



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE CO-SOLUTOS NA REOLOGIA DE GÉIS
LÁCTEOS ACIDIFICADOS**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos,
Unicamp, para a obtenção do título de
doutor em Engenharia de Alimentos**

Doutoranda: Edméia Sabadini Neves

Orientadora: Profa.Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Co-orientação: Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

N414e Neves, Edméia Sabadini
Efeito da adição de co-solutos na reologia de géis lácteos acidificados / Edméia Sabadini Neves. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Rosiane Lopes da Cunha
Co-orientador: Miriam Dupas Hubinger
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Proteínas - Leite. 2. Carragena. 3. Co-solutos. 4. Reologia.
5. Capacidade de retenção de água. 6. Temperatura da desnaturação.
I. Cunha, Rosiane Lopes da. II. Hubinger, Miriam Dupas. III.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Effects of co-solutes addition in rheology of the acidified lacteous gels
Palavras-chave em inglês (Keywords): Milk - Proteins, Carrageenan, Co-solutes, Rheology,
Water holding capacity, Denaturation temperature

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Rosiane Lopes da Cunha
Flavia Maria Netto
Florência Cecília Menegalli
Izabel Cristina Freitas Moraes
Kil Jin Park
Luiz Antonio Viotto

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha
(orientadora)

Profa. Dra. Flavia Maria Netto
(membro da comissão Examinadora)

Profa. Dra. Florência Cecília Menegalli
(membro da comissão Examinadora)

Profa. Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes
(membro da comissão Examinadora)

Prof. Dr. Kil Jin Park
(membro da comissão Examinadora)

Prof. Dr. Luiz Antonio Viotto
(membro da comissão Examinadora)

Dedico,

**Aos meus queridos:
Pedro Paulo e
Cássio.**

Agradecimentos

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp em especial ao Departamento de Engenharia de Alimentos.

Ao Cnpq pela concessão de bolsa de pesquisa.

À Profa. Dra Rosiane Lopes da Cunha e a Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger pela dedicação e amizade na orientação e co-orientação deste trabalho.

Ao meu irmão, Edvaldo Sabadini pelo apoio incondicional.

A Profa. Dra Solange Cadore do Instituto de Química da Unicamp no auxílio dos ensaios de absorção atômica.

Ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, onde realizei os ensaios de capacidade de retenção de água, especialmente à Fifa.

Às técnicas do Laboratório Microscopia Eletrônica Instituto de Biologia da Unicamp, Adriana e Antônia, na ajuda com os ensaios de microscopia eletrônica de varredura.

À Joyce técnica do nosso laboratório (Laboratório de Engenharia de Processos) pelo auxílio e paciência.

Ao pessoal do Laboratório pela amizade, companheirismo e pelos momentos alegres que jamais serão esquecidos.

Aos funcionários da FEA que direta ou indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

INDICE GERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 Objetivos	6
1.2.1 Geral	6
1.2.2 Específicos	7
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 Proteínas do leite	8
2.2 Polissacarídeos em alimentos	13
2.3 Géis	15
2.4 Reologia de alimentos	17
2.4.1 Comportamento reológico de géis a baixas deformações	17
2.4.2 Comportamento reológico de géis a altas deformações	20
2.5 Sistemas formados por proteínas e polissacarídeos	22
2.5.1 Géis protéicos	22
2.5.2 Misturas de proteínas-polissacarídeos	26
CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Material	33
3.2 Métodos	34
3.2.1 Preparo dos sistemas modelo	34
3.2.1.1 Condições preliminares usadas no preparo dos géis: planejamentos experimentais fatoriais fracionários	35
3.2.1.2 Condições usadas no preparo dos géis: planejamentos experimentais fatoriais completos	38
3.2.2 Metodologia da avaliação das propriedades físicas, químicas e estruturais dos sistemas modelo	42
3.2.2.1 Propriedades mecânicas obtidas sob compressão uniaxial	42
3.2.2.2 Capacidade de retenção de água	45
3.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura	46
3.2.2.4 Calorimetria diferencial de varredura	47

3.2.2.5 Tratamento estatístico dos dados experimentais	49
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. Planejamento fatorial fracionário	51
4.1.1 Ensaio de compressão uniaxial até a ruptura	51
4.1.2 Ensaio relaxação de tensões	61
4.2. Análise calorimétrica	66
4.3. Planejamento fatorial completo	73
4.3.1. Ensaio de ruptura -géis com adição de sacarose	74
4.3.2. Ensaio de ruptura -géis com adição de sal (KCl/NaCl)	94
4.3.3. Ensaio relaxação de tensões - géis com adição de sacarose	106
4.3.4 Ensaio relaxação de tensões - géis com adição de sal (KCl/NaCl)	116
4.3.5. Capacidade de retenção de água - géis com adição de sacarose	125
4.3.6. Capacidade de retenção de água - géis com adição de sal (KCl/NaCl)	133
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS	141
BIBLIOGRAFIA	144

