



Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA  
Departamento de Alimentos e Nutrição - DEPAN

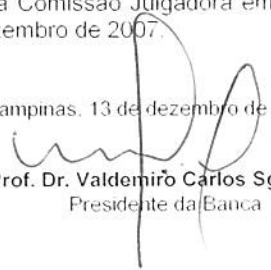
**ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE E GELATINA BOVINA:**  
**Caracterização Físico-Química, Nutricional e tecnológica para o**  
**desenvolvimento de um produto geleificado.**

**JANESCA ALBAN ROMAN**  
Tecnóloga de Alimentos

PARECER

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por **Janesca Alban Roman** aprovado pela Comissão Julgadora em 13 de dezembro de 2007.

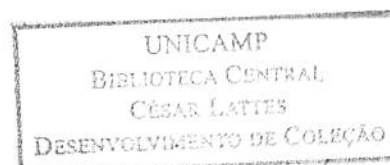
Campinas, 13 de dezembro de 2007

  
Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri  
Presidente da Banca

**Prof. Dr. VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI**  
Orientador

Campinas - SP

2007







JANESCA ALBAN ROMAN

**ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE E GELATINA BOVINA:**

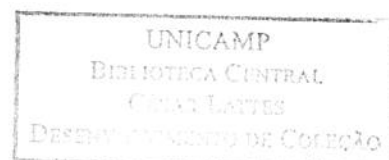
**Caracterização Físico-Química, Nutricional e tecnológica para o desenvolvimento de um produto geleificado.**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Doutor em Alimentos e Nutrição - Área de Nutrição Básica Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

**Orientador:** Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Campinas - SP

2007



UNIDADE BC  
Nº CHAMADA: \_\_\_\_\_  
T/UNICAMP R661i  
V. \_\_\_\_\_ EX. \_\_\_\_\_  
TOMBO BCCL 15611  
PROC 16-129-08  
C \_\_\_\_\_ D x  
PREÇO 11,00  
DATA 18-02-08  
BIB-ID 423779

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R661i Roman, Janesca Alban  
Isolado protéico de soro de leite e gelatina bovina: caracterização físico-química, nutricional e tecnológica para o desenvolvimento de um produto geleificado / Janesca Alban Roman. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Isolado protéico. 2. Gelatina. 3. Análise sensorial. I. Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Milk whey protein concentrate and bovine gelatin: physic chemical characterization, nutritional and technological development of jellified products

Área de concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Palavras-chave em inglês (Keywords): Whey protein, Gelatin, Sensory analysis

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Valdemiro Carlos Sgarbieri

Flávia Maria Netto

Célio Kenji Miyauaka

Maria Isabel Rodríguez

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Saraspathy Naidoo Naidoo Terroso Gama de Mendonça

Data de defesa: 12-12-2007

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

**ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE E GELATINA BOVINA:**

**Caracterização Físico-Química, Nutricional e tecnológica para o desenvolvimento de um produto geleificado.**

**BANCA EXAMINADORA**



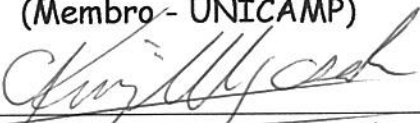
---

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri  
(Orientador - UNICAMP)



---

Prof. Dra. Flávia Maria Netto  
(Membro - UNICAMP)



---

Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka  
(Membro - UNICAMP)



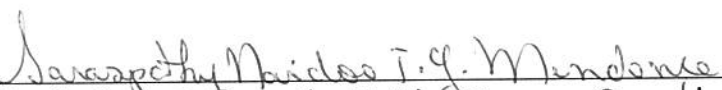
---

Profa. Dra. Maria Izabel Rodrigues  
(Membro - UNICAMP)



---

Profa. Dra. Maria Tereza Bertoldo Pacheco  
(Membro - ITAL)



---

Profa. Dra. Saraspathy Naidoo Terroso Gama de Mendonça  
(Membro - UTFPR)



*"Sem esforço de nossa parte  
jamais atingiremos o alto da montanha.*

*Não desanime no meio da estrada:  
siga à frente, porque os horizontes se  
tornarão amplos e maravilhosos à  
medida que for subindo.*

*Mas não se iluda,  
pois só atinge o topo da montanha  
se estiver decidido a enfrentar o  
esforço da caminhada".*

(Carlos Torres Pastorino)



***"Não é no silêncio que os homens se fazem,  
mas na palavra, no trabalho, na ação-reação"***

(Paulo Freire)





Aos que sempre acreditaram e acima de tudo confiaram em mim...

Aos meus pais **Sérgio e Clédis**,  
pelo amor, doação, apoio, carinho e pelas orações constantes, dando-me coragem  
para sempre prosseguir;

Ao meu esposo **Evandro**,  
pelo amor, respeito, apoio, carinho, paciência, exemplo de caráter e determinação.  
Você é o "responsável" por mais essa nossa conquista;

A minha querida **Família**,  
minhas irmãs Fernanda e Sergiane, meus cunhados Celso e Joci, minha avó Gema,  
minha tia Zizele, meus sobrinhos João Miguel, Felipe Gabriel e Pedro Henrique (que  
está a caminho) pela eterna torcida pela minha realização profissional.

**Dedico**



## **AGRADECIMENTOS**

**A Faculdade de Engenharia de Alimentos / UNICAMP,**  
especialmente ao Departamento de Alimentos e Nutrição.

**À FAPESP e a GELITA®,**  
pelo auxílio financeiro indispensável  
à realização desta pesquisa.

**Ao INRA,**  
Institute National de la Recherche Agronomique  
pela oportunidade de estagio em Rennes- França.

**A UTFPR,**  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
pela oportunidade de realização profissional.



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **DEUS**, por iluminar minhas decisões, guiar meus passos e acima de tudo, pelos obstáculos vencidos e conquistas alcançadas.

A **Nossa Senhora desatadora dos nós**, pela constante proteção e por preencher de bênçãos minha vida.

Ao Prof. Dr. **Valdemiro Carlos Sgarbieri**, além de preciosa orientação científica, nos prestigia com sua compreensão, bom humor e respeito. Agradeço pela oportunidade de estágio na França, pela amizade e pelo longo período de estadia “suíte máster”, “cafofo”, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho. E a sua fiel companheira **Astrid**, pelo carinho e atenção a mim dedicada em todo esse período.

Aos **professores membros da banca**, pelas sugestões e contribuições apresentadas em um curtíssimo prazo de tempo, possibilitando a defesa em dezembro.

Ao Prof. Dr. **Célio Miyasaka**, pela colaboração, amizade e pôr disponibilizar o laboratório de Nutrição e Metabolismo para a execução de grande parte desse trabalho.

A Prof. Dr. **Flavia**, pelos ensinamentos e por acompanhar com atenção as etapas desse trabalho, no laboratório, nas bancas de qualificação e na defesa.

A Prof. Dr. **Saraspathy**, minha fonte de inspiração, desde meu segundo grau técnico, um exemplo de pessoa querida, abençoada, com seu jeito meigo e dócil sempre disposta a ajudar a todos, registro aqui meu carinho e admiração, bem como por seu filho **William**, exemplo de perseverança.



A Prof. Dr. **Maria Izabel (Bel)**, pela paciência, dedicação e pelo excelente livro que auxilia no desenvolvimento de muitas dissertações e teses envolvendo planejamento de experimentos, por quem tenho muita admiração.

Ao **Guilherme e Daniel** (discípulos da Bel), de forma voluntária me orientaram na execução do planejamento experimental.

A todos da secretaria de Pós-graduação, em especial ao **Cosme** pela paciência e dedicação, estando sempre disposto a ajudar com competência e a Prof. **Florência**, por compreender minha situação e agilizar o processo da defesa.

A todos os funcionários do DEPAN: **Fátima, Cidinha, Chico, Eliana, Karla, Chico, Lia, Nice e Soely**, pela amizade e convívio. Cada um de vocês foi muito importante durante minha caminhada. A Fátima pelos momentos de alegria, sempre de bom humor, festas de aniversário e pelas inúmeras resoluções de problemas de informática; a Cidinha pelo lado humano, incondicional, transformando muitas coisa de impossíveis para possíveis. A Eliana pelo auxílio técnico nas análises laboratoriais e o Chico pela sua bondade e disposição nas análises de textura, é muito bom ter sua amizade. Serei eternamente grata!

Aos meus amigos e companheiros de laboratório de nutrição e metabolismo: **Cláudia, Cristiane, Elisvânia, Fabiane, Laura, Luciano, Maria Inês e Pablo**, pela ajuda, incentivo, compreensão e amizade. Vou sentir falta das confraternizações e dos amigos secretos organizados com muito bom humor pelo prof. Célio.

As minhas queridas amigas de todas as horas, **Maria Inês e Fabiane**. Sem palavras para agradecer tudo o que elas sempre fizeram por mim: pelos momentos de trabalho no laboratório, pelos inúmeros almoços no “bandejão”, por me acolherem em suas casas, pelos conselhos, carinho, amizade e bons momentos que passamos. Obrigada por toda a atenção e dedicação. Sentirei saudades!





Aos professores do **colegiado de nutrição** da FAG, pela experiência profissional, pelo aprendizado, e pelas amizades que fiz, agradeço pelo apoio, incentivo.

As minhas amadas nutricionistas **Ana Flávia, Elis Carolina, Gersislei e Rosângela**, pela amizade, estímulo, compreensão nos momentos difíceis e pelos vários momentos de confraternização. Sinto muita falta do convívio diário com vocês.

Aos meus queridos alunos de TCC: **Clecy, Cris, Dani, Fer, Gaby, Grazi e Mari** sempre dedicados, motivados e atenciosos. Agora somos colegas de profissão. Saibam que sempre poderão contar comigo.

As amigas-irmãs que a vida me trouxe: **Maribel, Júlia Mattei e Margareth Saron**.

A minha querida amiga **Sandra**, que sempre me incentivou nos momentos difíceis, de intenso trabalho e viagens semanais de ônibus, sempre de coração aberto, disposta a me escutar, me incentivando em todos os momentos.

A minha família de coração: **Eumita, Wander, Wagner e Simone**, pelo apoio, incentivo, orações, compreensão sempre torcendo por minhas conquistas.

A minha querida amiga e companheira, **Marli**, sempre me ajudando nas tarefas mais diversas, por preparar meus “lanchinhos” para a longa viagem de ônibus (16 horas), me auxiliar nas organizações de documentos, por muitas vezes me levar e buscar na rodoviária, enfim por cuidar de mim com muito carinho. Aqui registro minha gratidão.

A família Roman, em especial, **Isa, Jaque, Ro**, pelas orações e incentivos durante toda minha caminhada. Ao **Pablo (Zé)**, pela amizade, pela compreensão de minha ausência, por divertidos momentos que passamos em família, ao lado da Piti e Chalana, pelas latas de doce de leite, pizza, passeios no shopping, no cinema...



A **Letícia**, muito mais que minha professora de francês, uma grande amiga. Agradeço pelos conselhos, longas conversas, incentivo, passeios no Paraguai, as caminhadas no lago, jantares e os momentos únicos vividos. *Merci beacoup!*

**Aos servidores da UTFPR**, campus Toledo-PR, formarem minha segunda família, pelo aprendizado constante e pela amizade e por participarem da análise sensorial. A profa. **Raquel** pelas correções finais da tese. Ao **Beto, Gilberto e Simone**, por compreenderem e apoiarem a etapa final de meu trabalho, pois além de excelentes profissionais, são muito acessíveis. Essa conquista em 2007 foi possível pelo apoio de vocês.

Aos voluntários que participaram da análise sensorial da gelatina, possibilitando a execução da pesquisa, em especial aos alunos **Aline, Ana, Douglas** e aos servidores, **Elizane, Juliany, Nelson, Taís, Rafael Klein e Rafael Davis**, que disponibilizaram parte de seu tempo para me auxiliarem na codificação das amostras, nas análises laboratoriais, nas elaborações e testes preliminares de degustação das formulações de gelatina.

Aos **alunos do curso técnico de gastronomia** por torcerem por mim e por me incentivarem a cada dia, a buscar novos conhecimentos.

Aos **amigos distantes**, os quais mesmo de longe sempre torceram por mim.

A **todos os amigos(as), alunos(as)**, que encontrei nesta jornada!

*A todas as pessoas que não foram mencionadas e que de alguma forma  
contribuíram para a realização deste trabalho.*

*Muito obrigada!*

*Janesca*



## ÍNDICE

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| LISTA DE QUADROS.....           | xxviii |
| LISTA DE TABELAS .....          | xxix   |
| LISTA DE FIGURAS .....          | xxxv   |
| NOMENCLATURA E ABREVIACÕES..... | xliii  |
| RESUMO GERAL.....               | xliv   |
| GENERAL SUMMARY.....            | xlvi   |

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| <b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b> | <b>1</b> |
|------------------------------|----------|

|                                          |          |
|------------------------------------------|----------|
| <b>CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA</b> | <b>9</b> |
|------------------------------------------|----------|

---

|                                                                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>ARTIGO 1: Composição e propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais da gelatina e das proteínas do soro de leite bovino</i> ..... | 11        |
| <b>1 COMPOSIÇÃO E VALOR NUTRITIVO DA GELATINA E PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO.....</b>                                                 | <b>11</b> |
| 1.1 Gelatina.....                                                                                                                          | 11        |
| 1.2 Proteínas do leite.....                                                                                                                | 14        |
| <b>2 PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS DAS PROTEÍNAS E PEPTÍDIOS DO SORO DE LEITE E DA GELATINA.....</b>                                           | <b>18</b> |
| <b>3 PROPRIEDADES GELEIFICANTES.....</b>                                                                                                   | <b>25</b> |
| 3.1 Propriedades geleificantes da gelatina.....                                                                                            | 27        |
| 3.2 Propriedades geleificantes do soro de leite: WPI, $\beta$ -lg.....                                                                     | 28        |
| 3.3 Géis Mistos.....                                                                                                                       | 31        |
| <b>4 TEXTURA EM ALIMENTOS.....</b>                                                                                                         | <b>35</b> |
| 4.1 Tipos de testes.....                                                                                                                   | 36        |
| 4.2 Tipos de instrumentos.....                                                                                                             | 37        |
| <b>5 ANÁLISE SENSORIAL.....</b>                                                                                                            | <b>38</b> |
| <b>6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>                                                                                                    | <b>40</b> |

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| 6.1 Planejamento fatorial e <i>Screening Design</i> ..... | 41        |
| <b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                  | <b>42</b> |

## **CAPÍTULO II: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE BOVINO (WPI) 71**

---

|                                                                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>ARTIGO 1: Obtenção em planta piloto, composição e caracterização analítica de um isolado protéico de soro de leite bovino (WPI)</i> ..... | 73        |
| RESUMO.....                                                                                                                                  | 73        |
| SUMMARY.....                                                                                                                                 | 74        |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                     | <b>74</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                             | <b>76</b> |
| 2.1. Produção de isolado protéico de soro de leite bovino (WPI).....                                                                         | 76        |
| 2.2 Caracterização do isolado protéico de soro de leite (WPI).....                                                                           | 78        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                         | <b>81</b> |
| 3.1 Composição Centesimal.....                                                                                                               | 81        |
| 3.2 Composição em aminoácidos.....                                                                                                           | 82        |
| 3.3 Perfil eletroforético.....                                                                                                               | 86        |
| 3.4 Perfil cromatográfico do WPI.....                                                                                                        | 88        |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                      | <b>82</b> |
| <b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                     | <b>92</b> |

|                                                                                                                                                                                                          |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>ARTIGO 2: Hidrólise enzimática e caracterização cromatográfica e por espectrometria de massa de peptídios do isolado proteico do soro de leite (WPI) e da <math>\beta</math>-lactoglobulina</i> ..... | 99         |
| RESUMO.....                                                                                                                                                                                              | 99         |
| SUMMARY.....                                                                                                                                                                                             | 100        |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                                                                                 | <b>100</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                                                                         | <b>102</b> |
| 2.1 Hidrólise enzimática.....                                                                                                                                                                            | 104        |

|                                                                           |            |
|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.2 Fracionamento dos peptídios por cromatografia de troca iônica – FPLC. | 104        |
| 2.3 Caracterização dos peptídios fracionados em RP-HPLC.....              | 105        |
| 2.4 Espectrometria de Massa.....                                          | 106        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                      | <b>107</b> |
| 3.1 Separação por cromatografia de troca iônica (FPLC).....               | 107        |
| 3.2 Caracterização em função da hidrofobicidade (RP-HPLC).....            | 111        |
| 3.3 Caracterização de peptídios por espectrometria de massa.....          | 113        |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                                   | <b>126</b> |
| <b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                  | <b>126</b> |

## **CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO DE GÉIS MISTOS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE BOVINO E GELATINA BOVINA**

**131**

---

|                                                                                                                       |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>ARTIGO 1: Caracterização físico-química do isolado proteico de soro de leite e gelatina de origem bovina</i> ..... | <b>133</b> |
| RESUMO.....                                                                                                           | 133        |
| SUMMARY.....                                                                                                          | 134        |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                              | <b>134</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                      | <b>136</b> |
| 2.1 Determinação do perfil de aminoácidos.....                                                                        | 136        |
| 2.2 Determinação da composição centesimal.....                                                                        | 137        |
| 2.3 Determinação de grupos sulfidril livres (SH).....                                                                 | 137        |
| 2.4 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....                                              | 138        |
| 2.5 Solubilidade da mistura protéica em função do pH.....                                                             | 138        |
| 2.6 Análise estatística.....                                                                                          | 139        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                  | <b>139</b> |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                               | <b>148</b> |
| <b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                              | <b>149</b> |

|                                                                                                                                              |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ARTIGO 2: Características gerais e perfil de textura de géis mistos de isolado proteico de soro de leite (WPI) e gelatina bovina (GB)</b> | <b>155</b> |
| RESUMO.....                                                                                                                                  | 155        |
| SUMMARY.....                                                                                                                                 | 156        |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                     | <b>156</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                             | <b>158</b> |
| 2.1 Testes preliminares de geleificação.....                                                                                                 | 159        |
| 2.2 Perfil de textura.....                                                                                                                   | 161        |
| 2.3 Capacidade de retenção de água (CRA).....                                                                                                | 163        |
| 2.4 Solubilidade dos géis.....                                                                                                               | 164        |
| 2.5 Análise estatística.....                                                                                                                 | 164        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                         | <b>165</b> |
| 3.1 Testes preliminares de geleificação.....                                                                                                 | 165        |
| 3.2 Perfil de textura.....                                                                                                                   | 169        |
| 3.3 Capacidade de retenção de água (CRA) dos géis.....                                                                                       | 175        |
| 3.4 Solubilidade (%SP) dos géis.....                                                                                                         | 176        |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                      | <b>178</b> |
| <b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                     | <b>178</b> |

|                                                                                                                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ARTIGO 3: Caracterização de géis mistos de isolado protéico de soro de leite (WPI) e gelatina bovina (GB): influência da concentração de proteína e do pH</b> | <b>183</b> |
| RESUMO.....                                                                                                                                                      | 183        |
| SUMMARY.....                                                                                                                                                     | 184        |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                                         | <b>185</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                                 | <b>186</b> |
| 2.1 Preparo dos géis mistos.....                                                                                                                                 | 186        |
| 2.2 Planejamento experimental completo.....                                                                                                                      | 187        |
| 2.3 Perfil de textura.....                                                                                                                                       | 188        |
| 2.4 Análise estatística.....                                                                                                                                     | 189        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                             | <b>189</b> |



|                                                         |            |
|---------------------------------------------------------|------------|
| 3.1 Perfil de textura dos géis mistos.....              | 189        |
| 3.2 Análise dos efeitos.....                            | 195        |
| 3.3 Análise dos coeficientes variância e regressão..... | 197        |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                 | <b>202</b> |
| <b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                | <b>202</b> |

***ARTIGO 4: Caracterização de géis mistos de isolado protéico de soro de leite (WPI) e gelatina bovina (GB): influência da concentração de proteína, temperatura e tempo de aquecimento***..... **207**

|                                                          |            |
|----------------------------------------------------------|------------|
| RESUMO.....                                              | 207        |
| SUMMARY.....                                             | 208        |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                 | <b>209</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                         | <b>210</b> |
| 2.1. Delineamento Experimental.....                      | 210        |
| 2.2 Perfil de textura.....                               | 212        |
| 2.3 Aspecto visual.....                                  | 213        |
| 2.4 Análise estatística.....                             | 213        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                     | <b>213</b> |
| 3.1 Perfil de textura dos géis mistos.....               | 213        |
| 3.2 Análise dos efeitos.....                             | 218        |
| 3.3 Análise de variância e coeficiente de regressão..... | 220        |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                  | <b>227</b> |
| <b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                 | <b>227</b> |

***ARTIGO 5: Caracterização do perfil de textura de géis de gelatina (GB) e da mistura WPI/GB (60:40%): influência da concentração de proteína e da temperatura***..... **233**

|                                                |            |
|------------------------------------------------|------------|
| RESUMO.....                                    | 233        |
| SUMMARY.....                                   | 234        |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                       | <b>235</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>               | <b>236</b> |
| 2.1 Determinação da composição centesimal..... | 237        |

|                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.2 Delineamento Experimental.....                                   | 237        |
| 2.3 Perfil de textura.....                                           | 239        |
| 2.4 Análise estatística.....                                         | 240        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                 | <b>240</b> |
| 3.1 Caracterização das amostras.....                                 | 240        |
| 3.2 Géis de isolado protéico de soro de leite (WPI).....             | 241        |
| 3.3 Géis de gelatina.....                                            | 242        |
| 3.3.1 Análise dos efeitos.....                                       | 245        |
| 3.3.2 Análise de variância e coeficientes de regressão.....          | 247        |
| 3.4 Comparação dos géis de gelatina com os géis mistos (WPI:GB)..... | 251        |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                              | <b>255</b> |
| <b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                             | <b>255</b> |

|                                                                                                                                |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>CAPÍTULO IV: ELABORAÇÃO DE UM PRODUTO<br/>GELEIFICADO À BASE DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO<br/>DE LEITE E GELATINA BOVINA</b> | <b>261</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

---

|                                                                                                                                                 |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b><i>ARTIGO 1: Análise físico-química, microbiológica, sensorial e<br/>atitude do consumidor de gelatina de elevado valor nutricional.</i></b> | <b>263</b> |
| RESUMO.....                                                                                                                                     | 263        |
| SUMMARY.....                                                                                                                                    | 264        |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                        | <b>264</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                | <b>266</b> |
| 2.1 Testes preliminares de geleificação.....                                                                                                    | 267        |
| 2.2 Elaboração das formulações .....                                                                                                            | 267        |
| 2.3 Caracterização das formulações.....                                                                                                         | 268        |
| 2.4 Estimativa do valor nutricional.....                                                                                                        | 269        |
| 2.5 Critérios éticos.....                                                                                                                       | 270        |
| 2.6 Análise sensorial.....                                                                                                                      | 270        |

|                                                      |            |
|------------------------------------------------------|------------|
| 2.7 Atitude do consumidor em relação à gelatina..... | 272        |
| 2.8 Análise estatística.....                         | 273        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                 | <b>273</b> |
| 3.1 Composição físico-química das formulações.....   | 273        |
| 3.2 Informações nutricionais.....                    | 276        |
| 3.3 Análise sensorial.....                           | 277        |
| 3.4 Atitude do consumidor em relação à gelatina..... | 282        |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                              | <b>286</b> |
| <b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>             | <b>286</b> |

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| <b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b> | <b>293</b> |
|--------------------------------|------------|

|                     |            |
|---------------------|------------|
| <b>ANEXOS .....</b> | <b>297</b> |
|---------------------|------------|

|                                                          |     |
|----------------------------------------------------------|-----|
| Anexo A: Parecer comitê de ética.....                    | 299 |
| Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido..... | 303 |
| Anexo C: Ficha de análise sensorial.....                 | 309 |
| Anexo D: Questionário.....                               | 313 |

|                        |            |
|------------------------|------------|
| <b>APÊNDICES .....</b> | <b>317</b> |
|------------------------|------------|

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| Apêndice A: Nomenclatura de aminoácidos.....                  | 319 |
| Apêndice B: Artigo publicado Revista Brazilian Journal, ..... | 323 |
| Apêndice C: Apresentação trabalho oral – Florianópolis.....   | 333 |
| Apêndice D: Posters apresentados em congressos.....           | 341 |

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO 1

|                 |                                                                           |           |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Quadro 1</b> | Proteínas fisiologicamente ativas secretados no leite bovino...           | <b>19</b> |
| <b>Quadro 2</b> | Ficha de avaliação com escala hedônica estruturada mista de 9 pontos..... | <b>43</b> |

### CAPÍTULO 4

|                 |                                                                                                       |            |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Quadro 1</b> | Informações nutricionais da gelatina formulada (GM2) comparadas a de uma gelatina comercial (GC)..... | <b>277</b> |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

---

|                 |                                                                            |           |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1</b> | Classificação das proteínas do leite: caseínas e proteínas do soro.....    | <b>15</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Alterações físicas e químicas que induzem a gelatinização da proteína..... | <b>27</b> |

### CAPÍTULO II

---

#### Artigo 1

|                 |                                                                                                                                                                                       |           |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1</b> | Caracterização química parcial do leite bovino desnatado e de um isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) produzido em planta piloto, de acordo com fluxograma da Figura 1..... | <b>82</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Perfil de aminoácidos (g/100g) do WPI produzido, comparado com dados da literatura.....                                                                                               | <b>83</b> |
| <b>Tabela 3</b> | Determinação das massas moleculares correspondentes a 8 bandas identificadas no WPI pela eletroforese, comparadas aos dados da literatura.....                                        | <b>87</b> |

#### Artigo 2

|                 |                                                                                                                                                          |            |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabela 1</b> | Identificação dos peptídeos de isolado proteico de soro de leite bovino (WPI) hidrolisado com tripsina.....                                              | <b>116</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Resultados da espectrometria de massa da amostra de isolado proteico de soro de leite bovino (WPI) fração D, com e sem adição de ditiotreitol (DTT)..... | <b>117</b> |
| <b>Tabela 3</b> | Identificação dos peptídeos de $\beta$ -lactoglobulina hidrolisada com tripsina.....                                                                     | <b>112</b> |

|                 |                                                                                                                                            |            |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabela 4</b> | Comparação das características físico-químicas dos peptídeos obtidos por hidrólise enzimática com tripsina entre o WPI e $\beta$ -Lg ..... | <b>122</b> |
| <b>Tabela 5</b> | Identificação dos peptídeos da fração D da $\beta$ -Lactoglobulina separada por FPLC.....                                                  | <b>124</b> |

### **CAPÍTULO III**

---

#### **Artigo 1**

|                 |                                                                                                                                                                                                                          |            |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabela 1</b> | Composição centesimal do isolado proteico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina, mistura protéica WPI/gelatina na proporção 60:40%.....                                                                         | <b>140</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Composição de aminoácidos essenciais dos produtos: isolado proteico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina, mistura 60:40 WPI/gelatina base protéica, comparada aos padrões de referência da FAO/WHO (1990)..... | <b>141</b> |
| <b>Tabela 3</b> | Teor de grupos sulfidril livres (SH), nas amostras de isolado proteico de soro de leite bovino (WPI) e mistura WPI:GB na proporção 60:40.....                                                                            | <b>143</b> |
| <b>Tabela 4</b> | Temperaturas de desnaturação (Td) e alterações de entalpia ( $\Delta H$ ) com a desnaturação térmica do isolado proteico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina (GB) e mistura WPI: GB na proporção 60:40.....   | <b>144</b> |

#### **Artigo 2**

|                 |                                                                                                                                                            |            |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabela 1</b> | Níveis das variáveis na avaliação do perfil de textura de géis mistos, utilizando planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ).....                     | <b>162</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Matriz do planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ), estudando-se 4 variáveis, por meio de 11 ensaios, incluindo 3 pontos centrais (9, 10, 11) ..... | <b>163</b> |

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                         |            |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabela 3</b> | Avaliação da formação de gel, contendo 5% de proteína, em diferentes proporções de WPI:GB, temperatura de aquecimento e pH.....                                                                                                                         | <b>166</b> |
| <b>Tabela 4</b> | Avaliação da formação dos géis (tampão fosfato pH 6,5), em diferentes concentrações de proteína, e de temperatura, proporção WPI:GB 60:40%.....                                                                                                         | <b>166</b> |
| <b>Tabela 5</b> | Avaliação das características sensoriais dos géis mistos de WPI e GB, com variação na concentração de proteína (%), pH, temperatura (T) e tempo de aquecimento (t).....                                                                                 | <b>170</b> |
| <b>Tabela 6</b> | Efeitos do perfil de textura dos géis (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade) mistos 60% WPI e 40% GB, determinados através das variáveis estudadas no planejamento ( $2^{4-1}$ ) fatorial fracionário..... | <b>173</b> |

### **Artigo 3**

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                            |            |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabela 1</b> | Níveis das variáveis do perfil de textura, utilizando delineamento composto central rotacional: influência da concentração de proteína (%P) e do pH.....                                                                                                                                   | <b>187</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Matriz do delineamento composto central rotacional, com as variáveis codificadas e reais, em função da concentração de proteína (%P) e do pH, totalizando 11 ensaios.....                                                                                                                  | <b>188</b> |
| <b>Tabela 3</b> | Influência da concentração de proteína (%P) e do pH na dureza, mastigabilidade (mastig.), gomosidade (gomo.), elasticidade (elast.) e coesividade, (coes.) de géis mistos.....                                                                                                             | <b>189</b> |
| <b>Tabela 4</b> | Coefficientes de regressão para as respostas dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade de géis mistos aquecidos por 30 minutos em diferentes concentrações de proteína e pH (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade)..... | <b>195</b> |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |            |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabela 5</b>     | Análise de variância e coeficiente de determinação a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ) de géis mistos (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade).....                                                                                                    | <b>197</b> |
| <b>Tabela 6</b>     | Equações quadráticas que expressam os atributos de textura estudados para os géis mistos com influência da concentração de proteína e do pH.....                                                                                                                                                   | <b>198</b> |
| <br><b>Artigo 4</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |            |
| <b>Tabela 1</b>     | Níveis das variáveis do perfil de textura, utilizando delineamento composto central rotacional: influência da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento dos géis mistos.....                                                                                                        | <b>211</b> |
| <b>Tabela 2</b>     | Matriz do delineamento composto central rotacional, com as variáveis codificadas e reais, fixando-se o tempo de aquecimento, totalizando 11 ensaios.....                                                                                                                                           | <b>212</b> |
| <b>Tabela 3</b>     | Influência da concentração de proteína (%P), temperatura ( $T^{\circ}\text{C}$ ) e tempo de aquecimento na dureza, mastigabilidade (mastig.), gomosidade (gomo.), elasticidade (elast.) e coesividade, (coes.) de géis mistos (*não analisado; <sup>1</sup> medidas adimensionais).....            | <b>213</b> |
| <b>Tabela 4</b>     | Coeficientes de regressão para as respostas dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade de géis mistos aquecidos por 30 minutos em diferentes concentrações de proteína e temperatura (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade)..... | <b>219</b> |
| <b>Tabela 5</b>     | Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para cada fator no modelo codificado para a dureza dos géis mistos, contendo 60% de WPI e 40% GB.....                                                                                                                         | <b>220</b> |
| <b>Tabela 6</b>     | Análise de variância e coeficiente de determinação a 95% de                                                                                                                                                                                                                                        |            |



confiança ( $p \leq 0,05$ ) de géis mistos (mastig=mastigabilidade, gomo=gomosidade, elast=elasticidade, coes= coesividade)... 221

## Artigo 5

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1</b> | Níveis das variáveis na avaliação do perfil de textura de géis mistos, utilizando-se delineamento composto central rotacional: influência da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento.....                                                                                              | 252 |
| <b>Tabela 2</b> | Matriz do delineamento composto central rotacional, com as variáveis codificadas e reais em função da concentração de proteína (%) e temperatura (T °C).....                                                                                                                                            | 239 |
| <b>Tabela 3</b> | Composição centesimal do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina (GB), mistura protéica WPI/GB na proporção 60:40%.....                                                                                                                                                         | 241 |
| <b>Tabela 4</b> | Géis mistos em função da concentração de proteína (%P) e temperatura (T°C), analisado quanto ao perfil de textura (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, coes= coesividade, elast= elasticidade).....                                                                                              | 243 |
| <b>Tabela 5</b> | Coefficiente de regressão para as repostas: dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade de géis de gelatina aquecidos por 30 minutos em diferentes concentrações de proteína e temperatura (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade)..... | 245 |
| <b>Tabela 6</b> | Análise de variância e coeficiente de determinação a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ) de géis de gelatina (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade).....                                                                                                    | 247 |
| <b>Tabela 7</b> | Equações quadráticas que expressam os atributos de textura estudados para os géis de gelatina com influência da concentração de proteína e da temperatura.....                                                                                                                                          | 248 |

## CAPÍTULO IV

---

### Artigo 1

|                 |                                                                                                                                                                                                                    |            |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabela 1</b> | Composição das formulações de gelatina (base seca) contendo isolado protéico de soro de leite bovino (GM1, GM2, GM3).....                                                                                          | <b>268</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Caracterização físico-química (g/100g) das formulações de gelatinas, adicionadas de isolado protéico de soro de leite (GM1, GM2, GM3) em comparação a uma gelatina comercial (GC).....                             | <b>273</b> |
| <b>Tabela 3</b> | Composição de aminoácidos essenciais dos produtos: isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina, mistura 60:40 WPI/GB, base protéica, comparados ao padrão de referência da FAO/WHO (1990)..... | <b>274</b> |
| <b>Tabela 4</b> | Caracterização microbiológica das gelatinas formuladas adicionadas de isolado protéico de soro de leite (GM1, GM2, GM3) em comparação a uma gelatina comercial (GC).....                                           | <b>276</b> |
| <b>Tabela 5</b> | Atitude do consumidor em relação à gelatina.....                                                                                                                                                                   | <b>285</b> |

# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO I

---

|                 |                                                  |           |
|-----------------|--------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1</b> | Estrutura química da gelatina (POPPE, 1997)..... | <b>13</b> |
|-----------------|--------------------------------------------------|-----------|

## CAPÍTULO II

---

### Artigo 1

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1</b> | Fluxograma de processamento do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), através dos processos de microfiltração, ultrafiltração, diafiltração e liofilização, realizado no INRA, Rennes-França.....                                                                                                                                          | <b>77</b> |
| <b>Figura 2</b> | Comparação do teor de aminoácidos essenciais do isolado protéico de soro de leite bovino (produzido), com valores da literatura (ETZEL, 2004) e com o padrão da FAO (1990).....                                                                                                                                                                     | <b>85</b> |
| <b>Figura 3</b> | Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE dos produtos obtidos durante o processamento de obtenção do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI): 1) leite desnatado 2) microfiltrado 0,1 $\mu$ 3) retentado diafiltrado 4) WPI 5) permeado 8Kd e 6) concentrado de caseína, PMM (padrão de massas moleculares, Amershan Biosciences)..... | <b>86</b> |
| <b>Figura 4</b> | Perfil cromatográfico obtido em RP-HPLC, do isolado protéico de soro bovino (WPI) produzido através dos processos de separação em membranas.....                                                                                                                                                                                                    | <b>89</b> |
| <b>Figura 5</b> | Perfil cromatográfico obtido em RP-HPLC (25-50min) do isolado protéico de soro bovino (WPI) produzido através dos processos de separação em membranas comparado com frações puras de $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La) e albumina de soro bovino (BSA).....                                            | <b>88</b> |

## **Artigo 2**

|                 |                                                                                                                                                                                                                  |            |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figura 1</b> | Seqüência metodológica: hidrólise enzimática com tripsina, FPLC (cromatografia de troca iônica), RP-HPLC (cromatografia de fase reversa) espectrometria de massa (P:pressão, T:temperatura, C:concentração)..... | <b>103</b> |
| <b>Figura 2</b> | Perfil cromatográfico (FPLC) das amostras de WPI e $\beta$ -Lg em 214 nm no gradiente se 46-100% de Tampão B.....                                                                                                | <b>108</b> |
| <b>Figura 3</b> | Perfis cromatográficos dos hidrolisados de WPI e $\beta$ -lactoglobulina, obtidos por cromatografia de troca iônica, FPLC, durante 45 minutos.....                                                               | <b>110</b> |
| <b>Figura 4</b> | Perfil cromatográfico dos hidrolisados de WPI e $\beta$ -Lg hidrolisadas por 22 horas. Baixa hidrofobicidade (I), II hidrofobicidade intermediária (II) ou hidrofobicidade alta (III).....                       | <b>112</b> |
| <b>Figura 5</b> | Espectros de massa do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) após hidrólise de 22h com tripsina, hidrolisado total sem DTT (A) e com DTT (B).....                                                        | <b>115</b> |
| <b>Figura 6</b> | Espectrometria de massa do isolado proteico de soro de leite bovino (WPI) após hidrólise de 22h com tripsina, fração D, sem DTT (A) e com DTT(B).....                                                            | <b>118</b> |
| <b>Figura 7</b> | Espectrometria de massa da $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) após hidrólise com tripsina, sem DTT(A) e com DTT(B).....                                                                                      | <b>122</b> |
| <b>Figura 8</b> | Espectrometria de massa da $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) após hidrólise de 22h com tripsina, fração D, (A) sem DTT e (B) com DTT.....                                                                   | <b>125</b> |

## **CAPÍTULO III**

### **Artigo 1**

|                 |                                                                                                                                                      |            |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figura 1</b> | Composição de aminoácidos não-essenciais do WPI (isolado proteico de soro de leite bovino), gelatina bovina e mistura WPI:GB na proporção 60:40..... | <b>142</b> |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figura 2</b>     | Calorimetria diferencial de varredura (DSC) das amostras: A) WPI, B) mistura WPI 60% e GB 40% e C) GB.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>145</b> |
| <b>Figura 3</b>     | Representação do perfil de solubilidade do isolado proteico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina (GB) e da mistura WPI:GB na proporção 60:40, em diferentes pHs em água e em solução de 0,1M de NaCl. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as amostras estudadas no mesmo pH. Letras minúsculas diferentes indicam resultados estatísticos da mesma amostra em função do pH.... | <b>147</b> |
| <br><b>Artigo 2</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |
| <b>Figura 1</b>     | Curva típica do perfil de textura obtido em texturômetro TAX-T <sub>2</sub> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>161</b> |
| <b>Figura 2</b>     | Curvas de calibração para a determinação de proteína pelo método do Biureto. y= absorbância, x= concentração e r= coeficiente de correlação.....                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>165</b> |
| <b>Figura 3</b>     | Avaliação da dureza dos géis em função do tempo de estocagem de 1 a 26 horas, armazenados sob refrigeração a 5°C.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>169</b> |
| <b>Figura 4</b>     | Influência da % de proteína, pH, tempo e temperatura de aquecimento, tendo-se como respostas dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade de géis mistos, contendo 60% WPI e 40% GB, obtidos por planejamento fatorial fracionário.....                                                                                                                                                              | <b>171</b> |
| <b>Figura 5</b>     | Efeitos das respostas de elasticidade e coesividade, tendo-se como variáveis a % de proteína, pH, temperatura e tempo de aquecimento.....                                                                                                                                                                                                                                                                               | <b>174</b> |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 6</b>     | Solubilidade dos géis de gelatina e de géis mistos, em água ou diferentes tampões, em temperatura de 25°C ± 3°C. Os géis foram elaborados contendo 6% de proteína e aquecidos a 65° por 30 minutos (Tampão A= 0,086M Tris, 0,09M glicina, 4mM EDTA dissódico – Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0; Tampão B= contendo solvente A mais 8M de uréia e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tampão C= solvente B + 10mM de ditioneitol -DTT). Letras iguais indicam que não houve diferenças estatísticas a 95% de confiança.....                                     | 177 |
| <br><b>Artigo 3</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
| <b>Figura 1</b>     | Análise da dureza (g-força), mastigabilidade <sup>1</sup> e gomosidade <sup>1</sup> de géis mistos de WPI:GB (60:40%). A- pH 6,5 e concentração de proteína 3,2; 6,0 e 8,8%; B- 6% de proteína e pH 5,1; 6,5 e 7,9. <sup>1</sup> adimensional. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas (p< 0,05) entre os atributos de textura, em função da variável independente (% proteína ou pH). Letras minúsculas indicam diferenças em função da variação da concentração de proteína ou pH para o mesmo atributo (dureza, mastigabilidade ou gomosidade)..... | 191 |
| <b>Figura 2</b>     | Influência da variação da concentração de proteína (3,2; 6,0 e 8,8) em géis elaborados em pH 6,5) (A) e em função do pH (5,1; 6,5 e 7,9) de géis mistos obtidos com 6% de proteína (B). Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas (p< 0,05) do mesmo atributo em diferentes condições de concentração de proteína ou pH. Letras minúsculas comparam as respostas de elasticidade e coesividade em função da concentração de proteína ou pH.....                                                                                                          | 193 |
| <b>Figura 3</b>     | Efeitos na dureza, mastigabilidade e gomosidade (A) e elasticidade e coesividade (B) de géis de gelatina. (*L: linear, **Q:quadrática).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 196 |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                    |            |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figura 4</b>     | Superfícies de resposta da mastigabilidade e gomosidade, tendo como variáveis independentes o pH e a concentração de proteína.....                                                                                                 | <b>200</b> |
| <b>Figura 5</b>     | Superfícies de resposta da elasticidade e coesividade, tendo como variáveis independentes o pH e a concentração de proteína.....                                                                                                   | <b>201</b> |
| <br><b>Artigo 4</b> |                                                                                                                                                                                                                                    |            |
| <b>Figura 1</b>     | Influência do tempo de aquecimento na dureza do gel misto, contendo 60% de isolado protéico de soro do leite (WPI) e 40% de gelatina bovina (60:40% WPI:GB). As linhas tracejadas indicam o valor ideal de dureza determinado..... | <b>216</b> |
| <b>Figura 2</b>     | Influencia do tempo de aquecimento na elasticidade e na coesividade de géis mistos contendo 60% de WPI e 40% de gelatina. ( <sup>1</sup> medidas adimensionais).....                                                               | <b>217</b> |
| <b>Figura 3</b>     | Curvas de contorno tendo como resposta dureza dos géis pela variação da concentração de proteína e da temperatura (°C) em diferentes tempos de aquecimento (min).....                                                              | <b>222</b> |
| <b>Figura 4</b>     | Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) relacionados com a resposta de dureza de géis de mistos após 30 minutos de aquecimento.....                                                                                   | <b>224</b> |
| <b>Figura 5</b>     | Superfícies de resposta (A) e gráficos de contorno (B) relacionados com a resposta de mastigabilidade e gomosidade de géis mistos aquecidos durante 30 minutos.....                                                                | <b>225</b> |
| <b>Figura 6</b>     | Superfícies de resposta (A) e gráficos de contorno (B) relacionados com a resposta de elasticidade e coesividade de géis de mistos aquecidos durante 30 minutos.....                                                               | <b>226</b> |

## **Artigo 5**

|                 |                                                                                                                                                                                                             |            |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figura 1</b> | Perfil de textura de géis de gelatina elaborados em pH 6,5, aquecidos durante 30min, variando-se a concentração de proteína (3,2 a 8,8%) e a temperatura de aquecimento (51-79°C).....                      | <b>244</b> |
| <b>Figura 2</b> | Efeitos na dureza, mastigabilidade e gomosidade (A), elasticidade e coesividade (B) de géis de gelatina. p:proteína, T:temperatura, *L: linear-L, **Q: quadrática.....                                      | <b>246</b> |
| <b>Figura 3</b> | Superfícies de resposta das variáveis de dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade de géis de gelatina em função da concentração de proteína e da temperatura.....                    | <b>250</b> |
| <b>Figura 4</b> | Comparação dos atributos de textura dos géis mistos (WPI 60: GB40), elaborados em tampão fosfato 0,05M, pH 6,5 e aquecidos a 65°C por 30 minutos, com géis de gelatina elaborados nas mesmas condições..... | <b>252</b> |
| <b>Figura 5</b> | Curvas de contorno da dureza dos géis de gelatina comparadas às do gel misto (60WPI:40GB) em função da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento....                                         | <b>253</b> |
| <b>Figura 6</b> | Superfície de resposta da dureza do gel de gelatina comparado ao gel misto (60WPI:40GB) em função da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento....                                           | <b>254</b> |

## **CAPÍTULO IV**

---

### **Artigo 1**

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                           |            |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figura 1</b> | Média de notas atribuídas pelos julgadores para os atributos de cor e aroma (A) e textura e sabor (B) para os produtos de gelatina contendo isolado protéico de soro de leite bovino (GM1, GM2 e GM3) em comparação com uma gelatina comercial (GC). .... | <b>279</b> |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|



|                 |                                                                                                                                                                                               |            |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figura 2</b> | Índice de Aceitabilidade (IA) das amostras de gelatina adicionadas de isolado protéico de soro de leite (GM1, GM2, GM3) comparadas a uma gelatina comercial (GC). Mínimo aceitável > 70%..... | <b>281</b> |
| <b>Figura 3</b> | Fatores relevantes para a escolha de produtos alimentícios.....                                                                                                                               | <b>283</b> |
| <b>Figura 4</b> | Motivo apontado pelos provadores que justificam o consumo de gelatina.....                                                                                                                    | <b>284</b> |



## NOMENCLATURA E ABREVIATÖES

|                    |                                              |
|--------------------|----------------------------------------------|
| abs                | Absorbância                                  |
| AOAC               | Association of Official Analytical Chemistys |
| ANVISA             | Agencia Ncional de Vigilância Sanitária      |
| $\alpha$ -La, a-la | $\alpha$ -Lactalbimuna                       |
| $\beta$ -Lb, b-Ig  | $\beta$ -Lactoblobulina                      |
| ANOVA              | Análise de variância                         |
| BSA                | Albumina do Soro Bovino                      |
| °C                 | Graus Centígrados                            |
| cm                 | Centímetro                                   |
| CRA                | Capacidade de retenção de água               |
| WPC                | Concentrado protéico de soro de leite        |
| Da                 | Dalton                                       |
| DCCR               | Delineamento composto central rotacional     |
| DSC                | Carolimetria diferencial de varredura        |
| DTT                | Ditiotreitol                                 |
| FHLP               | Cromatografia de troca iônica                |
| g                  | Gramas                                       |
| GB                 | Gelatina Bovina                              |
| h                  | Horas                                        |
| HPLC               | Cromatografia de Fase reversa                |
| Ig                 | Imunoglobulinas                              |
| INRA               | Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica    |
| Kda                | Kilo dalton                                  |
| M                  | Molaridade                                   |
| min                | Minutos                                      |
| mL                 | Mililitros                                   |
| mm                 | Milímetros                                   |
| n                  | Número absoluto                              |
| N                  | Normalidade                                  |
| pH                 | Potencial hidrogeniônico                     |

|     |                                                         |
|-----|---------------------------------------------------------|
| pl  | Ponto isoelétrico                                       |
| rpm | Rotações por minuto                                     |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio                                |
| SP  | Solubilidade protéica                                   |
| S-S | grupos dissulfeto                                       |
| t   | Tempo                                                   |
| T   | Temperatura                                             |
| TPA | Análise do perfil de textura (Textura Profile Analysis) |
| UE  | Umidade Espremível                                      |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia                            |
| WPC | Concentrado Protéico de Soro de Leite                   |
| WPI | Isolado Protéico de Soro do Leite                       |

## RESUMO GERAL

O isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) utilizado nesse trabalho foi obtido em planta piloto através do processo de separação em membrana, ultrafiltração, diafiltração e liofilização. O processo de obtenção do WPI foi realizado na planta piloto do Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica (INRA), Rennes–França. Obteve-se WPI com 96,8% de proteína (base seca) e 2,2% de resíduos minerais em condições microbiológicas adequadas para o consumo, com perfil de aminoácidos apresentando quantidades suficientes de todos os aminoácidos essenciais. O perfil eletroforético e a cromatografia em coluna comprovaram que o WPI é composto principalmente pelas frações  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La) além de outras proteínas presentes, como albumina de soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig) e outras em menores quantidades. A gelatina apresentou-se deficiente em relação a todos os aminoácidos essenciais e ausência de triptofano, apresentando elevadas concentrações dos aminoácidos não essenciais arginina, prolina, glicina e alanina, superiores às do WPI. A desnaturação térmica do WPI, determinada pela análise DSC ocorreu em 75,4°C e da mistura 60:40% WPI/GB em 75,7°C, ambas apresentando apenas um pico definido. Para a gelatina a desnaturação ocorreu em 36,1°C. A solubilidade do WPI, pH entre 2,5 a 7,5, em solução aquosa e 0,1M NaCl foi elevada (87,4 a 97,5%), a gelatina apresentou solubilidade inferior (63%) sendo o valor mais baixo (24%), em pH 6,5. A solubilidade da mistura foi intermediária, na faixa de 58 a 81%. Estudou-se a influência da concentração de proteína (3,2 a 8,8%), da temperatura (51 a 79°C) e do tempo de aquecimento entre 10 e 40 min, na de textura de géis mistos. O gel com as melhores características foi o obtido com 60% WPI:40%GB, pH 6,5, aquecido 30 min a 65°C, com 6% de proteína. A melhor textura encontrada foi na faixa de 270-310g-força, mastigabilidade e gomosidade próximas a 265 g-força, elasticidade e coesividade elevadas, 0,87-0,96. O gel misto (60WPI:40GB) apresentou capacidade de retenção de água de 48,6% enquanto que a do gel de GB foi 23,2%. O planejamento experimental elaborado permitiu uma boa descrição e previsão do comportamento de geleificação dos géis mistos em função da concentração de proteínas e da temperatura. Amostras de

produtos geleificados à base de misturas de proteínas (soro de leite/gelatina) foram degustadas por 65 julgadores não treinados, utilizando-se a Escala Hedônica estruturada de nove pontos. As médias obtidas para os atributos de cor, sabor, aroma e textura, apresentaram-se nas categorias *gostei ligeiramente* e *gostei regularmente*. As maiores notas foram atribuídas à consistência, independentemente de formulação. O produto contendo isolado protéico de soro de leite apresentou aceitabilidade acima de 70%, semelhante à gelatina comercial, o que sugere um índice satisfatório de aceitação no mercado consumidor.

**Palavras chave:** isolado protéico, gelatina, perfil de textura, análise sensorial

## GENERAL SUMMARY

The bovine whey protein (WPI) utilized in the present work was obtained in pilot plant employing membrane ultrafiltration/diafiltration and lyophilization. The WPI was obtained at the National Institute of Agronomic Research (INRA) at Rennes, France. WPI with 96.8% protein (dry basis), 2.2% ash, and adequate essential amino acids and microbiological profiles, was obtained. Electrophoretic and chromatographic profiles showed  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La), bovine serum albumin (BSA) and immunoglobulins (Igs) as the major protein components of WPI. Gelatin revealed deficiency in all essential amino acids and absence of tryptofan, presenting elevated concentration of the non essential amino acids arginine, proline, glycine and alanine, which were at higher concentrations than in WPI. Difference Scanning Calorimetry (DSC) showed that WPI denatures at 75.4°C and the WPI:BG mixture (60:40%) at 75.7°C, both samples presenting only one defined peak. Gelatin (BG) denaturation occurred at 36.1°C. The solubility of WPI, pH 2.5 to 7.5, in water or 0.1M NaCl solution was high (87.4 to 97.5%). For gelatin the highest solubility was 63% and the lowest (pH 6.5) 24%. The solubility of the mixture 60:40% was in the 58 to 81% range. The influence of protein concentration (3.2 to 8.8%), temperature (51 to 79°C) and heating time (10-40min), in the texture of mixed gels, was studied. Best texture was defined in the range 270-310g-force, chewiness and gomosity around 265g-force, high elasticity and cohesiveness (0.87-0.96). The 60% WPI:40%BG gel presented 48.6% water holding capacity (WHC) while for BG gel WHC was 23.2%. The experimental design used permitted good prevision and description of the behavior of the mixed 60:40% WPI/BG gels, as a function of protein concentration and temperature. Samples of products were tasted by 65 non-trained judges, a non-structured nine point Hedonic Scale. Average scores were obtained for the color, taste, aroma, and texture. The highest scores were attributed to viscosity, independently of the formulation. The product containing 60% WPI and 40% BG presented acceptability above 70%, similar to the commercial gelatin, an index that suggests adequacy for market consumption.

**Key words:** whey protein, gelatin, texture profile, sensory analyses





## Introdução Geral



## INTRODUÇÃO GERAL

No contexto atual da ciência dos alimentos e do consenso da relação alimentação-saúde-doença, existe grande solicitação por alimentos que além de fornecer os nutrientes indispensáveis ao organismo, proporcionem benefícios adicionais à saúde (FUJITA e FIGUEROA, 2003). Com isso, a dieta hoje tem um papel cada vez mais fundamental, de tal maneira que as suas propriedades vão além de sua qualidade microbiológica e sensorial (PIRES et al., 2006).

A busca por novas tecnologias para o processamento de alimentos deve levar em consideração o interesse cada vez maior dos consumidores por alimentos nutritivos, seguros, convenientes, econômicos e altamente aceitáveis do ponto de vista sensorial (HOUGH et al., 1997; WARD et al., 1999). Por este motivo, o número de alimentos modificados nutricionalmente vem aumentando como resultado de uma preocupação individual com a saúde (COLLI et al., 2002).

A expansão da utilização de proteínas do soro do leite por meio da aplicação de ingredientes que aumentam o valor nutricional, funcional e/ou biológico, aumentou o valor comercial dos ingredientes da indústria láctea (CHATTERTON et al., 2006). As proteínas do soro contêm um número de peptídeos imunomodulatórios que estão presentes naturalmente (GAUTHIER et al., 2006), além de possuírem propriedades que resultam em possíveis funções biológicas benéficas à saúde humana, como o fortalecimento do sistema imunológico (WONG e WATSON, 1995; SGARBIERI, 2004; PACHECO et al., 2006) e a diminuição do risco de doenças degenerativas como certos tipos de câncer (BOUNOUS, 2000).

A capacidade de formar gel é uma propriedade funcional importante tecnológica das proteínas para se obter características sensoriais dos alimentos e textura desejável (TOTOSAUS et al., 2002). A gelatina bovina é o agente mais versátil, utilizado para a modificação da textura de produtos (HAUG et al., 2004), pois forma géis em baixas concentrações. É altamente utilizada devido às suas propriedades multi-funcionais: habilidade de formar géis estáveis e reversíveis (SEGTMAN e ISAKSSON, 2004).

Entretanto, não é uma proteína completa devido à ausência do aminoácido essencial triptofano (BENDER et al., 1953) e aos teores bastante baixos de aminoácidos sulfurados, como metionina e cistina; enquanto que as proteínas de soro de leite apresentam esses aminoácidos em quantidades adequadas (SCHUCK et al., 2004).

Portanto, a associação dessas duas fontes protéicas deverão possibilitar melhoria considerável no equilíbrio de aminoácidos essenciais, com significativa vantagem nutricional, apresentando também uma grande vantagem econômica na associação dessas duas proteínas, já que a gelatina é abundante e de baixo custo, enquanto que as proteínas do soro de leite são de recuperação tecnológica de alto custo.

O objetivo geral desse trabalho foi estudar os efeitos dos parâmetros concentração de proteína, pH, tempo e temperatura de aquecimento na obtenção de géis mistos com a finalidade de se conseguir produtos geleificados de elevado valor nutritivo e de boa aceitação pelo consumidor.

Neste trabalho, os principais objetivos específicos foram:

- a) produzir um isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) em planta piloto, através do processo de separação em membrana, ultrafiltração, diafiltração e liofilização;
- b) preparar hidrolisados trípticos de WPI e fraciona-los por cromatografia de troca iônica, para identificar frações enriquecidas com aminoácidos sulfurados, separar destas frações os seus peptídios por cromatografia de alta eficiência em fase reversa e identifica-los por espectrometria de massa;
- c) estudar a composição e algumas propriedades físico-químicas de duas fontes protéicas de largo uso industrial (WPI) e gelatina bovina (GB), isoladamente e na mistura 60%WPI:40%GB;
- d) obter géis mistos de WPI:GB com variações de concentração de proteína, pH, tempo de aquecimento e temperatura. Utilizando-se do planejamento experimental de processo, determinar as propriedades ótimas de textura, avaliando dureza, mastigabilidade, gomosidade, coesividade e elasticidade e;
- e) elaborar um produto geleificado à base de mistura das proteínas (soro de leite/gelatina) nas proporções indicadas e com boas características nutritivas e sensoriais.

A tese está dividida em quatro capítulos, na forma de artigos já preparados para publicação. No capítulo I é abordada a revisão da literatura. O capítulo II é composto por dois artigos referentes à obtenção e caracterização físico-química e analítica de um isolado protéico (WPI) e da  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) de soro de leite bovino. O capítulo III, contendo 5 artigos, trata da composição, propriedades físicas e geleificantes de proteínas do soro de leite (WPI) e da gelatina bovina, isoladamente e em combinação. Para finalizar, o capítulo IV contempla o desenvolvimento de um produto geleificado, à base da mistura de proteínas (soro de leite/gelatina), com boas características nutritivas e características sensoriais aceitáveis para o consumo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENDER, A.E.; MILLER, D.S.; ELIZABETH, J.T. The biological value of gelatin. **Chemistry and Industry**, p.799, 1953.
- BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v.20, n.6, p.4785-4792, 2000.
- CHATTERTON, D.E.W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v.16, n.11, p.1229-1240, 2006.
- COLLI, C.; SARDINHA, F.; FILISETTI, T.M.C.C. Alimentos Funcionais. In: CUPPARI, L. Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto. Barueri, São Paulo: Manole, 2002.
- FUJITA, A.H.; FIGUEROA, M.O.R. Composição centesimal e teor de  $\beta$ -glucanas em cereais e derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.116-120, 2003.

GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y.; SAINT-SAUVEUR, D. Immunomodulatory peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. **International Dairy Journal**, v.16, n.11, p.1315-1323, 2006.

HAUG, I.J.; DRAGET, K.I.; SMIDSRØD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.2, p.203-213, 2004.

HOUG, G.; SANCHES, R.; BARBIERI, T.; MARTINEZ, E. Sensory optimization of powdered chocolate milk formula. **Food Quality and Preferences**, v.8, n.3, p.137-166, 1997.

PACHECO, M.T.B.; BIGHETTI, E.; ANTÔNIO, M.; CARVALHO, J.E.; ROSANEL, C.F.; SGARBIERI, V.C. Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.1, p.47-55, 2006.

PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, N.M.B. Qualidade nutricional e teor químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.170-187, 2006.

SCHUCK, P.; BOUHALLAB, S.; DURUPT, D.; VAREILLE, P.; HUMBERT, J.P.; MARIN, M. Séchage des lactosérums et dérivés: rôle du lactose et de la dynamique de l'eau. **Lait**, v.84, n.3, p.243-268, 2004.

SEGTMAN, V.H.; ISAKSSON, T. Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatin gels studied by near infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.1, p.1-11, 2004.

SGARBIERI, V.C. Propriedades Fisiológicas Funcionais das Proteínas de Soro de Leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, 2004.

TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J.G.; SALAZAR, J.A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, n.6, p.586-601, 2002.

WARD, C. D. W.; KOEFERLI, C. S.; SCHWEGLER, P. P.; SCHAEPPPI, D.; PLEMMONS, L. E. European strawberry yogurt market analysis with a case study on acceptance drivers for children in Spain using principal component analysis and partial least squares regression. **Food Quality and Preference**, v.10, n.5, p.387-400, 1999.

WONG, C.W.; WATSON, D.L. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. **Journal of Dairy Research**, v.62, n.2, p.359-368, 1995.





## Capítulo I

---

### REVISÃO DA LITERATURA



# COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES NUTRITIVAS, TECNOLÓGICAS E FUNCIONAIS DA GELATINA E DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO

## 1 Composição e valor nutritivo da gelatina e proteínas do soro de leite bovino

### 1.1 Gelatina

A gelatina é produzida em larga escala, a preços relativamente baixos, justificando assim o grande interesse e exploração de suas propriedades funcionais (CARVALHO e GROSSO, 2006). A gelatina é um dos hidrocolóides mais populares e amplamente utilizados nas indústrias de alimentos (confeitos, produtos cárneos, laticínios, etc), farmacêutica (cápsulas) e fotográfica (POPPE, 1997; CHO et al., 2004; BIGI et al., 2004).

É um ingrediente constituído quase inteiramente de proteína (84-85%), 9-12% de água e 1-3% de sais minerais. Apresenta elevado conteúdo de sódio e cálcio e traços de gordura. É uma proteína de fácil digestão e absorção, enriquecendo e variando dietas normalmente restritas, como no caso de pacientes com úlceras gástricas, pós-operatórios e diabéticos, devido à ausência de gorduras e carboidratos.

É uma proteína de origem animal, solúvel em água (em temperaturas entre 38-40°C), resultante da hidrólise parcial do colágeno proveniente de ossos, peles e tecidos conectivos de suínos e bovinos (CARVALHO, 2002). Constitui quase 30% das proteínas totais em vertebrados e invertebrados e, ao microscópio, aparece como fibras brancas opacas circundadas por outras proteínas e mucopolissacarídeos (POPPE, 1997).

A produção comercial de gelatina pode ser dividida em duas etapas. Primeiramente, o colágeno é desnaturado a 40°C e, posteriormente, submetido à hidrólise (ácida ou básica) para quebra das ligações covalentes. Mediante o tipo

No entanto, apesar dessa deficiência, esta proteína apresenta funções tecnológicas que justificam sua utilização na indústria alimentícia, pois a conversão do estado sol para o estado gel é reversível e pode ser repetido, o que torna vantajosa a utilização da mesma em vários produtos comestíveis (POPPE, 1997), é utilizada como agente de clarificação, estabilização e material de revestimento, especialmente em sobremesas, doces, produtos cárneos, de panificação, sorvetes, produtos lácteos e farmacêuticos (plasma, sorológico específico, biomateriais ósseos e melhora da circulação sanguínea) (DJAGNY, 2001; IWAI et al., 2005).

A gelatina pode ser dissolvida através de dois métodos: direto ou indireto. No método indireto, inicialmente à gelatina é adicionada água fria, de forma que todas as partículas estejam igualmente umedecidas. A mesma fica em repouso (30 minutos a 2 horas, dependendo do tamanho das partículas) até que as partículas de gelatina sofram inchamento e se tornem uma massa homogênea, com a dissolução realizada sob aquecimento, em temperaturas na faixa de 50 a 60°C. No processo direto, água quente (80 a 90°C) é adicionada diretamente à gelatina, sob forte agitação até sua completa dissolução, contudo o inconveniente desse método é que a gelatina possui propriedades espumantes (POPPE, 1997).

## **1.2 Proteínas do leite**

As proteínas do leite têm sido extensivamente estudadas continuamente por mais de 50 anos. As proteínas do leite apresentam elevado valor nutritivo e excelentes propriedades funcionais, tanto de interesse tecnológico como fisiológico (SGARBIERI, 2000; SGARBIERI, 2004; PACHECO et al., 2005).

O leite é reconhecido como uma excelente fonte de proteínas de elevada qualidade, devido ao conteúdo variável de aminoácidos que não são sintetizados pelo organismo humano (essenciais). O leite é composto de água, lactose, gordura, sais e proteína. As proteínas podem ser divididas em três grandes grupos: as caseínas, insolúveis em pH 4,6 e 20°C, as proteínas do soro e as proteínas das membranas dos glóbulos de gordura-PMGG (MAUBOIS e OLLIVER, 1997; AIMUTIS, 2002; 2004; RICCIO, 2004; SPITSBERG, 2005).

O leite bovino contém aproximadamente 3,5% de proteínas, destas, 78% são caseínas, 20% proteínas do soro e cerca de 2% PMGG (SGARBIERI, 1996; RICCIO, 2004; SPITSBERG, 2005). O leite contém uma mistura de proteínas, cada uma delas apresenta atributos individuais quanto aos fatores biológicos, nutricionais e sua aplicação na indústria de alimentos (Tabela 1). As principais proteínas presentes no leite incluem a  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, imunoglobulinas, albumina do soro bovino e as caseínas:  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -caseínas. As proteínas em menor proporção, no entanto comercialmente também importantes, são a lactoferrina, lactoperoxidase, caseinomacropéptidos e proteose-peptonas (NIELSEN, 1997; FOX e McSWEENEY, 1998; ETZEL, 2004; CHATTERTON et al., 2006).

**Tabela 1** Classificação das proteínas do leite: caseínas e proteínas do soro

| <b>Proteína</b>         | <b>Massa Molecular<br/>(kg/mol)</b> | <b>Concentração<br/>(g/L)</b> | <b>Ponto Isoelétrico<br/>(pI)</b> |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Caseína</b>          |                                     |                               |                                   |
| $\kappa$ -caseína       | 19                                  | 3,3                           | 5,8                               |
| $\beta$ -caseína        | 24                                  | 9,3                           | 5,2                               |
| $\alpha$ -caseína       | 24                                  | 13                            | 4.9/5.3                           |
| Glicomacropéptido       | 8,6                                 | 1,5                           | <3,8                              |
| <b>Soro de leite</b>    |                                     |                               |                                   |
| $\beta$ -lactoglobulina | 18                                  | 3,2                           | 5,4                               |
| $\alpha$ -lactalbumina  | 14                                  | 1,2                           | 4,4                               |
| Albumina sérica         | 66                                  | 0,4                           | 5,1                               |
| Imunoglobulina G        | 150                                 | 0,7                           | 5-8                               |
| Lactoferrina            | 77                                  | 0,1                           | 7,9                               |
| Lactoperoxidase         | 78                                  | 0,03                          | 9,6                               |

Fonte: ETZEL, 2004

Trabalhos recentes têm demonstrado que as proteínas do soro apresentam algumas diferenças fundamentais em relação às caseínas (BOIRIE et al., 1997) relacionadas ao metabolismo e na ação fisiológica, baseadas na propriedades de que essas proteínas não sofrerem alterações conformacionais pelos ácidos estomacais. Ao atingirem o intestino delgado, essas proteínas são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando rapidamente a concentração aminoacídica do plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos (BOIRIE et al. 1997; DONIEL et al. 1990).

Durante muito tempo o soro foi considerado como um resíduo industrial ou produto com valor comercial residual. Só nas três últimas décadas foram desenvolvidos processos de separação que permitem obter ingredientes alimentares com alto teor protéico a partir do soro de leite (TORRES, 2005; SIMMONS et al., 2007).

Formado por uma mistura de proteínas com numerosas e diversas propriedades funcionais (como emulsificação, aeração, formação de gel), o soro de leite bovino tem potencial elevado de utilizações (KINSELLA, 1984; AUDIC et al., 2003; SINHA et al., 2007), necessitando de processamento para tornar-se o ingrediente protéico adequado para uma utilização específica (HUFFMAN, 1996).

Métodos de obtenção da proteína na forma nativa permitem maior exploração das propriedades funcionais no processamento de produtos alimentícios (DE JONGH et al., 2001). Técnicas de ultrafiltração são utilizadas para a obtenção de concentrados de proteínas do soro não desnaturadas (MAUBOIS e OLLIVER, 1997). A ultrafiltração apresenta várias vantagens sobre outros processos de separação, já que não envolve mudança de fases; pode ser conduzida a baixas temperaturas e pressão hidrostática, não afetando substâncias termosensíveis e não precisa de reagentes químicos (PORTER e MICHAELS, 1970).

A ultrafiltração é a técnica preferida para a fabricação dos concentrados protéicos de soro com >50% de proteína (MORR e FOEGEDING, 1990). De acordo com MORR e HÁ (1993), a ultrafiltração é um processo industrial utilizado para o fracionamento do soro, com o objetivo de produzir um concentrado protéico de soro com alto teor de proteína. Geralmente o processo é seguido de uma diafiltração com água desionizada para a remoção de lactose residual e dos

minerais do retentado antes da secagem. A diafiltração aumenta a pureza do concentrado protéico e a funcionalidade dos ingredientes (HUFFMAN, 1996).

Na obtenção de proteínas, normalmente o processo de liofilização é utilizado para conseguir maior estabilidade da proteína na estocagem. Em geral, as proteínas liofilizadas são mais estáveis em meios com menor conteúdo de água (LAI e TOPP, 1999). A umidade residual normalmente é considerada a responsável pela instabilidade química de proteína e peptídios no estado sólido (LIU et al., 1991).

Os derivados do soro mais importantes são: o soro desmineralizado por troca iônica ou eletrodialise, muito utilizado para uso em formulações infantis; a lactose refinada; o concentrado protéico de soro, obtido por ultrafiltração com um conteúdo protéico que varia de 35 a 80% (MULVIHILL e ENNIS, 2003; TOLKACH e KULOZIK, 2006); e o isolado protéico de soro que contém acima de 90% de proteína e é obtido por troca iônica e diafiltração (LA FUENTE et al., 2002; CANCINO et al., 2006).

O conteúdo de proteína do soro de 10 a 12% (base seca) pode aumentar após o processo de concentração por membranas 35, 50 ou 80% de proteína, com redução do teor de lactose e sais (CANCINO et al. 2006). Segundo MORR e HA (1993), diversos trabalhos tratam da funcionalidade de proteína do soro, concentrado protéico de soro (WPC) e isolado protéico de soro (WPI), com impactos nas propriedades físico-químicas e funcionais (MILLER et al., 2000).

Concentrados e isolados protéicos de soro de leite bovino são usados como ingredientes em um grande número de produtos formulados (MILLER et al., 2000). Quanto às propriedades funcionais fisiológicas, os produtos de soro de leite oferecem benefícios nutricionais devido a sua excelente composição em aminoácidos essenciais (lisina e triptofano) e pela presença de vitaminas do complexo B, como a tiamina e a riboflavina (SCHUCK et al., 2004).

De todas as proteínas alimentícias, as do soro apresentam a maior concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina), os quais estão relacionados com a construção de tecido muscular e regeneração de traumas múltiplos (ALEXANDER e GOTTSCHLISH, 1990). A suplementação nutricional com este tipo de aminoácidos em desportistas previne a degradação



protéica e a perda de massa muscular associada ao exercício intenso e de longa duração (WALZEM et al., 2002).

MARKUS et al. (2000) demonstraram ainda que uma dieta que contém proteínas do soro enriquecidas em  $\alpha$ -lactalbumina como fonte protéica altera a razão plasmática de triptofano/outros aminoácidos neutros, o que modula a atividade serotoninérgica cerebral. Esta ação promove a melhoria do humor e o aumento das capacidades cognitivas em humanos vulneráveis ao stress.

Dietas ricas em proteínas, especialmente proteínas de alto conteúdo de aminoácidos essenciais (EAAs), aminoácidos sulfurados e aminoácidos de cadeias ramificadas têm sido recomendadas para o aumento da perda de peso e gordura corporal, síntese de proteína muscular e diminuição da insulina e triacilgliceróis no plasma. Frações de proteína, como a  $\beta$ -lg, apresentam as seguintes características: 17% EAAs, 33,5% aminoácidos de cadeia ramificada e 74% leucina a mais que a maioria das proteínas (ETZEL, 2004).

A habilidade da proteína de formar agregado ou gel quando aquecida contribui para melhorar a viscosidade e a textura de muitos alimentos (EUSTON, 2004). Países como Estados Unidos, Austrália, Canadá e Nova Zelândia e nações da União Européia processam o soro, reconhecendo-o como ingrediente funcional e agregando valor à linha de produção da indústria láctea (ANTUNES, 2003).

## **2 Propriedades fisiológicas das proteínas e peptídios do soro de leite e da gelatina**

Avanços recentes nas pesquisas nutricionais e biomédicas têm revelado relações complexas entre nutrição e doença, sugerindo que algumas proteínas alimentícias e seus peptídios poderão ser úteis na prevenção e/ou diminuição de riscos de um grande número de condições patológicas derivadas da má nutrição, doenças ou injúrias de diversas naturezas (SGARBIERI, 1999a; SGARBIERI, 1999b; SGARBIERI, 2004). Interesse na perda de peso, controle do diabetes, perda de gordura e aumento da proteína muscular são alguns dos benefícios



associados à melhoria da saúde por meio da ingestão de proteínas (ETZEL, 2004).

Estudos recentes mostram um grande número de hidrolisados ou peptídios derivados de várias fontes protéicas, com eficiência comprovada *in vitro* e/ou *in vivo*, das quais pode-se destacar que vários componentes bioativos, amplamente difundidos nos alimentos de origem animal, apresentam atividade fisiológica (PRATES e MATEUS, 2002) do pescado (FUJITA et al., 2000), da soja (WU e DING, 2002), dos produtos cárneos, componentes de sangue (AGUIAR et al., 2005) e das proteínas do leite (SEPPO et al., 2002). O Quadro 1 ilustra os principais componentes bioativos secretados no leite bovino.

**Quadro 1** Proteínas fisiologicamente ativas secretadas no leite bovino.

|                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proteínas protetoras   | Imunoglobulinas<br>Proteose peptonas<br>Lactoferrina<br>Transferina                                                                                                                                                                                                                   |
| Fatores de crescimento | Fator de crescimento epidermal (EGF)<br>Fator beta de transformação celular (TGF $\beta$ )<br>Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)                                                                                                                                      |
| Enzimas                | Lactoperoxidase<br>Lisozima<br>Plasmina<br>Xantina oxidase<br>Glicose oxidase                                                                                                                                                                                                         |
| Hormônios              | Hormônio de liberação de tirotropina (TRH)<br>Somatostatina (SIH)<br>Calcitonina<br>Insulina<br>Relaxina<br>Hormônio estimulante da tiróide (TSH)<br>Hormônio de liberação luteinizante (LRH)<br>Peptídeo de liberação de gastrina (GRP)<br>Adrenocorticotropina (ACTH)<br>Prolactina |

Fonte: Adaptado de AIMUTIS (2002)

Pesquisas realizadas na última década revelaram que o leite bovino, o colostro, e o soro do leite bovino, contêm um número de componentes biologicamente ativos, que podem exercer efeitos potencialmente benéficos para a saúde (KORHONEN, 2002).

O leite bovino é considerado como um alimento básico em muitas dietas, pois é rico em uma variedade de nutrientes essenciais. Sofisticados métodos analíticos, bioquímicos e biológicos têm sido importantes ferramentas para a comprovação da atividade biológica das substâncias. Técnicas de separação e a utilização de enzimas nos produtos do leite têm oferecido oportunidades para isolar, concentrar ou modificar estes componentes (STEIJNS, 2001). Há várias classes de componentes bioativos presentes no leite: caseínas, proteína do soro, imunoglobulinas, peptídios derivados da caseína e das proteínas do soro, lactoferrina e lactoperoxidase, glicoproteínas, esfingolipídios, lactose e oligossacarídeos, hormônios, fatores de crescimento e enzimas como oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (STEIJNS, 2001).

Estudos têm focado a bioatividade das frações destas proteínas isoladas a partir de hidrolisados do leite bovino em seu uso na formulação de alimentos (MEISEL, 1999; MEISEL e SCHLIMME, 1996; MEISEL e BROCKLEMAN, 1999; WARNER et al., 2001). Além das propriedades funcionais tecnológicas e nutricionais, algumas proteínas apresentam atividade biológica, como por exemplo: a influência no metabolismo ósseo apresentada pelas proteínas do soro do leite (TAKADA et al., 1997); atividade antimicrobiana apresentada pela lactoferrina (MEISEL, 1998); atividade imunoestimulante desempenhada pelas imunoglobulinas (KORHONEN et al., 1998). Essas funções também podem estar associadas aos chamados peptídios bioativos, presentes em determinadas seqüências da proteína, liberados após a hidrólise enzimática *in vivo* ou *in vitro* (KORHONEN et al., 1998).

A expansão da utilização de proteínas do soro do leite como ingredientes que aumentam o valor nutricional, funcional e/ou biológico, aumentou o valor comercial dos ingredientes da indústria láctea (CHATTERTON et al., 2006). Uma concentração elevada de peptídios bioativos pode ser produzida em escala

comercial, utilizando a hidrólise enzimática e tecnologias de separação e purificações destes peptídios (GAUTHIER et al., 2006).

Proteínas de soro e caseínas são preferidas para formulações infantis em virtude de seu elevado valor nutritivo. As proteínas de leite são utilizadas na forma de hidrolisados, na qual normalmente são reduzidos a aminoácidos e peptídios de baixos pesos moleculares. Teoricamente, a hidrólise extensiva deve destruir os epítomos alergênicos (regiões de ligação da IgE), resultando em produtos hipoalergênicos seguros (MAHMOUD, 1994).

Exemplos de doenças ou condições clínicas que exigem o uso de fórmulas especiais contendo hidrolisados protéicos incluem: doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome de intestino curto, fístulas, pancreatite, traumas severos, síndromes de imunodeficiência e alergias alimentares. Na preparação de alimentos especiais é desejável utilizar hidrolisados que possuam entre 2 a 6 aminoácidos (massa molecular abaixo de 2kDa), para facilitar ao máximo sua absorção intestinal, evitando o aparecimento de peptídios amargos e a possibilidade de causarem efeitos alergênicos (CLEMENTE, 2000).

A hidrólise enzimática em condições de pH 6-8 e temperatura de 40-60°C pode também promover a obtenção de ingredientes a partir do leite com atividade biológica e nutricional, que possibilitam melhora à saúde (SINHÁ et al., 2007). Os peptídios bioativos dos componentes das proteínas do soro de leite, como as imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase e glicomacropéptido, são hoje em dia disponíveis comercialmente de forma isolada, com aplicações específicas em fórmulas infantis, dietas clínicas e componentes das pastas de dentes e agentes conservantes contra microrganismos (STEIJNS, 2001; KELLY e MCDONAGH, 2002; SCAMMELL, 2001). Efeitos antihipertensivos (YAMAMOTO et al., 1999; MEISEL et al., 1997), peptídios opióides (McDONAGH e FITZGERALG, 1998) e com propriedades anticancerígenas (REGESTER et al., 1996; REYNOLDS, 1997; REYNOLDS, 1999; FITZGERALG, 1998) são aplicações para as proteínas do leite que são esperadas no futuro (KORHONEN, 2002).

As proteínas de soro de leite se destacam por aumentar a resposta imune através de uma maior produção de glutathione celular. Para vários investigadores (BOUNOUS et al., 1989; BOUNOUS e GOLD, 1991; BRINK, 1996), o estímulo à síntese de glutathione e ao estímulo imunológico depende da propriedade das

proteínas de soro liberarem, pela hidrólise enzimática, peptídios de glutamilcistina, contidos nesta seqüência nas frações de albumina sérica (BSA),  $\beta$ -lactoglobulina e de imunoglobulina G.

As proteínas e peptídios do soro produzem vários efeitos biológicos quando ingeridas como estímulo à síntese de glutatona, estímulo à síntese de IGF-1 (Insulin Growth Factor I), reforço imunológico, ação hipocolesterolemica, ação antitumoral e aumento da longevidade em animais de experimentação (BRINK, 1996; SGARBIERI, 2004). A glutatona é um tri-peptídio composto de glutamato, glicina e cisteína, distribuída em todas as células do organismo humano e animal. Desempenha função metabólica como antioxidante celular, protegendo contra efeitos deletérios de radicais livres, xenobióticos e como substrato para a enzima glutatona peroxidase (selênio dependente), com ação desintoxicante sobre o peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos (BRINK, 1996).

Segundo PACHECO et al. (2006), a atividade citoprotetora do concentrado protéico de soro de leite, do hidrolisado e sua fração contendo peptídios de baixo peso molecular pode ser atribuída à presença de elevado conteúdo de compostos sulfidril, os quais, provavelmente, servem de substrato para síntese de glutatona pelas células da mucosa gástrica.

Contudo, para que as proteínas do soro de leite estimulem a síntese de glutatona e atuem como imunomoduladoras, elas devem permanecer com suas estruturas nativas intactas, preservando a atividade biológica original, que devem ser transferidas aos peptídios resultantes da hidrólise (BOUNOUS e GOLD, 1991).

MURAKAMI et al. (2004) pesquisaram a atividade anti-hipertensiva em 12 tipos de hidrolisados protéicos comerciais de diferentes fontes protéicas. Esses autores verificaram que hidrolisados do soro de leite (WE80M) e outro derivado da ovoalbumina (EE90FX) foram os que apresentaram os maiores índices de inibição (78,2%) da enzima conversora de angiotensina I (ECA), porém, somente o hidrolisado do soro de leite foi capaz de promover um decréscimo significativo na pressão arterial de ratos naturalmente hipertensos (SHR). Por outro lado, os hidrolisados da caseína (CE90GMM) e do soro de leite (WE80BG) induziram um forte efeito hipotensor nos animais, embora apenas com médios índices de inibição da ECA (~50%).

COSTA (2004) verificou que o tratamento térmico ou enzimático das proteínas do soro de leite influi na obtenção de hidrolisados com atividade anti-hipertensiva. O isolado protéico tratado a 65°C, parcialmente desnaturado, e hidrolisado com alcalase resultou em um produto com maior atividade quando comparado aos produtos obtidos de proteínas nativas ou totalmente desnaturadas hidrolisadas com alcalase,  $\alpha$ -quimotripsina e proteomix, sendo o único hidrolisado eficiente em reduzir a pressão arterial dos ratos espontaneamente hipertensos, após a administração por via oral.

FARIA (2006) avaliou a influência das enzimas do trato gastrointestinal na atividade inibitória da ECA de hidrolisados protéicos e de diferentes fontes (caseína, soro de leite, glúten de trigo, soja e colágenos hidrolisados de origem bovina e suína). Os hidrolisados de maior peso molecular, colágenos hidrolisados bovino e suíno, apresentaram aumento significativo da potência inibitória da ECA. Por outro lado, observou-se redução na capacidade de inibir a ECA dos hidrolisados com menores pesos moleculares, como os hidrolisados da caseína, soro de leite e soja.

Muitos estudos dos efeitos imunomodulatórios das proteínas do soro e de seus peptídeos obtidos por hidrólise enzimática têm sido estudados com efeitos no sistema imune, ativação e proliferação de linfócitos, secreção de citocina e produção de anticorpos. No entanto numerosos estudos têm sido realizados para a identificação de peptídeos com ação anti-microbiana (GAUTHIER et al., 2006).

A enzima que converte a angiotensina A em angiotensina B é a responsável pela regulação da pressão sanguínea e da hipertensão. Vários peptídeos derivados da ação proteolítica da  $\beta$ -lg têm inibido a atividade da enzima conversora de angiotensina (ACE). Estes estudos têm mostrado que a hidrólise com pepsina, tripsina, quimotripsina ou outras proteases comerciais resultaram na inibição da ACE de 73-90% (STEIJNS, 2001; CHATTERTON et al., 2006).

Nas últimas duas décadas, o estudo da fração protéica do leite bovino revelou a existência de vários componentes diretamente envolvidos na manutenção, reparação e proliferação celulares. Estas proteínas de baixo peso molecular, denominadas fatores de crescimento, interagem com receptores específicos da membrana celular. Depois de internalizadas, desencadeiam uma resposta celular no sentido do aumento da atividade biossintética, o que leva ao



crescimento, diferenciação e proliferação celular. É atualmente aceito que estes componentes estão envolvidos na maturação e desenvolvimento dos órgãos imaturos do recém-nascido. Estas propriedades têm estimulado o desenvolvimento de estratégias para a concentração dos fatores de crescimento do soro bovino para uso clínico, nomeadamente na recuperação de tecidos danificados, quer em tratamentos pós cirúrgicos, quer na cicatrização de feridas através de aplicação tópica (FRANCIS et al., 1995; REGESTER e BELFORD, 1999).

O soro do leite bovino tem sido considerado uma das principais fontes para a produção de ingredientes funcionais a partir da proteína hidrolisada. As técnicas de investigação consistem na determinação da atividade biológica da proteína hidrolisada com uma enzima proteolítica, o isolamento do peptídeo ativo, a determinação de sua estrutura e determinação de sua atividade, que geralmente se procede sintetizando um peptídeo de sequência similar ao determinado, a partir da proteína precursora. No entanto, do ponto de vista econômico, a purificação desses peptídios torna-se inviável, sendo considerado mais adequado a combinação de tratamentos que resultem em produtos de melhor atividade biológica (COSTA, 2004).

O interesse pelo colágeno (gelatina, hidrolisados de gelatina) está sendo estimulado por suas inúmeras aplicações industriais (POPPE, 1997) e pelas propriedades fisiológicas importantes reveladas mais recentemente (KRANS e SCHWARS, 2001; BRODIE, 1984; OESSER et al., 1999; MOSKOWITZ, 2000; OESSER e SEIFERT, 2003; ITO et al., 2002).

Os autores acima citados são concordes de que a ingestão de gelatina, particularmente na forma hidrolisada, produz os seguintes efeitos benéficos no organismo: fortalece e estimula o crescimento dos cabelos, unhas e torna a mais saudável (KRANS e SCHWARS, 2001; BRODIE, 1984); fortalece a estrutura óssea, contribuindo para o tratamento da artrose e da osteoporose (OESSER et al., 1999; MOSKOWITZ, 2000; OESSER e SEIFERT, 2003).

A influência positiva da administração oral de gelatina em doenças degenerativas tem sido estudada na indicação de que os hidrolisados de gelatina são absorvidos no intestino e, preferencialmente, acumulados no tecido cartilaginoso (OESSER et al., 1999). Para o tratamento de artrite reumatóide, uma

triagem clínica de administração oral de cartilagem derivada do colágeno tipo II melhorou os sintomas (BARNETT et al., 1998; TRENTAM et al., 1993). E para compensar a deficiência de cálcio durante a adolescência, gravidez e lactação, sendo associados a tratamentos de osteoporose, hidrolisados de gelatina foram administrados (DJAGNY, 2001).

Trabalhos recentes mostraram *in vitro* que certas preparações de colágeno apresentaram efeito antitumoral, inibindo o crescimento (metástase) e a proliferação de células cancerígenas (apoptose). (ITO et al., 2002; CHO et al., 2004; ROTH et al., 2006; PASCO et al., 2005; GOLDSTEIN et al., 2005).

### 3 Propriedades Geleificantes

As propriedades funcionais das proteínas podem ser classificadas em três principais grupos: propriedades de hidratação, as quais são dependentes da interação proteína-água (absorção, retenção, molhabilidade, adesão, dispersibilidade, solubilidade e viscosidade); propriedades que estão relacionadas com as interações proteína-proteína (precipitação e geleificação) e propriedades de superfície (tensão superficial, emulsificação e formação de espuma) (MESSENS et al., 1997).

A capacidade de formar gel é uma importante propriedade funcional das proteínas para se obter textura desejável e características sensoriais dos alimentos (TOTOSAUS et al., 2002). O fenômeno de formação de gel é muito complexo e normalmente ocorre com o resfriamento da solução coloidal, após aquecimento prévio. Com o resfriamento, verifica-se um aumento de viscosidade até o ponto em que a rigidez se manifesta. A rede protéica formada é considerada como resultante de um equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-solvente e as forças repulsivas e de atração entre cadeias próximas (SGARBIERI, 1998).

As reações iniciais do processo de geleificação envolvem o enfraquecimento e quebra das pontes de hidrogênio e hidrofóbicas, desestabilizando a estrutura conformacional das proteínas. Posteriormente, ocorre agregação das moléculas

de proteína, produzindo-se uma estrutura tridimensional capaz de imobilizar fisicamente grande parte do solvente, através de ligações intermoleculares, interações hidrofóbicas e iônicas (MANGINO, 1992).

Os géis são geralmente classificados em dois grupos: químicos e físicos, os quais são diferenciados pela natureza das ligações entre os polímeros. Se o gel é formado por reações químicas, as ligações formadas são ligações covalentes e o gel formado é irreversível. No entanto, no gel físico, a rede formada é estabilizada por ligações secundárias, pontes de hidrogênio, interações dipolares e hidrofóbicas. Estes géis são reversíveis quando parâmetros como pH, força iônica e temperatura são modificados (CHATTERJEE e BOHIDAR, 2005). As características químicas e físicas que induzem a geleificação das proteínas estão listadas na Tabela 2.

A capacidade de um gel de apresentar viscosidade, rigidez e elasticidade é considerada como uma função que depende do tipo de proteína, composição em aminoácidos, massa molecular, temperatura e tempo de aquecimento, grau de desnaturação causado pelo pH, concentração protéica e força iônica; além das interações iônicas, hidrofóbicas e grupos sulfidril livres (SHIMADA e MATSUSHITA, 1981; GOSAL e ROSS-MURPHY, 2000; TOTOSAUS et al., 2002; FUENTE et al., 2002).

**Concentração de Proteína:** Com o aumento da concentração de proteína ocorre a modificação da textura dos géis, resultando em aumento da firmeza e intensificando a retenção de água pela matriz. De modo geral, usa-se na geleificação concentrações protéicas de 5-12% e temperaturas de 60-110°C (IPSEN et al., 2002). As interações proteína-proteína podem ser fracas e reversíveis ou covalentes. As ligações intermoleculares fracas são, essencialmente, de três tipos: a) interações hidrofóbicas (5-10 kJ/mol), que resultam da exposição de grupos hidrofóbicos durante a desnaturação, b) pontes de hidrogênio (10-40 kJ/mol), que resultam da interação entre cadeias laterais hidrofílicas de aminoácidos; e c) interações eletrostáticas (25-80 kJ/mol), que resultam de interações entre grupos e cargas contrárias. As ligações covalentes (200-400 kJ/mol) estabelecem-se, majoritariamente, através de ligações dissulfeto (NIELSEN, 1995).



**Tabela 2** Alterações físicas e químicas que induzem a geleificação da proteína.

| <b>Agentes</b>  | <b>Classificação</b> | <b>Formação de Gel</b>                                                                                                                                                                            |
|-----------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Físicos</b>  | Aquecimento          | A proteína nativa é parcialmente desnaturada para a formação da rede. A matriz é ordenada pela agregação das moléculas.                                                                           |
|                 | Alta pressão         | Pressões (200-500 Mpa) induzem à interação hidrofóbica entre as ligações dissulfeto e as moléculas de proteína, resultando em rearranjo da estrutura do gel.                                      |
| <b>Químicos</b> | Força iônica         | Após o aquecimento, seguido da adição salina, ou ocorre a repulsão eletrostática, ou as cargas são protegidas, formando o gel. A distribuição da estrutura secundária induz o efeito hidrofóbico. |
|                 | Uréia                | A uréia promove ligações dissulfídicas intermoleculares, oxidação dos grupos sulfidril, resultando na formação da rede.                                                                           |
|                 | Ácido                | A diminuição do pH, seguida da desnaturação, forma aglomerados ou agregados. Esses, por sua vez, podem ser considerados como blocos de gel.                                                       |
|                 | Ação enzimática      | A catálise enzimática entre resíduos de glutamina forma ligações que mantêm a estrutura do gel.                                                                                                   |

---

 FONTE: TOTOSAUS et al., 2002

**Efeito do pH:** O pH, assim como a força iônica, pode alterar a distribuição das cargas entre as cadeias laterais das proteínas, causando aumento ou diminuição das interações proteína-proteína. Próximo do ponto isoelétrico (pI), há um excesso de interação proteína-proteína e, acima do ponto isoelétrico, aumentam as interações proteína-solvente (BERTRAND e TURGEON, 2007). A integridade física do gel é mantida pelo contra balanceamento das forças de atração e repulsão entre as moléculas de proteína e destas com o solvente circundante (ZIEGLER e FOEGENDING, 1990).

**Efeito da Temperatura:** as condições externas (temperatura, pH e força iônica) balanceiam as forças atrativas e repulsivas proteína-proteína e proteína-solvente que, conseqüentemente, afetam as taxas de desnaturação e de agregação, determinando assim a estrutura final do gel (ERRINGTON e FOEGEDING 1998; HUDSON et al., 2000). A geleificação de proteínas globulares envolve dois estágios. O primeiro é o desdobramento da estrutura nativa globular (desnaturação) e o segundo é a agregação intermolecular. A desnaturação envolve a dissociação de ligações intermoleculares (não covalentes), e este processo é conhecido como processo endotérmico. A agregação envolve a formação de ligações entre as moléculas de proteína, podendo ser covalentes e não covalentes (RELKIN, 1994; FITZSIMONS et al., 2006). A geleificação das proteínas é tradicionalmente conseguida por aquecimento, mas alguns processos físicos ou químicos formam géis de proteínas por mecanismos análogos à indução pelo calor. Dos métodos físicos, o principal, depois do tratamento térmico, é a alta pressão. Dos métodos químicos, podemos citar a acidificação, alterações enzimáticas e o uso de sais e uréia, causando modificações nas interações proteína-proteína e proteína com componentes do meio (TOTOSAUS et al., 2002).

**Efeito da Hidrofobicidade:** O conteúdo de cálcio e a hidrofobicidade da proteína são fatores que têm grande influência na textura e força do gel. Fatores de composição e etapas de processamento alteram a funcionalidade das proteínas que têm grande impacto na textura de géis (MANGINO, 1992).

Segundo LOURENÇO (2000), os géis protéicos são avaliados por meio de procedimentos que medem características macroestruturais e microestruturais e

por caracterização dos componentes do sistema. A avaliação macroestrutural de um gel envolve, usualmente, a mensuração de algumas propriedades químicas e físicas do sistema; entre elas, o conteúdo total de água, de proteína e de sólidos totais, alterações de turbidez durante a geleificação, faixa de pH em que a geleificação ocorre, grau de sinérese e medidas de propriedades do gel (dureza, adesividade, coesividade e elasticidade). As propriedades reológicas são parâmetros de consistência, medidas por métodos texturométricos, viscosimétricos, penetrométricos e compressiométricos.

A reologia é o estudo da relação que existe entre as forças externas que atuam sobre um corpo e a deformação ou escoamento que estas produzem (STEFFE, 1996). A determinação das propriedades reológicas de alimentos é importante para o projeto de tubulações e equipamentos, no controle de qualidade, no desenvolvimento de novos produtos e na predição da textura (TAKEUCHI, 2003).

Segundo o mesmo autor, a avaliação microestrutural envolve o acompanhamento das reações e a observação física das mudanças de estrutura microscópica dos componentes do sistema no decorrer da geleificação e, no gel, através de microscopia eletrônica, de espectroscopia e de técnicas de análise térmica, entre essas, a calorimetria diferencial de varredura. Os métodos físicos de avaliação microestrutural fornecem informações sobre as características microscópicas da rede protéica do gel, sobre a conformação das proteínas e sua influência nas propriedades reológicas.

### **3.1 Propriedades geleificantes da gelatina**

Soluções de gelatina formam géis transparentes após refrigeração abaixo da temperatura de geleificação, normalmente próximo a 40°C (SEGTAN e ISAKSSON, 2004). Durante a geleificação, as cadeias apresentam uma desordem conformacional e regeneram parcialmente a estrutura tripla hélice do colágeno. Esse processo é termoreversível, pois a rede é estabilizada por ponte de hidrogênio (BIGI et al., 2004).

Em nível molecular a formação de gelatina em solução envolve a renaturação de estruturas no estado ordenado para estruturas tripla hélice características do colágeno no estado nativo, sendo que a estrutura e as propriedades físicas dos géis são resultado do nível de renaturação (ACHET e HE, 1995).

A dureza do gel e as propriedades físicas são as principais condições do gel de gelatina influenciadas pelas condições de extração da gelatina. Geralmente, quando a gelatina é extraída em temperaturas mais baixas o gel é mais rígido e exibe um grande valor de *bloom*, o qual é mensurado pela dureza do gel (USTA et al., 2003). A força do gel ocorre em função do complexo de interações determinadas pela composição de aminoácidos. A estrutura do gel de gelatina é mais estável em presença dos iminoácidos hidroxiprolina e prolina (GOMEZ-GUILLÉN et al., 2002).

Géis de gelatina em pH 7,5 apresentam aparência transparente com uma tendência muito fracamente opaca, indicando uma microestrutura delicada em forma de rede. (WALKENSTRÖM e HERMANSSON, 1997). A gelatina é o agente mais versátil, utilizado para a modificação da textura de alimentos (HAUG et al., 2004), pois forma géis em baixas concentrações.

BOT et al. (1996) estudaram a formação de géis de gelatina em função da concentração (2-15%), da temperatura de resfriamento, pH em concentrações de cloreto de sódio e de cálcio, verificando a dureza dos géis.

Outros estudos verificaram comportamento reológico e mecânico de géis de gelatina (HAUG et al., 2004; KASAPIS e SABLANI, 2005; GIMÉNEZ et al., 2005; OTTONE e DEIBER, 2005; OTTONE et al., 2005; CHIOU et al., 2006); em diferentes condições de alta pressão (MONTEIRO et al., 2002); temperatura de gelatinização (MARANGONI e TOSH, 2005); presença de íon sódio, potássio e cálcio, ou em presença de ácido cítrico (OAKENFULL e SCOTT, 2003; SAITO, et al., 2004); tensão superficial (HYONO et al., 2004); viscosidade (HONE e HOWEL, 2002) e microestrutura (TOSH et al., 2003; MOHANTY e BOHIDAR, 2005).

Vários trabalhos publicados relatam propriedades de filmes elaborados à base de gelatina: SOBRAL et al (1997) estudaram as propriedades funcionais da gelatina em função da espessura; CARVALHO (1997, 2002) verificou as mudanças provocadas nos filmes modificados enzimática e quimicamente em

relação às propriedades funcionais dos mesmos. BERTAN (2003) estudou a adição de substâncias hidrofóbicas nos filmes de gelatina e as mudanças provocadas em suas características funcionais. BIGI et al. (2004) estudaram a relação entre o conteúdo da tripla-hélice com as propriedades mecânicas dos filmes de gelatina e FERREIRA (2000) e DAVANÇO (2006) avaliaram o efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre filmes à base de gelatina.

### **3.2 Propriedades geleificantes das proteína do soro de leite: WPI, $\beta$ -Lg**

As proteínas do soro melhoram as propriedades funcionais dos alimentos, apresentando como funções a melhora da textura, sabor e aroma, cor e melhoram o valor nutritivo, pois aumentam o teor de proteínas (EL-GARAWNY e EL-SALAM, 2005). A mais importante propriedade funcional é a habilidade de formar gel sob aquecimento, termo-induzido (MORR e HÁ, 1993; MLEKO, 1996; SGARBIERI, 1998; SINGH e HEVEA, 2003; HAVEA et al., 2004).

A capacidade geleificante dos concentrados protéicos de soro é muito variável, em virtude das diferenças de composição determinadas pelos métodos empregados na produção. A concentração protéica mínima, as condições de aquecimento necessárias para geleificação, as propriedades dos géis, como opacidade, firmeza, elasticidade e brilho e mecanismo de agregação, dependem das características desses concentrados (AGUILERA, 1995; PUYOL et al., 2001; KAZMIERSKI e CORREDIG, 2003).

Há na literatura vários trabalhos (MORR e FOEGEDING, 1990; PARRIS et al., 1997; MORR e HÁ, 1993; ANDRADE e NASSER, 2005; TORRES, 2005) mostrando que diferentes fontes e técnicas de processamento de soro resultam na variabilidade de composição e propriedades geleificantes de fontes comerciais de concentrado protéico de soro.

Tradicionalmente, as soluções de proteínas do soro geleificam quando submetidas a aquecimento em temperaturas superiores a 60°C, pois é quando estas proteínas se desnaturam parcialmente e, em seguida, se agregam para formar uma estrutura tridimensional que é capaz de reter água (MORR e HÁ, 1993). A geleificação das proteínas do soro pode ser induzida por vários fatores



físicos e químicos desde que, depois de uma alteração da estrutura nativa da proteína (desnaturação), se estabeleçam interações proteína-proteína (agregação) que originem uma rede tridimensional (TORRES, 2005).

As proteínas do soro, quando submetidas a aquecimento, sofrem mudanças conformacionais (desnaturação) e, em seguida, agregam-se de maneira irreversível, via ligações covalentes e não-covalentes, podendo formar um gel (VERHEUL et al., 1998) em uma concentração suficiente de proteína (maior que 5%).

Géis de proteína do soro variam de translúcidos e elásticos a agregados e opacos; os primeiros são formados por aquecimento de dispersões em temperaturas e concentrações protéicas baixas (3 a 5%), ou pelo aquecimento de dispersões extensivamente dialisadas. Os segundos, géis opacos e pouco elásticos, são formados em concentrações protéicas e temperaturas elevadas ou na presença de íons (IPSEN et al., 2002).

Segundo MESSENS et al. (1997), a geleificação das proteínas do soro de leite bovino ocorre em uma ampla faixa de pH (2,5-9,5). Fora desta região, as repulsões eletrostáticas entre as moléculas de proteína tornam-se excessivamente fortes e não permitem a formação de gel. Próximo do ponto isoelétrico (pI), há um excesso de interação proteína-proteína e, acima do ponto isoelétrico, aumentam as interações proteína-solvente (BERTRAND e TURGEON, 2007).

Em pH neutro, a estrutura dos géis térmicos de proteínas de soro de leite bovino parece ser suportada, em grande parte, por interações hidrofóbicas (essencialmente) e por interações covalentes (HAVEA et al., 2004). Em pH ácido, os géis formados, de natureza pouco elástica, parecem ser suportados essencialmente por pontes de hidrogênio (SHIMADA e CHEFTEL, 1988; 1989).

Géis de aparência macia, com boa propriedade de retenção de água, são obtidos em regiões próximas ao pI (pH 5,0), enquanto que, em zonas de pH neutro ou alcalino, os géis são de textura fina, mecanicamente fortes e elásticos, caracterizados pela força de repulsão eletrostática (IKEDA e MORRIS, 2002).

De acordo com MANGINO (1992), para valores de pH acima de 7,5, géis de concentrado protéico de soro de leite são translúcidos e viscoelásticos. Resultados descritos por DOI (1993) se assemelham aos de Mangino em valores de pH

próximos a 8,5. No entanto, em pHs abaixo de 7,5, os géis são opacos e menos viscoelásticos.

A gelificação do leite por acidificação é uma importante etapa no processo de fabricação de diversos produtos lácteos. A formação de géis ácidos de caseinato de sódio ou leite é mais favorável em pH próximos ao ponto isoeletrico (CHEN et al., 1999). As diferentes etapas que ocorrem no processo de acidificação são mais facilmente entendidas ao correlacionar a variação do comportamento reológico (textura) com o perfil dos peptídios agregados ou solubilizados.

O aquecimento é considerado um processo clássico de indução da desnaturação. A desnaturação das diferentes proteínas do soro de leite ocorre em temperaturas diferentes; além disso, a temperatura de desnaturação de cada uma depende de condições extrínsecas. O tratamento térmico do leite em temperaturas de 70-90°C causa desnaturação das proteínas do soro do leite, sendo que a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) desnatura com maior rapidez que a  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -la) (VASBINDER et al., 2003).

A temperatura de desnaturação da  $\beta$ -lg diminui de 82°C para 64,6°C quando o pH aumenta de 3,5 para 8,0 (LIU et al., 1994), enquanto que a temperatura de desnaturação da  $\alpha$ -la aumenta ligeiramente de 59°C para 62°C quando o pH aumenta de 3,5 para 7,5 (DE WIT e KLARENBECK 1984). As proteínas do soro de leite que apresentam melhores propriedades geleificantes são  $\beta$ -lactoglobulina (KAVANAGH et al., 2000) e a albumina do soro bovino (BSA).

A  $\beta$ -lg é a principal fração das proteínas do soro de leite bovino (7 a 12% do total de proteínas do leite desnatado). Sua estrutura terciária é fortemente estabilizada por ligações dissulfeto (Cys 66-Cys 160 e Cys 106-119), isso faz com que a presença de grupos sulfidril determinem a propriedade funcional das proteínas do soro, em particular, quando induzidas à geleificação após aquecimento (BOUHALLAB et al., 2004; HINES e FOEDING, 1993; D'ALFONSO et al., 2002). A  $\beta$ -Lg, que é uma proteína globular composta por 162 resíduos de aminoácidos (WONG et al. 1996) forma géis particulados brancos na região de pH 4-6, e géis transparentes constituídos por uma rede de filamentos finos abaixo e acima deste intervalo de pH. Grande parte das informações sobre a gelificação e

as propriedades de géis de proteínas globulares foi obtida a partir de estudos com sistemas formados por apenas uma proteína, em particular com a  $\beta$ -lactoglobulina (ANDRADE e NASSER, 2005).

### 3.3 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 à dos géis simples (TURGEON e OULD ELEYA, 2000).

No caso de produtos lácteos, existem inúmeros estudos de géis mistos. Estes géis podem apresentar uma ampla faixa de características de textura, estrutura e estabilidade, que dependem das propriedades das proteínas e da natureza e força das interações (DICKINSON, 1998). Assim, o conhecimento dos mecanismos de interação que ocorre em sistemas mistos é importante no desenvolvimento das propriedades desejáveis nos produtos alimentícios (TAKEUCHI, 2003).

Recentemente, considerável interesse tem sido dado ao estudo de misturas de proteínas e polissacarídeos nos setores acadêmico e industrial (TURGEON e BEAULIEU, 2001; FONKWE et al., 2003). Tais combinações podem implicar em novos ingredientes de alimentos, particularmente como substitutos de gordura (TOLSTOGUZOV e VINCENT, 1997; WALKESTRÖM et al., 1998; SCHORSCH et al., 2000; CAPRON et al., 1999), além de ser uma mistura comumente encontrada em alimentos que mostram um intervalo de propriedades mecânicas e de textura mais amplo que os géis puros de proteína. Esta mistura de hidrocolóides pode mostrar efeitos antagônicos ou sinérgicos, dependendo de um grande número de parâmetros como concentração dos hidrocolóides, pH, força iônica, conteúdo de açúcares, temperatura, peso molecular, fonte da proteína do leite, história térmica do produto, cisalhamento, entre outros (SYRBE et al., 1998).

As interações entre as proteínas do soro e k-carragena são favorecidas em valores de pH superiores a 5, e este efeito sinérgico é maior quando a proteína passa por tratamento térmico (MLEKO et al., 1997). LIZARRAGA et al., (2005)



verificaram o comportamento reológico de concentrados de proteínas do soro de leite (2,0–32,0%) em soluções aquosas de carragena (0,1–2,0%), observando que quantidades relativamente baixas de carragena produziram significativo aumento na viscosidade aparente dos géis de WPC. Segundo TAKEUCHI (2003), na mistura de carragena com proteínas do leite dois eventos independentes e antagônicos podem ocorrer: (1) a formação de um complexo entre a k-carragena e as proteínas do soro, que interfere na formação do gel, e (2) formação da rede elástica de carragena e a geleificação.

Géis mistos foram obtidos a partir da combinação de concentrado protéico de soro de leite (WPC) e carragena, sendo observadas as características de força e elasticidade destes géis (EL-GARAWANY e EL-SALAM, 2005). Estudos feito por BOLAND et al. (2005) verificaram a influência da textura em géis de gelatina adicionados de pectina para a obtenção de sobremesas.

Entre os compostos utilizados como ingredientes, também são encontrados alguns polissacarídeos como a xantana, muito utilizada em produtos lácteos pela sua capacidade de conferir aumento de viscosidade de soluções e formação de géis devido à sua elevada habilidade de ligação com a água (MORRIS, 1995), levando a uma melhoria das características reológicas de textura e estabilidade dos alimentos (SYRBE et al., 1998).

CAVALLIERI (2003) estudou as interações entre os compostos por proteínas do soro e xantana em diferentes condições de pH, com as proteínas nativas e desnaturadas termicamente. Os géis de consistência mais firme foram obtidos nos sistemas em que os valores de pH se equilibraram em torno de 4,7 e 5,1, enquanto que LI et al. (2005) verificaram os efeitos da adição de xantana na geleificação de solução a 15% de proteína do soro em pH 7,0. Os efeitos do pH (6.5, 6.0 e 5.5) na formação de géis contendo isolado protéico de soro de leite e goma xantana (0,01%, 0,03% e 0,06% v/v) foram estudados por BERTRAND e TURGEON (2007) que verificaram pequenas alterações que poderiam resultar em um sistema instável. Observaram também que os géis mistos apresentaram mais elasticidade que os géis simples de WPI.

Buscando viabilizar a obtenção de géis protéicos numa faixa mais ampla de pH, LUPANO (2000) estudou as propriedades de géis mistos de concentrado protéico de soro de leite e glúten de trigo 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 isolado protéico de soro de leite nos pHs de 4 a 6,3. Nos dois estudos, os autores observaram que os géis mistos apresentaram maior firmeza, elasticidade e capacidade de retenção de água, que os géis simples produzidos nas mesmas condições.

CHRONAKIS e KASAPIS (1993) estudaram as propriedades reológicas dos géis mistos de isolado protéico de soja em combinação com o isolado protéico de soro de leite bovino IPS:IPSL, usando uma quantidade fixa de IPSL (10% p/p) e um gradiente de concentrações de IPS (6-16% p/p). PAZ (2004) estudou o efeito de diferentes pHs, temperaturas, concentração protéica e proporção de isolado protéico de soro de leite (IPSL) e isolado protéico de soja (IPS) sobre as características físico-químicas, estruturais e funcionais dos géis obtidos dessa mistura e constatou que a mistura IPS:IPSL, nas condições estudadas, levou a formação de géis com melhores propriedades de textura e capacidade de retenção de água, quando comparados aos géis simples de IPS. Outro estudo feito por COMFORT e HOWELL (2002) verificou a influência da geleificação de proteínas mistas de soro de leite e 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.

YAMUL e LUPANO (2003) estudaram propriedades funcionais de géis mistos de concentrado protéico de soro de leite bovino e mel, preparados em três diferentes pHs 3,75, 4,2 e 7,0. Os resultados mostraram que as reações dissulfídicas eram importantes na determinação da elasticidade, capacidade de retenção de água e coesividade dos géis de WPC e que os produtos obtidos poderiam ser utilizados na formulação de diferentes sobremesas tais como bolos, flans e tortas.

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. Com o objetivo de melhorar a propriedade de geleificação de sistemas mistos, as proteínas musculares, concentrado protéico de soro de leite e isolado protéico de soja foram estudadas por LIU et al. (2000), que submeteram estas proteínas a condições oxidativas, pois estas induzem mudanças nas proteínas, tais como o 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, foram verificados um aumento de todos os atributos testados ( $p < 0,05$ ) com a adição de soja. Iogurtes com 1 a 2,5% de proteína de soja foram similares ao iogurte controle. A diferença no sabor do iogurte foi percebida com a adição de 5% de soja.

Recentemente muita atenção tem sido direcionada para o estudo de produtos capazes de geleificar em condições de menor temperatura através de um aquecimento prévio ao processamento (JU e KILARA, 1998) ou por adição de sais (HONGSPRABHAS e BARBUT, 1996) nas soluções de proteínas do soro. Estas proteínas, uma vez modificadas termicamente, poderiam ser adicionadas na formulação de alimentos levando à formação de géis em condições de menor temperatura, produzindo o que se chama de geleificação a frio ou, em inglês, "cold set gelation" (BRYANT e McCLEMENTS, 1998).

Géis mistos de gelatina e concentrados protéicos de soro de leite mostram uma maior tendência à opacidade quando comparados aos géis puros. Quando a concentração é variada nos géis mistos, uma alteração de cor é encontrada, indicando diferença estrutural entre esses géis (WALKENSTRÖM e HERMANSSON, 1997).

As interações proteína-proteína podem levar a três principais fenômenos:

(a) *Interações sinérgicas*, que resultam em um efeito que é maior do que aqueles produzidos em cada isolado protéico separadamente, com formação de géis compatíveis e espumas estáveis;

(b) *Precipitação*, por ocorrer predominantemente interações eletrostáticas intermoleculares e;

(c) *Separação de fases*, 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 (HOWELL, 1995).

#### **4 Textura em alimentos**

A preferência dos consumidores por produtos industrializados que apresentam reduzido teor de gordura, porém com características de melhor textura, aparência mais firme e sabor agradável, tem crescido ao longo dos últimos anos. A indústria de laticínios tem vivenciado esta demanda, levando a uma intensificação e diversificação das linhas de produção e desenvolvimento de ingredientes aptos a conferir tais atributos aos alimentos formulados. Alimentos processados são estruturados e estabilizados por um complexo arranjo de vários constituintes alimentícios e, dentre estes, proteínas e polissacarídeos desempenham um papel chave, devido às suas propriedades funcionais individuais ou de interação sinérgicas ou antagônicas (CAVALLIERI, 2003).

As proteínas exercem papel fundamental na textura de muitos produtos alimentícios. O desempenho funcional das proteínas irá depender de suas características conformacionais, que podem ser alteradas com as condições de processo, como tratamento térmico empregado, pH do meio e alterações no ambiente iônico entre outros. Por outro lado, fatores intrínsecos também podem afetar as propriedades destes compostos, como a composição de proteínas específicas, seqüência de aminoácidos, estruturas conformacionais nativas (secundárias e terciárias), caráter superficial das moléculas representado pelas

interações hidrofílicas ou hidrofóbicas e distribuição de cargas (SGARBIERI, 1998).

A textura é um dos principais atributos relacionados à qualidade dos alimentos, sendo difícil uma definição exata, já que esta se constitui em um grupo de propriedades físicas, visuais e estruturais dos alimentos, não podendo ser analisada isoladamente (BOURNE, 1982).

SZCZESNIAK (1963) definiu textura como a manifestação sensorial e funcional das propriedades estruturais e mecânicas dos alimentos detectadas através do sentido da visão, audição e toque. As características foram divididas em: mecânicas, geométricas e outras. As mecânicas estão relacionadas à reação dos alimentos e à aplicação de uma força (dureza, coesividade, viscosidade, elasticidade e adesividade); as geométricas, relacionadas com o tamanho, formato e orientação das partículas no alimento (fibroso, cristalino, granuloso, etc.) além de outras características relacionadas com a percepção da umidade, teor de óleos e gorduras nos alimentos (oleosidade, suculência, etc.).

#### **4.1 Tipos de testes**

SCOTT BLAIR (1958) classificou os métodos objetivos de textura em três tipos: fundamentais, empíricos e imitativos:

a) Os fundamentais medem propriedades mecânicas como módulos de elasticidade ou viscosidade. Os resultados são expressos em unidades definidas, podendo-se quantificar os efeitos de variação da amostra, forma geométrica do dispositivo usado e outras condições do teste.

b) Os métodos empíricos medem propriedades mecânicas da amostra em unidades empíricas do instrumento, aplicando uma combinação de forças como, por exemplo, compressão, tração, cisalhamento, escoamento e extrusão (BOURNE, 1982).

c) Os métodos imitativos são os que simulam as condições em que o alimento é submetido na realidade. Os instrumentos simulam o complexo processo de mastigação, porém em grau limitado. Geralmente apresentam dispositivos em forma de dentes e/ou uma ação que imita o movimento das



mandíbulas no plano vertical. O primeiro instrumento criado deste tipo foi o texturômetro da General Foods (BRENNAN, 1984).

## 4.2 Tipos de instrumentos

Os instrumentos utilizados nas medidas de textura, podem ser individuais ou múltiplos. Os individuais têm uma ação específica sobre o alimento e utilizam vários tipos de dispositivos diferentes. Os mais utilizados são: o penetrômetro, em que a medida é dada através de uma força requerida para uma certa penetração ou para uma penetração total, observada num determinado tempo e associada com a dureza ou firmeza do alimento; o gelômetro de *bloom*, para medir o poder de gelificação; consistômetros, que são instrumentos empíricos para medir a consistência de alimentos semi-sólidos, como os amilógrafos, farinógrafos e os de cisalhamento, utilizados para sólidos, empregando uma ou várias lâminas (SZCZESNIAK, 1963; SZCZESNIAK, 1975a).

Os instrumentos múltiplos permitem obter vários parâmetros de textura em uma só medida, através do registro de curvas/força *versus* tempo, força *versus* deformação e deformação *versus* tempo. Estes instrumentos são usados numa grande variedade de testes de textura por apresentarem precisão e exatidão. O *Instron Universal Testing Machine* (UTM) é um exemplo deste tipo de instrumento, que apresenta uma grande variedade de dispositivos que podem ser adaptados, possibilitando a realização de quase todos os métodos de medidas de textura (BRENNAN, 1984). O *Instron* foi adaptado por BOURNE (1982) para a análise de perfil de textura (TPA) de alimentos, cujo fundamento foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores da *General Foods* tanto para a análise sensorial como para a instrumental, a partir do *Texturômetro General Foods*, que imitava o movimento de mastigação na boca (SZCZESNIAK, 1975a; SZCZESNIAK, 1975b; BRANDT et al., 1963; FRIEDMAN et al., 1963).

Atualmente, dois instrumentos são muito utilizados nas determinações da Análise de Perfil de Textura, o *Instron* e o Analisador de Textura TAX-T<sub>2</sub>. Este último consiste num sistema hidráulico para a movimentação de um pistão com velocidade variável conforme o método, ao qual é conectado um dispositivo que

entra em contato com a amostra, registrando a resistência na forma de curvas das quais são obtidos os parâmetros para os modelos matemáticos de previsão de textura (TOLEDO, 2004).

## 5 Análise Sensorial

Dois fatores prevalecem na decisão de compra do consumidor: preço e qualidade. Sabendo-se que um dos parâmetros de qualidade dos produtos alimentícios é o sensorial, reforça-se a importância dos métodos de análise sensorial, sendo esta ferramenta cada vez mais utilizada na indústria de alimentos (AMBIEL, 2004). Os testes sensoriais têm sido conduzidos desde a existência de seres humanos, avaliando-se a aceitação dos alimentos, água e tudo que possa ser utilizado e consumido (MEILGAARD et al., 1999a).

Testes sensoriais com escalas envolvem o uso de números, expressões verbais e/ou faciais, ou linhas, para expressar tanto a intensidade percebida de um atributo em um alimento (doçura, acidez), como a opinião de um indivíduo com relação ao produto (MEILGAARD et al., 1991b). Os testes sensoriais possuem importantes vantagens, tais como serem capazes de identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, definir características sensoriais importantes de um produto de forma rápida, detectar particularidades que não podem ser detectadas por outros procedimentos analíticos (MUÑOZ et al., 1992).

As principais escalas utilizadas para medir e interpretar as respostas humanas à avaliação sensorial de produtos alimentícios podem ser apresentadas em ordem crescente de complexidade: i) escalas nominais ou de classificação; ii) escalas ordinais ou de ordenação; iii) escalas de intervalo e, iv) escalas de razão (MEILGAARD et al., 1991a; 1991b; STONE e SIDEL, 1993; LAWLESS e HEYMANN, 1999). Somam-se a estas outros tipos de escalas que, embora menos utilizadas, foram propostas com o objetivo de minimizar ou eliminar problemas encontrados nas escalas anteriormente citadas, são elas: a escala híbrida (LAWLESS e MALONE, 1986a,b; VILLANUEVA et al., 2005), a *labeled magnitude scale* (GREEN et al., 1993; SCHUTZ e CARDELLO, 2001), a escala autoajustável (GAY e MEAD, 1992; VILLANUEVA et al., 2001), dentre outras.

Os dois tipos de escalas de intervalo mais comumente utilizados na análise sensorial de alimentos são: i) escalas de categoria e ii) escalas lineares (STONE e SIDEL, 1993; LAWLESS e HEYMANN, 1999). Nas escalas de categoria, também chamadas de escalas estruturadas ou afetivas, o provador é solicitado a expressar a intensidade de um atributo ou o grau de aceitação de um produto escolhendo a categoria da escala que melhor corresponda à sua opinião. Escalas de categoria são escalas finitas, na qual cada categoria é associada a uma expressão verbal, numérica ou ilustrada, também chamados de testes afetivos (MEILGAARD et al., 1991; LAWLESS e HEYMANN, 1999), utilizados quando se necessita conhecer o “status afetivo” dos consumidores com relação ao(s) produto(s), e para isso utiliza-se das escalas hedônicas e dos valores relativos de aceitabilidade se pode inferir a preferência, ou seja, as amostras mais aceitas são as mais preferidas e vice-versa (MEILGAARD et al., 1991).

Segundo os mesmos autores, os testes afetivos podem ser classificados em dois tipos: testes de aceitação, que avaliam o quanto o consumidor gosta ou desgosta de um ou mais produtos; e testes de preferência, que medem a preferência dos consumidores de um produto sobre os demais. Eles têm por objetivo conhecer a opinião pessoal de um determinado grupo de consumidores em relação a um ou mais produtos, opinião essa que pode ser dada em relação ao produto de uma forma global, ou em relação a apenas algumas características específicas do produto.

A escala hedônica estruturada de 9 pontos (PERYAM e PILGRIM, 1957) é a mais empregada para avaliar a aceitação de alimentos (Quadro 2).

Esta escala consiste em 9 categorias verbais com termos variando entre “desgostei extremamente” (valor 1) e “gostei extremamente” (valor 9), possuindo ainda uma categoria neutra localizada no centro da escala, a qual é associada ao termo “nem gostei/nem desgostei” (valor 5). O grande uso desta escala se deve, notadamente, à sua confiabilidade e suficiente sensibilidade para detectar diferenças de aceitação entre amostras (SCHUTZ e CARDELLO, 2001).

O teste de aceitação tem sido muito útil e pode ser aplicado antes da pesquisa de mercado, de forma a predizer o sucesso de venda do produto (STONE e SIDEL, 1993). Apresenta como principal vantagem a sua facilidade de



entendimento e uso por provadores não treinados, o que os torna a opção preferencial com consumidores (CARDELLO e SCHUTZ, 1996).

**Quadro 2** Ficha de avaliação com escala hedônica estruturada mista de 9 pontos.

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo quatro amostras de gelatina codificadas. Avalie, por favor, as duas amostras utilizando a escala abaixo (a nota varia de 1 a 9), para descrever o quanto você gostou ou desgostou.

- 9 gostei extremamente
- 8 gostei muito
- 7 gostei moderadamente
- 6 gostei ligeiramente
- 5 nem gostei / nem desgostei
- 4 desgostei ligeiramente
- 3 desgostei moderadamente
- 2 desgostei muito
- 1 desgostei extremamente

| Amostra n° | Valor |
|------------|-------|
| _____      | _____ |
| _____      | _____ |

Comentários:

## 6 Planejamento experimental

A metodologia do planejamento experimental fatorial associada à análise de superfície de resposta é uma ferramenta fundamental na teoria estatística, por fornecer informações muito mais seguras do processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativas e erro (BOX et al., 1978).

Através desta técnica sistemática de condução de experimentos é possível avaliar os efeitos principais das variáveis nas respostas desejadas, bem como a interação entre elas. A partir da análise de variância, pode-se propor um modelo probabilístico adequado que correlaciona as respostas em função das variáveis

estudadas, construindo-se as superfícies de resposta para determinar as faixas ótimas de operação.

Nem sempre o objetivo do trabalho em estudo é a otimização do processo, mas sim um melhor conhecimento sobre as respostas do sistema frente às variações ou perturbações que podem ocorrer dentro das faixas de operação estabelecidas. Assim, outra informação muito importante que pode ser obtida através do planejamento fatorial é a verificação das variáveis que apresentam nenhuma ou pouca influência nas respostas, fornecendo subsídios fundamentais quanto à flexibilidade e robustez do sistema e, conseqüentemente, na definição da melhor estratégia de controle operacional (OGRODOWSKI, 2006).

### **6.1 Planejamento fatorial e *Screening Design***

Segundo RODRIGUES e IEMMA (2005) a análise univariável ou o estudo de uma variável por vez, mantendo as outras constantes, dificulta grandemente a discussão dos resultados, além do tempo gasto, material e principalmente da falta de conclusão baseada numa metodologia científica. A maior falta de informação no estudo univariável relaciona-se ao efeito sinérgico ou antagônico entre as variáveis, que só podem ser obtidas pela determinação dos efeitos de interação entre as variáveis através de um planejamento fatorial. Uma outra vantagem do planejamento fatorial é a possibilidade de otimizar várias respostas ao mesmo tempo. Para se aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário, primeiramente, programar ensaios através de um planejamento fatorial.

Segundo o mesmo autor, este método consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada e, então, executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como primeira etapa é usual um planejamento fatorial com dois níveis (-1 e +1) para cada variável. Uma particularidade consistente em processos bioquímicos é o grande número de variáveis envolvidas. Os planejamentos fatoriais fracionados são muito úteis nas etapas prévias de um desenvolvimento de processo, por exemplo, para identificação das variáveis mais relevantes que devem entrar num planejamento

completo numa etapa posterior. Assim, este procedimento é muito interessante em termos qualitativos, mas não se deve, a partir de um planejamento fracionado, otimizar o processo. Isto porque os efeitos principais, na verdade contrastes, estão confundidos com interações de 2ª ou 3ª ordem ou superiores, conforme o tipo de resolução do fracional.

Quando o número de variáveis aumenta, a utilização do planejamento fracionado começa a dificultar a análise dos contrastes das variáveis. Uma alternativa muito interessante que reduz drasticamente o número de ensaios a serem realizados é o planejamento fatorial proposto por Plackett e Burman em 1946, citado por RODRIGUES et al. (1998); RODRIGUES e IEMMA (2005). São planejamentos saturados, muito úteis como avaliação prévia de variáveis *screening design*, etapa preliminar à otimização de processos. As frações propostas por Plackett Burman (PB) permitem estimar "efeitos principais" (contrastes) com variância mínima. Nos planejamentos de PB, as colunas são todas ortogonais. Esta simetria permite que os "efeitos principais" de cada variável sejam determinados individualmente, admitindo-se que os efeitos de interação sejam desprezíveis (NETO et al., 1995).

Os planejamentos propostos por PB com maior potencial de uso para 12, 16, 20, 24, 28 e 36 ensaios, existindo, porém para sistemas superiores a 100 variáveis. Eles podem ser usados por qualquer número de fatores ou variáveis de entrada, desde que estes fiquem pelo menos um número abaixo do número de ensaios. Apesar disto, é conveniente utilizar um planejamento que fique com o número de ensaios um pouco superior ao número de variáveis, para se ter graus de liberdade que possibilitem estimar o erro padrão e assim definir as variáveis estatisticamente significativas. Embora os planejamentos de PB apresentem as vantagens citadas acima, ele é pouco citado na literatura (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHET, D.; HE, X.W. Determination of the renaturation level in gelatin films. *Polymer*, v.36, n.4, p.787-791, 1995.

AGUIAR, C.L.; CORÓ, F.A.G.; PEDRÃO, M.R. Componentes ativos de origem animal. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.23, n.2, p.413-434, 2005.

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

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

AIMUTIS, W.R. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.989-995, 2004.

AIMUTIS, W.R. Safety aspects related to milk-derived bioactives. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.375, p.130-135, 2002.

ALEXANDER, J.W; GOTTSCHLISH, M.M. Nutritional immunomodulation in burned patients. **Critical Care Medical**, v.18, p.S149-153, 1990.

AMBIEL, C. Efeitos das concentrações combinadas de cloreto e lactato de sódio na qualidade e conservação de um sucedâneo da carne-de-sol. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2004.

AMES, W.M.; The manufacturing of hide glue and gelatin. **Journal Society Leather Trades Chemistry**, v.33, p.407, 1949.

ANDRADE, C.T.; NASSER, R.O. Estudo reológico da gelificação induzida pelo calor de proteínas do soro do leite e dos géis resultantes sob condições variadas de pH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p.315-321, 2005.

ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**, 1ª ed., Editora Manole Ltda., 2003.

- ASTBURY, W.T. The molecular structure of the fibers of the collagen group. **Journal Society Leather Trades Chemistry**, v.24, p.69, 1940.
- AUDIC, J.; CHAUFER, B.; DAUFIN, G. Non-food applications of milk components and dairy co-products: a review. **Lait**, v.83, p.417-438, 2003.
- BARNETT, M.L.; KREMER, J.M.; ST. CLAIR, W.; CLEGG, D.O.; FURST, D.; WEISMAN, M.; FLETCHER, M.J.F.; CHASAN-TABER, S.; FINGER, E.; MORALES, A.; LE, C.H.; TRENTHAM, D.E. Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen. **Arthritis & Rheumatism**, v.41, p.290-297, 1998.
- BENDER, A.E.; MILLER, D.S.; ELIZABETH, J.T. The biological value of gelatin. **Chemistry and Industry**, p.799, 1953.
- BERTAN, L.C. Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 148p. 2003.
- BERTRAND, M.; TURGEON, S.L. Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.159-166, 2007.
- BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v.25, n.25 p.5675-5680, 2004.
- BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, MP; MAUBOIS, JL; BAUFRÈRE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v.94, p.14930-14935, 1997.
- BOLAND, A.B.; DELAHUNTY, C.M.; RUTH, S.M. Influence of the texture of gelatin gels and pectin gels on strawberry flavour release and perception. **Food Chemistry**, p.1-9, 2005.

BOT, A.; AMERONGEN, I.A.V.; GROOT, R.D.; HOEKSTRA, N.L.; AGTEROF, W.G.M. Large deformation rheology of gelatins gels. *Polymer Gels and Networks*, v.4, p.189-227, 1996.

BOUHALLAB, S.; HENRY, G.; CAUSSIN, F.; CROGUENNEC, T.; FAUQUANT, J.; MOLLÉ, D. Copper-catalyzed formation of disulfide-linked dimmer of bovine  $\beta$ -lactoglobulina. *Lait*, v.84, p.517-525, 2004.

BOUNOUS, G; GERVAIS, F; AMER, V; BATIST, G; GOLD, P. The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and the diseases of aging. **Clinical and Investigative Medicine**, n.12, p.343-349, 1989.

BOUNOUS, G; GOLD, P. The biological activity of unde-natured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, v.14, p.296-309, 1991.

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

BOX, G.E.P., HUNTER, W.G. & HUNTER, J.S. **Statistics for Experimenters – An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. John Wiley & Sons, N.Y., 1978.

BRANDT, M.A.; SKINNER, E.Z.; CONNAN, J.A. Texture profile method. **Journal of Food Science**. v.28, p.404-409, 1963.

BRENNAN, J.G. Texture perception and measurement. In: PIGGOTT, J. R. (Ed) **Sensory Applied**. Science Publ., 1984. p.59-91.

BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**, n.1, p.21-28, 1996.

BRODIE, J.M. Hair growth benefits from dietary cysteine-gelatine supplementation. **Journal Applied Cosmetology**, v.2, p.15-27, 1984.



BRYANT, C.M.; McCLEMENTS, D.J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat denatured whey. **Trends in Food Science and Technology**, v.9, p.143-151, 1998.

CANCINO, B.; ESPINA, V.; ORELLANA, C. Whey concentration using microfiltration and ultrafiltration. **Desalination**, v.200, p. 557-558, 2006.

CAPRON, I.; NICOLAI, T.; DURAND, D. Heat induced aggregation and gelation of b-lactoglobulin in the presence of k-carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v.13, p.1-5, 1999.

CARDELLO, A.V.; SCHUTZ, H.G. Food appropriateness measures as an adjunct to consumer food preferences/acceptability. **Food Quality and Preference**, v.7,n.3-4, p.239-249, 1996.

CARVALHO, R.A. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1997, 81p.

CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R.F. Properties of chemically modified gelatin films **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23, n.1 , p.45 - 53, 2006.

CARVALHO, R.A. Elaboração e caracterização de filmes protéicos a base de gelatina modificada enzimaticamente e quimicamente. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002.

CAVALLIERI, A.L.F. Influência da desnaturação térmica e do pH sobre as propriedades reológicas de proteínas do soro e sua compatibilidade termodinâmica com a xantana. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2003.

CHARLEY, H. Gelatin. In: **Food Science**, 2 ed., New Jersey: Prentice-Hall, inc., p.443-447, 1992.

CHATTERJEE, S.; BOHIDAR H.B. Effect of cationic size on gelation temperature and properties of gelatin hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.35, p.81–88, 2005.

CHATTERTON, D.E.W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of b-lactoglobulin and a-lactalbumin – Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v.16, n.11, p.1229-1240, 2006.

CHEN, J.S.; DICKINSON, E.; EDWARDS, M. Rheology of acid-induced sodium caseinate stabilized emulsion gels. **Journal of Texture Studies**, v.30, p.377-396, 1999.

CHIOU, B.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; SHEY, J.; YEE, E.; BECHTEL, P.J.; SYED IMAM, H.; GLENN, G.M.; ORTS, W.J. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. **Polymer**, v.47, p. 6379-6386, 2006.

CHO, S.M.; KWAK, K.S.; PARK, D.C. ; GU, Y.S.; JI, C.I., JANG, D.H.; LEE, Y.B.; KIM, S.B. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.573–579, 2004.

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

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.254-262, 2000.

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

COSTA, E.L. Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de leite com atividade anti-hipertensiva. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004.

D'ALFONSO, L.; COLLINI, M.; BALDINI, G.; Does  $\beta$ -lactoglobulin denaturation occur via an intermediate state? **Biochemistry**, v.41, p.326-333, 2002.



DAVANÇO, T. Desenvolvimento e caracterização de ciofilmes à base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2006, 155p.

DE JONGH, H.H.J.; GRÖNEVELD, T.; DE GROOT, J. Mild isolation procedure discloses new protein structural properties of  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.562-571, 2001.

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

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

DJAGNY, K.B.; WANG, Z.; XU, S. Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.41, n.6, p.481-492, 2001.

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

DONIEL, H; VOWINKEL, M; REHNER, G. Effect of casein and b-casomorphins on gastrointestinal motility in rats. **Journal of Nutrition**, v.120, p.252-257, 1990.

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**, v.65, n.7, p.1244-1247, 2000.

EL-GARAWANY, G.A; EL-SALAM, M.H., Preparation and rheological properties of a dairy dessert based on whey protein/potato starch. **Food Chemistry**, v.91, p.261-267, 2005.

ERRINGTON, A.D.; FOEGEDING, E.A. Factors determining fracture stress and strain of fine-stranded whey protein gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2963-2967, 1998.

ETZEL, M.R. The Emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. Manufacture and use of dairy protein fractions. **American Society for Nutritional Sciences**, p.996S-1002S, 2004.

EUSTON, S.R. Computer simulation of proteins: adsorption, gelation and self-association. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.9, p.321-327, 2004.

FARIA, M. Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade anti-hipertensiva de hidrolisados comerciais de diversas fontes protéicas. Dissertação de mestrado. Faculdade de engenharia de alimentos. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, 2006, 134p.

FERREIRA, V.L.P.; ALMEIDA, T.C.A.; PETTINELLI, M.L.C.V.; SILVA, M.A.A.P.; CHAVES, J.B.P.; BARBOSA, E. M.M. Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos. Campinas: SBCTA, 127p.-(Manual: Série Qualidade), 2000.

FITZGERALD, R.J. Potential uses of caseinophosphopeptides. **International Dairy Journal**, v.8, p.451-457, 1998.

FITZSIMONS, S.M.; MULVIHILL, D.M.; MORRIS, E.R. Denaturation and aggregation process in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v.21, n.4, p.638-644, 2006.

FONKWE, L.G.; NARSIMHAN, G.; CHA, A.S. Characterization of gelation time and texture of gelatin and gelatin-polysaccharide mixed gels. **Food Hydrocolloids**, v.17 p.871-883, 2003.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk Proteins. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, Cap.4, p.147-238, 1998.

FRANCIS G.L.; REGESTER, G.O.; WEBB, H.A.; BALLARD, J.F. Extraction from cheese whey by cation-exchange chromatography of factors that stimulate the growth of mammalian cells. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.1209-1218, 1995.

FRIEDMAN, H.H.; WHITNEY, J.E.; SZCZESNIAK, A.S. The Texturometer- a new instrumente for objctive measurement. **Journal of Food Science**, v.28, p.390-396, 1963.

FUENTE, M.A.; SINGH, H.; HEMAR, Y. Recent advances in the characterization of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.262-274, 2002.

FUJITA H.; YOKOYAMA; YOSHIKAWA, M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. **Journal of Food Science**, v.65, n.4, p.564-569, 2000.

GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y.; SAINT-SAUVEUR, D. Immunomodulatory peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. **International Dairy Journal**, v.16, n.11, p.1315-1323, 2006.

GAY, C.; MEAD, R.A.A statistical appraisal of the problem of sensory measurements. **Journal of Sensory Studies**, v.7, n.3, p.205-228, 1992.

GENNADIOS, A.; McHUGH, T.H.; WELLER, C.L.; KROCHTA, J.M. Edible coating and films based on proteins, in: **Edible Coatings and improve Food Quality**, KROCHTA, J. M., BALDWIN, E. A. & NISPEROS-CARRIEDO, M. O., Technomic Publishing Company, Ch 9, p.201-277, 1994.

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Moisture adsorption by grain protein film. **Transactions of the ASAE**, v.37, n.2, p.535-539, 1994.

GIMÉNEZ, B.; M.C. GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. The role of salt washing of fish skins in chemical and rheological properties of gelatin extracted. **Food Hydrocolloids**, v.19, p.951-957, 2005.

GOLDSTEIN, L.; CHEN, H.; BAUER, R.J.; BAUER, S.M.; VELAZQUEZ, O.C.; Normal human fibroblasts enable melanoma cells to induce angiogenesis in type I collagen. **Surgery**, v.138, p.439-449, 2005

GOMÉZ-GUILLÉN, M.C.; TURNAY, J.; FERNANDEZ-DIAZ, M.D.; ULMO, N.; LIZABE, M.A.; MONTERO, P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species. **Food Hydrocolloids**, v.16, p.25-34, 2002.

GOSAL, W.S.; ROSS-MURPHY, S.B. Globular protein gelation. **Current Opinion in Colloid & Interface Sciences**, v.5, p.188-194, 2000.

GREEN, B.G.; SHAFFER, G.; GILMORE, M.M. Derivation and evaluation of a semantic scale of oral sensation magnitude with apparent ratio properties. **Chemical Senses**, v.18, p.683-702, 1993.

HAUG, I.J.; DRAGET, K.I.; SMIDSROD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.2, p.203-213, 2004.

HAVEA, P.; CARR A.J.; CREAMER, L.K. The roles of disulphide and non-covalent bonding in the functional properties of heat-induced whey protein gels. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.330-339, 2004.

HINES, M.E.; FOEGEDING, E.A. Interactions of  $\alpha$ -lactalbumin and bovine serum albumin with  $\beta$ -lactoglobulin in thermally induced gelation. **Journal Agriculture of Food Chemistry**, v.41, p.341-346, 1993.

HONE, J.H.E.; HOWEL, A.M. Viscosity of Colloidal Suspensions in Aqueous Gelatin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.25, p.193-199, 2002.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced gelation of whey protein isolate: Effects of pre-heating. **Food Research International**, v.29, n.2, p.135-139, 1996.

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. Cap 16, p.335 -336, 1995.

HUDSON, H.M.; DAUBERT, C.R.; FOEGEDING, E.A. Rheological and physical properties of derivitized whey protein isolate powders. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3112-3119, 2000.

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

HYONO, A.; SATO, H.; MATSUBARA, H.; OKUBO, M.; OHSHIMA, H.; Overshoot and oscillation in surface tension of gelatin solutions **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.39, p.65-68, 2004.

IKEDA, S.; MORRIS, V.J. Fine-stranded and particulate aggregates of heat-denatured whey proteins visualized by atomic force microscopy. **Biomacromolecules**, v.3, p.382-389, 2002.

IPSEN, R.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L.H.; QVIST, K.B. Gelation of whey protein induced by high pressure. **Milchwissenschaft**, v.57, n.11/12, p.650-653, 2002.

ITO, N.; KOJIMA, T.; NAGATA, H.; OZEKI, N.; YOSHIDA, Y.; NONAMI, T. Apoptosis induced by culturing MH134 cells in the presence of porcine skin gelatin in vitro. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v.17, n.4, p.379-384, 2002.

IWAI, K.; HASEGAVA, T.; TAGUCHI, Y.; MORIMATSU, F.; SATO, K.; NAKAMURA, Y.; HIGASHI, A.; KIDO, Y.; NAKABO, Y.; OHTSUKI, K. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatine hidrolisates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.16, p.6531-6536, 2005.

JOHNSTON-BANKS, F.A. **Gelatine**. In Food Gels, ed. P. Harris. Elsevier Applied Science, New York, NY, p. 233-289, 1990.

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

KASAPIS, S.; SABLANI, S.S. A fundamental approach for the estimation of the mechanical glass transition temperature in gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.36, p.71-78, 2005.

KAVANAGH, G.M.; CLARK, A.H.; ROSS-MURPHY, S.B. Heat-induced gelation of globular protein: part 3. Molecular studies on low pH b-lactoglobulin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.28, p.41-50, 2000.

KAZMIERSKI, M.; CORREDIG, M. Characterization of soluble aggregates from whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.685-692, 2003.

KELLY, P.M.; MCDONAGH, D. Innovative dairy ingredients. *World of Food Ingredients*. October/November, p.24-32, 2002.

KINSELLA, J.E. Milk Proteins: physicochemical and functional properties. **Critical Review Food Science Nutrition**, v.21, p.197-261, 1984.

KORHONEN, H. Technology option for new nutritional concepts. **International Journal of Dairy Technology**, v.55, n.2, p.79-88, 2002.

KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; RANTAMÄKI, P.; TUPASELA, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, n.8-9, p.307-319, 1998.

KRANS, C.; SCHWARS, E. Osteoporose-artrose: aspectos nutricionais e fisiológicos em relação à prevenção e ao acompanhamento terapêutico. **Proteva Food AG**, Höchst, Alemanha, 60p., 2001.

KRONER, T.D.; TABROFF, W.; MCGORR, J.J. Peptides isolated from hydrolyzed of steer hide collagen II. **Journal American Chemistry Society**, v.77, p.3356, 1955.

LA FUENTE, M.A.; HEMAR, Y.; TAMEHANA, M.; MUNRO, P.A.; SINGH, H. Process induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. **International Dairy Journal**, v.12, n.4, p.361-369, 2002.

LAI, M.C.; TOPP, E.M. Solid-state chemical stability of proteins and peptides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.88, p.489-500, 1999.

LAWLESS, H.T.; MALONE, G.J. The discriminative efficiency oh common scaling methods. **Journal of Sensory Studies**, v.1, n.1, p.85-98, 1986a.

LAWLESS, H.T.; MALONE, G.J. A comparison of rating scales: sensitivity, replicates and relative measurement. **Journal of Sensory Studies**, v.1, n.2, p.155-174, 1986b.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. New York: Chapman and Hall, 1999. 827 p.

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

LI, J.; ELEYA, M.M.O.; GUNASEKARAN, S. Gelation of whey protein and xanthan mixture: Effect of heating rate on rheological properties. **Food Hydrocolloids**, p.1-9, 2005.

LIU, W.; LANGER, R.; KLIBANOV, A. Moisture-induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p.177-184, 1991.

LIU, T.X.; RELKIN, P.; LAUNAY, B. Thermal denaturation and heat-induced gelation properties of  $\beta$ -lactoglobulin. Effects of some chemical parameters. **Thermochimica Acta**, v.246, p.387-403, 1994.

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



LIZARRAGA, M.S.; VICIN, D.D.P.V.; GONZÁLEZ, R.; A. RUBIOLO, A.; SANTIAGO, L.G. Rheological behaviour of whey protein concentrate and l-carrageenan aqueous mixtures. **Food Hydrocolloids**, p.1-9, 2005.

LOURENÇO, E. **Tópicos de Proteínas de Alimentos**. Jaboticabal : Funep, Fapesp, 344p., 2000.

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

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, v.48, n.10, p.89-95, 1994.

MANGINO, M.E. Gelation of whey protein concentrates. **Food Techonogy**, v.46, n.1, p.114-117, 1992.

MARANGONI. A.G.; TOSH, S.M. On the nature of the maximum gelation temperature in polymer gels. **Biophysical Chemistry**, v.113, p.265– 267, 2005.

MARKUS, C.R.; OLIVIER, B.; PANHUYSEN, G.E.M.; VAN DER GUGTEN, J.; ALLES, M.; TUITEN, A. The bovine protein  $\alpha$ -lactalbumin increases the plasm ratio of triptophan to the other large neutral amino acids and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood Ander stres. **American Journal of Critical Nutrition**, v.71, p.1536-1544, 2000.

MAUBOIS, J.L.; OLLIVER, G. Extraction of milk protein In: DAMODARAN, S. e PARAF, A. **Food proteins and their applications**, New York, Marcel Dekker Inc., p.1579-1595, 1997.

McDONAGH, D.; FITZGERALD, R.J. Production of caseinophosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a range commercial protease preparations. **International Dairy Journal**, v.8, p.39-45, 1998.

MEILGAARD, M.; CIVILE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, Inc., 354 p. 1991a.



MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Current progress in sensory analysis. A review. **American Society of Brewing Chemists**, v.49, p.101-109, 1991b.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory Evaluation Techniques. 3rd ed. Washington: CRC, 1999.

MEISEL, H. Bioactive substances of food origin: a challenge for food and nutrition science. **Nahrung**, v.43, p.147, 1999.

MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, v.8, n.5/6, p.363-373, 1998.

MEISEL, H.; BROCKLEMAN, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thoro-functional properties. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.76, p.207-215, 1999.

MEISEL, H.; GOEPFERT, A.; GUNTER, S. ACE-inhibitory activities in milk products. **Milchwissenschaft**, v.52, p.307-311, 1997.

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

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

MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; MCBEON, L.D. **Handbook of Dairy Foods and Nutrition**. Boca Raton, London 2<sup>o</sup> ed, New York, Washington, D.C., 2000.

MLEKO, S. Effect of pH on the microstructure and texture of whey protein concentrates and isolate gels. **Polymer Journal of Food Nutrition Science**, v.5, p. 33-46, 1996.

- MLEKO, S.; LI-CHAN, E.C.Y.; PIKUS, S. Interactions of k-carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. **Food Research International**, v.30, p.427-433, 1997.
- MOHANTY, B.; BOHIDAR, H.B. Microscopic structure of gelatin coacervates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.36, p.39-46, 2005.
- MONTEIRO, P.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M.D.; GÓMEZ-GUILLÉN, MC. Characterization of gelatin gels induced by high pressure. **Food Hydrocolloids**, v.16, p.197-205, 2002.
- MORR, C.V.; FOEGEDING, E.A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. **Food Technology**, v.44, n.4, p.100-112, 1990.
- MORR, C.V.; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- MORRIS, V.J. Bacterial polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, p.341-375, 1995.
- MOSKOWITZ, R.W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.30, p.87-99, 2000.
- MULVIHILL, D.M.; ENNIS, M.P. **Functional milk proteins**: Production and utilisation. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry. Part B, Vol. 1* (pp. 1175-1228). New York: Kluwer Academic, 2003.
- MUÑOZ, A. M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation in quality control. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 240, 1992.
- MURAKAMI, M.; TONOUCHI, H.; TAKAHASHI, R.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; NEGISHI, H.; SAITO, T. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (b-

lactosin B) isolated from a commercial whey product. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.7, p.1967-1974, 2004.

NEMATI, M. OVEISI, M.R.; ABDOLLAHI, H.; SABZEVARI, O. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. **Journal of Pharmaceutical na Biomedical Analysis**, p.1-8, 2004.

NETO, B.B., SCRMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de processos**. Campinas, SP: Editora da Unicamp (série Manuais), 1995.

NIELSSEN, P.M. Functionality of protein hydrolysates. In: S. Damodaram; Paraf. A (Eds). **Food Proteins and their Application**. New York, US: Marcel Decker, p.443-472, 1997.

NIELSSEN, P.M. Reactions and potential applications of transglutaminase. Review of litetature and patents. **Food Biotechnology**, v.9, n.3, p.119-156, 1995.

OAKENFULL, D.; SCOTT, A. Gelatin gels in deuterium oxide. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.207-210, 2003.

OESSER, S.; ADAM, M.; BABEL, W.; SEFERT, J. Oral administration of C<sup>14</sup>-labelled gelatin hydrolysate leads to na accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). **Journal of Nutrition**, v.129, p.1891-1895, 1999.

OESSER, S.; SEIFERT, J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. **Cell Tissue Research**, v.311, p.393-399, 2003.

OGRODOWSKI, 2006. Produção de biomassa a partir do soro de queijo para obtenção de ribonucleotídeos Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2006, 122p.

OTTONE, M.L.; DEIBER, J.A. Modeling the rheology of gelatin gels for finite deformations. Part 1. Elastic rheological model. **Polymer**, v.46, p.4928-4937, 2005.

OTTONE, M.L.; PEIROTTI, M.B.; DEIBER, J.A. Modeling the rheology of gelatin gels for finite deformations. Part 2. Viscoelastic solid model. **Polymer**, v.46, p.4938–4949, 2005.

PACHECO, M.T.B.; BIGHETTI, E.; ANTÔNIO, M.; CARVALHO, J.E.; ROSANEL, C.F.; SGARBIERI, V.C. Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídios na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.1, p.47-55, 2006.

PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G.; BALDINI, V.L.S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p.333-338, 2005.

PARRIS, N.; HOLLAR, M.; HSISCH, A.; COCKLEY, D. Thermal stability of whey protein concentrates mixtures: Aggregate formation. **Journal Dairy Science**, v.80, p.19-28, 1997.

PASCO, S.; BRASSANT, B.; RAMONT, L.; FRANÇOIS-XAVIER, M.; MONBOISE, J.C. Control of melanoma cell invasion by type IV collagen. **Cancer detection and prevention**, v.29, p.260-266, 2005.

PAULING, L.; COREY, R.B. The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group. **Proc Natl Academic Science USA**, v.37, p.272, 1951.

PAZ, J.C.S.N. Geleificação de sistemas simples e mistos de isolados protéicos de soja e de soro de leite. Dissertação de mestrado. Universidade estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004, 93p.

PERYAM, D.R.; PILGRIM, F.J. Hedonic scale method of measuring food preferences. **Food Technology**, v.11, n.9, p.9-14, 1957.

POPPE, J. Gelatin. In; IMESON, A. (Ed.) **Thickening and Gelling agents for Food**, 2 nd, Ed. London: Blackie Academic and Professional, Cap. 7, p.144-179, 1997.

PORTER, M.C.; MICHAELS, A.S. Applications of membrane ultrafiltration to food processing. **Proceedings of the Third International Congress of Food Science and Technology**, p.462-473, 1970.

POURADIER, J. Structure of gelatin. **Chemistry and industry**. v.74, n.6, p.75-84, 1955.

PRATES, J.A.M.; MATEUS, C.M.R.P. Physiologically active components from animal food sources. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v.97, n.541, p.3-12, 2002.

PUYOL, P.; PEREZ, M.D.; HORNE, D.S. Heat-induced gelation of whey protein isolates (WPI): effect of NaCl and protein concentration. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.233-237, 2001.

REGESTER G.O.; MCINTOSH, G.H.; LEE, V.W.K.; SMITHERS, G.W. Whey protein as nutritional and functional food ingredients. Technical paper. **Food Australia**, v.48, n.3, p.123-127, 1996.

REGESTER, G.O.; BELFORD, D.A. New therapeutics from a dairy byproduct – cheese whey. **Drug Development Research**, v.46, p.286-291, 1999.

RELKIN, P. Differential scanning calorimetry: A useful tool for studying protein denaturation. **Thermochimica Acta**, v.246, p.371-386, 1994.

REYNOLDS, E.C. Anticarcinogenic casein phosphopeptides. **Protein and Peptide Letters**, v.6, p.295-303, 1999.

REYNOLDS, E.C. Remineralization of enamel subsurface lesion by casein phosphopeptides: stabilized calcium phosphate solutions. **Journal of Dental Research**, v.76, p.1581-1595, 1997.

RICCIO, P. The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.458-461, 2004.

RODRIGUES, M.I.; KALIL, S.J.; MAUGERI, F. Planejamento Fatorial e "Screening Design" como Ferramenta para Otimização de Processos Bioquímicos. **Anais XII SINAFERM**, Seção Técnica C2, Uberlândia, agosto de 1998.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos. Uma estratégia sequencial de planejamentos**. Editora Casa do Pão, p.326, 2005.

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

ROTH, J.M.; CAUNT, M.; CRETU, A.; AKALU, A.; POLICARPIO, D.; LI, X.; GAGNE, P.; FORMETI, S.; BROOKS, P. Inhibition of experimental metastasis by targeting the HUIV26 cryptic epitope in collagen. **American journal of pathology**, v.68, n.5, p.1576-1586, 2006.

SAITO, H.; TAGUCHI, T.; KOBAYASHI, H.; KATAOKA, K.; TANAKA, J.; MURABAYASHI, S.; MITAMURA, Y. Physicochemical properties of gelatin gels prepared using citric acid derivative. **Materials Science and Engineering**, v.24, p.781-785, 2004.

SCAMMELL, A.W. Production and uses of colostrum. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.56, p.74-82, 2001.

SCHOEDER, W.A; KAY, L.M.; LEGETTE, J. HONNEN, L.; GREEN, F.C.; The constitution of gelatin. Separation and estimation of peptides in partial hydrolyzates of gelatin. **Proc. Natl Academic Science USA**, v.39, p.23, 1954.

SCHORSCH, C.; JONES, M.G.; NORTON, I.T. Phase behavior of pure micellarcasein/k-carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.347-358, 2000.

SCHUCK, P.; BOUHALLAB, S.; DURUPT, D.; VAREILLE, P.; HUMBERT, J.P.; MARIN, M. Séchage des lactosérums et derives: role du lactose et de la dynamique de l'eau. **Lait**, v.84, p.243-268, 2004.

SCHUTZ, H.G.; CARDELLO, A.V. A labeled affective magnitude (lam) scale for assessing food liking/disliking. **Journal of Sensory Studies**, v.16, n.2, p.117-159, 2001.

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

SEGTMAN, V.H.; ISAKSSON, T. Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.1, p.1-11, 2004.

SEPPO, L.; KEROJOKI, O.; SUOMALAINEN, T.; KORPELA, R.; The effect of a *Lactobacillus helveticus* LKB-16 H fermented milk on hypertension – a pilot study on humans. **Milchwissenschaft**, v.57, n.3, p.124-127, 2002.

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

SGARBIERI, V. C. Propriedades Funcionais de proteínas em Alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência de Tecnologia de alimentos**, v.32, p.105-126, 1998.

SGARBIERI V.C. The role of dietary energy and of macrocomponents of foods in modulating carcinogenesis (an review). **Ciência e Cultura**, v.51, n.1, p.104-121, 1999a.

SGARBIERI, V.C. Food proteins and peptides presenting specific protection to human healthy (a review). Food for Health in the Pacific Rim. Eds: JR Whitaker, FH Norman, CF Shoemaker, RP Singh. Food and Nutrition Press, Inc. Thrumbull, Conn, USA, p. 335-352, 1999b.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Alimentos Funcionais fisiológicos (revisão). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, n.1-2, p.7-19, 2000.

SGARBIERI, V.C. Propriedades Fisiológicas Funcionais das Proteínas de Soro de Leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, 2004.



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

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

SHIMADA, K.; MATSUSHITA, S. Thermal coagulation of bovine serum albumin. **Agricultural Biologiacal Chemistry**, v.45, n.9, p.1945-1952, 1981.

SIMMONS, M.J.H.; JAYARAMAN, P.; FRYER, P.J. The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implication for milk fouling. **Journal of Food Engineering**, v.79, p.517-528, 2007.

SINGH, H.; HEVEA, P. Thermal denaturation, aggregation and gelation of whey proteins. FOX, I. P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.), **Advanced dairy chemistry**, Part B, vol. 1 New York: Kluwer Academic p. 1261–1287, 2003.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolyzate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, n.101, v.4, p.1484-1491, 2007.

SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; CARVALHO, R.A.; SOUZA, S.M.A.; MONTERREY, E.S. Elaboração de filmes de proteína para uso como impermeabilizante ou embalagem flexível. Seminário Internacional – **Tópicos Especiais em Ciências e Tecnologia de Alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, p.95-104, 1997.

SPITSBERG, V.L. Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. **Journal Dairy Science**, v.88, p.2289-2294, 2005.

STEFFE, J.F. **Rheological methods in food process engineering**. FreemanPress, East Lansing, p. 1-93, 1996.



STEIJNS, J.M. Milk ingredients as nutraceuticals. *International Journal of Dairy Technology*, v.54, n.3, p.81-88, 2001.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 2. ed. San Diego:Academic Press, Inc., 1993. 338 p.

SYRBE, A.; BAUER, W.J.; KLOSTERMEYER, H. Polymer science concepts in dairy systems-An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, v.8, p.179-193, 1998.

SZCZESNIAK, A.S. Classification of Textural Characteristics. *Journal of Food Science*, v.28, p.385-409, 1963.

SZCZESNIAK, A.S. General foods texture profile revised: Ten years perspective. *Journal of Texture Studies*, v.6, p.5-17, 1975a.

SZCZESNIAK, A.S. Textural characterization of temperature sensitive foods. *Journal of Texture Studies*, v.6, p.139-156, 1975b.

TAKADA, Y.; MATSUYAMA, H.; KATO, K.; KOBAYASHI, N.; YAMAMURA, J.; YAHIRO, M.; AOE, S. Milk whey protein enhances the bone breaking force in ovariectomized rats. *Nutrition Research*, v.17, n.11/12, p.1709-1720, 1997.

TAKEUCHI, K. Análises reológicas e calorimétricas de sistemas-modelo de proteínas do leite adicionados de carragena e sacarose. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2003, 177p.

THRENTAM, D.E.; DYNESIUS-THENTHAM, R.A.; ORAV, E.J.; COMBITCHI, D.; LORANZO, C.; SEWELL, K.L.; HAFLER, D.A.; WEINER, H.L.; Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science*, v.26, p.1727-1730, 1993.

TOLEDO, P.F. Propriedades reológicas de doce de banana. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de

Alimentos. Departamento de Engenharia de Alimentos. Laboratório de Tecnologia Apropriada, Campinas, 2004.

TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Transport of whey proteins through 0,1um ceramic membrane: phenomena, modeling and consequences for concentration or diafiltration processes. **Desalination**, v.199, n.340-341, 2006.

TOLSTOGUZOV, V.B.; VINCENT, R. (1997) **Low fat food ingredients**. European Patent nº 96104828 7.

TORRES, D.P.M. Gelificação térmica de hidrolizados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino – comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos. Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos. 100p. Braga, 2005.

TOSH, S.M.; ALEJANDRO G.; MARANGONI, A.G.; HALLETT, F.R.; IAN J.; BRITT, I.J.; Aging dynamics in gelatin gel microstructure. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.503–513, 2003.

TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J.G.; SALAZAR, J.A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, n.6, p.586-601, 2002.

TURGEON, S.L.; BEAULIEU, M. Improvement modification of whey protein gel texture using polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.583-591, 2001.

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

USTA, M.; PIECH, D.L.; MACCRONE, R.K.; HILLIG, W.B. Behavior and properties of net and filled gelatins. **Biomaterials**, v.24, p.165–72, 2003.

VACKIER, M.C.; HILLS, B.P.; RUTLEDGE, D.N. An NMR relaxation study of the state of water in gelatin gels. **Journal of magnetic resonance**, n.138, v.1, p.36-42, 1999.

VASBINDER, A.J.; ALTING, A.C.; KRUIF, K.G. Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.31, p.115-123, 2003.

VERHEUL, M.; ROEFS, S.P.F.M.; MELLEMA, J.; KRUIF, K.G. Power law behavior of structural properties of protein gels. **Langmuir**, v.14, p.2263-2268, 1998.

VILLANUEVA, N.D.M.; PETENATE, A.; DA SILVA, M.A.A.P. Performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. **Food Quality and Preference**, v.16, n.8, p. 691-703, 2005.

VILLANUEVA, N.D.M.; PETENATE, A.J.; DA SILVA, M.A.A.P. **Self-adjusting and hybrid hedonic scales: advantages and disadvantages with respect to traditional affective methods**. In: THE 4th PANGBORN SENSORY SCIENCE SYMPOSIUM. Dijon, 2001. Conference Programme Abstracts, p. 136.

WALKENSTRÖM, P.; HERMANSSON, A.M. Fine-stranded mixed gels of whey proteins and gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.11, n.4, p. 457-470, 1997

WALKENSTRÖM, P.; WINDHAB, E.; HERMANSSON, A.M. Shear-induced structuring of particulate whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, v.12, p. 459-468, 1998.

WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, n.4, 353-375, 2002.

WARNER, E.A.; KANEKANIAN, A.D.; ANDREWS, A.T. Bioactivity of milk proteins: 1. anticariogenicity of whey proteins. **International Journal of Dairy Technology**, v.54, n.4, 2001.

WONG, D.W.S.; CAMIRANT, W.M.; PAVLATH, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.8, p.807-844, 1996.

WU, J.; DING, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food Research International**, v.35, n.4, p.367-375, 2002.

YAMAMOTO, N.; MAENO, M.; TAKANO, T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.7, p.1388-1393, 1999.

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

ZIEGLER, G.R., FOEGEDING, E.A. The gelation of proteins. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.34, p.203-298, 1990.

## --- **Capítulo II**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO  
PROTÉICO DE SORO DE LEITE BOVINO (WPI).**

---



## OBTENÇÃO EM PLANTA PILOTO, COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DE UM ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE BOVINO (WPI)

J.A. ROMAN, G. HENRY, J. FAUQUANT, S. BOUHALLAB, V.C. SGARBIERI

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a produção em escala piloto de um isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) através dos processos de microfiltração, ultrafiltração, diafiltração e liofilização, por meio de membranas cerâmicas, e a sua caracterização analítica. O processo de obtenção do WPI foi realizado na planta piloto do Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica (INRA), Rennes-França. A caracterização do WPI foi realizada quanto à composição centesimal (extrato seco, umidade, cinza, teor de proteína, nitrogênio não caséico-NNC e nitrogênio não protéico-NNP), composição aminoacídica, perfil eletroforético e cromatográfico. Os procedimentos adotados seguiram metodologia padrão, estabelecida pelo INRA, para leite e produtos lácteos. Obteve-se WPI com 96,8% de proteína (base seca) e 2,2% de resíduos minerais, em condições microbiológicas adequadas para o consumo. A composição em aminoácidos do WPI, quando comparado com o padrão de referência da FAO/WHO, mostrou um perfil de aminoácidos adequado, ressaltando a sua qualidade nutricional devido à presença em quantidades suficientes de todos os aminoácidos essenciais. O perfil eletroforético e a cromatografia em coluna comprovaram que o WPI é composto principalmente pelas frações  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La), além de outras proteínas presentes, como albumina de soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig) e outras em menores quantidades.

**Palavras-chave:** leite, isolado protéico, soro de leite, caracterização, eletroforese, cromatografia

## SUMMARY

The objectives of the present work were the pilot plant production of a whey protein isolate (WPI) from raw bovine milk using the process of microfiltration, ultrafiltration, diafiltration and liofilization. For the microfiltration and ultrafiltration a ceramic membrane system was used. The obtention and characterization of the WPI was performed at the National Institute for Agronomic Research (INRA) pilot plant, at Rennes, France. The obtained WPI was characterized as to humidity, total dry solids, total whey protein (NCN), non-protein nitrogen (NPN) and ash content. Total WPI protein was 96.8% and whey protein was 96.6% (based on NCN). The product contained 2.2% mineral and microbiological profile adequate for human consumption. The essential amino acid composition was superior to FAO/WHO standard. Both eletrophoretic and chomatophafic analysis revealed  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La), serum albumin (BSA) and imunoglobulins (Ig) as the main whey proteins, lactoferrin and lactoperoxidase as minor component.

**Key words:** raw milk, protein, fractionation, protein isolate, electrophoresis, column chromatography.

## 1 INTRODUÇÃO

O soro de leite pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos principais: a) pelo processo de coagulação enzimática (enzima quimosina), resultando no coágulo de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos e soro “doce”; b) precipitação ácida no pH isoelétrico (pI) da caseína, obtendo-se a caseína isoelétrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido; c) separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas, assim como as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico (MAUBOIS e OLLIVER, 1997; ZINSLY et al., 2001; ROMAN, 2002; SGARBIERI, 2004; TOLKACH e KULOZIK, 2005).

A principal vantagem da separação em frações ricas de caseína e de proteínas do soro usando membranas cerâmicas (PUNIDADAS e RIZVI, 1998) é



que se trata de um processo termicamente suave e puramente mecânico. Isso significa que o processo não tem impacto negativo nas propriedades funcionais e nutricionais do produto (OSTERLAND, 1998).

Os derivados do soro mais importantes são: o soro desmineralizado por troca iônica ou eletrodialise, muito utilizado para uso em formulações infantis; a lactose refinada; o concentrado protéico de soro, obtido por ultrafiltração com um conteúdo protéico que varia de 35 a 80% (MULVIHILL e ENNIS, 2003; TOLKACH e KULOZIK, 2006) e o isolado protéico de soro, que contém acima de 90% de proteína, obtido por troca iônica e diafiltração (LA FUENTE et al., 2002; AUDIC et al., 2003; CANCINO et al., 2006).

Aplicações do soro de leite bovino estão aumentando constantemente, em parte, devido aos progressos nas técnicas de separação (ultracentrifugação, ultrafiltração, microfiltração, osmose reversa, eletroforese e cromatografia) e hidrólise enzimática (SPREER, 1998). Técnicas para isolamento das proteínas individuais do soro, em escala laboratorial, tais como *salting-out*, cromatografia de troca iônica e/ou cristalização, têm sido utilizadas há aproximadamente 40 anos (SMITHERS et al., 1996).

Vários tipos de cromatografia líquida são utilizados industrialmente para separar e purificar proteínas do soro de leite. Estes incluem exclusão molecular, troca iônica, processos cromatográficos de adsorção e afinidade (GERBERDING, BYERS, 1998).

Os métodos cromatográficos, particularmente processos de adsorção por troca iônica, têm sido desenvolvidos e utilizados com sucesso em escala comercial para a separação das proteínas do soro de leite, as quais têm sido estudadas através de sistemas de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) por cromatografia de troca iônica e exclusão molecular (ANDREWS, TAYLOR, OWEN, 1985; MANJI et al., 1985; GIRARDET, PAQUET, LINDEN, 1989; GERBERDING, BYERS, 1998; KRISTIANSEN et al., 1998; HAHN et al., 1998; YE, YOSHIDA et al., 2000).

As principais frações protéicas do soro incluem a  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina e a soroalbumina bovina (BSA), nas concentrações de 3,7; 0,6; e 0,3g/L de leite, respectivamente. Outras proteínas estão presentes em

concentrações mais baixas, são elas: imunoglobulinas, lisozima, lipase, lactoferina e xantina oxidase (KINSELLA e WHITEHEAD, 1989).

Os avanços da tecnologia de fracionamento das proteínas do soro de leite permitem estudos das propriedades imunobiológicas de alguns componentes do soro com alta pureza, com a perspectiva de possíveis aplicações industriais e biomédicas (WONG et al., 1997). A utilização dessas proteínas nas formas de concentrados ou isolados protéicos evidenciaram propriedades muito favoráveis à saúde no sentido de diminuir o risco de doenças infecciosas e também as consideradas doenças crônicas não transmissíveis (SGARBIERI, 2004), devido à presença de componentes biologicamente ativos que podem exercer efeitos potenciais benéficos para a saúde (KORHONEN, 2002; SGARBIERI, 2004; POULIOT e GAUTHIER, 2006).

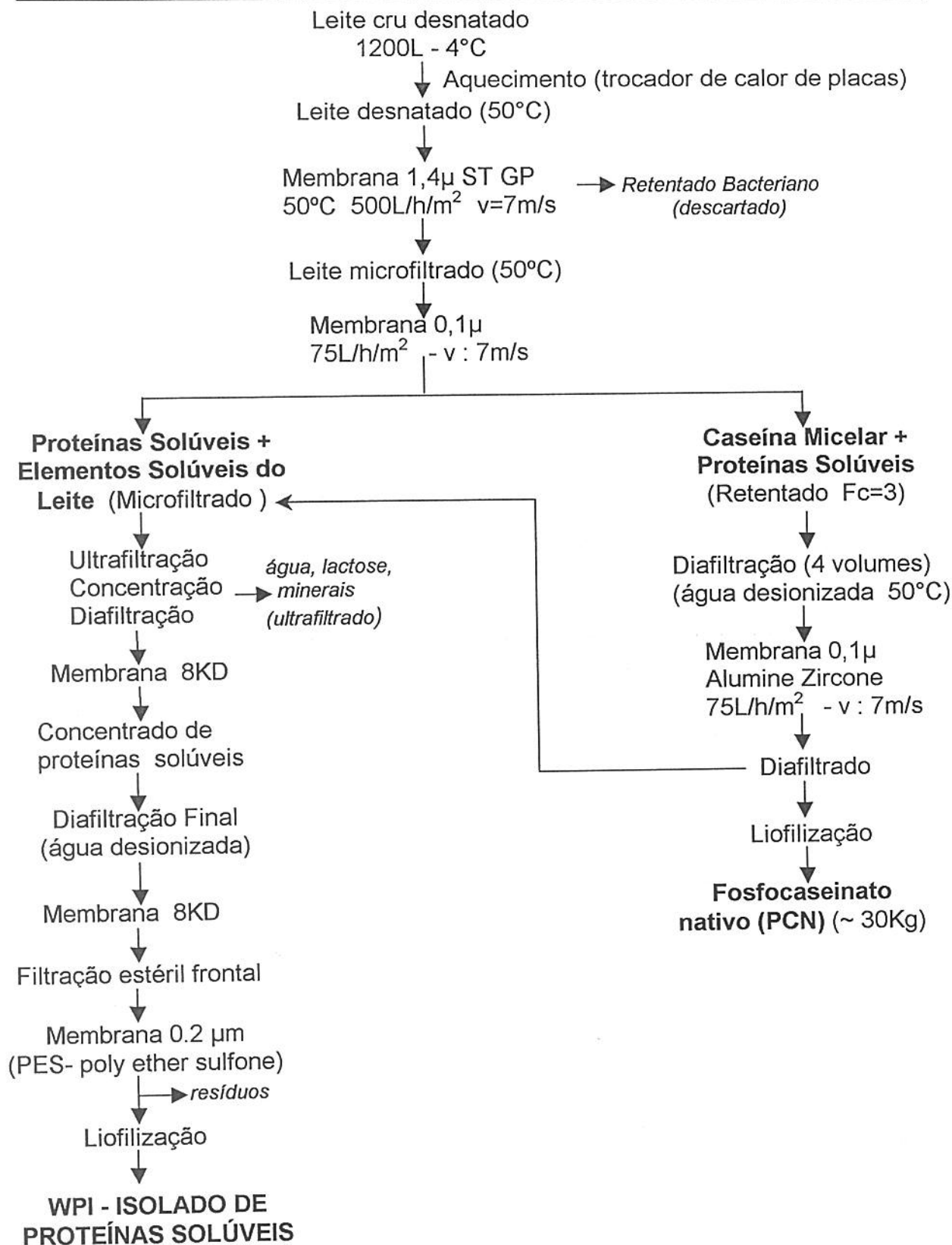
O objetivo deste trabalho foi o de obter um isolado protéico de soro de leite bovino, em escala piloto, e caracterizá-lo quanto à composição centesimal, perfil aminoacídico, eletroforético e cromatográfico.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Produção de isolado protéico de soro de leite bovino (WPI)**

O processo de obtenção do WPI foi realizado na planta piloto do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA), Rennes–França. Os processos envolvidos foram: microfiltração, concentração, diafiltração, ultrafiltração e liofilização (Figura 1).

O leite bovino desnatado cru (4°C), utilizado como matéria prima (1.200L) foi homogeneizado e aquecido a 50°C e microfiltrado (membrana 1,4 $\mu$  Sterilox GP constituída por Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 1,02m de altura, 4mm de diâmetro, 7 tubos com 19 canais e superfície de 1,68 m<sup>2</sup>, 500L/h/m<sup>2</sup> à 50°C e v= 7m/s), na qual se obteve um retentado bacteriano que foi descartado e um permeado denominado leite desnatado microfiltrado.



**Figura 1** Fluxograma de processamento do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), através dos processos de microfiltração, ultrafiltração, diafiltração e liofilização, realizado no INRA, Rennes-França.

Em seguida, proteínas e elementos solúveis do leite (permeado) foram separados da caseína (retentado), mediante a utilização da membrana 0,1 $\mu$  (multicanais 19 tubos com 19 canais, diâmetro de 4 mm e superfície 4,6m<sup>2</sup>, 75L/h/m<sup>2</sup> e velocidade de fluxo de 7m/s).

O retentado de caseína foi concentrado 3 vezes, enquanto o permeado foi concentrado 4 vezes e, em seguida, ultrafiltrado. A diafiltração foi realizada com água desionizada a 50°C, com o intuito de separar no ultrafiltrado água, lactose e minerais do concentrado de proteínas solúveis. Para isto, utilizou-se uma membrana de 8 Kd TAMI, com superfície de 13,6 m<sup>2</sup>.

Após este procedimento o WPI foi filtrado em filtro estéril, através de membrana de 0,2 $\mu$ m (PES ether sulfone poly), para garantir a qualidade microbiológica do produto obtido e, em seguida, liofilizado. O rendimento final foi de 4,128 Kg de isolado protéico de soro de leite.

## 2.2 Caracterização do isolado protéico de soro de leite (WPI)

A caracterização do WPI foi realizada quanto à composição centesimal (extrato seco, umidade, cinza, teor de proteína, nitrogênio não caséico-NNC e nitrogênio não protéico-NNP), composição aminoacídica, perfil eletroforético e cromatográfico. Os procedimentos analíticos adotados foram os padronizados para a análise de leite e produtos lácteos no INRA, Rennes, França.

**Composição centesimal:** O extrato seco e umidade foram determinados conforme método AFNOR (1985) e FIL-IDF (1987), tendo como princípio a evaporação de água em placas metálicas (de 20 a 25mm de altura e 50-75mm de diâmetro em material apropriado, aço inoxidável, níquel ou alumínio, com tampas bem ajustadas), em presença de areia (com granulometria entre 180 e 500 $\mu$ m), por um período de sete horas em uma estufa a temperatura de  $102 \pm 2^\circ\text{C}$ . Essas análises foram realizadas em quadruplicata, pesando-se em média 1 a 2g de amostra.

O teor de proteínas total (PT) foi determinado através dos protocolos descritos no AFNOR (1971), FIL-IDF (1993) e FIL-IDF (1988). O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldhal. Os procedimentos foram realizados em aparelho automático de destilação à vapor e de titulação Tecator KJELTEC 2400/2460 Analyser. O cálculo do teor de proteína foi realizado multiplicando-se pelo fator 6,38.

O teor de nitrogênio não protéico (NNP) foi determinado no sobrenadante, após precipitação das proteínas em presença de ácido tricloroacético (TCA) a uma concentração final de 12% e determinado conforme o método de Kjeldhal (FIL-IDF, 1993). O teor de nitrogênio não caseico ou solúvel em pH 4,6 (NNC) foi determinado mediante a precipitação da fração caseica com tampão ácido acético-acetato e extração do precipitado por filtração contendo o teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e, após a filtração, fez-se a determinação do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldhal (FIL-IDF, 1964).

O teor de proteínas foi calculado pela diferença: PT-NNP. O teor de proteínas insolúveis em pH 4,6 (caseínas) foi calculado pela diferença PT-NNC e o teor de proteínas solúveis em pH 4,6 foi calculado subtraindo-se NNC – NNP.

O teor de cinza foi determinado de acordo com a norma descrita por AFNOR (1989), tendo como princípio a incineração da matéria seca através de um banho de areia com temperatura regulada entre 200-250°C, em que os cadinhos de porcelana (30-40mm de diâmetro e 25-50mm de altura) eram depositados até incineração completa e, na seqüência, transferidos para uma mufla onde permaneciam a 550°C  $\pm$  25°C durante 5 horas, pesando-se o resíduo obtido (ciclo utilizado na estufa: a temperatura passava de 0 a 200°C rapidamente, de 200 para 350°C em uma hora, a uma velocidade de 2,5°C/min., de 350 para 550°C rapidamente e, após estabilização, permanecia a 550°C durante 5 horas).

**Composição em aminoácidos:** O teor de aminoácidos foi determinado após hidrólise ácida, ácido clorídrico 6N a 110°C em tubos selados à vácuo durante 24 a 96 horas, segundo DAVIES e THOMAS (1973). A dosagem dos aminoácidos foi realizada após oxidação prévia com ácido perfórmico, segundo o protocolo de BELSUNCE, PION (1963). A análise dos aminoácidos foi efetuada por cromatografia de troca de cátions mediante um analisador automático de

aminoácidos da Biochrom 30 (Biochrom Ltd, Cambridge, G.B.), eluição por tampões citrato de lítio e reação pós-coluna com ninidrina. A dosagem de triptofano foi feita por colorimetria a 590nm, com base no cromóforo formado entre o triptofano e p-dimetilaminodenalaldeído (PAB) das amostras hidrolisadas por pronase (SPIES, 1967). Os aminoácidos essenciais da  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina foram obtidos da literatura (ETZEL, 2004).

**Perfil eletroforético:** A determinação do perfil eletroforético de cinco produtos intermediários obtidos durante o processamento de WPI foi realizada através do gel contendo o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), descrito por LAEMMLI (1970). A eletroforese foi realizada em seis amostras: leite bovino desnatado a 4°C (11,48 $\mu$ g), microfiltrado 0,1 $\mu$  (14,78 $\mu$ g), retentado de proteína de soro diafiltrado (10,55 $\mu$ g), isolado protéico de soro do leite WPI (16,5 $\mu$ g), permeado da ultrafiltração (8Kd) e concentrado de caseína.

Na eletroforese em SDS-PAGE foi utilizado gel de poliacrilamida a 4% no gel de concentração e a 15% no gel de separação. A eletroforese foi conduzida em aparelho vertical *Mini protean II 1D* – Biorad. As amostras foram diluídas para 1,5g/L de proteína. Tomou-se 60 $\mu$ L da amostra diluída e adicionou-se 20 $\mu$ L de solução desnaturante contendo 12% de tris-HCl 0,5M (pH 6,8), 20% SDS, 10% glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,1% azul de bromofenol; a mistura foi aquecida a 100°C por 3 minutos. Após resfriadas, foram aplicadas no gel, alíquotas de 15 $\mu$ L de cada amostra. A corrida foi efetuada a temperatura ambiente, sendo a voltagem de 200V. Após a corrida (1h15min.), os géis foram corados em solução de Coomassie Blue 250R e, em seguida, descorados em solução aquosa contendo 15% metanol e 7% de ácido acético glacial.

O padrão de massas moleculares utilizado foi o *LMW Calibration Kit* (Amersham Biosciences) contendo: fosforilase B (97,0 KDa); albumina bovina (66,0 KDa); ovalbumina (45,0 KDa); anidrase carbônica (30,0 KDa); inibidor de tripsina (20,1 KDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 KDa).

A determinação da massa molecular após a eletroforese foi obtida pela medida da distância migrada pela proteína, comparando-se a do padrão e



calculando-se o valor de  $r_f$  e dividindo-se a distância de migração da proteína pela distância de migração do marcador molecular padrão.

**Perfil cromatográfico:** O WPI produzido também foi analisado por cromatografia de fase reversa RP-HPLC em coluna  $C_4$ , comparando-se com frações puras de  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e albumina de soro bovino (BSA). Para a análise em HPLC, utilizou-se coluna  $C_4$  Vydac (150 x 4,6mm, 300 A, 214TP5415 Touzart) a temperatura de 40°C. Os solventes utilizados foram tampão A, contendo ácido trifluoroacético (TFA), produzido pela Peirce Chemicals (TFA 1,60%), solvente B composto por 0,1% de TFA em acetonitrila-água (80:20 v/v) e tampão C contendo acetonitrila a 50%.

A eluição foi realizada no fluxo de 1mL/min com gradiente linear de acetonitrila, variando de 0 a 100% do solvente B, pressão máxima de 100 bar, volume de injeção 200 $\mu$ L e detector de 214 nm, durante 60 minutos. As corridas foram realizadas iniciando-se com 5% de tampão B até os primeiros 5 minutos; após a concentração de tampão B foi progressivamente subindo até atingir 100% de solução B e, nos últimos 5 min., a concentração de solução B foi de 5%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Composição centesimal

Na Tabela 1 estão descritos os resultados da composição centesimal do leite desnatado e isolado de proteína do soro bovino (WPI). Observou-se que houve uma concentração de proteína que passou de 37,4% no leite bovino para 96,8% no WPI. O WPI obtido a partir do processo de microfiltração/diafiltração apresentou um elevado teor de proteína, caracterizando-se como isolado protéico (>90% proteína).

**Tabela 1** Caracterização química parcial do leite bovino desnatado e de um isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) produzido em planta piloto, de acordo com fluxograma da Figura 1.

| <b>Componentes</b><br><b>(% base seca)</b>      | <b>Leite desnatado</b> | <b>WPI produzido</b> |
|-------------------------------------------------|------------------------|----------------------|
| Proteína (total)                                | 37,4 ± 0,01            | 96,8 ± 0,2           |
| Proteína de soro (NNC)                          | 8,8 ± 0,03             | 96,6 ± 1,8           |
| Nitrogênio não protéico (NNP)                   | 2,2 ± 0,11             | 0,2 ± 0,02           |
| Cinza (resíduo mineral)                         | 8,8 ± 0,01             | 2,1 ± 0,1            |
| Não Determinado* (diferença)                    | 54,2                   | 0,9                  |
| Médias de 4 repetições                          |                        |                      |
| Fator de multiplicação para proteína (N x 6,38) |                        |                      |

As análises de nitrogênio não caséico (NNC) para o WPI quando multiplicado pelo fator 6,38, correspondeu a 96,6%, indicando que a maior parte das proteínas presentes no WPI não contém proteínas vindas da caseína. A elevada percentagem de não determinado (54,2%) no leite desnatado (base seca) corresponde basicamente à lactose, somada a pequeno resíduo de gordura, que possa ter permanecido após desnate e sucessivas microfiltrações.

### 3.2 Composição em aminoácidos

O valor nutricional das proteínas da dieta é uma função da sua composição em aminoácidos essenciais, da sua digestibilidade e, finalmente, do seu posterior metabolismo no organismo animal e humano (BOS et al. 2000). As quantidades de referência de aminoácidos essenciais foram revisadas em 1990, pelo FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization e Word Health Organization*), que estabeleceram padrões de necessidades, obtido com base na taxa de oxidação de aminoácidos em função dos níveis ingeridos (FAO/WHO, 1990).

Os resultados obtidos para a composição de aminoácidos do WPI e os dados obtidos da literatura para  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina são comparados (Tabela 2).