RESUMO

Foram estudadas as interações entre as proteínas do leite e a carragena em sistemas acidificados com glucona-delta-lactona (GDL) contendo ou não co-solutos, como açúcar (sacarose) e a mistura salina KCl/NaCl, na formação/obtenção de géis. Foi possível avaliar o efeito das variáveis de composição (concentrações de caseinato de sódio, concentrado protéico do soro, carragena, sacarose ou mistura salina KCl/NaCl) e condições de processo (temperatura de mistura dos componentes, tempo de aquecimento e velocidade de agitação) nas propriedades mecânicas e da capacidade de retenção de água dos géis protéicos acidificados, utilizando a metodologia de planejamento experimental fatorial. Essas análises foram complementadas com microscopia eletrônica de varredura e calorimetria diferencial de varredura. Nos géis obtidos com adição de sacarose verificou-se que a concentração de carragena foi a variável de maior contribuição ao aumento da dureza, deformabilidade e firmeza dos géis. Através dos ensaios de relaxação de tensões, verificou-se que o módulo elástico foi fortemente influenciado pelas interações entre a carragena e o caseinato de sódio, na presença do açúcar. O gel mais forte foi obtido em altas concentrações de biopolímeros, sendo o efeito da sacarose associado à diminuição das interações polissacarídeo-solvente. Na análise dos ensaios de ruptura e de relaxação de tensões constatou-se que os géis com a adição da mistura salina (KCl/NaCl), comportaram-se de maneira diferente dos com e sem sacarose. Foram estruturalmente muito mais frágeis e, em certas formulações, não se formou gel, sendo a força iônica e a temperatura de processo, as variáveis que definiram as características reológicas do sistema com sal. Pode-se observar o efeito negativo da concentração do concentrado protéico do soro (CPS) nas propriedades mecânicas do gel lácteo. Na avaliação da capacidade de retenção de água nos sistemas contendo sal, o comportamento foi totalmente diferente do da sacarose. A adição do açúcar promoveu o fortalecimento da rede do gel, com uma malha mais firme e coesa ao contrário do observado para os géis com adição da mistura salina KCl/NaCl.

Palavras chave: proteínas do leite, carragena, co-soluto, reologia, capacidade de retenção de água, temperatura de desnaturação.

ABSTRACT

Gel formation due to interactions between milk proteins and carrageenan in systems acidified by glucono-delta-lactona (GDL) with or without co-solutes like sugar (sucrose) and KCl/NaCl, were studied. A factorial experimental design was used to determine the effect of several variables, such as: the composition of the system (concentrations of sodium caseinate, whey protein concentrate, carrageenan and sucrose or a KCl/NaCl mixture); the process conditions (temperature of the mixture, heating time and stirring speed), on the mechanical properties of the acidified gels, as well as their water holding capacity. Scanning Electronic Microscopy and Differential Scanning Calorimetry were also used to complement the studies. In the gels containing sucrose, the concentration of carrageenan was the more important variable with respect to the increase in hardness, rigidity and consistence of the gels. Using the stress relaxation experiments, it was observed that the elastic modulus was highly affected by the interactions between the carrageenan and sodium caseinate if sucrose was present. The strongest gel was obtained with the higher concentrations of the biopolymers, and this can be attributed to a decrease in the interactions between the polysaccharides and the water. In the presence of salts (KCl/NaCl) the stress relaxation and rupture experiments showed that the gels obtained were different from those obtained with the addition of sucrose or without a solute. The gels containing salts were much weaker and in some cases failed to form a gel. For these gels, the ionic strength and the temperature were the more important variables affecting the rheological properties of the gels. On the other hand, a negative effect of the concentration of whey protein concentrate on the mechanical properties of the lacteous gels could also be observed, due to strong interactions between the sodium caseinate and carrageenan. In terms of the water holding capacity, the behaviors of the gels containing salts and sucrose were again completely different. In the presence of sucrose, the molecular structure of the gel became stronger and cohesive, the opposite effect being observed in gels containing salts (KCl/NaCl).

Keywords: milk proteins, carrageenan, co-solute, rheology, water holding capacity, denaturation temperature.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Os produtos alimentícios são compostos de uma variedade de substâncias, sendo que a consistência e estabilidade dos produtos estão diretamente ligadas às forças de interação entre seus componentes. Na indústria de alimentos o estudo dessas interações é de grande valia, uma vez que pode contribuir no desenvolvimento de novas formulações e melhora de produtos existentes no mercado.

Atenta a nichos diferenciados no mercado, a indústria de alimentos tem se preocupado em desenvolver e introduzir novos produtos “light”, que visam reduzir o teor calórico pela substituição de gordura ou açúcar por biopolímeros e os “diet” que tem como objetivo formular produtos para consumidores de dietas especiais (ANVISA, 2007). O sal hiposódico, que contém na sua formulação mais de 60% de cloreto de potássio e o restante de cloreto de sódio e iodeto de potássio, é um ingrediente utilizado em produtos alimentícios pertencentes a esta última categoria. Esse tipo de sal é particularmente útil para pessoas hipertensas e/ou cardíacas (sem complicações renais) que necessitam da redução de sódio na sua dieta (SACKS *et al.*, 2001).