**Tabela 2** Perfil de aminoácidos (g/100g) do WPI produzido, comparado com dados da literatura\*.

| Aminoácidos            | $\alpha$ -La* | $\beta$ -Lg* | WPI* | WPI (produzido) |
|------------------------|---------------|--------------|------|-----------------|
| Alanina                | 1,5           | 5,4          | 4,9  | 4,8             |
| Arginina               | 1,4           | 2,6          | 2,4  | 2,9             |
| Asparagina             | 9,7           | 3,1          | 3,8  | **              |
| Ácido aspártico        | 7,3           | 6,9          | 10,7 | 11,5            |
| Cisteína               | 5,8           | 2,8          | 1,7  | 2,9             |
| Glutamina              | 4,5           | 6,3          | 3,4  | **              |
| Ácido glutâmico        | 7,3           | 11,3         | 15,4 | 18,1            |
| Glicina                | 2,4           | 0,9          | 1,7  | 2,0             |
| Histidina              | 2,9           | 1,5          | 1,7  | 2,1             |
| Isoleucina             | 6,4           | 6,2          | 4,7  | 6,0             |
| Leucina                | 10,4          | 13,6         | 11,8 | 12,4            |
| Lisina                 | 10,9          | 10,5         | 9,5  | 10,4            |
| Metionina              | 0,9           | 2,9          | 3,1  | 3,0             |
| Fenilalanina           | 4,2           | 3,2          | 3,0  | 4,1             |
| Prolina                | 1,4           | 4,2          | 4,2  | 5,0             |
| Serina                 | 4,3           | 3,3          | 3,9  | 4,8             |
| Treonina               | 5,0           | 4,4          | 4,6  | 5,3             |
| Triptofano             | 5,3           | 2,0          | 1,3  | 2,5             |
| Tirosina               | 4,6           | 3,6          | 3,4  | 3,9             |
| Valina                 | 4,2           | 5,4          | 4,7  | 5,8             |
| Cadeias ramificadas    | 21,0          | 25,1         | 21,2 | 24,2            |
| Aminoácidos essenciais | 47,2          | 48,1         | 42,7 | 55,8            |

\* Dados da literatura (ETZEL, 2004).

\*\* Valores não determinados

Observa-se que quando comparados, o WPI produzido em planta piloto com os dados obtidos da literatura, este apresenta, para a maioria dos aminoácidos, uma quantidade superior ao da literatura, evidenciando a excelente qualidade nutricional do produto obtido ou apenas a variabilidade da metodologia.

Os valores de asparagina e glutamina aparecem inseridos nos resultados de ácido aspártico e ácido glutâmico, uma vez que a hidrólise ácida transforma os grupos amida em seus respectivos ácidos, com a liberação de amônia.

As proteínas dos concentrados protéicos de soro de leite apresentam elevado conteúdo de aminoácidos sulfurados, com um balanço ideal entre metionina e cisteína de aproximadamente 1:1 (BORÓ et al. 1995).

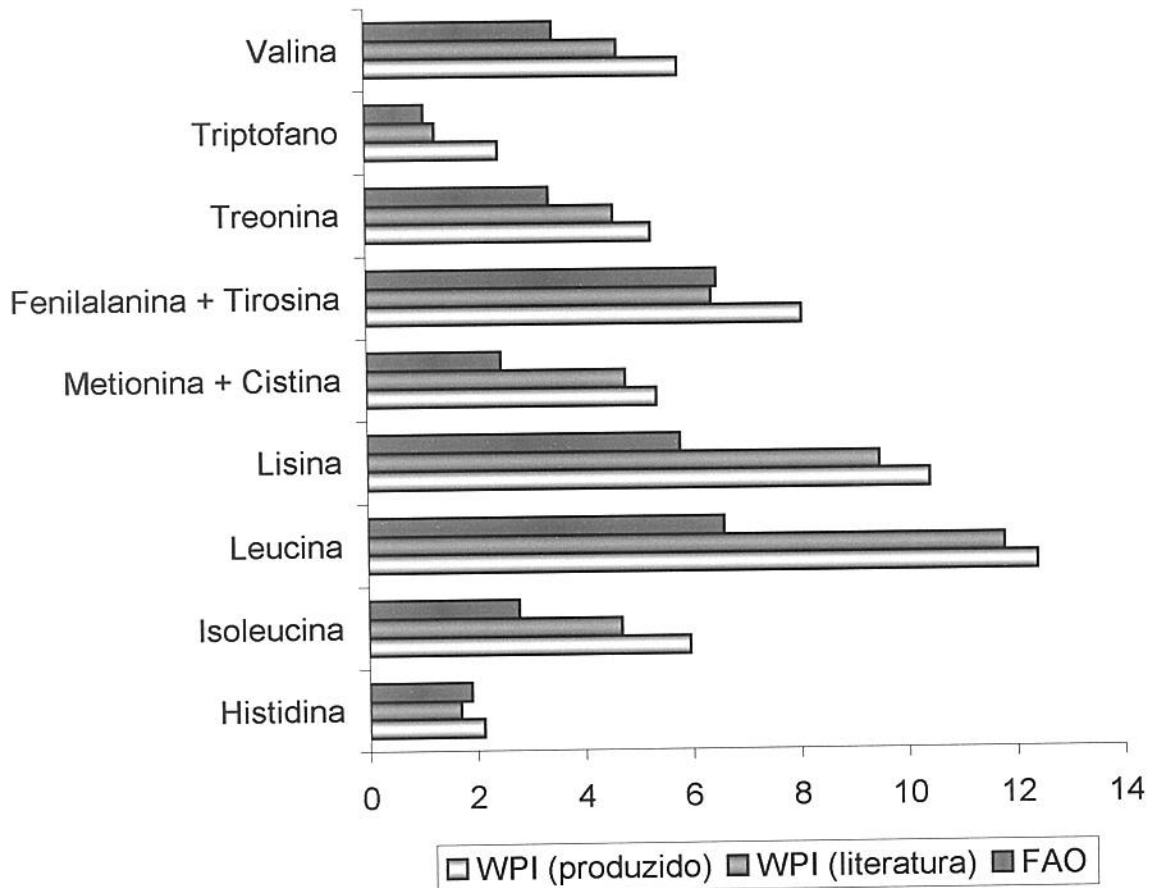
A influência da suplementação de aminoácidos sobre a atividade física, atualmente, tem se constituído em importante objeto de estudo, visto que sua comercialização e utilização, com objetivos variados, têm crescido. A suplementação de aminoácidos ramificados, aspartato e asparagina, promove maior resposta oxidativa em atividades motoras intensas e prolongadas, impedindo a fadiga por acidose metabólica ou por depleção de glicogênio muscular e hepático (LANCHA JÚNIOR et al. 1995).

Os aminoácidos de cadeia ramificada regulam a produção de serotonina a partir da competição pelo transportador de membrana com o triptofano. O triptofano é o precursor da serotonina, neurotransmissor responsável por respostas fisiológicas como o sono, além de regular as atividades sexuais e a gênese de fadiga central em atividades prolongadas. Assim, quando as concentrações de aminoácidos ramificados estiverem em equilíbrio com a concentração do triptofano, a produção de serotonina será reduzida (MARQUEZI e LANCHA JÚNIOR, 1997; SGARBIERI, 2004).

A Figura 2 apresenta a comparação dos dados do WPI produzido, com os dados do WPI da literatura (ETZEL, 2004), comparados com o padrão de aminoácidos essenciais da FAO/WHO (1990). Observa-se que o WPI produzido apresentou uma composição de aminoácidos essenciais que atende os requisitos da FAO e que é superior aos dados encontrados na literatura para o mesmo produto. Considera-se que os métodos de obtenção e de análise podem levar a uma variação na composição do isolado protéico de soro de leite obtido, podendo influenciar em suas propriedades físico-químicas e funcionais.

O desenvolvimento de técnicas de fracionamento, de modificação e de preservação das proteínas do soro pode contribuir para a recuperação desse valioso nutriente, assim como melhorar a expressão de suas propriedades funcionais (CAPITANI et al., 2005).

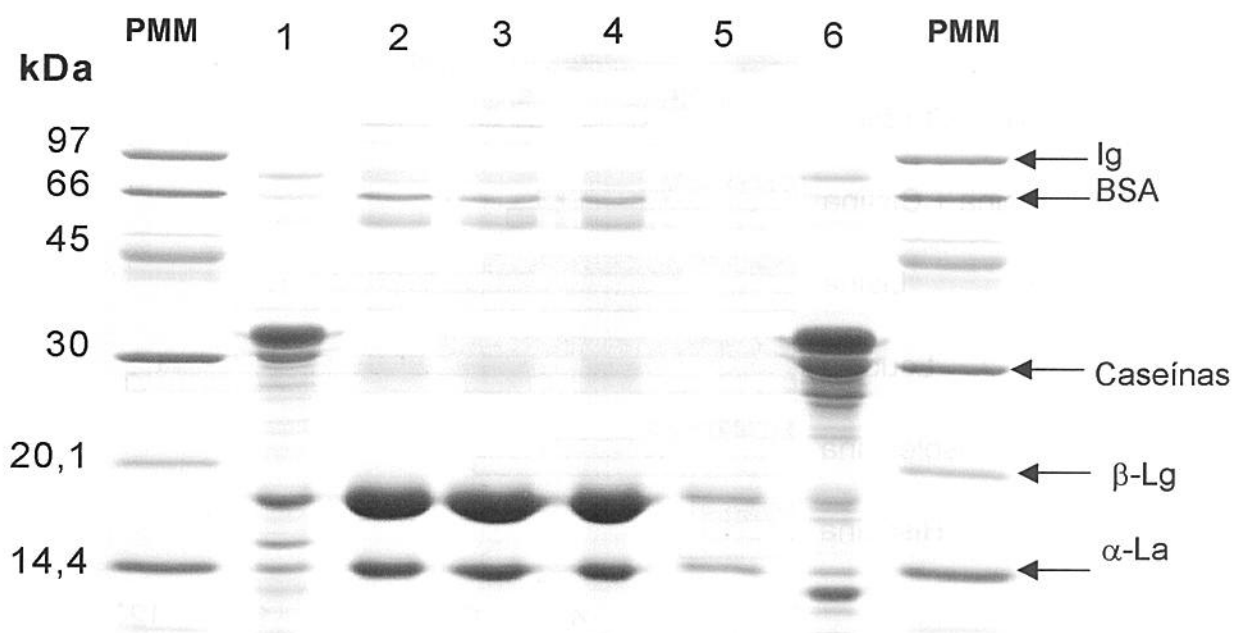
O soro de leite possui alto valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais, destacando-se o conteúdo dos aminoácidos, triptofano, aminoácidos sulfurados e aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina). Os aminoácidos presentes nas proteínas do soro superam os valores recomendados para crianças de dois a cinco anos e para adultos (WIT, 1998; NEVES, 2001).



**Figura 2** Comparação do teor de aminoácidos essenciais do isolado protéico de soro de leite bovino (produzido) com valores da literatura (ETZEL, 2004) e com o padrão da FAO/WHO (1990).

### 3.3 Perfil eletroforético

O perfil eletroforético em SDS-PAGE (Figura 3) foi realizado para o leite desnatado, alguns produtos intermediários obtidos durante o processo (microfiltrado 0,1 $\mu$ , retentado 8Kd e concentrado de caseína) e para o WPI. Na Figura 3 observa-se que o leite bovino desnatado (1) sofre processo de concentração das proteínas nas diversas fases do processamento (2, 3, 4 e 6) como caseína (massa molecular 30 KDa),  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 KDa) e  $\beta$ -lactoglobulina (18,8 KDa).



**Figura 3** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE dos produtos obtidos durante o processamento de obtenção do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI): **1)** leite desnatado **2)** microfiltrado 0,1 $\mu$ L **3)** retentado diafiltrado **4)** WPI **5)** permeado 8Kd e **6)** concentrado de caseína, PMM (padrão de massas moleculares, Amershan Biosciences).

As proteínas do soro representam cerca de 20% das proteínas do leite. As duas principais frações de proteína do soro,  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, perfazem 70-80% das proteínas totais do soro. Além dessas são encontradas a

soralbumina, imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas (SGARBIERI, 1996; MILLER et al. 2000).

Nota-se que os perfis (2, 3, e 4) preparados de soro de leite são praticamente idênticos. É importante notar que a ultrafiltração deixa no permeado (perfil 5) duas proteínas com massas moleculares muito semelhantes à  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, respectivamente.

Na Tabela 3 são apresentados alguns dados da eletroforese para o WPI analisado (valores de rf, % representativa das principais bandas de proteína e massas moleculares correspondentes), que serão comparados com dados da literatura.

**Tabela 3** Determinação das massas moleculares correspondentes a 8 bandas identificadas no WPI pela eletroforese, comparadas aos dados da literatura.

| WPI ANALISADO |         |                     | DADOS DA LITERATURA |                         |                        |
|---------------|---------|---------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|
| Rf            | % Banda | Massa Molecular KDa | Massa Molecular KDa | Proteínas do Leite      | Referência             |
| 1 0,167       | 0,89    | 143                 | 150-900             | IgG, IgA, IgM           | HAHN et al. 1998       |
| 2 0,196       | 1,15    | 126                 |                     |                         |                        |
| 3 0,278       | 5,81    | 77                  | 77,0                | Lactoferrina            | ETZEL, 2004            |
|               |         |                     | 78,0                | Lactoperoxidase         | HAHN et al. 1998       |
| 4 0,306       | 6,28    | 63                  | 69,0                | Soroalbumina            | HAHN et al. 1998       |
|               |         |                     | 66,0                |                         | FOX e McSWEENEY, 1998  |
|               |         |                     |                     |                         | ETZEL, 2004            |
| 5 0,339       | 7,25    | 53                  |                     |                         |                        |
| 6 0,550       | 9,96    | 29                  | 24,0                | Caseína                 | SGARBIERI, 1996        |
|               |         |                     | 19,0                | $\beta$ -caseína        | ETZEL, 2004            |
|               |         |                     | 19,0                | $\alpha$ - caseína      | ETZEL, 2004            |
|               |         |                     | 23,9                |                         | KINSELLA, 1984         |
|               |         |                     |                     |                         | KINSELLA, et al., 1989 |
| 7 0,746       | 46,55   | 18                  | 18,4                | $\beta$ -lactoglobulina | HAHN et al. 1998       |
|               |         |                     |                     |                         | NAKAI, MODLER, 1996    |
|               |         |                     |                     |                         | ETZEL, 2004            |
| 8 0,847       | 22,11   | 14                  | 14,2                | $\alpha$ -lactalbumina  | HAHN et al. 1998       |
|               |         |                     | 12,3                |                         | LOURENÇO, 2000         |
|               |         |                     |                     |                         | ETZEL, 2004            |

Segundo LOURENÇO (2000), a  $\beta$ -lactoglobulina é a principal proteína do soro de leite, formada pela associação de duas subunidades globulares idênticas de peso molecular de 18 KDa. A conformação da  $\beta$ -Lg é dependente do pH (IMAFIDON et al., 1997). Entre valores de pH de 5,2 e 7,2, esta proteína apresenta-se como dímero, com peso molecular de 36,0 kDa (NAKAI, MODLER, 1996).

A  $\alpha$ -lactalbumina é formada de componente de massa molecular ~14Kda, sendo a proteína de menor massa molecular do soro (LOURENÇO, 2000). A soroalbumina bovina (BSA) é formada por uma única cadeia polipeptídica, constituída de aproximadamente 580 resíduos de aminoácidos de massa molecular 66KDa (LOURENÇO, 2000). A molécula contém 17 ligações dissulfeto e uma sulfidril livre (FOX, McSWEENEY, 1998).

As bandas 1 e 2, embora se aproximem da mesma massa molecular de monômeros das imunoglobulinas, tornam-se difíceis de caracterizar como tal, já que a ação redutora do mercaptoetanol deveria liberar as cadeia longas e curtas das imunoglobulinas, com massa molecular inferior a 100 KDa (LOURENÇO, 2000). É possível que nas condições da análise tenha havido recombinações de cadeias das Igs, gerando moléculas com as massas moleculares detectadas. Por outro lado, a banda 3 poderá estar representando as proteínas lactoferrina mais peroxidases com massas moleculares muito próximas. O grupo das caseínas (banda 6) apresenta-se múltiplo e de difícil caracterização.

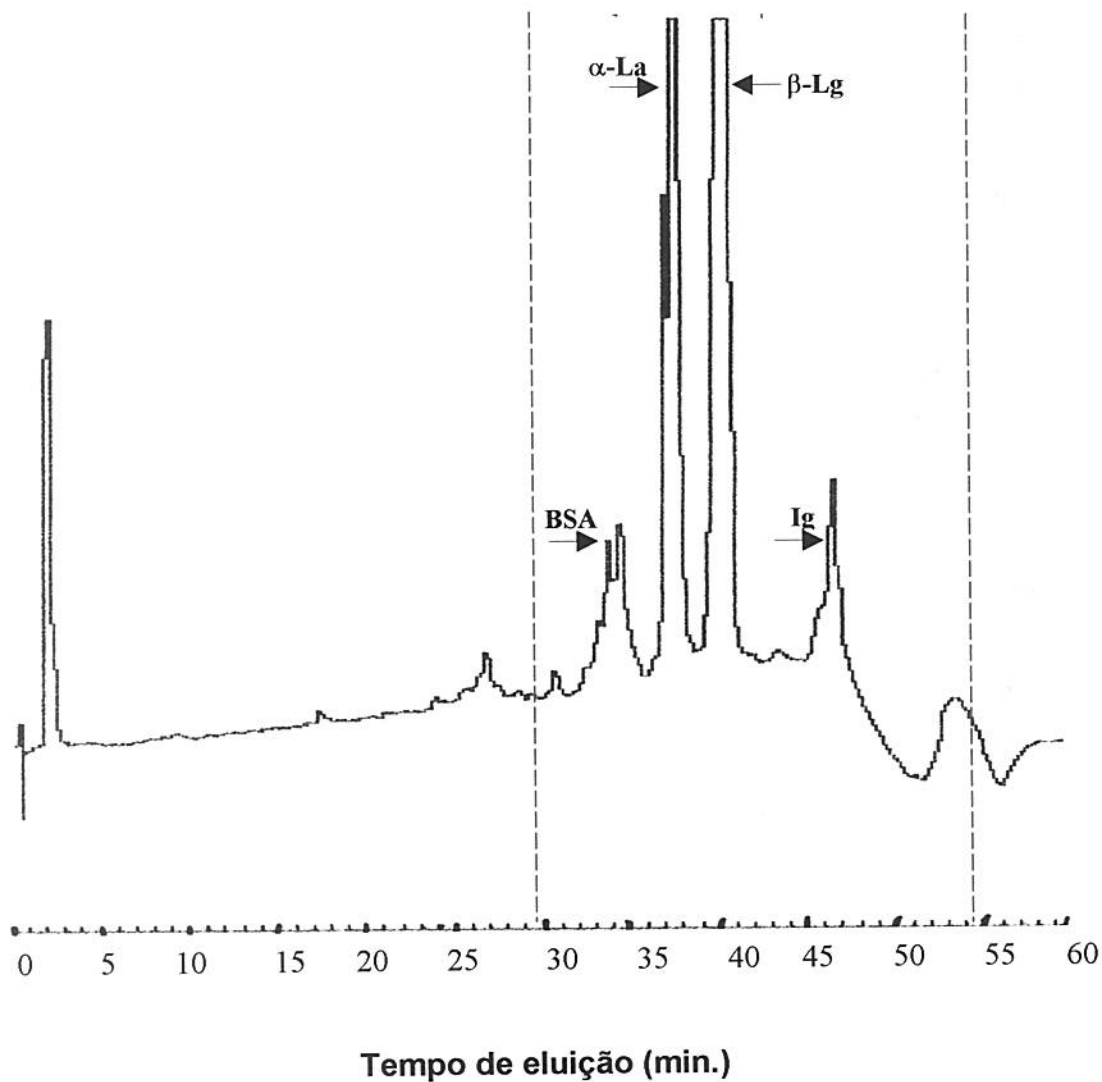
### 3.4 Perfil cromatográfico do WPI

O perfil cromatográfico da amostra de WPI obtida através dos processos de separação em membranas e a comparação com frações protéicas puras esta representado nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Pode-se observar na Figura 4 que foram evidenciados pelo menos quatro picos de eluição que ocorreram entre 30-50 minutos de análise, dentre eles, BSA,  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg, e Ig. Pode-se verificar que a fração de  $\beta$ -Lg apresentou-se bem separada. Quanto às frações  $\alpha$ -La e BSA, estas saíram praticamente ao mesmo

tempo com outro componente não identificado, no início do gradiente, não sendo claramente distinguidas.

Os resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com os dados identificados por COSTA (2004), que verificou os perfis do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) em pH 4,6, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa da fração solúvel, antes e após os tratamentos térmicos. Foi observado a presença de dois picos bem definidos correspondentes, a  $\alpha$ -La e a  $\beta$ -Lg, sendo a  $\alpha$ -La eluída primeiro.



**Figura 4** Perfil cromatográfico obtido em RP-HPLC do isolado protéico de soro bovino (WPI) produzido através dos processos de separação em membranas.



MEZZARROBA (2005) utilizou o sistema FPLC da Pharmacia e coluna de troca aniônica (resina Q Sepharose fast flow) para o isolamento da  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina a partir do concentrado de soro de leite. Observou-se que a  $\alpha$ -lactalbumina foi uma das primeiras proteínas a ser eluída da coluna. Sua eluição se deu quando se aumentou a concentração do tampão B para 10%, sendo que nesta concentração foram eluídas várias proteínas presentes no concentrado de soro de leite. A  $\beta$ -lactoglobulina foi eluída da coluna quando o tampão B atingiu uma concentração de 30%. Esses resultados são semelhantes aos encontrados nesse trabalho, pois a  $\beta$ -lg foi eluída com o aumento do tampão B (~38min.), iniciando-se com 5% de tampão B até os primeiros 5 minutos e, após a concentração de tampão B, foi-se progressivamente subindo (1mL/min) até atingir 100%.

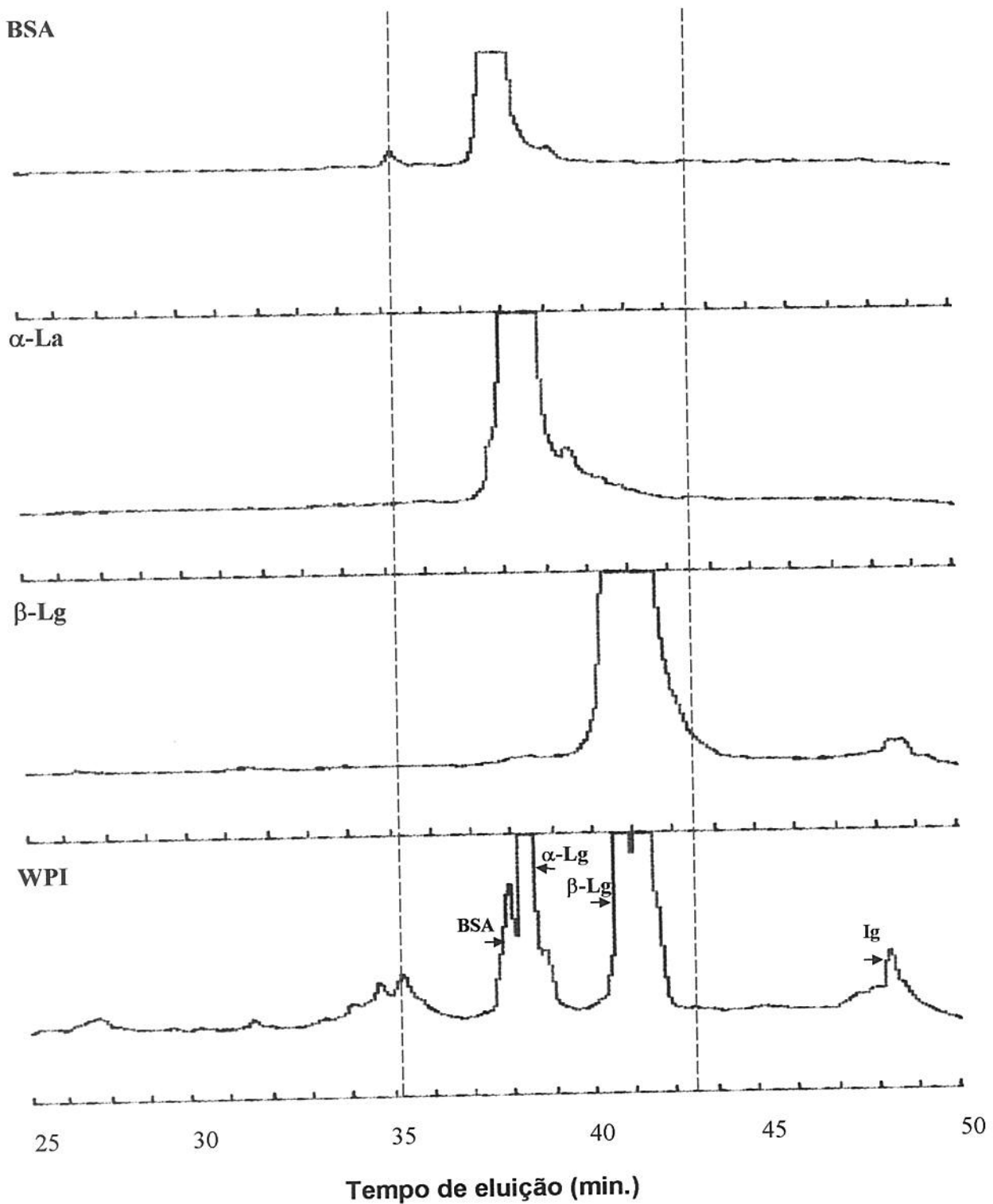
De acordo com as condições de fracionamento por cromatografia de fase reversa utilizadas nesse trabalho, a Ig foi à última fração identificada a ser separada. Segundo GIRARDET et al. (1989), a Ig não foi eluída totalmente no primeiro volume de eluição, sendo eluída progressivamente com o aumento da força iônica, contaminando a fração subsequente.

Segundo GIRARDET et al. (1989), a separação das proteínas do soro por troca aniônica em pH 6-8 foi obtida com boa resolução na seguinte ordem de volume de eluição: Ig< $\alpha$ -La<BSA< $\beta$ -Lg.

Para uma melhor identificação dos picos de eluição (Figura 4), estes foram comparados a proteínas padrões puras de  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La),  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e albumina de soro bovino (BSA) (Figura 5).

Segundo MEZZARROBA (2005), a cromatografia de troca iônica (resina de troca aniônica) mostrou-se eficiente para o isolamento da  $\beta$ -lactoglobulina. Isto ocorreu devido à  $\beta$ -lactoglobulina ter uma alta afinidade à resina utilizada, sendo uma das últimas proteínas a serem eluídas da coluna, uma vez que as demais proteínas e contaminantes presentes no concentrado de soro de leite foram eluídas anteriormente.





**Figura 5** Perfil cromatográfico obtido em RP-HPLC (25-50min) do isolado protéico de soro bovino (WPI) produzido através dos processos de separação em membranas comparado com frações puras de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La) e albumina de soro bovino (BSA).

Através dos cromatogramas apresentados nesse trabalho (Figura 4 e 5), pode-se afirmar que o WPI produzido é composto principalmente pelas frações  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La e BSA, principais proteínas do soro de leite bovino.

Os avanços da tecnologia de fracionamento das proteínas do soro de leite permitem estudos das propriedades imunobiológicas de alguns componentes do soro com alta pureza, com a perspectiva de possíveis aplicações industriais e biomédicas (WONG et al., 1997).

## 4 CONCLUSÃO

As técnicas de microfiltração, ultrafiltração/ diafiltração do leite bovino desnatado permitiram a obtenção de concentrados de caseína (micelar) e de proteínas de soro (WPI) com alto grau de pureza (> 95% de proteína).

O perfil de aminoácidos essenciais do WPI, produzido em planta piloto, foi superior ao padrão de referência da FAO/WHO (1990) e de resultados relatados na literatura.

A cromatografia em coluna (RP-HPLC) e a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelaram as principais proteínas do WPI ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, lactalbumina sérica e imunoglobulinas) que, somadas, representaram aproximadamente 76% das proteínas do WPI.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFNOR. Association Française de Normalisation. Lait - Détermination de la teneur en azote – Méthode de Kjeldahl, Norme NF-V-04-211, 1971

AFNOR. Association Française de Normalisation. Lait - Détermination des cendres – Méthode de référence, Norme NF-V-04-208, 1989.

AFNOR. Association Française de Normalisation. Lait, crème et lait concentré non sucré – Détermination de la matière sèche – Méthode de référence. Norme NF-V-04-367, 1985.

ANDREWS, A.T.; TAYLOR, M.D.; OWEN, A.J. Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.348, p.177-185, 1985.

BELSUNCE, C.; PION, R. Dosage de la cystine dans les aliments. **Anna. Biol. Anim; Bioch. Biophys**, v.3, n.2, p.191-199, 1963.

BORÓ, L; GUADIX, E.M; AUGUSTIN, O.M; BOZA, J.J; GIL, A. Serum amino acid concentrations in growing rats fed intact protein versus enzymatic protein hydrolysate-based diets. **Biology of Neonate**, v.68, p.55-61, 1995.

BOS, C. GAUDICHON, C.; TOMÉ, D. Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein for humans. **Journal of the American College of Nutrition**, Vol. 19, No. 90002, 191S-205S, 2000.

CANCINO. B.; ESPINA, V.; ORELLANA, C. Whey concentration using microfiltration and ultrafiltration. **Desalination**, v.200, p. 557-558, 2006.

CAPITANI, C.D.; PACHECO, M.T.B.; GUMERATO, H.F.; ALFREDO VITALI, A.; SCHMIDT, F.L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, p.1123-1128, 2005.

DAVIES, M.G.; THOMAS, A.J. An investigation of hydrolytic techniques for the amino acid analysis of foodstuffs. **Journal of Science Food Agriculture**, n.24, n.12, p.1525-1540, 1973.

ETZEL, M.R. The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. Manufacture and use of dairy protein fractions. **American Society for Nutritional Sciences**, v.184, n.4, p. 996S-1002S, 2004.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation, Bethesda, 1990.

FIL-IDF. Fédération Internationale de Laiterie – Internacional Dairy Federation. Norme Internationale 135A. Lait et produits laitiers –Caractéristiques de fidélité des methods analytiques – Schéma de conduite d'une etude collaborative, 1988.

FIL-IDF. Fédération Internationale de Laiterie – Internacional Dairy Federation. Norme Internationale 20B. Lait - Determination de la teneur en azote – Partie 4: Détermination de la teneur en azote non protéique, 1993.

FIL-IDF. Fédération Internationale de Laiterie – Internacional Dairy Federation. Norme Internationale 21B. Lait, crème et lait concentré non sucré - Determination de la matière sèche – Méthode de reference, 1987.

FIL-IDF. Fédération Internationale de Laiterie – Internacional Dairy Federation. Norme Internationale 29. Lait - Determination de la teneur en caseïne du lait, 1964.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk Proteins. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, Cap.4, p.147-238, 1998.

GERBERDING, S.J.; BYERS, C.H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of chromatography A**, v.808, n.1-2, p.141-151, 1998.

GIRARDET, J.M.; PAQUET, D.; LINDEN, G. Effects of chromatography parameters on the fractionation of whey proteins by anion exchange FLPC. **Milchwissenschaft**, v.44, n.11, p.692-696, 1989.

HAHN, R.; SCHULZ, P.M.; SCHAUPP, C.; JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.795, n.2, p.277-287, 1998.

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

KINSELLA, J.E. Milk Proteins: physicochemical and functional properties, **CRS Critical Review Food Science Nutrition**, v.21, n.3, p.197-261, 1984.

KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M.; BRADY, J. BRINGE, N.A. **Milk Proteins: possible relationships of structure and function**, in FOX, P.F. (Ed.), *Developments in Dairy Chemistry-4-Functional Milk Proteins*, Elsevier Appl. Sci. London, England, pp.55-95, 1989.

KINSELLA, J. 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.

KORHONEN, H. Tecnology option for new nutritional concepts. **International Journal of Dairy Technology**, v.55, n.2, p.79-88, 2002.

KRISTIANSEN, K.R.; OTTE, J.; IPSEN, R.; QVIST, K.B. Large-scale preparation of b-lactoglobulin A and B by ultrafiltration and ion-exchange chromatography. **International Dairy Journal**, v.8, n.2, p.113-118, 1998.

LA FUENTE, M.A.; HEMAR, Y.; TAMEHANA, M.; MUNRO, P.A.; SINGH, H. Processinduced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. **International Dairy Journal**, v.12, n.4, p.361-369, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. London, v.227, n.15, p.680-685, 1970.

LANCHA JÚNIOR, A.H.; RECCO, M.B.; ABDALLA, D.S.; CURI, R. Effect of aspartame, asparagines, and carnitine supplementation in the diet on metabolism of skeletal muscle during a moderate exercise. **Physiology and Behavior**, v.57, p.367-371, 1995.

LOURENÇO, E. **Tópicos de Proteínas de Alimentos**. Jaboticabal : Funep, Fapesp, 344p., 2000.

MANJI, B.; HILL, A.; KAKUDA, Y.; IRVINE, DM. Rapid separation of milk whey proteins by anion exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.12, p.3176-3179, 1985.

MÄNTYJÄRVI, R.; RAUTIAINEN, J.; VIRTANEN. Lipocalins as allergens. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1482, p.308-317, 2000.

MARKUS, C.R.; OLIVIER, B.; PANHUYSEN G.E.M.; GUGTEN, J. VAN DER; LLES, M.S.; TUITEN, A.; WESTENBERG, H.G.M, FEKKES, D.; OPPERSCHAAR, H.F.; HAAN, E. The bovine apha-lactalbumin increases the lasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in ulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.6, p.1536-1544, 2000.

MARQUEZI, M.L.; LANCHÁ JÚNIOR, A.H. Possível efeito da suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada, aspartato e asparagina sobre o limiar anaeróbio. **Revista Paulista de Educação Física**, v.11, n.1, p.90-101, 1997.

MATSUMOTO, H; SHIMOKAWA, Y; USHIDA, Y; TOIDA, T; HAYASAWA, H. New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.65, n.5, p.1104-1111, 2001.

MAUBOIS, J.L.; OLLIVER, G. Extraction of milk proteins. In: **Food proteins and their applications**. Srinivasan Damodaram; Alain Paraf (Eds). New York: Marcel Dekker, INC, Cap.20, p.579-595, 1997.

MEZZAROBÁ, L.F.H. "Ação da a-lactalbumina e seus hidrolisados na inibição da úlcera gástrica induzida por diferentes agentes". Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005, p.131.

MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; MCBEON, L.D. **Handbook of Dairy Foods and Nutrition**. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2000.

MULVIHILL, D.M.; ENNIS, M.P. **Functional milk proteins**: Production and utilisation. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry*. Part B, Vol. 1 (pp. 1175–1228). New York: Kluwer Academic, 2003.

NAKAI, S.; MODLER, H.W. **Food Proteins, Properties and Characterization**. Wiley-VCH, 1996, 544 pg.

NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: EMBRAPA GADO DE LEITE. **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil**: qualidade e segurança alimentar. Juiz de Fora, MG, 2001. p.97-108.

OSTERLAND, N. **New developments in membrane processing**. XXV International Dairy Congress, Aarhus, Denmark, 21-24 September, International Dairy Federation, p.30-31, 1998.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S.F. Milk growth factors as health products: Some technological aspects. **International Dairy Journal**, v.16, n.11, p.1415-1420, 2006.

PUNIDADAS, P. RIZVI, S.S.H. Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration. **Food Research International**. Essex, v.31, n.4, p.265-272, 1998.

ROMAN, J.A. Propriedades físico-químicas, nutritivas e funcionais da caseína de leite bovino obtida por diferentes processos. Dissertação (Mestrado) apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campina, (UNICAMP), 2002, 163p.

SGARBIERI, V.C. Propriedades Fisiológicas Funcionais das Proteínas de Soro de Leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, 2004.

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



SMITHERS, G.W.; BALLARD, F.J.; COPELAND, A.D.; SILVA, K.J.; DIONYSIUS, D.A.; FRANCIS, G.L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P.A.; MCINTOSH, G.H.; MITCHELL, I.R.; PEARCE, R.J.; REGESTER, G.O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.8, p.1454-1459, 1996.

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in protein. **Analytical Chemistry**, v.39, n.12, p.1412-1416, 1967.

SPREER, E. **Milk as a raw material and food. In: Milk and dairy product technology.** Translated by Axel Mixa. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998.

TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **Journal of Food Engineering**, v.67, v.1-2, p.13-20, 2005.

TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Transport of whey proteins through 0,1um ceramic membrane: phenomena, modeling and consequences for concentration or diafiltration processes. **Desalination**, v.199, n.1-3, p.340-341, 2006.

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

WONG, C.W.; SEOW, H.F.; HUSBAND, A.J.; REGESTER, G.O.; WATSON, D.L. Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.56, n.1-2, p.85-96, 1997.

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



# HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA E POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE PEPTÍDIOS DO ISOLADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE (WPI) E DA $\beta$ -LACTOGLOBULINA

J.A. ROMAN, G. HENRY, D. MOLLÉ, S. BOUHALLAB, V.C. SGARBIERI.

## RESUMO

Os principais objetivos desta pesquisa foram: a) obter hidrolisados tripticos de um isolado protéico de soro de leite (WPI) e da  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) pura; b) submeter os hidrolisados ao fracionamento, visando a separação de uma ou mais frações enriquecidas com peptídios contendo nas moléculas grupos dissulfeto (S-S); c) caracterizar parcialmente os peptídios contidos na referida fração quanto à massa molecular, identificação, com seqüências primárias de proteínas conhecidas do soro de leite e identificação dos peptídios contendo S-S na molécula mediante redução com ditioneitol (DTT). Para atingir esses objetivos foram empregadas seqüencialmente técnicas de cromatografia em colunas de troca iônica (FPLC), cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) e espectrometria de massa. Da fração D (WPI), foram isolados e parcialmente caracterizados 33 peptídios de massa molecular entre 393–3316 Da, a maioria deles foram associados à seqüência primária da  $\beta$ -Lg; apenas quatro identificaram-se com a seqüência da  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La). Da fração D ( $\beta$ -Lg), foram identificados 19 peptídios (MM 572–4304 Da), sendo que 15 foram identificados com a seqüência primária da  $\beta$ -Lg, 2 com a  $\alpha$ -La e 8 peptídios não identificados. Conclui-se que foi possível separar dos hidrolisados do WPI e da  $\beta$ -Lg, uma fração hidrofóbica e enriquecida com peptídios contendo pontes dissulfeto em suas estruturas.

**Palavras-chave:** peptídios, caracterização, cromatografia, hidrólise enzimática, espectrometria de massa.

## SUMMARY

The main objectives of this research were a) to obtain tryptic hydrolysates of a whey protein isolate (WPI) and of a pure  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg); b) fractionation of the hydrolysates aiming at separation of one or more fractions enriched with peptides containing disulfide (S-S) group in the molecule; c) partial characterization of peptides contained in this(e) fraction(s) regarding molecular mass, identification of primary sequences of known whey proteins and, identification of peptides containing S-S groups in their structure applying reduction with dithiotreitol (DTT). To reach these objectives the following methodology was employed: ion-exchange column chromatography (FPLC), reverse phase chromatography (RP-HPLC) and mass spectrometry. From column chromatography of fraction D (WPI) 33 peptides were isolated (MM 393-3316 Da) which were partially characterized. The primary sequences of the majority of them were associated with the  $\beta$ -Lg whereas only 4 presented  $\alpha$ -La sequence. From fraction D of  $\beta$ -Lg, 19 peptides were identified (MM 572-4304 Da) from which 15 were identified with  $\beta$ -Lg primary sequences, 2 with  $\alpha$ -La sequences and 8 non-identified peptides. It was concluded that it was possible to separate from WPI and  $\beta$ -Lg a hydrophobic fraction enriched of disulfide bridges in their structures.

**Keywords:** peptides, characterization, enzymatic hydrolysates, chromatography, mass spectrometry

## 1 INTRODUÇÃO

As proteínas do soro de leite têm encontrado cada vez mais aplicações em diversas áreas, como as tecnológicas e biomédicas, pela sua excelente composição de aminoácidos, alta solubilidade em toda a faixa de pH, elevada digestibilidade e a capacidade de gerar, através da hidrólise enzimática, tanto *in vitro* como *in vivo*, uma grande variedade de peptídios bioativos capazes de modular várias funções biológicas diferentes (SMITHERS et al. 1996; SGARBIERI, 1996; MCINTOSH et al. 1995; FARRELL et al. 2004; ETZEL, 2004).

Dentre as mais conhecidas funções metabólico-fisiológicas das proteínas do soro de leite citam-se: propriedades de imunoestimulação, estímulo à síntese de glutathione tecidual e da síntese de imunoglobulina M(IgM) mediante desafio com um antígeno específico, estímulo à síntese de IGF-1 (fator anabolizante semelhante à insulina), atividade antimicrobiana (antibacteriana e antiviral), atividade anti-tumoral, atividade opióide, atividade antihipertensora e, mais recentemente, atividade antiulcerogênica (SGARBIERI, 2004; BRINK, 1996; MARSHALL, 2004; ROSANELI et al. 2002, 2004; MEZZAROBBA et al. 2006; DIAS et al. 2006; BOUNOUS et al. 1993; BOUNOUS e GOLD, 1991; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2001).

Em função do poder específico das proteínas do soro de leite de estimular a síntese de glutathione nos tecidos e da dependência demonstrada entre a síntese de glutathione e o estímulo à síntese de imunoglobulinas (Ig), surgiu o grande interesse de se explicar a tríplice relação: proteínas de soro, estímulo à síntese de glutathione e estímulo à síntese de Ig.

Pesquisadores canadenses (BOUNOUS et al. 1989; BOUNOUS e GOLD, 1991) tentaram explicar essa relação. Após alguns experimentos, emitiram as hipóteses de que: a) as proteínas do soro de leite, particularmente albumina sérica bovina (BSA), lactoferrina (Lf), alfa lactalbumina ( $\alpha$ -La), beta lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e imunoglobulina G (IgG), são ricas em aminoácidos sulfurados, que aparecem na estrutura da molécula na forma de cistina, formando pontes dissulfeto em várias partes da molécula; b) revisando a estrutura dessas proteínas, ficou demonstrado que muitas dessas pontes dissulfeto apareciam na estrutura primária da proteína precedidas de ácido glutâmico.

Como as enzimas proteolíticas não hidrolisam ligações dissulfeto, é de se esperar que na proteólise extensiva por endopeptidases do sistema digestivo se formem, tanto *in vitro* como *in vivo*, peptídeos de reduzida massa molecular contendo a seqüência glutamyl-cistina que, no processo de absorção e transporte até o sítio de síntese de glutathione (ex. tecido hepático), transformaria-se em glutamyl-cisteína, substrato ideal para a síntese da glutathione.

BOUNOUS et al. (1989), verificaram que a administração *in vivo* do inibidor da enzima glutathione sintase inibiu não somente a síntese tecidual da glutathione em vários tecidos, mas também a síntese de IgM no baço, em resposta ao

antígeno específico de hemácias de carneiro, ficando assim demonstrado a dependência entre a produção de glutathione e a resposta da Ig ao antígeno específico.

Foi também demonstrado que tanto a síntese de glutathione como a produção de IgM no baço ficam muito reduzidas quando as proteínas de soro são submetidas a tratamentos drásticos de temperatura, possivelmente rompendo, por efeito térmico, as pontes dissulfeto e desestruturando a proteína, modificando, inclusive, a especificidade da proteólise pelas enzimas digestivas.

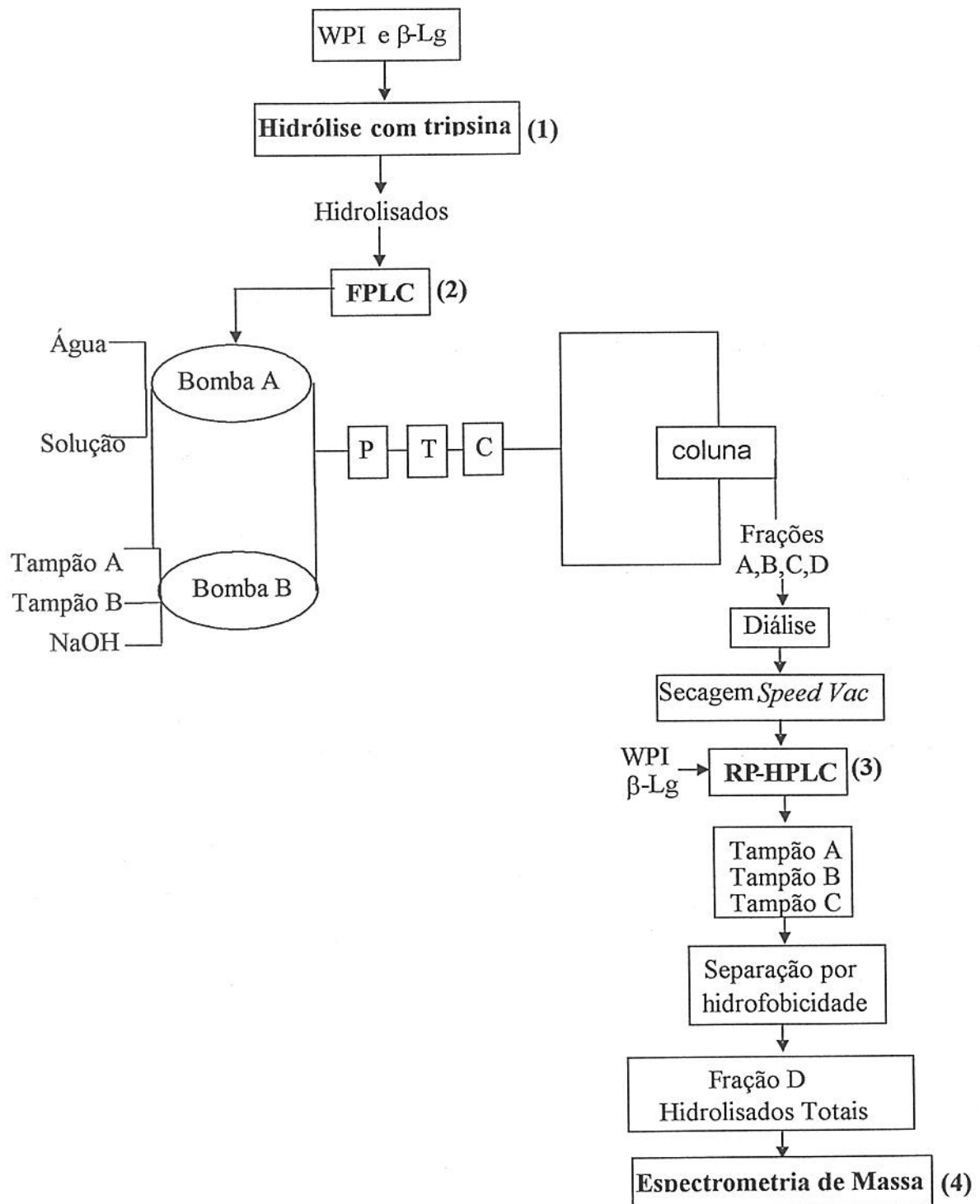
É, portanto, de interesse não somente identificar na seqüência primária dessas proteínas as regiões contendo as pontes dissulfeto, mas principalmente isolar frações de hidrolisados enriquecidos com esses peptídios, a fim de testar seus efeitos imunoestimulante *in vivo*.

O objetivo desta pesquisa foi preparar hidrolisados tripticos e fracioná-los, por cromatografia de troca iônica, frações estas enriquecidas com aminoácidos sulfurados e, em seguida, separar destas frações os seus peptídios por cromatografia de alta eficiência em fase reversa e identificá-los por espectrometria de massa antes e após reação de redução das pontes dissulfeto com o agente redutor ditioneitol (DTT).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os hidrolisados foram estudados com o objetivo de identificar as frações contendo peptídios ricos em cistinas (cisteínas unidas por ligações covalentes do tipo S-S) produzidos pela hidrólise enzimática com tripsina.

O isolado protéico de soro de leite (WPI) e a beta lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) foram hidrolisados, fracionados pelas cromatografias de troca iônica (FPLC *fast protein peptide and polynucleotide liquid chromatography*) e de fase reversa (RP-HPLC), e caracterizados pela espectrometria de massa. Esta seqüência de processos está ilustrada na Figura 1.



**Figura 1** Seqüência metodológica: (1) hidrólise enzimática com tripsina, (2) FPLC (cromatografia de troca iônica), (3) RP-HPLC (cromatografia de fase reversa) e (4) espectrometria de massa (P:pressão, T:temperatura, C:concentração).

## 2.1 Hidrólise enzimática

Na hidrólise enzimática, usaram-se como substratos o isolado de proteína de soro de leite bovino (FV 22.05.00) e  $\beta$ -lactoglobulina (madgelas – INR BB), ambos previamente preparados pelo INRA (*Institute National de la Recherche Agronomique*), Rennes - França.

A enzima utilizada foi a tripsina (TPCK – Sigma – Lot : 76H7115 – ref. T142), na relação enzima/substrato 1/200g. A inativação da enzima após período de reação foi realizada pela elevação da temperatura a 80°C e foi mantida durante 10 minutos.

A hidrólise foi realizada em banho-maria sob agitação a 37°C, sendo que o substrato foi dissolvido na concentração de 1g/L de tampão tris-HCl (20 mM, pH 8,0). A hidrólise foi paralisada nos tempos de 1, 3, 6 e 22 horas. As análises foram realizadas com as amostras não hidrolisadas e após 22 horas de hidrólise enzimática.

## 2.2 Fracionamento dos peptídios por cromatografia de troca iônica – FPLC

A separação por FPLC é baseada na diferença das propriedades de cargas das moléculas, sendo que as moléculas compostas por resíduos de cisteína-cisteína (formando ligação dissulfeto S-S) saem no final do gradiente (nas últimas frações coletadas).

O sistema FPLC utilizado foi constituído de um controlador LCC-500, duas bombas (P-500) e um detector operando a 214nm (UV-1). O sistema foi conectado ao *logiciel Nelson* (2600 Chromatography Nelson Analytical Software da série 900, Nelson Analytical, USA). Utilizou-se uma coluna Soucre™ 15 RPC (Pharmacia Biotech) HR 5/5 matriz de troca iônica (50mm x 5 mm I.D, 10 $\mu$ m tamanho da partícula).

Água destilada foi purificada usando-se o sistema Milli-Q (Millipore). Todos os sais e produtos eram de grau analítico. Utilizou-se como tampão A uma solução de ácido clorídrico (HCl 20 mM pH 2,0) e, como tampão B, cloreto de potássio e



de sódio (KCl 20mM + NaCl 1M pH 2,0). O gradiente foi efetuado entre 0 e 60% de tampão B, em 30 minutos 1mL/min, totalizando 45 minutos.

Os hidrolisados obtidos após 22 horas de reação com tripsina foram injetados (500  $\mu$ L) na coluna previamente equilibrada com tampão A, na concentração de 1g/L. Após 2 minutos iniciou a elevação do gradiente de Tampão B de 0 a 60%, em uma velocidade de 1mL/min., durante 30 minutos. Após esse tempo elevou-se para 100% de Tampão B, retornando a 0% de B aos 38 min, permanecendo até os 45 minutos.

Após a coleta das quatro frações dos hidrolisados de  $\beta$ -Lg e de WPI, fez-se a diálise das frações, sob agitação com azida sódica 0,02%, durante 3 dias, em temperatura de refrigeração utilizando-se membrana *Spectra* com tamanho de corte de 500 Da e secagem sob vácuo em *speed-vac* (para obtenção das amostras liofilizadas).

Para promover a redução das amostras (rompimento das ligações S-S), utilizou-se ditioneitol (DTT), deixando-se as amostras em banho-maria a 37°C sob agitação, durante 1 hora.

### 2.3 Caracterização dos peptídeos fracionados em RP-HPLC

A caracterização em RP-HPLC (cromatografia de alta eficiência líquida de fase reversa) foi realizada para identificar e separar os peptídeos contendo as ligações dissulfeto (S-S) em função da hidrofobicidade, comparando-se as amostras hidrolisadas, antes e após redução com DTT.

Os peptídeos obtidos em FPLC foram desidratados em *speed-vac*, depois de identificados em RP-HPLC, e para isto utilizou-se coluna C<sub>18</sub> Vydac (250 x 4,6mm, 300 Å, 5 $\mu$ , 2188TP54 Touzart) a temperatura de 40°C. Os solventes utilizados foram tampão A, contendo ácido trifluoroacético (TFA), produzido pela Peirce Chemicals (TFA 1,60%), solvente B, composto por 0,1% de TFA em acetonitrila-água (80:20 v/v) e tampão C contendo acetonitrila a 50%.

A eluição foi realizada a um fluxo de 1mL/min e gradiente linear de acetonitrila variado de 0 a 100% do solvente B pressão máxima de 150 bar, volume de injeção 200µL e detector a 214 nm, durante 80 minutos.

A porcentagem de tampão B foi diferente. As amostras não hidrolisadas de WPI e  $\beta$ -Lg foram cromatografadas iniciando-se com 5% de tampão B até os primeiros 10 minutos, após a concentração de tampão B foi progressivamente elevando até atingir 60% de solução B em 70 minutos, e mantendo-se de 72-74 min, 100% de solução B e dos 75-80 min 5% de solução B. Nas amostras hidrolisadas após 22 horas, iniciou-se com gradientes de 46% de tampão B no tempo zero, subindo progressivamente e atingindo 100% de tampão B dos 54-56 min.

## 2.4 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é baseada na ionização em fase gasosa das moléculas analisadas. A mensuração é feita da relação massa/carga ( $m/z$ ) de íons moleculares ou de fragmentos gerados e permite determinar a massa molecular dos compostos estudados.

Para a determinação da espectrometria de massa, foi utilizado um sistema LC/MS, RP-HPLC, Column Symmetry C18 (125 x 2,1mm), tampão A 1,60% TFA, tampão B acetonitrila 80% e TFA 1%.

A espectrofotometria de massa foi realizada a 40°C, volume de injeção de 50 ou 100µL, detector a 214 e 280 nm e velocidade de 0,25mL/min, totalizando um tempo de 85 min. Para a hidrólise com tripsina, o *scan acquire* valor médio de  $m/z$  de 300 a 2350 Da, com tamanho médio de 0,33 KDa.

As amostras foram submetidas à diálise e secagem em *speed-vac*. As frações foram suspensas em tampão Tris 20mM, pH 8,0 + 0,02% de azida sódica (nas mesmas condições utilizadas para o HPLC).



## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Separação por cromatografia de troca iônica (FPLC)

Uma importante distinção entre concentração e fracionamento durante o processo de separação deve ser enfatizada. Concentração é o processo que aumenta igualmente o conteúdo de cada proteína da mistura. A quantidade relativa de cada proteína é condensada em um líquido de pequeno volume. O processo de fracionamento divide a mistura protéica em diferentes porções, cada qual em diferentes quantidades de cada proteína da solução original. Cada porção poderá estar mais diluída ou mais concentrada que a solução original. A separação ideal é aquela em que se combinam os processos simultâneos de fracionamento e concentração de proteínas específicas da solução (ETZEL, 2004).

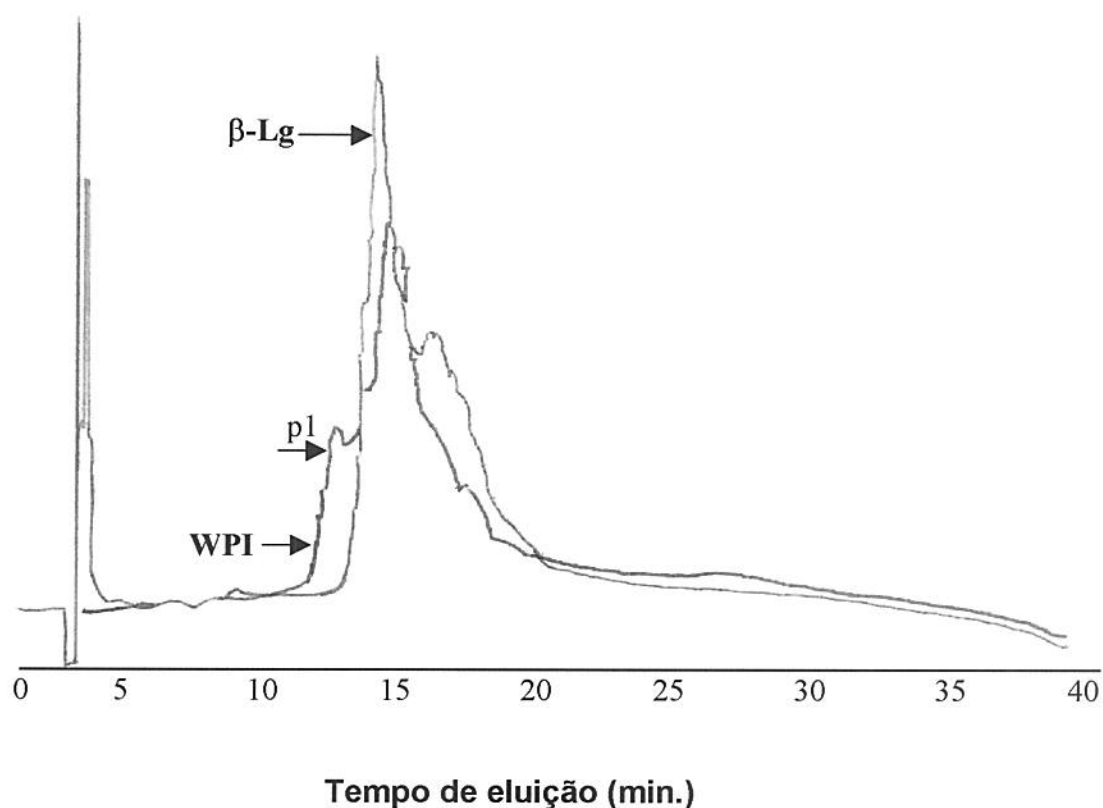
Atualmente, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para a caracterização dos hidrolisados de proteína. Para a determinação da distribuição de massas moleculares, paralelamente às metodologias eletroforéticas, a cromatografia líquida de alta performance de exclusão molecular (SE-HPLC), baseada nas diferenças de volumes hidrodinâmicos das moléculas, tem sido largamente utilizada. A cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC), baseada essencialmente em diferenças de hidrofobicidade, tem também sido utilizada na caracterização de hidrolisados protéicos, sendo possível, através do perfil do cromatograma de RP-HPLC, prever a distribuição das massas moleculares dos peptídios (VAN DER VEN et al. 2001).

Separações cromatográficas baseadas na carga das moléculas (cromatografia de troca iônica, IE-HPLC), ou baseadas na afinidade específica por determinados ligantes (LE-HPLC), revelaram-se úteis em análises específicas de hidrolisados protéicos (SILVESTRE, 1997). Um detector convencional de ultravioleta ou de fluorescência é normalmente acoplado ao sistema de cromatografia líquida.

As principais frações protéicas do soro incluem a  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina e a soroalbumina bovina (BSA) nas concentrações de 3,7; 0,6; e

0,3g/L de leite, respectivamente. Outras proteínas estão presentes em concentrações mais baixas, são elas: imunoglobulinas, lisozima, lipase, lactoferrina e xantina oxidase (KINSELLA e WHITEHEAD, 1990).

Os perfis cromatográficos das amostras de  $\beta$ -Lg e WPI não hidrolisadas em coluna de exclusão molecular estão descritos na Figura 2. A comparação dos perfis cromatográficos das amostras de WPI e  $\beta$ -Lg não hidrolisados mostram-se semelhantes (eluídos entre 10 e 20 min), no entanto, como o WPI é uma mistura de proteínas ( $\alpha$ -La, BSA e Ig), diferenças podem ser observadas no gradiente (tempo de 12 min. de eluição, com a presença do pico p1). Estima-se que o pico (p1), presente no perfil do WPI, é representado pela  $\alpha$ -La.



**Figura 2** Perfil cromatográfico (FPLC) das amostras de WPI e  $\beta$ -Lg em 214 nm no gradiente de 46-100% de Tampão B.

Segundo GIRARDET et al. (1989), a separação das proteínas do soro por troca aniônica em pH 6-8 foi obtida com boa resolução na seguinte ordem de volume de eluição: Ig< $\alpha$ -La<BSA< $\beta$ -Lg.

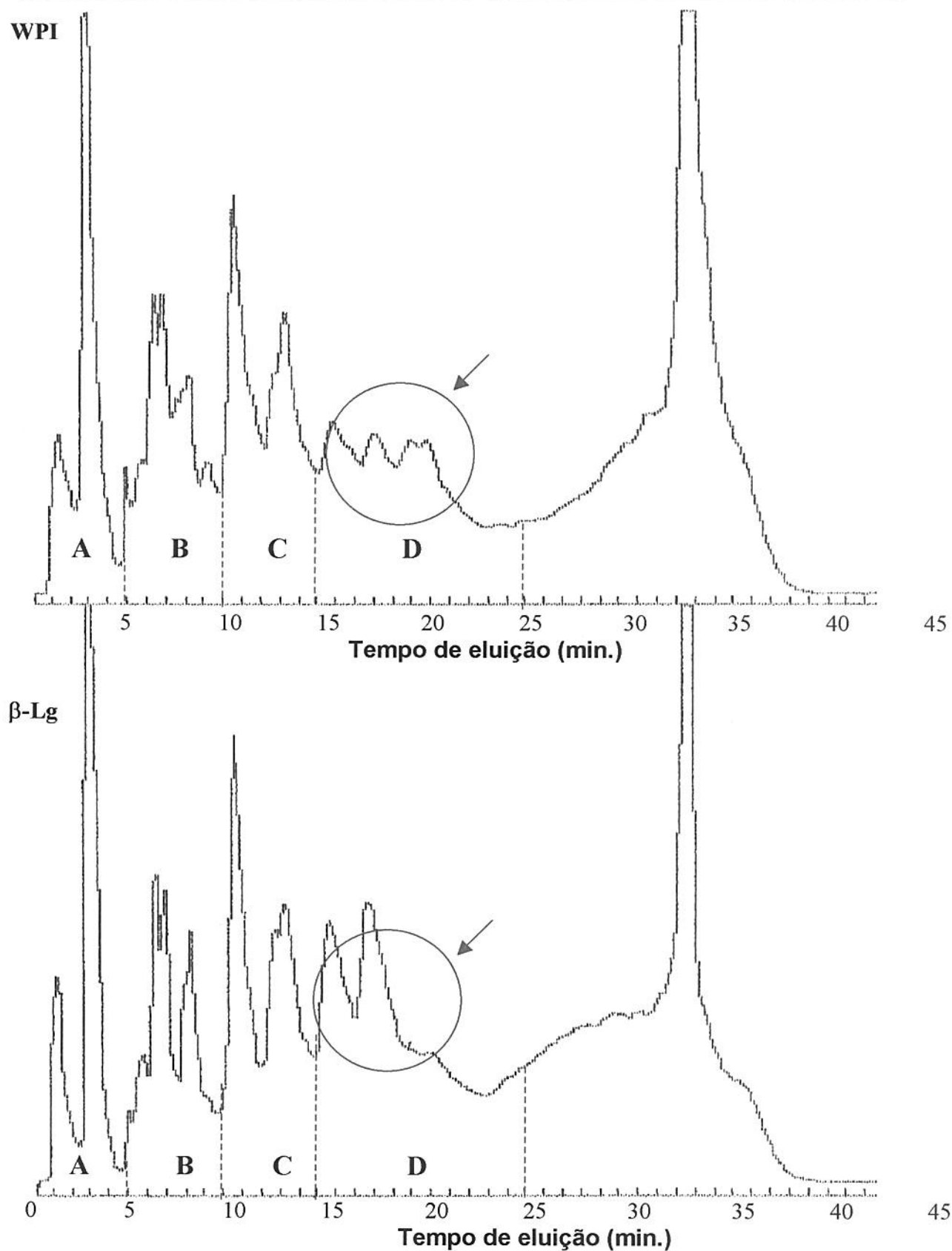
Segundo MEZZAROBÀ (2005), a cromatografia de troca iônica (resina de troca aniônica) mostrou-se eficiente para o isolamento da  $\beta$ -lactoglobulina, pois esta fração possui alta afinidade à resina utilizada e é uma das últimas proteínas a serem eluídas da coluna, uma vez que as demais proteínas e contaminantes presentes no concentrado de soro de leite foram eluídas anteriormente.

O perfil cromatográfico das amostras de  $\beta$ -Lg e WPI hidrolisadas com tripsina estão mostradas na Figura 3. O que se observa nas amostras hidrolisadas e cromatografadas (FPLC), é o aparecimento de maior número de picos devido à maior presença de peptídeos, originados pela hidrólise enzimática. Os dados obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos descritos por COSTA (2004), que relatou que o perfil cromatográfico (CLAE-FR) do WPI anteriormente era caracterizado por dois picos correspondentes à  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina e que, após a hidrólise, apresentou um grande número de picos correspondentes aos peptídeos formados pela ação das enzimas proteolíticas (Alcalase,  $\alpha$ -quimotripsina, Proteomix), com perfil característico de acordo com a enzima utilizada.

Os hidrolisados obtidos foram separados em 4 frações que foram denominadas respectivamente, frações A, B, C e D, nos tempos médios de (A) 2,4-4,6; (B) 4,5-9,7; (C) 9,7-15 e (D) 15-25 min.

Após reação com o agente redutor (ditiotreitól DTT) usado para clivar as ligações dissulfídicas, houve diferença após tratamento apenas para a fração D; esse mesmo resultado foi verificado ao se comparar os dois cromatogramas mostrados na Figura 3.

Somente serão discutidos os resultados da espectrometria de massa dos peptídeos obtidos no hidrolisado total e na fração D de ambas as amostras (WPI e  $\beta$ -Lg), pois as demais frações não apresentaram diferenças nos picos após a utilização do DTT.



**Figura 3** Perfis cromatográficos dos hidrolisados de WPI e  $\beta$ -lactoglobulina, obtidos por cromatografia de troca iônica, FPLC, durante 45 minutos.

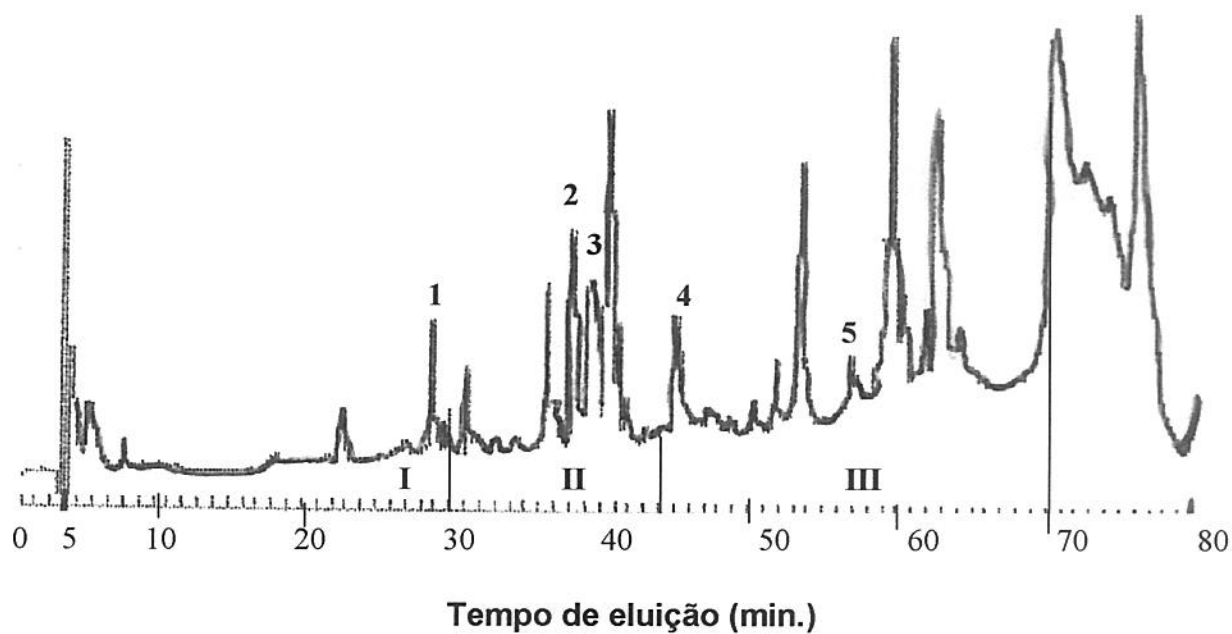
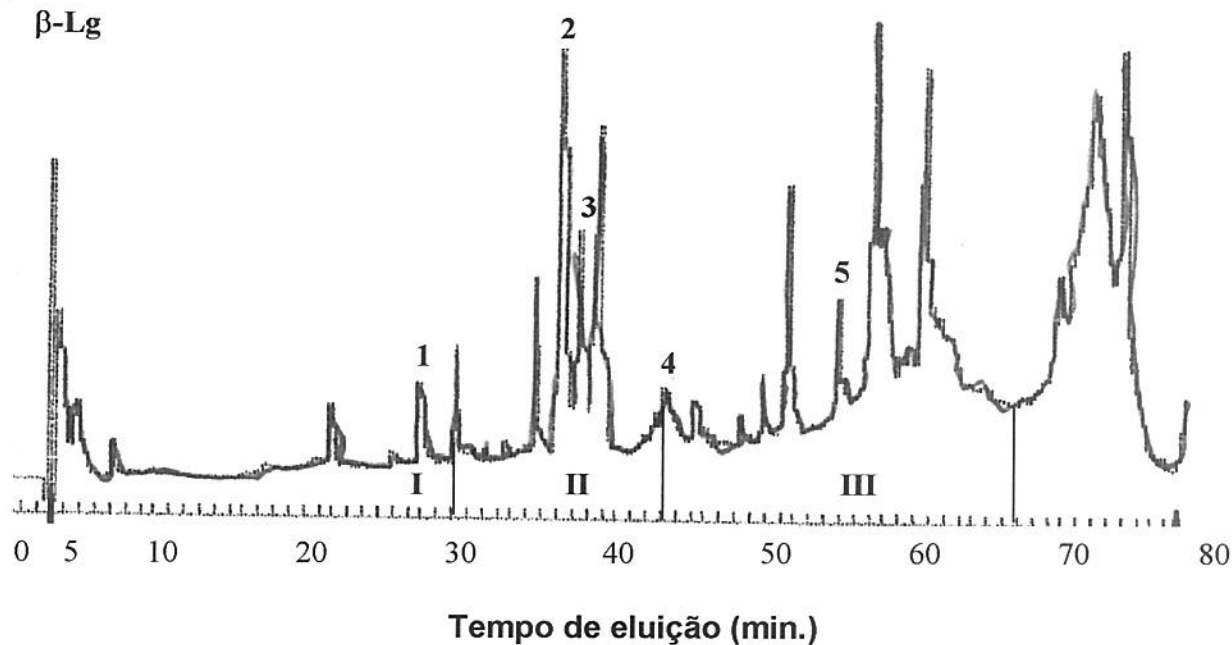
### 3.2 Caracterização em função da hidrofobicidade (RP-HPLC)

O perfil de eluição foi dividido em três zonas, de acordo com a hidrofobicidade dos peptídeos eluídos, tendo como base a classificação feita por LEGAY et al. (1997) e COSTA (2004). Os cromatogramas dos hidrolisados obtidos a partir de amostras de WPI e  $\beta$ -Lg, hidrolizados com tripsina, foram classificados como: (I) baixa hidrofobicidade, os que eluíram até 30 minutos, com um gradiente da solução B entre 5-25%; (II) hidrofobicidade média, os que eluíram entre 30 e 45 minutos, com gradiente da solução B entre 25% e 40% e (III) hidrofobicidade alta, os que eluíram a partir de 46 minutos, com gradiente da solução B acima de 40%. A partir de 70 min, o gradiente da solução B passou de 60 para 100%, não sendo mais verificado a presença de picos significativos (Figura 4).

Os hidrolisados de WPI e  $\beta$ -Lg produzidos pela ação da tripsina apresentaram elevada concentração de peptídeos nas regiões de hidrofobicidade intermediária e alta. Esses mesmos resultados foram relatados por COSTA (2004) sobre a hidrólise de WPI com ação de alcalase, o que sugere a presença de peptídeos de alto peso molecular provenientes da hidrólise parcial das proteínas do soro e formação de poucos peptídeos de baixo peso molecular (CHABANET, 1992).

Quando comparados os cromatogramas dos hidrolisados de WPI e  $\beta$ -Lg, apenas os picos distintos foram identificados, sendo o pico 1 caracterizado como de baixa hidrofobicidade, os picos 2 e 3 de hidrofobicidade intermediária e os picos 4 e 5 de hidrofobicidade alta. Pode-se observar que os picos 2 e 5 são maiores na  $\beta$ -Lg, isso pode indicar que esses picos são formados praticamente desta fração. No entanto, os picos 1, 3 e 4 são maiores no hidrolisado de WPI, o que sugere que outras proteínas, como  $\alpha$ -La, BSA, Igs, contribuíram para o *pool* de peptídeos obtidos.

## WPI

 $\beta$ -Lg

**Figura 4** Perfil cromatográfico (RP-HPLC) das amostras de WPI e  $\beta$ -Lg hidrolisadas por 22 horas. Baixa hidrofobicidade (I), hidrofobicidade intermediária (II) e hidrofobicidade alta (III).

### 3.3 Caracterização de peptídios por espectrometria de massa

A possibilidade recente de utilizar a espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) revelou-se uma ferramenta muito potente na caracterização dos hidrolisados e no estudo da relação estrutura-função das proteínas e peptídios. Esta análise torna-se valiosa no aprofundamento do conhecimento de propriedades nutricionais e funcionais de hidrolisados de proteína (LÉONIL et al. 2000).

Muitas das funções biológicas apontadas às proteínas do soro (e às caseínas) só se manifestam após a sua proteólise durante o processo digestório ou durante o processamento. São, na realidade, alguns dos peptídios contidos nas seqüências protéicas originais que atuam em nível celular e aí exercem funções reguladoras de vários processos orgânicos. A libertação dos peptídios das proteínas do soro ocorre, em condições normais, durante a digestão pela ação das enzimas digestivas. O tratamento do soro ou seus derivados com enzimas proteolíticas, ou com espécies microbianas possuidoras de considerável atividade proteolítica, leva também à liberação de peptídios que depois podem ser ingeridos na sua forma ativa (TORRES, 2005).

Dentre uma variedade significativa de enzimas de origem microbiana ou digestiva, as enzimas pancreáticas, principalmente a tripsina, têm sido usadas para a identificação e caracterização de vários peptídios bioativos (KORHONEN e PHILANTO-LEPPÄLÄ 2001). Os hidrolisados produzidos por ação de endoproteases que apresentem uma baixa especificidade e que liberam peptídios com aminoácidos não polares nas extremidades são mais amargos que aqueles produzidos por enzimas, tal como a tripsina, com maior especificidade (TORRES, 2005). A Tripsina (EC 3.4.21.4) apresenta maior afinidade por resíduos hidrofílicos (ADLER-NISSEN 1986) e hidrolisa grupos C-terminais de arginina (Arg, R) e lisina (Lys, K) (POULIOT et al., 2000).

Os espectros de massa dos hidrolisados totais de WPI estão apresentados na Figura 5 e os resultados da análise na Tabela 1, representam a seqüência aminoacídica, massa mensurada e o tempo de eluição. Ao avaliar os espectros de massa do hidrolisado total de WPI, antes e após tratamento com DTT (Figura 5), 4 regiões foram relevantes. Nas regiões identificadas como **a**, **c** e **d**, novos picos

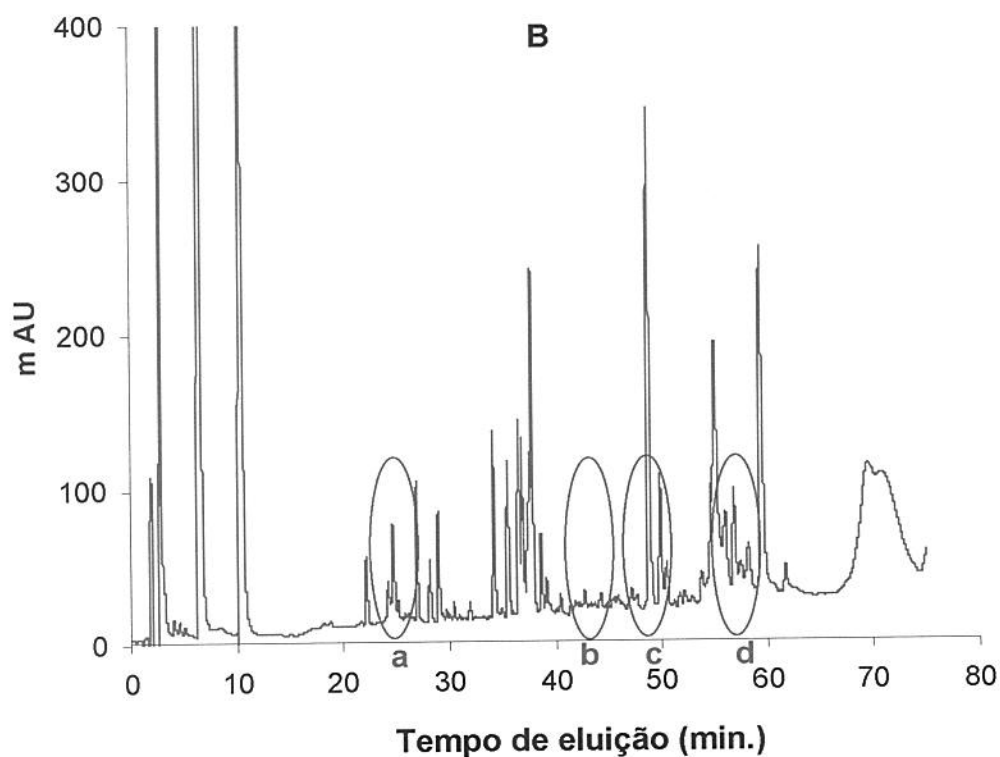
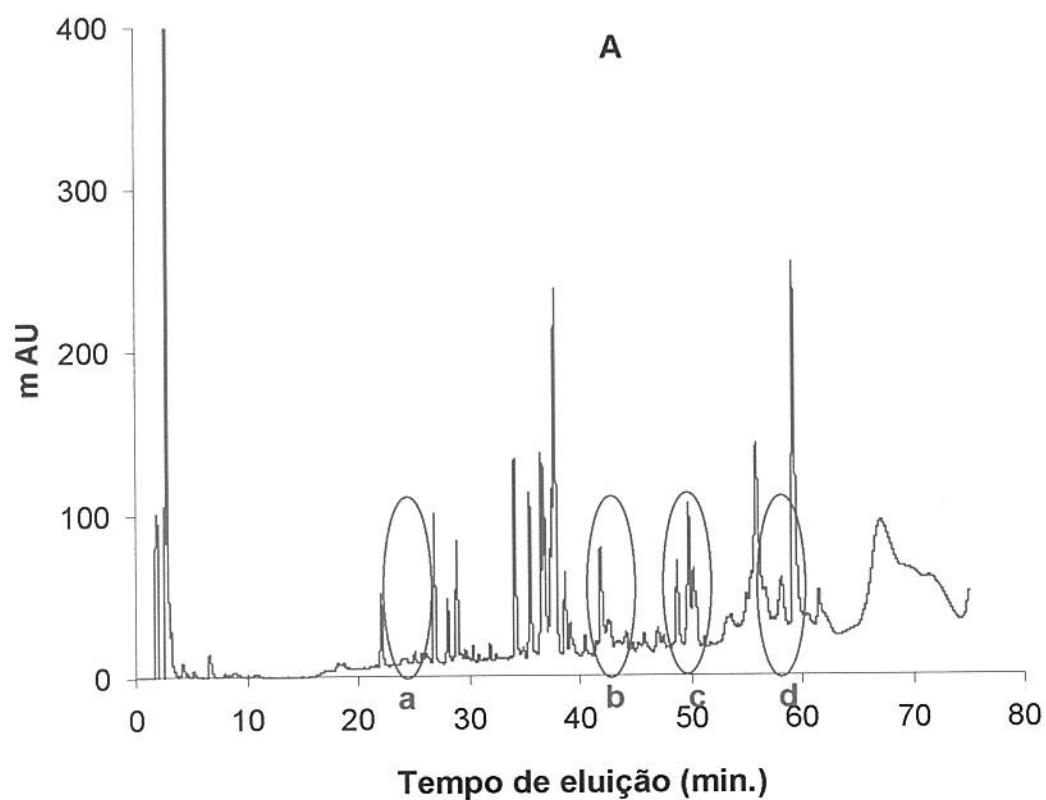


surtem após tratamento com DTT, ao contrário do que foi evidenciado na região **c**, que praticamente desaparece.

Para justificar esses resultados, pode-se atribuir esse fato à ação do DDT que, rompeu a ligação dissulfídica entre os dois peptídios (61-70 e 149-162), eluídos em 41,81 minutos, com massa molecular de 2907,38 Da (Tabela 1), dividindo-os em duas frações. Estas foram identificadas nas regiões **a** e **c**, respectivamente eluídos em 24,64min e 48,45 min., justificando-se o maior número de picos após utilização do DTT (Figura 5B).

Na verdade, apenas a região **a** pode ser identificada no espectrômetro como pico único (eluído em 24,64 min.), com massa mensurada de 1249,90 (fr 61-70) da sequência da  $\beta$ -Lg; e a região **c** registrada com um dublete com massas 2030,24 e 1658,99; somente o primeiro destes pode ser identificado (fr 149-162) da  $\beta$ -Lg. Finalmente a região **d** (Figura 5B) registrada como um triplete com massas mensuradas em 5203,76 (sem identificação) e 2804,73 (fr 102-124) e 3547,28 (fr 41-70) da  $\beta$ -Lg. Por meio da metodologia utilizada, foi possível identificar o peptídio contendo ligações S-S no hidrolisado trípico do WPI, identificados na região **b**. Durante 85 minutos de avaliação, foram eluídos 41 peptídios oriundos da hidrólise enzimática com tripsina, do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI). Destes, 24 fragmentos foram identificados como pertencendo à estrutura primária da  $\beta$ -Lg e apenas 4 deles como pertencentes à  $\alpha$ -La.





**Figura 5** Espectros de massa do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) após hidrólise de 22h com tripsina, hidrolisado total sem DTT (A) e com DTT (B).

**Tabela 1** Identificação dos peptídeos de isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) hidrolisado com tripsina.

| N.  | Fragmento     | Seqüência Aminoacídica**   | Massa Mensurada (g/mol) | Proteína Referência | Tempo de eluição (min.) |
|-----|---------------|----------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| 1   | 71-75         | IIAEK                      | 572,60                  | $\beta$ -Lg         | 22,11                   |
| 2   |               |                            | 596,30                  | -                   | 24,10                   |
| 3a  | ▶61-70        | WENDOCAOKK                 | 1249,90                 | $\beta$ -Lg         | 24,64                   |
| 4   | 70-75         | KIIAEK                     | 700,70                  | $\beta$ -Lg         | 26,70                   |
| 5   | 84-91         | IDALNENK                   | 915,80                  | $\beta$ -Lg         | 26,89                   |
| 6   | 71-77         | IIAEKTK                    | 802,70                  | $\beta$ -Lg         | 26,86                   |
| 7   | 78-83         |                            | 687,809                 | -                   | 26,89                   |
| 8   | 1-5           | EQLTK                      | 616,70                  | $\alpha$ -La        | 26,89                   |
| 9   |               |                            | 567,50                  | -                   | 28,10                   |
| 10  | 9-14          | GLDIQK                     | 672,80                  | $\beta$ -Lg         | 28,93                   |
| 11  | 125-135       | TPEVDDEALEK                | 1245,14                 | $\beta$ -Lg         | 30,10                   |
| 12  | 109-114       | ALCSEK                     | 647,70                  | $\alpha$ -La        | 30,10                   |
| 13  |               |                            | 827,09                  | -                   | 30,20                   |
| 14  | 1-8           | LIVTQTMK                   | 933,14                  | $\beta$ -Lg         | 34,14                   |
| 15  |               |                            | 706,70                  | -                   | 34,14                   |
| 16  |               |                            | 607,70                  | -                   | 34,14                   |
| 17  | 142-148       | ALPMHIR                    | 836,44                  | $\beta$ -Lg         | 35,46                   |
| 18  | 6-10          | CEVFR                      | 652,64                  | $\alpha$ -La        | 35,46                   |
| 19  |               |                            | 555,50                  | -                   | 35,46                   |
| 20  | 92-101        | VLVLDTDYKK                 | 1193,39                 | $\beta$ -Lg         | 36,49                   |
| 21  |               |                            | 695,60                  | -                   | 36,50                   |
| 22  | 78-83         | IPAVFK                     | 673,70                  | $\beta$ -Lg         | 37,54                   |
| 23  | 125-138       | TPEVNNEALEKFDK             | 1635,89                 | $\beta$ -Lg         | 37,77                   |
| 24  | 76-83         | KIPAVFK                    | 902,90                  | $\beta$ -Lg         | 37,77                   |
| 25  | 92-100        | VLVLDTDYK                  | 1065,14                 | $\beta$ -Lg         | 38,65                   |
| 26  |               |                            | 680,60                  | -                   | 40,10                   |
| 27b | 61-70*149-162 | WENDECAQK*LSFDPTQLEEQCHI   | 2907,38                 |                     | 41,81                   |
| 28  | 11-16         | ELKDLK                     | 774,80                  | $\alpha$ -La        | 41,81                   |
| 29  |               |                            | 782,90                  | -                   | 42,10                   |
| 30  |               |                            | 1364,69                 | -                   | 47,10                   |
| 31c | 149-162 ◀     | LSFNPTQLEEQCHI             | 1658,99                 | $\beta$ -Lg         | 48,75                   |
| 32  |               |                            | 2030,24                 | -                   | 48,75                   |
| 33  | 41-60         | VYVEELKPTPEGLDLEILLQK      | 2314,28                 | $\beta$ -Lg         | 49,84                   |
| 34  | 102-124       | YLLFCMEN...LACQCLVR        | 2647,18                 | $\beta$ -Lg         | 54,65                   |
| 35  | 41-70         | VYVEELKP...NGECAQKK        | 3488,98                 | $\beta$ -Lg         | 54,65                   |
| 36d | 41-70         | VYVEELKP...NDQCAQKK        | 3547,28                 | $\beta$ -Lg         | 55,01                   |
| 37  | 101-124       | KYLLFCME...LVCQCLVR        | 2804,73                 | $\beta$ -Lg         | 55,01                   |
| 38  |               |                            | 5203,76                 | -                   | 55,84                   |
| 39  | 41-69         | VYVEELKP...ENDQCAQK        | 3418,56                 | $\beta$ -Lg         | 55,99                   |
| 40  | 102-124       | YLLFCMEN...LVCQCLVR        | 2676,33                 | $\beta$ -Lg         | 56,81                   |
| 41  | 15-40         | VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR | 2708,73                 | $\beta$ -Lg         | 59,32                   |

\*peptídeos contendo dois fragmentos unidos por ligação dissulfeto.

\*\*Nomenclatura dos aminoácidos (Apêndice A).

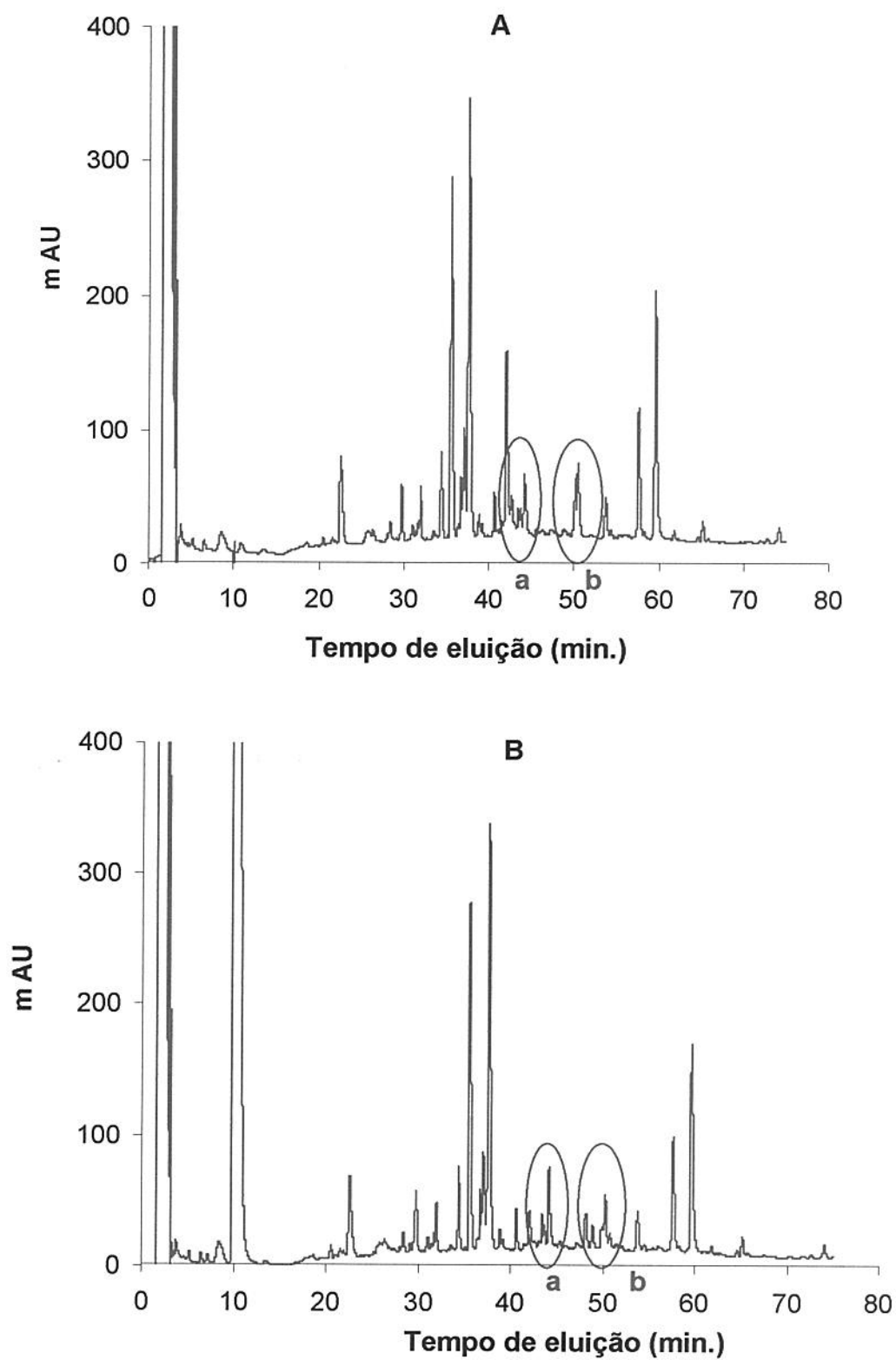
a,b,c,d regiões modificadas após reação com ditioneitol (DTT).

Os espectros de massa da fração D do WPI, separada por FPLC, estão ilustradas na Figura 6 e os resultados da análise na Tabela 2.

**Tabela 2** Resultados da espectrometria de massa da amostra de isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), fração D, com e sem adição de ditioneitol (DTT).

| Pico de eluição | Fragmento              | Tempo de eluição (min.) | Massa Mensurada (g/mol) | Proteína referência |
|-----------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| 1               | 71-75                  | 22,54                   | 572,60                  | $\beta$ -Lg         |
| 2               | 139-141                | 24,58                   | 348,50                  | $\beta$ -Lg         |
| 3               | 11-13                  | 27,10                   | 392,60                  | $\beta$ -Lg         |
| 4               | 84-91                  | 27,10                   | 916,19                  | $\beta$ -Lg         |
| 5               | 115-122                | 27,20                   | 1044,71                 | $\alpha$ -Lg        |
| 6               | 142-148                | 29,74                   | 852,89                  | $\beta$ -Lg         |
| 7               | 142-148                | 31,94                   | 836,14                  | $\beta$ -Lg         |
| 8               | 95-98                  | 33,76                   | 452,60                  | $\alpha$ -La        |
| 9               | 1-8                    | 34,35                   | 932,9                   | $\beta$ -Lg         |
| 10              | 142-148                | 35,48                   | 836,84                  | $\beta$ -Lg         |
| 11              | 92-101                 | 36,10                   | 1193,39                 | $\beta$ -Lg         |
| 12              | 78-83                  | 37,02                   | 696,00                  | $\beta$ -Lg         |
| 13              | 76-83                  | 37,57                   | 903,14                  | $\beta$ -Lg         |
| 14              | 92-100                 | 38,10                   | 1065,14                 | $\beta$ -Lg         |
| 15              | 84-101                 | 41,43                   | 2092,38                 | $\beta$ -Lg         |
| 16              | 80-98                  | 41,43                   | 2220,63                 | $\beta$ -Lg         |
| 17              | <b>61-70*149-162</b>   | 41,90                   | 2850,33                 |                     |
| 18              | 84-101                 | 41,90                   | 2092,68                 | $\beta$ -Lg         |
| 19              | 11-16                  | 41,90                   | 774,80                  | $\alpha$ -La        |
| 20 a            | <b>61-69*149-162</b>   | 42,05                   | 2721,48                 |                     |
| 21              | <b>61-70*149-162</b>   | 42,05                   | 2851,68                 |                     |
| 22              | 76-91                  | 43,10                   | 1801,53                 | $\beta$ -Lg         |
| 23              | 149-162 ←              | 44,17                   | 1658,84                 | $\beta$ -Lg         |
| 24              | 61-75                  | 44,17                   | 1739,24                 | $\beta$ -Lg         |
| 25              | 76-91                  | 48,22                   | 1808,99                 | $\beta$ -Lg         |
| 26              | 61-75                  | 48,22                   | 1717,39                 | $\beta$ -Lg         |
| 27              | 84-101                 | 49,10                   | 2030,09                 | $\beta$ -Lg         |
| 28              | 41-60                  | 50,30                   | 2314,23                 | $\beta$ -Lg         |
| 29b             | <b>149-162*149-162</b> | 50,47                   | 3316,53                 |                     |
| 30              | 102-124                | 53,74                   | 2756,80                 | $\beta$ -Lg         |
| 31              | 99-122                 | 53,74                   | 2869,60                 | $\alpha$ -La        |
| 32              | 15-40                  | 57,59                   | 2724,63                 | $\alpha$ -La        |
| 33              | 15-40                  | 59,57                   | 2708,73                 | $\alpha$ -La        |

\* ligações dissulfeto (S-S), segundo MORGAN et al. (1997).



**Figura 6** Espectrometria de massa do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) após hidrólise de 22h com tripsina, fração D, sem DTT (A) e com DTT(B).

Dos 33 picos eluídos, todos foram identificados. A maioria foi identificada com peptídios de massa molecular e sequência encontrada na  $\beta$ -Lg. Duas regiões diferentes foram observadas quando comparadas à fração D, sem DTT (A) e com DTT (B), denominadas **a** e **b**, registrando picos de pesos moleculares de 2851,68; 2721,48 e 3316,53, respectivamente eluídos em 42,05 e 50,47 min., observando-se um número maior de picos após tratamento com DTT (Figura 6B).

A  $\beta$ -lactoglobulina é a proteína mais abundante, representando aproximadamente 50% do total das proteínas do soro de leite e 12% do total das proteínas do leite (FOX e McSWEENEY, 1998). A  $\beta$ -lactoglobulina é uma proteína globular, com estrutura primária de 162 resíduos de aminoácidos pI 5,2 e peso molecular de 18,4 kDa. O monômero da  $\beta$ -lactoglobulina tem uma sulfidril livre e duas pontes dissulfeto (NAKAI e MODLER, 1996). É uma proteína rica em aminoácidos sulfurados, o que lhe garante alto valor nutritivo (FOX e McSWEENEY, 1998).

Dos cinco resíduos de cisteína, quatro estão envolvidos em duas ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteína (106-119) e (66-160), que contribuem para a estrutura terciária da proteína. O resíduo de cisteína 121 é responsável pelo grupo tiol livre, que normalmente está oculto na forma dimérica, mas apresenta um aumento na reatividade em meios com pH acima de 6,5. Isso facilita as interações tiol-dissulfeto que contribuem com a formação de agregados covalentes, originados após o tratamento térmico (KINSELLA e WHITEHEAD, 1990; SAWYER et al., 2002). Existem variantes genéticas desta proteína sendo as mais comuns as variantes A e B (WONG et al., 1996). Diferem nos resíduos 64-aspartato e 118-valina na  $\beta$ -lactoglobulina A, ocupados, respectivamente, pela glicina e pela alanina na  $\beta$ -lactoglobulina B (TORRES, 2005).

Dos espectros de massa da amostra da  $\beta$ -Lg hidrolisada pela tripsina com ou sem tratamento com DTT, 34 picos foram eluídos e identificados com o banco de dados do Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica (INRA), Rennes–França. Os dados encontrados no presente estudo foram comparados com os resultados descritos por MORGAN et al. (1997) e POULIOT et al. (2000).

Na Tabela 3, estão mostrados os peptídios identificados, classificados quanto ao fragmento, sequência aminoacídica, massa mensurada (g/mol) e tempo de eluição (min.).

**Tabela 3** Identificação dos peptídios de  $\beta$ -lactoglobulina hidrolisada com tripsina.

| N               | Fragmento                    | Seqüência aminoacídica**               | Massa Mensurada (g/mol) | Tempo de eluição (min.) |
|-----------------|------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1               | 71-75 <sup>1,2</sup>         | IIAEK                                  | 572,60                  | 22,13                   |
| 2               | 70-75 <sup>1</sup>           | KIIAEK                                 | 700,70                  | 22,51                   |
| 3 <sup>a</sup>  | 61-70                        | WENGECQKK                              | 1192,94                 | 24,22                   |
| 4               | 84-91 <sup>1,2</sup>         | IDALNENK                               | 915,99                  | 26,95                   |
| 5               | 9-14 <sup>1</sup>            | GLDIQK                                 | 672,80                  | 28,96                   |
| 6               | 142-148 <sup>1</sup>         | ALPMHIR                                | 826,70                  | 31,99                   |
| 7               | 1-8 <sup>1,2</sup>           | LIVTQTMK                               | 933,14                  | 34,16                   |
| 8               | 142-148 <sup>1,2</sup>       | ALPMHIR                                | 836,84                  | 35,39                   |
| 9               | 92-101 <sup>1</sup>          | VLVLDTDYKK                             | 1193,54                 | 35,50                   |
| 10              | 15-20 <sup>1</sup>           |                                        | 696,6                   | 36,89                   |
| 11              | 125-138 <sup>1</sup>         | TPEVNNEALEKFDK                         | 1635,44                 | 36,90                   |
| 12              | 78-83 <sup>1</sup>           | IPAVFK                                 | 674,00                  | 37,10                   |
| 13              | 76-83 <sup>1</sup>           | TKIPAVFK                               | 903,14                  | 37,10                   |
| 14              | 125-138 <sup>1</sup>         | TPEVNNEALEKFDK                         | 1636,04                 | 37,81                   |
| 15              | 92-100 <sup>1</sup>          | VLVLDTDYK                              | 1065,74                 | 38,67                   |
| 16              | 84-100 <sup>1</sup>          | DALNENK...VLVLDTDYKK                   | 2092,08                 | 41,10                   |
| 17 <sup>b</sup> | 61-70*142-162 <sup>1,2</sup> | WENGECQKK*LSFDPTQLEEQCHI               | 2850,18                 | 41,88                   |
| 18              | 76-91                        | TKIPAVFKIDALNENK                       | 1801,23                 | 43,93                   |
| 19              | 78-91                        | IPAVFKIDALNENK                         | 1572,14                 | 44,10                   |
| 20              | 6-16                         | CEVFRELKDL                             | 1364,54                 | 44,20                   |
| 21 <sup>c</sup> | 149-162                      | LSFNPTQLEEQCHI                         | 1658,99                 | 48,70                   |
| 22              | 41-60 <sup>1</sup>           | VYVEELKPTPEGLDLEILLQK                  | 2314,53                 | 48,81                   |
| 23              | 149-162*149-162 <sup>1</sup> | LSFDPTQLEEQCHI*LSFDPTQLEEQCHI          | 3317,43                 | 50,24                   |
| 24              | 61-69*149-142 <sup>1,2</sup> | WENGECQK*LSFDPTQLEEQCHI                | 2776,38                 | 52,60                   |
| 25 <sup>d</sup> | 41-70                        | VYVEELKP...NGECAQKK                    | 3490,98                 | 53,55                   |
| 26              | 102-124*149-162 <sup>1</sup> | YLLFCMENSAEPEQSLACQCLVR*LSFDPTQLEEQCHI | 4303,87                 | 53,63                   |
| 27              | 17-62                        | GYGGVSLPE...INNKIWCK                   | 5146,87                 | 54,10                   |
| 28              | 102-124                      | YLLFCMEN...LACQCLVR                    | 2648,88                 | 54,52                   |
| 29              | 41-70                        | VYVEELKP...NGECAQKK                    | 3489,63                 | 54,52                   |
| 30              | 17-62                        | GYGGVSLPE...INNKIWCK                   | 5146,87                 | 55,29                   |
| 31 <sup>d</sup> | 149-162*149-162 <sup>1</sup> | LSFDPTQLEEQCHI*LSFDPTQLEEQCHI          | 3316,53                 | 56,03                   |
| 32              | 14-58                        | DLKGYGGVS...GLFQINN                    | 5018,02                 | 56,15                   |
| 33              | 15-40 <sup>1</sup>           | VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR             | 2709,33                 | 57,97                   |
| 34              | 15-40 <sup>1</sup>           | VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR             | 2708,73                 | 59,26                   |

\*peptídios contendo dois fragmentos unidos por ligação dissulfeto.

\*\*Nomenclatura dos aminoácidos – (Apêndice A).

MORGAN et al. (1997)<sup>1</sup>, POULIOT et al., (2002)<sup>2</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> picos modificados após reação com ditioneitol (DTT).

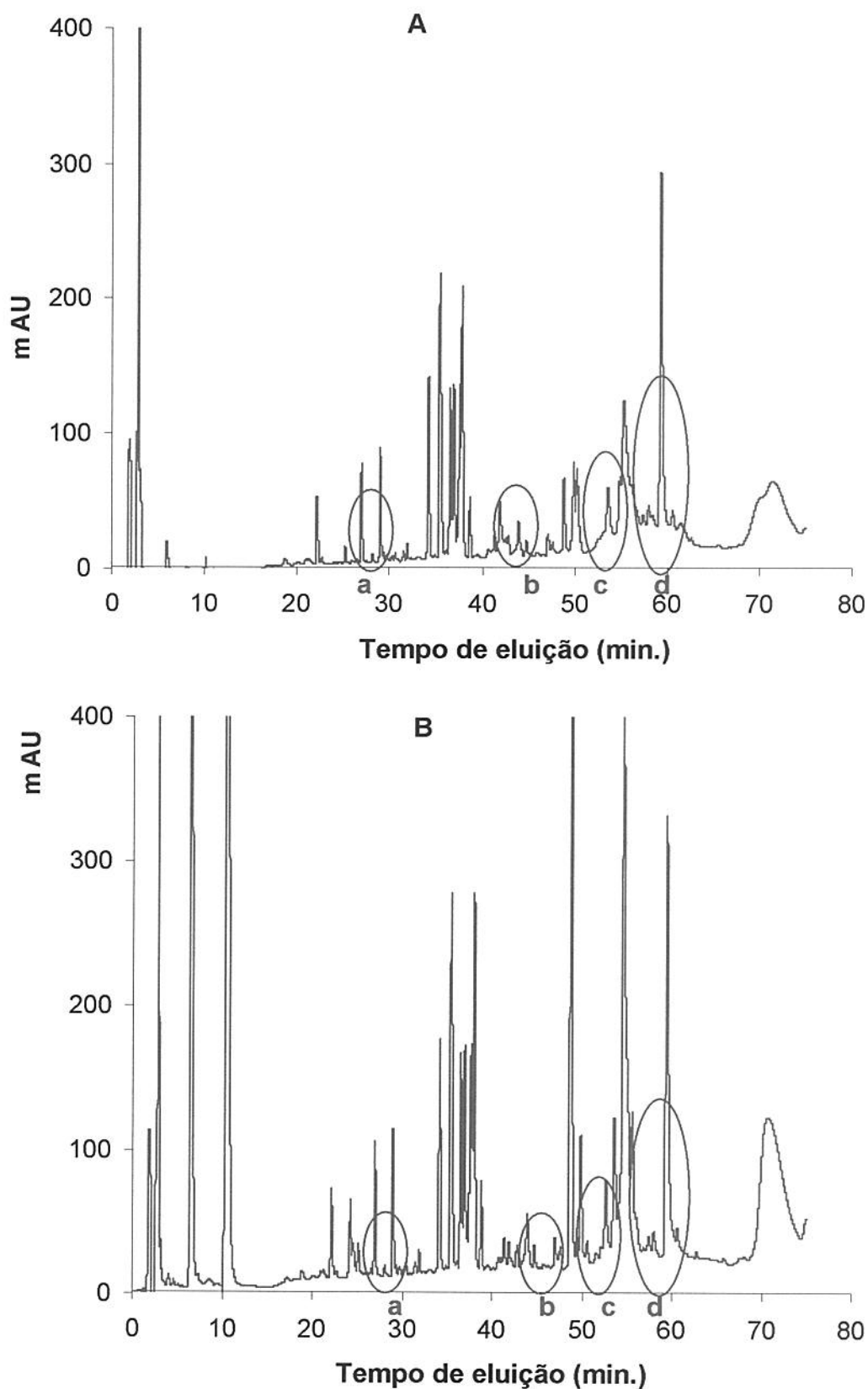
Em relação ao trabalho descrito por MORGAN (et al., 1997), que identificaram os peptídios de  $\beta$ -Lg aquecida com lactose a 60°C por 24 horas, 29 picos de eluição foram relatados; destes 22 fragmentos<sup>1</sup> foram idênticos aos encontrados nesse trabalho.

POULIOT et al.(2000) determinaram a presença de 23 peptídios de  $\beta$ -lactoglobulina e suas características físico-químicas dos peptídios com concentração superior a 2,5%, totalizando 12 frações<sup>2</sup>. Comparando esses dados com os obtidos nesse trabalho, 7 peptídios 1-8; 15-20, 71-75, 84-91, 142-148 foram semelhantes, incluindo as ligações peptídicas entre os resíduos 61-70\*142-162 e 61-69\*149-142.

Cinco grupos de peptídios contendo dois fragmentos unidos por ligações dissulfídicas foram identificados. Em comum, estes apresentavam no segundo fragmento o resíduo de aminoácido composto inicialmente por leucina (L).

Comparando os espectros de massa da  $\beta$ -Lg hidrolisada, quatro regiões foram evidenciadas com maior número de picos após tratamento com DTT (Figura 7B). O primeiro pico (eluído em 24,22 min.,) apresentou um fragmento de 61-70 e com massa mensurada de 1192,94. Na região **b**, o fragmento 142-162 foi eluído em 41,88min, com massa molecular de 2850,18 e correspondeu ao fragmento da  $\beta$ -Lg unido por uma ligação dissulfeto (61-70\*142-162). E o último pico **d** foi o que apresentou mais peptídios unidos por ligações dissulfeto, correspondentes aos fragmentos 149-162\*149-162, 61-70\*149-162 e 102-124\*149-162 da  $\beta$ -Lg.

Comparando-se os dados obtidos na Tabela 1, referentes ao WPI hidrolisado com os dados apresentados na Tabela 3, relacionados à  $\beta$ -Lg hidrolisada, observou-se que o primeiro pico de eluição, correspondente à fração 71-75, e o último pico, composto pelos resíduos 15-40, estiveram presentes nas amostras analisadas, com tempos de eluição semelhantes, 22,1 e 59,3 min., respectivamente. No entanto, diferenças significativas puderam ser observadas quanto ao número de picos de eluição, tamanho dos peptídios produzidos, presença de fragmentos de  $\alpha$ -La, entre outros (Tabela 4).



**Figura 7** Espectrometria de massa da  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) após hidrólise com tripsina, sem DTT(A) e com DTT(B).



**Tabela 4** Comparação das características físico-químicas dos peptídios obtidos por hidrólise enzimática com tripsina entre o WPI (isolado protéico de soro de leite bovino) e  $\beta$ -Lg ( $\beta$ -Lactalbumina bovina).

| Características Físico-químicas                 | Hidrolisados com tripsina |                |
|-------------------------------------------------|---------------------------|----------------|
|                                                 | WPI                       | B-Lg           |
| Número de picos de eluição                      | 41                        | 34             |
| Massa mensurada (g/mol)                         | 555,5 – 5203,8            | 572,6 – 5146,9 |
| Tamanho dos peptídios (resíduos de aminoácidos) | 5 a 26                    | 5 a 37         |
| Picos identificados com banco de dados          | 30                        | 34             |
| Fragmentos de $\alpha$ -lactalbumina            | 4                         |                |
| Fragmentos unidos por ligações peptídicas       | 1                         | 5              |

O perfil do hidrolisado de WPI caracterizou-se pela presença de várias bandas correspondentes à  $\beta$ -Lg e, em menor proporção, à  $\alpha$ -La, de outras frações de alto peso molecular que não foram hidrolisadas, além de peptídios de peso molecular intermediário, não identificados no banco de dados, podendo esses terem sido originados de outras frações presentes no soro de leite, como BSA e Ig, típico de um produto complexo de baixo grau de hidrólise.

Outra diferença expressiva observada está relacionada com o número de fragmentos unidos por ligação dissulfídica, determinadas pela massa mensurada (g/mol). Na fração de  $\beta$ -Lg foram identificadas 5 ligações, enquanto nos hidrolisados de WPI apenas 1, mostrando que esse é mais reativo ao DTT. Os peptídios oriundos do WPI eram de menores tamanhos, variando de 5 a 26 resíduos de aminoácidos, enquanto que o tamanho nos peptídios da  $\beta$ -Lg eram formados de até 37 aminoácidos. Não foram identificados aminoácidos livres. Portanto, pode-se afirmar que o WPI sofreu hidrólise mais facilmente pela tripsina que a  $\beta$ -Lg.

Esses dados estão de acordo com TORRES (2005), que produziu hidrolizados de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg a partir da reação com tripsina e observou por meio de estudo cromatográfico que a  $\alpha$ -lactalbumina é facilmente degradada pela tripsina, aparecendo apenas em quantidade muito baixa em hidrolisados com grau de hidrólise superior a 1%.

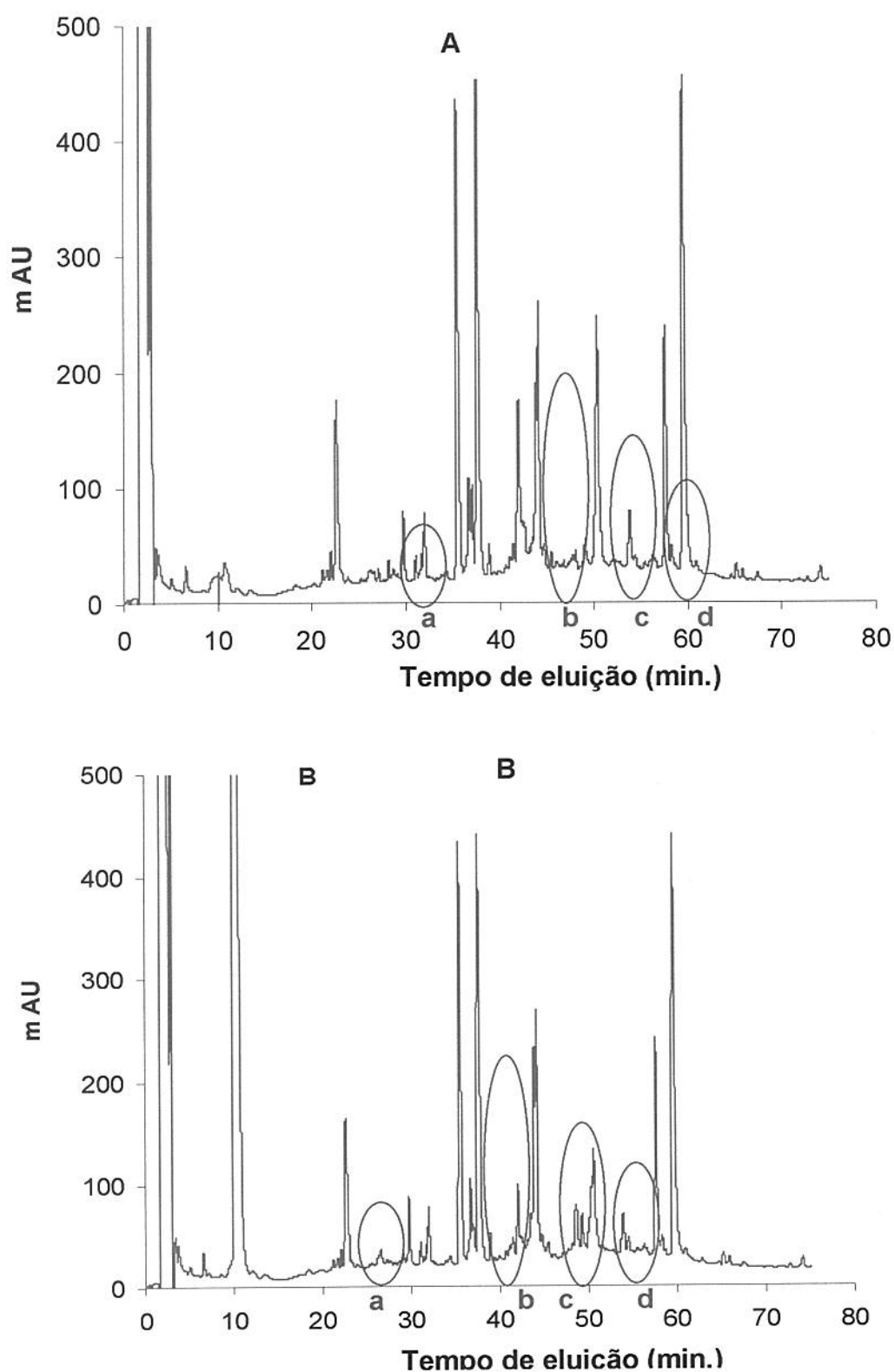
A hidrólise da  $\beta$ -lactoglobulina é, relativamente, mais lenta, pois o hidrolisado com grau de hidrólise 4,2% continha ainda 30% de  $\beta$ -lactoglobulina não hidrolizada.

Os picos de eluição da fração D obtida a partir da  $\beta$ -Lg hidrolizada e separada por FPLC (Figura3); estão mostrados na Figura 8 e Tabela 5. Foram eluídos 23 picos, com massa mensurada entre 572,60 e 4304,32 g/mol.

**Tabela 5** Identificação dos peptídios da fração D da  $\beta$ -Lactoglobulina separada por FPLC.

| Picos de Eluição | Fragmento                    | Massa Mensurada (g/mol) | Tempo de eluição (min.) |
|------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1                | 71-75                        | 572,60                  | 22,10                   |
| 2                | 84-91                        | 915,00                  | 24,10                   |
| 3                |                              | 852,89                  | 27,71                   |
| 4a               | 115-123                      | 1044,74                 | 28,10                   |
| 5                |                              | 852,89                  | 29,71                   |
| 6                |                              | 827,09                  | 31,94                   |
| 7                | 142-148                      | 836,84                  | 35,39                   |
| 8                | 61-70                        | 1193,09                 | 36,65                   |
| 9                | 76-83                        | 902,09                  | 37,49                   |
| 10               | 92-100                       | 1065,44                 | 38,86                   |
| 11               | 84-101                       | 2091,63                 | 41,10                   |
| 12               | 61-70*149-162 <sup>1</sup>   | 2850,03                 | 41,95                   |
| 13b              | 76-91                        | 1801,48                 | 44,01                   |
| 14               | 149-162                      | 1658,84                 | 44,13                   |
| 15c              | 76-91                        | 1809,14                 | 48,61                   |
| 16               | 109-123                      | 1776,74                 | 49,10                   |
| 17               | 84-101                       | 2030,09                 | 49,10                   |
| 18               | 41-60                        | 2314,53                 | 49,10                   |
| 19               | 76-91                        | 1825,05                 | 49,10                   |
| 20               | 149-162*149-162 <sup>1</sup> | 3316,83                 | 50,56                   |
| 21d              | 102-124*149-162 <sup>1</sup> | 4304,32                 | 53,77                   |
| 22               | 61-69*149-162 <sup>1</sup>   | 2724,63                 | 57,52                   |
| 23               | 15-40                        | 2708,73                 | 59,47                   |

\* ligações dissulfeto (S-S), segundo MORGAN et al. (1997)<sup>1</sup>



**Figura 8** Espectrometria de massa da  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) após hidrólise de 22h com tripsina, fração D, (A) sem DTT e (B) com DTT.

## 4 CONCLUSÃO

As técnicas cromatográficas em colunas de troca iônica (FPLC), de fase reversa (RP-HPLC) e espectrometria de massa, quando aplicadas seqüencialmente, revelaram-se eficazes no fracionamento, identificação e caracterização de peptídios oriundos da hidrólise enzimática.

Foi possível separar dos hidrolisados do WPI e da  $\beta$ -Lg uma fração (fração D), hidrofóbica e enriquecida com peptídios contendo pontes dissulfeto em suas estruturas. Comparando-se os espectros de massa antes e após tratamento com ditioneitol (DTT), foi possível identificar na fração D (do WPI e da  $\beta$ -Lg) elevado número de peptídios que foram caracterizados quanto ao fragmento da estrutura primária ( $\beta$ -Lg ou  $\alpha$ -La), massa molecular e presença de ligações dissulfeto.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures. In: Freeney RE, Whitaker JR (eds) **Protein tailoring for food and medical uses**. Marcel Dekker, New York, pp 97-112, 1986.

BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Food protein as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**. v.16, n.3, p.204-209, 1993.

BOUNOUS, G.; GERVAIS, F.; AMER, V.; BATIST, G.; GOLD, P. The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and the diseases of aging. **Clinical and Investigative Medicine**, v12, p.343-349, 1989.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of unde-natured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, v.14, p.296-309, 1991.

BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**, n.1, p.21-28, 1996.

CHABANET, C. Prediction of peptide retention time in reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.599, n.1-2, p.211-225, 1992.

COSTA, E.L. Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de leite com atividade anti-hipertensiva. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004, p.115.

DIAS, N.F.G.P.; SGARBIERI, V.C. JACOBUCI, H.B.; RANGEL, H.A.; TANIKAWA, C. Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in mouse. **Lait**, v.86, p.11-14, 2006.

ETZEL, M.R. The Emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. Manufacture and use of dairy protein fractions. **American Society for Nutritional Sciences**, v134, p. 996S-1002S, 2004.

FARRELL, H.M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G.T.; BROWN, E.M.; BUTLER, J.E. Nomenclatura of the Proteins of Cow's Milk – Sixth Revision. **Journal Dairy Science**, v.87, p.1641-1674, 2004.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk Proteins. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, Cap.4, p.147-238, 1998.

GIRARDET, J.M.; PAQUET, D.; LINDEN, G. Effects of chromatography parameters on the fractionation of whey proteins by anion exchange FLPC. **Milchwissenschaft**, v.44, n.11, p.692-696, 1989.

KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: Chemical, physical, and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.33, p.343-437, 1990.

KORHONEN, H.; PHILANTO-LEPPÄLÄ, A. Milk protein-derived bioactive peptides – novel opportunities for health promotion. **Bulletin of the International DairyFederation**, v.363, p.17-26, 2001.

LEGAY, C.; POPINEAU, Y.; BÉROT, S.; GUÉGUEN, J. Comparative study of enzymatic hydrolysis of  $\alpha/\beta$ - and  $\gamma$ -gliadins. **Narung**, v.41, n.4, p.201-207, 1997.

LÉONIL J.; GAGNAIRE, V.; MOLLÉ, D.; PEZENNEC, S.; BOUHALLAB, S. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. **Journal of Chromatography A**, v.881, p.1-21, 2000.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey proteins. **Alternative Medicine Review**, v.9, n.2, p.136-156, 2004.

MCINTOSH, G.H.; REGESSTER, G.D.; LELUE, P.J.; ROYLE, P.L.; SMITHERS, G.W. Dairy proteins protect against dimethyldiazine-induced intestinal cancers in rat. **Journal of Nutrition**, v.125, p. 809-816, 1995.

MEZZARROBA, L.F.H. "Ação da  $\alpha$ -lactalbumina e seus hidrolisados na inibição da úlcera gástrica induzida por diferentes agentes". Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005, p.131.

MEZZARROBA, L.F.H.; CARVALHO, J.E.; PONEZI, A.N.; ANTONIO, M.A.; MONTEIRO, M.M.; POSSENTI, A.; SGARBIERI, V.C. Antiulcerative properties of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. **International Dairy Journal**, v.16, p.1005-1012, 2006.

MORGAN, F.; LÉONIL, J.; MOLLÉ, D.; BOUHALLAB, S. Nonenzymatic lactosylation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin under mild heat treatment leads to structural heterogeneity of the glycoforms. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.236, p. 413-417, 1997.

NAKAI, S.; MODLER, H.W. **Food Proteins, Properties and Characterization**. Wiley-VCH, 1996, 544 pg.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends Food Science and Technology**, Cambridge, v.11, p.347-356, 2001.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S.F.; HEUREUX, J.L. Effect of peptides distribution on the fractionation of whey protein hydrolysates by nanofiltration membranes. **Lait**, v.80, p.113-122, 2000.

ROSANELI, C.F. BIGHETHI, A.E.; ANTONIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Protective effect of bovine milk whey protein concentrate on the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin. **Journal of Medicinal Food**, v.7, n.3, p.309-314, 2004.

ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI V.C. Efficacy of a whey concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, v.5, n.4, p.221-228, 2002.

SAWYER, L.; BARLOW, P. N.; BOLAND, M. J.; CREAMER, L. K.; DENTON, H.; EDWARDS, P. J. B.; HOLT, C; JAMESON, G. B.; KONTOPIDIS, G.; NORRIS, G. E.; UHRÍNOVÁ, S.; WU, S. Milk protein structure – what can it tell the dairy industry? **International Dairy Journal**, v.12, n.4, p.299-310, 2002.

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

SGARBIERI, V.C. Propriedades Fisiológicas Funcionais das Proteínas de Soro de Leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, 2004.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p.43-56, 2005.

SILVESTRE, M.P.C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.60, p.263-271, 1997.

SMITHERS, G.W.; BALLARD, J.F.; COPELAND, A.D.;, DE SILVA, K.J.; DIONYSIUS, D.A.; FRANCIS, G.L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P.A.; MCINTOSH, G.H.; MITCHELL, I.R.; PEARCE, R.J.; REGESTER, G.O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1454-1459, 1996.

TORRES, D.P.M. Gelificação térmica de hidrolizados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino – comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos. Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos. Braga, 2005. 100p.

VAN DER VEN C.; GRUPPEN, H.; DE BONT, D.B.A.; VORAGEN, A.G.J. Reversed phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysates: relation between elution from reversed phase column and apparent molecular weight distribution. **International Dairy Journal**, v.11, p.83-92, 2001.

WONG, D.W.S.; CAMIRAND, W.M.; PAVLATH, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.8, p.807-844, 1996.



## Capítulo III

---

### CARACTERIZAÇÃO DE GÉIS MISTOS DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE BOVINO E GELATINA BOVINA



## CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE E GELATINA DE ORIGEM BOVINA

J.A. ROMAN, V. C. SGARBIERI

### RESUMO

Avaliou-se, comparativamente, a composição e algumas propriedades físico-químicas de um isolado protéico do soro de leite bovino (WPI), de uma gelatina bovina com 240 *bloom* (GB) e uma mistura das duas proteínas na proporção 60:40 WPI:GB. Não houve diferença estatística quanto ao teor de proteína do WPI e da mistura. Para a GB, encontrou-se 83% de proteína ( $p < 0,05$ ), inferior às duas proteínas isoladas. O perfil de aminoácidos do WPI atendeu perfeitamente ao padrão da FAO/WHO e a gelatina apresentou-se deficiente em relação a todos os aminoácidos essenciais, e completa ausência de triptofano, apresentando elevada concentração dos aminoácidos não essenciais arginina, prolina, glicina e alanina, superiores aos do WPI. O perfil de aminoácidos da mistura protéica foi significativamente melhor que o da gelatina, pois somente três dos 9 aminoácidos essenciais não atenderam às recomendações da FAO/WHO. A desnaturação térmica do WPI, determinada pela análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC), ocorreu em 75,4°C e da mistura a 75,7°C, ambas apresentando apenas um pico definido. Para a gelatina a desnaturação ocorreu a 36,1°C. A solubilidade do WPI, pH entre 2,5 a 7,5, em solução aquosa e 0,1M NaCl, foi elevada (87,4 a 97,5%), no que a gelatina apresentou solubilidade inferior (63%), sendo o valor mais baixo de 24%, em pH 6,5. A solubilidade da mistura foi intermediária, na faixa de 58 a 81%.

**Palavras-chave:** soro de leite, gelatina, caracterização, mistura protéica

## SUMMARY

Composition and some physico-chemical properties of a bovine whey protein isolate (WPI), a 240 bloom bovine gelatin (BG) and a mixture 60:40 respectively of the two proteins, were comparatively evaluated. There was no difference in the protein concentration of the WPI and the mixture of the two proteins. A lower protein concentration (83%) was found for BG ( $p < 0.05$ ). The WPI amino acid profile satisfied entirely the FAO/WHO standard while BG was deficient in all essential amino acids and contained no tryptophan but presented high concentrations of the nonessential amino acids arginine, proline, glycine and alanine which were higher than in WPI. The amino acid profile of the mixture was significantly better than that of gelatin since only three of the nine essential amino acids remained limiting. The thermal denaturation of WPI as determined by differential scanning calorimetry (DSC) occurred at 75.4°C and that of the mixture at 75.7°C, both presenting only one peak. BG denatured at 36.1°C. WPI solubility at pH between 2.5 – 7.5, 0.1M NaCl solution was high (87.4 to 95.5%). The gelatin presented lower solubility (63%) with a lowest value of 24% at pH 6.5. The mixture presented intermediate solubility values in the range of 58 to 81%.

**Key Words:** whey protein, gelatin, characterization, protein mixture

## 1 INTRODUÇÃO

A gelatina é amplamente utilizada na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos, sendo produzida em grande escala e a preços relativamente baixos, justificando assim o grande interesse em seu uso devido às suas propriedades multifuncionais: habilidade de formar géis estáveis e reversíveis (SEGTMAN e ISAKSSON, 2004).

A gelatina comercial é um produto protéico solúvel em água quente, obtida por meio de hidrólise parcial do colágeno com ácido ou álcali diluído respectivamente, designadas gelatinas tipo A e B (HAUG et al. 2004). Em virtude da variedade de fontes de colágeno e dos diferentes métodos de produção, as

gelatinas comerciais apresentam diferenças em suas propriedades físicas e químicas (BIGI et al. 2004). Elas podem variar em composição e na seqüência de aminoácidos das cadeias polipeptídicas, quanto ao ponto isoelétrico e massa molecular (NEMATİ et al. 2004).

A gelatina é uma proteína deficiente em todos os aminoácidos essenciais, principalmente em triptofano e cisteína, enquanto que as proteínas de soro de leite apresentam esses aminoácidos em abundância. Portanto, a combinação dessas duas fontes protéicas possibilita melhoria considerável no equilíbrio de aminoácidos essenciais, com significativa vantagem nutricional. Haverá também vantagem econômica na associação dessas duas proteínas, já que a gelatina é produzida em larga escala e a baixo custo, enquanto que as proteínas do soro de leite são de difícil recuperação tecnológica e de alto custo. A associação de propriedades funcionais fisiológicas da gelatina e das proteínas do soro de leite também se apresenta como um potencial a ser explorado.

As proteínas do soro de leite, além de suas excelentes propriedades nutritivas e fisiológicas, apresentam propriedades físico-químicas e funcionais muito apreciadas como ingredientes alimentícios, inclusive na produção de géis translúcidos e de elevada consistência (VEITH e REYNOLDS, 2004; CHATTERTON et al., 2006), também utilizadas em diferentes aplicações na tecnologia de alimentos (PÉREZ et al. 2006; TOSI et al. 2007). De modo geral, as preparações derivadas do leite podem apresentar-se como opções atrativas em dietoterapia, por conter diferentes fatores de crescimento e moduladores do metabolismo geral (MICHAELIDOU e STEIJNS, 2006).

Existe um grande interesse no comportamento de sistemas de géis mistos, devido à variedade de propriedades mecânicas e de textura, além da possibilidade de modificação dessas propriedades (WALKENSTRÖM e HERMANSSON, 1997).

O presente trabalho tem por objetivo o estudo comparativo da composição e de algumas propriedades físico-químicas de duas fontes protéicas de largo uso industrial (WPI e GB), isoladamente e da mistura WPI:GB (proporção 60:40 em base protéica).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL

Foi utilizado o isolado protéico de soro de leite, ALACEN 895 produzido por troca iônica e ultrafiltração, com reduzido teor de lactose e gordura, adquirido da NZMP®, New Zealand Milk Products, São Paulo, Brasil. A Gelatina bovina, tipo A, produzida por hidrólise ácida, lote PFL 196/04, foi gentilmente cedida pela empresa Gelita® (Gelita South America), Cotia-SP. Segundo dados do fabricante, foi caracterizada como de 240 *bloom*, viscosidade de 33-42 mPs, teor de proteína de 83%, umidade entre 8 e 13%, conteúdo de cinza inferior a 2,0%.

A proporção na mistura protéica utilizada (60:40) foi baseada no valor nutritivo de misturas entre WPI e hidrolisados de colágeno bovino (HCB), determinado por ZIEGLER (2006), em que através de ensaios biológicos com ratos Wistar recém desmamados, chegou-se a composição aminoacídica mais indicada, levando-se em consideração aspectos nutricionais e econômicos, tendo-se por base o perfil de aminoácidos essenciais proposto pela FAO/WHO (1990).

### MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 2.1 Determinação do perfil de aminoácidos

Para a determinação dos aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N em tubos de hidrólise, seladas à vácuo e mantidas a 110°C por 22 horas. Após a incubação, o ácido clorídrico foi evaporado e fez-se a recuperação dos aminoácidos livres em tampão citrato pH 2,2. Uma alíquota de 25µL foi injetada no analisador (Dionex Dx-300) para separação em coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina. Solução padrão de aminoácidos Pierce (Illinois, USA, lote: 03102467) foi utilizada para referência de cálculo de cada aminoácido.

O triptofano, que é destruído durante a hidrólise ácida, foi quantificado segundo o método descrito por SPIES (1967), após a hidrólise enzimática com pronase a 40°C por 24 horas, seguida de reação colorimétrica com dimetilamino benzaldeído (DAB) e nitrito de sódio na ausência de luz e posterior leitura em espectrofotômetro a 590nm. O teor de triptofano foi determinado a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas.

## 2.2 Determinação da composição centesimal

**Umidade, sólidos totais, cinza e proteínas:** Foram determinados de acordo com os procedimentos descritos no manual da AOAC (1990). As determinações foram feitas em quadruplicata. Os sólidos totais foram obtidos pela diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo de umidade por secagem em estufa a 105°C, até peso constante. A cinza foi determinada pela incineração da amostra em cadinhos de porcelana (30-40mm de diâmetro e 25-50mm de altura) em mufla a 550°C, até peso constante. Proteína bruta foi determinada pelo método semimicro-Kjeldahl, multiplicando-se o teor de nitrogênio (%N) pelo fator 6,38 para o WPI e 5,55 para a gelatina. Para a mistura, usou-se fator corrigido 6,02 calculado, tendo por base a %N e as proporções conhecidas das duas proteínas, na mistura.

**Carboidratos e lipídios totais.** Foram estimados por diferença, subtraindo-se de 100% a soma dos valores obtidos nas demais determinações.

## 2.3 Determinação de grupos sulfidrila livres (SH)

Foram determinados usando o reagente de Ellman (5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico), de acordo com BEVERIDGE et al. (1984), com pequenas modificações. Aproximadamente 90-150mg de amostra, WPI, gelatina ou mistura protéica, foram solubilizadas em 15mL de tampão Tris 0,086M, glicina 0,09M, EDTA 0,04M (pH 8,0), contendo ainda 8M de uréia. Estas preparações foram centrifugadas (centrífuga Sorval Wilmington, Telaware, US), 27.000g, 20 minutos, 4°C. Ao sobrenadante (4mL) foi adicionado 0,04mL do reagente de Ellman

(4mg/mL). A absorbância foi lida em 412nm ( $A_{412}$ ), após 10 min e 30 min da adição da mistura de reagente à amostra. As determinações foram feitas em triplicata, em presença de um branco isento de amostra. A quantidade expressa em  $\mu$ moles de sulfidrilas livres por grama de proteína foi calculada pela expressão descrita por BEVERIDGE et al. (1974):  $\mu\text{moles SH/g} = 73,53 \times A_{412} \times \text{fator de diluição/ concentração proteína (mg/mL)}$ .

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

O isolado protéico de soro de leite, a gelatina bovina e a mistura WPI:GB na proporção 60:40 foram dispersos em água destilada (20% p/v). Alíquotas foram colocadas em cápsulas de alumínio (50 $\mu$ L) hermeticamente seladas. Uma cápsula vazia foi usada como referência. As amostras foram aquecidas de 15 a 100°C, na velocidade de 5°C/minuto, conforme IBANOGLU (2005). A variação da entalpia ( $\Delta H$ ), temperatura de desnaturação ( $T_d$ ), início e pico da temperatura de desnaturação foram computadas com picos endotérmicos, determinados através de programa computacional em cada curva térmica, pelo equipamento Perkin-Elmer Pyris 7 DSC (*differential scanning calorimeter*), calibrado com solução padrão de indium. As análises foram realizadas em duplicata.

## 2.5 Solubilidade da mistura protéica em função do pH

A porcentagem de solubilidade protéica (%SP) da mistura 60:40%, de WPI e da gelatina bovina 240 bloom, foi analisada em água e solução 0,1M NaCl, verificando-se o efeito do pH (2,5 a 7,5), de acordo com o método descrito por MORR et al. (1985), com pequenas modificações. Suspendeu-se 0,5g de amostra em 40mL de água ou solução de 0,1M NaCl. Deixou-se em repouso por 30 minutos, para melhor solubilização da gelatina, ajustando-se o pH das soluções com NaOH ou HCl 0,1N. As suspensões foram mantidas sob agitação constante durante 60 minutos, monitorando-se o pH ao longo do período.



As dispersões foram transferidas para balões volumétricos de 50mL e em seguida submetidas à centrifugação (Sorval Wilmington, Telaware, US) sob 20.000g, 30 minutos, 4°C. Após a filtração em papel filtro (Whatman nº2), determinou-se o conteúdo de proteína solúvel no filtrado pelo método semimicro-Kjeldhal (A.O.A.C, 1990), usando-se os fatores descritos na determinação da composição centesimal. A porcentagem de proteína solúvel foi calculada pela relação: %SP = concentração de proteína no filtrado (mg/mL) x 50/ peso da amostra (mg) x conteúdo de proteína da amostra (%).

## 2.6 Análise estatística

Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey utilizando-se o programa *Statística: Basic statistics and Tables*, (STATSOFT, 1995).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal dos três concentrados protéicos estudados é apresentada na Tabela 1. O componente de maior concentração foi à proteína, variando entre 83 e 90,8% para as três amostras. Não houve diferença estatística quanto ao teor de proteína entre o WPI e a mistura, tendo sido estatisticamente inferior para a gelatina ( $p < 0,05$ ). Sólidos totais, umidade e cinza diferiram significativamente entre as três amostras analisadas.

Segundo informações do fabricante, o WPI contém ainda em sua composição (mg/100g amostra) 600mg sódio, 300mg potássio, 100mg cálcio e 70mg fósforo. Os teores de cinza e de proteína da gelatina são os mais baixos dos três concentrados e, de umidade, o mais elevado.

**Tabela 1** Composição centesimal do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina, mistura protéica WPI/gelatina na proporção 60:40%.

| Componentes    | WPI                    | Gelatina               | Mistura 60:40%         |
|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Sólidos totais | 95,5±0,34 <sup>a</sup> | 88,1±0,06 <sup>c</sup> | 92,6±0,11 <sup>b</sup> |
| Umidade        | 4,5±0,34 <sup>c</sup>  | 11,9±0,06 <sup>a</sup> | 7,4±0,10 <sup>b</sup>  |
| Proteínas      | 90,8±1,06 <sup>a</sup> | 83,1±0,56 <sup>b</sup> | 87,7±0,33 <sup>a</sup> |
| Cinza          | 1,8±0,07 <sup>a</sup>  | 0,7±0,03 <sup>c</sup>  | 1,3±0,01 <sup>b</sup>  |
| Diferença*     | 2,9                    | 4,4                    | 3,6                    |

\* Diferença = 100 – (proteína + cinza + umidade). Os resultados são médias de 4 determinações analíticas ± desvio padrão. Letras diferentes (linhas) indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na Tabela 2 encontram-se os teores de aminoácidos essenciais (g/100g de proteína) dos diferentes produtos protéicos e da mistura WPI:GB, comparados com os padrões da FAO/WHO (1990), para pré-escolares e adultos. Os aminoácidos não essenciais são apresentados na Figura 1.

A gelatina apresenta-se deficiente em oito dos nove aminoácidos, em relação ao padrão da FAO/WHO de aminoácidos essenciais para pré-escolares, não sendo detectado metionina, cisteína e triptofano. Contudo, ao considerar-se o perfil de aminoácidos essenciais recomendado para adultos, apenas a histidina permanece limitante na mistura. Pelo fato dos aminoácidos sulfurados e do triptofano serem essencialmente inexistentes na gelatina, o EAE para a gelatina é zero (0). Portanto, a gelatina é incapaz de promover crescimento em crianças e de manter o balanço nitrogenado em adultos.

O WPI apresenta excelente composição aminoacídica, atendendo todas as recomendações para os aminoácidos essenciais com base no padrão da FAO/WHO (1990) para crianças na faixa etária de 2,5 a 5,0 anos. Não somente seu valor biológico é superior, mas é uma proteína que contém, em elevadas proporções, aminoácidos sulfurados, os quais desempenham importantes funções antioxidantes (SINHA et al., 2007).

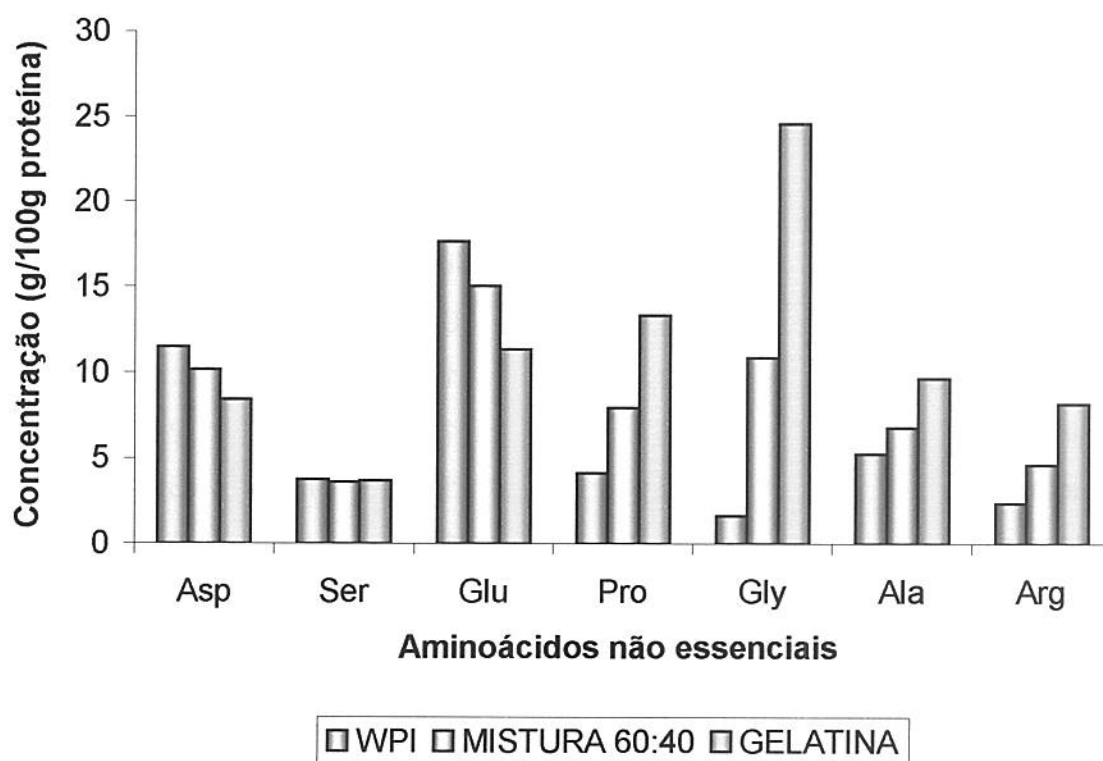
**Tabela 2** Composição de aminoácidos essenciais dos produtos: isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina, mistura 60:40 WPI/gelatina base protéica, comparada aos padrões de referência da FAO/WHO (1990).

| Aminoácidos<br>(g/100g de proteína) | Padrão                   | Padrão             | WPI  | Gelatina         | Mistura<br>60:40 |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------|------|------------------|------------------|
|                                     | FAO/WHO<br>Pré-escolares | FAO/WHO<br>Adultos |      |                  |                  |
| Treonina                            | 3,4                      | 0,9                | 4,7  | 1,9              | 3,6              |
| Metionina + Cistina                 | 2,5                      | 1,7                | 8,0  | *                | 3,6              |
| Valina                              | 3,5                      | 1,3                | 4,8  | 2,3 <sup>a</sup> | 3,6              |
| Leucina                             | 6,6                      | 1,9                | 12,8 | 3,1 <sup>a</sup> | 9,2              |
| Isoleucina                          | 2,8                      | 1,3                | 5,0  | 1,5 <sup>a</sup> | 3,6              |
| Fenilalanina + Tirosina             | 6,3                      | 1,9                | 6,8  | 2,5 <sup>a</sup> | 5,3 <sup>a</sup> |
| Lisina                              | 5,8                      | 1,6                | 10,2 | 3,9 <sup>a</sup> | 8,0              |
| Histidina                           | 1,9                      | 1,6                | 2,0  | 0,8 <sup>b</sup> | 1,4 <sup>b</sup> |
| Triptofano                          | 1,1                      | 0,5                | 2,8  | *                | 1,8              |
| Escore Aminoácidos Essenciais (EAE) |                          |                    | 1,0  | 0                | 0,8              |

\* Aminoácido não detectado na análise; a- aminoácido limitante apenas para crianças; b- aminoácido limitante tanto para crianças como para adultos.

Para a mistura contendo 60% de WPI e 40% de gelatina, observou-se deficiência de fenilalanina e tirosina para pré-escolares e histidina também para adultos, consequência da deficiência destes aminoácidos na gelatina. É importante observar a elevada concentração de lisina, leucina e triptofano no WPI, o que reflete no alto teor desses aminoácidos também na mistura.

Quando analisado o teor de aminoácidos não-essenciais nos produtos (Figura 1), nota-se que a gelatina apresenta concentrações bastante elevadas, superiores as do WPI, dos aminoácidos arginina, prolina, glicina e alanina. A análise da gelatina mostrou como característica peculiar alto conteúdo de glicina, hidroxiprolina e prolina.



**Figura 1** Composição de aminoácidos não-essenciais do WPI (isolado protéico de soro de leite bovino), gelatina bovina e mistura WPI:GB na proporção 60:40.

Grupos sulfidrida (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 (SCHIMADA e CHEFTEL, 1989). Segundo esses 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 de formação de pontes dissulfeto, resultando em géis de baixa elasticidade e alta solubilidade protéica.

Os resultados da determinação de grupos SH livres no WPI e na mistura WPI:GB são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** Teor de grupos sulfidrila livres (SH), nas amostras de isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) e mistura WPI:GB na proporção 60:40.

| Amostra        | SH $\mu\text{moles/g}$ de proteína |                              |
|----------------|------------------------------------|------------------------------|
|                | 10 minutos                         | 30 minutos                   |
| WPI            | $31,78 \pm 0,29^{\text{Aa}}$       | $30,80 \pm 0,17^{\text{Ab}}$ |
| WPI:GB (60:40) | $18,61 \pm 0,30^{\text{Bb}}$       | $19,63 \pm 0,07^{\text{Ba}}$ |

Os resultados são valores médios de 3 determinações  $\pm$  desvio padrão. Letras maiúsculas iguais (coluna) indicam que não houve diferenças estatísticas no mesmo tempo analisado. Letras minúsculas iguais (linha) indicam que não houve diferenças estatísticas entre os diferentes tempos estudados, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com HARDMAN (1981), o tempo de reação durante a determinação dos grupos SH reativos tem influência nos resultados de absorvância. No presente trabalho o conteúdo de grupos sulfidrila livres determinado foi estatisticamente diferente após 10 e 30 minutos de reação, para as amostras analisadas.

O valor determinado para o WPI foi praticamente o mesmo relatado por LIU et al. (2000), ou seja, de 30  $\mu\text{moles/g}$  de proteína para um isolado protéico de soro de leite comercial. Segundo os mesmos autores, grupos sulfidrila da albumina de soro bovino (BSA) apresentaram maior reatividade em pH 6,0. Em pH 7,0, a  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -la) e a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) são as principais proteínas responsáveis por reações tiol/dissulfeto no soro de leite. A  $\alpha$ -la, quando aquecida isoladamente, não é capaz de formar agregado ou polímero. BEVERIDGE et al. (1984) encontraram para um soro de leite desidratado (Dairyland Products, Inc., Savage, MN) 30,6% de proteína ( $N \times 6,38$ ) e 15,0  $\mu\text{moles}$  de grupos sulfidrila livres/g proteína. Como a mistura WPI:GB apresenta 60% de WPI, parece coerente o valor de 18,61  $\mu\text{moles/g}$  proteína encontrado no presente trabalho.

Os resultados apresentados por COSTA (2004) mostram uma diminuição linear do número de grupos SH, de 27,36 para 19,03  $\mu\text{moles/g}$ , após o tratamento térmico do WPI entre 60°C e 95°C, verificando que a concentração de grupos SH diminui em função do tratamento térmico, porque o aquecimento provoca o

desdobramento da estrutura nativa da proteína, expondo estes grupos e aumentando a frequência de colisão molecular, o que promove a formação de novas interações aleatórias.

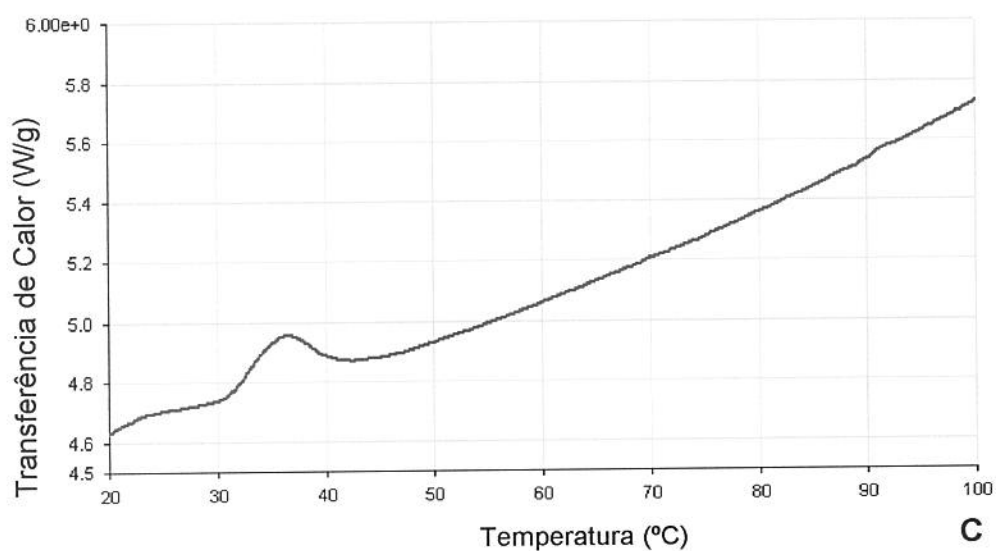
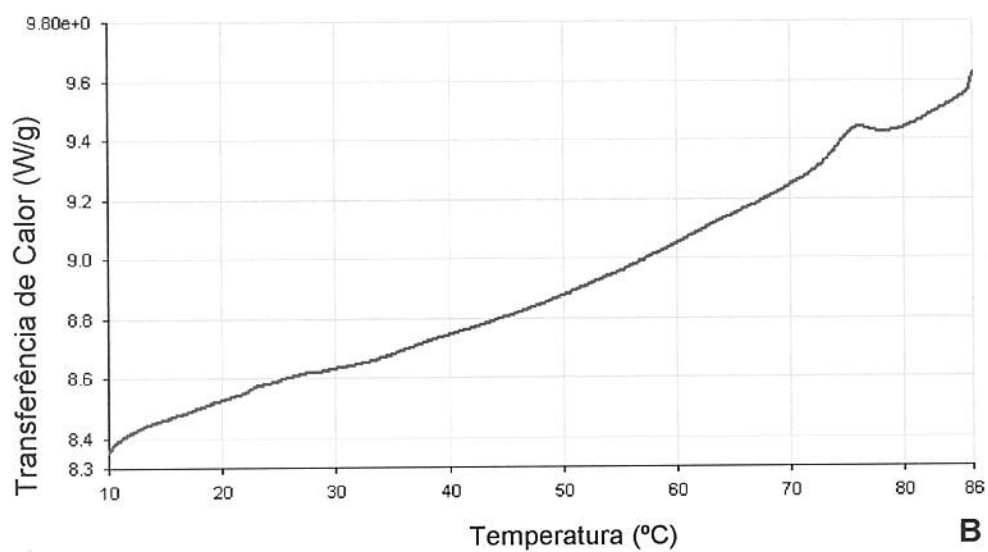
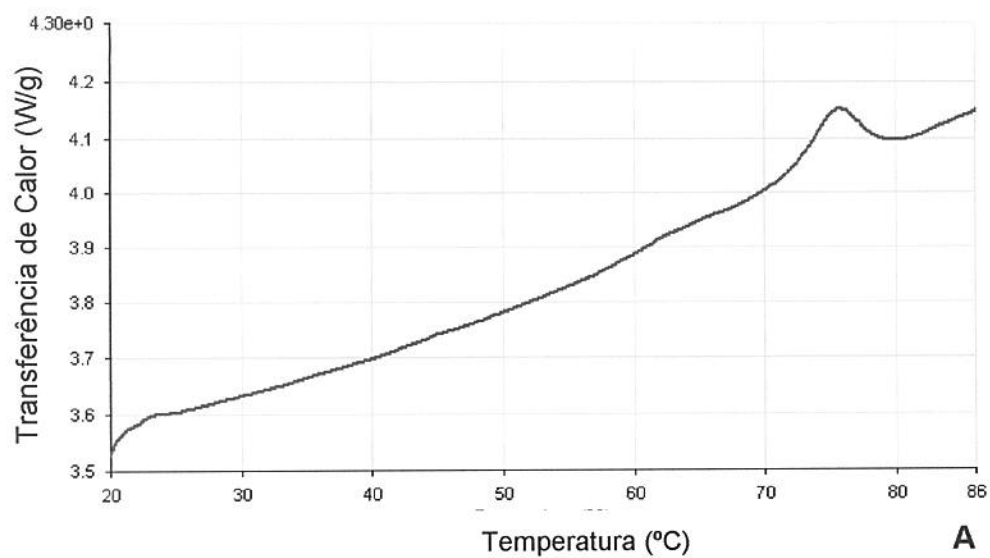
A reação de transformação de grupos SH em pontes S-S é favorecida em valores de pH acima de 6,8, em virtude da desprotonação progressiva desses grupos com a elevação do pH, levando-os à formação de ligações covalentes. Em baixos valores de pH, os grupos SH são relativamente inertes e não contribuem para a manutenção da estrutura protéica. Nessa condição, as forças atrativas envolvidas são principalmente iônicas e hidrofóbicas. Na  $\beta$ -Lg, os grupos SH tornam-se altamente reativos em valores de pH acima de 7,5 (RIBEIRO, 2001).

A Tabela 4 e a Figura 2 representam os picos de temperatura de desnaturação e as alterações de entalpia de desnaturação térmica das amostras estudadas. Observa-se que a solução com 20% de WPI (Figura 2A) mostra uma transição térmica a 75,4°C, sendo que este dado encontrado está de acordo com dados descritos na literatura, como em IBANOGLU (2005) por exemplo, ao relatar que uma solução pura de WPI apresentou um pico a 74,6°C, com entalpia de 1,34J/g, e BOYE et al. (2000) que encontraram pico característico da  $\beta$ -lg a 76,8°C, utilizando-se de WPC (300mg/g em tampão fosfato pH 7,0).

**Tabela 4** Temperaturas de desnaturação (Td) e alterações de entalpia ( $\Delta H$ ) com a desnaturação térmica do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina(GB) e mistura WPI: GB na proporção 60:40.

| Solução 20%<br>(p/v) em água | Td (°C) |           |       | $\Delta H$ (J/g) |
|------------------------------|---------|-----------|-------|------------------|
|                              | Início  | Pico máx. | Final |                  |
| WPI                          | 72,3    | 75,4      | 79,1  | 3,9              |
| GB                           | 31,6    | 36,1      | 43,0  | 10,1             |
| WPI:GB (60:40)               | 73,3    | 75,7      | 78,8  | 2,2              |

J/g= Joules por grama.



**Figura 2** Calorimetria diferencial de varredura (DSC) das amostras:

A) WPI, B) mistura WPI 60% e GB 40% e C) GB.



Resultados semelhantes foram apresentados por COSTA (2004), que avaliou o WPI aquecido de 25 a 100°C em cápsulas de alumínio, com aquecimento de 10°C/min. Detectou o primeiro pico endotérmico corresponde à temperatura de desnaturação da  $\alpha$ -lactalbumina e o segundo à temperatura de desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina, detectadas a 62,0°C e 72,7°C, respectivamente e a entalpia de transição ( $\Delta H$ ) foi 2,215J/g de proteína.

Quanto à gelatina, sua desnaturação térmica ocorreu aos 36°C (Figura 2C), com entalpia de 10,1J/g, sugerindo que apesar da desnaturação parcial, ainda deve manter elevado número de pontes de hidrogênio e de estruturação molecular.

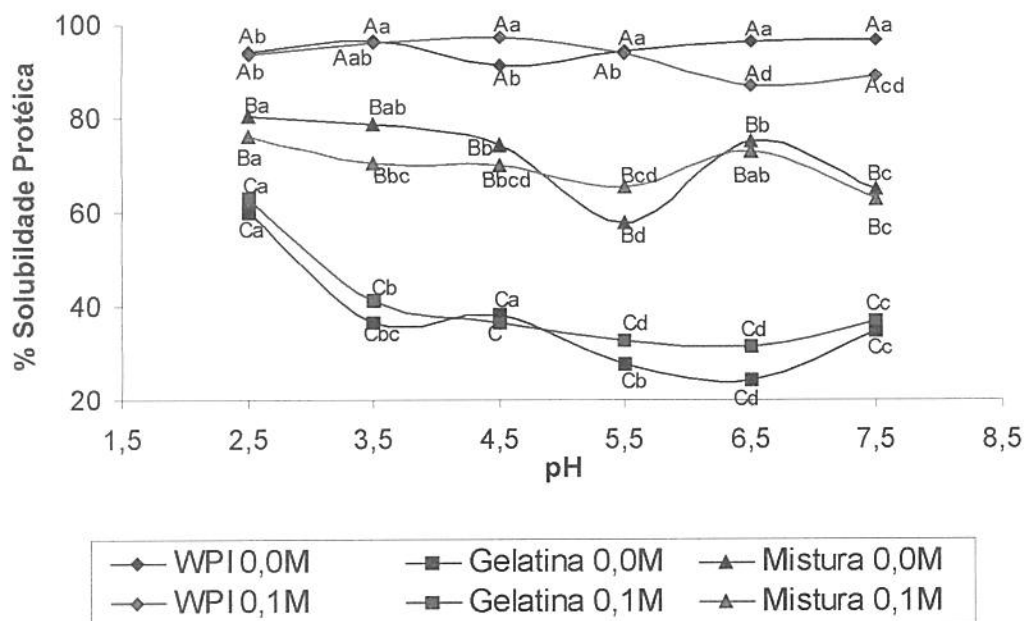
A desnaturação envolve a dissociação de ligações intermoleculares (ligações não covalentes e, em alguns casos, covalente) em processos endotérmicos (FITZSIMONS et al., 2006). Com a mistura observou-se apenas um pico a 75,7°C, equivalente ao WPI; no entanto, observa-se uma aparente transição térmica entre 20-30°C, porém sem definição de pico de transição, nesta faixa de temperatura. O ideal seria trabalhar com quantidades maiores de amostra para a análise de DSC, sugerindo-se para tal recipientes de 100 $\mu$ L.

Os dados dos perfis de solubilidade para os três concentrados protéicos na faixa de pH 2,3 a 7,5, em água e em solução de 0,1M NaCl, estão ilustrados na Figura 3.

Em solução aquosa, o WPI apresentou a mais alta solubilidade em todos os pHs, variando de 91,7% (pH 4,5) a 96, 2% (pH 7,5). A gelatina apresentou a mais baixa solubilidade em toda a faixa de pH, variando de 24,4% (pH 6,5) a 60,2% (pH 2,5), enquanto que a solubilidade da mistura foi de 58% (pH 5,5) e 80,6% (pH 2,5).

Em solução salina, a solubilidade mais baixa para a gelatina (31,5%) verificou-se em pH 6,5 e a mais alta (63%) em pH 2,5. Para o WPI, a solubilidade mais baixa (87,5) ocorreu em pH 6,5 e a mais alta (97,5) em pH 4,5, enquanto que para a mistura a solubilidade mais baixa (66%) ocorreu em pH 5,5 e a mais elevada, nos pHs 2,5 e 6,5.





**Figura 3** Representação do perfil de solubilidade do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina (GB) e da mistura WPI:GB na proporção 60:40, em diferentes pHs em água e em solução 0,1M de NaCl. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as amostras estudadas no mesmo pH. Letras minúsculas diferentes indicam resultados estatísticos da mesma amostra em função do pH.

Uma das propriedades mais importantes das proteínas do soro em seu estado nativo é a elevada solubilidade em uma ampla faixa de pH, inclusive na região de seu ponto isoelétrico, que varia em torno de 4 a 5 (MORR e HA, 1993). 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 neste pH. De acordo com LAW e LEAVER (1999), a solubilidade dos isolados de soro de leite com alto teor de proteína nativa é superior a 90%.

MORR (1992) avaliou a solubilidade protéica de três isolados de soro de leite comerciais com teor de proteína variando entre 88,6 a 92,7%, encontrando valores de solubilidade em pH 7,0, iguais ou superiores a 98%, sendo que os valores

mínimos de solubilidade foram encontrados em pH 4,5. COSTA (2004) determinou a solubilidade protéica de isolado protéico de soro de leite comercial (BiPro) e verificou a alta solubilidade protéica no intervalo de pH entre 3 e 9. No pH 4,6, a solubilidade protéica foi de  $90,1 \pm 0,7\%$ .

ANEMA et al. (2006) determinaram a solubilidade do concentrado protéico de soro de leite (MPC85) e mostraram que se armazenado a 20°C, por períodos de 60 dias, poucas alterações ocorreriam na solubilidade; no entanto, se estocado a 40°C, a solubilidade seria boa somente nos dois primeiros dias, decrescendo a valores de 20%.

A baixa solubilidade da gelatina bovina (Tipo B), inferior a 60%, também foi relatada por MAMANI (2004), que verificou um aumento da solubilidade (100%) após sua hidrólise com tripsina nos pHs estudados (3,0 a 8,0). Conforme descrito por MAHMOUD (1994), o aumento da solubilidade dos hidrolisados é provavelmente devido à diminuição do tamanho da cadeia polipeptídica e corresponde a um aumento da exposição de grupos ionizáveis ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{COO}^-$ ) com incremento concomitante na hidrofiliidade, bem como da carga líquida da molécula.

Para a mistura WPI:GB (60:40%), a mais baixa solubilidade, 58%, foi obtida em pH 5,5, em solução aquosa. Isto se justifica pelo fato de que a gelatina utilizada é do tipo A a qual apresenta ponto isoelétrico entre 4,8-5,2, (POPPE, 1997).

## 4 CONCLUSÃO

A mistura WPI:GB apresentou perfil aminoacídico significativamente superior ao da gelatina, pois somente dois dos 9 aminoácidos essenciais não atenderam em 100% as recomendações da FAO/WHO.

As desnaturações térmicas do WPI e da mistura WPI:GB, determinada pela análise da calorimetria diferencial de varredura (DSC), apresentou apenas um pico, similar e bem definido. A gelatina apresentou temperatura de desnaturação bem inferior, com uma entalpia bem mais elevada que a do WPI ou da mistura WPI:GB (60/40).

Das amostras avaliadas, o WPI apresentou solubilidade mais elevada, variando entre 87,4 a 97,5%, não apresentando variações significativas com alteração de pH e da força iônica. A mistura WPI:GB apresentou comportamento semelhante ao do WPI, no entanto, com uma solubilidade intermediária entre WPI e GB. A solubilidade máxima da gelatina foi de 63% em pH ácido, sendo reduzida significativamente com a elevação do pH.

Finalmente, pode-se concluir que a mistura WPI/GB (60:40) constituiu-se em um ingrediente importante para a formulação de alimentos, pelas suas propriedades tanto nutritivas como funcionais.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e a GELITA® (*Gelita South America*, Cotia-SP\_ pelo suporte financeiro ao projeto.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEMA, S.G.; PINDER, D.N.; HUNTER, R.J.; HEMAR, Y. Effects of storage temperature on the solubility of milk protein concentrates (MPC85). **Food Hydrocolloids**, v.20, n.2-3, p.386-393, 2006.

A.O.A.C. **Association of Official Analytical Chemists** – Official Methods of Analysis, W. Horwitz (ed.), 15<sup>th</sup> edition, Washington, D.C., p.1141, 1990.

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

BEVERIDGE, T. JONES, .L.; TUNG, M.A. Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean and albumen protein gels. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.32, n.2, p.307-313, 1984.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v.25, n.25, p.5675-5680, 2004.

BOYE, J.E.; ALLI, I. Thermal denaturation of mixtures of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin: a differential scanning calorimetric study. **Food Research International**, v.33, n.8, p.673-682, 2000.

CHATTERTON, D.E.W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin – Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v.16, n.11, p.1229-1240, 2006.

COSTA, E.L. Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de leite com atividade anti-hipertensiva. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004, p.115.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. **Report on a joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation**, Bethesda, 1990.

FITZSIMONS, S.M.; MULVIHILL, D.M.; MORRIS, E.R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v.21, n.4, p.638-644, 2006.

HARDMAN, J.F. The determination of total and reactive sulfhydryl groups of whey protein concentrates. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.36, n.1, p.153-155, 1981.

HAUG, I.J.; DRAGET, K.I.; SMIDSRØD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.2, p.203-213, 2004.

IBANOGLU, E. Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. **Food Chemistry**, v.90, n.4, p.621-626, 2005.

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

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

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, v.48, n.10, p.89-95, 1994.

MAMANI, H.N.C. **Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase**. Dissertação (mestrado em Alimentos e Nutrição) Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, 2004, 98p.

MICHAELIDOU, A.; STEIJNS, J. Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: growth factors, vitamins and nucleotides. **International Dairy Journal**, v.16, n.11, p.1421-1426, 2006.

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

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

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

NEMATİ, M. OVEISI, M.R.; ABDOLLAHI, H.; SABZEVARI, O. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.34, n.3, p.485-492, 2004.

PÉREZ, O.E.; WARGON, V.; PILOSOFF, A.M.R. Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, v.20, n.7, p.966-974, 2006.

POPPE, J. Gelatin. In; IMESON, A. (Ed.) **Thickening and Gelling agents for Food**, 2 nd, Ed. London: Blackie Academic and Professional, Cap. 7, 1997. p.144-179.

RIBEIRO, H.S. Obtenção e aplicação de concentrado protéico de soro de leite bovino em produtos cárneos. Tese (doutorado em Alimentos e Nutrição) Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, 2001, 194 p.

SEGTMAN, V.H.; ISAKSSON, T. Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, v.18, n.1, p1-11, 2004.

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

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, v.101, n.4, p.1484-1491, 2007.

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in protein. *Analytical Chemistry*, v.39, n.12, p.1412-1416, 1967.

STATSOFT, INC. Statistica for Windows, Computer Program Manual, Tulsa, 1995.Catalogue.

TOSI, E.; CANNA, L.; LUCERO, H.; RÉ, E. Foaming properties of sweet solutions as modifieds by thermal treatment. *Food Chemistry*, n.100, n.2, p.794-799, 2007.

VEITH, P.D.,REYNOLDS, E.C. Production of a high gel strength whey protein concentrate from chesse whey. *Journal of Dairy Science*, v.87, n.4, p.831-840, 2004.

WALKENSTRÖM, P.; HERMANSSON, A.M. Fine-stranded mixed gels of whey proteins and gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.11, n.4, p.457-470, 1997.

ZIEGLER, F.L.F. **Desenvolvimento de um produto dietético funcional para idosos**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2006, 243p.





## **CARACTERÍSTICAS GERAIS E PERFIL DE TEXTURA DE GÉIS MISTOS DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE (WPI) E GELATINA BOVINA (GB).**

**J.A. ROMAN, V.C. SGARBIERI**

### **RESUMO**

Este estudo teve como principal objetivo a obtenção de géis mistos de gelatina bovina (GB) e isolado de proteínas de soro de leite (WPI) com características tecnológicas adequadas, perfil de textura aceitável e bom valor nutritivo. Para tanto, foram estudados preliminarmente os efeitos de diversas variáveis, como concentração de proteína, pH, temperatura e tempo de aquecimento, bem como diferentes proporções das fontes protéicas, na aparência e na avaliação macroscópica dos géis obtidos. Seguiu-se um planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ) com as variáveis independentes: concentração de proteína, pH, temperatura e tempo de aquecimento, avaliando-se dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade. Observou-se que a dureza foi a variável melhor relacionada com os atributos sensoriais. O gel com as melhores características foi o obtido com 60% WPI:40%GB, pH 6,5, aquecido 30 min a 65°C, formado com 6% de proteína. A melhor textura foi encontrada na faixa de 270-310g-força, mastigabilidade e gomosidade próximas a 265 g-força, elasticidade e coesividade elevadas, 0,87-0,96. O gel misto (60WPI:40GB) apresentou capacidade de retenção de água de 48,6%, enquanto que a do gel de GB foi 23,2%. A solubilidade em diversos solventes indicou que os géis mistos são dependentes de interações hidrofóbicas e de ligações dissulfeto.

**Palavras-chave:** gelatina, isolado protéico de soro de leite, geleificação, gel misto.

## SUMMARY

The main objective of this study was the obtention of mixed gels of bovine gelatin (BG) and whey protein isolate (WPI) with adequate technological characteristics, acceptable texture profile and good nutritive value. For reaching these goals, the effects of several variables such as protein concentration, pH, temperature, time of heating as well as different properties of the two proteins were preliminarily studied in the appearance and macroscopic evaluation of the gels. A fractionary factorial planning ( $2^{4-1}$ ) was followed taking into consideration the following independent variables: protein concentration, pH, temperature and the heating time following evaluation of hardness, chewiness, gomosity, elasticity and cohesiveness. It was observed that hardness was the most sensitive of the sensorial attributes. The gel with the best characteristics was obtained with 60%WPI:40%BG, pH 6.5, 6% protein and 65°C for 30 minutes. Best textures were found in the range of 270-310g-force, chewiness and gomosity near 265g-force, high elasticity and cohesiveness of 0.87-0.96. The 60:40 gel showed 48.6% water retention capacity (WRC) while for gelatin gel the WRC was 23.2%. Solubility in various solvents indicated that the mixed gels were dependent on hydrophobic interactions and disulfide bonds.

**Keywords:** gelatin, whey protein isolad, mixed gel

## 1 INTRODUÇÃO

A gelatina é formada de um conjunto de polipeptídios de elevada massa molecular obtida por hidrólise parcial do colágeno, proteína animal presente nos tecidos epiteliais, conjuntivos e cartilagosos, como na pele e nos tendões (POPPE, 1997; CHAMBI, 2004).

O ponto isoelétrico da gelatina pode variar em função da forma de obtenção da mesma. A gelatina obtida a partir da hidrólise ácida apresenta ponto isoelétrico na faixa alcalina (~9,4), devido às condições de processamento menos rígidas, minimizando modificações nos grupos amida, o que mantém o valor próximo do pH do colágeno. A gelatina obtida através de hidrólise alcalina é submetida a

longos tratamentos com álcali e apenas uma pequena porção dos grupos amina resiste ao processo (90-95% de ácido carboxílico livre). Nesse caso, a proteína obtida apresenta ponto isoelétrico na faixa de 4,8 a 5,2 (ALVIM, 2005).

A qualidade da gelatina é tipicamente avaliada com base em suas propriedades funcionais tecnológicas. A força do gel é a mais importante propriedade da gelatina nas aplicações industriais. No entanto, a qualidade da gelatina comercial é também determinada por outras propriedades, tais como viscosidade, geleificação, turidez, solubilidade, etc. (CHO et al. 2004).

Devido ao seu caráter anfótero (carga negativa acima de seu ponto isoelétrico e carga positiva abaixo deste), os derivados do colágeno apresentam propriedades de formação de géis e filmes termo-reversíveis. A gelatina apresenta-se como um material muito versátil na obtenção de micropartículas por diversos tipos de processos (BERTAN, 2003).

O valor protéico da gelatina só é melhorado quando esta é consumida em combinação com outra proteína ou misturas de proteínas, usadas com a finalidade de suplemento protéico, aumentando o seu valor nutritivo, pois esta é uma proteína deficiente, em todos os aminoácidos essenciais, principalmente em triptofano e cisteína.

As proteínas do soro de leite estão entre as mais equilibradas fontes de aminoácidos da dieta humana, além disso, foram descritas muitas atividades biológicas, essenciais para o desenvolvimento, com repercussões benéficas também para o organismo humano, como efeito hipocolesterolêmico (ZHANG e BEYNEN, 1993); anticarcinogênico (BEZAULT et al., 1994); antimicrobiana (MEISEL e SCHLIMME, 1996) e cicatrizante (BELFORD et al. 1997; SGARBIERI, 2004).

As proteínas do soro de leite, além de suas excelentes propriedades nutritivas e fisiológicas, apresentam propriedades físico-químicas e funcionais muito apreciadas como ingredientes alimentícios, dentre as quais podem ser citadas as de agentes emulsificantes e estabilizantes e as de agentes gelificantes, inclusive na produção de géis translúcidos e de elevada consistência (BANAVARA et al, 2003; VEITH e REYNOLDS, 2004; ANDRADE e NASSER, 2005).

Os géis conferem estrutura, textura e estabilidade aos alimentos; possibilitam, ainda, a retenção de grandes quantidades de água e outras

pequenas moléculas dentro da matriz alimentar (TORRES, 2005). O comportamento de géis mistos tem atraído a atenção de pesquisadores devido à possibilidade de maior flexibilidade de suas propriedades mecânicas e estruturais comparadas às dos géis simples (TURGEON e OULD ELEYA, 2000).

O presente trabalho teve por objetivo o estudo comparativo da geleificação induzida por aquecimento de duas fontes protéicas de largo uso industrial, isolado protéico de soro de leite (WPI) e gelatina bovina (GB), na proporção 60:40 (em base protéica) e análise do perfil de textura dos géis obtidos em diferentes condições.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL

Foi utilizado isolado protéico de soro de leite, ALACEN 895, produzido industrialmente por troca iônica e ultrafiltração, com reduzido teor de lactose e gordura, lote 473933884518335, obtido da NZMP, New Zealand Milk Products, composto de 95,7% de proteína, 5,1% de umidade, 0,3% de lipídios, 2,1% de cinza e 0,6% de lactose com pH (5% a 20°C) igual a 6,9, de cor creme e densidade 0,47g/mL, isento de *Salmonella* (1/750g), *Listeria* (1/50g). Composição mineral em 100g compreendendo 600mg de sódio, 300 mg de potássio, 70 mg de íons Cl<sup>-</sup>, 100 mg de cálcio e 70 mg de fósforo (dados do fabricante).

A gelatina bovina, tipo A, produzida por hidrólise ácida, lote PFL 196/04, foi gentilmente cedida pela empresa Gelita South América, Cotia-SP. Segundo informações do fabricante, caracteriza-se com 240 *bloom*, viscosidade de 33-42 mPs, teor de proteína de 83%, umidade entre 8 e 13%, conteúdo de cinza inferior a 2,0% e pH entre 5,0-6,0.

## MÉTODOS

### 2.1 Testes preliminares de geleificação

Para a realização dos ensaios, testes preliminares de geleificação foram realizados com o intuito de definir as variáveis independentes de interesse nas características do perfil de textura. Quatro pré-testes foram utilizados para se conhecer o material e para se ter uma melhor noção das propriedades de formação de gel, anteriormente aos procedimentos de planejamento experimental, bem como para determinação das variáveis independentes e seus níveis de variação.

**Dissolução da gelatina e ajuste do pH.** A gelatina é uma substância que não é dissolvida em água fria e sabe-se que, para na formação de gel, é importante que os materiais apresentem elevada solubilidade. Testes de dissolução e de ajuste do pH foram realizados com o intuito de melhor estabelecer o procedimento de preparo dos géis mistos.

**Efeito do pH, temperatura e proporção entre as misturas protéicas, na obtenção de géis simples e mistos.** Foram estudadas características de geleificação do isolado protéico de soro bovino (WPI) e de gelatina bovina (GB), testando-se inicialmente concentrações de 5% (p/p) de proteína em pH 3,5 e 6,5, tampão citrato e fosfato (0,05M), respectivamente. Dispersões de cada um dos isolados foram preparadas, mantendo-se a concentração de proteína na mistura igual a da dispersão simples. Depois de pesadas em balança analítica, adicionou-se a solução tampão (p/p) aguardando intumescimento durante 30 minutos; em seguida, fez-se a dissolução em banho-maria a 45°C durante 15 minutos. As amostras foram colocadas em tubos de vidro de formato cilíndrico, de 20mm de diâmetro e 80mm de altura, tampados no fundo com uma rolha de borracha e na parte superior por um filme plástico. A seguir, os tubos foram aquecidos em banho-maria a 70 ou 80°C, durante 30 minutos. Depois foram resfriados em banho

de gelo durante 10 minutos e, em seguida, armazenados durante 20 horas a 4°C e, então, removidos dos tubos e analisados visualmente quanto à formação ou não de gel e suas características macroscópicas.

**Efeito da concentração de proteína e da temperatura na obtenção de géis simples e mistos (60% WPI / 40% GB).** Foram estudadas características de geleificação do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) e de gelatina bovina (GB), em pH 6,5 (tampão fosfato 0,05M). Dispersões da mistura na proporção de WPI:GB, 60;40, foram preparados variando-se a concentração de proteína de 4 a 10%. Depois de pesadas em balança analítica, adicionou-se a solução tampão (p/p) e aguardou-se intumescer durante 30 minutos; em seguida, fez-se a dissolução em banho-maria a 45°C, durante 15 minutos. As amostras foram colocadas em tubos de vidro de formato cilíndrico, de 20mm de diâmetro e 80mm de altura, tampados no fundo com uma rolha de borracha e na parte superior por um filme plástico. A seguir, os tubos foram aquecidos em banho-maria a 60, 70 ou 80°C, durante 30 minutos. Depois foram resfriados em banho de gelo durante 10 minutos e, em seguida, armazenados durante 20 horas a 4°C e, então, removidos dos tubos e analisados visualmente quanto à formação ou não de gel e quanto ao atributo sensorial de textura.

**Estabilidade dos géis em função do tempo.** A estabilidade dos géis foi avaliada variando-se o tempo após sua obtenção. Utilizou-se para o teste de estabilidade misturas na proporção de 60:40 (WPI:GB), contendo concentração de 8% de proteína total, em que se avaliou o perfil de textura dos géis, através da dureza, em texturômetro modelo TAX-T<sub>2</sub> (Stable Microsystems SMS, Surrey, UK). Amostras à temperatura ambiente (25°C ± 3°C), com 2 cm de diâmetro e 1,5 centímetro de altura, foram comprimidas em um probe cilíndrico SMS P/5S. Utilizou-se força de compressão de 5g em 50%, velocidade pré-teste, durante e pós-teste de 3 mm/s. Foram analisados géis em triplicata, variando-se o tempo de obtenção do gel de 1 a 26 horas.

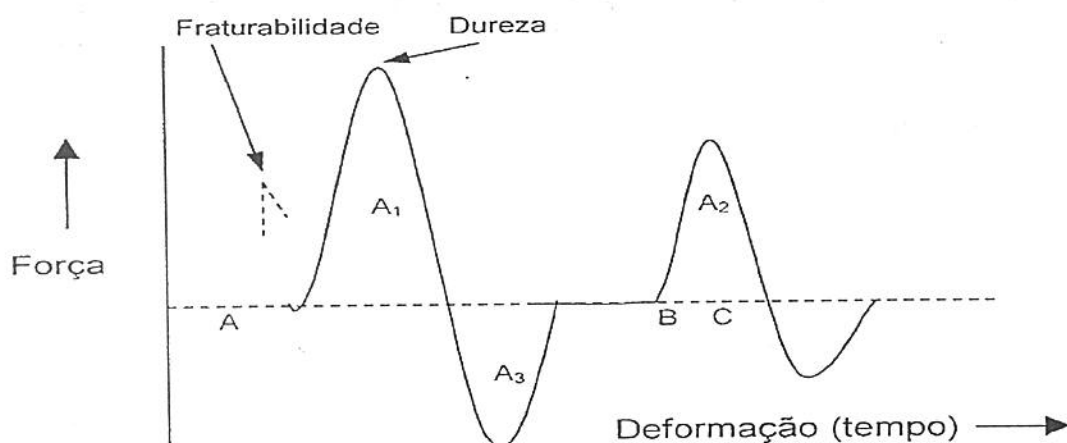


## 2.2 Perfil de textura

As propriedades de textura, muitas vezes estudadas recorrendo a ensaios empíricos que simulam o processo de mastigação, permitem caracterizar os géis e são aplicados em vários estudos (MARANGONI et al. 2000; YONG e KILARA, 1998).

Os parâmetros de textura dos géis são importantes para quantificar e caracterizar seus atributos. Tais atributos podem ser obtidos pela análise do perfil de textura (TPA) utilizando-se um instrumento denominado texturômetro, o qual simula o processo de desintegração de um alimento pelos dentes (Figura 1).

O primeiro pico expressa a dureza ( $A_1$ ); coesividade corresponde à área do segundo pico ( $A_2$ ) dividida pela área do primeiro pico; elasticidade é obtida pela diferença entre a distância medida no início do contato com a amostra até o início da segunda compressão, e gomosidade é o produto da dureza através da coesividade (FRIEDMAN et al. 1963).



**Figura 1** Curva típica do perfil de textura obtido em texturômetro TAX-T<sub>2</sub>.

Os atributos são graficados como força em função do tempo (Figura 1), sendo correlacionados com a avaliação sensorial. 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 e expressos em função de massa, tempo e distância (BOURNE, 1982; 1998).

Com o intuito de verificar a influência de 4 diferentes variáveis, realizaram-se 11 experimentos, por meio de um planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ), contendo 3 pontos centrais.

Géis mistos, 60% WPI e 40% gelatina, foram elaborados através da geleificação termicamente induzida em diferentes condições experimentais: concentrações de proteína entre 3 e 10%, pH entre 5,5 e 7,5, aquecimento (banho-maria) entre 45-80°C por um período de 10-60min.

A Tabela 1 apresenta os níveis e as variáveis independentes e a Tabela 2 resulta da matriz do planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ), com 4 variáveis independentes em dois níveis eqüidistantes (-1 e +1) e três repetições no ponto central (nível 0). Os pontos experimentais foram escolhidos com base na literatura e em testes preliminares.

As respostas do planejamento fatorial fracionário foram obtidas por meio da análise do perfil de textura: dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade, além da avaliação visual dos géis elaborados.

**Tabela 1** Níveis das variáveis na avaliação do perfil de textura de géis mistos, utilizando planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ).

| Variáveis                               | Níveis |     |     |
|-----------------------------------------|--------|-----|-----|
|                                         | -1     | 0*  | +1  |
| Concentração de proteína da mistura (%) | 4,0    | 6,0 | 8,0 |
| pH                                      | 5,5    | 6,5 | 7,5 |
| Temperatura (T °C)                      | 45     | 65  | 85  |
| Tempo (min.)                            | 15     | 30  | 45  |

\* Ponto central.



**Tabela 2** Matriz do planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ), estudando-se 4 variáveis, por meio de 11 ensaios, incluindo 3 pontos centrais (9,10 e 11).

| Exp. | Valores Codificados |    |        |         | Variáveis Reais |     |        |         |
|------|---------------------|----|--------|---------|-----------------|-----|--------|---------|
|      | %                   | pH | T (°C) | t (min) | %               | pH  | T (°C) | t (min) |
| 1    | -1                  | -1 | -1     | -1      | 4               | 5,5 | 45     | 15      |
| 2    | 1                   | -1 | -1     | 1       | 8               | 5,5 | 45     | 45      |
| 3    | -1                  | 1  | -1     | 1       | 4               | 7,5 | 45     | 45      |
| 4    | 1                   | 1  | -1     | -1      | 8               | 7,5 | 45     | 15      |
| 5    | -1                  | -1 | 1      | 1       | 4               | 5,5 | 85     | 45      |
| 6    | 1                   | -1 | 1      | -1      | 8               | 5,5 | 85     | 15      |
| 7    | -1                  | 1  | 1      | -1      | 4               | 7,5 | 85     | 15      |
| 8    | 1                   | 1  | 1      | 1       | 8               | 7,5 | 85     | 45      |
| 9    | 0                   | 0  | 0      | 0       | 6               | 6,5 | 65     | 30      |
| 10   | 0                   | 0  | 0      | 0       | 6               | 6,5 | 65     | 30      |
| 11   | 0                   | 0  | 0      | 0       | 6               | 6,5 | 65     | 30      |

### 2.3 Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água dos géis é avaliada pela quantidade de líquido expelida de um sistema protéico pela aplicação de uma força centrífuga, através do método da umidade espremível (UE), determinado pela metodologia proposta por JAUGUERI et al. (1981), com modificações propostas e descritas por BEUSCHEL et al. (1992).

A % de umidade espremível foi calculada pela diferença em peso do papel de filtro seco e úmido. Amostras de 1g dos géis foram pesadas em papel de filtro Whatman nº2 e centrifugadas a 2500 rpm (772g), a 5°C por 10 minutos em centrífuga Sorval (rotor SS-34, Wilmington, Delaware, USA). A umidade retirada do gel foi calculada pela diferença de peso entre o papel de filtro seco e úmido. As análises foram feitas em triplicata e 3 géis de cada experimento foram avaliados. A porcentagem de capacidade de retenção de água (em %) dos géis foi calculada pela relação: % CRA= 100 – (% umidade retirada por centrifugação).

## 2.4 Solubilidade dos géis

Amostras dos géis (1g) com 6% de proteína (p/v) foram dispersas em 10mL de água destilada: Tampão A (0,086M Tris, 0,09M glicina, 4mM EDTA dissódico, pH 8,0); Tampão B (contendo solvente A além de 8M de uréia e 0,5% de dodecil sulfato de sódio-SDS); Tampão C (solvente B + 10mM de ditioneitol -DTT), conforme descrito por SHIMADA e CHEFTEL (1988).

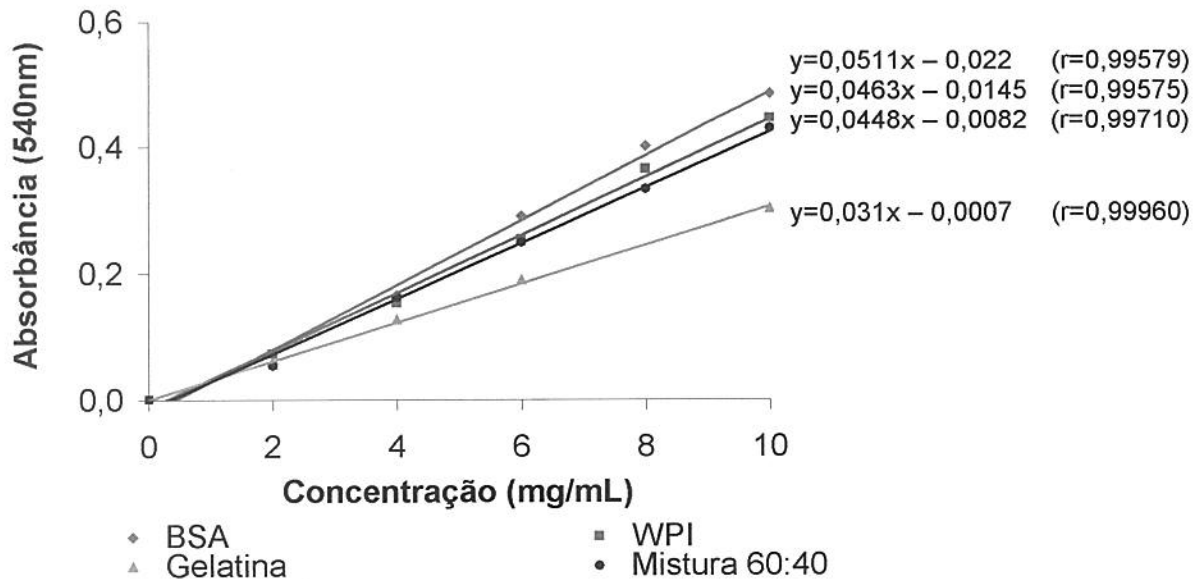
As amostras foram homogeneizadas com um homogeneizador (Ultra Turrax 250), 10.000 rpm em temperatura ambiente ( $25 \pm 3$  °C), por 2 minutos e centrifugadas a 18.000 rpm (38.724g) por 15 minutos, a 25°C em centrífuga Sorval. Os sobrenadantes foram filtrados em papel filtro comum e deles retiradas alíquotas de 1mL para a determinação da concentração protéica utilizando-se o método de biureto (GORNALL et al., 1949).

Para a construção da curva padrão (Figura 2), foi lido as absorbâncias a 540nm das dispersões de albumina de soro bovino (BSA), isolado protéico de soro de leite (WPI), gelatina bovina (GB) e a mistura contendo 60% de WPI e 40% GB. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS, modelo BECKMAN DU – 70 (Fullerton, USA). As análises foram feitas em triplicata.

Dos sobrenadantes obtidos da solubilização dos géis, foram retiradas alíquotas de 0,5mL para posterior determinação do perfil eletroforético das proteínas solúveis.

## 2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente segundo a metodologia de superfície de resposta, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). A comparação das médias foi feita utilizando-se o teste de Tukey. Os resultados do planejamento fatorial fracionário foram avaliados através dos efeitos das variáveis independentes. O *software* *Statística for Windows* versão V foi utilizado para calcular os coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA).



**Figura 2** Curvas de calibração para a determinação de proteína pelo método do Biureto. y= absorbância, x= concentração e r= coeficiente de correlação

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Testes preliminares de geleificação

A melhor dissolução das amostras de gelatina ocorreu através de um intumescimento durante 30 minutos, seguido do aquecimento em banho-maria, a 45°C, durante 15 minutos. O ajuste do pH não foi possível após o aquecimento da solução, pois a amostra se apresentava viscosa e no esfriamento esta geleificava; por esses motivos decidiu-se optar por manter o pH constante através de soluções tampões.

A Tabela 3 representa os resultados observados pela avaliação visual na formação ou não de géis mistos, em diferentes proporções da mistura WPI:GB, enquanto que a Tabela 4 ilustra as observações visuais verificadas na mistura WPI:GB em 60:40% em diferentes concentrações de proteína e tempo de aquecimento.

**Tabela 3** Avaliação da formação de gel, contendo 5% de proteína, em diferentes proporções de WPI:GB, temperatura de aquecimento e pH.

| Proporção<br>WPI : GB | Tampão Fosfato pH 6,5 |      | Tampão Citrato pH 3,5 |      |
|-----------------------|-----------------------|------|-----------------------|------|
|                       | 70°C                  | 80°C | 70°C                  | 80°C |
| 100 : 0               | ñ                     | ñ    | ñ                     | ñ    |
| 80 : 20               | ◇                     | ◇    | ◇                     | ◇    |
| 60 : 40               | □                     | ■    | □+                    | □+   |
| 50 : 50               | □                     | ■    | □+                    | □+   |
| 40 : 60               | □                     | ■    | □+                    | □+   |
| 20 : 80               | □                     | ■    | ■                     | ■    |
| 0 : 100               | □                     | □    | □                     | □    |

ñ não formou gel;

◇ gel que não mantém a sua forma;

□+ gel misto com 2 fases distintas;

□ gel translúcido;

■ gel opaco.

**Tabela 4** Avaliação da formação dos géis (tampão fosfato, pH 6,5) em diferentes concentrações de proteína, e de temperatura, proporção WPI:GB 60:40%.

| Concentração de<br>Proteína (%) | Temperatura de Aquecimento |      |      |
|---------------------------------|----------------------------|------|------|
|                                 | 60°C                       | 70°C | 80°C |
| 4                               | ◇                          | ◇    | ◇    |
| 6                               | □                          | □■   | ■    |
| 8                               | □                          | □■   | ■    |
| 10                              | □                          | □■   | ■    |

◇ gel que não mantém a sua forma;

□ gel translúcido;

□■ gel semi- translúcido;

■ gel opaco.

Através das informações ilustradas na Tabela 3, pode-se verificar que o isolado protéico de soro de leite, não forma gel nas condições estudadas, ao contrário da gelatina, que independente do pH formou géis duros e translúcidos. Quando se adicionou 20% de gelatina na mistura, observou-se um aumento da viscosidade da solução através da formação de um “falso gel”, ou seja, um gel que não mantinha sua forma ao ser retirado do tubo.

Em tampão citrato pH 3,5, obteve-se géis mistos com duas fases distintas, indicando que o pH próximo ao neutro (6,5) é mais adequado para a combinação da proteína do leite e da gelatina para a elaboração de produtos geleificados. A separação de fase em misturas de proteínas globulares com proteínas de elevada massa molecular é devida à incompatibilidade de diferentes massas moleculares quanto à configuração das proteínas, causando movimentação do material denso para a base e do material leve para a parte superior do tubo (HOWEL et al. 1995).

Géis mistos na proporção 60:40 de WPI:GB, contendo 4% de proteína, não formaram géis consistentes, indicando a importância dessa variável no fenômeno de formação da matriz de gel (Tabela 4).

Com o aumento da concentração de proteína ocorre a modificação da textura dos géis, resultando em aumento da firmeza e intensificando a retenção de água pela matriz (IPSEN et al., 2002). Para o processo de geleificação das proteínas do soro são necessárias concentrações de proteína variando de 6-12%, dependendo do pH (BRANDENBERG et al., 1992) e das temperaturas, na faixa de 70 a 90°C (MORR e HÁ, 1993), já a gelatina forma gel em água em concentrações 1% (SGARBIERI, 1998).

Tradicionalmente, as soluções de proteínas do soro geleificam quando submetidas a aquecimento em temperaturas superiores a 60°C, pois é quando estas proteínas se desnaturam parcialmente e, em seguida, se agregam para formar uma estrutura tridimensional que é capaz de reter água (MORR e HÁ, 1993).

Ao relacional a temperatura de aquecimento, com as características dos géis formados, verificou-se que esta é uma variável que influencia a opacidade dos géis produzidos, pois géis mistos, aquecidos a 70°C, são translúcidos, enquanto que, os aquecidos a 80°C são opacos em tampão fosfato pH 6,5 (Tabela 3).

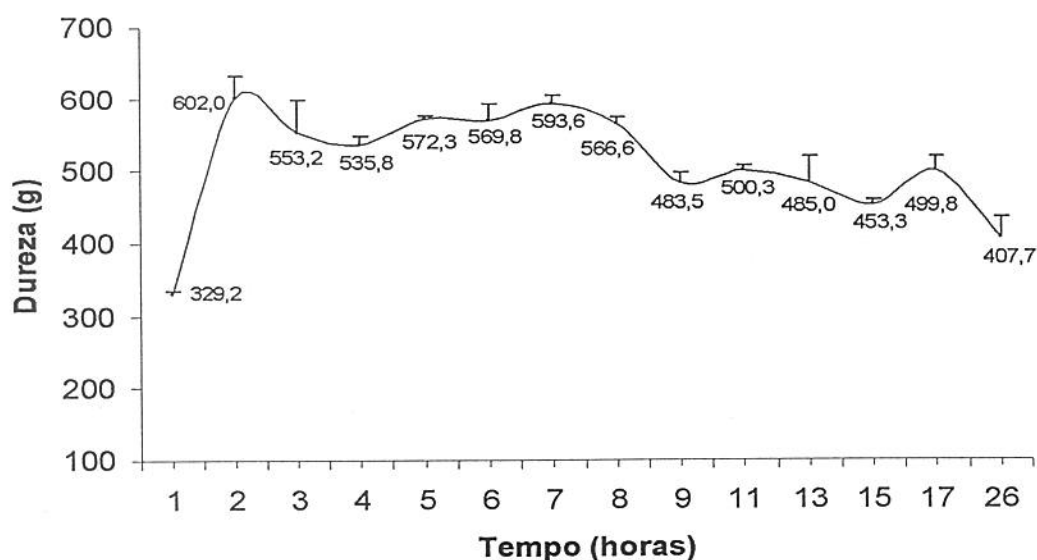
As características de formação de gel, quanto à opacidade, foram independentes da concentração de proteína utilizada (Tabela 4), mostrando, portanto, que a temperatura de aquecimento exerce uma influência significativa na opacidade do gel produzido, ou seja, a 60°C, os géis mostravam-se translúcidos, a 70°C, semi-opacos e a 80°C, opacos.

Os resultados encontrados nesse trabalho estão de acordo com o descrito na literatura por IPSEN et al. (2002), que relatam que os géis de proteína do soro variam de translúcidos e elásticos a agregados e opacos; os primeiros são formados por aquecimento de dispersões em temperaturas e concentrações protéicas baixas (3 a 5%), ou pelo aquecimento de dispersões extensivamente dialisadas. Os segundos, géis opacos e pouco elásticos, são formados em concentrações protéicas e temperaturas elevadas, dependendo ainda da concentração iônica. Por outro lado, os géis de gelatina apresentam aparência transparente, com uma tendência muito fracamente opaca, indicando uma microestrutura delicada em forma de rede (WALKENSTRÖM e HERMANSSON, 1997).

Segundo MANGINO et al. (1987), as propriedades dos géis induzidos termicamente são influenciadas por muitos fatores, tais como concentração de proteína, pH, temperatura e duração do tratamento térmico.

Os resultados do teste de estabilidade dos géis mistos na proporção de 60:40 (WPI/GB), contendo concentração de 8% de proteína, foram avaliados mediante seu valor de dureza e os resultados são representados na Figura 3.

Observou-se que, até duas horas, não ocorreu a estabilização da dureza dos géis. Provavelmente, o tempo foi insuficiente para as interações intramoleculares formar a estrutura protéica, estabilizando a matriz do gel. Segundo SGARBIERI (1998), o fenômeno de formação de gel é muito complexo e normalmente ocorre com o resfriamento da solução coloidal, após aquecimento previo. Com o resfriamento, verifica-se um aumento da viscosidade, até o ponto em que a rigidez se manifesta, chamado de "ponto de gel". Baseado nos resultados obtidos determinou como procedimento padrão, que os géis seriam analisados em texturômetro TAX-T<sub>2</sub>, após 5 horas da obtenção.



**Figura 3** Avaliação da dureza dos géis em função do tempo de estocagem de 1 a 26 horas, armazenados sob refrigeração a 5°C.

### 3.2 Perfil de textura

Onze experimentos foram realizados em condições variáveis de concentração (%) de proteína, pH, temperatura e tempo de aquecimento. Sendo que o ponto central foi realizado em triplicada, para possibilitar o cálculo do erro padrão (Tabela 2). As características sensoriais destes géis são descritas na Tabela 5.

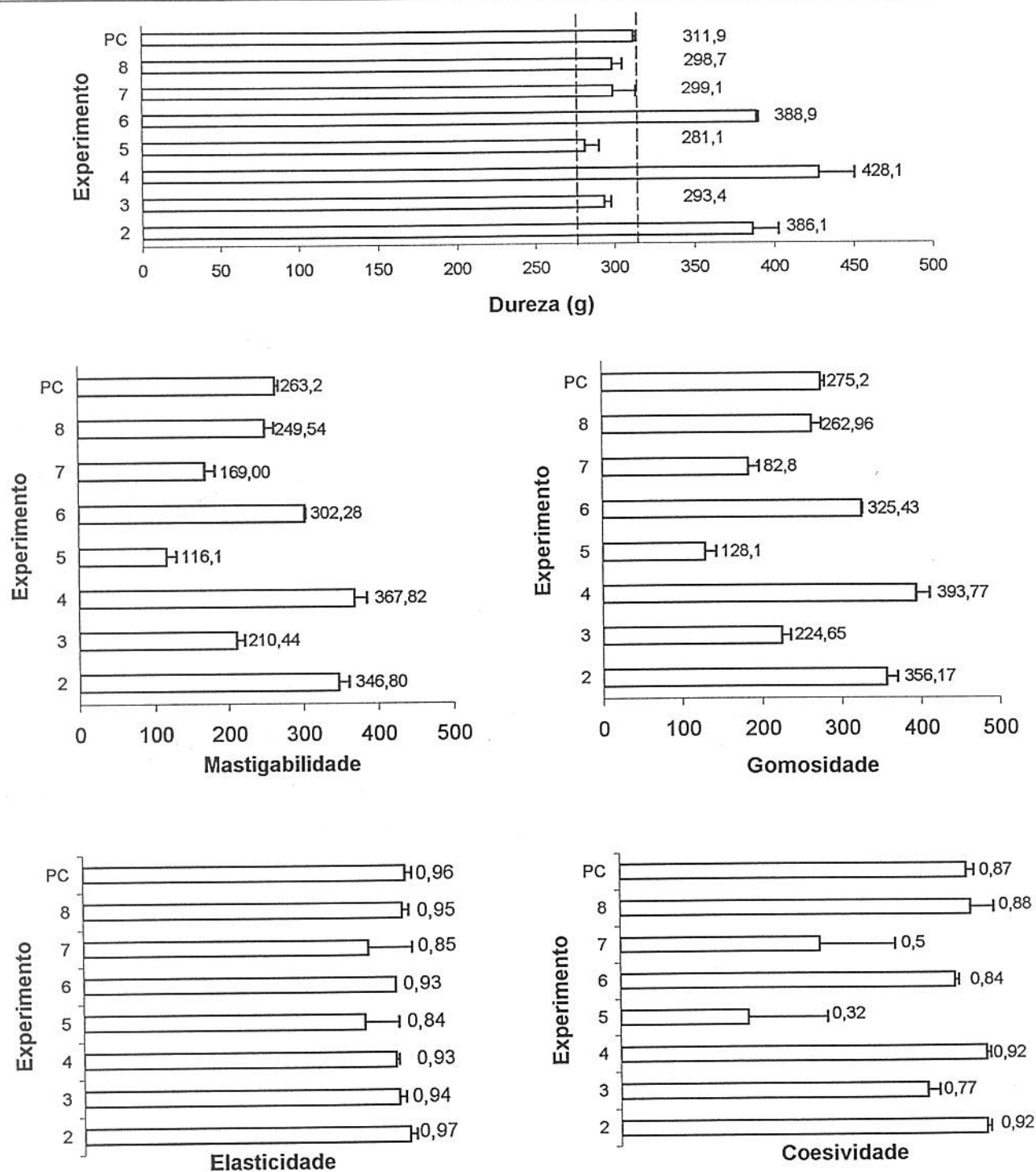
Os resultados do perfil de textura dos géis mistos 60:40 (WPI:GB), avaliados quanto às características de dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade, estão representados na Figura 4. Verificou-se que os géis contendo 8% de proteína (experimentos 2, 4 e 6) mostraram-se com textura dura, enquanto que os géis obtidos a 4% (experimentos 1, 3, 5 e 7), apresentaram textura foi muito mole.



**Tabela 5** Avaliação das características sensoriais dos géis mistos de WPI e GB, com variação na concentração de proteína (%), pH, temperatura (T) e tempo de aquecimento (t).

| Exp. | % Prot | pH  | T (°C) | t (min) | Características Sensoriais                                                                                                                      |
|------|--------|-----|--------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1    | 4      | 5,5 | 45     | 15      | gel transparente e mole, perde a forma ao sair do tubo, (não analisado).                                                                        |
| 2    | 8      | 5,5 | 45     | 45      | gel mais amarelado que o gel 1, boa textura, pode ser cortado com a colher, mantém a forma; porém contém textura um pouco dura.                 |
| 3    | 4      | 7,5 | 45     | 45      | gel transparente, mesma cor que o gel 1, boa textura para cortar com a colher, mais macio que o gel 2, aparentemente um pouco mais mole.        |
| 4    | 8      | 7,5 | 45     | 15      | gel transparente, amarelado como o gel 2, boa textura para cortar com a colher, um pouco mais duro que o gel 2.                                 |
| 5    | 4      | 5,5 | 85     | 45      | gel branco, coagulado, com retenção de água, não homogêneo, aparência coagulada, 1/2 branco, 1/2 transparente, coagula logo após o aquecimento. |
| 6    | 8      | 5,5 | 85     | 15      | gel branco, coagulado e apresenta estrutura homogênea.                                                                                          |
| 7    | 4      | 7,5 | 85     | 15      | gel transparente, semelhante ao experimento 1 e 3, porém um pouco mais esbranquiçado, sua textura desmancha-se em contato com a colher.         |
| 8    | 8      | 7,5 | 85     | 45      | gel semi-transparente, esbranquiçado, aparência estranha, muito duro.                                                                           |
| 9    |        |     |        |         | gel semi-transparente e branco-amarelado,                                                                                                       |
| 10   | 6      | 6,5 | 65     | 30      | melhor textura para cortar com a colher. Boa                                                                                                    |
| 11   |        |     |        |         | textura na boca, gel homogêneo.                                                                                                                 |





**Figura 4** Influência da % de proteína, pH, tempo e temperatura de aquecimento, tendo-se como respostas dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade de géis mistos, contendo 60% WPI e 40% GB, obtidos por planejamento fatorial fracionário.

A mastigabilidade e gomosidade apresentaram valores próximos, pois, a gomosidade refere-se à energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido no ponto ideal para a mastigação, enquanto que a mastigabilidade está relacionada com o tempo requerido para mastigar um alimento sólido até a deglutição.

A coesividade e a elasticidade são variáveis do perfil de textura correlacionadas, pois verifica-se através destes dados o grau de compressão do alimento antes do rompimento sob pressão e o quanto ele retorna após a compressão dos dentes, respectivamente. Nas condições estudadas, verificou-se que a menor elasticidade foi de 0,84 para o experimento 5, que apresentou os níveis mínimos de concentração de proteína, pH e os níveis máximos de tempo e temperatura, significando que nessas condições o gel formado apresentou uma maior sensibilidade à ruptura. Observou-se que a menor coesividade também foi obtida nesse experimento, o que está relacionado com a menor dureza do gel formado.

Resultados semelhantes foram observados no experimento 7, em que géis foram obtidos em pH 7,5, aquecidos a 85° por 15 minutos. Porém, na concentração de proteína 4%, observou-se que a variável que exerceu maior efeito nas características do gel foi a concentração de proteína, com possível interação do pH com a temperatura de aquecimento.

As características sensoriais do gel do experimento 5 indicaram uma possível relação do pH ácido com a temperatura, pois os géis apresentaram-se coagulados, não homogêneos após o aquecimento. Segundo JOST (1993), os géis obtidos em pHs próximos ao ponto isoelétrico são inferiores em textura, completamente opacos, não elásticos e apresentam sinérese. Nesta região de pH, o gel pode também degenerar-se para um coágulo. No experimento 7 não se obteve um gel coagulado, provavelmente em função do pH (7,5); no entanto, acredita-se que o tempo de 15 minutos de aquecimento tenha sido insuficiente, por isso o gel apresentou fraca textura e desmanchava-se com facilidade.

Com base nas observações, a textura ideal estimada deve estar entre 270 - 310 g-força de dureza, indicados no gráfico pelas linhas pontilhadas, o que está relacionado às condições experimentais do ponto central, mastigabilidade e

gomosidade próximas a 265 g-força, e elasticidade e coesividade elevadas 0,87-0,96.

Os efeitos da % de proteína, pH, temperatura e tempo de aquecimento estão representados na Tabela 6 e as ilustrações na Figura 5.

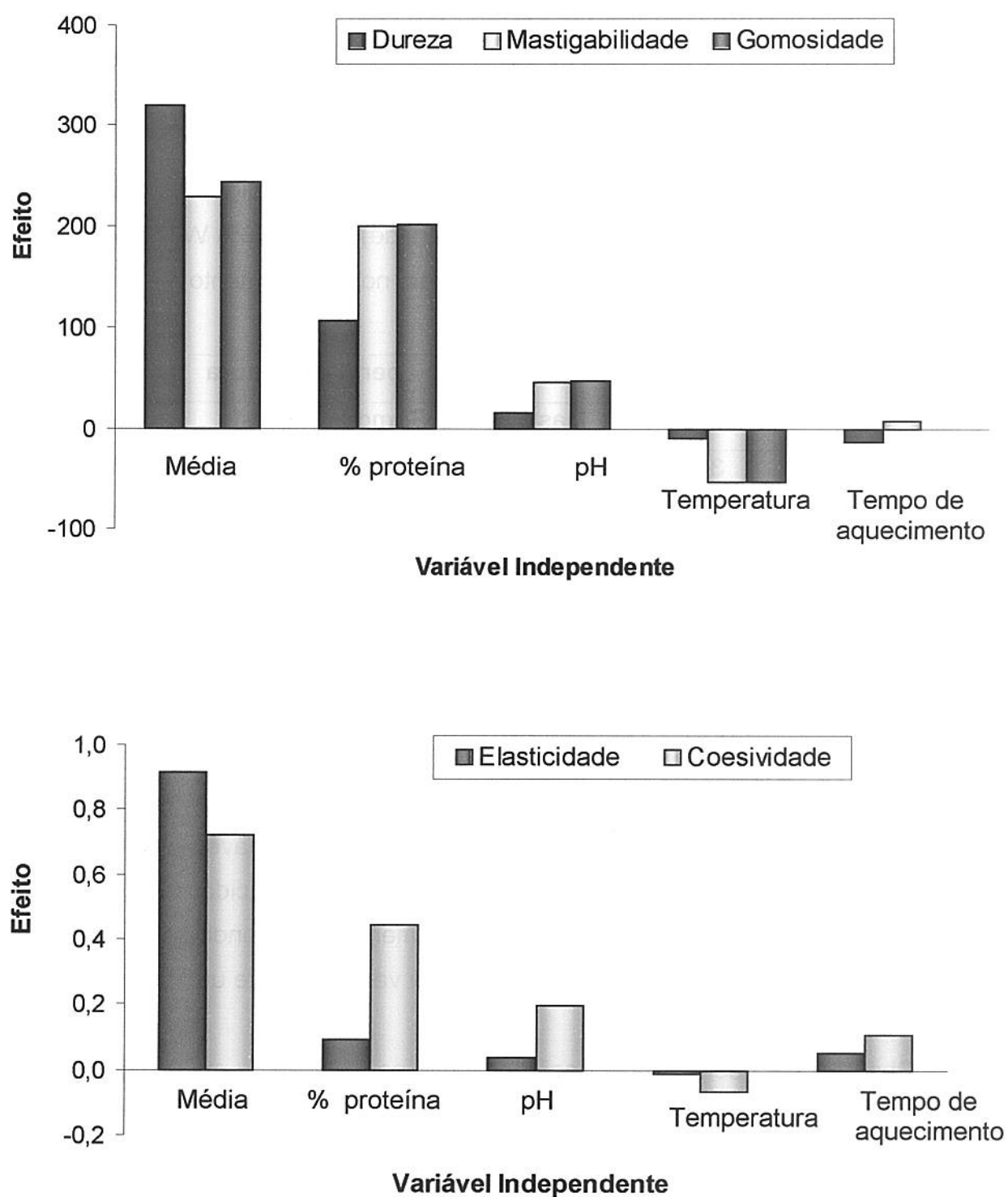
**Tabela 6** Efeitos do perfil de textura dos géis (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade) mistos 60% WPI e 40% GB, determinados através das variáveis estudadas no planejamento ( $2^{4-1}$ ) fatorial fracionário.

| Efeitos        | Respostas – perfil de textura |         |         |        |        |
|----------------|-------------------------------|---------|---------|--------|--------|
|                | Dureza                        | Mastig. | Gomo.   | Elast. | Coes.  |
| Média          | 319,18*                       | 228,22* | 243,43* | 0,92*  | 0,72*  |
| % proteína     | 107,07*                       | 198,95* | 201,04* | 0,09*  | 0,44*  |
| pH             | 15,77*                        | 45,77*  | 47,31*  | 0,04*  | 0,20*  |
| Temperatura °C | -9,92*                        | -53,26* | -54,17* | -0,01  | -0,07* |
| Tempo (°C)     | -14,18*                       | 8,08    | -1,22   | 0,05*  | 0,11*  |

\* diferenças estatísticas com 95% de confiança

Verificou-se que a dureza, coesividade e mastigabilidade apresentaram características próximas em relação à influência de cada variável. A coesividade não apresenta relação com nenhuma outra resposta e a elasticidade do gel não é um bom parâmetro para ser analisado, pelo menos nas condições estudadas nesse planejamento, devido à sua baixa taxa de variação entre um experimento e outro.

Observou-se que a concentração de proteína apresentou efeito significativo positivo na dureza, mastigabilidade e gomosidade; isso significa que quanto maior a % de proteína, maior serão estas respostas, ou seja, mais duro e gomoso será o gel. No entanto, sabe-se que para os parâmetros de desenvolvimento de um produto, nem sempre aquele de textura mais elevada é o melhor, pois associados a estas respostas, devem ser analisadas as características sensoriais do produto, por isso a análise empírica de textura tornam-se oportuna (Tabela 5).



**Figura 5** Efeitos das respostas de elasticidade e coesividade, tendo-se como variáveis a % de proteína, pH, temperatura e tempo de aquecimento.

Quanto à temperatura e ao tempo de aquecimento, observou-se que estes fatores apresentaram um efeito negativo nas características dos géis produzidos, sendo que quanto maior a temperatura e/ou o tempo de aquecimento, menos gomoso e menor a dureza do gel, nas condições estudadas. Utilizaram-se temperaturas variando de 45 a 85°C e tempos de aquecimento de 15 a 45 minutos.

O pH exerceu o menor efeito dentre as variáveis estudadas. Para melhor identificação da influência deste parâmetro, desenvolveu-se o planejamento fatorial completo. Quando analisada a coesividade dos géis mistos, identificou-se que a concentração de proteína e o pH exerceram efeitos positivos na resposta, enquanto que a temperatura de aquecimento do gel exerceu um efeito negativo.

Das respostas analisadas, a elasticidade foi a variável menos influenciada pelas mudanças das variáveis independentes, não sendo considerada um bom parâmetro para a análise da qualidade dos géis nas condições estudadas.

### **3.3 Capacidade de retenção de água (CRA) dos géis**

A capacidade de retenção de água dos géis de gelatina e mistos produzidos nas condições do ponto central, ou seja, contendo 6% de proteína, solubilizadas em pH 6,5 (tampão fosfato) e aquecidos a 65°C durante 30 minutos foram analisadas. Observou-se que a CRA do gel de gelatina foi de 23,21% , inferior à do gel misto 60:40 (48,61%), nas mesmas condições estudadas, ou seja, os géis de gelatina apresentaram uma menor capacidade de retenção de água em sua matriz.

A capacidade de retenção de água é uma das principais e desejáveis propriedades funcionais de um gel. A água é retida na estrutura do gel por forças de capilaridade ou, simplesmente, é aprisionada na malha geleificada. Na maior parte dos estudos efetuados, a capacidade de retenção de água foi avaliada recorrendo a técnicas de centrifugação e quantificação da água expelida do gel por diferença de peso.

Neste tipo de ensaio, convém salientar que as amostras estão sujeitas a forças centrífugas relativamente altas e a quantidade de água que sai da amostra

vai depender não só da capacidade intrínseca do gel de reter água, mas também da compressibilidade do próprio gel (maior compressibilidade implicará maior quantidade de água expelida) (OTTE et al., 2000).

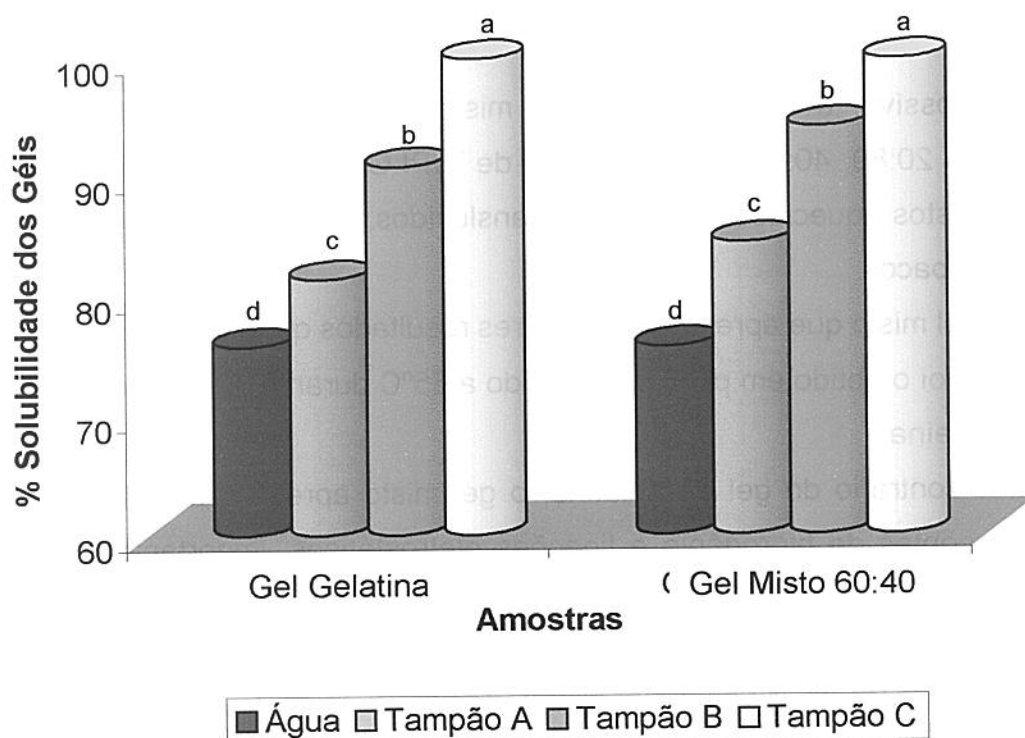
A CRA de um gel refere-se à habilidade da proteína de absorver e reter água dentro da matriz protéica, contra a aplicação de força gravitacional. Essa água é a soma da água ligada, água livre e água fisicamente retida no gel (DAMODARAM, 1996). Essa capacidade é muito útil no desenvolvimento de novos produtos, como salsichas, produtos de panificação e sistemas geleificados, e depende basicamente da interação da água com a proteína (PUPPO, et al. 1995; DAMODARAM, 1996).

### 3.4 Solubilidade (%SP) dos géis

A solubilidade dos géis em, água, tampão A (Tris-glicina-EDTA, pH 8,0); tampão B (solvente A+ Uréia 6M + 0,5% SDS) e tampão C( solvente B + 10mM de DTT) é representada na Figura 6.

As interações proteína-proteína podem ser fracas e reversíveis, ou covalentes. As ligações intermoleculares fracas são, essencialmente, de três tipos: a) interações hidrofóbicas (5-10 KJ/mol), resultam da exposição de grupos hidrofóbicos durante a desnaturação; b) pontes de hidrogênio (10-40 KJ/mol), resultam da interação entre cadeias laterais hidrofílicas de aminoácidos e c) interações eletrostáticas (25-80 KJ/mol), que resultam de interações entre grupos de cargas contrárias. As ligações covalentes (200-400 KJ/mol) estabelecem-se, majoritariamente, entre grupos sulfidríla (ligações dissulfeto) (NIELSEN, 1995).

Tanto o gel de gelatina, como gel misto 60/40% WPI/GB apresentaram o mesmo comportamento, sendo mais solúveis em tampão C, seguido de tampão B, A e menor solubilidade em água. A elevada solubilidade do gel no tampão B indica que as ligações não covalentes são importantes na manutenção da rede do gel e a solubilidade no tampão C, que contém DTT, foi 100%, indicando haver participação importante de ligações dissulfeto na estruturação do gel.



**Figura 6** Solubilidade dos géis de gelatina e de géis mistos, em água ou diferentes tampões, em temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Os géis foram elaborados contendo 6% de proteína e aquecidos a  $65^{\circ}$  por 30 minutos (Tampão A= 0,086M Tris, 0,09M glicina, 4mM EDTA dissódico –  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 8,0; Tampão B= contendo solvente A mais 8M de uréia e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tampão C= solvente B + 10mM de ditiotreitól -DTT). Letras iguais indicam que não houve diferenças estatísticas a 95% de confiança.

Os tampões A e B parecem ter influenciado mais a solubilidade do gel misto do que o gel de gelatina, sugerindo maior importância relativa das ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.



## 4 CONCLUSÃO

É possível a obtenção de géis mistos, contendo 5% de proteína, nas proporções 20:80, 40:60, 50:50 e 60:40 de WPI:GB em tampão fosfato (pH 6,5). Os géis mistos aquecidos a 70°C são translúcidos, enquanto que os aquecidos a 80°C são opacos.

O gel misto que apresentou melhores resultados quanto ao perfil sensorial e de textura foi o obtido em pH 6,5, aquecido a 65°C durante 30 minutos e contendo 6% de proteína.

Ao contrário do gel de gelatina, o gel misto apresentou na sua estrutura, além de pontes de hidrogênio e ligações eletrostáticas, importante contribuição das interações hidrofóbicas e de ligações dissulfeto, resultando em capacidade de retenção de água.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, I.D. Produção e caracterização de microcapsulas obtidas por spray drying e coaservação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2005, 243 pg.

ANDRADE, C.T.; NASSER, R.O. Estudo Reológico da gelificação induzida pelo calor de proteínas do soro do leite e dos géis resultantes das condições variadas de pH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p.315-321, 2005.

BANAVARA, D.S., ANUPAMA, D., RANKIN, S.A. Studies on physicochemical and functional properties of commercial sweet whey powders. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3866-3875, 2003.

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.



BERTAN, L.C. Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 148p. 2003.

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

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

BOURNE, M. C. **Food texture and viscosity: concept and measurement**. New York: Academic Press, 1982, 325p. 1998?

BOURNE, M.C.; Texture profile of ripening pears. **Journal of Food Science**, v.2, p.223-226, 1998.

CHAMBI, H.N.M. Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004, 99p.

CHO, S.M.; KWAK, K.S.; PARK, D.C. ; GU, Y.S.; JI, C.I., JANG, D.H.; LEE, Y.B.; KIM, S.B. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.573–579, 2004.

DAMODARAM, S. Functional Properties. In: **Food Proteins – properties and chacarcterization**. Shryo Nakai and H. Wayne Modler (Eds). New York: Wiley-VCH, Cap.4, p.167-234, 1996.

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

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal Biological Chemistry**, v.177, p. 751-766, 1949.

HOWEL, N.K.; YEBOAH, N.; LEWIS, D. studies on the eletrostatic interactions of lysozyme with  $\alpha$ -lactalbumina and  $\beta$ -lactoglobulin. **International Journal of Food Science and Technology**, v.30, p.321-334, 1995.

IPSEN, R.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L.H.; QVIST, K.B. Gelation of whey protein induced by high pressure. **Milchwissenschaft**, v.57, n.11/12, p.650-653, 2002.

JAUGUERI, C.A.; REGESTEIN, J.M.; BAKER, R.C. A simple centrifugal method for measuring expressible moisture, a water-binding property of muscle foods. **Journal of Food Science**, v.46, n.4, p.1271-1272, 1981.

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

MANGINO, M.E.; KIM, J.H.; DUNKERLEY, J.A.; ZADOW, J. G. Factors important to the gelation of whey protein concentrates. **Food Hydrocolloids**, v.1, n.4, p.277-282, 1987.

MARANGONI, A.G.; BGARBUT, S.; McGAULEY, S.E.; MARCONE, S.; NARINE, S.S. On the structure of particulate gels-the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.61-74, 2000.

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

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

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

NIELSSEN, P.M. Reactions and potential applications of transglutaminase. Review of literature and patents. **Food Biotechnology**, v.9, n.3, p.119-156, 1995.

OTTE, J., LOMHOLT, S.B.; IPSEN, R.H.; QVIST, K.B. effect of partial hydrolysis with an immobilized proteinase on thermal gelation properties of B-lactoglobulin B. **Journal of Dairy Research**, v.67, p. 597-608, 2000.

POPPE, J. Gelatin. In; IMESON, A. (Ed.) **Thickening and Gelling agents for Food**, 2 nd, Ed. London: Blackie Academic and Professional, Cap. 7, p.144-179, 1997.

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**, v.43, p.2356-2361, 1995.

SGARBIERI, V.C. Propriedades Fisiológicas Funcionais das Proteínas de Soro de Leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, 2004.

SGARBIERI, V. C. Propriedades Funcionais de proteínas em Alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência de Tecnologia de alimentos**, v.32, p.105-126, 1998.

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

TORRES, D.P.M. Gelificação térmica de hidrolizados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino – comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos. Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos. Braga, 2005, 100p.

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

VEITH, P.D.; REYNOLDS, E.C. Production of a high gel strength whey protein concentrate from chesse whey. **Journal of Dairy Science**, v.87, p. 831-840, 2004.

YONG, Z.; KILARA, A. Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.1830-1835, 1998.

WALKENSTRÖM, P.; HERMANSSON, A.M. Fine-stranded mixed gels of whey proteins and gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.11, n.4, p. 457-470, 1997

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

# **CARACTERIZAÇÃO DE GÉIS MISTOS DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE (WPI) E GELATINA BOVINA (GB): INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E DO pH**

**J.A. ROMAN, V.C. SGARBIERI**

## **RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi o de verificar a influência da variável concentração de proteína (3,2 a 8,8%) e do pH (5,1 a 7,9) em relação ao tempo de aquecimento de 65°C durante 30 min. Foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), formado de 11 ensaios. O perfil de textura foi determinado em texturômetro TAX-T2. Em todas as condições estudadas, as soluções aquecidas a 65°C durante 30 min formaram géis no resfriamento. A concentração de proteína exerceu um efeito positivo significativo a 95% de confiança em todas as respostas estudadas para os géis mistos 60:40 WPI:GB, enquanto que não houve influência significativa do pH na dureza, mastigabilidade e elasticidade. Os dados indicaram que quando se manteve o pH em 6,5 e variou-se a concentração de proteína de 3,2 a 8,8%, esta variável exerceu um efeito positivo significativo. Isso significa que quanto maior a concentração de proteína, maior será os atributos de dureza, mastigabilidade e gomosidade. Quando observados os resultados do perfil de textura (dureza) dos géis mistos obtidos com concentração de proteína igual a 3,2%, os valores de dureza não foram superiores a 165g-força; no entanto, quando analisados os géis elaborados com 8,8% de proteína, os valores mínimos foram acima de 450g-força; e valores intermediários, próximos a 320g-força, foram resultados obtidos para géis com 6,0% de proteína. O pH não exerceu influência significativa quando se variou de 5,1 para 7,9, o valor da elasticidade passou de 0,97 para 0,92, enquanto que a coesividade mudou de 0,89 para 0,83. Contudo, a concentração de proteína, exerceu diferença

significativa quando se utilizou 3,2%, mostrando uma menor elasticidade e coesividade dos géis mistos nestas condições.

**Palavras-chave:** gelatina, proteína do soro de leite, gel misto, perfil de textura, superfície de resposta

## SUMMARY

The objective of the present study was to verify the influence of two independent variables, protein concentration (3.2-8.8%) and of pH (5.1-7.9), heating at 65°C for 30 min, on the texture attributes of gels obtained from the protein mixture 60:40% whey protein isolate (WPI) and bovine gelatin (GB). The statistical experimental design was a Central Composite Rotational Design with a total of 11 experiments. The texture profiles were determined in a TAX-T<sub>2</sub> texturometer. Protein concentration exerted a significant positive effect at 95% confidence level for all studied attributes. There was no significant effect of pH on hardness, chewiness and elasticity. The results obtained by maintaining a fixed pH (6.5) and varying protein concentration from 3.2 to 8.8% showed a significant positive effect on hardness, chewiness and gomosity. Texture profile for hardness at 3.2% protein concentration generated the lowest values, not superior to 165g-force, however the values obtained at 8.8% protein concentration were above 400, whereas intermediate values around 300 were obtained with 6% protein gels. The pH did not significantly influence the elasticity value with change from 5.1 to 7.9, the elasticity 0.97 to 0.92 while the coesivity varied from 0.89 to 0.83 for the same range. Nevertheless protein concentration exerted significant difference on elasticity at 3.2% showing lower values of both elasticity and coesivity under these conditions.

**Keywords:** gelatin, milk whey protein, mixed gel, texture profile, surface response.

## 1 INTRODUÇÃO

As proteínas do leite têm sido extensivamente estudadas por mais de 50 anos. O conhecimento deste sistema complexo de proteínas envolve avanços da tecnologia. As proteínas do leite apresentam elevado valor nutritivo e excelente propriedades funcionais, tanto de interesse tecnológico como fisiológico (SGARBIERI e PACHECO, 1999; SGARBIERI, 2004; PACHECO et al., 2005).

O leite é composto de água, lactose, gordura, sais e proteína. As proteínas podem ser divididas em dois grandes grupos: as caseínas, insolúveis em pH 4,6 e 20°C, e as proteínas do soro (MAUBOIS e OLLIVER, 1997; AIMUTIS, 2004).

O soro de leite desidratado é denominado soro em pó e contém em média 12,5% de proteínas. Por ser muito rico em lactose (74%) e cinzas (8%) sua funcionalidade tecnológica é restrita. Quando o percentual de proteínas atinge entre 35 e 80% é que são obtidos os concentrados protéicos de soro, e acima de 90%, os isolados protéicos de soro (KILARA, 1994).

Os derivados do soro mais importantes são: o soro desmineralizado por troca iônica ou eletrodialise, muito utilizado para uso em formulações infantis; a lactose refinada; o concentrado protéico de soro, obtido por ultrafiltração com um conteúdo protéico que varia de 35 a 80% (MULVIHILL e ENNIS, 2003; TOLKACH e KULOZIK, 2006) e o isolado protéico de soro que contém acima de 90% de proteína, obtido por troca iônica e diafiltração (LA FUENTE et al., 2002; CANCINO et al., 2006).

A habilidade da proteína de formar agregado ou gel quando aquecida contribuiu para melhorar a viscosidade e a textura de muitos alimentos (EUSTON, 2004). Países como Estados Unidos, Austrália, Canadá, Nova Zelândia e nações da União Européia processam o soro, reconhecendo-o como ingrediente funcional e agregando valor à linha de produção da indústria láctea (ANTUNES, 2003).

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). Estudos sobre as propriedades de géis mistos caseína e isolado protéico de soro de leite (AGUILERA e KINSELLA, 1991), concentrado protéico de soro de leite e



glúten (LUPANO, 2000); concentrado protéico de soro de leite e soja (COMFORT e HOWELL, 2002; CHRONAKIS e KASAPIS, 1993; PAZ, 2004;) e géis mistos de concentrado protéico de soro de leite bovino e mel (YAMUL e LUPANO, 2003) têm sido encontrados na literatura.

O objetivo do presente estudo foi o de verificar a influência da concentração de proteína e do pH sob o perfil de textura de géis mistos, contendo 60% WPI e 40% GB.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL

Gelatina bovina, tipo A, produzida por hidrólise ácida, lote PFL 196/04, cedida pela empresa Gelita, Cotia-SP. Caracterizada como apresentando 240 *bloom*, viscosidade de 33-42 mPs, teor de proteína de 83%, umidade entre 8 e 13%, conteúdo de cinza inferior a 2,0% e pH entre 5,0-6,0 em solução de 1%. Foi utilizado o isolado protéico de soro de leite, ALACEN 895, produzido industrialmente por troca iônica e ultrafiltração, com reduzido teor de lactose e gordura, adquirido da NZMP®, *New Zealand Milk Products*, São Paulo, Brasil.

A proporção na mistura protéica utilizada foi baseada no valor nutritivo de misturas entre WPI e hidrolisados de colágeno bovino (HCB), determinada por ZIEGLER (2006), através de ensaios biológicos com ratos Wistar recém desmamados. Chegou-se à composição aminoacídica mais indicada, levando-se em consideração aspectos nutricionais e econômicos e tendo-se por base o perfil de aminoácidos essenciais proposto pela FAO/WHO (1990).

### MÉTODOS

#### 2.1 Preparo dos géis mistos

Géis mistos, contendo 60% de WPI e 40% de GB foram elaborados através da geleificação termicamente induzida, em diferentes condições experimentais:



concentrações de proteína entre 3,2 e 8,8% e pH entre 5,1 e 7,9; sendo estes aquecidos (banho-maria) a 65°C por um período de 30min.

Depois de pesadas em balança analítica, adicionou-se a solução tampão (p/p) e aguardou-se intumescer durante 30 minutos; em seguida fez-se a dissolução em banho-maria, a 45°C, durante 15 minutos.

As amostras foram colocadas em tubos de vidro de formato cilíndrico, de 20mm de diâmetro e 80mm de altura, tampados no fundo com uma rolha de borracha e na parte superior por um filme plástico.

Em seguida, os tubos foram aquecidos em banho-maria, a 60°C, durante 30 minutos. Depois foram resfriados em banho de gelo durante 10 minutos e em seguida armazenados durante 5 horas a 4°C e, então, removidos dos tubos e analisados quanto ao perfil de textura.

## 2.2 Planejamento experimental completo

Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) analisando a porcentagem de proteína e o pH nas características de textura dos géis, totalizando 11 ensaios (RODRIGUES e IEMMA, 2005). As Tabela 1 e 2 apresentam os níveis estudados e a matriz dos ensaios realizados de superfície.

**Tabela 1** Níveis das variáveis do perfil de textura, utilizando delineamento composto central rotacional: influência da concentração de proteína (%P) e do pH.

| Variáveis | Níveis |     |     |     |        |
|-----------|--------|-----|-----|-----|--------|
|           | - 1,41 | -1  | 0*  | +1  | + 1,41 |
| %P        | 3,2    | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 8,8    |
| pH        | 5,1    | 5,5 | 6,5 | 7,5 | 7,9    |

\*Ponto central.

**Tabela 2** Matriz do delineamento composto central rotacional, com as variáveis codificadas e reais, em função da concentração de proteína (%P) e do pH, totalizando 11 ensaios.

| Ensaio | Valores Codificados |        | Valores Reais |     |
|--------|---------------------|--------|---------------|-----|
|        | %P                  | pH     | %P            | pH  |
| 1      | -1                  | -1     | 4,0           | 5,5 |
| 2      | 1                   | -1     | 8,0           | 5,5 |
| 3      | -1                  | 1      | 4,0           | 7,5 |
| 4      | 1                   | 1      | 8,0           | 7,5 |
| 5      | - 1,41              | 0      | 3,2           | 6,5 |
| 6      | + 1,41              | 0      | 8,8           | 6,5 |
| 7      | 0                   | - 1,41 | 6,0           | 5,1 |
| 8      | 0                   | + 1,41 | 6,0           | 7,9 |
| 9      | 0                   | 0      | 6,0           | 6,5 |
| 10     | 0                   | 0      | 6,0           | 6,5 |
| 11     | 0                   | 0      | 6,0           | 6,5 |

O planejamento experimental foi composto por um delineamento com 2 variáveis independentes em cinco níveis de variação, tendo-se alterado a concentração de proteína (3,2 a 8,8) e o pH (5,1 a 7,9), analisando-se as respostas do perfil de textura do gel misto.

### 2.3 Perfil de textura

Amostras à temperatura ambiente, com 2,0cm de diâmetro e 1,0cm de altura, foram comprimidas por um probe cilíndrico acrílico de fundo chato com 5cm de diâmetro e os resultados obtidos da curva força x tempo foram calculados pelo programa Texture Expert versão 1.11 para TPA (*Texture Profile Analysis*), segundo método descrito por JU e KILARA (1998) e em texturômetro modelo TA XT-2 (*Stable Microsystems* SMS, Surrey, UK).

As respostas do planejamento fatorial completo foram obtidas por meio da análise do perfil de textura: dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e

coesividade. As condições de medida foram padronizadas em probe de calibração de 40mm, força de compressão de 5g e 50% de compressão, velocidade pré-teste, no teste e pós teste de 3mm/s. Foram analisados seis géis resultantes de cada condição estudada.

## 2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente segundo a metodologia de superfície de resposta, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). O *software Estatística for Windows* versão V foi utilizado para calcular os coeficientes de regressão, análise de variância (ANOVA) e coeficientes de correlação do modelo, bem como para gerar as superfícies de resposta.

Equações polinomiais de segunda ordem foram ajustadas para os dados experimentais do planejamento fatorial completo. As variáveis não significativas a 95% de confiança foram colocadas no resíduo (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Perfil de textura dos géis mistos

As variáveis dependentes, respostas do perfil e textura em função do pH e da concentração de proteína estão apresentadas na Tabela 3. Os valores mínimos de dureza, mastigabilidade, gomosidade e elasticidade foram obtidos no menor nível estudado de concentração de proteína, o que corresponde a 3,2%, enquanto que os valores máximos foram correlacionados com a maior concentração de proteína estudada neste trabalho, 8,8%.

Das cinco respostas analisadas, apenas a coesividade, não seguiu a mesma tendência, sendo que o gel menos coeso foi o obtido com 4% de proteína em pH 5,5 (ensaio 1) e o valor máximo foi encontrado no ponto central (6% e pH 6,5).

**Tabela 3** Influência da concentração de proteína (%P) e do pH na dureza, mastigabilidade (mastig.), gomosidade (gomo.), elasticidade (elast.) e coesividade, (coes.) de géis mistos.

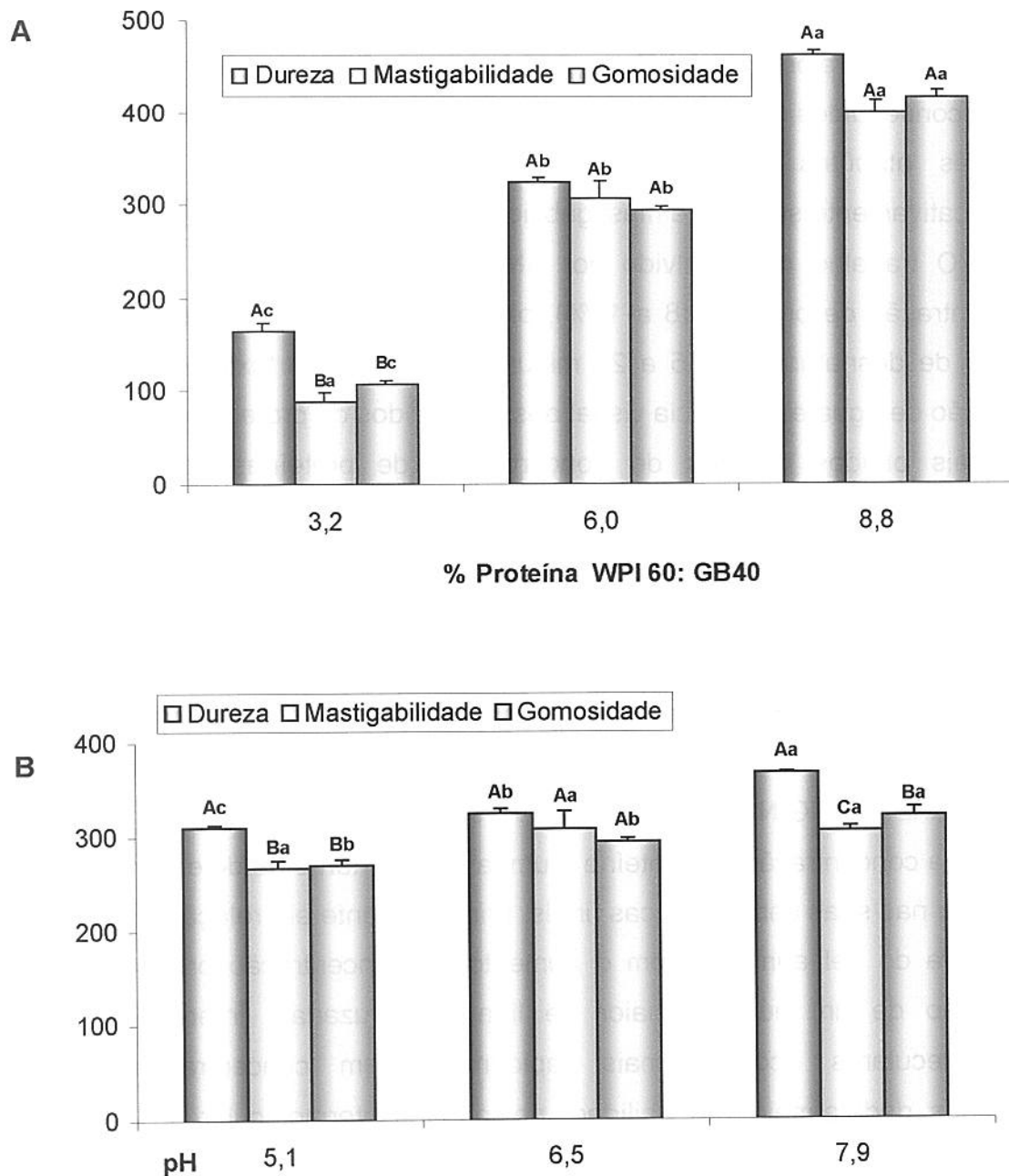
| Ensaio | Valores reais |     | Respostas  |                       |                     |                      |                     |
|--------|---------------|-----|------------|-----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
|        | %P            | pH  | Dureza (g) | Mastig <sup>1</sup> . | Gomo <sup>1</sup> . | Elast <sup>1</sup> . | Coes <sup>1</sup> . |
| 1      | 4,0           | 5,5 | 328,2      | 111,0                 | 118,4               | 0,87                 | 0,36                |
| 2      | 8,0           | 5,5 | 345,6      | 302,9                 | 313,5               | 0,95                 | 0,91                |
| 3      | 4,0           | 7,5 | 287,0      | 160,3                 | 173,9               | 0,92                 | 0,61                |
| 4      | 8,0           | 7,5 | 283,8      | 238,2                 | 247,2               | 0,96                 | 0,84                |
| 5      | 3,2           | 6,5 | 164,2      | 89,4                  | 107,2               | 0,69                 | 0,63                |
| 6      | 8,8           | 6,5 | 463,1      | 400,9                 | 417,6               | 0,97                 | 0,91                |
| 7      | 6,0           | 5,1 | 309,3      | 266,9                 | 269,5               | 0,98                 | 0,89                |
| 8      | 6,0           | 7,9 | 367,2      | 305,4                 | 321,4               | 0,95                 | 0,89                |
| 9      | 6,0           | 6,5 | 326,2      | 329,5                 | 293,5               | 0,97                 | 0,92                |
| 10     | 6,0           | 6,5 | 319,0      | 293,2                 | 298,5               | 0,96                 | 0,91                |
| 11     | 6,0           | 6,5 | 328,7      | 301,7                 | 290,9               | 0,96                 | 0,91                |

<sup>1</sup> medidas adimensionais

Os dados da dureza, mastigabilidade e gomosidade estão representados na Figura 1. Os dados indicam que quando se mantém o pH em 6,5 e varia-se a concentração de proteína de 3,2 a 8,8%, esta variável exerce um efeito positivo significativo. Isso indica que quanto maior a concentração de proteína, os valores de dureza, mastigabilidade e gomosidade serão significativamente mais elevados.

A dureza dos géis mistos obtidos com concentração de proteína igual a 3,2% não foi superior a 165 g-força. Todavia, quando analisados os géis elaborados com 8,8% de proteína, os valores mínimos foram acima de 463 g-força, e valores intermediários, próximos de 320 g-força, foram resultantes de géis com 6,0% de proteína (Figura 1 A).

Quando verificada a influência das variáveis independentes sobre os atributos (dureza, mastigabilidade e gomosidade), em função do pH, (Figura 1 B), observou-se que esta variável exerceu um efeito menos significativo que a concentração de proteína, mostrando pequenas variações.



**Figura 1** Análise da dureza (g-força), mastigabilidade<sup>1</sup> e gomosidade<sup>1</sup> de géis mistos de WPI:GB (60:40%). A- pH 6,5 e concentração de proteína 3,2; 6,0 e 8,8%; B- 6% de proteína e pH 5,1; 6,5 e 7,9. <sup>1</sup>adimensional. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os atributos de textura, em função da variável independente (% proteína ou pH). Letras minúsculas indicam diferenças em função da variação da concentração de proteína ou pH para o mesmo atributo (dureza, mastigabilidade ou gomosidade).

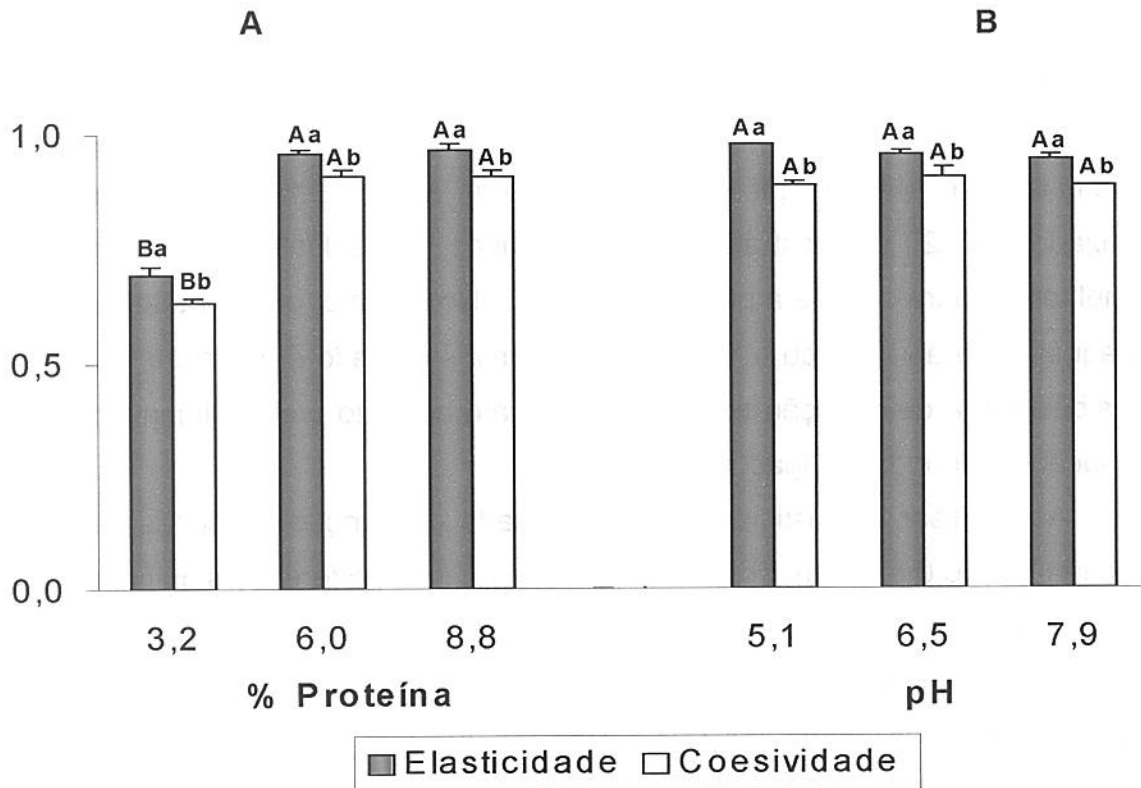
A dureza variou entre 285 e 367g-força e a mastigabilidade e gomosidade apresentaram valores entre 261 e 303 g-força, sendo que os valores máximos foram conseguidos com pH 7,9. Em pH 6,5 não houve diferença significativa entre os três atributos estudados, em pH 5,1 e em pH 7,9, a dureza foi significativamente superior à mastigabilidade e gomosidade.

O trabalho desenvolvido por ANTUNES (2004) avaliou a influência da concentração de proteína (8 a 12%), pH (4,0 a 5,2), temperatura (81 a 89°C) e tempo de desnaturação (15 a 27 minutos), no perfil de textura, capacidade de retenção de água e aparência visual dos géis ácidos de proteínas do soro de leite. Os géis obtidos a partir de concentrados de proteínas do soro de leite apresentaram os maiores valores de dureza, coesividade, elasticidade, gomosidade e capacidade de retenção de água, de maneira geral, nas maiores faixas de concentração protéica, tempo e temperatura de desnaturação (ANTUNES, 2004).

Com o aumento da concentração protéica ocorre modificação da textura dos géis, resultando em aumento da firmeza e intensificando a retenção de água pela matriz (MANGINO, 1984; SCHMIDT et al. 1978). Segundo PHILLIPS et al. (1994), a concentração de proteína é um fator importante na determinação do tipo de gel e nas suas características finais, principalmente em relação à textura, pois 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.

Dentre as principais características das proteínas do soro, a presença de aminoácidos sulfurados permite que elas formem ligações covalentes intermoleculares durante o processamento térmico (MORR e HA, 1993). MANGINO et al. (1987; 1992) observaram correlação positiva entre a firmeza do gel e a quantidade de grupos SH livres. Segundo HUDSON et al. (2000), as condições externas (temperatura, pH e força iônica) equilibram as forças atrativas e repulsivas proteína-proteína e proteína-solvente que, conseqüentemente, afetam as taxas de desnaturação e de agregação, determinando assim a estrutura final do gel.

Na Figura 2 estão representados os resultados de elasticidade e coesividade de géis mistos de WPI e GB (60:40): A em função da variação % de proteína (em pH 6,5) e B com alteração com pH (6% de proteína).



**Figura 2** Influência da variação da concentração de proteína (3,2; 6,0 e 8,8) em géis elaborados em pH 6,5) (A) e em função do pH (5,1; 6,5 e 7,9) de géis mistos obtidos com 6% de proteína (B). Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) do mesmo atributo em diferentes condições de concentração de proteína ou pH. Letras minúsculas comparam as respostas de elasticidade e coesividade em função da concentração de proteína ou pH.

Observou-se que o pH não exerceu influência significativa nem na elasticidade e nem na coesividade dos géis mistos quando variou 5,1 para 7,9. No entanto, ao se comparar esses dois atributos do perfil de textura, observou-se que os géis foram significativamente mais elásticos do que coesos nos três pHs avaliados.



Em pH neutro, a estrutura dos géis térmicos de proteínas de soro de leite bovino parece ser suportada, em grande parte, por interações hidrofóbicas (essencialmente) e por interações covalentes (HAVEA et al. 2004). A pH ácido, os géis formados, de natureza pouco elástica, parecem ser suportados essencialmente por pontes de hidrogênio (SHIMADA e CHEFTEL 1988).

Segundo ANDRADE e NASSER (2005), o processo de geleificação do concentrado protéico de soro leite teve início a 80°C e o gel menos rígido e de menor caráter elástico foi caracterizado em pH 7,0. Espectros mecânicos realizados a 20°C mostraram características viscoelásticas aparentemente semelhantes para os géis a pH 7,0 e a pH 4,6. No entanto, o gel obtido em pH 7,0 foi aquele que apresentou o caráter elástico mais elevado e demonstrou a menor sensibilidade à deformação sob essa temperatura, muito provavelmente devido à formação favorecida de ligações covalentes.

Ao analisar a elasticidade e coesividade em função da concentração de proteína (3,2; 6,0 e 8,8%), observou-se que não houve diferença significativa para ambos atributos, contendo 6 ou 8,8% de proteína, porém estes valores foram superiores aos obtidos quando se utilizou 3,2%, mostrando uma menor elasticidade e coesividade dos géis mistos nas menores concentrações.

Grande parte dos trabalhos publicados sobre geleificação das proteínas de concentrados protéicos de soro de leite (WPC) enfocou faixa de pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas do soro (COOPER et al. 1977; MOLDLER e EMMONS, 1976; SHIMADA e CHEFTEL, 1988; SHIMADA e CHEFTEL, 1989) ou acima (MANGINO et al., 1987, RATTRAY e JELEN, 1997; SCHMIDT et al., 1978).

No trabalho realizado por ANTUNES (2004), foi estudado a faixa correspondente ao pI das principais proteínas do WPC (4,0 e 5,2) para verificar seu comportamento quando aplicado na produção de alimentos ácidos, tais como iogurtes, verificando-se que géis formados em pH 4,0 apresentaram-se mais elásticos, opacos, amarelados e com maior capacidade de retenção de água, enquanto que os géis formados em pH 4,9 a 5,2 foram mais firmes, coesos, gomosos e brilhantes.

ANDRADE e NASSER (2005), estudaram o efeito do pH sobre a geleificação de um concentrado comercial de proteínas do soro do leite, em suspensões a 10% (m/m), avaliando-o por meio de medidas reológicas sob



cisalhamento oscilatório. Foram obtidas informações sobre a gelificação induzida pelo calor do sistema com uma mistura de proteínas globulares, e sobre o comportamento dos géis formados sob condições de pH neutro e ácido.

Foi verificado que em presença de teores significativos de sais, procedentes do próprio soro, a concentração usada nos experimentos (10%) foi suficiente para a formação de géis macroscópicos; além disso, verificou-se também que o pH exerce papel importante na formação e na natureza estrutural dos géis.

### 3.2 Análise dos efeitos

As variáveis lineares, quadráticas e suas interações fazem parte dos modelos para compor as superfícies de resposta. Os resultados dos efeitos das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 4 e Figura 3.

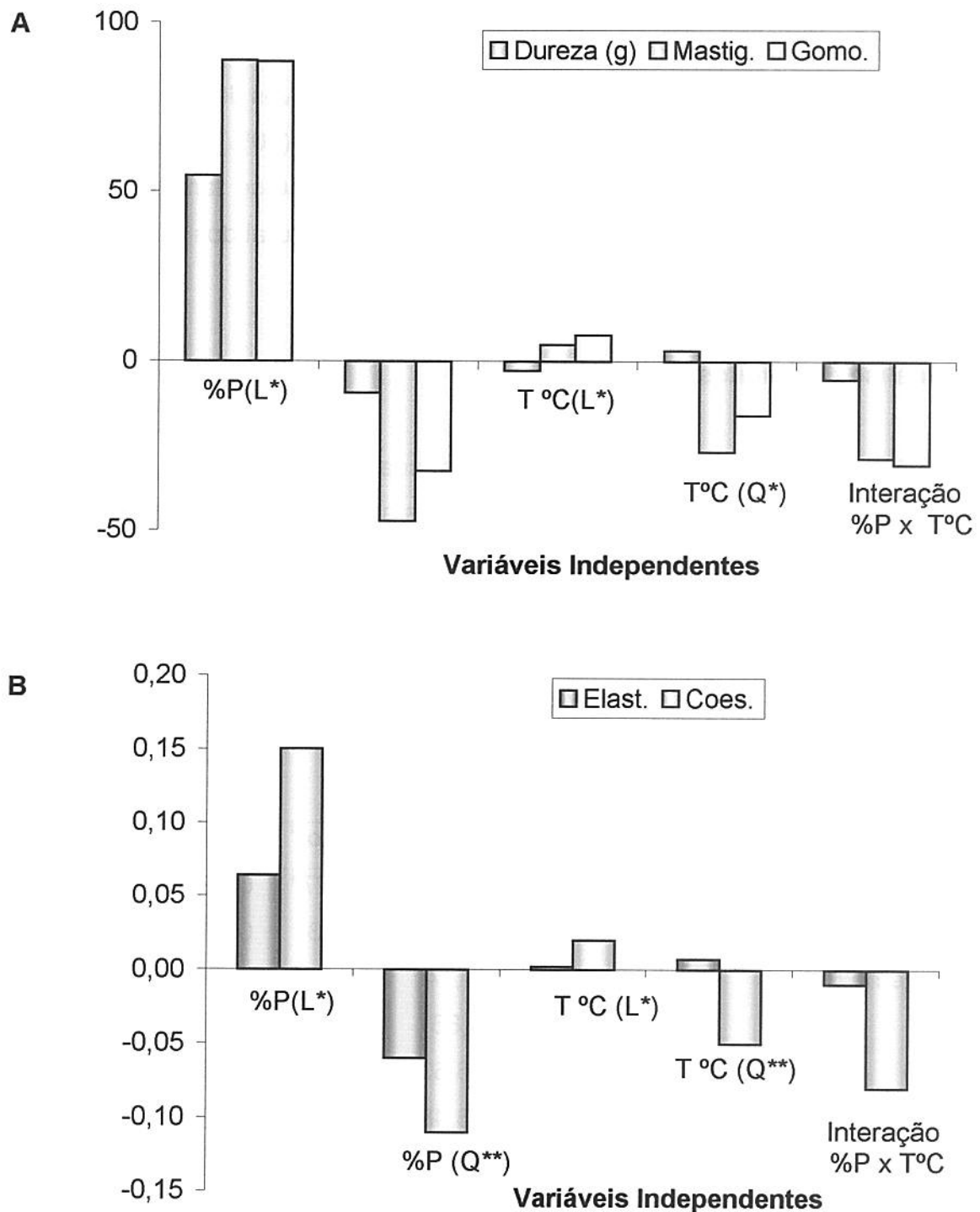
**Tabela 4** Coeficiente de regressão para as respostas de dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade de géis mistos aquecidos por 30 minutos (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade).

| Variáveis independentes | Dureza (g) | Mastig. <sup>1</sup> | Gomo. <sup>1</sup> | Elast. <sup>1</sup> | Coes. <sup>1</sup> |
|-------------------------|------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Média                   | 324,61*    | 308,13*              | 294,27*            | 0,963*              | 0,91*              |
| % Proteína (L)          | 54,62*     | 88,79*               | 88,43*             | 0,064*              | 0,15*              |
| % Proteína (Q)          | -9,18*     | -47,14*              | -32,35*            | -0,060*             | -0,11*             |
| pH (L)                  | -2,64      | 4,86                 | 7,81*              | 0,002               | 0,02*              |
| pH (Q)                  | 3,13       | -26,63               | -15,83*            | 0,007               | -0,05*             |
| % proteína x pH         | -5,15      | -28,48               | -30,45*            | -0,010              | -0,08*             |

\* diferenças estatísticas em 95% de confiança; <sup>1</sup> medidas adimensionais

(L) linear; (Q) quadrática.

Por meio da análise de regressão foi verificado que a concentração de proteína é uma variável independente que, tanto na forma linear, quanto quadrática influência de forma significativa, os cinco atributos de textura analisados nesse estudo.



**Figura 3** Efeitos na dureza, mastigabilidade e gomosidade (A) e elasticidade e coesividade (B) de géis de gelatina em função da concentração de proteína (%P) e da temperatura (T°C). \*L: linear, \*\*Q: quadrática.

Já o pH e a interação %proteína x pH exercem influência significativa negativa na gomosidade e coesividade dos géis mistos de WPI e GB. Segundo ANTUNES (2004), para a coesividade, o pH também apresentou efeito significativo e positivo, a 95% de confiança.

### 3.3 Análise dos coeficientes variância e regressão

Os coeficientes de regressão das variáveis do processo, ao nível de significância de 5%, foram obtidos, e aparecem na Tabela 5. Observou-se que a concentração de proteína é uma variável significativa em todas as respostas do perfil de textura avaliados. No entanto o pH e a interação concentração de proteína x pH exerceram efeitos na gomosidade e coesividade.

**Tabela 5** Análise de variância e coeficiente de determinação a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ) de géis mistos (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade).

| Parâmetros                      | Dureza (g) | Mastig. <sup>1</sup> | Gomo. <sup>1</sup> | Elast. <sup>1</sup> | Coes. <sup>1</sup> |
|---------------------------------|------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Fcalculado                      | 0,96       | 6,25                 | 5,53               | 4,56                | 4,03               |
| Ftabelado                       | 5,05       | 5,05                 | 5,05               | 5,05                | 5,05               |
| Fcalculado/ Ftabelado           | 0,19       | 1,24                 | 1,10               | 0,90                | 0,80               |
| Variação explicável ( $R^2\%$ ) | 49,1       | 86,2                 | 84,7               | 82,0                | 80,1               |

<sup>1</sup> medidas adimensionais.

O teste F confere significância estatística ao modelo. A regressão é estatisticamente significativa se o valor de F calculado for maior que o valor de F tabelado. Observou-se na Tabela 5 que os parâmetros de mastigabilidade e gomosidade avaliados apresentaram  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ .

Os modelos para as variáveis independentes apresentaram bons ajustes, exceto para a dureza, sendo o  $R^2\%=49,1$  o que indicou que o modelo não é preditivo, por esse motivo não será apresentada a superfície de resposta da dureza dos géis mistos.

As equações que expressam os atributos de textura estudados (respostas) para a obtenção dos géis, que geraram as superfícies de resposta, estão apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6** Equações quadráticas que expressam os atributos de textura estudados para os géis mistos com influência da concentração de proteína e do pH.

| Respostas       | Equações                                                                     |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Dureza          | $z = 324,61^* + 54,62x^* - 2,64y - 9,188x^{2*} - 5,25x.y - 3,13y^2$          |
| Mastigabilidade | $z = 308,13^* + 88,79x^* + 4,86y - 47,14x^{2*} - 28,48x.y - 26,63y^2$        |
| Gomosidade      | $z = 294,27^* + 88,43x^* - 7,81y^* - 32,35x^{2*} - 30,45x.y^* - 15,83y^{2*}$ |
| Elasticidade    | $z = 0,963^* + 0,064x^* + 0,002y - 0,060x^2 - 0,010x.y + 0,007y^2$           |
| Coesividade     | $z = 0,91^* + 0,15x^* + 0,02y^* - 0,11x^{2*} - 0,08x.y^* - 0,05y^{2*}$       |

\*Diferenças significativas a 95% de confiança.

z= resposta, x = concentração de proteína, y = pH,

x.y= interação concentração proteína . pH.

Observa-se que a concentração de proteína é a variável independente que influencia de forma significativa a dureza dos géis mistos, pois tem-se um perfil inclinado, indicando que, com o aumento da concentração de proteína, têm-se géis mais firmes. Já o pH, nas condições estudadas, não exerce influência na dureza dos géis contendo 60% de WPI e 40% de GB.

As superfícies de resposta da mastigabilidade e gomosidade (Figura 4), bem como da elasticidade e coesividade (Figura 5), apresentam-se semelhantes. Isso porque esses atributos do perfil de textura estão relacionados.

A mastigabilidade e gomosidade apresentaram valores próximos, pois, a gomosidade refere-se à energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido ao ponto ideal para a mastigação, enquanto que a mastigabilidade está relacionada com o tempo requerido para mastigar um alimento sólido até a deglutição, ou seja, a mastigabilidade representa a coesividade x elasticidade (ANTUNES, 2004).

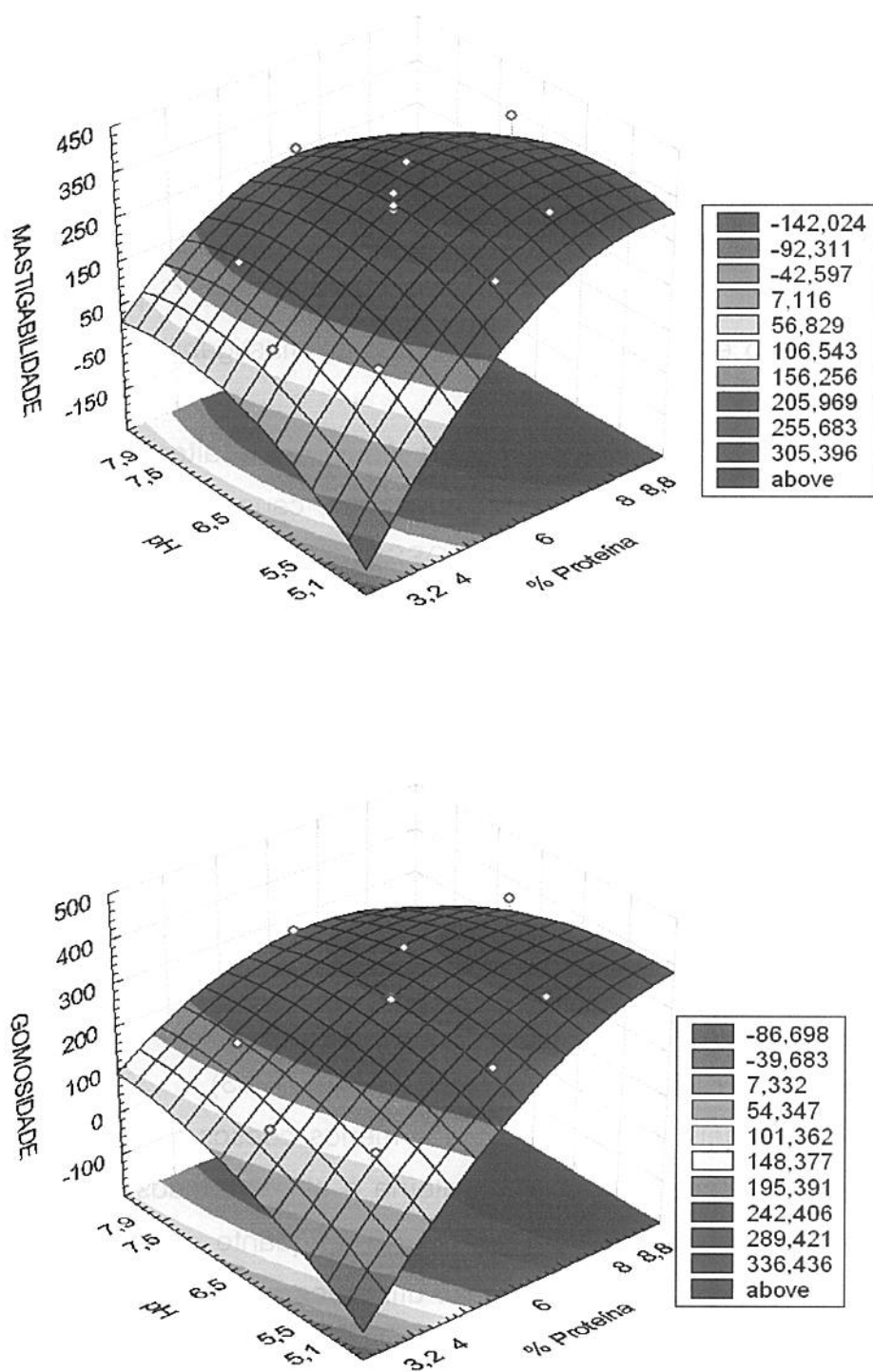
A coesividade é verificada através do grau de compressão do alimento antes do rompimento sob pressão e a elasticidade indica o quanto o alimento retorna após a compressão dos dentes (ANTUNES, 2004).

Os valores mínimos de mastigabilidade estão relacionados com o pH 5,1 e concentrações de proteína em torno de 3,2%, ou seja, nas menores condições das variáveis independentes avaliadas nesse trabalho. O valor máximo não ultrapassa 350, sendo este obtido com 8,8% de proteína. O pH exerce efeito negativo, resultando em valores mais elevados de mastigabilidade e gomosidade em pHs entre 5,0 e 5,1.

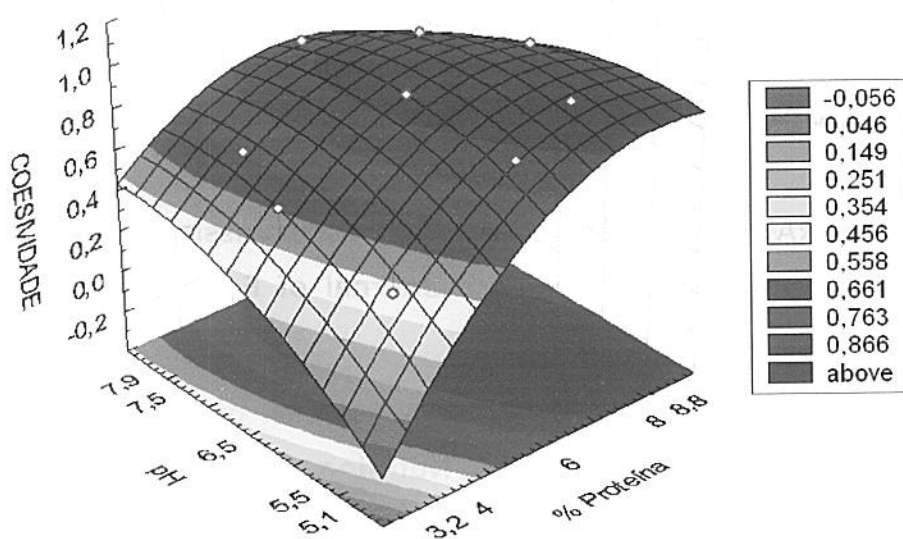
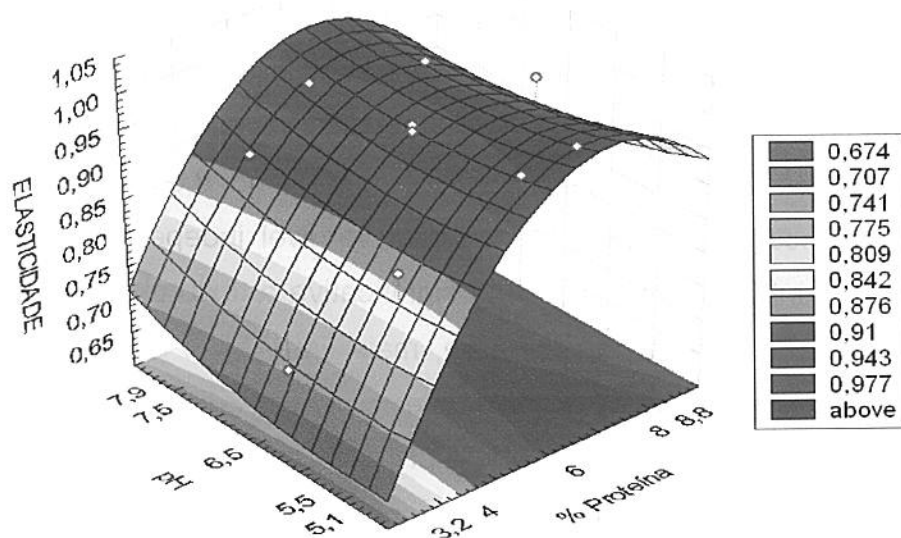
O pH, assim como a força iônica, pode alterar a distribuição das cargas entre as cadeias laterais das proteínas, causando aumento ou diminuição das interações proteína-proteína (GOSSETT et al. 1984). O concentrado protéico é composto por quatro frações protéicas principais que apresentam pontos isoelétricos de 5,2 ( $\beta$ -lactoglobulina), 4,2-4,5 ( $\alpha$ -lactoalbumina), 4,7-4,9 (albumina do soro bovino) e 5,5-8,3 (imunoglobulinas). As proteínas do soro em sua forma nativa permanecem solúveis em seus pontos isoelétricos devido aos seus estados conformacionais globulares e compactos (MORR e HA, 1993).

O aquecimento de soluções de concentrado protéico de soro de leite em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico leva à formação de coágulos turvos e sujeitos à sinérese, devido às forças atrativas intensas entre as moléculas protéicas, resultando em géis frágeis e de reduzida elasticidade (BRANDENBERG et al., 1992; KINSELLA, 1984, MORR e HA, 1993).

Os géis menos elásticos e menos coesos foram obtidos nos níveis mais baixos de concentração de proteína e pH estudados, sendo que os valores de elasticidade variaram de 0,67 a 1,0, enquanto que os valores de coesividade podem ser inferiores a 4,0, caso utilizados as condições que correspondem a pH 5,1 e 5,5 e concentração de proteína de 3,2 e 4,0, respectivamente.



**Figura 4** Superfícies de resposta da mastigabilidade e gomosidade, tendo como variáveis independentes o pH e a concentração de proteína.



**Figura 5** Superfícies de resposta da elasticidade e coesividade, tendo como variáveis independentes o pH e a concentração de proteína.



## 4 CONCLUSÃO

Os valores mínimos de dureza, mastigabilidade, gomosidade e elasticidade foram obtidos no menor nível estudado, o que corresponde a 3,2% de proteína, enquanto que, os valores máximos foram correlacionados com a maior concentração de proteína estudada neste trabalho, 8,8%.

A concentração de proteína foi a variável independente que gerou efeitos positivos, influenciando de forma significativa a textura dos géis, ou seja, quanto maior a concentração de proteína, mais firme foi o gel em todas as respostas estudadas, exceto para a gomosidade.

O pH e a interação proteína x pH exerceram influência significativa negativa na gomosidade e coesividade dos géis mistos de WPI e GB na proporção 60:40.

O planejamento experimental elaborado permite dentro do que é exigido em termos práticos, uma boa descrição e previsão do comportamento de géis mistos, contendo 60% de isolado protéico de soro de leite bovino e 40% de gelatina bovina, em função da concentração de proteínas e do pH.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AIMUTIS, W.R. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.989-995, 2004.

ANDRADE, C.T.; NASSER, R.O. Estudo reológico da gelificação induzida pelo calor de proteínas do soro do leite e dos géis resultantes sob condições variadas de pH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.2, p.315-321, 2005.

ANTUNES, A.E.C.; MOTTA, E.M.P.; ANTUNES, A.J. Perfil de textura e capacidade de retenção de água de géis ácidos de concentrado protéico de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.183-189, 2003.



ANTUNES, A.E.C. influência do concentrado protéico do soro de leite e de culturas probióticas nas propriedades de logurtes naturais desnatados- Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004.

BOX, G.E.P; DRAPPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: Wiley, 1987.

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

CANCINO. B.; ESPINA, V.; ORELLANA, C. Whey concentration using microfiltration and ultrafiltration. **Desalination**, v.200, p. 557-558, 2006.

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

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

COOPER, H.R., HUGHES, I.R., MATTHEWS, M.E. Application of response surface methodology to the evaluation of whey protein gels systems. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, v. 12, n. 4, p. 248-252, 1977.

EUSTON, S.R. Computer simulation of proteins: adsorption, gelation and self-association. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.9, p.321-327, 2004.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation, Bethesda, 1990.

GOSSET, P.W., RIZVI, S.S. H., BAKER, R.C. Qualitative analysis of gelation in egg protein systems. **Food Technology**, v. 38, n. 5, p. 67-74, 1984.

HAVEA, P.; CARR, A.J.; CREAMER, L.K. The roles of disulphide and non-covalent bonding in the functional properties of heat-induced whey protein gels. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.330-339, 2004.

- HUDSON, H.M.; DAUBERT, C.R.; FOEGEDING, E.A. Rheological and physical properties of derivitized whey protein isolate powders. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3112-3119, 2000
- JU, Z.Y.; KILARA, A. Properties of gels induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant from calcium ion-aggregated whey protein isolate. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.5, p.1236-1243, 1998.
- KILARA, A. Whey protein functionality. In: HETTIARACHCHY, N. S., ZIEGLER, G. R. (Eds) **Protein functionality in food systems**, New York: Marcel Dekker, 1994, p. 325-355.
- KINSELLA, J.E. Milk proteins: physicochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.21, n.2, p.197-262, 1984.
- LA FUENTE, M.A.; HEMAR, Y.; TAMEHANA, M.; MUNRO, P.A.; SINGH, H. Process induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. **International Dairy Journal**, v.12, n.4, p.361-369, 2002.
- LUPANO, C. E. Gelation of mixed systems whey protein concentrate-gluten in acidic conditions. **Food Research International**, v.33, p.691-696, 2000.
- MANGINO, M.E. Physicochemical aspects of whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2711-2722, 1984.
- MANGINO, M.E., KIM, J.H., DUNKERLEY, J.A., ZADOW, J.G. Factors important to the gelation of whey protein concentrates. **Food Hydrocolloids**, v.1, n.4, p.277-282, 1987.
- MANGINO, M.E. Gelation of whey protein concentrates. **Food Technology**, v.46, n.1, p.114-117 1992.
- MAUBOIS, J.L.; OLLIVER, G. Extraction of milk protein In: DAMODARAN, S. e PARAF, A. **Food proteins and their applications**, New York, Marcel Dekker Inc., p.1.579-1.595, 1997.
- MOLDER, H.W., EMMONS, D.B. Properties of whey protein concentrate prepared by heating under acidic conditions. **Journal of Food Science**, v.60, n.2, p.177-184, 1976.

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

MULVIHILL, D.M.; ENNIS, M.P. **Functional milk proteins**: Production and utilisation. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry. Part B*, Vol. 1 (pp. 1175–1228). New York: Kluwer Academic, 2003.

PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G.; BALDINI, V.L.S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p.333-338, 2005.

PAZ, J.C.S.N. Geleificação de sistemas simples e mistos de isolados protéicos de soja e de soro de leite. Dissertação de mestrado. Universidade estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004, 93p.

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

RATTRAY, W., JELEN, P. Thermal stability of skim milk/whey protein solution blends. **Food Research International**, v.30, n.5, p.327-334, 1997.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Uma estratégia seqüencial de planejamentos. Editora Casa do Pão, p.326, 2005.

SCHMIDT, R.H., ILLINGWORTH, B.L., AHMED, E.M. Heat-induced gelation of peanut protein/whey protein blends. **Journal of Food Science**, v.43, n.2, p.613-615, 1978.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Alimentos Funcionais fisiológicos (revisão). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, n.1/2, p.7-19, 1999.

SGARBIERI, V.C. Propriedades Fisiológicas Funcionais das Proteínas de Soro de Leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, 2004.

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

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

TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Transport of whey proteins through 0,1um ceramic membrane: phenomena, modeling and consequences for concentration or diafiltration processes. **Desalination**, v.199, n.340-341, 2006.

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

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

ZIEGLER, F.L. Desenvolvimento de um produto dietético funcional para idosos. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Campinas, 2006, 243p.

# **CARACTERIZAÇÃO DE GÉIS MISTOS DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE E GELATINA BOVINA: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA, TEMPERATURA E TEMPO DE AQUECIMENTO.**

**J.A. ROMAN, V.C. SGARBIERI**

## **RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência da concentração de proteína (3,2 a 8,8%) e da temperatura (51 a 79°C) em relação ao tempo de aquecimento, entre 10 e 40 min, quanto ao perfil de textura de géis mistos, contendo 60% isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) e 40% gelatina bovina (GB). Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com 4 blocos de 11 ensaios, totalizando 44 experimentos. O perfil de textura foi determinado em texturômetro TAX-T<sub>2</sub>. De todas as condições estudadas, apenas na condição de 3,2% de proteína, soluções aquecidas a 65°C durante 10 min não formaram géis. A variável independente de concentração de proteína exerceu um efeito positivo significativo a 95% de confiança em todas as respostas estudadas dos géis mistos 60:40 WPI:GB. Contudo, não houve influência significativa da temperatura. A interação proteína x temperatura gerou efeito significativo positivo para a dureza dos géis e negativo para a elasticidade e coesividade. Os atributos mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade, quando os géis foram aquecidos durante 30 ou 40 min, obtiveram os valores mínimos a 79°C e valores máximos em 65°C. Quanto à elasticidade e coesividade dos géis mistos, a maioria apresentou valores próximos de 1,0, independente do tempo de aquecimento. O gel menos elástico e menos coeso foi obtido a 55°C, e continha 4% de proteína, resultando em valores que variaram entre 0,47 a 0,89 para elasticidade e 0,14 a 0,43 para coesividade. Os géis obtidos pelo aquecimento por 40min

apresentavam-se esbranquiçados, com aparência de coagulado e com elevada sinérese. Observou-se que as melhores percepções de dureza foram obtidas nos géis mistos com 6% de proteína, aquecidas a 65°C durante 30 min.

**Palavras-chave:** gelatina, proteína de soro de leite, gel misto, perfil de textura, superfície de resposta.

## SUMMARY

The objective of the present study was to verify the influence of protein concentration (3.2 to 8.8%) and of temperature (51 to 79°C) related to heating time between 10 and 40 min on the texture profiles of mixed gels containing 60% whey protein isolate (WPI) and 40% bovine gelatine (GB). A Central Composite Rotational Design (CCRD) with a total of 44 experiments was applied. The texture profile was determined in a TAX-T2 texturometer. From all studied conditions, only the condition with 3.2% protein solution heated at 65°C for 10 min did not form gel. The independent variable protein concentration exerted a significant positive effect, at 95% confidence, on all of the mixed gels attributes, while temperature did not influence gels properties significantly. Regarding mixed gels elasticity and cohesiveness, the majority presented values close to 1.0; independently of the heating time. The less elastic and less cohesive protein gel was obtained with 4% protein heating at 55°C. The values ranged from 0.47 to 0.89 for elasticity, and 0.14 to 0.43 for cohesiveness. The gels obtained by heating 40 min had a white and coagulated appearance showing elevated synerese. Best conditions for gel firmness were 6% protein, heating at 65°C for 30 minutes.

**Keywords:** gelatin, milk whey protein, mixed gels, texture profile, response surface.



## 1 INTRODUÇÃO

A capacidade de formar gel é uma importante propriedade funcional das proteínas para se obter textura desejável e boas características sensoriais dos alimentos (TOTOSAUS et al., 2002). O fenômeno de formação de gel é muito complexo e normalmente ocorre com o resfriamento da solução coloidal, após aquecimento prévio. Com o resfriamento, verifica-se um aumento de viscosidade até o ponto em que a rigidez se manifesta. A rede protéica formada é considerada como resultante de um equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-solvente e das forças repulsivas e de atração entre cadeias próximas (SGARBIERI, 1998).

A capacidade de um gel de apresentar viscosidade, rigidez e elasticidade é tida como uma função que depende do tipo de proteína, composição em aminoácidos, massa molecular, temperatura e tempo de aquecimento, grau de desnaturação causado pelo pH, concentração protéica e força iônica (SHIMADA e MATSUSHITA, 1981; GOSAL e ROSS-MURPHY, 2000; TOTOSAUS et al., 2002; FUENTE et al., 2002); outros fatores são interações iônicas, hidrofóbicas e sulfidríla livres.

Soluções de gelatina formam géis transparentes após refrigeração abaixo da temperatura de geleificação, normalmente próximo a 40°C (SEGTAN e ISAKSSON, 2004). Durante a geleificação, as cadeias apresentam uma desordem conformacional e regeneram parcialmente a estrutura tripla hélice do colágeno. Esse processo é termoreversível, pois a rede é estabilizada por ponte de hidrogênio (BIGI et al., 2004).

A dureza do gel e as propriedades físicas são as principais condições do gel de gelatina influenciadas pela extração da gelatina. Geralmente, quando a gelatina é extraída em temperaturas mais baixas o gel é mais rígido e exibe um grande valor de bloom o qual é mensurado pela dureza do gel (USTA et al., 2003).

Outros estudos verificaram comportamento reológico e mecânico de géis de gelatina (KASAPIS e SABLANI, 2005; OTTONE e DEIBER, 2005; OTTONE et al., 2005; CHIOU et al., 2006); em diferentes condições de alta pressão (MONTEIRO et al., 2002); temperatura de geleificação (MARANGONI e TOSH, 2005); presença de íon sódio, potássio e cálcio ou em presença de ácido cítrico (OAKENFULL e

SCOTT, 2003; SAITO, et al., 2004); tensão superficial (HYONO et al., 2004); viscosidade (HONE e HOWEL, 2002) e microestrutura (TOSH et al., 2003; MOHANTY e BOHIDAR, 2005).

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 comparadas às dos géis simples (TURGEON e OULD ELEYA, 2000). Estudos sobre as propriedades de géis mistos caseína e isolado protéico de soro de leite (AGUILERA e KINSELLA, 1991), concentrado protéico de soro de leite e glúten (LUPANO, 2000) concentrado protéico de soro de leite e soja (COMFORT e HOWELL, 2002; CHRONAKIS e KASAPIS, 1993; PAZ, 2004;) e géis mistos de concentrado protéico de soro de leite bovino e mel (YAMUL e LUPANO, 2003) foram descritos na literatura.

O objetivo desse estudo foi o de verificar a influência da concentração de proteína, da temperatura e tempo de aquecimento sobre o perfil de textura de géis mistos, contendo 60% WPI e 40% GB.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATERIAL**

Gelatina bovina, tipo A, produzida por tratamento ácido da pele bovina, lote PFL 196/04, cedida pela empresa Gelita South America, Cotia-SP. Caracterizada como apresentando 240 bloom, viscosidade de 33-42 mPs, teor de proteína de 83%, umidade entre 8 e 13%, conteúdo de cinza inferior a 2,0% e pH entre 5,0-6,0 (solução 1g/100mL). Foi utilizado o isolado protéico de soro de leite ALACEN 895, produzido por troca iônica e ultrafiltração, com reduzido teor de lactose e gordura, adquirido da NZMP®, New Zealand Milk Products, São Paulo, Brasil.

A proporção na mistura protéica utilizada foi baseada no valor nutritivo de misturas entre WPI e hidrolisados de colágeno bovino (HCB), determinado por ZIEGLER (2006). Através de ensaios biológicos com ratos Wistar recém



desmamados, chegou-se à composição aminoacídica mais indicada, levando-se em consideração aspectos nutricionais e econômicos e tendo-se por base o perfil de aminoácidos essenciais proposto pela FAO/WHO (1990).

## MÉTODOS

### 2.1 Delineamento Experimental

Géis contendo 60% WPI e 40% GB foram elaborados através da geleificação termicamente induzida, em diferentes condições experimentais. Estudou-se o efeito da concentração de proteína entre 3,2 e 8,8% e da temperatura entre 51 e 79°C em função do tempo de aquecimento de 10, 20, 30 e 40 minutos, que foi uma variável fixa para cada bloco de 11 ensaios, totalizando 44 ensaios, portanto foram feitos 4 delineamentos.

Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) analisando as características de textura dos géis mistos: dureza, elasticidade, mastigabilidade, gomosidade e coesividade (RODRIGUES e IEMMA, 2005). As Tabelas 1 e 2 apresentam os níveis estudados e a matriz dos ensaios realizados de superfície.

**Tabela 1** Níveis das variáveis do perfil de textura, utilizando-se um delineamento composto central rotacional: influência da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento dos géis mistos.

| Variáveis Independentes       | Níveis |     |     |     |        |
|-------------------------------|--------|-----|-----|-----|--------|
|                               | - 1,41 | -1  | 0*  | +1  | + 1,41 |
| Concentração de proteína (%P) | 3,2    | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 8,8    |
| Temperatura (T °C)            | 51     | 55  | 65  | 75  | 79     |

\*Ponto central.

**Tabela 2** Matriz do delineamento composto central rotacional, com as variáveis codificadas e reais, fixando-se o tempo de aquecimento, totalizando 11 ensaios.

| Ensaio | Valores Codificadas |        | Valores Reais |      |
|--------|---------------------|--------|---------------|------|
|        | %P                  | T °C   | %P            | T °C |
| 1      | -1                  | -1     | 4,0           | 55   |
| 2      | 1                   | -1     | 8,0           | 55   |
| 3      | -1                  | 1      | 4,0           | 75   |
| 4      | 1                   | 1      | 8,0           | 75   |
| 5      | - 1,41              | 0      | 3,2           | 65   |
| 6      | + 1,41              | 0      | 8,8           | 65   |
| 7      | 0                   | - 1,41 | 6,0           | 51   |
| 8      | 0                   | + 1,41 | 6,0           | 79   |
| 9      | 0                   | 0      | 6,0           | 65   |
| 10     | 0                   | 0      | 6,0           | 65   |
| 11     | 0                   | 0      | 6,0           | 65   |

%P= porcentagem de proteína, T °C= temperatura

## 2.2 Perfil de textura

Amostras à temperatura ambiente, com 2,0cm de diâmetro e 1,0cm de altura, foram comprimidas por um probe cilíndrico acrílico de fundo chato com 5 cm de diâmetro e os resultados obtidos da curva força x tempo foram calculados pelo programa *Texture Expert* versão 1.11 para TPA (*Texture Profile Analysis*).

A curva obtida para cada amostra resultou de dois ciclos de compressão que são relativos a parâmetros mecânicos da amostra; sendo dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade as características de interesse deste estudo, dos quais 3 parâmetros foram medidos pelo equipamento: dureza, coesividade e elasticidade e dois foram calculados: mastigabilidade e gomosidade.

Os perfis de textura dos géis obtidos foram analisados segundo método descrito por JU e KILARA (1998), em texturômetro modelo TAX-T<sub>2</sub> (*Stable Microsystems* SMS, Surrey, UK).

As condições de medida foram padronizadas em probe de calibração de 40mm, força de compressão de 5g e 50% de compressão, velocidade pré-teste, no teste e pós teste de 3mm/s. Foram analisados seis géis resultantes de cada condição estudada.

### 2.3 Aspecto visual

Para optar pelo melhor tempo de aquecimento estudado (entre 10 e 40 min) para a elaboração dos géis mistos de WPI:GB, na proporção 60:40%, utilizou-se como critério de avaliação a aparência dos géis mistos formados.

### 2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente segundo a metodologia de superfície de resposta, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). O software *Statística for Windows* versão V foi utilizado para calcular os coeficientes de regressão, análise de variância (ANOVA) e coeficientes de correlação do modelo, bem como para gerar as superfícies de resposta (RODRIGUES, IEMMA, 2005; CALADO, MONTGOMERY, 2003; NETO et al. 1995)..

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Perfil de textura dos géis mistos

Para a elaboração dos géis mistos, contendo 60% WPI e 40% GB, foram analisadas as influências do tempo de aquecimento do gel em 10, 20, 30 e 40 min., por meio de 44 experimentos (Tabela 3).

**Tabela 3** Influência da concentração de proteína (%P), temperatura (T°C) e tempo de aquecimento na dureza, mastigabilidade (mastig.), gomosidade (gomo.), elasticidade (elast.) e coesividade, (coes.) de géis mistos.

| Tempo   | Nº | Valores Reais |     | Respostas |         |        |        |       |
|---------|----|---------------|-----|-----------|---------|--------|--------|-------|
|         |    | %P            | T°C | Dureza    | Mastig. | Gomo.  | Elast. | Coes. |
| 10 min. | 1  | 4,0           | 55  | 181,00    | 19,78   | 34,47  | 0,58   | 0,19  |
|         | 2  | 8,0           | 55  | 270,80    | 250,92  | 257,80 | 0,97   | 0,95  |
|         | 3  | 4,0           | 75  | 231,17    | 175,03  | 182,61 | 0,96   | 0,79  |
|         | 4  | 8,0           | 75  | 353,76    | 412,25  | 332,58 | 1,00   | 0,94  |
|         | 5  | 3,2           | 65  | *         | *       | *      | *      | *     |
|         | 6  | 8,8           | 65  | 194,83    | 177,10  | 178,06 | 0,99   | 0,91  |
|         | 7  | 6,0           | 51  | 240,82    | 112,01  | 117,21 | 0,95   | 0,49  |
|         | 8  | 6,0           | 79  | 236,21    | 203,92  | 211,68 | 0,96   | 0,90  |
|         | 9  | 6,0           | 65  | 192,62    | 175,37  | 178,39 | 0,98   | 0,93  |
|         | 10 | 6,0           | 65  | 188,35    | 166,65  | 173,52 | 0,96   | 0,92  |
|         | 11 | 6,0           | 65  | 198,27    | 176,20  | 179,98 | 0,98   | 0,91  |
| 20 min. | 12 | 4,0           | 55  | 279,69    | 51,79   | 63,55  | 0,82   | 0,22  |
|         | 13 | 8,0           | 55  | 300,55    | 290,06  | 282,08 | 0,99   | 0,93  |
|         | 14 | 4,0           | 75  | 174,41    | 156,73  | 145,71 | 0,98   | 0,83  |
|         | 15 | 8,0           | 75  | 274,14    | 216,13  | 218,71 | 0,99   | 0,80  |
|         | 16 | 3,2           | 65  | 154,60    | 97,01   | 107,55 | 0,53   | 0,76  |
|         | 17 | 8,8           | 65  | 311,85    | 283,31  | 296,47 | 0,96   | 0,95  |
|         | 18 | 6,0           | 51  | 221,29    | 207,58  | 207,28 | 1,00   | 0,94  |
|         | 19 | 6,0           | 79  | 217,60    | 228,25  | 203,26 | 0,99   | 0,93  |
|         | 20 | 6,0           | 65  | 203,28    | 190,21  | 192,50 | 0,99   | 0,95  |
|         | 21 | 6,0           | 65  | 207,36    | 190,09  | 192,95 | 0,99   | 0,93  |
|         | 22 | 6,0           | 65  | 210,02    | 191,29  | 195,14 | 0,98   | 0,93  |
| 30 min. | 23 | 4,0           | 55  | 273,85    | 17,51   | 36,26  | 0,47   | 0,14  |
|         | 24 | 8,0           | 55  | 289,08    | 310,27  | 271,19 | 1,00   | 0,94  |
|         | 25 | 4,0           | 75  | 196,13    | 185,90  | 163,02 | 1,00   | 0,83  |
|         | 26 | 8,0           | 75  | 356,63    | 320,76  | 323,35 | 0,99   | 0,91  |
|         | 27 | 3,2           | 65  | 205,53    | 86,93   | 98,64  | 0,67   | 0,48  |
|         | 28 | 8,8           | 65  | 395,09    | 363,94  | 372,19 | 0,98   | 0,94  |
|         | 29 | 6,0           | 51  | 219,96    | 198,22  | 203,42 | 0,97   | 0,92  |
|         | 30 | 6,0           | 79  | 229,98    | 192,87  | 200,04 | 0,96   | 0,87  |
|         | 31 | 6,0           | 65  | 235,23    | 224,41  | 222,43 | 1,00   | 0,95  |
|         | 32 | 6,0           | 65  | 247,02    | 245,34  | 230,30 | 1,00   | 0,93  |
|         | 33 | 6,0           | 65  | 236,83    | 220,66  | 221,53 | 1,00   | 0,94  |
| 40 min. | 34 | 4,0           | 55  | 308,28    | 103,56  | 116,44 | 0,89   | 0,43  |
|         | 35 | 8,0           | 55  | 243,59    | 229,14  | 231,26 | 0,99   | 0,95  |
|         | 36 | 4,0           | 75  | 147,94    | 139,78  | 142,31 | 0,98   | 0,90  |
|         | 37 | 8,0           | 75  | 284,59    | 254,60  | 261,38 | 0,97   | 0,92  |
|         | 38 | 3,2           | 65  | 172,85    | 151,00  | 161,00 | 0,94   | 0,91  |
|         | 39 | 8,8           | 65  | 528,92    | 486,10  | 496,14 | 0,98   | 0,94  |
|         | 40 | 6,0           | 51  | 333,73    | 255,58  | 236,95 | 0,99   | 0,94  |
|         | 41 | 6,0           | 79  | 273,41    | 234,49  | 244,94 | 0,96   | 0,90  |
|         | 42 | 6,0           | 65  | 299,61    | 277,33  | 283,19 | 0,98   | 0,95  |
|         | 43 | 6,0           | 65  | 296,32    | 293,89  | 282,17 | 1,00   | 0,95  |
|         | 44 | 6,0           | 65  | 291,04    | 267,18  | 272,01 | 0,98   | 0,94  |

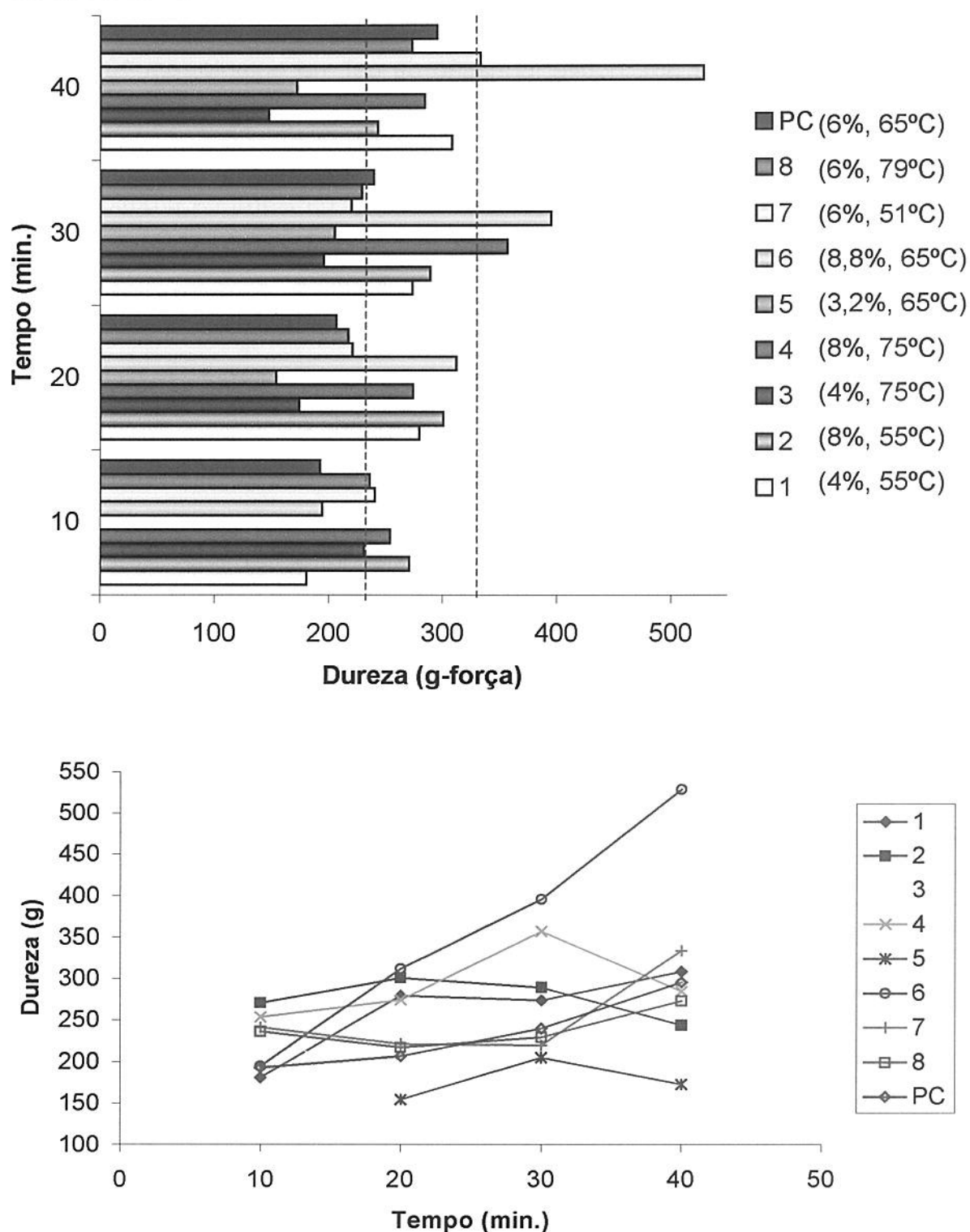
Nas soluções com 3,2% de proteína, aquecidas a 65°C durante 20, 30 e 40 min (ensaios 16, 27 e 38), houve formação de gel; no entanto, em 10 min, de aquecimento, nas mesmas condições (ensaio 5), ocorreu apenas um aumento da viscosidade. Provavelmente as interações protéicas intramoleculares, em baixas concentrações, foram insuficientes para a formação da estrutura protéica do gel (MORR e FOEGEDING, 1990), pois o tempo de aquecimento é importante para que ocorra a ruptura de ligações e possibilite a formação de outras ligações que estabilizem a matriz do gel.

A influência do tempo de aquecimento de 10 a 40 minutos sobre a dureza do gel misto pode ser verificada na Figura 1. Segundo as características dos géis em cada experimento, estima-se que a dureza para a sobremesa que se deseja elaborar é a da formação um gel que possa ser cortado com a colher, sem perder a forma e que não apresente textura rígida, estando, então, entre 230 e 330 g-força (parâmetros indicados pelas linhas tracejadas).

Observando-se os ensaios (7 a 11; 18 a 22; 29 a 33 e 40 a 44) realizados nesse trabalho, em que a concentração de proteína foi de 6% e variação da temperatura de aquecimento entre 51 e 79°C, pode-se observar que a menor temperatura estudada (51°C) apresentou perfil de dureza superior quando comparado a géis aquecidos a 79°C, exceto quando os géis foram aquecidos por 30 min. Os atributos de mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade, quando os géis foram aquecidos durante 30 ou 40 min, obtiveram os valores mínimos a 79°C e valores máximos em 65°C.

A dureza dos géis mistos avaliados, nas condições estudadas, variou de 150 a 530 g-força, sendo o valor máximo obtido com 8,8% de proteína (ensaio 6) e os valores mínimos nos menores níveis estudados, correspondendo a 3,2 e 4% de proteína, respectivamente.

Segundo MANGINO et al. (1987), as propriedades dos géis induzidos termicamente são influenciadas por muitos fatores, tais como concentração de proteína, pH, temperatura e duração do tratamento térmico. Com o aumento da temperatura, tende-se a ter géis mais firmes, mas essa proporção não é linear.

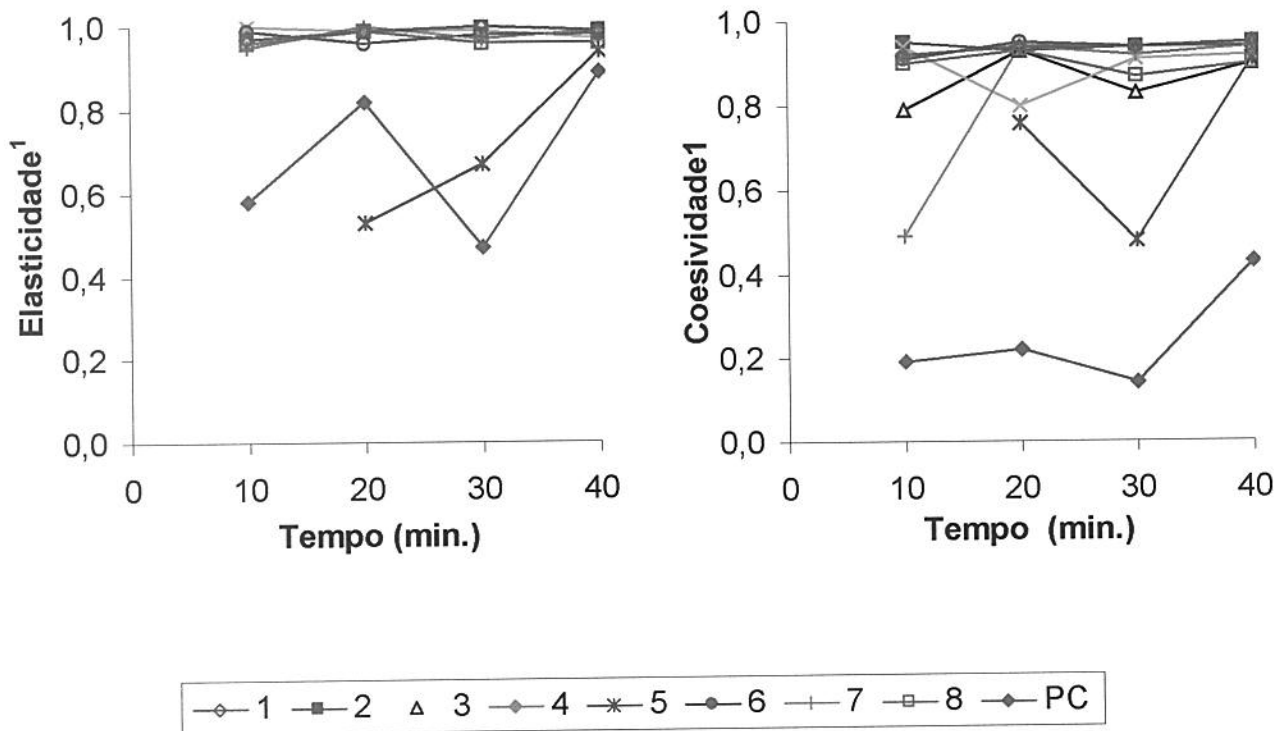


**Figura 1** Influência do tempo de aquecimento na dureza do gel misto, contendo 60% de isolado protéico de soro do leite (WPI) e 40% de gelatina bovina (60:40% WPI:GB). As linhas tracejadas indicam o valor ideal de dureza determinado.

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 frequentemente causa rompimento 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 temperaturas entre 60 a 80°C e sua geleificação normalmente é observada acima de 70°C (MYERS, 1990).

Na Figura 2 estão representados os valores de elasticidade e coesividade em função do tempo de aquecimento.



**Figura 2** Influencia do tempo de aquecimento na elasticidade e na coesividade de géis mistos contendo 60% de WPI e 40% de gelatina. (¹medidas adimensionais)



Segundo ANTUNES (2003), os géis de concentrado protéico de soro de leite apresentaram os maiores valores de dureza, coesividade, elasticidade, gomosidade e capacidade de retenção de água, de maneira geral, nas maiores faixas de concentração protéica, tempo e temperatura de desnaturação, ou seja, 12%, 27 min a 89°C.

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, dadas as maiores probabilidades de contatos intermoleculares (PHILLIPS et al., 1994).

Quando avaliadas a elasticidade e coesividade dos géis mistos, a maioria apresentou valores próximos de 1,0, independente do tempo de aquecimento. O gel menos elástico e menos coeso foi obtido com 4% proteína a 55°C (ensaios 1, 12, 23 e 34), resultando em valores que variaram entre 0,47 a 0,89 para a elasticidade e 0,14 e 0,43 de coesividade.

### 3.2 Análise dos efeitos

As variáveis, lineares, quadráticas e suas interações fazem parte dos modelos para compor as superfícies de resposta. As análises dos efeitos das variáveis independentes (concentração de proteína e temperatura de aquecimento durante 30 minutos) estão mostradas na Tabela 4 e os resultados estatísticos dos efeitos da dureza dos géis mistos em função do tempo de aquecimento estão apresentados na Tabela 5.

Observou-se que a variável concentração de proteína exerceu um efeito positivo significativo a 95% de confiança em todos os atributos estudados dos géis mistos 60:40 WPI:GB; enquanto que não houve influência significativa da temperatura. A interação proteína x temperatura gerou efeito significativo positivo para a dureza dos géis e negativo para a elasticidade e coesividade.



**Tabela 4** Coeficiente de regressão das respostas dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade de géis mistos aquecidos por 30 minutos em diferentes concentrações de proteína e temperatura (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade).

| Variáveis                   | Dureza (g) | Mastig. <sup>1</sup> | Gomo. <sup>1</sup> | Elast. <sup>1</sup> | Coes. <sup>1</sup> |
|-----------------------------|------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Média                       | 239,69*    | 230,14*              | 224,6*             | 1,00 *              | 0,94*              |
| % Proteína (L)              | 55,48*     | 102,42*              | 97,76*             | 0,12*               | 0,19*              |
| % Proteína (Q)              | 34,38*     | -2,82                | 0,30               | -0,95*              | -0,14              |
| Temperatura °C (L)          | 0,50       | 21,41                | 21,76              | 0,63                | 0,07               |
| Temperatura °C (Q)          | -3,29      | -17,77               | -16,54             | -0,25               | -0,05              |
| % proteína x Temperatura °C | 36,32*     | -39,48               | -18,65             | -0,14*              | -0,18*             |

\* significativos a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ )

<sup>1</sup> medidas adimensionais

(L) linear; (Q) quadrática

Na resposta dureza do gel (Tabela 5), observou-se que a %P influenciou significativamente a dureza dos géis mistos, com efeito positivo, isso significa que quanto mais elevada a %P da mistura, maior a dureza do gel misto formado. Pode-se verificar que os parâmetros de temperatura (L) e (Q) são significativos a 95% de confiança, exceto para o tempo de 30 minutos.

Os géis quando aquecidos durante 40 min apresentaram efeitos negativos, ou seja, o aumento da temperatura proporcionou uma diminuição da dureza do gel. A interação proteína x temperatura foi significativa ao nível de 95% de confiança para os tempos 20, 30 e 40 minutos.

O aumento da concentração protéica também resultou em géis mais firmes (MANGINO et al. 1987). Segundo SHIMADA e CHEFTEL (1988), interações hidrofóbicas intermoleculares dominam na matriz de gel na medida em que a concentração de proteína aumenta.

**Tabela 5** Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para cada fator no modelo codificado para a dureza dos géis mistos contendo 60% de WPI e 40% GB.

| Fatores  | Tempo 10 min    |             |         | Tempo 20 min    |             |         |
|----------|-----------------|-------------|---------|-----------------|-------------|---------|
|          | Efeito Estimado | Erro Padrão | p       | Efeito Estimado | Erro Padrão | p       |
| %P (L)   | 77,21*          | 1,87*       | 0,0006* | 42,87*          | 1,20*       | 0,0008* |
| %P (Q)   | -5,88           | 2,23        | 0,1184  | 20,88*          | 1,43*       | 0,0046* |
| T°C (L)  | 55,82*          | 1,87*       | 0,0011* | -17,11*         | 1,20*       | 0,0049* |
| T°C (Q)  | 10,95*          | 2,23*       | 0,0389* | 13,99*          | 1,43*       | 0,0103* |
| %P x T°C | 1,52            | 2,65        | 0,6236  | 19,72*          | 1,70*       | 0,0073* |

| Fatores  | Tempo 30 min    |             |         | Tempo 40 min    |             |         |
|----------|-----------------|-------------|---------|-----------------|-------------|---------|
|          | Efeito estimado | Erro padrão | p       | Efeito estimado | Erro padrão | p       |
| %P (L)   | 55,48*          | 2,26*       | 0,0017* | 71,94*          | 1,53*       | 0,0005* |
| %P (Q)   | 34,38*          | 2,69*       | 0,0061* | 7,33            | 1,82        | 0,0564  |
| T°C (L)  | 0,50            | 2,26        | 0,8455  | -25,58*         | 1,53*       | 0,0036* |
| T°C (Q)  | -3,29           | 2,69        | 0,3459  | -16,33*         | 1,82*       | 0,0122* |
| %P x T°C | 36,32*          | 3,20*       | 0,0077* | 50,34*          | 2,16*       | 0,0018* |

Valores p: significância estatística (p < 0,05).

%P: concentração de proteína; T°C: temperatura de aquecimento.

(L): linear; (Q): quadrático.

### 3.3 Análise de variância e coeficiente de regressão

A Tabela 6 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos lineares e quadráticos.

**Tabela 6** Análise de variância e coeficiente de determinação a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ) de géis mistos (mastig=mastigabilidade, gomo=gomosidade, elast=elasticidade, coes= coesividade).

| Parâmetros                           | Dureza (g) | Mastig. <sup>1</sup> | Gomo. <sup>1</sup> | Elast. <sup>1</sup> | Coes. <sup>1</sup> |
|--------------------------------------|------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Fcalculado                           | 21,51      | 19,65                | 16,4               | 7,07                | 6,22               |
| Ftabelado                            | 5,05       | 5,05                 | 5,05               | 5,05                | 5,05               |
| Fcalculado/ Ftabelado                | 4,26       | 3,89                 | 3,30               | 1,40                | 1,23               |
| Variação explicável R <sup>2</sup> % | 96         | 95                   | 94                 | 88                  | 86                 |

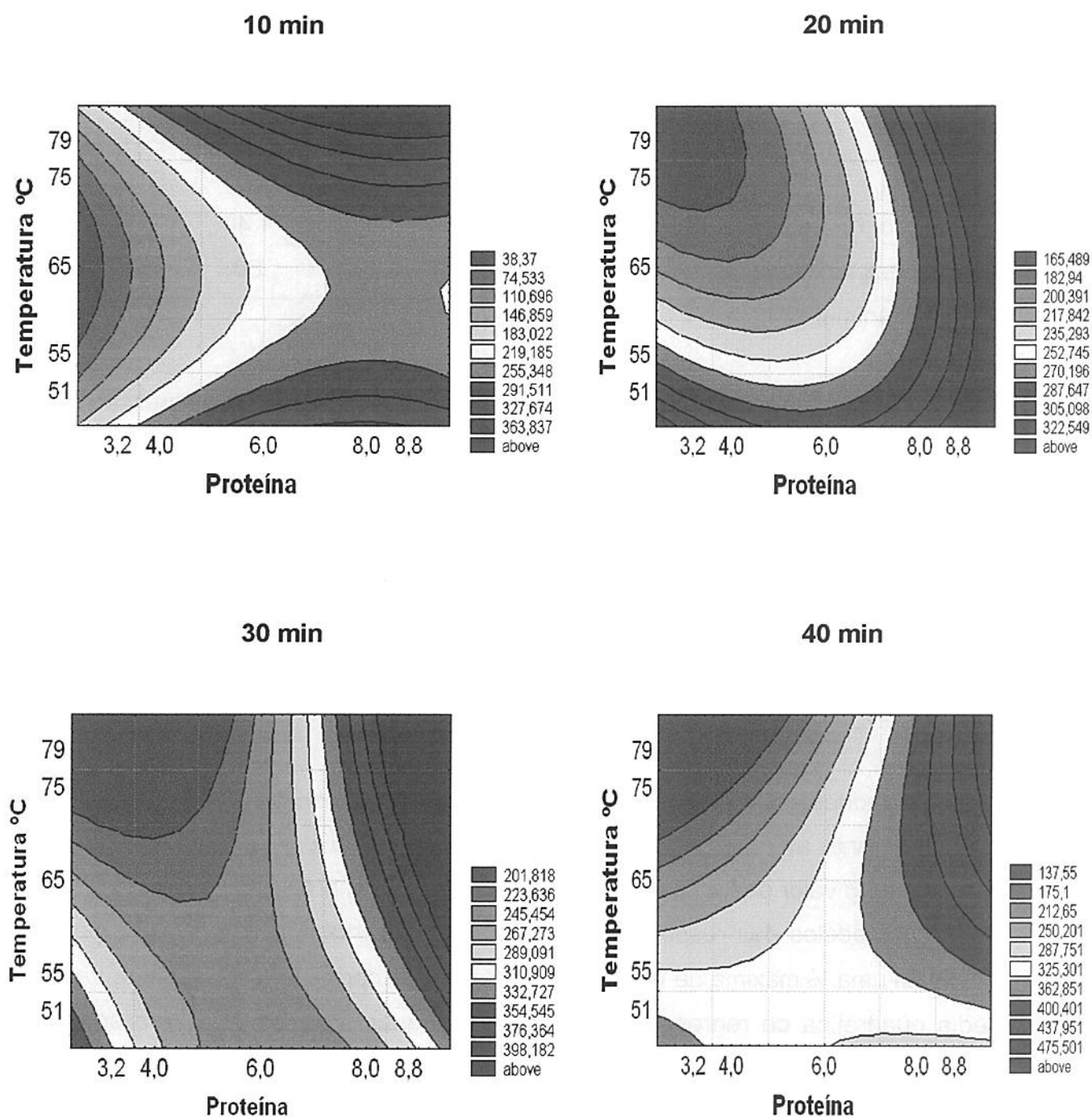
<sup>1</sup> medidas adimensionais

O teste F confere significância estatística ao modelo. A regressão é estatisticamente significativa se o valor de F calculado for maior que o valor de F tabelado. Observou-se na Tabela 6 que os parâmetros de dureza, mastigabilidade e gomosidade avaliados apresentaram  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ . Segundo BOX e DRAPER (1987), para que uma regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática do resíduo ( $MQ_R/MQ_r$ , que corresponde ao  $F_{\text{calculado}}$ ) deve ser no mínimo 10 vezes maior que o valor de  $F_{1,n-2}$  ( $F_{\text{tabelado}}$ ).

Os modelos para as variáveis independentes apresentaram bons ajustes ( $R^2$ ), no entanto as razões  $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$  ao nível de 5%, não foram 10 vezes maiores que o valor de  $F_{\text{calculado}}$ , indicando modelo não foi preditivo.

Os modelos das respostas dependentes apresentaram bons ajustes, pois obtiveram uma % máxima de variação explicável, que corresponde à razão entre a média quadrática da regressão menos a média quadrática do erro puro sob a média quadrática do resíduo ( $MQ_T - MQ_{ep}/MQ_T$ ) de no mínimo 99% pois a variação total da média foi explicada pela regressão.

A Figura 3 compara, por meio das curvas de contorno, a dureza dos géis mistos contendo 60% de WPI e 40% de GB, em tempos de aquecimento entre 10 e 40 min. O que foi verificado é que a área mais escura indica a maior dureza dos géis; entretanto esses valores de firmeza, correspondentes a 8 e 8,8% de proteína, são superiores aos desejáveis.



**Figura 3** Curvas de contorno apresentado como resposta dureza dos géis pela variação da concentração de proteína e da temperatura (°C) em diferentes tempos de aquecimento (min).

As melhores percepções de firmeza foram observadas em amostras com 6% de proteína. Comparando-se as curvas de contorno, observa-se que esta faixa está otimizada no ponto central, o que corresponde entre 220 e 260g-força, no tempo de aquecimento de 30 min.

Para optar entre uma faixa ou outra é recomendado, portanto, avaliar as características de interesse no produto, pois os dados de textura apresentados como faixa ótima podem não condizer com a textura ótima do produto indicada por testes sensoriais. Os géis obtidos em 40 min apresentavam-se esbranquiçados, com aparência de coagulado e com elevada sinérese.

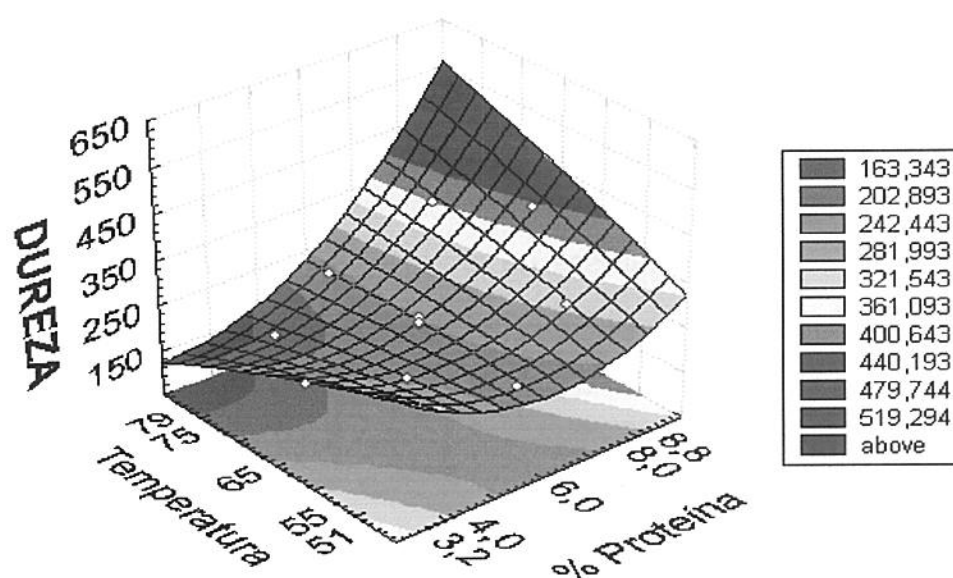
As superfícies de resposta, expressas por meio de equações matemáticas para os atributos de textura estudados (respostas) para a obtenção dos géis mistos aquecidos durante 30 min, estão apresentadas nas Figuras 4, 5 e 6.

Observa-se que a dureza é influenciada positivamente pelo aumento da concentração de proteína, enquanto que a temperatura elevada de aquecimento diminui a firmeza dos géis mistos. Conforme discutido anteriormente, considera-se que o atributo de dureza foi otimizado, pois a faixa desejada encontra-se no centro da figura, o que corresponde ao ponto central: 6,0% de proteína e aquecimento de 65°C.

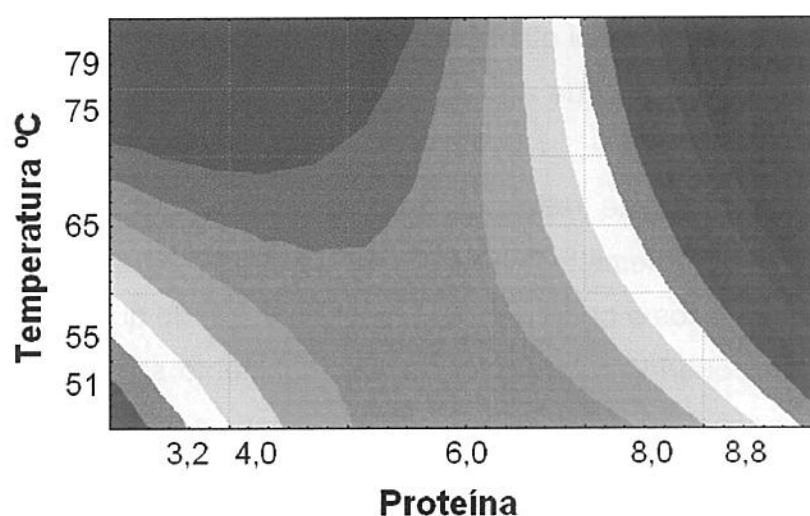
As superfícies de resposta e curvas de contorno da mastigabilidade e gomosidade foram semelhantes (Figura 5), pois foram obtidas por meio de cálculos matemáticos a partir da dureza dos géis, sendo que a gomosidade refere-se à energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido ao ponto ideal para a mastigação, enquanto que a mastigabilidade está relacionada com o tempo requerido para mastigar um alimento sólido até a deglutição. Observa-se que esses atributos apresentaram valores mínimos, tanto para a concentração de proteína, como para a temperatura de aquecimento, que corresponde respectivamente a 3,2% e 51°C.

A coesividade e a elasticidade também são variáveis correlacionadas, pois representam o grau de compressão do alimento antes do rompimento sob pressão e o quanto ele retorna após a compressão dos dentes, respectivamente. Nas condições estudadas, verificou-se que os géis mais elásticos e mais coesos foram obtidos com 8,8% de proteína e aquecidos a 79°C.

A



B

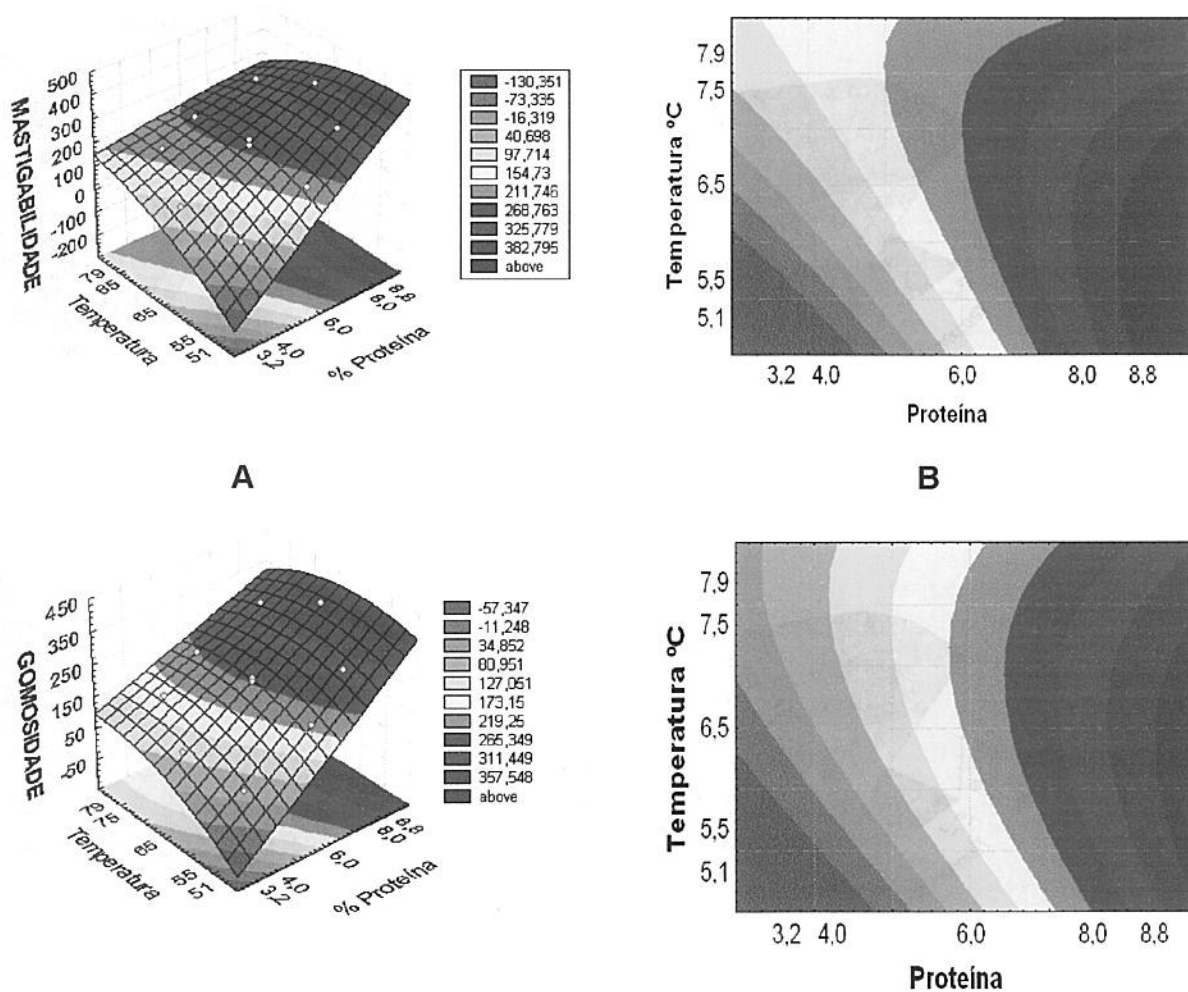


**Figura 4** Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B), relacionados com a resposta de dureza de géis mistos após 30 minutos de aquecimento.

A equação codificada que expressa a dureza dos géis mistos em função das variáveis estudadas foi:

$$\text{Dureza} = 239,693 + 55,476 (\text{proteína}) + 0,5 (\text{temperatura}) + 34,379 (\text{proteína})^2 + 36,318 (\text{proteína} \times \text{temperatura}) - 3,291 (\text{temperatura})^2$$



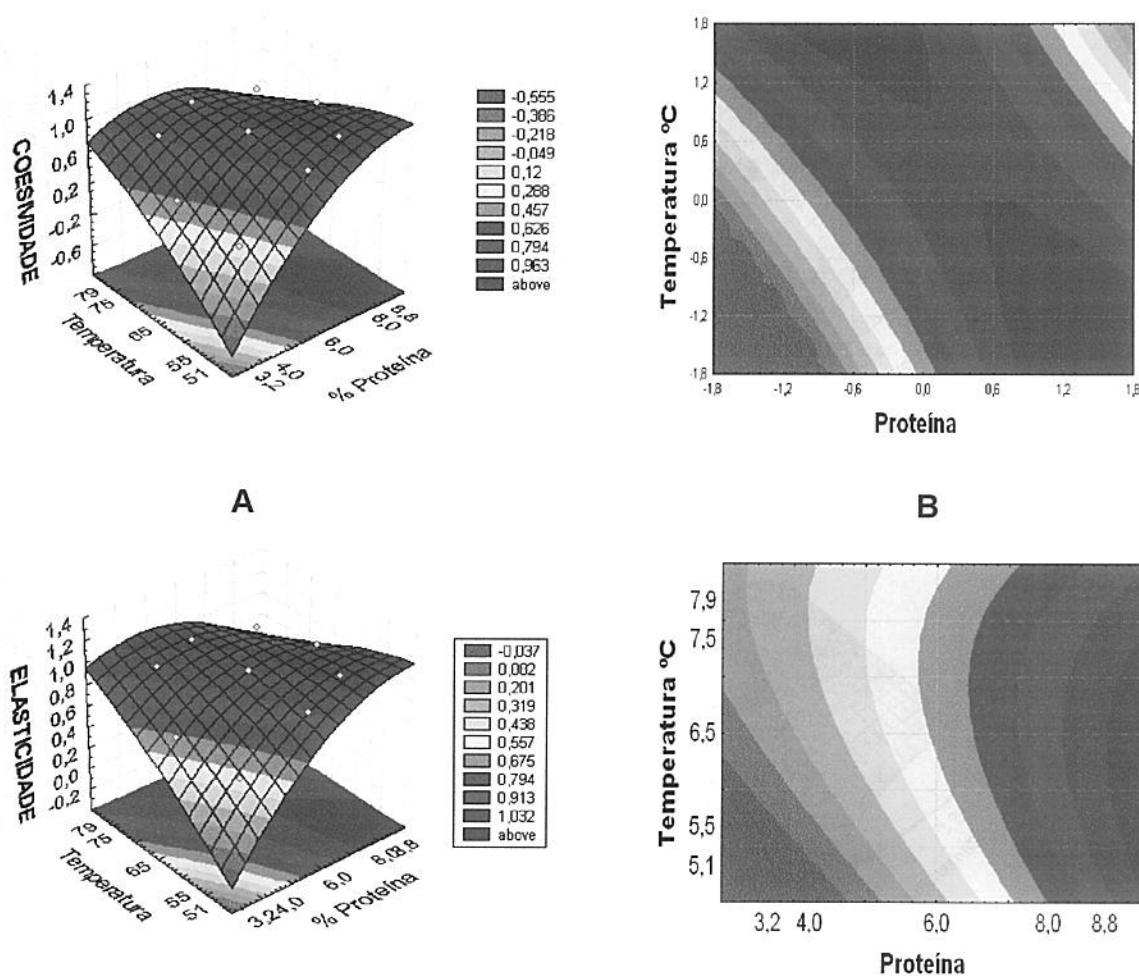


**Figura 5** Superfícies de resposta (A) e gráficos de contorno (B) relacionados com a resposta de mastigabilidade e gomosidade de géis mistos aquecidos durante 30 minutos.

As equações codificadas que expressam a mastigabilidade e gomosidade dos géis mistos em função das variáveis (proteína e temperatura) estudadas são:

$$\text{Gomosidade} = 224,753 + 97,765 (\text{proteína}) + 21,767 (\text{temperatura}) + 0,301 (\text{proteína})^2 - 18,65 (\text{proteína} \times \text{temperatura}) - 16,541 (\text{temperatura})^2$$

$$\text{Mastigabilidade} = 230,137 + 102,421 (\text{proteína}) + 21,414 (\text{temperatura}) - 2,821 (\text{proteína})^2 - 39,475 (\text{proteína} \times \text{temperatura}) - 17,766 (\text{temperatura})^2$$



**Figura 6** Superfícies de resposta (A) e gráficos de contorno (B) relacionados com a resposta de elasticidade e coesividade de géis mistos aquecidos durante 30 minutos.

As equações codificadas que expressam a elasticidade e coesividade dos géis mistos em função das variáveis (proteína e temperatura) estudadas são:

$$\text{Coesividade} = 0,94 + 0,191 (\text{proteína}) + 0,074 (\text{temperatura}) - 0,139 (\text{proteína})^2 - 0,18 (\text{proteína} \times \text{temperatura}) - 0,047 (\text{temperatura})^2$$

$$\text{Elasticidade} = 1,00 + 0,12 (\text{proteína}) + 0,063 (\text{temperatura}) - 0,095 (\text{proteína})^2 - 0,135 (\text{proteína} \times \text{temperatura}) - 0,025 (\text{temperatura})^2$$



## 4 CONCLUSÃO

A concentração de proteína foi a variável independente que gerou efeitos positivos, influenciando de forma significativa a textura dos géis, ou seja, quanto maior a concentração de proteína, mais firme foi o gel. E a temperatura apresentou efeito negativo, particularmente em baixas concentrações de proteína.

Dos tempos de aquecimento estudados, os géis apresentaram melhor aparência quando aquecidos por 30 min; tempos inferiores não foram suficientes para manter a estrutura dos géis em todas as condições estudadas e tempos de aquecimento superiores produziram géis não homogêneos e de elevada sinérese na maioria dos ensaios.

De todas as condições estudadas, apenas na condição de 3,2% de proteína, soluções aquecidas a 65°C durante 10 min não formaram géis.

As melhores percepções de firmeza foram observadas em amostras com 6% de proteína. Comparando-se as curvas de contorno, observa-se que esta faixa está otimizada no ponto central, o que corresponde entre 220 e 260g-força, no tempo de aquecimento de 30 min.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANTUNES, A.E.C.; MOTTA, E.M.P.; ANTUNES, A.J. Perfil de textura e capacidade de retenção de água de géis ácidos de concentrado protéico de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.183-189, 2003.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v.25, n.25, p.5675-5680, 2004.

BOX, G.E.P.; DRAPPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: Wiley, 1987.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: e-paper, 2003, 259p.

CHIOU, B., AVENA-BUSTILLOS, R.J.; SHEY, J.; YEE, E.; BECHTEL, P.J.; SYED IMAM, H.; GLENN, G.M.; ORTS, W.J. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. **Polymer**, v.47, p. 6379-6386, 2006.

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

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

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

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation, Bethesda, 1990.

FUENTE, M.A.; SINGH, H.; HEMAR, Y. Recent advances in the characterization of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.262-274, 2002.

GOSAL, W.S.; ROSS-MURPHY, S.B. Globular protein gelation. **Current Opinion in Colloid & Interface Sciences**, v.5, p.188-194, 2000.

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.

HONE, J.H.E.; HOWEL, A.M. Viscosity of Colloidal Suspensions in Aqueous Gelatin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 25, p.193–199, 2002.

HYONO, A.; SATO, H.; MATSUBARA, H.; OKUBO, M.; OHSHIMA, H.; Overshoot and oscillation in surface tension of gelatin solutions **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.39, p.65–68, 2004.

JU, Z.Y.; KILARA, A. Properties of gels induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant from calcium ion-aggregated whey protein isolate. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.5, p.1236-1243, 1998.

KASAPIS, S.; SABLANI, S.S. A fundamental approach for the estimation of the mechanical glass transition temperature in gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.36, p.71–78, 2005.

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

MANGINO, M.E., KIM, J.H., DUNKERLEY, J.A., ZADOW, J. G. Factors important to the gelation of whey protein concentrates. **Food Hydrocolloids**, v.1, n.4, p.277-282, 1987.

MARANGONI, A.G.; TOSH, S.M. On the nature of the maximum gelation temperature in polymer gels. **Biophysical Chemistry**, v.113, p.265–267, 2005.

MOHANTY, B.; BOHIDAR, H.B. Microscopic structure of gelatin coacervates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.36, p.39–46, 2005.

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

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

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.

NETO, B.B., SCRMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de processos**. Campinas, SP: Editora da Unicamp (série Manuais), 1995.

OAKENFULL, D.; SCOTT, A. Gelatin gels in deuterium oxide. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 207–210, 2003.

OTTONE, M.L.; DEIBER, J.A. Modeling the rheology of gelatin gels for finite deformations. Part 1. Elastic rheological model. **Polymer**, v. 46, p. 4928–4937, 2005.

OTTONE, M.L.; PEIROTTI, M.B.; DEIBER, J.A. Modeling the rheology of gelatin gels for finite deformations. Part 2. Viscoelastic solid model. **Polymer**, v.46, p.4938–4949, 2005.

PAZ, J.C.S.N. Geleificação de sistemas simples e mistos de isolados protéicos de soja e de soro de leite. Dissertação de mestrado. Universidade estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004, 93p.

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

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos. Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Editora Casa do Pão, p.326, 2005.

SAITO, H.; TAGUCHI, T.; KOBAYASHI, H.; KATAOKA, K.; TANAKA, J.; MURABAYASHI, S.; MITAMURA, Y. Physicochemical properties of gelatin gels prepared using citric acid derivative. **Materials Science and Engineering**, v.24, p.781–785, 2004.

SEGTNAN, V.H.; ISAKSSON, T. Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.1, p.1-11, 2004.

SGARBIERI, V. C. Propriedades Funcionais de proteínas em Alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência de Tecnologia de alimentos**, v.32, p.105-126, 1998.

SHIMADA, K.; MATSUSHITA, S. Thermal coagulation of bovine serum albumin. **Agricultural Biological Chemistry**, v.45, n.9, p.1945-1952, 1981.

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

TOSH, S.M.; ALEJANDRO G.; MARANGONI, A.G.; HALLETT, F.R.; IAN J.; BRITT, I.J.; Aging dynamics in gelatin gel microstructure. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.503–513, 2003.

TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J.G.; SALAZAR, J.A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, n.6, p.586-601, 2002.

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

USTA, M.; PIECH, D.L.; MACCRONE, R.K.; HILLIG, W.B. Behavior and properties of net and filled gelatins. **Biomaterials**, v.24, p.165–72, 2003.

YAMUL, D.K.; LUPANO, C.E. Properties of gels from whey protein concentrate and honey at different pHs. **Food Research International**, v.36, n.1, p. 25-33, 2003.

ZIEGLER, F.L. Desenvolvimento de um produto dietético funcional para idosos. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2006, 243p.



## **CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE TEXTURA DE GÉIS DE GELATINA BOVINA (GB) E DA MISTURA WPI/GB (60:40): INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E DA TEMPERATURA**

**J.A. ROMAN, V.C. SGARBIERI**

### **RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi o de verificar a influência da variável concentração de proteína (3,2 a 8,8%) e da temperatura de aquecimento (51 a 79°C) sobre o perfil de textura de géis de gelatina bovina (GB) e do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), comparados aos géis combinados na proporção 60% WPI e 40% GB. Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), de 11 ensaios. O perfil de textura foi determinado em texturômetro TAX-T<sub>2</sub>. Não se conseguiu obter géis de WPI nas condições estudadas, apenas observou-se um aumento da viscosidade. Os géis de gelatina apresentaram-se firmes e gomosos nas maiores faixas de concentração de proteína e temperatura de desnaturação. Dureza e gomosidade apresentaram diferenças estatísticas em todas as condições, exceto na interação proteína x temperatura. No entanto a mastigabilidade apresentou valores significativos nas variáveis lineares, quadráticas e sua interação. Verificou-se que a variável proteína exerceu um efeito positivo, ou seja, quanto maior a concentração de proteína, mais firme foi o gel. Ao contrário, a temperatura exerceu um efeito negativo, ou seja, quanto maior a temperatura de aquecimento do gel, menor a dureza, mastigabilidade e gomosidade. Os valores médios de elasticidade ( $0,93 \pm 0,029$ ) e coesividade ( $0,94 \pm 0,006$ ) não foram indicativos da modificação da textura dos géis de gelatina. Os géis de gelatina apresentaram valores de dureza entre 375 e 1176 g-força e os géis mistos de 196 e 395 g-força. O maior valor de dureza para ambas as amostras foram obtidas com 8,8% de proteína (nível +1,41). Nas mesmas condições de concentração de proteína e temperatura de aquecimento os valores de dureza para os géis de gelatina foram mais elevados,



sugerindo que os géis mistos possuem estrutura menos rígida, pois 60% deste são compostos de WPI e apenas 40% de gelatina.

**Palavras-chave:** gelatina, soro de leite, gel misto, perfil de textura, superfície de resposta

## SUMMARY

The objective of the present study was to verify the influence of the protein variable (3.2 to 8.8%) and of the temperature (51 to 79°C) on the texture profiles of bovine gelatin (GB), a whey protein isolate (WPI) and a mixture 60%:40% WPI:GB protein gels. The statistical planning used was a Central Composite Rotational Design (CCRD), evolving 11 experiments. The texture profiles were determined in a TAX-T<sub>2</sub> Texturometer. No WPI gels could be obtained under the conditions studied, only an increase in viscosity was observed. The gelatin gels exhibited high hardness and gomosity at the highest protein concentration and hardness and gomosity were statistically significant under all experimental conditions, except for protein x temperature interaction. Chewiness presented significative values for linear, quadratic and interactions. The independent variables protein concentration exerted the most positive effect; the higher the concentration the high firmness of the gels. On the other hand temperature showed, in most cases, a negative effect, i. e, the higher the temperature the lower the hardness, chewiness and gomosity. The average elasticity value ( $0.93 \pm 0.029$ ) and coesivity ( $0.94 \pm 0.006$ ) were not indicative of the texture modification observed in the gelatin gels. The gelatin gels presented hardness values in the range between 375 and 1176 g-force while in the mixed (60:40 WPI:GB) gels measured hardness was in the range 196-395 g-force. The highest hardness value for both types of gels were obtained with 8.8% protein. Under same conditions of protein concentration and temperature the hardness value was higher for the gelatin gel than for mixed 60:40% WPI/GB gels, suggesting that mixed gels with 60%WPI:40%GB are softer and less compact than pure gelatin gels.

**Key words:** gelatin, milk whey, mixed gel, texture profile, surface response methodology

## 1 INTRODUÇÃO

A gelatina é uma proteína de origem animal, solúvel em água (em temperaturas entre 38-40°C), resultante da hidrólise do colágeno proveniente de ossos, peles e tecidos conectivos de suínos e bovinos (CARVALHO, 2002). É produzida em larga escala, a preços relativamente baixos, justificando assim o grande interesse e exploração de suas propriedades funcionais (CARVALHO e GROSSO, 2006).

A gelatina é um dos hidrocolóides mais populares e amplamente utilizados na indústria de alimentos (confeitos, produtos cárneos, laticínios, etc), farmacêutica (cápsulas) e fotográfica (POPPE, 1997; CHO et al., 2004; BIGI et al., 2004).

Em virtude da variedade de fontes de colágeno (provenientes de ossos, peles bovinas, suínas e tecidos conectivos) e dos diferentes métodos de produção, as gelatinas comerciais apresentam diferenças em suas propriedades físicas e químicas. Elas podem variar em composição e na seqüência de aminoácidos das cadeias polipeptídicas, no ponto isoelétrico (pI) e no peso molecular (CHARLEY, 1992), além de avaliadas pela sua viscosidade, granulometria e poder de geleificação ou *bloom*; podendo ser encontrada comercialmente entre 50 a 300 *bloom*.

A composição química da gelatina, como o colágeno (CARVALHO, 2002), é composta de 18 aminoácidos tendo como característica peculiar alto teor de glicina (33%), prolina e hidroxiprolina (22%) (JOHNSTON-BANKS, 1990). Entretanto, não é uma proteína completa devido à ausência do aminoácido essencial triptofano (BENDER et al., 1953) e níveis bastante baixos de aminoácidos sulfurados como metionina e cistina.

A capacidade de formar gel é uma importante propriedade funcional das proteínas para se obter desejável textura e características sensoriais dos alimentos (TOTOSAUS et al., 2002). Com o aumento da concentração de proteína ocorre a modificação da textura dos géis, resultando em aumento da firmeza e intensificando a retenção de água pela matriz. De modo geral, usam-se na geleificação concentrações protéicas de 5-12% e temperaturas de 60-110°C (IPSEN et al., 2002). A gelatina é o agente mais versátil, utilizado para a

modificação da textura de alimentos (HAUG et al., 2004), pois forma géis em baixas concentrações.

As condições externas (temperatura, pH e força iônica) equilibram as forças atrativas e repulsivas proteína-proteína e proteína-solvente que, conseqüentemente, afetam as taxas de desnaturação e de agregação, determinando assim a estrutura final do gel (ERRINGTON e FOEGEDING 1998; HUDSON et al., 2000). A dureza do gel e as propriedades físicas são as principais condições influenciadas pela extração da gelatina (USTA et al., 2003).

Recentemente, considerável interesse tem sido dado ao estudo de misturas de proteínas/polissacarídeos (TURGEON e BEAULIEU, 2001; FONKWE et al., 2003; EL-GARAWANY e EL-SALAM, 2005; BOLAND et al., 2005; TORRES, 2005; BERTRAND e TURGEON, 2007) e proteína/proteína (LUPANO, 2000; COMFORT e HOWELL, 2002; ROESCH et al., 2004; PAZ, 2004) nos setores acadêmico e industrial.

O objetivo desse estudo foi o de verificar a influência da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento sob o perfil de textura de géis de gelatina bovina (GB) e do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), comparados aos géis combinados na proporção 60% WPI e 40% GB

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL

A Gelatina bovina, tipo A, produzida por hidrólise ácida, lote PFL 196/04, foi cedida pela empresa Gelita, Cotia-SP. Segundo dados do fabricante, apresenta 240 bloom, viscosidade de 33-42 mPs, teor de proteína de 83%, umidade entre 8 e 13%, conteúdo de cinza inferior a 2,0% e pH entre 5,0-6,0.

Utilizou-se o isolado protéico de soro de leite ALACEN 895, produzido por troca iônica e ultrafiltração, com reduzido teor de lactose e gordura, adquirido da NZMP®, New Zealand Milk Products, São Paulo, Brasil.

A mistura protéica na proporção 60:40 (WPI:GB) utilizada foi baseada no valor nutritivo de misturas entre WPI e hidrolisados de colágeno bovino (HCB), determinado por ZIEGLER (2006), em que através de ensaios biológicos com

ratos Wistar recém desmamados, chegou-se à composição aminoacídica mais indicada, levando-se em consideração aspectos nutricionais e econômicos e tendo-se por base o perfil de aminoácidos essenciais proposto pela FAO/WHO (1990).

## **MÉTODOS**

### **2.1 Determinação da composição centesimal**

Os teores de umidade, sólidos totais, cinza e proteína bruta foram determinados de acordo com os procedimentos descritos no manual da AOAC (1990).

Os sólidos totais foram obtidos pela diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo de umidade por secagem em estufa a 105°C até peso constante. O teor de cinza foi determinado pela incineração da amostra em cadinhos de porcelana (30-40mm de diâmetro e 25-50mm de altura) em mufla a 550°C, até peso constante.

A proteína bruta foi determinada pelo método semimicro-Kjeldahl, multiplicando-se o teor de nitrogênio (%N) pelo fator 6,38 para o WPI e 5,55 para a gelatina. Para a mistura usou-se fator corrigido 6,02 calculado, tendo por base a %N e as proporções conhecidas das duas proteínas na mistura. Os carboidratos e lipídios totais foram estimados por diferença, subtraindo-se de 100% a soma dos valores obtidos nas demais determinações.

### **2.2 Delineamento experimental**

Neste trabalho foi utilizada a metodologia do planejamento experimental e da análise de superfície de resposta para verificar de uma forma sistemática os efeitos da concentração de proteína e temperatura nas características dos géis isolados e combinados.

Essa metodologia foi escolhida por ser uma ferramenta que permite avaliar o efeito de cada variável individualmente, bem como as interações (efeito sinérgico ou antagônico) entre elas. Um outro fator positivo no uso desta técnica é a possibilidade de otimizar mais de uma resposta simultaneamente, caso muito comum em processos multivariáveis.

Géis simples de WPI e de gelatina e em combinação na proporção 60:40 foram elaborados através da geleificação termicamente induzida, em diferentes condições experimentais, variando-se a concentração de proteína entre 3 e 9% e temperatura de aquecimento (50-80°C), mantendo-se fixo o pH (6,5 em tampão fosfato 0,05M) e o tempo de aquecimento (30 minutos).

Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) analisando a porcentagem de proteína e a temperatura de aquecimento características de textura dos géis (dureza, elasticidade, mastigabilidade, gomosidade e coesividade), totalizando 11 ensaios (RODRIGUES e IEMMA, 2005). As Tabelas 1 e 2 apresentam os níveis estudados e a matriz dos ensaios realizados de superfície.

**Tabela 1** Níveis das variáveis na avaliação do perfil de textura de géis mistos, utilizando-se um delineamento composto central rotacional: influência da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento.

| Variáveis                    | Níveis |     |     |     |       |
|------------------------------|--------|-----|-----|-----|-------|
|                              | - 1,41 | -1  | 0*  | +1  | +1,41 |
| Concentração de proteína (%) | 3,2    | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 8,8   |
| Temperatura (T °C)           | 51     | 55  | 65  | 75  | 79    |

\* Ponto central

**Tabela 2** Matriz do delineamento composto central rotacional, com valores codificados e reais em função da concentração de proteína (%P) e da temperatura (T °C).

| Ensaio | Valores Codificados |        | Valores Reais |      |
|--------|---------------------|--------|---------------|------|
|        | %P                  | T °C   | %P            | T °C |
| 1      | -1                  | -1     | 4,0           | 55   |
| 2      | 1                   | -1     | 8,0           | 55   |
| 3      | -1                  | 1      | 4,0           | 75   |
| 4      | 1                   | 1      | 8,0           | 75   |
| 5      | - 1,41              | 0      | 3,2           | 65   |
| 6      | + 1,41              | 0      | 8,8           | 65   |
| 7      | 0                   | - 1,41 | 6,0           | 51   |
| 8      | 0                   | + 1,41 | 6,0           | 79   |
| 9      | 0                   | 0      | 6,0           | 65   |
| 10     | 0                   | 0      | 6,0           | 65   |
| 11     | 0                   | 0      | 6,0           | 65   |

### 2.3 Perfil de textura

Amostras à temperatura ambiente, com 2,0cm de diâmetro e 1,0cm de altura, foram comprimidas por um probe cilíndrico acrílico de fundo chato com 5 cm de diâmetro; já os relutados obtidos da curva força x tempo foram calculados pelo programa *Texture Expert* versão 1.11 para TPA (*Texture Profile Analysis*).

A curva obtida para cada amostra resultou de dois ciclos de compressão que são relativos a parâmetros mecânicos da amostra, sendo dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade as características de interesse deste estudo, das quais 3 parâmetros foram medidos pelo equipamento: dureza, coesividade e elasticidade, e dois foram calculados: mastigabilidade e gomosidade.

Os perfis de textura dos géis obtidos foram analisados segundo método descrito por JU e KILARA (1998), em texturômetro modelo TAX-T2 (Stable Microsystems SMS, Surrey, UK).

As condições de medida foram padronizadas em probe de calibração de 40mm, força de compressão de 5g e 50% de compressão, velocidade pré-teste, no teste e pós-teste de 3mm/s. Foram analisados seis géis resultantes de cada condição estudada.

## 2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente segundo a metodologia de superfície de resposta, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). O *Software Estatística for Windows* versão V foi utilizado para calcular os coeficientes de regressão, análise de variância (ANOVA) e coeficientes de correlação do modelo, bem como para gerar as superfícies de resposta (RODRIGUES e IEMMA, 2005; CALADO e MONTGOMERY, 2003; NETO et al. 1995).

Equações polinomiais de segunda ordem foram ajustadas para os dados experimentais do planejamento fatorial completo. As variáveis não significativas a 95% de confiança foram colocadas no resíduo.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização das amostras

A composição centesimal dos isolados protéicos estudados é apresentada na Tabela 3. O componente de maior concentração foi a proteína, variando entre 83 e 90,8% para as três amostras. Não houve diferença estatística quanto ao teor de proteína entre o WPI e a mistura, tendo sido estatisticamente inferior para a



gelatina ( $p < 0,05$ ). Sólidos totais, umidade e cinza diferiram significativamente entre as três amostras analisadas.

Segundo informações do fabricante, o WPI contém ainda em sua composição (mg/100g amostra) sódio 600mg, potássio 300mg, cálcio 100mg e fósforo 70mg. Os teores de cinza e de proteína da gelatina são os mais baixos dos três concentrados, e o de umidade o mais elevado.

**Tabela 3** Composição centesimal do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina (GB), mistura protéica WPI/GB na proporção 60:40%.

| Componentes    | WPI                    | Gelatina               | Mistura 60:40%         |
|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Sólidos totais | 95,5±0,34 <sup>a</sup> | 88,1±0,06 <sup>c</sup> | 92,6±0,11 <sup>b</sup> |
| Umidade        | 4,5±0,34 <sup>c</sup>  | 11,9±0,06 <sup>a</sup> | 7,4±0,10 <sup>b</sup>  |
| Proteínas      | 90,8±1,06 <sup>a</sup> | 83,1±0,56 <sup>b</sup> | 87,7±0,33 <sup>a</sup> |
| Cinza          | 1,8±0,07 <sup>a</sup>  | 0,7±0,03 <sup>c</sup>  | 1,3±0,01 <sup>b</sup>  |
| Diferença*     | 2,9                    | 4,4                    | 3,6                    |

\*Diferença = 100 – (proteína + cinza + umidade). Resultados são médias de 4 determinações analíticas ± desvio padrão. Letras Diferentes (linhas) indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Géis de isolado protéico de soro de leite (WPI)

O WPI, usado isoladamente, não formou gel em nenhuma das condições estudadas de concentração de proteína e temperatura, apenas ocorreu um aumento da viscosidade da solução.

Em concentrações superiores às utilizadas neste estudo, pesquisadas por ANTUNES et al. (2003), descreveu-se a formação de géis de concentrado protéico de soro de leite elaborados com concentração protéica variando entre 8 e 12%, pH entre 4,0 e 5,2 e temperatura e tempo de desnaturação variando entre 81 e 89°C e 15 e 27min.

Acredita-se que o aquecimento (desnaturação) tenha sido insuficiente para formação de géis firmes de WPI nas condições de concentração de proteína

testadas (3,2; 4,0; 6,0; 8,0; 8,8%) no presente estudo. Para DAMODARAM (1994), em proteínas globulares, a faixa de temperatura ótima para geleificação é definida pela sua temperatura de desnaturação. Para o processo de geleificação das proteínas do soro são necessárias concentrações de proteína variando de 6-12%, dependendo do pH (BRANDENBERG et al., 1992) e das temperaturas, na faixa de 70 a 90°C (MORR e HÁ, 1993).

Em concentrações mais baixas de proteína, a formação de uma rede protéica de gel é difícil de ser estabilizada, além disso, leva-se em conta que há somente um aumento na viscosidade, ao invés de formação de gel. A taxa de geleificação inicial do soro de leite varia em função da concentração de proteína (TORRES, 2005).

Segundo MORR e FOEDING (1990), dispersões com 8 e 10% de proteína e pH 3,5, aquecidas a 80°C/30 min, não formaram géis em todas as condições testadas, apenas uma dispersão viscosa. Provavelmente as interações protéicas intramoleculares, em baixas concentrações, foram insuficientes para a formação da estrutura protéica do gel.

### 3.3 Géis de gelatina

Soluções de gelatina formam géis transparentes quando resfriadas a temperaturas próximas a 35°C, em concentrações acima de 1%. Sugere-se que as estruturas  $\beta$ -pregueada estão presentes em géis de gelatina, promovendo a junção de zonas ricas em glicina, prolina e hidroxiprolina (Gly-Pro-Hyp), que são importantes na formação da região da tríplice hélice, sendo estas estabilizadas por pontes de hidrogênio e atrações de Van der Waals entre os resíduos imino (Pro-Hyp) de diferentes cadeias (SEGATANAN e ISAKSSON, 2004).

Nas condições estudadas de concentração de proteína (entre 3 e 9%) e temperatura de aquecimento (50-80°C), em todos os experimentos ocorreu a formação de géis. Na Tabela 4 e Figura 1 estão representadas as respostas de dureza, mastigabilidade, gomosidade, coesividade e elasticidade expressas pelo valor médio de seis repetições.

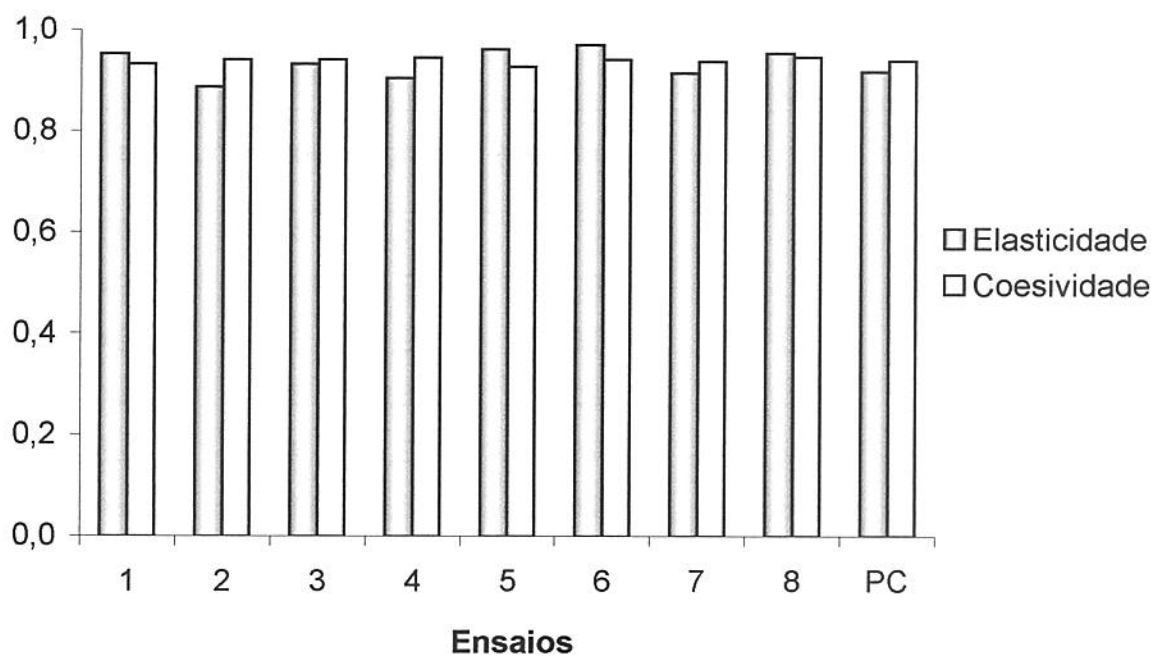
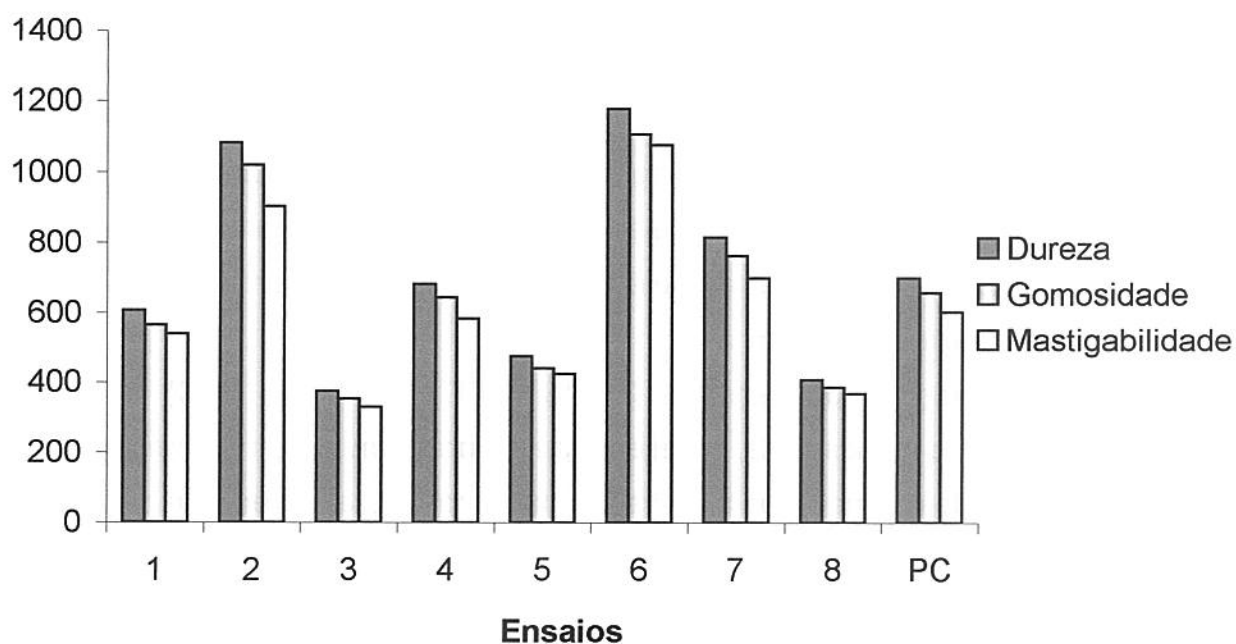
Segundo POPPE (1997), a força do gel depende da concentração de gelatina, tendo as gelatinas comerciais força de gel (*bloom strenght* ou *bloom*) entre 50 e 300 *bloom* para uma concentração de gelatina de 6,67%, variando inversamente com a temperatura. Segundo o mesmo autor, a conversão sol-gel é reversível e pode ser repetida, ou seja, géis de gelatina começam a se liquefazer, tornando-se termorreversíveis, o que é uma propriedade altamente desejável, pois tendem a se desfazer na boca.

Nas condições dos ensaios 3 (4%, 75°C) e 8 (6%, 79°C) a dureza, mastigabilidade e gomosidade, apresentaram valores mínimos, inferiores a 400. O que pode ser determinado pela elevação da temperatura (níveis 1 e 1,41), com possíveis rupturas das pontes de hidrogênio que estabilizam a estrutura da gelatina.

**Tabela 4** Géis de gelatina em função da concentração de proteína (%P) e temperatura (T°C), analisados quanto ao perfil de textura (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, coes= coesividade, elast= elasticidade).

|    | Valores     |       |       |     | Resposta  |                      |                     |                      |                       |
|----|-------------|-------|-------|-----|-----------|----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
|    | Codificados |       | Reais |     |           |                      |                     |                      |                       |
|    | %P          | T°C   | %P    | T°C | Dureza(g) | Mastig. <sup>1</sup> | Gomos. <sup>1</sup> | Coesiv. <sup>1</sup> | Elastic. <sup>1</sup> |
| 1  | -1          | -1    | 4,0   | 55  | 607,7     | 539,5                | 566,4               | 0,93                 | 0,95                  |
| 2  | 1           | -1    | 8,0   | 55  | 1083,1    | 903,6                | 1018,5              | 0,94                 | 0,89                  |
| 3  | -1          | 1     | 4,0   | 75  | 375,3     | 329,3                | 353,1               | 0,94                 | 0,93                  |
| 4  | 1           | 1     | 8,0   | 75  | 682,4     | 583,4                | 644,6               | 0,94                 | 0,90                  |
| 5  | -1,41       | 0     | 3,2   | 65  | 475,8     | 423,7                | 440,7               | 0,93                 | 0,96                  |
| 6  | 1,41        | 0     | 8,8   | 65  | 1176,6    | 1075,4               | 1106,9              | 0,94                 | 0,97                  |
| 7  | 0           | -1,41 | 6,0   | 51  | 813,6     | 697,7                | 762,4               | 0,94                 | 0,91                  |
| 8  | 0           | 1,41  | 6,0   | 79  | 408,5     | 367,7                | 386,3               | 0,95                 | 0,95                  |
| 9  | 0           | 0     | 6,0   | 65  | 723,8     | 592,5                | 675,8               | 0,93                 | 0,88                  |
| 10 | 0           | 0     | 6,0   | 65  | 696,1     | 615,4                | 655,6               | 0,94                 | 0,94                  |
| 11 | 0           | 0     | 6,0   | 65  | 676,2     | 596,4                | 636,2               | 0,94                 | 0,94                  |

<sup>1</sup> medidas adimensionais.



**Figura 1** Perfil de textura de géis de gelatina elaborados em pH 6,5, aquecidos durante 30min, variando-se a concentração de proteína (3,2 a 8,8%) e a temperatura de aquecimento (51-79°C).

No ponto central (ensaios 9,10, 11), no qual se estudou a textura dos géis de gelatina, elaborada com de 4% de proteína, aquecimento de 65°C por 30 min., os valores destes atributos ficaram entre 550 e 750. Os valores médios de elasticidade ( $0,93 \pm 0,029$ ) e coesividade ( $0,94 \pm 0,006$ ) não foram indicativos da modificação da textura dos géis de gelatina estudados em função da concentração de proteína e da temperatura.

### 3.3.1 Análise dos efeitos

As variáveis lineares, quadráticas e suas interações fazem parte dos modelos para compor as superfícies de resposta. A análise dos efeitos das variáveis independentes está mostrada na Figura 2 e Tabela 5.

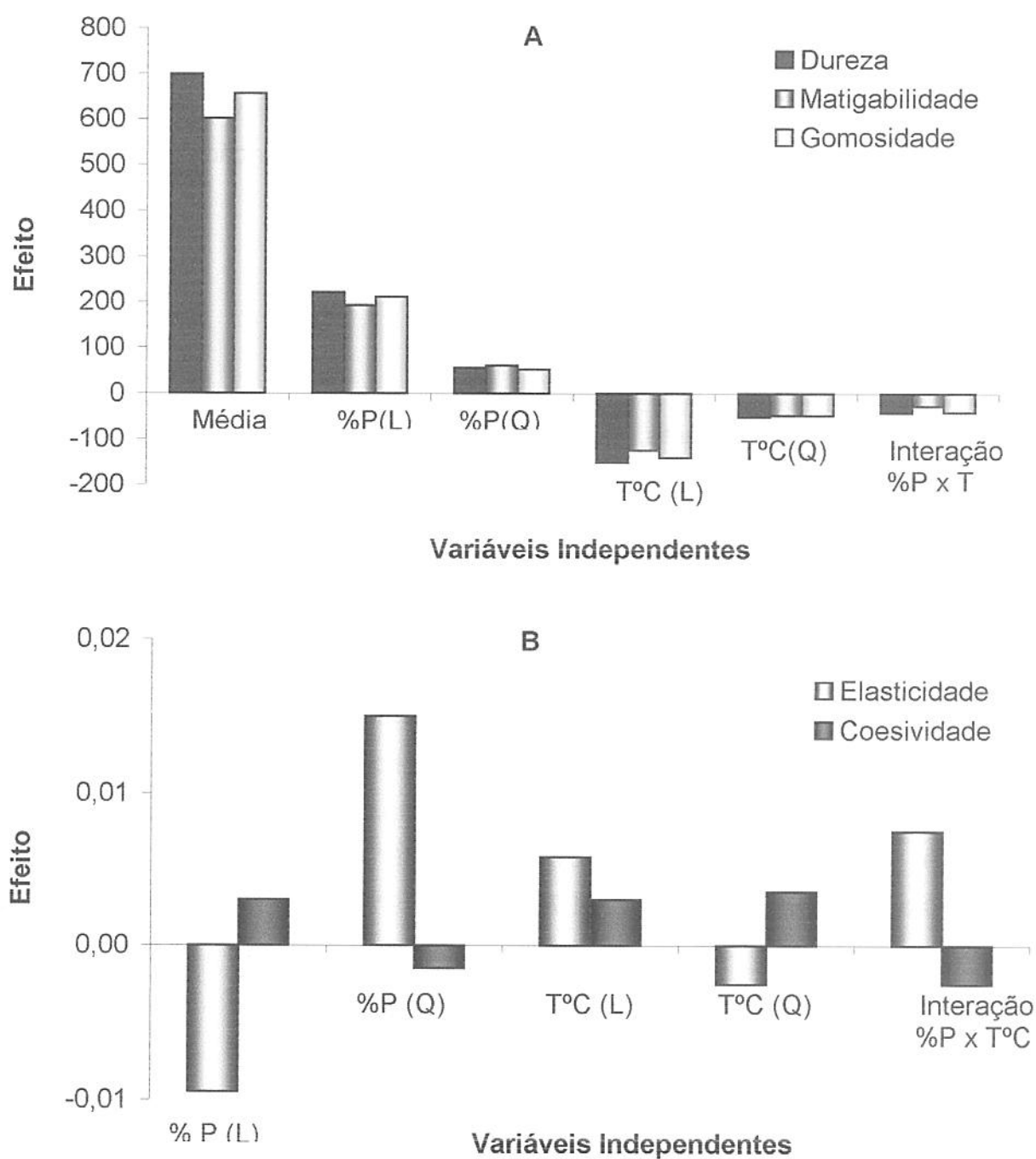
**Tabela 5** Coeficiente de regressão para as repostas: dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade de géis de gelatina aquecidos por 30 minutos em diferentes concentrações de proteína e temperatura (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade).

| Variáveis independentes | Dureza (g) | Mastig. <sup>1</sup> | Gomo. <sup>1</sup> | Elast. <sup>1</sup> | Coes <sup>1</sup> . |
|-------------------------|------------|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Média                   | 698,68*    | 601,45*              | 655,89*            | 0,920*              | 0,937*              |
| % Proteína (L)          | 221,70*    | 192,49*              | 210,72*            | -0,009              | 0,003               |
| % Proteína (Q)          | 55,88*     | 60,99*               | 51,86*             | 0,015               | -0,001              |
| Temperatura T°C (L)     | -150,74*   | -124,64*             | -139,89*           | 0,006               | 0,003               |
| Temperatura T°C (Q)     | -51,70*    | -47,41*              | -47,88*            | -0,002              | 0,004               |
| % Proteína x T°C        | -42,06     | -27,48*              | -40,17             | 0,008               | -0,003              |

\* significativos a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>1</sup> medidas adimensionais; (L):linear; (Q):quadrática.

A dureza e gomosidade apresentaram diferenças estatísticas em todos as condições, exceto na interação proteína x temperatura. No entanto, a mastigabilidade apresentou valores significativos nas variáveis lineares, quadráticas e sua interação.



**Figura 2** Efeitos na dureza, mastigabilidade e gomosidade (A) e elasticidade e coesividade (B) de géis de gelatina: %P: proteína, T°C: temperatura, L: linear, Q:quadrática.

O que pôde ser verificado foi que a variável proteína exerceu um efeito positivo, ou seja, quanto maior a concentração de proteína, mais firme foi o gel. A temperatura, pelo contrário, exerceu um efeito negativo, ou seja, quanto maior a temperatura de aquecimento do gel, menor a dureza, mastigabilidade e gomosidade.

Observou-se que as variáveis independentes estudadas neste planejamento experimental não foram significativas quanto aos parâmetros de elasticidade e coesividade, pois a diferença entre uma amostra e outra quando o experimento passou do menor para o maior nível estudado foi mínimo, não significativo, então, a 95% de confiança, respectivamente 3,2 e 8,8% de proteína e 51 e 79°C .

### 3.3.2 Análise de variância e coeficientes de regressão

A Tabela 6 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos linear e quadrático.

**Tabela 6** Análise de variância e coeficiente de determinação a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ) de géis de gelatina (mastig= mastigabilidade, gomo= gomosidade, elast= elasticidade, coes= coesividade).

| Parâmetros                             | Dureza (g) | Mastig. <sup>1</sup> | Gomo. <sup>1</sup> | Elast. <sup>1</sup> | Coes. <sup>1</sup> |
|----------------------------------------|------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Fcalculado                             | 69,72      | 26,52                | 72,43              | 0,46                | 3,40               |
| Ftabelado                              | 5,05       | 5,05                 | 5,05               | 5,05                | 5,05               |
| Fcalculado/ Ftabelado                  | 13,80      | 5,25                 | 14,34              | 0,09                | 0,67               |
| Variação explicável (R <sup>2</sup> %) | 98,59      | 96,37                | 98,64              | 31,27               | 76,29              |

<sup>1</sup> medidas adimensionais

O teste F confere significância estatística ao modelo. A regressão é estatisticamente significativa se o valor de F calculado for maior que o valor de F tabelado. Observa-se, na Tabela 6, que os parâmetros de dureza, mastigabilidade e gomosidade avaliados apresentaram  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ .



Segundo BOX, DRAPER (1987), para que uma regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática do resíduo ( $MQ_R/MQ_r$ , que corresponde ao  $F_{\text{calculado}}$ ) deve ser no mínimo 10 vezes maior que o valor de  $F_{1,n-2}$  ( $F_{\text{tabelado}}$ ).

Os modelos para as variáveis independentes de dureza, mastigabilidade e gomosidade apresentaram bons ajustes ( $R^2 = 0,99; 0,96; 0,99$ , respectivamente) e as razões  $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$  ao nível de 5%, foram de 13,8 e 14,3, respectivamente, para a dureza e gomosidade (produto dureza x coesividade), o que indicou modelo preditivo para ambas.

Os modelos das demais respostas apresentaram bons ajustes, exceto para a elasticidade, que obteve uma % de variação explicada de 31,27% pois a variação total da média não foi explicada pela regressão.

As equações que expressam os atributos de textura estudados (respostas) para a obtenção dos géis, e que geraram as superfícies de resposta (Figura 3), estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7** Equações quadráticas que expressam os atributos de textura estudados para os géis de gelatina com influência da concentração de proteína e da temperatura.

| Resposta        | Equações                                                                        |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Dureza          | $z = 698,68^* + 221,70x^* - 150,74y^* + 55,88x^{2*} - 42,06x.y - 51,70y^{2*}$   |
| Mastigabilidade | $z = 601,45^* + 192,49x^* - 124,64y^* + 60,99x^{2*} - 27,48x.y^* - 47,41y^{2*}$ |
| Gomosidade      | $z = 655,89^* + 210,72x^* - 139,89y^* + 51,86x^{2*} - 40,17x.y - 47,88y^{2*}$   |
| Elasticidade    | $z = 0,92^* - 0,009x + 0,006y + 0,015x^2 + 0,007x.y - 0,002y^2$                 |
| Coesvidade      | $z = 0,94^* + 0,003x + 0,003y - 0,001x^2 - 0,002x.y + 0,004y^2$                 |

\*Diferenças significativas a 95% de confiança.

z= resposta, x = concentração de proteína, y = temperatura,  
x.y= interação concentração proteína x temperatura.

Todas as variáveis do processo, bem como a interação proteína x temperatura, foram significativas para a mastigabilidade, compondo o modelo quadrático (Tabela 5). Por outro lado, nas respostas dureza e gomosidade,

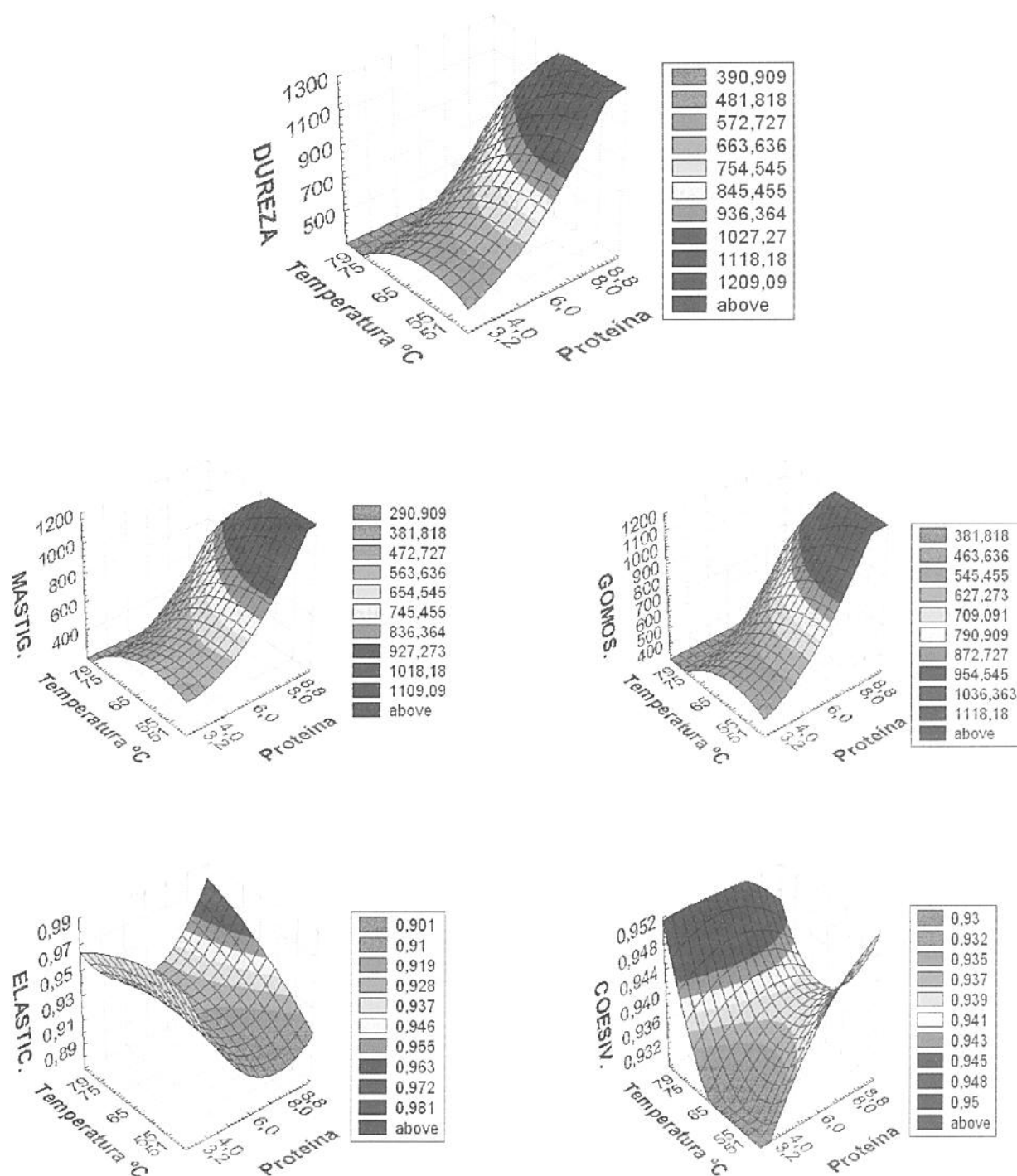
apenas a interação não foi significativa e, para a coesividade e elasticidade não foi possível estabelecer uma equação significativa no modelo linear.

As variações nos dados experimentais obtidos nos ensaios mostraram que a dureza, mastigabilidade e gomosidade foram as variáveis que influenciaram a textura dos géis de gelatina de forma mais significativa do que a elasticidade e coesividade, sendo a concentração de proteína a variável que exerce efeito positivo significativo.

As superfícies de resposta mostradas na Figura 3 indicam que o aumento da temperatura para o nível superior, que corresponde a 79°C, exerce um efeito negativo para os atributos de dureza, mastigabilidade e gomosidade, pois os valores encontrados são mínimos. Esse mesmo fenômeno ocorre com a coesividade dos géis de gelatina, mas somente com os menores níveis de temperatura estudados (51 e 55°C).

Fica evidente que o aumento da concentração de proteína, de 3,2 para 8,8%, resulta nos valores máximos dos atributos estudados, indicado pela área mais escura dos gráficos de superfície.

De acordo com a literatura, a formação de ligações para a estabilidade dos géis é proporcional à concentração de proteína, ou seja, com o aumento da concentração protéica ocorre modificação da textura dos géis, resultando num aumento da firmeza e intensificando a retenção de água pela matriz (MANGINO, 1984; TOTOSAUS et al., 2002; LOWE et al., 2003 e ANTUNES, 2003).



**Figura 3** Superfícies de resposta das variáveis de dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade de géis de gelatina em função da concentração de proteína e da temperatura.

### 3.4 Comparação dos géis de gelatina com os géis mistos (WPI:GB)

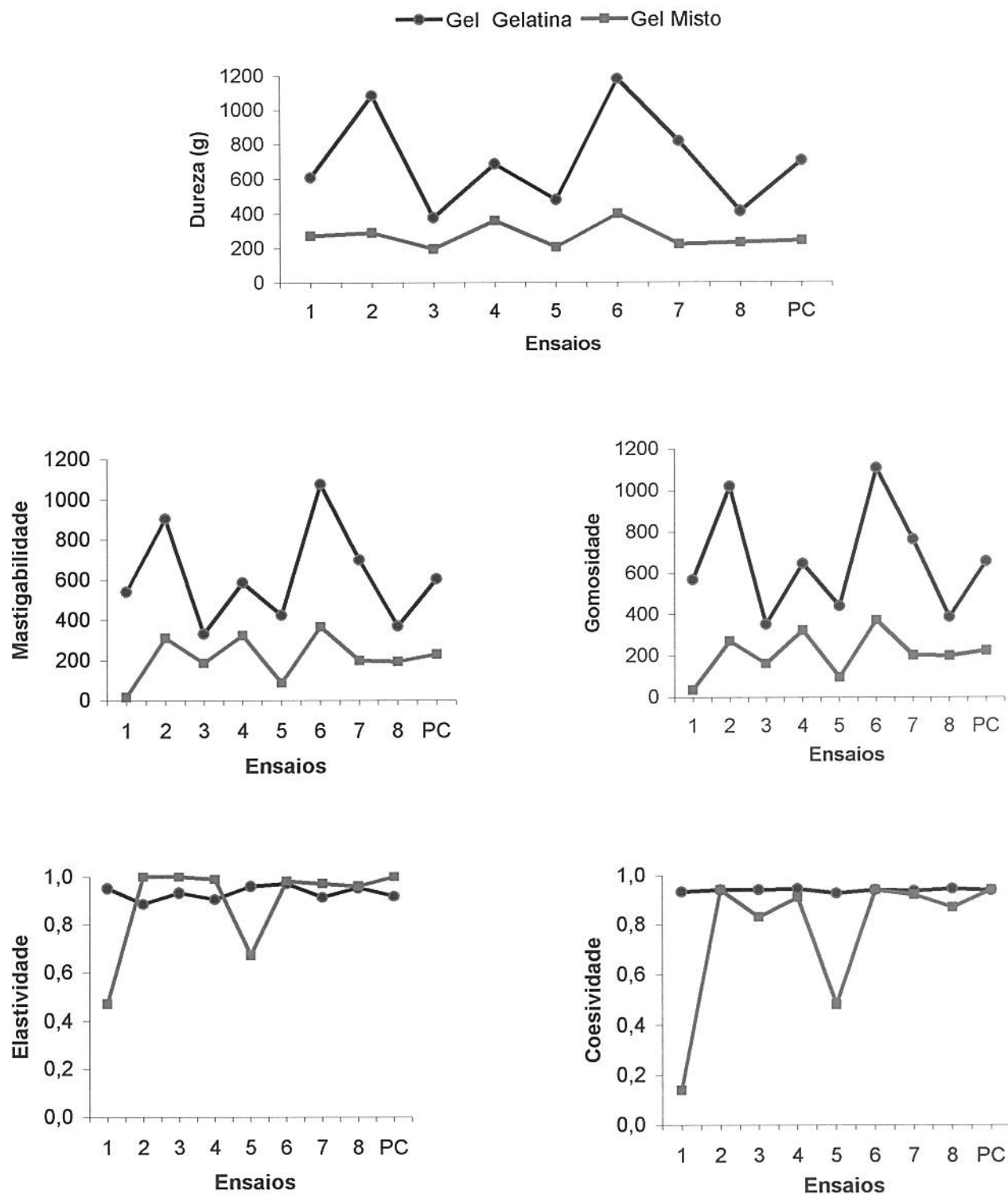
A Figura 4 compara os resultados obtidos dos perfis de textura de géis (puros) de gelatina com géis mistos de WPI:GB, nas mesmas condições de obtenção. Diferenças evidentes podem ser observadas, pois valores bem superiores de dureza, mastigabilidade e gomosidade foram obtidos para os géis de gelatina e valores pouco variáveis para a elasticidade e coesividade.

As variáveis dependentes: dureza, mastigabilidade e gomosidade dos géis de gelatina, apresentaram a mesma tendência que os géis mistos, elaborados com 60% WPI e 40% gelatina bovina, sendo que nestes perfis obtiveram-se valores mais baixos nos ensaios 1, 3 e 5, nas condições de menor concentração de proteína 4,0; 3,2 e 4,0%, respectivamente.

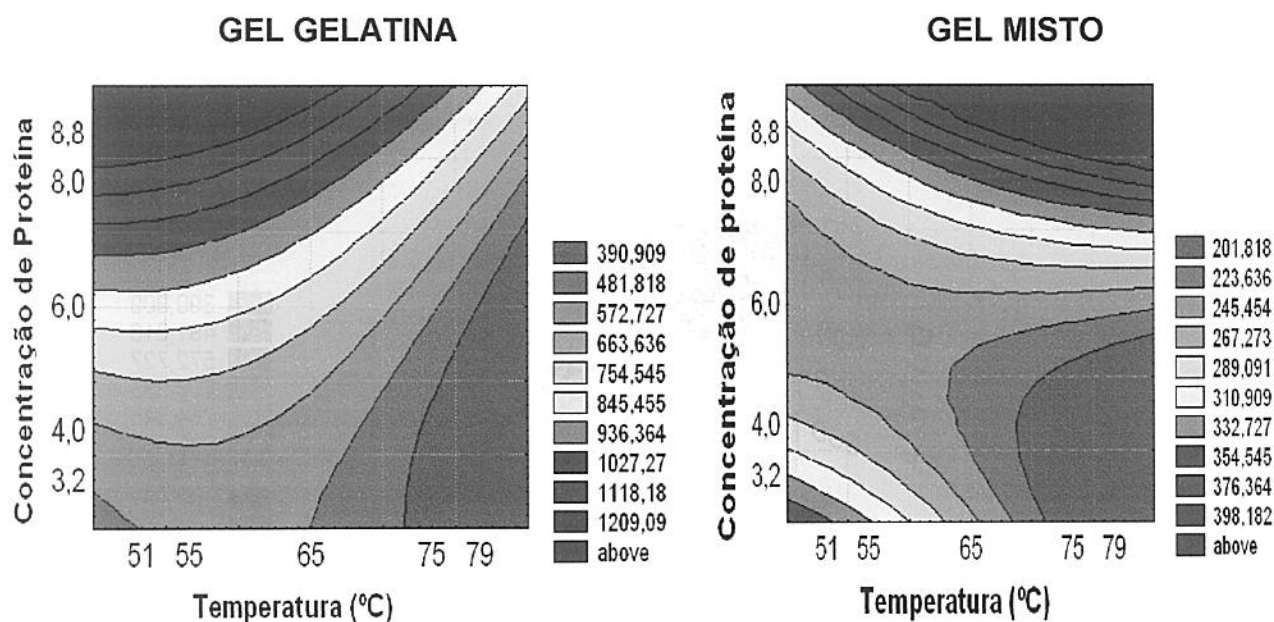
Ao se observar os perfis de elasticidade e coesividade, não são notadas diferenças muito evidentes entre os experimentos, exceto nos ensaios 1 e 5, em que foram encontrados valores bem inferiores desses atributos de textura para os géis mistos.

Nas Figuras 5 e 6 estão representadas as curvas de contorno e as superfícies de resposta da dureza de géis de gelatina comparados com a dureza dos géis mistos. As análises das superfícies de resposta e de contorno levaram a conclusão de que existem faixas na qual as respostas são maximizadas ou minimizadas. As curvas de contorno (Figura 5), mostram uma diferença interessante na concentração de proteína inferior a 4%, pois os géis mistos não apresentam a tendência crescente na dureza do gel com o aumento da concentração de proteína quando o nível passa de 3,2 para 8,8% como acontece para gelatina, mostrando que ocorre uma possível interação da gelatina com o WPI em temperaturas inferiores a 65°C, modificando suas características originais.

A gelatina apresentou valores de dureza entre 375 e 1176 g-força e os géis mistos de 196 a 395 g-força (Figura 6). O maior valor de dureza para ambas as amostras foram obtidas com 8,8% de proteína. Nas mesmas condições de concentração de proteína e temperatura de aquecimento, os valores de dureza para os géis de gelatina foram mais elevados, sugerindo que os géis mistos possuem estrutura menos rígida, pois 60% destes são compostos de WPI e apenas 40% de gelatina.



**Figura 4** Comparação dos atributos de textura dos géis mistos (WPI 60: GB40), elaborados em tampão fosfato 0,05M, pH 6,5 e aquecidos a 65°C por 30 minutos, com géis de gelatina elaborados nas mesmas condições.



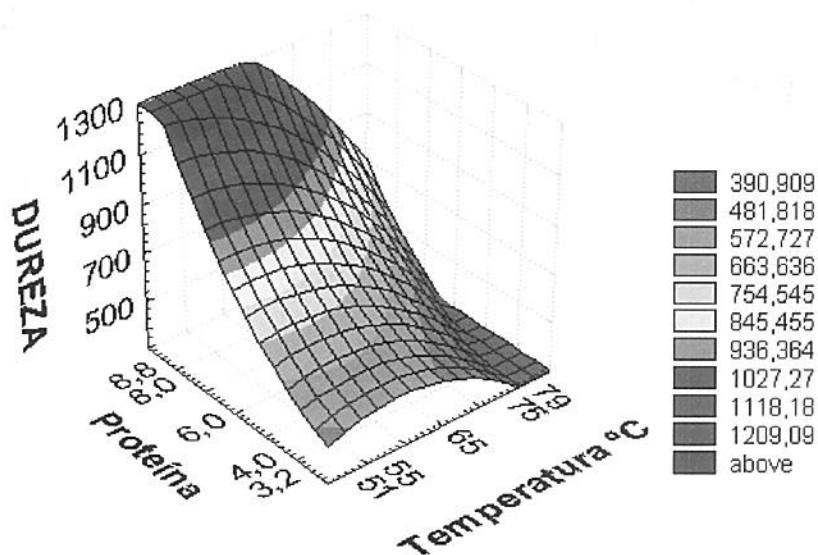
**Figura 5** Curvas de contorno da dureza dos géis de gelatina comparadas às do gel misto (60WPI:40GB) em função da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento.

Para optar entre uma faixa ou outra é recomendado, portanto, avaliar as características de interesse no produto, pois os dados de textura apresentados como faixa ótima podem não condizer com a textura ótima do produto indicada por testes sensoriais.

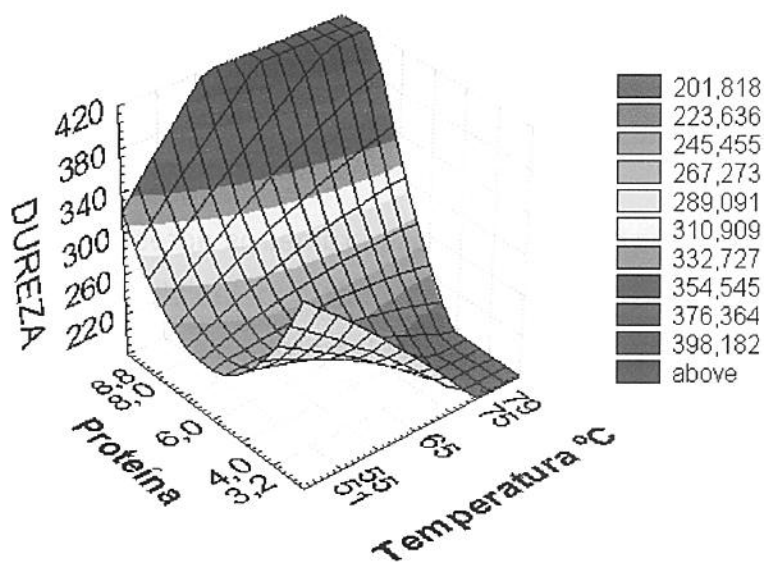
As diferenças observadas nos parâmetros apresentados no comportamento de geleificação são modificadas, a princípio, pelas alterações nos mecanismos de agregação e estruturação das moléculas protéicas de sistemas mistos (TORRES, 2005).

O mecanismo de desnaturação, agregação e gelificação das proteínas globulares puras e em misturas, como no soro do leite, ainda não foi completamente elucidado (STADING et al., 1993; STADING et al., 1995; IKEDA e MORRIS, 2002).

## GEL GELATINA



## GEL MISTO



**Figura 6** Superfície de resposta da dureza do gel de gelatina comparado ao gel misto (60WPI : 40GB) em função da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento.



## 4 CONCLUSÃO

As variações nos dados experimentais obtidos nos ensaios mostraram que a dureza, mastigabilidade e gomosidade são variáveis que influenciam a textura dos géis de gelatina de forma mais significativa do que a elasticidade e coesividade.

A concentração de proteína foi a variável independente que gerou efeitos positivos, influenciando de forma significativa a textura dos géis, ou seja, quanto maior a concentração de proteína, mais firme foi o gel. E a temperatura apresentou efeito negativo, particularmente em baixas concentrações de proteína.

O WPI, usado isoladamente, não formou gel em nenhuma das condições estudadas de concentração de proteína e temperatura, apenas ocorreu um aumento da viscosidade da solução.

Os géis de gelatina apresentaram valores bem superiores de dureza sugerindo que os géis mistos possuem estrutura menos rígida, pois 60% destes são compostos de WPI e apenas 40% de gelatina.

O planejamento experimental elaborado permitiu, dentro do que é exigido em termos práticos, uma boa descrição e previsão do comportamento de geleificação dos géis mistos contendo 60% de isolado protéico de soro de leite bovino e 40% gelatina bovina, em função da concentração de proteínas e da temperatura.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. **Association of Official Analytical Chemists** – Official Methods of Analysis, W. Horwitz (ed.), 15<sup>th</sup> edition, Washington, D.C., p.1141, 1990.

ANTUNES, A.E.C.; MOTTA, E.M.P.; ANTUNES, A.J. Perfil de textura e capacidade de retenção de água de géis ácidos de concentrado protéico de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.183-189, 2003.

BENDER, A.E.; MILLER, D.S.; ELIZABETH, J.T. The biological value of gelatin. **Chemistry and Industry**, p.799, 1953.

BERTRAND, M.; TURGEON, S.L. Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.159-166, 2007.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v.25, n.25 p.5675-5680, 2004.

BOLAND, A.B.; DELAHUNTY, C.M.; RUTH, S.M. Influence of the texture of gelatin gels and pectin gels on strawberry flavour release and perception. **Food Chemistry**, p.1-9, 2005.

BOX, G.E.P; DRAPPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: Wiley, 1987.

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

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: e-paper, 259p., 2003

CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R.F. Properties of chemically modified gelatin films **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23, n.1 , p.45 - 53, 2006.

CARVALHO, R.A. Elaboração e caracterização de filmes à base de gelatina modificada enzimática e quimicamente. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Campinas, 2002.

CARVALHO, R.A. Elaboração e caracterização de filmes protéicos a base de gelatina modificada enzimaticamente e quimicamente. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002.

CHARLEY, H. Gelatin. In: **Food Science**, 2 ed., New Jersey: Prentice-Hall, inc., p.443-447, 1992.

CHO, S.M.; KWAK, K.S.; PARK, D.C. ; GU, Y.S.; JI, C.I., JANG, D.H.; LEE, Y.B.; KIM, S.B. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. **Food Hydrocolloids** , v.18, p.573–579, 2004.

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

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

EL-GARAWANY, G.A; EL-SALAM, M.H., Preparation and rheological properties of a dairy dessert based on whey protein/potato starch. **Food Chemistry**, v.91, p.261–267, 2005.

ERRINGTON, A.D.; FOEGEDING, E.A. Factors determining fracture stress and strain of fine-stranded whey protein gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2963-2967, 1998.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation, Bethesda, 1990.

FONKWE, L.G.; NARSIMHAN, G.; CHA, A.S. Characterization of gelation time and texture of gelatin and gelatin–polysaccharide mixed gels. **Food Hydrocolloids**, v. 17 p. 871–883, 2003.

HAUG, I.J.; DRAGET, K.I.; SMIDSROD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.2, p.203-213, 2004.

HUDSON, H.M.; DAUBERT, C.R.; FOEGEDING, E.A. Rheological and physical properties of derivitized whey protein isolate powders. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3112-3119, 2000.

IKEDA, S.; MORRIS, V.J. Fine-stranded and particle aggregates of heat-denatured whey proteins visualized by atomic force microscopy. **Biomacromolecule**, v.3, n.2, p.382-389, 2002.

IPSEN, R.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L.H.; QVIST, K.B. Gelation of whey protein induced by high pressure. **Milchwissenschaft**, v.57, n.11/12, p.650-653, 2002.

JOHNSTON-BANKS, F.A. Gelatin, In: **Food gels**, London, Peter Harris, Elsevier Applied Science, Chap. 7, p. 233-289, 1990.

JU, Z.Y.; KILARA, A. Properties of gels induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant from calcium ion-aggregated whey protein isolate. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.5, p.1236-1243, 1998.

LOWE, L.L.; FOEGEDING, E.A.; DAUBERT, C.R. Rheological properties of fine-stranded whey protein isolate gels. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.515-522, 2003.

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

MANGINO, M.E. Physicochemical aspects of whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.11, p.2711-2722, 1984.

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

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

NETO, B.B., SCRMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de processos**. Campinas, SP: Editora da Unicamp (série Manuais), 1995.

PAZ, J.C.S.N. Geleificação de sistemas simples e mistos de isolados protéicos de soja e de soro de leite. Dissertação de mestrado. Universidade estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004, 93p.

POPPE, J. Gelatin, In: **Thickening and Gelling Agents for Food**, New York., Ed. Alan Imeson, Blackie Academic & Professional, Chap.7, p.144-168, 1997.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos. Uma estratégia sequencial de planejamentos**. Editora Casa do Pão, p.326, 2005.

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

SEGTMAN, V.H.; ISAKSSON, T. Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.1, p.1-11, 2004.

STADING, M.; LANGTON, M.; HERMANSSON, A.M. Microstructure and rheological behaviour of particulate  $\beta$ -lactoglobulin gels. **Food Hydrocolloids**, v.7, n.3, p.195-212, 1993.

STADING, M.; LANGTON, M.; HERMANSSON, A.M. Small and large deformation studies of protein gels. **Journal of Rheology**, v.39, n.6, p.1445-1450, 1995.

TORRES, D.P.M. Gelificação térmica de hidrolizados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino – comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos. Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos. 100p. Braga, 2005.

TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J.G.; SALAZAR, J.A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, n.6, p.586-601, 2002.

TURGEON, S.L.; BEAULIEU, M. Improvement modification of whey protein gel texture using polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v15, p.583-591, 2001.

USTA, M.; PIECH, D.L.; MACCRONE, R.K.; HILLIG, W.B. Behavior and properties of net and filled gelatins. **Biomaterials**, v.24, p. 165–72, 2003.

ZIEGLER, F.L. Desenvolvimento de um produto dietético funcional para idosos. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade Estadual de Campinas, 2006, 243p.

## --- **Capítulo IV**

**ELABORAÇÃO DE UM PRODUTO GELEIFICADO À BASE  
DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE E  
GELATINA BOVINA**





## **ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA, SENSORIAL E ATITUDE DO CONSUMIDOR DE GELATINA DE ELEVADO VALOR NUTRICIONAL**

**J.A. ROMAN; S.N.T.G. MENDONÇA; V.C. SGARBIERI**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi o de elaborar formulações a base de gelatina com melhor valor nutricional em relação a tradicional, pela adição de isolado protéico de soro de leite (GM1, GM2 e GM3), na proporção de 60%, buscando-se um produto com boa aceitabilidade sensorial. As formulações foram caracterizadas quanto sua composição físico-química (composição centesimal, perfil de aminoácidos e informações nutricionais), perfil microbiológico e sensorial (teste de preferência, índice de aceitabilidade e intenção de compra), além de avaliar a atitude dos consumidores. Uma equipe composta por 65 julgadores avaliou os atributos de cor, sabor, textura, aroma e aparência geral de três formulações. A atitude dos consumidores foi expressa em três categorias: “concordo”, “discordo” e “nem concordo/nem discordo” e por meio de frases positivas ou negativas relacionadas à gelatina. A gelatina comercial (GC) apresentou teores significativamente inferiores de umidade e proteína e significativamente superiores de cinza em relação às gelatinas elaboradas, pois os teores de proteína foram de 10 a 13% superiores aos encontrados na gelatina comercial. A aceitabilidade de todas as amostras foi superior a 70%. Não houve diferença significativa quanto ao índice de aceitabilidade do produto geleificado GM2 em comparação com a gelatina comercial, o que significa um índice satisfatório no mercado consumidor. Dos provadores avaliados, 89% consomem gelatina em casa, principalmente após o almoço (65%), sendo preferidos os sabores de morango (47%), seguido pelo de limão (13%), uva (10%) e abacaxi (1%). A frequência de consumo foi considerada elevada, pois apenas 4% dos entrevistados disseram não consumir gelatina. Foi possível elaborar um produto

geleificado, de aceitabilidade sensorial elevada, semelhante à gelatina comercial, mas com teor de proteínas 63% superior e de elevado valor nutritivo, por meio da adição do isolado protéico de soro de leite bovino, na proporção 60:40 WPI:GB.

**Palavras-chave:** gelatina, isolado protéico, análise sensorial, aceitabilidade.

## SUMMARY

This work aimed at developing a gelatin with high nutritional value and compare the acceptability of the developed products with a commercial sample. The hedonic scale of nine points was used to evaluate the attributes of colour, flavor, aroma and texture with a panel of 65 non trained members. Higher averages were found for the texture in all products. Of the interviewed consumers, 89% consumed gelatin at home, mainly after lunch (65%), the preferred flavor was strawberry (47%), lemon (13%), grape (10%) and pineapple (1%). Consumption was assumed to be high since only 4% of the interviewed spoke as non gelatin consumers. The gelatin with whey protein isolated from bovine milk, presented a score of acceptability above 70% for the attributes of colour, aroma, consistency (texture), flavor, which indicates an adequate acceptability when compared with the commercial product.

**Key words:** gelatin, protein isolated, sensory analyses, acceptability

## 1 INTRODUÇÃO

Dois fatores prevalecem na decisão de compra do consumidor: preço e qualidade. Sabendo-se que um dos parâmetros de qualidade dos produtos alimentícios é o sensorial, reforça-se a importância dos métodos de análise sensorial, sendo esta ferramenta cada vez mais comumente utilizada na indústria de alimentos (AMBIEL, 2004).

Alimentos modificados com propriedade de saúde (COLLI et al., 2002) têm sido investigados, pois suas propriedades vão além de sua qualidade microbiológica e sensorial, de tal maneira que a dieta hoje tem um papel cada vez mais fundamental (PIRES et al., 2006).

Por este motivo, obter informações sobre as preferências e/ou aceitação de produtos alimentícios junto à população torna-se relevante para a indústria de alimentos moderna (HOUGH et al., 1997; WARD et al., 1999). E isso se faz por meio de testes sensoriais, com escalas que envolvem o uso de números, expressões verbais e/ou faciais ou linhas para expressar tanto a intensidade percebida de um atributo em um alimento (doçura, acidez), como a opinião de um indivíduo com relação ao produto (MEILGAARD et al., 1991b; MONTEIRO, 1984).

Um dos tipos de escalas de intervalo mais comumente utilizados, na análise sensorial de alimentos é a escala de categoria (STONE e SIDEL, 1993; LAWLESS e HEYMANN, 1999); já a escala hedônica estruturada de 9 pontos (PERYAM e PILGRIM, 1957) é a mais empregada para avaliar a aceitação de alimentos, pois tem como principal vantagem a sua facilidade de entendimento e uso por provadores não treinados, o que as tornam as opções preferenciais em testes com consumidores (CARDELLO e SCHUTZ, 1996).

Os testes sensoriais possuem importantes vantagens, tais como ser capaz de identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, definir características sensoriais importantes de um produto de forma rápida e capacidade de detectar particularidades que não podem ser detectadas por outros procedimentos analíticos (MUÑOZ et al., 1992).

A pesquisa de mercado é a melhor e mais confiável ferramenta para obtenção de informações representativas sobre determinado público-alvo. Além de permitir o teste de novas hipóteses, conceitos ou produtos, a pesquisa de mercado auxilia na identificação de problemas e oportunidades, e ajuda a traçar perfis de consumidores e mercados (IBOPE, 2007).

A atitude é uma predisposição aprendida pelo indivíduo, formada a partir de suas experiências e informações obtidas, as quais o influenciam a agir favorável ou desfavoravelmente em relação a um determinado “objeto”. Este “objeto” pode ser um produto ou categoria de produtos, marcas, serviços, bens, pessoas,

conceitos/ idéias, propaganda, preço, canais de comércio, mídia, entre outros (SCHIFFMAN e KANUK, 2000).

Diante do exposto, entende-se que o mercado atual requer produtos que atendam às expectativas de saúde da população e ao mesmo tempo, tenham alto valor nutricional. Assim, observando os benefícios das proteínas do soro de leite bovino (SGARBIERI, 2004), pensou-se na elaboração de uma gelatina com valor nutricional, ou seja, um produto que contenha proteína de elevado valor nutritivo, que seja benéfico ao organismo e que também esteja vinculado à praticidade e satisfatoriamente aceito pelo consumidor.

O objetivo deste trabalho foi o de elaborar uma gelatina com melhor valor nutricional, através da adição de isolado protéico de soro de leite, e caracteriza-la quanto sua composição físico-química, perfil microbiológico e sensorial, além de avaliar a atitude dos consumidores em relação à gelatina.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATERIAL**

Foi utilizado isolado protéico de soro de leite (WPI) ALACEN 895, produzido por troca iônica e ultrafiltração com reduzido teor de lactose e gordura, adquirido da NZMP®, New Zealand Milk Products, São Paulo, Brasil.

Gelatina bovina (GB), tipo A, produzida por hidrólise ácida de pele bovina, lote PFL 196/04, cedida pela empresa Gelita South América, Cotia-SP.

A proporção na mistura protéica utilizada foi baseada no valor nutritivo de misturas entre WPI e hidrolisados de colágeno bovino (HCB), determinado por ZIEGLER (2006) através de ensaios biológicos com ratos Wistar recém desmamados. Chegou-se à composição aminoacídica mais indicada, levando-se em consideração aspectos nutricionais e econômicos, e tendo-se por base o perfil de aminoácidos essenciais proposto pela FAO/WHO (1990).

Ingredientes como açúcar, saborizante e gelatina comercial foram adquiridos no mercado local. Ácido cítrico (Synth®, lote 90433, com 99,5% de

pureza) e os corantes utilizados (amarelo crepúsculo e vermelho bordeaux) foram adquiridos como padrão laboratorial.

## **MÉTODOS**

### **2.1 Testes preliminares de geleificação**

Foram estudadas características de geleificação da gelatina bovina (GB) adicionada de isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) nas proporções entre 20 e 80%, variando-se a concentração de proteína da mistura de 6 a 46%, e verificando-se a textura e aparência dos géis obtidos, a fim de estabelecer condições adequadas para o processo de obtenção de um produto geleificado misto.

Após testes preliminares de formulação para adequação da textura, analisou-se o sabor, cor e aroma de formulações de gelatina adicionadas de isolado protéico de soro de leite bovino, além de ingredientes como açúcar, ácido cítrico, aroma artificial de morango e corantes artificiais amarelo crepúsculo e vermelho bordeaux.

### **2.2 Elaboração das formulações**

Baseados nos testes preliminares, três formulações de gelatina contendo WPI foram selecionadas e apresentadas a consumidores, a fim de verificar a preferência através das observações dos atributos de cor, aroma, textura, sabor e aspecto geral. Os ingredientes e suas proporções utilizadas na elaboração das amostras estão mostrados na Tabela 1.

Os ingredientes foram adequadamente pesados em balança semi-analítica para a obtenção de cada formulação. Variações na quantidade dos ingredientes foram realizadas com o objetivo de modificar o sabor e aparência dos produtos geleificados, a fim de verificar a preferência dos consumidores durante a análise sensorial.

**Tabela 1** Composição das formulações de gelatina (base seca) contendo isolado protéico de soro de leite bovino (GM1, GM2, GM3).

| Ingredientes                  | Formulação 1 | Formulação 2 | Formulação 3 |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                               | GM1          | GM2          | GM3          |
| Proteína <sup>1</sup> WPI: GB | 23,3%        | 21,5%        | 26,0%        |
| Açúcar                        | 65,0%        | 64,4%        | 62,4%        |
| Ácido cítrico                 | 0,7%         | 1,2%         | 0,7%         |
| Estabilizante                 | 0,0%         | 4,4%         | 4,4%         |
| Saborizante                   | 11,0%        | 7,6%         | 5,6%         |
| Corante                       | 0,0%         | 0,7%         | 0,6%         |
| Aromatizante                  | 0,0%         | 0,2%         | 0,3%         |

<sup>1</sup> Fonte protéica contendo 60% de isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) e 40% de gelatina bovina (GB).

### 2.3 Caracterização das formulações

Após a mistura dos ingredientes, a caracterização das formulações foi realizada quanto à composição centesimal (umidade, teor de proteína, lipídios e resíduo mineral), perfil de aminoácidos e análise microbiológica (contagem de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*) nas três formulações de gelatina contendo isolado protéico de soro de leite, comparadas a uma gelatina comercial disponível no mercado consumidor. As análises foram realizadas por um Laboratório credenciado, localizado na cidade de Cascavel-Pr, que forneceu os resultados na forma de laudos técnicos.

**Composição centesimal:** Seguiram-se os procedimentos descritos nos métodos químicos e físicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (1985) e LANARA (1981). O teor de umidade foi realizado pelo princípio da evaporação de água. O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldhal. O cálculo do teor de proteína foi realizado multiplicando-se pelo fator 6,25 para as gelatinas



mistas e 5,55 para a amostra comercial. O resíduo mineral (cinza) foi determinado tendo como princípio a incineração da matéria seca.

**Determinação do perfil de aminoácidos:** Para a determinação dos aminoácidos, as amostras foram hidrolizadas (HCl 6N, 110°C, 22h) e fez-se a recuperação dos aminoácidos livres. Uma alíquota de 25µL foi injetada no analisador (Dionex Dx-300) para separação em coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina. Solução padrão de aminoácidos Pierce (Illinois, USA, lote: 03102467) foi utilizada para referência de cálculo de cada aminoácido.

O triptofano, que é destruído durante a hidrólise ácida, foi quantificado após a hidrólise enzimática, seguida de reação colorimétrica e posterior leitura em espectrofotômetro a 590nm. O teor de triptofano foi determinado a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas (SPIES, 1967).

**Análises microbiológica:** Estas compreenderam contagem de coliformes totais e termotolerantes que foram realizadas de acordo com as técnicas de filtração em membrana e através do método de plaqueamento e confirmação em tubos, além de pesquisa de *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* que seguiram os procedimentos descritos na Instrução Normativa nº 62, de 29 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003a). As análises microbiológicas foram realizadas nas gelatinas elaboradas antes da análise sensorial, com o intuito de avaliar a qualidade e a segurança microbiológica das formulações elaboradas.

## 2.4 Estimativa do valor nutricional

Os componentes nutricionais foram estimados segundo os critérios estabelecidos na Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, que é o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados (BRASIL, 2003b;). O valor nutricional da amostra GM2 (contendo isolado protéico

de soro de leite) foi comparado ao amostra comercial através dos dados contidos na embalagem.

O cálculo do valor energético foi estabelecido usando os fatores de conversão de 4 Kcal/g para carboidratos e proteínas e 9 Kcal/g para lipídios. O percentual de valor diário recomendado (%VD) foi calculado nos valores diários de referência de nutrientes, sendo baseado em uma dieta de 2000 Kcal, na qual se preconiza a ingestão de 300g de carboidratos, 75g de proteínas, 55g de gorduras e 2400 mg de sódio (ANVISA, 2005).

## **2.5 Critérios éticos**

Como a coleta de dados envolvia seres humanos, seguiu-se foram adotados os procedimentos recomendados pelo Conselho Nacional de Saúde, de acordo com seguindo a Resolução 196, de 10 de outubro de 1996, do Ministério da Saúde (1996) foram adotados. Para tanto, o projeto de pesquisa foi encaminhado para a avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel-PR, que concedeu parecer favorável nº163/2007 (Anexo A).

Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando cientes dos procedimentos envolvidos na análise sensorial. Nos casos de indivíduos menores de idade, foi necessária a autorização dos pais e/ou responsáveis (Anexo B).

## **2.6 Análise sensorial**

A análise sensorial é uma prática laboratorial na qual se convidam avaliadores, que se utilizam da complexa interação dos órgãos dos sentidos (visão, gosto, tato e audição), para medir as características sensoriais e a aceitabilidade dos produtos alimentícios e muitos outros materiais (WATTS et al., 1992).

**Preparo das amostras:** A preparação das amostras seguiu o procedimento padrão; primeiramente fez-se a adição de água quente e mexeu-se até dissolver por completo, em seguida, adicionou-se água fria. As soluções, após o preparo, foram distribuídas em copos descartáveis de 50mL e armazenadas em geladeira até o momento da degustação

Os voluntários provaram em cabines individuais e as amostras foram apresentadas uma de cada vez, identificadas com números de 3 dígitos aleatórios. Entre uma amostra e outra, foi recomendada a ingestão de água. As respostas foram anotadas em ficha própria (Anexo C).

**Local da pesquisa e provadores:** A análise sensorial foi realizada no laboratório de alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Toledo. Sessenta e cinco indivíduos, incluindo alunos do ensino médio (60%) e servidores públicos da Universidade, representados por funcionários administrativos (15%) e professores (21%), constituíram a equipe avaliadora da análise sensorial. De fato, 63% dos provadores pertenciam ao gênero feminino e 37% ao gênero masculino. A idade variou de 14 a 54 anos, sendo que a idade média foi de 22 anos.

**Teste de preferência:** Os provadores avaliaram o quanto gostaram ou desgostaram do produto, utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos indo de 9 “gostei extremamente” até 1 “desgostei extremamente” (CHAVES e SPROESSER, 2005). Cor, aroma, textura, sabor e aspecto geral foram os atributos avaliados.

**Índice de aceitabilidade:** Os atributos, cor, aroma, sabor e consistência foram calculados quanto ao índice de aceitabilidade (IA) (NEMATİ et al., 2004), tendo como base notas médias obtidas no teste de preferência. Para o cálculo foi adotada a seguinte expressão matemática:

$$IA = \frac{A \times 100}{B}$$

Em que, A = nota média obtida para o produto;  
B = nota máxima dada ao produto;

O IA com boa repercussão tem sido considerado superior a 70% (DUTCOSKY, 1996; MONTEIRO, 1984; CHAVES e SPROESSER, 2005).

**Intenção de compra:** Para avaliação da intenção de compra foi utilizada a escala estruturada de 5 pontos, na qual 5 representava a nota máxima "certamente compraria", e 1 representava a nota mínima "certamente não compraria", empregando-se para isso, os procedimentos descritos para análise sensorial (MEILGAARD et al., 1991a; DAMÁSIO e SILVA, 1996; SILVA, 1997).

## 2.7 Atitude do consumidor em relação à gelatina

Sessenta e cinco indivíduos fizeram parte da amostra, composta por alunos do ensino técnico em gastronomia (60%) e servidores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Toledo (40%). A idade dos entrevistados variou entre 14 e 54 anos, com idade média de 22 anos. Cerca de 60% dos provadores pertenciam ao gênero feminino. Dessa forma, verificou-se que os indivíduos que participaram da pesquisa foram basicamente jovens consumidores.

Utilizou-se um questionário estruturado com perguntas pré-codificadas e outras em que a resposta era anotada textualmente, totalizando 20 questões (Anexo D). Os dados foram coletados em junho de 2007.

A escala de atitude continha 9 itens (questões) sobre gelatina, sendo 4 de caráter negativo e o restante de caráter positivo. Os respondentes leram cada uma das frases e expressaram o grau com que concordam ou discordam de cada item, através da escala que melhor correspondesse a opinião do participante, expressa em três categorias: "concordo", "discordo", "nem concordo/nem discordo". Tais questões foram baseadas na metodologia proposta por MUELLER (1986) e BEHRENS e SILVA (2004).

Com a finalidade de caracterizar a população entrevistada e obter informações sobre seus hábitos e consumo, foram incluídas perguntas sobre faixa etária, sexo, grau de escolaridade dos respondentes, bem como questões referentes à preferência e frequência de consumo de gelatina.

## 2.8 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada pelo teste de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias pelo teste de Tukey 5% de probabilidade, utilizando-se o programa *Statística: Basic Statistics and Tables* (STATSOFT, 1995).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Composição físico-química das formulações

**Composição centesimal:** Na Tabela 2 aparecem os resultados da composição centesimal das formulações das gelatinas elaboradas, adicionadas de isolado protéico de soro de leite bovino (GM1, GM2 e GM3), comparadas a uma gelatina comercial (GC).

**Tabela 2** Caracterização físico-química (g/100g) das formulações de gelatinas, adicionadas de isolado protéico de soro de leite (GM1, GM2, GM3), em comparação a uma gelatina comercial (GC).

| Análises (g/100g)<br>(base seca) | Formulação<br>GM1       | Formulação<br>GM2       | Formulação<br>GM3       | Formulação<br>GC        |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Umidade                          | 2,53±0,10 <sup>a</sup>  | 2,42±0,11 <sup>ab</sup> | 1,91±0,24 <sup>bc</sup> | 1,75±0,01 <sup>c</sup>  |
| Proteína <sup>2</sup>            | 23,78±1,11 <sup>a</sup> | 23,26±1,03 <sup>a</sup> | 26,20±1,13 <sup>a</sup> | 13,46±0,16 <sup>b</sup> |
| Gordura                          | n.d <sup>1</sup>        | n.d <sup>1</sup>        | n.d <sup>1</sup>        | n.d <sup>1</sup>        |
| Resíduo mineral (cinza)          | 0,57±0,01 <sup>b</sup>  | 0,53±0,01 <sup>b</sup>  | 0,59±0,02 <sup>b</sup>  | 2,35±0,07 <sup>a</sup>  |
| Não determinado <sup>3</sup>     | 73,12                   | 73,79                   | 71,30                   | 82,44                   |

Resultados expressos pela média ± desvio padrão (p>0,05). <sup>1</sup>n.d, não determinada. <sup>2</sup>Proteína: (N x 6,25) para as formulações mistas e Nx5,55 para a gelatina comercial. <sup>3</sup>Não determinado (carboidratos)= 100 – (umidade + proteína + resíduo mineral).

Observa-se nos resultados das análises físico-químicas que não houve diferenças significativas nos teores de proteínas e do resíduo mineral (cinza) nas formulações adicionadas de WPI. A gelatina comercial (GC) apresentou resultados significativamente inferiores em teores de umidade e proteína e significativamente superiores em cinza comparada às gelatinas mistas.

Acredita-se que os valores não determinados, calculados por diferença, correspondam ao conteúdo de carboidratos (açúcares) presentes nas formulações. Em nenhuma das amostras estudadas foi determinado analiticamente o teor de gordura.

**Determinação da composição aminoacídica:** Na Tabela 3 encontram-se os teores de aminoácidos essenciais (g/100g de proteínas) do WPI, GB e da mistura WPI:GB, comparados com os padrões da FAO/WHO (1990) para pré-escolares e adultos.

**Tabela 3** Composição de aminoácidos essenciais dos produtos: isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina, mistura 60:40 WPI/GB, base protéica, comparados ao padrão de referência da FAO/WHO (1990).

| Aminoácidos<br>(g/100g de proteína) | Padrão                   | Padrão             | WPI  | Gelatina         | Mistura<br>60:40 |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------|------|------------------|------------------|
|                                     | FAO/WHO<br>Pré-escolares | FAO/WHO<br>Adultos |      |                  |                  |
| Treonina                            | 3,4                      | 0,9                | 4,7  | 1,9              | 3,6              |
| Metionina + Cistina                 | 2,5                      | 1,7                | 8,0  | *                | 3,6              |
| Valina                              | 3,5                      | 1,3                | 4,8  | 2,3 <sup>a</sup> | 3,6              |
| Leucina                             | 6,6                      | 1,9                | 12,8 | 3,1 <sup>a</sup> | 9,2              |
| Isoleucina                          | 2,8                      | 1,3                | 5,0  | 1,5 <sup>a</sup> | 3,6              |
| Fenilalanina + Tirosina             | 6,3                      | 1,9                | 6,8  | 2,5 <sup>a</sup> | 5,3 <sup>a</sup> |
| Lisina                              | 5,8                      | 1,6                | 10,2 | 3,9 <sup>a</sup> | 8,0              |
| Histidina                           | 1,9                      | 1,6                | 2,0  | 0,8 <sup>b</sup> | 1,4 <sup>b</sup> |
| Triptofano                          | 1,1                      | 0,5                | 2,8  | *                | 1,8              |
| Escore Aminoácidos Essenciais (EAE) |                          |                    | 1,0  | 0                | 0,8              |

\* Aminoácido não detectado na análise. <sup>a</sup>aminoácidos limitantes apenas para crianças; <sup>b</sup> aminoácidos limitantes tanto para crianças como para adultos.



A gelatina apresenta-se deficiente em todos os aminoácidos essenciais, em relação ao padrão da FAO/WHO para pré-escolares, não sendo detectado metionina, cisteína e triptofano. Pelo fato dos aminoácidos sulfurados e do triptofano serem essencialmente inexistentes na gelatina, o EAE para a gelatina é zero (0). A análise da gelatina mostrou apenas 14 aminoácidos, tendo como característica peculiar alto conteúdo de glicina, hidroxiprolina e prolina.

O WPI apresenta excelente composição aminoacídica, atendendo a todas as recomendações para os aminoácidos essenciais com base no padrão da FAO/WHO (1990) para crianças na faixa etária de 2,5 a 5,0 anos.

Para a mistura contendo 60% de WPI e 40% de gelatina, observou-se deficiência de fenilalanina e tirosina para pré-escolares e histidina também para adultos, consequência da deficiência destes aminoácidos na gelatina. É importante observar a elevada concentração de lisina, leucina e triptofano no WPI, refletindo-se no alto teor desses aminoácidos também na mistura.

**Análise microbiológica:** Análises microbiológicas são importantes recursos para monitorar a eficácia dos processos e as condições sanitárias de equipamentos e utensílios que entram em contato com os alimentos, como também dos manipuladores de alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 1992).

A caracterização microbiológica das formulações de gelatina adicionadas de isolado protéico de soro de leite, em comparação a uma gelatina, comercial está mostrada na Tabela 4.

A legislação RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, preconiza que coliformes a 45°C sejam inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/g para os produtos a serem consumidos após adição de líquido (com emprego de calor min. 75°C durante 20 segundos), portanto as amostras elaboradas estão de acordo com os padrões de referência estabelecidos pela legislação vigente, em condições sanitárias satisfatórias e apropriadas para o consumo humano.



**Tabela 4** Caracterização microbiológica das gelatinas formuladas adicionadas de isolado protéico de soro de leite (GM1, GM2, GM3), em comparação a uma gelatina comercial (GC).

| Análises Microbiológicas <sup>1</sup>                                 | Amostras                |                         |                         |                         |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                                                       | GM1                     | GM2                     | GM3                     | GC                      |
| Coliformes a 45°C (UFC/g)<br>Referência < 1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/g | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> |
| Coliformes a 35°C<br>(UFC/g)                                          | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>(UFC/g)                               | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> | < 1,0 x 10 <sup>1</sup> |
| <i>Salmonella</i><br>(Ausência em 25g)                                | Ausência                | Ausência                | Ausência                | Ausência                |

<sup>1</sup>Lauda Laboratorial. <sup>2</sup>Padrão de referência: ANVISA (2001); UFC/g= Unidade formadora de colônia/g.

### 3.2 Informações nutricionais

Informações nutricionais da formulação de gelatina (GM2) contendo como fonte protéica WPI:GB foram comparadas com as de uma gelatina comercial (Quadro 1).

Observa-se que a gelatina mista (GM2), tendo por base WPI/GB na proporção 60:40, respectivamente apresentou teor de carboidratos e valor energético semelhantes aqueles da gelatina comercial (GC). No entanto, o teor de proteínas foi bem mais elevado, o que correspondeu a um aumento de 63%. Dessa forma, atingiu-se o objetivo proposto de elaborar um produto geleificado com teores mais elevados de proteínas de melhor valor nutricional, através da adição de isolado protéico de soro de leite bovino.

**Quadro 1** Informações nutricionais da gelatina formulada (GM2) comparadas a de uma gelatina comercial (GC).

| <b>INFORMAÇÃO NUTRICIONAL</b><br>Pó para gelatina 10g (1 colher de sopa)                                                                                                                                                                                                                          |                        |      |                       |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------|-----------------------|------|
| <b>Componentes</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>GM2<sup>1</sup></b> |      | <b>GC<sup>2</sup></b> |      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Quantidade por porção  | %VD* | Quantidade por porção | %VD* |
| Valor energético                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 39 kcal = 130 kJ       | 2%   | 37 kcal = 129 kJ      | 2%   |
| Carboidratos                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 7,4g                   | 3%   | 7,6g                  | 3%   |
| Proteínas                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 2,4g                   | 3%   | 1,5g                  | 2%   |
| Gordura total                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0g                     | 0%   | 0g                    | 0%   |
| Sódio                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 60mg                   | 3%   | 97mg                  | 4%   |
| (*)% Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas. Não contém quantidades significativas de gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans e fibra alimentar. |                        |      |                       |      |

<sup>1</sup> Análises físico-químicas. <sup>2</sup> Informação nutricional na embalagem da gelatina comercial (GC).

### 3.3 Análise sensorial

Os produtos geleificados à base de WPI:GB foram avaliados sensorialmente quanto ao teste de preferência, índice de aceitabilidade e intenção de compra, comparados a uma gelatina comercial.

#### Teste de preferência

A Figura 1 ilustra as médias das notas de cor, aroma, consistência e sabor atribuídas pelos 65 julgadores não treinados que avaliaram sensorialmente as amostras.

Das três amostras formuladas no presente estudo contendo isolado protéico de soro de leite bovino, a amostra que obteve as maiores médias foi a formulação GM2, variando de 7,2 a 7,9, correspondente a “*gostei regularmente e gostei muito na escala*”. As formulações 1 e 3 apresentaram bons resultados em relação ao aroma, textura e aspecto geral.

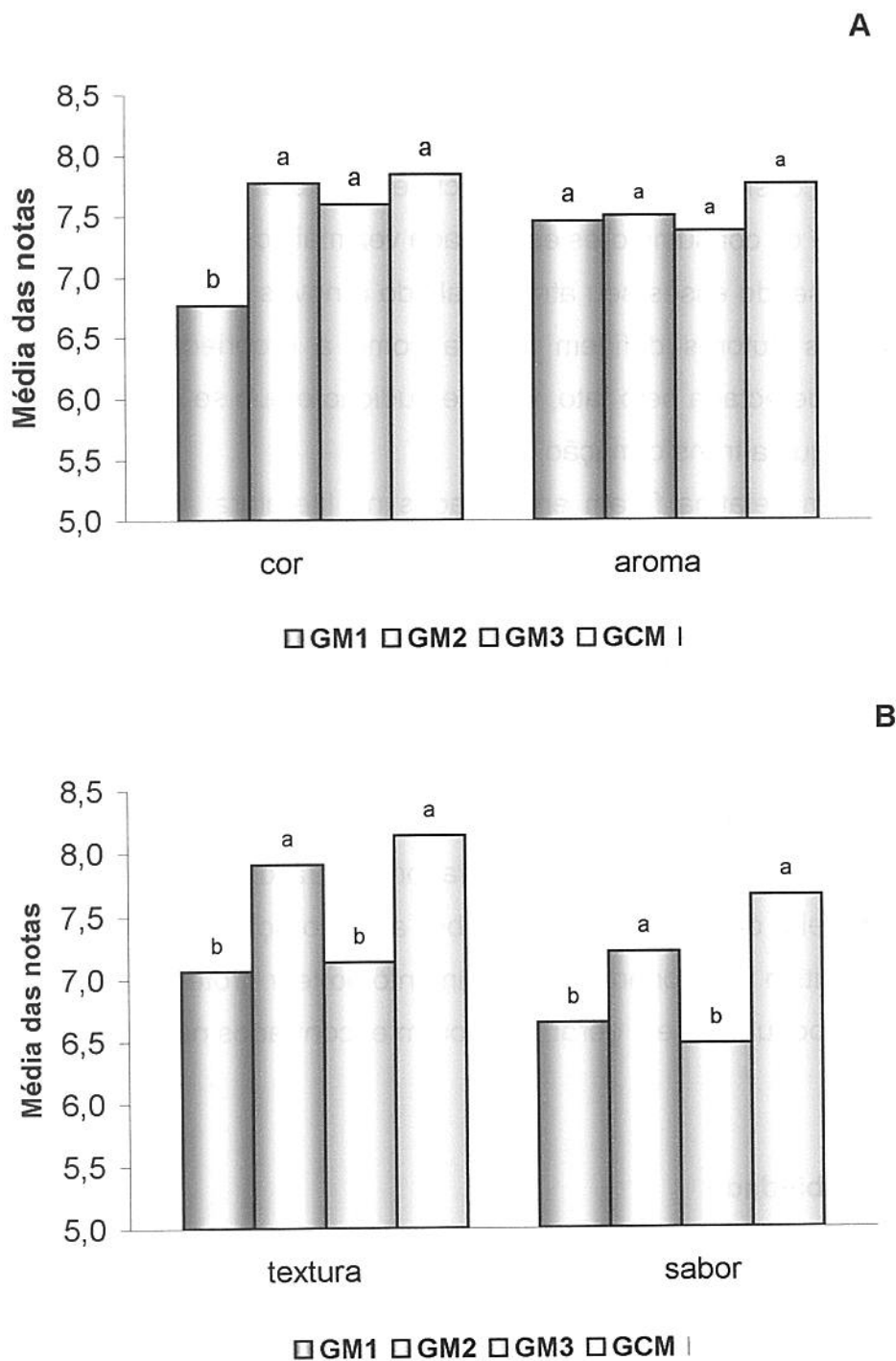
Dos atributos avaliados nas amostras de gelatina somente o aroma não apresentou diferenças significativas entre as amostras avaliadas. O sabor e a textura apresentaram a maior variação das notas atribuídas pelos degustadores. As amostras GM2 e GC foram significativamente superiores às demais.

Das quatro formulações elaboradas, a cor menos pontuada foi a da amostra GM1 (6,8), o que corresponde a *gostei ligeiramente* na escala, sendo que essa amostra foi a menos preferida pelos avaliadores.

Segundo CLYDESDALE (1993), a cor é um dos principais atributos sensoriais e está associada a muitos aspectos da vida humana, influenciando decisões, incluindo as que envolvem os alimentos. A aparência, segurança, aceitabilidade e características sensoriais dos alimentos são todas afetadas pela cor. Embora esses efeitos sejam associações inerentes às características psicológicas, eles interferem na escolha dos produtos.

Outro estudo envolvendo cor de amostras de gelatina foi realizado por PRADO e GODOY (2004), visando a determinação dos corantes em pós para gelatina. Os autores analisaram vários sabores de cinco marcas de gelatina comum e quatro marcas de gelatinas “diet”, de três lotes diferentes, totalizando 76 amostras compradas em supermercados da região de Campinas, São Paulo e Limeira.

A adição dos corantes artificiais: Tartrazina, Amarelo Crepúsculo, Amaranto, Ponceau 4R, Vermelho 40, Eritrosina, Azul Indigotina e Azul Brilhante, Verde Rápido, Azul Patente V e Azorrubina são permitidos de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1999).



**Figura 1** Média de notas atribuídas pelos julgadores para os atributos de cor e aroma (A) e textura e sabor (B) para os produtos de gelatina contendo isolado protéico de soro de leite bovino (GM1, GM2 e GM3), em comparação com uma gelatina comercial (GC). Letras diferentes indicam que houve diferenças estatísticas entre as amostras pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

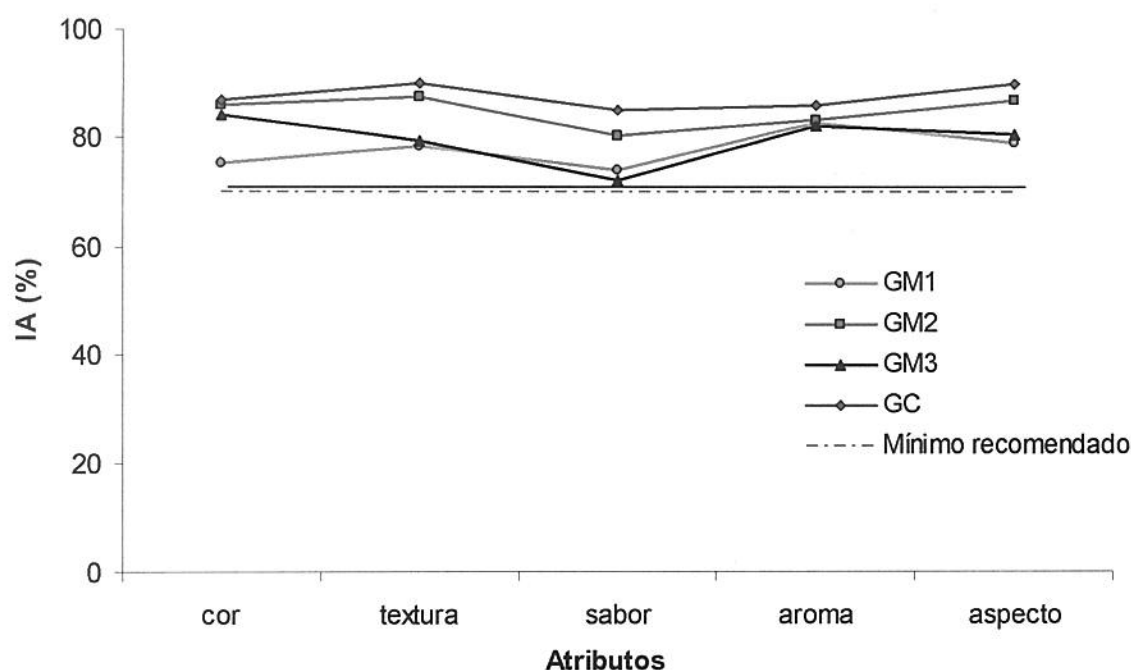
Existem opiniões contraditórias a respeito das características que mais influenciam a qualidade e aceitabilidade dos alimentos. KADER (2002) diz que o sabor é o fator mais importante e de maior ponderação, sobre aqueles que têm tradicionalmente consideração para o aspecto e a textura. ANZALDÚA-MORALES (1994), relata que os consumidores estão cada vez mais conscientes da textura de novos produtos, sendo esses seu atrativo aliado a novos sabores e propriedades sensoriais. Esses autores definem textura como a propriedade sensorial dos alimentos que é detectada pelo tato, visão e audição e que se manifesta quanto o alimento sofre alguma transformação.

Estudos com gelatina foram encontrados na literatura: PRADO e GODOY (2004) determinaram quantidades de corantes em pós para gelatina; GARCIA e PENTEADO (2005) analisaram a qualidade de balas de gelatina fortificadas com vitaminas A, C e E; CARVALHO e GROSSO (2006); FERREIRA (2006) e DAVANÇO (2006) verificaram o efeito do tratamento térmico e enzimático em filmes à base de gelatina. SILVA e BOLINI (2006) realizaram um estudo com a introdução de produto de soro ácido de leite na formulação de sorvete, em sistema modelo, verificando a percepção dos provadores para diferentes percentuais de substituição do leite desnatado. Dados sobre a elaboração de uma gelatina com melhor valor nutritivo relacionada com o aumento do teor protéico, ou do consumo de gelatina pela população em geral, não foram encontrados na literatura.

### **Índice de aceitabilidade**

Pesquisas sobre as preferências do consumidor e a aceitabilidade de produtos alimentícios por meio da análise sensorial são bastante divulgadas na literatura científica e praticadas na indústria de alimentos (LAGO et al., 2006; SILVA e BOLINI, 2006; COSTA et al., 2007; RÉVILLION, et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007; SOUZA e MENEZES, 2006; SANTANA et al., 2006).

Quanto ao índice de aceitabilidade dos produtos avaliados sensorialmente, pôde-se observar que todos os atributos foram aprovados para as quatro formulações, obtendo-se aceitabilidade mínima de 72% (Figura 2).



**Figura 2** Índice de Aceitabilidade (IA) das amostras de gelatina adicionadas de isolado protéico de soro de leite (GM1, GM2, GM3) comparadas a uma gelatina comercial (GC). Mínimo aceitável > 70%.

Em relação aos cinco atributos avaliados, o aroma foi o mais próximo entre as amostras com aceitabilidade mínima de 74%, enquanto as menores notas foram atribuídas ao sabor.

Das três formulações elaboradas contendo isolado protéico de soro de leite, a amostra GM2 apresentou aceitabilidade acima de 80% em cada atributo avaliado, considerando-se a repercussão favorável quando o índice de aceitabilidade for  $\geq$  70%.

Analizando os cinco atributos avaliados, obteve-se valores médios de 85 e 88% para a amostra GM2 e GC, respectivamente, significando que o produto elaborado apresentou aceitabilidade bem próxima a da amostra comercial, sendo esses resultados satisfatórios para a análise em nível laboratorial (Figura 2).

A amostra GM2 apresentou resultados muito semelhantes à amostra de gelatina já comercializada, no entanto, apresentou um teor mais elevado de proteínas, sendo considerada de melhor valor nutricional por conter proteínas de elevado valor biológico, baseada na sua composição de aminoácidos essenciais (EAE 0,8). O índice de aceitabilidade também foi bem próximo, respectivamente

85 e 88%, para a amostra GM2 e GC, verificando-se a mesma tendência para nas duas amostras para os cinco atributos sensoriais.

As amostras foram bem aceitas pelos consumidores, pois se atingiu a aceitabilidade mínima adequada para todos os atributos avaliados, indicando que é um produto de boa aceitação e com possibilidade de comercialização.

#### **Intenção de compra:**

Quanto à intenção de compra, apenas 3% tiveram dúvidas se comprariam as gelatinas provadas, os demais provadores comprariam qualquer das formulações, destacando-se a intenção de compra pela gelatina comercial (54,4%), seguida da amostra GM2 (32,4%) e da amostra GM1 (10,3%).

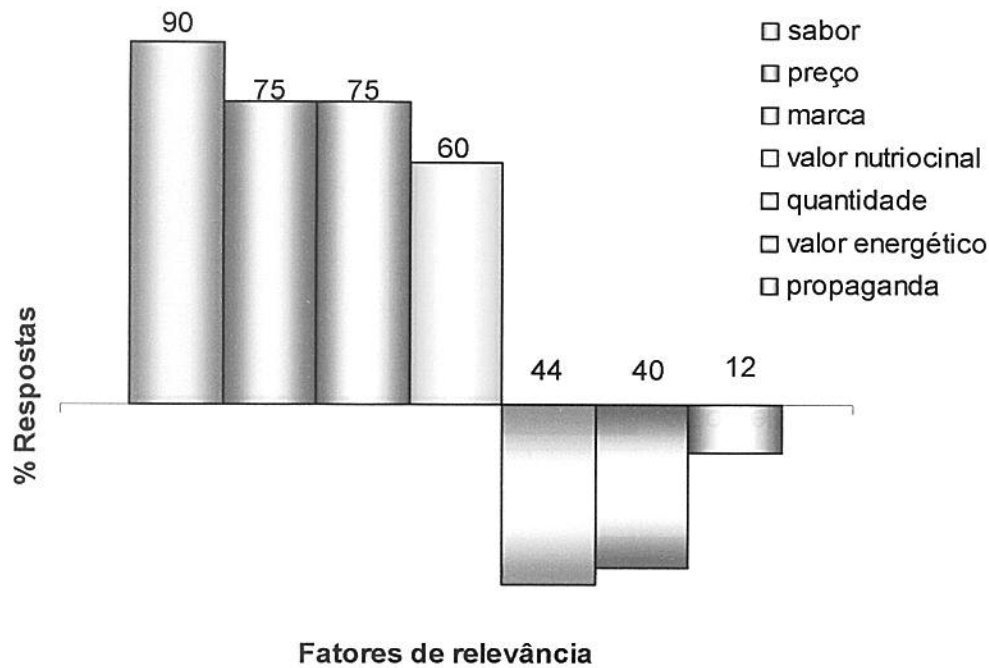
Acredita-se que a preferência pela gelatina comercial se deu pela maior aceitabilidade relativa ao aspecto geral, com índice de aceitabilidade de 77%, pois apresentava-se transparente, diferentes das demais amostras contendo WPI que se mostravam mais opacas.

Os resultados demonstram que o produto oferece boas perspectivas de consumo, tornando-se, assim, possível a elaboração de um produto à base de gelatina com melhor valor nutricional, pois os teores de proteína foram de 10 a 13% superiores aos encontrados na gelatina comercial, sem considerar o seu elevado valor nutritivo e propriedades funcionais fisiológicas já demonstradas para as proteínas do soro de leite.

### **3.4 Atitude do consumidor em relação à gelatina**

Quando questionados sobre qual é o fator de maior relevância considerado na escolha de um produto, a qualidade foi a mais evidente, pois critérios como sabor, seguido da marca e do preço foram apontados. Como irrelevantes foram considerados quantidade > valor calórico / energético > propaganda, para a maioria dos entrevistados; considerando-se como padrão 50% das respostas (Figura 3).





**Figura 3** Fatores relevantes para a escolha de produtos alimentícios.

**Consumo de gelatina:** Dos provadores avaliados, 89% consomem gelatina em casa, principalmente após o almoço (65%), sendo preferido o sabor de morango (47%), seguido pelo de limão (13%), uva (10%) e abacaxi (1%).

A frequência de consumo foi considerada elevada, pois apenas 4% dos entrevistados disseram não consumir gelatina. Pelo menos 25% consomem uma vez por semana, 16% a cada quinze dias e 26% uma vez ao mês, sendo que as quantidades consumidas geralmente são referenciadas a um pote pequeno (34%) ou médio (29%) de sobremesa.

O consumo elevado de gelatina nessa população poderia ser justificado pelo fato dos entrevistados serem estudantes de ensino médio de uma escola pública federal, UTFPR, portanto a maioria de baixa renda, como também de servidores que geralmente realizam suas refeições em restaurantes próximos a Instituição.

Cerca de 50% dos entrevistados responderam que o principal motivo relacionado ao consumo de gelatina está associado “gostar” do produto, seguido das respostas “sabor agradável”, “ser saudável” e “ter praticidade”. Esses dados estão mostrados na Figura 4.



**Figura 4** Motivo apontado pelos provadores que justificam o consumo de gelatina.

Interessa notar que nenhum dos participantes assinalou a alternativa “por ser nutritiva” do questionário. Evidenciando-se que esses estão cientes que o valor nutricional da gelatina não é uma referência para o seu consumo, pois não apresenta quantidades recomendadas de aminoácidos essenciais.

**Atitude do consumidor:** A atitude dos consumidores foi expressa em três categorias: “concordo”, “discordo” e “nem concordo/nem discordo” por meio de frases positivas ou negativas relacionadas à gelatina. Os dados estão apresentados na Tabela 5.

Observa-se para os itens 1, 2, e 3 altas frequências de entrevistados que expressaram suas opiniões através da categoria “nem concordo/nem discordo”. Isto indica que um grande número de indivíduos pareceu não estar certo das questões propostas nesses itens, em especial o item 2 “possui proteínas de boa qualidade”; atribui-se essa falta de informação pela não divulgação, pela mídia.

Desconhecem, portanto, que os produtos de elevado valor nutricional possuem aminoácidos essenciais, que necessitam estar presentes na dieta, pelo fato de não serem produzidos em nosso organismo.

**Tabela 5** Atitude do consumidor em relação à gelatina

| Itens avaliados                                   | Concordo | Discordo | Nem concordo/<br>Nem discordo |
|---------------------------------------------------|----------|----------|-------------------------------|
| <b>Negativas</b>                                  |          |          |                               |
| 1. É de origem animal?                            | 43%      | 19%      | 38%                           |
| 2. Possui proteínas de boa qualidade?             | 31%      | 16%      | 53%                           |
| 3. Apresenta alto valor nutricional?              | 29%      | 38%      | 32%                           |
| 4. Possui elevado teor calórico?                  | 4%       | 60%      | 35%                           |
| <b>Positivas</b>                                  |          |          |                               |
| 5. É “leve”, de fácil digestão?                   | 94%      | 1%       | 4%                            |
| 6. Apreciada pelas crianças?                      | 91%      | 3%       | 6%                            |
| 7. É um produto saudável e de baixo custo?        | 81%      | 7%       | 12%                           |
| 8. Pode ser enriquecida com vitaminas e minerais? | 71%      | 3%       | 26%                           |
| 9. Recomendada nas dietas de emagrecimento?       | 62%      | 6%       | 32%                           |

De acordo com as proposições dos itens 1 e 2, os entrevistados concordaram que a “gelatina é um produto de fácil digestão, muito apreciada pelas crianças e que pode ser enriquecida com minerais”. Apenas 4% dos entrevistados erroneamente acreditavam que a gelatina é um produto de elevado valor energético. Estes resultados sugerem que essa população desconhece, de um modo geral, o valor da gelatina como alimento.

Estudos sobre a percepção pelos consumidores têm sido investigados (FERNANDES et al., 2002; BEHRENS et al., 2004; BEHRENS e SILVA, 2004; DELGADO et al., 2006; MIGUEL et al., 2007). No entanto, não foram encontradas publicações referentes à atitude do consumidor em relação à gelatina. Por isso, esse estudo tornou-se oportuno.

## 4 CONCLUSÃO

Foi possível elaborar um produto geleificado, de elevado valor nutritivo por meio da adição do isolado protéico de soro de leite bovino, na proporção 60:40 WPI:GB.

Os resultados demonstram que o produto oferece boas perspectivas de consumo, pois o índice de aceitabilidade para uma das formulações elaboradas foi acima de 80% em cada atributo avaliado.

Além do mais elevado valor nutricional, com teor 63% superior de proteínas, a gelatina elaborada apresentou condições microbiológicas aceitáveis para o consumo.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBIEL, C. Efeitos das concentrações combinadas de cloreto e lactato de sódio na qualidade e conservação de um sucedâneo da carne-de-sol. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004.

ANVISA. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº.388 de 5 de agosto de 1999 (D.O.U09/08/99). "Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos – sobremesas", 1999.

ANVISA. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan. de 2001.

ANVISA. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**. Rotulagem Nutricional Obrigatória. Manual de Orientação às Indústrias de Alimentos. 2 versão, Brasília, 2005, 44p.

ANZALDÚA-MORALES, A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**. 198 p. Edit. ACRIBIA, Zaragoza, España, 1994.

BEHRENS, J.H.; SILVA, M.A.A.P. **Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.24, n.3, p.431-439, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº62, de 26 de agosto de 2003a.

BRASIL. Resolução RDC nº360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 dez. 2003b.

CARDELLO, A. V.; SCHUTZ, H. G. Food appropriateness measures as an adjunct to consumer food preferences/acceptability. **Food Quality and Preference**, v.7, n.3-4, p. 239-249, 1996.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C.R.F. Efeito do tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.495-501, 2006.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: UFV, 2005.

CLYDESDALE, F.M.; Color as a factor in food choice. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.83, 1993.

COLLI, C.; SARDINHA, F.; FILISETTI, T.M.C.C. Alimentos Funcionais. In: CUPPARI, L. Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto. Barueri, São Paulo: Manole, 2002.

COSTA, M.R.; FILHO, W.B.; CIPOLLI, K.M.V.A.B.; SILVEIRA, E.T.F.; FELÍCIO, P.E. Perfil sensorial e aceitação de presuntos crus produzidos por métodos tradicionais e acelerado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.1-176, 2007.

DAMÁSIO, M. H.; SILVA, M. A. A. P. **Curso de treinamento em análise sensorial**. Apostila. Campinas: Fundação Tropical de Tecnologia "André Tosello", 1996.

DAVANÇO, T. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capríco e surfactantes. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2006, 155p.

DELGADO, E.F.; AGUIAR, A.P.; ORTEGA, E.M.M.; SPOTO, M.H.F.; CASTILLO, C.J.C. Brazilian consumers' perception of tenderness of beef steaks classified by shear force and taste. **Scientia Agricola**, v.63, n.3, p.232-239, 2006.

DUTCOSKY, S.D. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Ed. DA Champagnat, 1996. 123.p.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. Report on a joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation, Bethesda, 1990.

FERREIRA, A.H. Efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e ceras de carnaúba e de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2006, 155p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 182p.

GARCIA, T.; PENTEADO, M.V.C. Qualidade de balas de gelatina fortificadas com vitaminas A, C e E. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.743-749, 2005

HOUG, G.; SANCHES, R.; BARBIERI, T.; MARTINEZ, E. Sensory optimization of powdered chocolate milk formula. **Food Quality and Preferences**, v.8, n.3, p.137-166, 1997.

IBOPE. O Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística disponível em: [http://www.ibope.com.br/calandraWeb/BDarquivos/sobre\\_pesquisas/pesquisa\\_opiniao.html](http://www.ibope.com.br/calandraWeb/BDarquivos/sobre_pesquisas/pesquisa_opiniao.html). Acessada em 18 de setembro de 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. 3ªed. Vol. 1 – São Paulo – 1985.

KADER, A. Potential for improving quality and extending postharvest life of stone fruits by genetic manipulation. p. 58-60. Segundo Seminario Internacional en Mejoramiento Genético de Frutales de Carozo. Actualizaciones en mejoramiento genético y postcosecha y su relación con el mercado. Santiago, Chile, 12 y 13 de noviembre de 2002. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

LAGO, E.S.; GOMES, E.; SILVA, R. Produção de geléia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico - químicos e avaliação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.847-852, 2006.

LANARA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II - Métodos Físicos e Químicos -Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de defesa Agropecuária - laboratório Nacional de Referência Animal - Brasília:, 1981, 2v.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999. 827p.

MEILGAARD, M.; CIVILE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, Inc., 354 p. 1991a.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Current progress in sensory analysis. A review. **American Society of Brewing Chemists**, v.49, p.101-109, 1991b.



MIGUEL, A.C.A.; SPOTO, M.H.F.; ABRAHÃO, C.; SILVA, P.P.S; Aplicação do método QFD na avaliação do perfil do consumidor de abacaxi 'Pérola'. **Ciência agrotécnica**, v.31, n.2, p.563-569, 2007.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO, Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais - INEP -, Censo Educacional, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução nº.196, de 10 de Outubro de 1996. **Diário Oficial da União**, de 16 de Outubro de 1996.

MONTEIRO, C.L.B. Técnicas de avaliação sensorial. 2.ed. Curitiba: CEPPA-UFPR, 1984. 101p.

MUELLER, D.J. 1986. **Measuring social attitudes: a handbook for researchers and practioners**. New York: Teachers College. 179p.

MUÑOZ, A. M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation in quality control. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992, 240p.

NEMATI, M. OVEISI, M.R.; ABDOLLAHI, H.; SABZEVARI, O. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.34, n.3, p. 485-492, 2004.

PERYAM, D.R.; PILGRIM, F.J. Hedonic scale method of measuring food preferences. **Food Technology**, v.11, n. 9, p. 9-14, 1957.

PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, N.M.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.170-187, 2006.

PRADO, M.A; GODOY, H.T. Determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pó para gelatina. **Química Nova**, v.27, n.1, p.22-26, 2004.

RÉVILLION, J.P.P.; FLÔRES, S.H.; WILK, E.O.; BADEJO, M.S.; MERCALI, G.D.; GANDOLFI, L.M.; ALLES, M.J.L.; MARIOT, R.F.; CAMPOS, S.U.; ALBERTI, S.S.; ROMERO, A.M. Qualidade sensorial de vinhos tintos finos do Rio Grande do Sul

comparados aos importados da Argentina e Chile. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.177-180, 2007.

RODRIGUES, M.A.A.; LOPES, G.L.; FRANÇA, A.S.; MOTTA, S. Desenvolvimento de formulações de biscoitos tipo cookie contendo café. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.162-169, 2007.

SANTANA, L.R.R.; SANTOS, L.C.S.; NATALÍCIO, M.A.; MONDRAGON-BERNALS, O.L.; ELIAS, E.M.; SILVA, C.B.; ZEPKA, L.Q.; MARTINS, I.S.L.; VERNAZA, M.G.; CASTILLO-PIZARRO, C.; BOLINI, H.M.A. Perfil sensorial de iogurte light, sabor pêssego. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.619-625, 2006.

SCHIFFMAN, L.G.; KANUK, L.L. 2000. **Consumer Behavior**. New Jersey: Prentice Hall, Inc. 608p.

SGARBIERI, V.C. Propriedades Fisiológicas Funcionais das Proteínas de Soro de Leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, 2004.

SILVA, K.; BOLINI, H.M.A. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.116-122, 2006.

SILVA, M. A. A. P. **Métodos de avaliação sensorial de alimentos**. Apostila: Escola de Extensão da UNICAMP. 1997. 71 p.

SOUZA, M.L.; MENEZES, H.C. Avaliação sensorial de cereais matinais de castanha-do-brasil com mandioca extrusados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.950-955. 2006.

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in protein. **Analytical Chemistry**, v.39, n.12, p.1412-1416, 1967.

STATSOFT, INC. Statistica for Windows, Computer Program Manual, Tulsa, 1995.Catalogue.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 2. ed. San Diego: Academic Press, Inc., 1993. 338 p.

WARD, C.D.W.; KOEFERLI, C.S.; SCHWEGLER, P.P.; SCHAEPPI, D.; PLEMMONS, L.E. European strawberry yogurt market analysis with a case study on acceptance drivers for children in Spain using principal component analysis and partial least squares regression. **Food Quality and Preference**, v.10, n.5, p.387-400, 1999.

WATTS, B.M., YLIMAKI, G.L., JEFFERY, L.E., ELIAS, L.G. *Métodos sensoriais básicos para la evaluación de alimentos*. Tradución: Oficina de Traducciones, Secretaria de Estado. Ottawa: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 1992. 170p.

ZIEGLER, F.L. Desenvolvimento de um produto dietético funcional para idosos. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade Estadual de Campinas, 2006, 243p.

## **Conclusões Gerais**

---



## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no decorrer deste trabalho conduziram às seguintes conclusões:

- 1) O perfil de aminoácidos essenciais do WPI, produzido em planta piloto (Rennes-França), foi superior ao padrão de referência da FAO/WHO (1990) e de resultados relatados na literatura e apresentou elevada pureza com 96,8% de proteína.
- 2) Foi possível separar dos hidrolisados do WPI e da  $\beta$ -Lg, uma fração hidrofóbica e enriquecida com peptídios contendo pontes dissulfeto em suas estruturas, por meio das técnicas cromatográficas em colunas, de troca iônica (FPLC), de fase reversa (RP-HPLC) e espectrometria de massa, aplicadas seqüencialmente.
- 3) Através de testes preliminares de formação de gel foi possível definir as variáveis independentes de relevância: concentração de proteína, pH, temperatura e tempo de aquecimento, bem como seus níveis de estudo para execução dos planejamentos experimentais.
- 4) A mistura WPI:GB (60:40%), apresentou perfil aminoacídico significativamente superior ao da gelatina, melhorando em 80% o escore de aminoácidos essenciais (EAE), já que somente dois dos 9 aminoácidos essenciais não atenderam em 100% as recomendações da FAO/WHO.
- 5) Foi possível a obtenção de géis mistos de WPI e GB, termicamente aquecidos, nas proporções 20:80, 40:60, 50:50 e 60:40, em tampão fosfato (pH 6,5). A gelatina bovina formou gel em todas as condições estudadas, ao contrário do WPI que não formou gel nas condições estudadas (concentrações inferiores a 10% proteína).

- 6)** Dureza, mastigabilidade e gomosidade são variáveis que influenciam a textura dos géis de gelatina de forma mais significativa do que a elasticidade e a coesividade.
- 7)** A concentração de proteína foi a variável independente que gerou efeitos mais positivos, influenciando de forma significativa a textura dos géis mistos; contudo a temperatura apresentou efeito negativo, particularmente em baixas concentrações de proteína. PH, tempo e t?
- 8)** Os dados apresentados nas superfícies de respostas como faixas ótimas, podem não condizer com as características de textura de interesse do produto geleificado, por isso a necessidade da relação com a análise sensorial.
- 9)** Melhores resultados de géis mistos de WPI e GB, quanto ao aspecto tecnológico e sensorial, foram obtidos em pH 6,5 aquecidos a 65°C durante 30 minutos e contendo 6% de proteína.
- 10)** Foi possível a elaboração de um produto a base de gelatina de melhor valor nutricional, em relação a gelatina tradicional, contendo 60% de isolado protéico de soro de leite bovino, e de aceitabilidade sensorial elevada (80%).



**Anexos**

---



**ANEXO A**  
**PARECER COMITÊ DE ÉTICA**



## ANEXO A - PARECER COMITÊ DE ÉTICA

### PARECER 163/2007 – CEP/FAG

O comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Assis Gurgacz, reunido em sessão ordinária, no dia 06/06/2007, ata 11/07, **APROVA** o projeto abaixo especificado.

**PROTOCOLO:** 94/2007

**PESQUISADOR:** JANESCA ALBAN ROMAN

**PROJETO:** ESTUDO DE MERCADO, ANÁLISE FÍSICO - QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E SENSORIAL DE UMA GELATINA DE ELEVADO VALOR NUTRICIONAL.

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP para acompanhamento da pesquisa o relatório final e a publicação de seus resultados, até o dia 01/12/2007, bem como a comunicação de qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

Cascavel, 06 de junho de 2007

Coordenadora do Comitê de Ética  
Em Pesquisa com Seres Humanos  
*Karina Elaine de Souza Silva*

KARINA ELAINE DE SOUZA SILVA

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
Faculdade Assis Gurgacz



## **ANEXO B**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**





## ANEXO B.1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_, responsável pelo(a) aluno(a) \_\_\_\_\_ autorizo sua participação na pesquisa intitulada **"Estudo de mercado, análise físico-química, microbiológica e sensorial de uma gelatina de elevado valor nutricional"**, sendo esta parte da tese de doutorado de Janesca Alban Roman, aluna da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas e docente da Universidade Tecnológica Federal (UTFPR), campus Toledo-Pr.

Receberei uma cópia deste documento onde consta o telefone da pesquisadora para o esclarecimento de dúvidas. Pesquisadora responsável: Prof. Janesca Alban Roman, (45) 3252-0954. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel-PR, sob o parecer nº 163/2007.

O objetivo da pesquisa é de elaborar géis de alto valor nutritivo, boas características tecnológicas e que apresentem boa aceitação sensorial (cor, sabor, textura).

Os riscos presentes para a execução da coleta de dados são considerados mínimos, pois a obtenção de informações, mediante a aplicação de questionários, no meio acadêmico, pode ser considerada uma prática de rotina, no questionário não será necessária à identificação pelo nome.

Será realizada um teste de degustação das gelatinas elaboradas por meio de uma avaliação sensorial, que consiste em provar a amostras e expressar a opinião quanto doçura, consistência, cor, aspecto global, aroma e indicar a amostra de preferência. Para tanto, as amostras foram aprovadas por meio de análises microbiológicas, o que indica que estas aprovadas para consumo humano.

Estou ciente que não será recebido remuneração em troca da participação e que os resultados obtidos durante este estudo, serão mantidos em sigilo, mas concordo em divulgá-los em publicações científicas. Estou ciente que o aluno(a) sob minha responsabilidade poderá recusar ou desistir da participação da pesquisa a qualquer momento, não tendo nenhum prejuízo em relação ao pesquisador ou com a instituição.

Fui informada (o) pela pesquisadora acima citada dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, confiabilidade, concordando ainda autorizar a participação na pesquisa.

De acordo: \_\_\_\_\_

(responsável pelo aluno)

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007.



## ANEXO B.2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_, estou de acordo em participar da pesquisa intitulada **"Estudo de mercado, análise físico-química, microbiológica e sensorial de uma gelatina de elevado valor nutricional"**, sendo esta parte da tese de doutorado de Janesca Alban Roman, aluna da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e docente da Universidade Tecnológica Federal (UTFPR), campus Toledo-Pr.

Receberei uma cópia deste documento onde consta o telefone da pesquisadora para o esclarecimento de dúvidas. Pesquisadora responsável: Prof. Janesca Alban Roman, (45) 3252-0954. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel-PR.

O objetivo da pesquisa é de elaborar géis de alto valor nutritivo, boas características tecnológicas e que apresentem boa aceitação sensorial (cor, sabor, textura).

Os riscos presentes para a execução da coleta de dados são considerados mínimos, pois a obtenção de informações, mediante a aplicação de questionários, no meio acadêmico, pode ser considerada uma prática de rotina, no questionário não será necessária à identificação pelo nome.

Será realizado um teste de degustação das gelatinas elaboradas por meio de uma avaliação sensorial, que consiste em provar a amostras e expressar a opinião quanto doçura, consistência, cor, aspecto geral, aroma e indicar a amostra de preferência. Para tanto, as amostras foram aprovadas por meio de análises microbiológicas, o que indica que estas aprovadas para consumo humano.

Estou ciente que não será recebido remuneração em troca de minha participação e que os resultados obtidos durante este estudo, serão mantidos em sigilo, mas concordo em divulgá-los em publicações científicas. Estou ciente que poderei recusar ou desistir da participação da pesquisa a qualquer momento, não tendo nenhum prejuízo em relação ao pesquisador ou com a instituição.

Fui informada(o) pela pesquisadora acima citada dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, confiabilidade, concordando ainda autorizar a participação na pesquisa.

De acordo: \_\_\_\_\_

(assinatura)

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007.



**ANEXO C**  
**FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL**



## ANEXO C: FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

Gênero: ( ) F    M ( )    Idade: \_\_\_\_\_ anos  
 Vínculo UTFPR: ( ) aluno    ( ) servidor    ( ) outros

**Por favor, avalie as duas amostras de gelatina utilizando a escala abaixo (a nota varia de 1 a 9), para descrever o quanto você gostou ou desgostou.**

- 1 ⇒ desgostei muitíssimo  
 2 ⇒ desgostei muito  
 3 ⇒ desgostei regularmente  
 4 ⇒ desgostei ligeiramente  
 5 ⇒ indiferente  
 6 ⇒ gostei ligeiramente  
 7 ⇒ gostei regularmente  
 8 ⇒ gostei muito  
 9 ⇒ gostei muitíssimo

| n° Amostra | Cor | Consistência | Doçura | Aroma | Aspecto Geral |
|------------|-----|--------------|--------|-------|---------------|
|            |     |              |        |       |               |
|            |     |              |        |       |               |

A sua amostra preferida foi a amostra n° \_\_\_\_\_.

**Quanto à intenção de compra, você:**

- ( ) certamente compraria  
 ( ) provavelmente compraria  
 ( ) tenho dúvidas se compraria  
 ( ) provavelmente não compraria  
 ( ) certamente não compraria

**Comentário Adicional:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

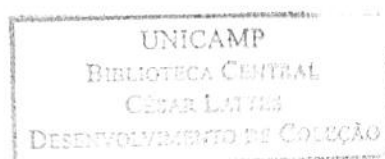
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

*Muito obrigada, sua opinião é muito importante!*







**ANEXO D**  
**QUESTIONÁRIO**



## ANEXO D: Questionário

### DADOS PESSOAIS

Idade: \_\_\_\_\_ anos

Peso: \_\_\_\_\_ kg

Altura: \_\_\_\_\_ cm

Gênero: ☐ Feminino ☐ Masculino

Vínculo UTFPR: ☐ aluno ☐ função administrativa ☐ professor ☐ outros \_\_\_\_\_

### QUESTIONÁRIO

#### 1) Você tem o costume de ler os rótulos dos alimentos?

☐ Nunca ☐ Raramente ☐ A maioria das vezes ☐ Quase sempre ☐ Sempre

#### 2) Na hora da compra o que leva você a adquirir um produto?

marca ☐ sim ☐ não

preço ☐ sim ☐ não

qualidade ☐ sim ☐ não

sabor ☐ sim ☐ não

propaganda ☐ sim ☐ não

valor energético/calórico ☐ sim ☐ não

valor nutricional ☐ sim ☐ não

quantidade/peso líquido ☐ sim ☐ não

Dos itens apontados, para você qual é o de maior relevância \_\_\_\_\_

3) Você consome gelatina? ☐ sim ☐ não ☐ às vezes Qual? ☐ normal ☐ diet ☐ light

4) Você convive com crianças que apreciam gelatina? ☐ sim ☐ não

#### 5) Assinale a alternativa que indique o principal motivo pelo qual você ingere gelatina

☐ por que gosto

☐ pela praticidade

☐ porque tem sabor agradável

☐ para auxiliar no emagrecimento

☐ por que é saudável

☐ por ser fonte de colágeno

☐ por que é nutritiva

☐ por ser acessível e de baixo custo

☐ como sobremesa após o almoço

☐ outro \_\_\_\_\_

#### 6) Se consome gelatina, onde o faz?

☐ na casa de meus pais ☐ em minha casa ☐ casa de amigos ☐ em restaurantes

☐ em outras preparações/sobremesas, quais? \_\_\_\_\_

#### 7) Com que frequência?

☐ Todos os dias

☐ 1 vez por semana

☐ 3 vezes por semana

☐ a cada 15 dias

☐ 1 vez por mês

☐ a cada três meses

☐ raramente

☐ não consumo

#### 8) Que quantidade (em medida caseira) você consome por porção de gelatina?

☐ menos que 01 pote pequeno de sobremesa

☐ 01 pote pequeno de sobremesa

☐ 01 pote médio de sobremesa

☐ mais que 01 pote médio de sobremesa

☐ Indique outra quantidade \_\_\_\_\_

#### 9) De uma forma geral, em que período você costuma consumir gelatina?

☐ café da manhã

☐ lanche da manhã

☐ após o almoço

☐ lanche da tarde

☐ ceia

☐ nenhum

10) Qual é a gelatina de sua preferência? Marca: \_\_\_\_\_ Sabor: \_\_\_\_\_

**11) A gelatina é recomendada nas dietas de emagrecimento?**

☐ Concordo      ☐ Discordo      ☐ Nem concordo/nem discordo

**12) A gelatina é um alimento de elevado valor nutricional?**

☐ Concordo      ☐ Discordo      ☐ Nem concordo/nem discordo

**13) A gelatina é um produto bastante apreciado pelas crianças?**

☐ Concordo      ☐ Discordo      ☐ Nem concordo/nem discordo

**14) A gelatina é um alimento que possui elevado teor calórico?**

☐ Concordo      ☐ Discordo      ☐ Nem concordo/nem discordo

**15) A gelatina é um produto “leve”, de fácil digestão?**

☐ Concordo      ☐ Discordo      ☐ Nem concordo/nem discordo

**16) A gelatina pode ser enriquecida com minerais e vitaminas?**

☐ Concordo      ☐ Discordo      ☐ Nem concordo/nem discordo

**17) A gelatina é excelente, pois possui um elevado teor de proteínas de boa qualidade?**

☐ Concordo      ☐ Discordo      ☐ Nem concordo/nem discordo

**18) A gelatina é obtida a partir de fonte animal ?**

☐ Concordo      ☐ Discordo      ☐ Nem concordo/nem discordo

**19) A gelatina é um alimento saudável e com custo baixo**

☐ Concordo      ☐ Discordo      ☐ Nem concordo/nem discordo

**20) Se você tivesse que elaborar uma nova gelatina, o que você gostaria de modificar e/ou acrescentar? Por que?**

***Obrigada, sua colaboração é de extrema importância!***

## Apêndices

---



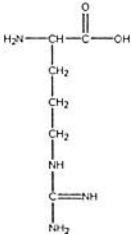
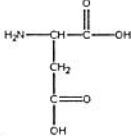
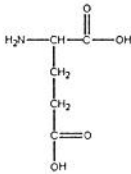
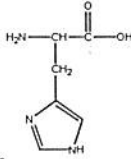
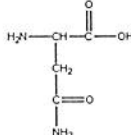
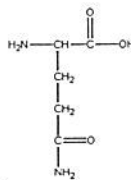
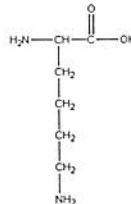
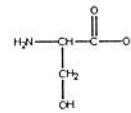
**APÊNDICE A**  
**NOMENCLATURA DOS AMINOÁCIDOS**





## Nomenclatura dos aminoácidos

(ordenados segundo a hidrofobicidade da molécula, de forma crescente)

| Nome            | Código   |         | Estrutura                                                                             | Hidrofobicidade<br>↓ |
|-----------------|----------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|                 | 3 letras | 1 letra |                                                                                       |                      |
| Arginina        | Arg      | R       |     |                      |
| Ácido aspártico | Asp      | D       |    |                      |
| Ácido glutâmico | Glu      | E       |     |                      |
| Histidina       | His      | H       |   |                      |
| Asparagina      | Asn      | N       |   |                      |
| Glutamina       | Gln      | Q       |  |                      |
| Lisina          | Lys      | K       |   |                      |
| Serina          | Ser      | S       |  |                      |

|              |     |   |                                                    |
|--------------|-----|---|----------------------------------------------------|
| Treonina     | Thr | T | <chem>C[C@H](O)[C@@H](N)C(=O)O</chem>              |
| Glicina      | Gly | G | <chem>[C@@H](N)C(=O)O</chem>                       |
| Alanina      | Ala | A | <chem>C[C@@H](N)C(=O)O</chem>                      |
| Cisteína     | Cys | C | <chem>[C@@H](CS)[C@@H](N)C(=O)O</chem>             |
| Prolina      | Pro | P | <chem>C1CC[C@H](N1)C(=O)O</chem>                   |
| Metionina    | Met | M | <chem>CSCC[C@@H](N)C(=O)O</chem>                   |
| Valina       | Val | V | <chem>CC(C)[C@@H](N)C(=O)O</chem>                  |
| Triptofano   | Trp | W | <chem>C1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)C[C@@H](N)C(=O)O</chem> |
| Tirosina     | Tyr | Y | <chem>Oc1ccc(cc1)C[C@@H](N)C(=O)O</chem>           |
| Isoleucina   | Ile | I | <chem>CC[C@H](C)[C@@H](N)C(=O)O</chem>             |
| Leucina      | Leu | L | <chem>CC(C)C[C@@H](N)C(=O)O</chem>                 |
| Fenilalanina | Phe | F | <chem>c1ccccc1C[C@@H](N)C(=O)O</chem>              |

Hidrofobicidade

## **APÊNDICE B**

### **CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE E GELATINA DE ORIGEM BOVINA**

*Publicado: Brazilian Journal of Food Technology, v.10, n.2, p.137-147, 2007*



**AUTORES**  
AUTHORS

**Janesca Alban ROMAN**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Departamento de Alimentos e Nutrição

✉ **Valdemiro Carlos SGARBIERI**

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA)  
Departamento de Alimentos e Nutrição  
CP 6121, CEP 13083-970, Campinas - SP, Brasil  
e-mail: sgarbi@fea.unicamp.br

**RESUMO**

Avaliou-se comparativamente, a composição e algumas propriedades físico-químicas de um isolado protéico do soro de leite bovino (WPI), de uma gelatina bovina com 240 bloom (GB) e uma mistura das duas proteínas na proporção 60:40 WPI/GB. Não houve diferença estatística quanto ao teor de proteína do WPI e da mistura. Para a GB encontrou-se teor mais baixo (83%) da proteína ( $p < 0,05$ ). O perfil de aminoácidos do WPI atendeu perfeitamente ao padrão da FAO/WHO, a gelatina apresentou-se deficiente em relação a todos os aminoácidos essenciais e apresentou ausência de triptofano, apresentando elevada concentração dos aminoácidos não essenciais arginina, prolina, glicina e alanina, superiores aos do WPI. O perfil de aminoácidos da mistura protéica foi significativamente melhor que o da gelatina, pois somente três dos 9 aminoácidos essenciais não atenderam às recomendações da FAO/WHO. A desnaturação térmica do WPI, determinada pela análise DSC, ocorreu a 75,4 °C e da mistura a 75,7 °C, ambas apresentando apenas um pico definido. Para a gelatina a desnaturação ocorreu a 36,1 °C. A solubilidade do WPI, pH entre 2,5 a 7,5, em solução aquosa e 0,1 M NaCl foi elevada (87,4 a 97,5%), a gelatina apresentou solubilidade inferior (63%) sendo o valor mais baixo de 24%, em pH 6,5. A solubilidade da mistura foi intermediária, na faixa de 58 a 81%.

**SUMMARY**

The composition and some physical-chemical properties of a bovine whey protein isolate (WPI), a 240 bloom bovine gelatin (BG) and a 60:40 mixture of the two proteins respectively, were comparatively evaluated. There was no statistical difference between the protein concentration of the WPI and that of the mixture of the two proteins. A lower protein concentration (83%) was found for BG ( $p < 0.05$ ). The WPI amino acid profile satisfied the FAO/WHO standard completely while the BG was deficient in all the essential amino acids and contained no tryptophan, but presented high concentrations of the nonessential amino acids arginine, proline, glycine and alanine, which were higher than in the WPI. The amino acid profile of the mixture was significantly better than that of the gelatin alone, since only three of the nine essential amino acids failed to attend the FAO/WHO recommendations. Thermal denaturation of the WPI, as determined by DSC, occurred at 75.4 °C and that of the mixture at 75.7 °C, both presenting only one peak. The BG denatured at 36.1 °C. The solubility of WPI in aqueous solution and in 0.1 M NaCl at pH values between 2.5 – 7.5 was high (87.4 to 95.5%). The gelatin was less soluble (63%), the lowest value of 24% occurring at pH 6.5. The mixture presented intermediate solubility values in the range from 58 to 81%.

**PALAVRAS-CHAVE**

**KEY WORDS**

Soro de Leite; Gelatina; Caracterização; Mistura Protéica.

Whey Protein; Gelatin; Characterization; Protein Mixture.

✉ Autor Correspondente

✉ Corresponding Author

## 1. INTRODUÇÃO

A gelatina é amplamente utilizada na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos, sendo produzida em grande escala e a preços relativamente baixos, justificando assim o grande interesse em seu uso devido às suas propriedades multifuncionais: habilidade de formar géis estáveis e reversíveis (SEGTAN e ISAKSSON, 2004).

A gelatina comercial é um produto protéico solúvel em água quente, obtida por meio de hidrólise parcial do colágeno com ácido ou álcali diluídos, respectivamente designadas gelatinas tipo A e B (HAUG et al., 2004). Em virtude da variedade de fontes de colágeno e dos diferentes métodos de produção, as gelatinas comerciais apresentam diferenças em suas propriedades físicas e químicas (BIGI et al., 2004). Elas podem variar em composição e na sequência de aminoácidos das cadeias polipeptídicas, quanto ao ponto isoeletrico e massa molecular (NEMAT et al., 2004).

A gelatina é uma proteína deficiente em todos os aminoácidos essenciais principalmente em triptofano e cisteína, enquanto que as proteínas de soro de leite apresentam esses aminoácidos em abundância, portanto, a combinação dessas duas fontes protéicas possibilita melhoria considerável no equilíbrio de aminoácidos essenciais, com significativa vantagem nutricional. Haverá também vantagem econômica na associação dessas duas proteínas, já que a gelatina é produzida em larga escala e a baixo custo enquanto que as proteínas do soro de leite são de difícil recuperação tecnológica e de alto custo. A associação de propriedades funcionais fisiológicas da gelatina e das proteínas do soro de leite também se apresenta como um potencial a ser explorado.

As proteínas do soro de leite, além de suas excelentes propriedades nutritivas e fisiológicas, apresentam propriedades físico-químicas e funcionais muito apreciadas como ingredientes alimentícios. Inclui-se na produção de géis translúcidos e de elevada consistência (VEITH e REYNOLDS, 2004; CHATTERTON et al., 2006), também utilizadas em diferentes aplicações em tecnologia de alimentos (PÉREZ et al., 2006; TOSI et al., 2007). De modo geral, as preparações derivadas do leite podem se apresentar como opções atrativas em dietoterapia por conter diferentes fatores de crescimento e moduladores do metabolismo geral (MICHAELIDOU e STEIJNS, 2006).

Existe um grande interesse no comportamento de sistemas de géis mistos, devido à variedade de propriedades mecânicas e de textura além da possibilidade de modificação dessas propriedades (WALKENSTRÖM e HERMANSSON, 1997).

O presente trabalho tem por objetivo o estudo comparativo da composição e de algumas propriedades físico-químicas de duas fontes protéicas de largo uso industrial (WPI e GB), isoladamente e da mistura WPI:GB (proporção 60:40 em base protéica).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material de estudo

Foi utilizado o isolado protéico de soro de leite, Alacen 895 produzido por troca iônica e ultrafiltração, com reduzido teor de lactose e gordura, adquirido da NZMP®, New Zealand Milk Products, São Paulo, Brasil. A Gelatina bovina, tipo A, produzida por hidrólise ácida, lote PFL 196/04, foi gentilmente cedida pela empresa Gelita® (Gelita South America), Cotia-SP. Segundo dados do fabricante foi caracterizada como de 240 bloom, viscosidade

de 33-42 mPs, teor de proteína de 83%, umidade entre 8 e 13%, conteúdo de cinza inferior a 2,0%.

A proporção na mistura protéica utilizada foi baseada no valor nutritivo de misturas entre WPI e hidrolisados de colágeno bovino (HCB), determinado por Ziegler (2006), em que através de ensaios biológicos com ratos Wistar recém desmamados, chegou-se à composição aminoacídica mais indicada, levando-se em consideração aspectos nutricionais e econômicos, tendo-se por base o perfil de aminoácidos essenciais proposto pela FAO/WHO (1990).

### 2.2 Métodos analíticos

#### 2.2.1 Determinação do perfil de aminoácidos

Para a determinação dos aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N em tubos de hidrólise, seladas sob vácuo e mantidas a 110 °C por 22 h. Após a incubação, o ácido clorídrico foi evaporado e fez-se a recuperação dos aminoácidos livres em tampão citrato pH 2,2. Uma alíquota de 25 µL foi injetada no analisador (Dionex Dx-300) para separação em coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina. Solução padrão de aminoácidos Pierce (Illinois, USA, lote: 03102467) foi utilizada para referência de cálculo de cada aminoácido.

O triptofano, que é destruído durante a hidrólise ácida, foi quantificado segundo o método descrito por Spies (1967), após a hidrólise enzimática com pronase a 40 °C por 24 h, seguida de reação colorimétrica com dimetilamino benzaldeído (DAB) e nitrito de sódio na ausência de luz e posterior leitura em espectrofotômetro a 590 nm. O teor de triptofano foi determinado a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas.

#### 2.2.2 Determinação da composição centesimal

Umidade, sólidos totais, cinza e proteínas foram determinados de acordo com os procedimentos descritos no manual da AOAC (1990). As determinações foram feitas em quadruplicata. Os sólidos totais foram obtidos pela diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo de umidade por secagem em estufa a 105 °C até peso constante. A cinza foi determinada pela incineração da amostra em cadinhos de porcelana [30-40 mm de diâmetro e 25-50 mm de altura] em mufla a 550 °C, até peso constante. Proteína bruta foi determinada pelo método semimicro-Kjeldahl, multiplicando-se o teor de nitrogênio (%N) pelo fator 6,38 para o WPI e 5,55 para a gelatina. Para a mistura usou-se fator corrigido 6,02, calculado tendo por base a %N e as proporções conhecidas das duas proteínas na mistura.

Carboidratos e lipídios totais: determinados por diferença, subtraindo-se de 100% a soma dos valores obtidos nas demais determinações.

#### 2.2.3 Determinação de grupos sulfidril livres (SH)

Foram determinados usando o reagente de Ellman (5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico), de acordo com Beveridge et al. (1984) com pequenas modificações. Aproximadamente 90-150 mg de amostra, WPI, gelatina ou mistura protéica, foram solubilizadas em 15 mL de tampão Tris 0,086 M, glicina 0,09 M, EDTA 0,04 M (pH 8,0) contendo ainda 8 M de uréia. Estas preparações foram centrifugadas (centrífuga Sorval Wilmington, Delaware, US); 27.000 g, 20 min, 4 °C. Ao sobrenadante (4 mL) foi adicionado 0,04 mL do reagente

de Ellman (4 mg.mL<sup>-1</sup>). A absorvância foi lida em 412 nm (A<sub>412</sub>), após 10 e 30 min da adição da mistura de reagente à amostra. As determinações foram feitas em triplicata em presença de um branco, isento de amostra. A quantidade expressa em  $\mu$ moles de sulfidril livre por grama de proteína foi calculada pela expressão descrita por Beveridge et al. (1974):  $\mu$ moles SH/g =  $73,53 \times A_{412} \times$  fator de diluição/concentração proteína (mg.mL<sup>-1</sup>).

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

O isolado protéico de soro de leite, a gelatina bovina e a mistura WPI:GB na proporção 60:40 foram dispersos em água destilada (20% p.v<sup>-1</sup>). Aliquotas foram colocadas em cápsulas de alumínio (50  $\mu$ L) hermeticamente seladas. Uma cápsula vazia foi usada como referência. As amostras foram aquecidas de 15 a 100 °C na velocidade de 5 °C/min, conforme Ibanoglu (2005). A variação da entalpia ( $\Delta H$ ), temperatura de desnaturação (Td), início e pico da temperatura de desnaturação foram computadas com picos endotérmicos, determinados através de programa computacional em cada curva térmica, através do equipamento Perkin-Elmer Pyris 7 DSC (differential scanning calorimeter), calibrado com solução padrão de indium. As análises foram realizadas em duplicata.

#### 2.2.5 Solubilidade da mistura protéica em função do pH

A porcentagem de solubilidade protéica (%SP) da mistura 60:40%, de WPI e da gelatina bovina 240 bloom, foi analisada em água e solução 0,1 M NaCl verificando-se o efeito do pH (2,5 a 7,5), de acordo com o método descrito por Morr et al. (1985), com pequenas modificações. Suspendeu-se 0,5 g de amostra em 40 mL de água ou solução de 0,1 M NaCl. Deixou-se em repouso por 30 min para melhor solubilização da gelatina, ajustando-se o pH das soluções com NaOH ou HCl 0,1 N. As suspensões foram mantidas sob agitação constante durante 60 min, monitorando-se o pH ao longo do período. As dispersões foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e em seguida submetidas à centrifugação (Sorval Wilmington, Telaware, US) sob 20.000 g, 30 min, 4 °C. Após a filtração em papel filtro (Whatman nº 2), determinou-se o conteúdo de proteína solúvel no filtrado pelo método semimicro-Kjeldhal (A.O.A.C., 1990), usando-se os fatores descritos na determinação da composição centesimal. A porcentagem de proteína solúvel foi calculada pela relação: %SP = concentração de proteína no filtrado (mg.mL<sup>-1</sup>) x 50/peso da amostra (mg) x conteúdo de proteína da amostra (%).

#### 2.2.6 Análise estatística

Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey utilizando-se o programa "Statística: Basic statistics and Tables".

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal dos três concentrados protéicos estudados é apresentada na Tabela 1.

O componente de maior concentração foi a proteína variando entre 83 e 90,8% para as três amostras. Não houve diferença estatística quanto ao teor de proteína entre o WPI e a mistura, tendo sido estatisticamente inferior para a gelatina ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 1.** Composição centesimal do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina, mistura protéica WPI/gelatina na proporção 60:40%.

| Componentes    | WPI                          | Gelatina                     | Mistura 60:40%               |
|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Sólidos totais | 95,5 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup> | 88,1 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup> | 92,6 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup> |
| Umidade        | 4,5 $\pm$ 0,34 <sup>c</sup>  | 11,9 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup> | 7,4 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>  |
| Proteínas      | 90,8 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup> | 83,1 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup> | 87,7 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup> |
| Cinzas         | 1,8 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>  | 0,7 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>  | 1,3 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>  |
| Diferença*     | 2,9                          | 4,4                          | 3,6                          |

\* Diferença = 100 - (proteína + cinza + umidade). Resultados são médias de 4 determinações analíticas  $\pm$  desvio padrão.

Letras diferentes [ítnhes] indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Sólidos totais, umidade e cinza diferiram significativamente entre as três amostras analisadas.

Segundo informações do fabricante, o WPI contém ainda em sua composição (mg.100g<sup>-1</sup> amostra): sódio 600 mg, potássio 300 mg, cálcio 100 mg e fósforo 70 mg. Os teores de cinza e de proteína da gelatina são os mais baixos dos três concentrados e o de umidade o mais elevado.

Na Tabela 2 encontram-se os teores de aminoácidos essenciais (g.100g<sup>-1</sup> de proteína) dos diferentes produtos protéicos e da mistura WPI:GB, comparados com os padrões da FAO/WHO (1990), para pré-escolares e adultos. Os aminoácidos não essenciais são apresentados na Figura 1.

A gelatina apresenta-se deficiente em todos os aminoácidos essenciais, em relação ao padrão da FAO/WHO para pré-escolares, não sendo detectados metionina, cisteína e triptofano. Contudo, ao considerar-se o perfil de aminoácidos essenciais recomendado para adultos, apenas a histidina permanece limitante na mistura. Pelo fato dos aminoácidos sulfurados e do triptofano serem essencialmente inexistentes na gelatina, o EAE para a gelatina é zero (0). Portanto, a gelatina é incapaz de promover crescimento em crianças e de manter o balanço nitrogenado em adultos.

O WPI apresenta excelente composição aminoacídica, atendendo todas as recomendações para os aminoácidos essenciais com base no padrão da FAO/WHO (1990) para crianças na faixa etária de 2,5 a 5,0 anos. Não somente seu valor biológico é superior, mas é uma proteína que contém em elevadas proporções aminoácidos sulfurados, os quais desempenham importantes funções antioxidantes (SINHA et al., 2007).

Para a mistura contendo 60% de WPI e 40% de gelatina, observou-se deficiência de fenilalanina e tirosina para pré-escolares e histidina também para adultos, consequência da deficiência destes aminoácidos na gelatina. É importante observar a elevada concentração de lisina, leucina e triptofano no WPI, o que reflete no alto teor desses aminoácidos também na mistura.

Quando analisado o teor de aminoácidos não-essenciais nos produtos (Figura 1), nota-se que a gelatina apresenta concentrações bastante elevadas, superiores as do WPI, dos aminoácidos arginina, prolina, glicina e alanina. A análise da gelatina mostrou apenas 14 aminoácidos, tendo como característica peculiar alto conteúdo de glicina, hidroxiprolina e prolina. Embora a gelatina não apresente composição adequada para promover crescimento e manter o balanço de nitrogênio no organismo, seu perfil atípico de aminoácidos estimula a síntese de colágeno nas cartilagens

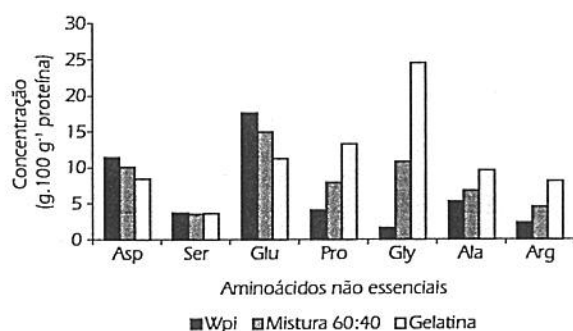


**TABELA 2.** Composição de aminoácidos essenciais dos produtos: isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina e mistura 60:40 WPI/gelatina base protéica, comparada aos padrões de referência da FAO/WHO (1990).

| Aminoácidos<br>(g.100 g <sup>-1</sup> de proteína) | Padrão FAO/WHO<br>Pré-escolares | Padrão FAO/WHO<br>Adultos | WPI  | Gelatina         | Mistura<br>60:40 |
|----------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|------|------------------|------------------|
| Treonina                                           | 3,4                             | 0,9                       | 4,7  | 1,9 <sup>a</sup> | 3,6              |
| Metionina + Cistina                                | 2,5                             | 1,7                       | 8,0  | *                | 3,6              |
| Valina                                             | 3,5                             | 1,3                       | 4,8  | 2,3 <sup>a</sup> | 3,6              |
| Leucina                                            | 6,6                             | 1,9                       | 12,8 | 3,1 <sup>a</sup> | 9,2              |
| Isoleucina                                         | 2,8                             | 1,3                       | 5,0  | 1,5 <sup>a</sup> | 3,6              |
| Fenilalanina + Tirosina                            | 6,3                             | 1,9                       | 6,8  | 2,5 <sup>a</sup> | 5,3 <sup>a</sup> |
| Lisina                                             | 5,8                             | 1,6                       | 10,2 | 3,9 <sup>a</sup> | 8,0              |
| Histidina                                          | 1,9                             | 1,6                       | 2,0  | 0,8 <sup>b</sup> | 1,4 <sup>b</sup> |
| Triptofano                                         | 1,1                             | 0,5                       | 2,8  | *                | 1,8              |
| Escore Aminoácidos Essenciais (EAE)                |                                 |                           | 1,0  | 0                | 0,8              |

\* Aminoácido não detectado na análise.

a- aminoácidos limitantes apenas para crianças; b- limitantes tanto para crianças como para adultos.



**FIGURA 1.** Composição de aminoácidos não-essenciais do WPI (isolado protéico de soro de leite bovino), gelatina bovina e mistura WPI:GB na proporção 60:40.

e na matriz extracelular de outros tecidos (MOSKOWITZ, 2000; NICKERSON et al., 2006).

Os resultados da determinação de grupos SH livres no WPI e na mistura WPI:GB são apresentados na Tabela 3. Grupos sulfidril (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 (SCHIMADA e CHEFTEL, 1989). Segundo esses 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 de formação de pontes dissulfeto, resultando em géis de baixa elasticidade e alta solubilidade protéica.

O valor determinado para o WPI foi praticamente o mesmo relatado por Liu et al. (2000) de 30  $\mu\text{moles.g}^{-1}$  de proteína para um isolado protéico de soro de leite comercial. Segundo o mesmo autor, grupos sulfidril da albumina de soro bovino (BSA) apresentaram maior reatividade em pH 6,0. Em pH 7,0, a  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -la) e a  $\beta$ -lg são as principais proteínas responsáveis por reações tiol/dissulfeto no soro de leite. A  $\alpha$ -la quando aquecida isoladamente não é capaz de formar agregado ou polímero. Beveridge et al. (1984)

encontraram para um soro de leite desidratado (Dairyland Products, Inc., Savage, MN) 30,6% de proteína (N x 6,38) e 15,0  $\mu\text{moles}$  de grupos sulfidril livres/g proteína. Como a mistura WPI:GB apresenta 60% de WPI parece coerente o valor de 18,61  $\mu\text{moles.g}^{-1}$  proteína, encontrado no presente trabalho.

**TABELA 3.** Teor de grupos sulfidril livres (SH), nas amostras de isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) e mistura WPI:GB na proporção 60:40.

| Amostra        | SH ( $\mu\text{moles.g}^{-1}$ de proteína) |                  |
|----------------|--------------------------------------------|------------------|
|                | 10 min                                     | 30 min           |
| WPI            | 31,78 $\pm$ 0,29                           | 30,80 $\pm$ 0,17 |
| WPI:GB (60:40) | 18,61 $\pm$ 0,30                           | 19,63 $\pm$ 0,07 |

Os valores são médias de três determinações.

Comparados os resultados após 10 e 30 min de reação, verificou-se pequenas diferenças. De acordo com Hardman (1981), o tempo de reação durante a determinação dos grupos SH reativos tem influência nos resultados de absorbância.

No presente trabalho o conteúdo de grupos sulfidril livres determinado foi ligeiramente diferente após 10 e 30 min de reação, sem diferença estatística entre os dois resultados.

A reação de transformação de grupos SH em pontes S-S é favorecida em valores de pH acima de 6,8 em virtude da desprotonação progressiva desses grupos com a elevação do pH, levando-os à formação de ligações covalentes. Em baixos valores de pH, os grupos SH são relativamente inertes e não contribuem para a manutenção da estrutura protéica. Nessa condição, as forças atrativas envolvidas são principalmente iônicas e hidrofóbicas. Na  $\beta$ -lg os grupos SH tornam-se altamente reativos em valores de pH acima de 7,5 (RIBEIRO, 2001).

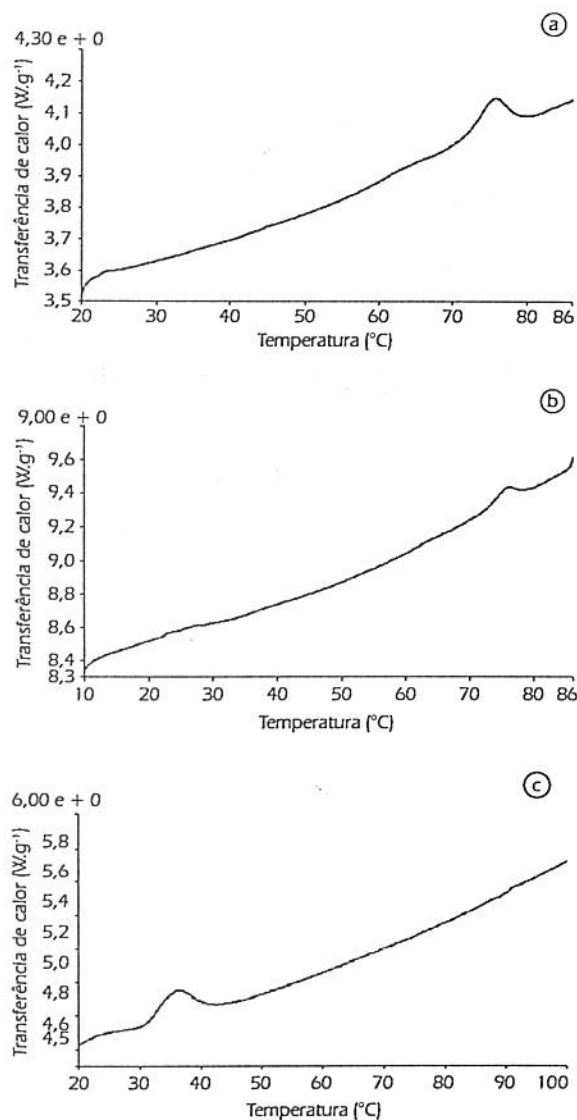
A Tabela 4 e a Figura 2 mostram os picos de temperatura de desnaturação e as alterações de entalpia de desnaturação térmica das amostras estudadas.

Observa-se que a solução com 20% de WPI (Figura 2a) mostra uma transição térmica a 75,4  $^{\circ}\text{C}$ , sendo que este dado

**TABELA 4.** Temperaturas de desnaturação (Td) e alterações de entalpia ( $\Delta H$ ) com a desnaturação térmica do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina (GB) e mistura WPI: GB na proporção 60:40.

| Solução 20%<br>(p.v <sup>-1</sup> ) em água | Td (°C) |           |       | $\Delta H$ (J.g <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------------|---------|-----------|-------|---------------------------------|
|                                             | Início  | Pico máx. | Final |                                 |
| WPI                                         | 72,3    | 75,4      | 79,1  | 3,9                             |
| GB                                          | 31,6    | 36,1      | 43,0  | 10,1                            |
| WPI:GB (60:40)                              | 73,3    | 75,7      | 78,8  | 2,2                             |

J.g<sup>-1</sup> = Joules por grama



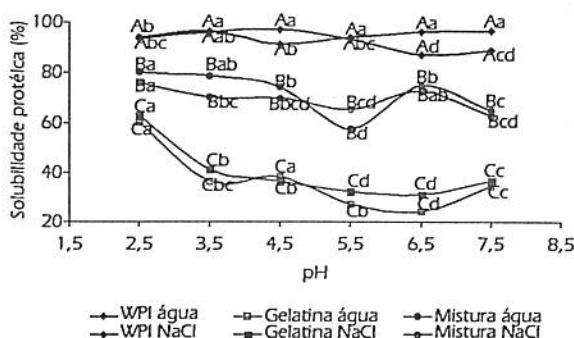
**FIGURA 2.** Calorimetria diferencial de varredura (DSC) das amostras estudadas: a) WPI, b) mistura WPI 60% e GB 40% e c) GB. Amostras dispersas em água [20% p.v<sup>-1</sup>].

encontrado está de acordo com Ibanoglu (2005) ao relatar que uma solução pura de WPI apresentou um pico a 74,6 °C, com entalpia de 1,34 J.g<sup>-1</sup> e Boye et al. (2000) encontraram pico característico da  $\beta$ -lg a 76,8 °C, utilizando-se de WPC (300 mg.g<sup>-1</sup> em tampão fosfato pH 7,0). Resultados semelhantes foram apresentados por Fitzsimons et al. (2006), utilizando-se 3% WPI, com aquecimento de 1 °C por minuto em água destilada, identificando os picos de desnaturação em ~62 e ~75 °C da  $\alpha$ -la e  $\beta$ -lg, respectivamente.

Quanto à gelatina, sua desnaturação térmica ocorreu aos 36 °C (Figura 2c), com entalpia de 10,1 J.g<sup>-1</sup>, sugerindo que apesar da desnaturação parcial, ainda deva manter elevado número de pontes de hidrogênio e de estruturação molecular.

A desnaturação envolve a dissociação de ligações intermoleculares (ligações não covalentes), em processos endotérmicos (FITZSIMONS et al., 2006). Com a mistura observou-se apenas um pico a 75,7 °C equivalente ao WPI, no entanto, observa-se uma aparente transição térmica entre 20-30 °C, porém sem definição de pico de transição, nesta faixa de temperatura. O ideal seria trabalhar com quantidades maiores de amostra para a análise de DSC, sugerindo-se para tal, recipientes de 100  $\mu$ L.

Os perfis de solubilidade para os três concentrados protéicos na faixa de pH 2,3 a 7,5, em água e em solução de 0,1 M NaCl são mostrados na Figura 3. Em solução aquosa o WPI apresentou a mais alta solubilidade em todos os pHs, variando de 91,7 (pH 4,5) a 96,2% (pH 7,5). A gelatina apresentou a mais baixa solubilidade em toda a faixa de pH, variando de 24,4 (pH 6,5) a 60,2% (pH 2,5), enquanto que a solubilidade da mistura foi de 58 (pH 5,5) e 80,6% (pH 2,5).



**FIGURA 3.** Representação do perfil de solubilidade do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), da gelatina bovina (GB) e da mistura WPI:GB na proporção 60:40, em diferentes pHs em água e em solução de 0,1 M de NaCl. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as amostras estudadas no mesmo pH. Letras minúsculas diferentes indicam resultados estatísticos da mesma amostra em função do pH.

Em solução salina a solubilidade mais baixa para a gelatina (31,5%) verificou-se em pH 6,5 e a mais alta (63%) em pH 2,5. Para o WPI, a solubilidade mais baixa (87,5) ocorreu em pH 6,5 e a mais alta (97,5) em pH 4,5, enquanto para a mistura, a solubilidade mais baixa (66%) ocorreu em pH 5,5 e a mais elevada nos pHs 2,5 e 6,5.

De acordo com a literatura, a solubilidade dos isolados de soro de leite com alto teor de proteína nativa é superior a 90% (LAW

e LEAVER, 1999) e em pH próximo a 5,2, pH da  $\beta$ -lactoglobulina, a proteína em maior quantidade no soro, quando as cargas são progressivamente neutralizadas, há maior tendência de agregação da proteína com diminuição da solubilidade (LUPANO, 2000).

Morr (1992) avaliou a solubilidade protéica de três isolados de soro de leite comerciais com teor de proteína variando entre 88,6 a 92,7%, encontrando valores de solubilidade em pH 7,0 iguais ou superiores a 98%, sendo que os valores mínimos de solubilidade foram encontrados em pH 4,5. Anema et al. (2006), determinou a solubilidade do concentrado protéico de soro de leite (MPC85) e mostrou que se armazenado a 20 °C, por períodos de 60 dias poucas alterações ocorriam na solubilidade, no entanto se estocado a 40 °C, a solubilidade decrescia de valores superiores a 80% nos dois primeiros dias para valores ao redor de 20%.

A baixa solubilidade da gelatina bovina (Tipo B), inferior a 60% também foi relatada por Mamani (2004) que verificou um aumento da solubilidade (100%) após sua hidrólise com tripsina nos pHs estudados (3,0 a 8,0). Conforme descrito por Mahmoud (1994), o aumento da solubilidade dos hidrolisados é provavelmente devido à diminuição do tamanho da cadeia polipeptídica e corresponde a um aumento da exposição de grupos ionizáveis ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{COO}^-$ ) com incremento concomitante na hidrofiliabilidade bem como da carga líquida da molécula.

Para a mistura WPI:GB (60:40%) a mais baixa solubilidade, 58%, foi obtida em pH 5,5, em solução aquosa. Isto se justifica pelo fato de que a gelatina utilizada é do tipo A, a qual apresenta ponto isoelétrico entre 4,8-5,2 (POPPE, 1997).

Esta pesquisa deverá continuar com o estudo de propriedades físico-químicas e nutricionais de géis mistos (60% WPI: 40% GB) e posterior formulação de um produto geleificado de boa aceitação pelas suas propriedades sensoriais.

#### 4. CONCLUSÕES

A mistura WPI:GB apresentou perfil aminoacídico significativamente superior ao da gelatina, pois somente três dos 9 aminoácidos essenciais não atenderam em 100% as recomendações da FAO/WHO.

A desnaturação térmica do WPI e da mistura WPI:GB, determinada pela análise da calorimetria diferencial de varredura (DSC) apresentou apenas um pico, similar e bem definido. A gelatina apresentou temperatura de desnaturação bem inferior, com uma entalpia bem mais elevada que o WPI ou a mistura WPI:GB (60:40).

Das amostras avaliadas, o WPI apresentou solubilidade mais elevada, variando entre 87,4 a 97,5%, não apresentando variações significativas com alteração de pH e da força iônica. A mistura WPI:GB, apresentou comportamento semelhante ao do WPI, no entanto com uma solubilidade intermediária entre WPI e GB. A solubilidade máxima da gelatina foi de 63% em pH ácido, sendo reduzida significativamente com a elevação do pH.

Finalmente, pode-se concluir que a mistura WPI:GB (60:40) constituiu-se em um ingrediente importante para a formulação de alimentos pelas suas propriedades tanto nutritivas como funcionais.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e a GELITA® (Gelita South America), Cotia-SP pelo suporte financeiro ao projeto.

#### REFERÊNCIAS

- ANEMA, S. G. et al. Effects of storage temperature on the solubility of milk protein concentrates (MPC85). *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 20, n. 2-3, p. 386-393, 2006.
- Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*, W. Horwitz (Ed.). 15 ed. Washington: AOAC, 1990, p. 1141.
- BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J.; NAJAI, 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.
- BEVERIDGE, T. JONES, L.; TUNG, M. A. Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean and albumen protein gels. *Journal Agriculture Food Chemistry*, Washington, v. 32, p. 307-313, 1984.
- BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, Oxford, v. 25, n. 25, p. 5675-5680, 2004.
- BOYE, J. E.; ALLI, I. Thermal denaturation of mixtures of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin: a differential scanning calorimetric study. *Food Research International*, Essex, v. 33, p. 673-682, 2000.
- CHATTERTON, D. E. W. et al. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin – Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, Barking, v. 16, p. 1229-1240, 2006.
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. *Report on a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation*, Bethesda, 1990.
- FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M.; MORRIS, E. R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, Oxford, doi:10.1016/j.foodhyd.2006.07.007, 2006.
- HARDMAN, J. F. The determination of total and reactive sulfhydryl groups of whey protein concentrates. *The Australian Journal of Dairy Technology*, Highett, v. 36, n. 1, p. 153-155, 1981.
- HAUG, I. J.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 18, n. 2, p. 203-213, 2004.
- IBANOGLU, E. Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. *Food Chemistry*, Barking, v. 90, n. 4, p. 621-626, 2005.
- LAW, A. J. R.; LEAVER, J. Factors affecting the heat denaturation of whey proteins in cow's milk. *International Dairy Journal*, Barking, v. 9, n. 3-6, p. 407-408, 1999.
- LIU, G.; XIONG, Y. L.; BUTTERFIELD, D. A. Chemical, physical, and gel forming properties of oxidized myofibrils and whey and soy proteins isolate. *Food Chemistry and Toxicology*, Oxford, v. 65, n. 5, p. 811-818, 2000.
- LUPANO, C. E. Gelation of mixed systems whey protein concentrate-gluten in acidic conditions. *Food Research International*, Essex, v. 33, n. 8, p. 691-696, 2000.
- MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technology*, Chicago, v. 48, n. 10, p. 89-95, 1994.
- MAMANI, H. N. C. *Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase*. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas, 2004, 98 p.

MICHAELIDOU, A.; STEUINS, J. Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: growth factors, vitamins and nucleotides. *International Dairy Journal*, Barking, v. 16, p. 1421-1426, 2006.

MORR, C. V. et al. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

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

MOSKOWITZ, R. W. Role of collagen hydrolysate on bone and joint disease. *Seminars In Arthritis and Rheumatism*, New York, v. 30, n. 2, p. 87-99, 2000.

NEMATI, M. et al. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 485-492, 2004.

NICKERSON, M. T. et al. Some physical properties of crosslinked gelatin-maltodextrin hydrogels. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 20, p. 1072-1079, 2006.

PÉREZ, O. E.; WARGON, V.; PILOSOFF, A. M. R. Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 20, p. 966-974, 2006.

POPPE, J. Gelatin. In: IMESON, A. (Ed.) *Thickening and Gelling agents for Food*, 2<sup>nd</sup> ed., London: Blackie Academic and Professional, cap. 7, p. 144-179, 1997.

RIBEIRO, H.S. *Obtenção e aplicação de concentrado proteico de soro de leite bovino em produtos cárneos*. Tese (doutorado

em Alimentos e Nutrição) Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas, 2001, 194 p.

SEGTAN, V. H.; ISAKSSON, T. Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2004.

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

SINHA, R. et al. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, Barking, v. 101, p. 1484-1491, 2007.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in protein. *Analytical Chemistry*, Arlington, v. 39, n. 12, p. 1412-1416, 1967.

TOSI, E. et al. Foaming properties of sweet solutions as modified by thermal treatment. *Food Chemistry*, Barking, n. 100, p. 794-799, 2007.

VEITH, P. D.; REYNOLDS, E. C. Production of a high gel strength whey protein concentrate from chesse whey. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 87, p. 831-840, 2004.

WALKENSTRÖM, P.; HERMANSSON, A. M. Fine-stranded mixed gels of whey proteins and gelatin. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 11, n. 4, p. 457-470, 1997.

ZIEGLER, F. L. F. *Desenvolvimento de um produto dietético funcional para idosos*. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2006, 243 p.



## APÊNDICE C

### INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA, TEMPERATURA E TEMPO DE AQUECIMENTO NA DUREZA DE GÉIS MISTOS

**Comunicação Oral:** 1º Jornada Científica e Tecnológica da Região Sul,  
realizado de 08 a 10 de agosto de 2007, Florianópolis – SC



# Influência da concentração de proteína, temperatura e tempo de aquecimento na dureza de géis mistos.

**Janesca Alban Roman\***

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Rua XV de Novembro, 2191 - CEP 85902-040 - Toledo-PR Fone/Fax (45) 3252-0954.  
E-mail: janasca@utfpr.edu.br

**Valdemiro Carlos Sgarbieri**

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Cidade Universitária "Zéferino Vaz" – Distrito de Barão Geraldo. Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN). Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA).  
Caixa Postal: 6121. CEP 13083-970, Campinas-SP. E-mail: sgarb@fea.unicamp.br

**Resumo:** O objetivo do presente estudo foi verificar a influência da concentração de proteína (3,2 a 8,8%) e da temperatura (51 a 79 °C) em relação ao tempo de aquecimento entre 10 e 40 min quanto ao perfil de textura (dureza) de géis mistos, contendo 60% WPI e 40% GB. O delineamento estatístico foi um planejamento fatorial  $2^2$  completo por meio de 44 experimentos. O perfil de textura foi determinado em texturômetro TAX-T2. De todas as condições estudadas, apenas na condição de 3,2% de proteína em soluções aquecidas a 65 °C durante 10 min não formaram géis. A variável independente concentração de proteína exerceu um efeito positivo significativo a 95% de confiança na dureza dos géis mistos 60:40 WPI:GB, enquanto não houve influência significativa da temperatura. As melhores percepções de firmeza foram observadas em amostras com 6% de proteína, aquecidas a 65 °C durante 30 min.

**Palavras-chave:** gelatina, proteína de soro de leite, gel misto, perfil de textura, superfície de resposta

## 1. Introdução

As proteínas do soro de leite que apresentam melhores propriedades geleificantes são a  $\beta$ -lactoglobulina e a albumina do soro bovino (BSA). A primeira é de 10 a 20 vezes mais abundante nos produtos com soro lácteo sendo, portanto, considerada o principal agente gelatinizante (AGUILERA, 1995). Esta propriedade deve-se a presença de grupos sulfidrilas livres (RATTRAY e JELEN, 1997).

A gelatina é um dos produtos mais populares e amplamente utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica, cosméticos e fotográfica (CHO et al. 2004., BIGI et al. 2004). A gelatina é produzida em larga escala a preços relativamente baixos, justificando assim o grande interesse e exploração de suas propriedades funcionais (CARVALHO, GROSSO, 2006).

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).

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 WPI nos pHs entre 4,0 e 6,3. Nos dois estudos, os autores observaram que os géis mistos apresentaram maior firmeza, elasticidade e maior capacidade de retenção de água que os géis simples produzidos nas mesmas condições.

O objetivo desse estudo foi o de verificar a influência da concentração de proteína, da temperatura e tempo de aquecimento no perfil de textura (dureza) de géis mistos, contendo 60% WPI e 40% GB.



## 2. Materiais e métodos

Gelatina bovina, tipo A, produzida por hidrólise ácida, lote PFL 196/04, foi cedida pela empresa Gelita, Cotia-SP. Caracterizada como 240 bloom, viscosidade de 33-42 mPs, teor de proteína de 83%, umidade entre 8 e 13%, conteúdo de cinza inferior a 2,0% e pH entre 5,0-6,0. Foi utilizado o isolado protéico de soro de leite, ALACEN 895 produzido por troca iônica e ultrafiltração, com reduzido teor de lactose e gordura, adquirido da NZMP®, New Zealand Milk Products, São Paulo, Brasil.

A proporção na mistura protéica utilizada foi baseada no valor nutritivo de misturas entre WPI e hidrolisados de colágeno bovino (HCB), determinado por Ziegler (2006), em que através de ensaios biológicos com ratos Wistar recém desmamados, chegou-se à composição aminoácida mais indicada, levando-se em consideração aspectos nutricionais e econômicos, tendo-se por base o perfil de aminoácidos essenciais proposto pela FAO/WHO (1990).

### 2.1 Delineamento experimental

Géis mistos contendo 60% de WPI e 40% de gelatina foram elaborados através da geleificação termicamente induzida, em diferentes condições experimentais, variando-se a concentrações de proteína, temperatura e tempo de aquecimento.

Um planejamento fatorial completo ( $2^2$ ), em dois níveis (-1, +1), mais os pontos axiais (- $\alpha$ , + $\alpha$ ) foi utilizado para verificar os efeitos das variáveis independentes nas características de textura dos géis, utilizando o "Central Composite Design" (BOX, DRAPER, 1987), ou Metodologia de Superfície de Resposta (NETO et al. 1995; CALADO, MONTGOMERY, 2003; RODRIGUES, IEMMA, 2005).

A Tabela 1 e Tabela 2 mostram a estrutura do planejamento fatorial completo executado, composto por um delineamento com 2 variáveis independentes em cinco níveis de variação, onde  $\alpha = \pm (2^n)^{1/4}$ , sendo o n o número de variáveis independentes (NETO et al. 1995).

A mistura de 60% de WPI e 40% GB foi utilizada para verificar a influência da concentração de proteína entre 3,2 e 8,8% e da temperatura entre 51 e 79°C em função do tempo de aquecimento de 10, 20, 30 e 40 minutos, que foi uma variável fixa para cada bloco de 11 ensaios, totalizando 44 ensaios.

**Tabela 1. Níveis das variáveis do perfil de textura: influência da concentração de proteína e da temperatura.**

| Variáveis                    | Níveis     |     |     |     |            |
|------------------------------|------------|-----|-----|-----|------------|
|                              | - $\alpha$ | -1  | 0   | +1  | + $\alpha$ |
| Concentração de proteína (%) | 3,2        | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 8,8        |
| Temperatura (T °C)           | 51         | 55  | 65  | 75  | 79         |

$$\alpha = \pm (2^n)^{1/4} = \pm 1,414$$

**Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial completo, com as variáveis codificadas e reais.**

| Exp. | Variáveis Codificadas |            | Variáveis Reais |      |
|------|-----------------------|------------|-----------------|------|
|      | %                     | T °C       | %               | T °C |
| 1    | -1                    | -1         | 4,0             | 55   |
| 2    | 1                     | -1         | 8,0             | 55   |
| 3    | -1                    | 1          | 4,0             | 75   |
| 4    | 1                     | 1          | 8,0             | 75   |
| 5    | - $\alpha$            | 0          | 3,2             | 65   |
| 6    | + $\alpha$            | 0          | 8,8             | 65   |
| 7    | 0                     | - $\alpha$ | 6,0             | 51   |
| 8    | 0                     | + $\alpha$ | 6,0             | 79   |
| PC   | 0                     | 0          | 6,0             | 65   |
| PC   | 0                     | 0          | 6,0             | 65   |
| PC   | 0                     | 0          | 6,0             | 65   |

PC = ponto central, repetições;

$$\alpha = \pm (2^n)^{1/4} = \pm 1,414$$

### 2.2 Perfil de Textura

Amostras à temperatura ambiente, com 2,0cm de diâmetro e 1,0cm de altura foram comprimidos por um probe cilíndrico acrílico de fundo chato com 5 cm de diâmetro e os relutados obtidos da curva força x tempo foram calculados pelo programa Texture Expert versão 1.11 para TPA (Texture Profile Analysis).

A curva obtida para cada amostra resultou de dois ciclos de compressão que são relativos a parâmetros mecânicos da amostra; sendo a dureza a características de interesse nesse estudo.

Os perfis de textura dos géis obtidos foram analisados segundo método descrito por Ju e Kilara (1998), em texturômetro modelo TA XT-2 (Stable Microsystems SMS, Surrey, UK).

As condições de medida foram padronizadas em probe de calibração de 40mm, força de compressão de 5g e 50% de compressão.

velocidade pré-teste, no teste e pós teste de 3mm/s. Foram analisados seis géis resultantes de cada condição estudada.

### 2.3 Aspecto Visual

Para optar pelo melhor tempo de aquecimento estudado (entre 10 e 40 min.) para a elaboração dos géis mistos de WPI:GB, na proporção 60:40% utilizou-se como critério de avaliação a aparência dos géis mistos formados.

### 2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente segundo a metodologia de superfície de resposta, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

O software Statistica for Windows versão V foi utilizado para calcular os coeficientes de regressão, análise de variância (ANOVA) e coeficientes de correlação do modelo, bem como para gerar as superfícies de resposta.

Equações polinomiais de segunda ordem foram ajustadas para os dados experimentais do planejamento fatorial completo. As variáveis não significativas a 95% de confiança foram colocadas no resíduo.

## 3 Resultados e discussão

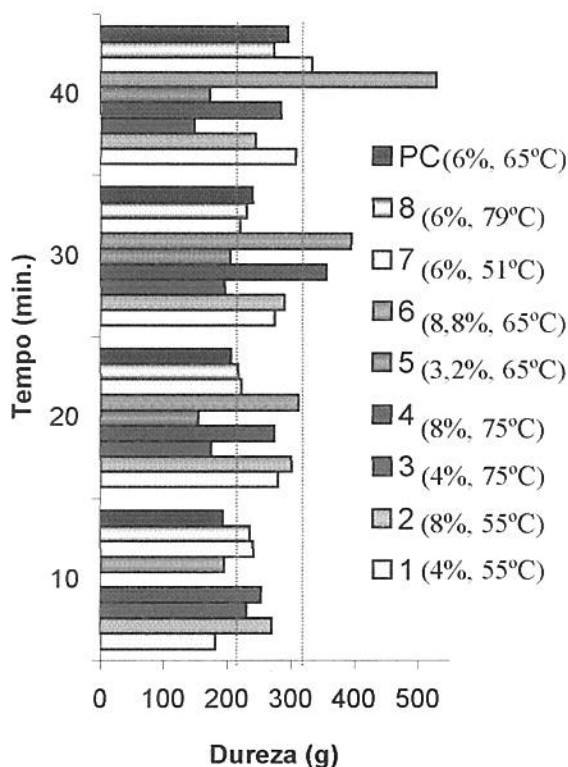
### 3.1 Perfil de textura dos géis mistos

Para a elaboração dos géis mistos, contendo 60% de WPI e 40% de GB, foram analisadas as influências do tempo de aquecimento do gel em 10, 20, 30 e 40 min., por meio de 44 experimentos. Os resultados podem ser visualizados na Figura 1.

Nas soluções com 3,2% de proteína, aquecidas a 65°C (ensaio 5) não houve formação de gel somente quando os géis mistos foram aquecidos durante 10 min, ocorrendo apenas um aumento da viscosidade.

As linhas tracejadas representam o valor ideal de dureza. Segundo as características sensoriais dos géis em cada experimento, estimando-se que a dureza para a sobremesa que se deseja elaborar, formando um gel que possa ser cortado com a colher sem perder a forma e não apresentar com textura rígida está entre 230 e 330 g-força.

Observando-se os ensaios 7, 8 e PC realizados nesse trabalho, em que a concentração de proteína foi de 6% e variação da temperatura de aquecimento entre 51 e 79°C, pode-se observar que a menor temperatura estudada (51°C) apresentou perfil de dureza superior quando comparados a géis aquecidos a 79°C, exceto quando os géis foram aquecidos por 30 min.



**Figura 1. Influência do tempo de aquecimento na dureza do gel misto, contendo 60% de isolado protéico de soro do leite (WPI) e 40% de gelatina bovina (60:40% WPI:GB)**

### 3.2 Análise dos efeitos

As variáveis, lineares, quadráticas e suas interações fazem parte dos modelos para compor as superfícies de resposta.

As análises dos efeitos das variáveis independentes (concentração de proteína (%P) e temperatura (T°C) durante 30 minutos) bem como os resultados estatísticos dos efeitos da dureza dos géis mistos em função do tempo de aquecimento, estão mostradas na Tabela 3.

Observou-se que a variável concentração proteína exerceu um efeito positivo significativo a 95% de confiança em todas as respostas estudadas dos géis mistos 60:40 WPI:GB, enquanto não houve influência significativa da temperatura. A interação proteína x temperatura gerou efeito significativo positivo para a dureza dos géis.

**Tabela 3. Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para cada fator no modelo codificado para a dureza dos géis mistos, aquecidos por 30 min.**

| Variáveis | Efeito estimado | Erro Padrão | p       |
|-----------|-----------------|-------------|---------|
| % P (L)   | 55,48*          | 2,26*       | 0,0017* |
| % P(Q)    | 34,38*          | 2,69*       | 0,0061* |
| T°C (L)   | 0,50            | 2,26        | 0,8455  |
| T°C (Q)   | -3,29           | 2,69        | 0,3459  |
| %P x T°C  | 36,32*          | 3,20*       | 0,0077* |

\* significativos à 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ )

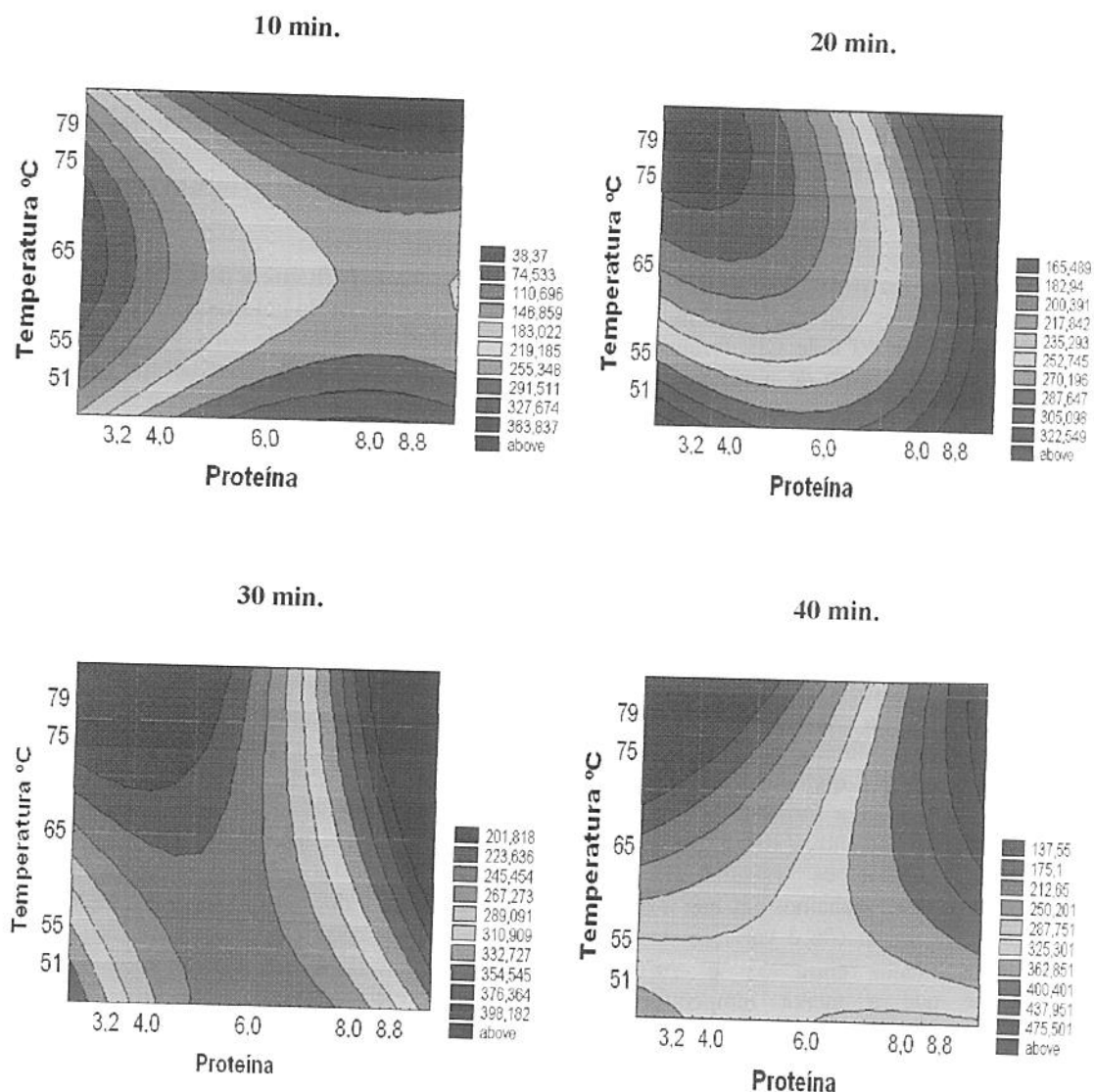
(L) medida linear;

(Q) medida quadrática

### 3.3 Curvas de contorno e superfícies de resposta

A Figura 2 compara por meio das curvas de contorno a dureza dos géis mistos, contendo 60% de WPI e 40% de GB, em tempos de aquecimento entre 10 e 40 min.

O que foi verificado é que a área mais escura indica a maior dureza dos géis, no entanto esses valores de firmeza, correspondentes a 8 e 8,8% de proteína, são superiores aos desejáveis. As melhores percepções de firmeza foram observadas em amostras com 6% de proteína, comparando-se as curvas de contorno, observa-se que esta faixa está otimizada no ponto central, o que corresponde entre 220 e 260g-força, no tempo de aquecimento de 30 min.



**Figura 2** Curvas de contorno tendo como resposta dureza dos géis pela variação da concentração de proteína e da temperatura (°C) em diferentes tempos de aquecimento (min.)

A superfície de resposta expressa por meio de equações matemáticas para a obtenção dos géis mistos aquecidos durante 30 min., está apresentada na Figura 3.

A equação (1) codificada que expressa a dureza dos géis mistos em função das variáveis estudadas foi:

$$\text{Dureza} = 239,693 + 55,476(\text{proteína}) + 0,5(\text{temperatura}) + 34,379(\text{proteína})^2 + 36,318(\text{interação proteína} \times \text{temperatura}) - 3,291(\text{temperatura})^2 \quad (1)$$

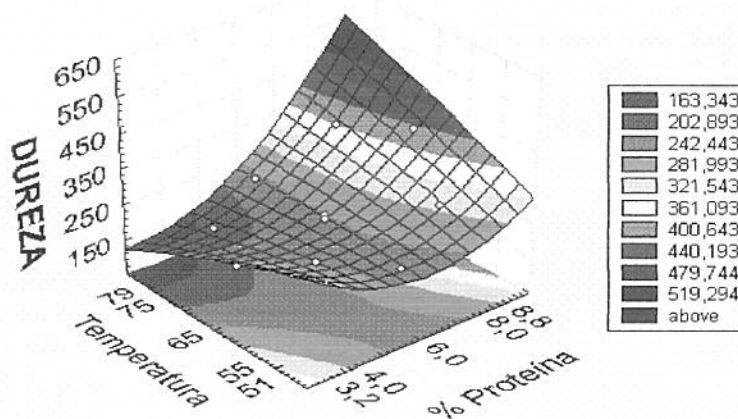


Figura 3 Superfície de resposta relacionada com a dureza de géis de mistos, contendo 60% de WPI e 40% de GB, após 30 min de aquecimento.

Observa-se que a dureza é influenciada positivamente pelo aumento da concentração de proteína, enquanto que a temperatura elevada de aquecimento, diminui a firmeza dos géis mistos. Conforme discutido anteriormente, considera-se que o atributo de dureza foi otimizado, pois a faixa desejada encontra-se no centro da figura, o que corresponde ao ponto central: 6,0% de proteína e aquecimento de 65°C.

#### 4. Conclusão

A concentração de proteína foi a variável independente que gerou efeitos positivos, influenciando de forma significativa a textura dos géis, ou seja, quanto maior a concentração de proteína, mais firme foi o gel. E a temperatura apresentou efeito negativo, particularmente em baixas concentrações de proteína.

Dos tempos de aquecimento estudados, os géis apresentaram melhor aparência quando aquecidos durante 30min, tempos inferiores não foram suficientes para manter a estrutura dos géis em todas as condições estudadas e superiores apresentaram géis não homogêneos e de elevada sinerese na maioria dos ensaios.

#### 5 Referências bibliográficas

- AGUILERA, J. M. Gelation of whey proteins. *Food Technology*, v. 49, n. 10, p. 83-89, 1995.
- 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.
- BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, Oxford, v.25, n. 25 p.5675-5680, 2004.
- BOX, G.E.P & DRAPPER, N.R. Empirical model-building and response surfaces. New York: Wiley, 1987.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. Planejamento de experimentos usando o Statistica. Rio de Janeiro: e-paper, 259p., 2003.
- CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Properties of chemically modified gelatin films

**Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 45 - 53, 2006.

CHO, S.M.; KWAK, K.S.; PARK, D.C.; GU, Y.S.; JI, C.I.; JANG, D.H.; LEE, Y.B.; KIM, S.B. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. **Food Hydrocolloids** 18, 573-579, 2004.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation, Bethesda, 1990.

JU, Z.Y.; KILARA, A. Properties of gels induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant from calcium ion-aggregated whey protein isolate. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.5, p.1236-1243, 1998.

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.

NETO, B.B., SCRMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de processos**. Campinas, SP: Editora da Unicamp (série Manuais), 1995.

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.

RATTRAY, W., JELEN, P. Thermal stability of skim milk/whey protein solution blends. **Food Research International**, v. 30, n. 5, p. 327-334, 1997.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Uma estratégia seqüencial de planejamentos. Editora Casa do Pão, p.326, 2005.

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

ZIEGLER, F.L.. Desenvolvimento de um produto dietético funcional para idosos. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e

Nutrição da Universidade Estadual de Campinas, 2006, 243p.

## 6 Responsabilidade de autoria

As informações contidas neste artigo são de inteira responsabilidade de seus autores. As opiniões nele emitidas não representam, necessariamente, pontos de vista da Instituição c/ou do conselho editorial.

## 7 Nomenclatura

| Símbolo            | Definição                             |
|--------------------|---------------------------------------|
| $\beta$ -Lb        | $\beta$ -Lactoglobulina               |
| BSA                | Albumina do Soro Bovino               |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Centígrados                     |
| cm                 | Centímetro                            |
| %P                 | Concentração de proteína              |
| g                  | Gramas                                |
| p                  | Grau de significância estatística     |
| GB                 | Gelatina Bovina                       |
| h                  | Horas                                 |
| %P.T               | Interação proteína e temperatura      |
| WPI                | Concentrado protéico de soro de leite |
| L                  | Medida linear                         |
| Q                  | Medida quadrática                     |
| min                | Minutos                               |
| mL                 | Mililitros                            |
| mm                 | Milímetros                            |
| n                  | Número absoluto                       |
| pH                 | Potencial hidrogeniônico              |
| t                  | Tempo                                 |
| T                  | Temperatura                           |
| TPA                | Textura profile analysis              |
| WPI                | Isolado Protéico de Soro do Leite     |

## APÊNDICE D

### POSTERS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

6º Simpósio Latino Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado de 07 a 10 de novembro de 2005, Campinas - SP

XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado de 08 a 11 de outubro de 2006, Curitiba - PR

IX Encontro Regional sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado de 16 a 19 de outubro de 2007, Curitiba - PR

7º Simpósio Latino Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado de 04 a 7 de novembro de 2007, Campinas - SP







UNICAMP

# COMPARAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA ENTRE GELATINA E ISOLADO PROTEÍCO DE SORO DE LEITE BOVINO OBTIDO EM RENNES - FRANÇA

Janesca Alban ROMAN, Valdemiro Carlos SGARBIERI

Faculdade de Engenharia de Alimentos - Departamento de Alimentos e Nutrição

Apoio: Empresa Gelita South America®



## INTRODUÇÃO

O leite desnatado pode ser separado em frações ricas de caseína e de proteínas do soro, usando-se membranas cerâmicas. A principal vantagem é que se trata de um processo termicamente suave e puramente mecânico. Isso significa que não tem impacto negativo nas propriedades funcionais e nutricionais do produto.

O estágio consolidado no 1º semestre de 2004, no Instituto Nacional de Pesquisa Agrônoma - INRA, foi realizado com o objetivo de produzir isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) com uma quantidade superior de 90% de proteína, além de caracterizar esse material quanto à composição centesimal e de aminoácidos, comparando-o com a gelatina bovina.

## METODOLOGIA

**Matéria-prima:** O leite bovino desnatado cru (4°C) (1.200L), composto de diferentes variedades genéticas (A,B e C).

**Processamento:** Todo o processo de obtenção do WPI foi realizado na planta piloto do INRA, localizado na cidade de Rennes-França. Os processos envolvidos foram: microfiltração, concentração, diafiltração, ultrafiltração e liofilização (Figura 1).

**Caracterização:** Foram determinados extrato seco, umidade, proteína bruta, minerais, flora total mesófila e composição aminoacídica, conforme procedimentos padronizados pelo INRA.

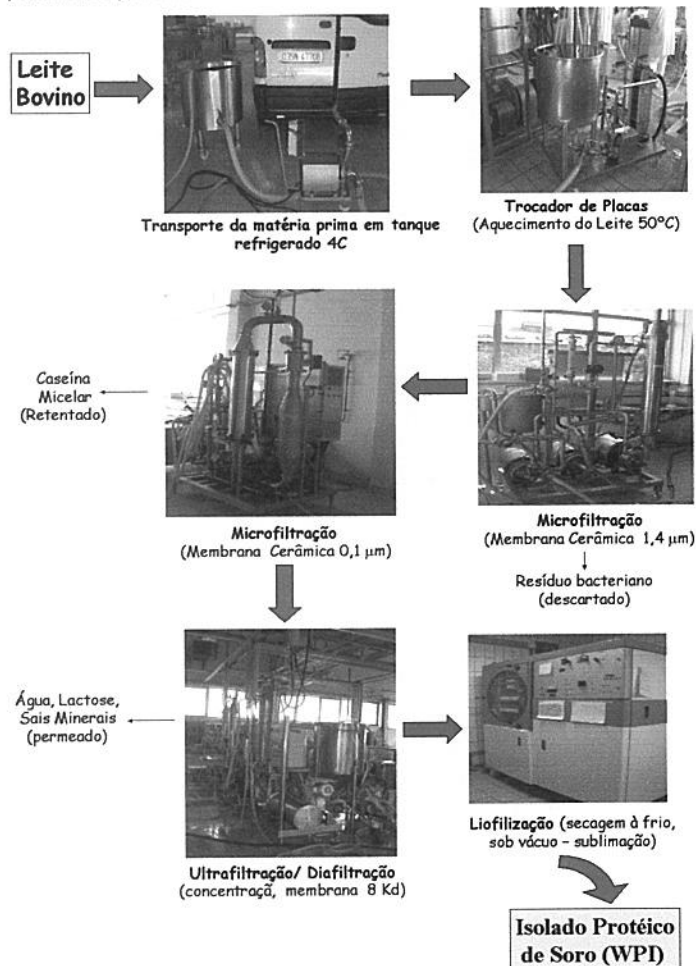


Figura 1- Fluxograma de Processo do Isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), através dos processos de microfiltração, ultrafiltração, diafiltração e liofilização, realizado em planta piloto do INRA-França.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados da composição centesimal obtidos no leite desnatado, isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) e gelatina bovina 250 bloom. Observa-se que o pH das soluções obtidas foram próximos, exceto para a gelatina que durante a sua fabricação industrial sofreu hidrólise ácida. O WPI obtido a partir do processo de microfiltração, apresenta um elevado teor de proteína, 95,60%, caracterizando-se como isolado protéico (>90%).

Tabela 1. Caracterização centesimal, pH e flora mesófila total do isolado protéico se soro de leite bovino (WPI) e gelatina bovina (250 bloom, Gelita®).

| ANÁLISES                     | LEITE | WPI   | GELATINA |
|------------------------------|-------|-------|----------|
| pH                           | 6,46  | 6,48  | 5,50     |
| Extrato Seco (%)             | 9,05  | 98,83 | 88,59    |
| Umidade (%)                  | 90,95 | 1,17  | 11,41    |
| Proteína (%)                 | 3,40  | 95,60 | 86,88    |
| Nitrogênio não caseico (%)   | 0,76  | 95,45 | *        |
| Nitrogênio não protéico (%)  | 0,18  | 0,78  | 13,49    |
| Minerais (%)                 | *     | 2,16  | 0,166    |
| Flora Total Mesófila (UFC/g) | *     | <15   | <5       |

\* Análises não realizadas

Os resultados obtidos para a composição de aminoácidos essenciais e não essenciais do WPI e gelatina comparada com o padrão de referência do FAO/WHO (1990), estão representados, respectivamente nas Figuras 2 e 3.

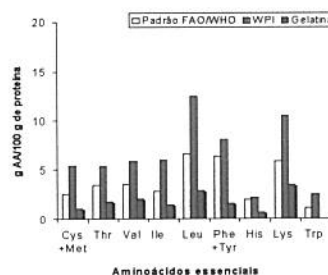


Figura 2- Composição de aminoácidos essenciais do WPI (isolado protéico de soro de leite bovino) e gelatina bovina (250 bloom), comparados com o padrão de referência FAO/WHO (1990).

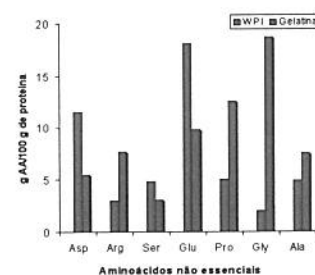


Figura 3- Composição de aminoácidos não-essenciais do WPI (isolado protéico de soro de leite bovino) e gelatina bovina (250 bloom), comparados com o padrão de referência FAO/WHO (1990).

## CONCLUSÃO

Obteve-se O WPI com 95,6% de proteína apresentando teores mais elevados que a gelatina de proteína e cinzas e teor mais baixo de umidade. Tanto WPI quanto a gelatina apresentou flora total mesófila inferior a 20UFC/g, caracterizando-se como de boa qualidade microbiológica. Comparados ao padrão da FAO/WHO o WPI apresentou teores mais elevados de todos os aminoácidos essenciais enquanto que a gelatina apresentou deficiência de vários aminoácidos essenciais e completa ausência de triptofano. A gelatina apresentou concentrações bastante elevadas dos aminoácidos em quantidades recomendadas pelo padrão da FAO/WHO ao contrário da gelatina.

janesca@fea.unicamp.br







UNICAMP

# CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE (WPI), GELATINA BOVINA (GB) E MISTURA CONTENDO 60% WPI E 40% GELATINA



Janesca Alban ROMAN e Valdemiro Carlos SGARBIERI\*

\*Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Caixa Postal 6121 – Campinas-SP, CEP 13081-970 – BRASIL.

## INTRODUÇÃO

A gelatina é uma proteína deficiente, em todos os aminoácidos essenciais, principalmente em triptofano e cisteína, enquanto que as proteínas de soro de leite apresentam esses aminoácidos em abundância, portanto, a combinação dessas duas fontes proteicas possibilita melhoria considerável no equilíbrio de aminoácidos essenciais da gelatina, com significativa vantagem nutricional.

Haverá também uma grande vantagem econômica na associação dessas duas proteínas, já que a gelatina é produzida em larga escala e de baixo custo enquanto que as proteínas do soro de leite são de difícil recuperação tecnológica e de alto custo. A associação de propriedades funcionais da gelatina e das proteínas do soro de leite também se apresenta como um potencial a ser explorado.

## OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo o estudo comparativo da composição e de algumas propriedades físico-químicas de duas fontes proteicas de largo uso industrial (WPI e GB), isoladamente e da mistura WPI:GB (60:40 em base protéica).

## METODOLOGIA

### Material

\* **WPI:** Isolado protéico de soro de leite, ALACEN 895, lote 196/04, obtido da NZMP®, New Zealand Milk Products, São Paulo, Brasil.

\* **GB:** Gelatina bovina, tipo A, produzida por hidrólise ácida, lote PFL 196/04, Gelita® (GELITA SOUTH AMERICA), Cotia-SP.

### Preparação da Mistura Protéica

A determinação da mistura protéica 60% de WPI e 40% de GB foi baseada no valor nutritivo levando-se em consideração aspectos nutricionais e econômicos.

### Métodos Analíticos

\* **Composição Centesimal:** Foram determinados de acordo com os procedimentos descritos na AOAC (1990).

\* **Determinação de Aminoácidos:** Utilizou-se a metodologia descrita por SPACKMAN *et al.*, (1958) e SPICES (1967).

\* **Determinação de perfil de sulfidrilo livre:** Foram determinados de acordo com BEVERIDGE *et al.*, (1984) e WAGNER, AÑON (1990).

\* **Perfil de Solubilidade:** As amostras foram analisadas verificando-se o efeito do pH (2,5 a 7,5), de acordo com o método descrito por MORR *et al.*, (1985).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal dos três concentrados protéicos estudados é apresentada na Tabela 1. O componente de maior concentração foi a proteína variando entre 83 e 92% para as três amostras. Não houve diferença estatística quanto ao teor de proteína entre o WPI e a mistura, tem sido estatisticamente inferior para a gelatina ( $p < 0,05$ ). Sólidos totais, umidade e cinzas diferiram significativamente entre as três amostras analisadas.

TABELA 1- Composição centesimal

| Componentes    | WPI                      | Gelatina                 | Mistura 60:40%           |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Sólidos totais | 95,5 ± 0,34 <sup>a</sup> | 88,1 ± 0,06 <sup>c</sup> | 92,6 ± 0,11 <sup>b</sup> |
| Umidade        | 4,5 ± 0,34 <sup>c</sup>  | 11,9 ± 0,06 <sup>a</sup> | 7,4 ± 0,10 <sup>b</sup>  |
| Proteínas      | 90,8 ± 1,06 <sup>a</sup> | 83,1 ± 0,56 <sup>b</sup> | 91,2 ± 0,33 <sup>a</sup> |
| Cinzas         | 1,8 ± 0,07 <sup>a</sup>  | 0,7 ± 0,03 <sup>c</sup>  | 1,3 ± 0,01 <sup>b</sup>  |
| Diferença*     | 2,9                      | 4,4                      | 0,1                      |

\* Diferença = 100 - (proteína + cinzas + umidade). Resultados são média de 4 determinações analíticas ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (linhas) indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



TABELA 2- Composição de aminoácidos essenciais dos produtos comparados ao padrão de referência da FAO/WHO (1990).

| Aminoácidos (g/100g de proteína)    | Padrão Pré-escolares | Padrão Adultos | WPI | Gelatina         | Mistura 60:40%   |
|-------------------------------------|----------------------|----------------|-----|------------------|------------------|
| Treonina                            | 3,4                  | 0,9            | 4,7 | 1,9 <sup>a</sup> | 3,6              |
| Metionina + Cistina                 | 2,5                  | 1,7            | 8   | *                | 3,6              |
| Valina                              | 3,5                  | 1,3            | 4,8 | 2,3 <sup>a</sup> | 3,6              |
| Leucina                             | 6,6                  | 1,9            | 13  | 3,1 <sup>a</sup> | 9,2              |
| Isoleucina                          | 2,8                  | 1,3            | 5   | 1,5 <sup>a</sup> | 3,6              |
| Fenilalanina + Tirosina             | 6,3                  | 1,9            | 6,8 | 2,5 <sup>a</sup> | 5,3 <sup>a</sup> |
| Lisina                              | 5,8                  | 1,6            | 10  | 3,9 <sup>a</sup> | 8,0              |
| Histidina                           | 1,9                  | 1,6            | 2   | 0,8 <sup>b</sup> | 1,4 <sup>b</sup> |
| Triptofano                          | 1,1                  | 0,5            | 2,8 | *                | 1,8              |
| Aminoácidos Essenciais Escore (EAE) |                      |                | 1   | 0                | 0,8              |

TABELA 3 – Valores de grupos sulfidrilo livres (SH).

| Amostra        | SH mmoles/g de proteína |             |
|----------------|-------------------------|-------------|
|                | 10 min.                 | 30 min.     |
| WPI            | 31,8 ± 0,29             | 30,8 ± 0,17 |
| WPI:GB (60:40) | 18,6 ± 0,30             | 19,6 ± 0,07 |

E-mail: janesca@fea.unicamp.br; sgarb@fea.unicamp.br

Os perfis de solubilidade para os três concentrados protéicos em todas as condições estudadas são mostrados na Figura 1.

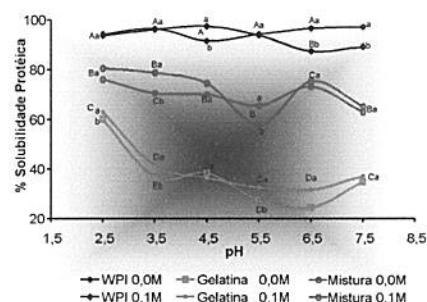


Figura 1- Representação do perfil de solubilidade do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina (GB) e da mistura WPI:GB na proporção 60:40%, em diferentes pHs em água e em solução de 0,1M de NaCl.

## CONCLUSÕES

\* O teor de proteína (91%) para o WPI e para a mistura WPI:GB (60:40%) diferiu de 83% para a GB ( $p < 0,05$ ).

\* O perfil de aminoácidos do WPI atende ao padrão da FAO/WHO, enquanto que a gelatina apresentou-se deficiente em todos os aminoácidos essenciais. A mistura WPI:GB apresentou perfil aminoacídico significativamente superior ao da gelatina, pois somente 3 aminoácidos essenciais não atenderam 100% das recomendações da FAO/WHO.

\* A solubilidade do WPI pH entre 2,5 e 7,5 em solução aquosa ou 0,1M NaCl variou de 87,4 a 97,5% e para a mistura WPI:GB variou entre 57,7 a 80,6%. A solubilidade máxima da gelatina em água foi de 63% e a mínima foi de 24,4% em pH 2,5 e 6,5, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis, W. Horwitz (ed.), 15ª edição, Washington, D.C., p.1141, 1990.
- BEVERIDGE, T.; JONES, L.; TUNG, M.A. Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean and albumen protein gels. *Journal of Food Science*, 32:307-313, 1964.
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. Report on a joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation, Bethesda, 1990.
- GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental. 10 ed., São Paulo: Nobel, 1982, 430p.
- MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.P.; BUREN, V.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50(6):1715-1718, 1985.
- SPACKMAN, D.C.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Biochemistry*, 30 (3):1190-1206, 1958.
- SPIES, J.R. Determination of tryptophan in protein. *Analytical Chemistry*, 39(12):1412-1416, 1967.



# ANÁLISE SENSORIAL E ÍNDICE DE ACEITABILIDADE DE GELATINA ADICIONADA DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE BOVINO



Janesca Alban ROMAN<sup>1,2</sup>, Nelson de Castro NETO<sup>1</sup>,  
Saraspthy Naidoo T.G. MENDONÇA<sup>1</sup>, Valdemiro Carlos SGARBIERI<sup>2</sup>

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Toledo-PR<sup>1</sup>  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP Campinas-SP<sup>2</sup>  
janesca@utfpr.edu.br



## INTRODUÇÃO

Preparações industriais de gelatina envolvem hidrólise controlada de estruturas organizadas de colágeno para a obtenção de gelatina solúvel [1]. Na composição química da gelatina estão presentes todos os aminoácidos essenciais, exceto o triptofano e cisteína [2]. O valor nutricional da gelatina só é melhorado quando é consumida em combinação com outra proteína ou misturas de proteínas, usadas com a finalidade de suplemento protéico, aumentando o seu valor nutritivo.

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar por meio da análise sensorial a aceitabilidade de três formulações de gelatina contendo isolado protéico de soro de leite em comparação com uma gelatina comercial.

## METODOLOGIA

**Preparo das Amostras:** Três formulações de gelatina foram elaboradas com isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), gelatina bovina (GB), açúcar, ácido cítrico, aroma artificial de morango e corantes artificiais amarelo crepúsculo e vermelho bordeaux (Figura 1) e comparadas a uma gelatina comercial (GCM).

**Provadores:** Sessenta e cinco provadores não treinados, incluindo alunos e funcionários da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Toledo, avaliaram o quanto gostaram ou desgostaram do produto.

**Teste de Preferência:** Escala hedônica estruturada de nove pontos, e Índice de Aceitabilidade (IA) foram analisados em relação aos atributos, cor, aroma, sabor e consistência [3]. O IA com boa repercussão tem sido considerado 70% [3;4].



Figura 1- Obtenção dos géis mistos contendo isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) e gelatina bovina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cerca de 63% dos provadores pertenciam ao gênero feminino e 37% ao gênero masculino. A idade variou de 14 a 54 anos, sendo que a idade média foi de 22 anos. Dos provadores avaliados, 89% consomem gelatina em casa, principalmente após o almoço (65%), sendo os sabores preferidos o de morango (47%), seguido pelo de limão (13%), uva 10%) e abacaxi (1%). Os resultados obtidos na análise sensorial estão mostrados nas Figuras 2 e 3.

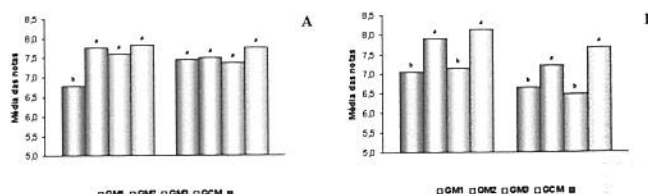


Figura 2- Média de notas atribuídas pelos julgadores para os atributos de cor e aroma (A) e textura e sabor (B) para as amostras de gelatina contendo isolado protéico de soro de leite bovino (GM1, GM2 e GM3) em comparação com uma amostra comercial (GCM). Letras diferentes indicam que houve diferenças estatísticas entre as amostras pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

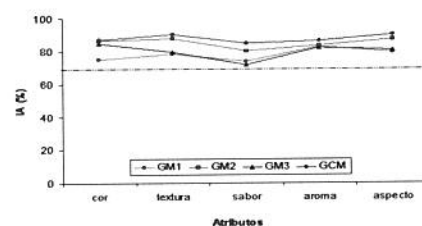


Figura 3- Índice de Aceitabilidade (IA) das amostras de gelatina adicionadas de isolado protéico de soro de leite (GM1, GM2, GM3) comparadas a uma gelatina comercial (GCM). Mínimo aceitável > 70%.

A amostra GM2 apresentou resultados muito semelhantes à amostra de gelatina já comercializada, no entanto apresentou um teor mais elevado de proteínas, sendo considerada de melhor valor nutricional por conter proteínas de elevado valor biológico baseada na sua composição de aminoácidos essenciais. O índice de aceitabilidade também foi bem próximo, respectivamente 85 e 88% para a amostra GM2 e GCM.

## CONCLUSÃO

Foi possível elaborar um produto geleificável, semelhante a gelatina, com teor superior de proteínas (63%) por meio da adição do isolado protéico de soro de leite bovino, melhorando o valor nutricional do produto e com características sensoriais aceitáveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] NEMATI, M. OVEISI, M.R.; ABDOLLAHI, H.; SABZEVARI, O. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Oxford, v.34, n.3, p. 485-492, 2004.

[2] CARVALHO, R.A. Elaboração e caracterização de filmes protéicos a base de gelatina modificada enzimaticamente e quimicamente. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002.

[3] MONTEIRO, R. A.; COUTINHO, J. G.; RECINE, E. Consulta aos rótulos de alimentos e bebidas por frequentadores de supermercados em Brasília, Brasil. *Revista Panamericana de Salud Pública*. Washington, n.3, set. 2005.

[4] DUTCOSKY, S.D. *Análise sensorial de alimentos*. Curitiba: Ed. DA Champagnat, 1996. 123.p.





Janesca Alban ROMAN<sup>1,3</sup>, Saraspathy Naidoo T.G. MENDONÇA<sup>2</sup>,  
Valdemiro Carlos SGARBIERI<sup>3</sup>

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Toledo-PR<sup>1</sup>  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Medianeira-PR<sup>2</sup>  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP Campinas-SP<sup>3</sup>

## INTRODUÇÃO

A gelatina é um produto bastante apreciado, principalmente como sobremesa após o almoço. É uma proteína de fácil digestão e absorção, produzida em larga escala e a preços relativamente baixos.

Preparações industriais de gelatina envolvem hidrólise controlada de estruturas organizadas de colágeno para a obtenção de gelatina solúvel [1]. É uma proteína de origem animal, solúvel em água (em temperaturas acima de 50°C), resultante da hidrólise ácida ou básica do colágeno. Na composição química da gelatina estão presentes todos os aminoácidos essenciais, exceto o triptofano e cisteína [2].

O objetivo do presente estudo foi o de realizar uma pesquisa de mercado no intuito de observar a opinião sobre a aquisição, consumo e as possíveis relações com a saúde e a nutrição em relação à gelatina.

## METODOLOGIA

**Critérios éticos:** Como a coleta de dados envolvia seres humanos, os procedimentos recomendados pelo Conselho Nacional de Saúde seguindo a Resolução 196 de 10 de outubro de 1996 [3].

**População e Amostra:** Utilizando um questionário de 20 questões (Quadro 1), foram entrevistadas 70 pessoas, incluindo alunos do ensino técnico em gastronomia (60%) e servidores da UTFPR (40%). Cerca de 63% dos provadores pertenciam ao gênero feminino e 37% ao gênero masculino. A idade variou de 14 a 54 anos, sendo que a idade média foi de 22 anos. A atitude dos consumidores foi expressa em três categorias: "concordo", "discordo" e "nem concordo/nem discordo" por meio de frases positivas ou negativas [4] relacionadas à gelatina.

## QUESTIONÁRIO

1) Você consome gelatina? ( ) sim ( ) não ( ) às vezes

2) Assinale a alternativa que indique o principal motivo pelo qual você ingere gelatina

- ( ) por que gosto  
( ) porque tem sabor agradável  
( ) por que é saudável  
( ) por que é nutritiva  
( ) como sobremesa após o almoço  
( ) pela praticidade  
( ) para auxiliar no emagrecimento  
( ) por ser acessível e de baixo custo  
( ) outro \_\_\_\_\_

3) Se consome gelatina, onde o faz?

- ( ) em minha casa ( ) casa de amigos ( ) em restaurantes  
( ) em outras preparações/sobremesas

4) Com que frequência?

- ( ) Todos os dias ( ) 1 vez por semana  
( ) 3 vezes por semana ( ) a cada 15 dias ( ) 1 vez por mês  
( ) a cada três meses ( ) raramente ( ) não consumo

5) De uma forma geral, em que período você costuma consumir gelatina?

- ( ) café da manhã  
( ) lanche da manhã  
( ) após o almoço  
( ) lanche da tarde  
( ) ceia

6) Qual é a gelatina de sua preferência?

Marca: \_\_\_\_\_  
Sabor: \_\_\_\_\_



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos provadores avaliados, 89% consomem gelatina em casa, principalmente após o almoço (65%), sendo preferidos os sabores de morango (47%), seguido pelo de limão (13%), uva (10%) e abacaxi (1%). A frequência de consumo foi considerada elevada, pois apenas 4% dos entrevistados disseram não consumir gelatina. Pelo menos 25% consomem uma vez por semana, 16% a cada quinze dias e 26% uma vez ao mês, sendo que as quantidades consumidas geralmente são referenciadas a um pote pequeno (34%) ou médio (29%) de sobremesa.

O motivo o motivo pelos quais os entrevistados consomem gelatina está mostrado na Figura 1.



Figura 1- Motivo apontado pelos provadores que justificam o consumo de gelatina

A Tabela 2 apresenta as respostas dos consumidores em relação à gelatina. Verifica-se que cerca de 60% dos entrevistados concordaram que a gelatina é um alimento que possui baixo teor calórico, e que é recomendada nas dietas de emagrecimento, 32% nem discordaram/nem concordaram que a gelatina é um alimento de elevado valor nutricional e quando questionados se a gelatina é um produto bastante apreciado pelas crianças, 91% concordaram com esta afirmação.

Tabela 2- Atitude do consumidor em relação à gelatina

| Itens avaliados                                   | Concordo | Discordo | Nem concordo/<br>Nem discordo |
|---------------------------------------------------|----------|----------|-------------------------------|
| <b>Negativas</b>                                  |          |          |                               |
| 1. É de origem animal?                            | 43%      | 19%      | 38%                           |
| 2. Possui proteínas de boa qualidade?             | 31%      | 18%      | 53%                           |
| 3. Apresenta alto valor nutricional?              | 29%      | 38%      | 32%                           |
| 4. Possui elevado teor calórico?                  | 4%       | 60%      | 35%                           |
| <b>Positivas</b>                                  |          |          |                               |
| 5. É "leve", de fácil digestão?                   | 94%      | 1%       | 4%                            |
| 6. Apreciada pelas crianças?                      | 91%      | 3%       | 6%                            |
| 7. É um produto saudável e de baixo custo?        | 81%      | 7%       | 12%                           |
| 8. Pode ser enriquecida com vitaminas e minerais? | 71%      | 3%       | 26%                           |
| 9. Recomendada nas dietas de emagrecimento?       | 62%      | 6%       | 32%                           |

## CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que essa população conhece de um modo geral, o valor da gelatina como alimento e que seu consumo apresenta-se bastante elevado.