As proteínas e os polissacarídeos são biopolímeros naturalmente encontrados em alimentos, porém também são ingredientes comumente adicionados a produtos alimentícios devido às suas propriedades nutricionais e funcionais. A interação entre biopolímeros exerce influência direta sobre as propriedades macroscópicas dos produtos alimentícios tais como fluidez, estabilidade, textura e “mouthfeel”. Nos últimos anos, considerável interesse tem sido devotado ao estudo de misturas polissacarídeo-proteína (GRINBERG &

TOLSTOGUZOV, 1997, CAPRON *et al.*, 1999, LANGENDORFF *et al.*, 2000, ROESCH *et al.*, 2004, DE LA FUENTE *et al.*, 2004, SPAGNUOLO *et al.*, 2005, BRAGA, 2006, ARLTOFT *et al.*, 2007), pois estas podem levar a uma grande variedade de texturas que dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo tipo e concentração dos biopolímeros, massa molecular, conformação, densidade de carga, pH e força iônica (TOLSTOGUZOV, 1991).

O pH e a força iônica do meio modificam a qualidade do solvente e, conseqüentemente, afetam as interações proteína-proteína, proteína-polissacarídeo e biopolímero-solvente (BELYAKOVA *et al.*, 2003, DICKINSON & MERINO, 2002, SCHORSCH *et al.*, 1999), exercendo influência direta sobre a estrutura da rede polimérica. A presença de outros co-solutos (DICKINSON, 2003, MLEKO & GUSTAW, 2000), como os açúcares, também influencia as interações biopoliméricas, uma vez que estes também modificam a qualidade do solvente como a presença de sais, devido à modificação do balanço hidrofóbico-hidrofílico na superfície da proteína e, conseqüentemente, da afinidade destas pelo meio (BELYAKOVA *et al.*, 2003).

As interações entre polissacarídeos e as proteínas do leite são as mais estudadas na literatura (LANGENDORFF *et al.*, 2000, SPAGNUOLO *et al.*, 2005, BRAGA, 2006, ARLTOFT *et al.*, 2007), devido à importância destas proteínas na alimentação humana e, conseqüentemente, na economia mundial. Vale destacar a relevância da indústria de laticínios para a economia brasileira que ocupou o 4º lugar em faturamento em 2005 e apresentou um crescimento em torno de 10% nas exportações em 2005-2006 (ABIA, 2007), além deste ser um dos principais setores que investem no desenvolvimento de novos produtos, com teor reduzido de gordura.

Os polissacarídeos, também denominados de gomas ou hidrocolóides, podem ser neutros ou carregados eletricamente e são normalmente adicionados em alimentos devido à

sua elevada hidrofiliçidade, podendo atuar como espessantes ou gelificantes. Interações entre gomas e compostos presentes no produto alimentício podem modificar a funcionalidade das gomas e proporcionar características reológicas e de textura únicas (MA & BARBOSA-CÁNOVAS, 1993). A maioria dos polissacarídeos de interesse comercial mostra incompatibilidade com as proteínas do leite dependendo das condições de pH e/ou força iônica, com uma visível separação do soro e, conseqüentemente, perda de qualidade do produto (THAIUDOM & GOFF, 2003). Com o intuito de retardar ou evitar este fenômeno, a maioria das misturas com polissacarídeos utilizados em produtos lácteos tem a adição de κ -carragena.

Existem duas teorias que explicam as interações entre as proteínas do leite e a κ -carragena. A primeira teoria propõe que a κ -carragena carregada negativamente interage eletrostaticamente com uma região da κ -caseína carregada positivamente (SNOEREN *et al.*, 1975), ou seja, que existe uma ligação direta entre proteína e polissacarídeo. Já a segunda teoria, que é mais recente, sugere que a separação de fases é evitada devido à formação de um gel fraco de κ -carragena que mantém a caseína presa na rede polimérica (BOURRIOT *et al.*, 1999), que neste caso seria duas redes independentes e interpenetrantes.

Uma considerável quantidade de trabalhos tem focado na funcionalidade da carragena em sistemas modelo contendo micelas de caseína (ARLTOFT *et al.*, 2007, DALGLEISH & MORRIS, 1998, FARRELL JR. *et al.*, 1990, XU *et al.* 1992; SYRBE *et al.* 1998, BOURRIOT *et al.* 1999, SCHORSCH *et al.*, 1999, MARTIN *et al.*, 2006), porém poucos avaliam os efeitos da κ -carragena em sistemas não micelares como o caseinato de sódio (OAKENFULL *et al.*, 1999, BELYAKOVA *et al.* 2003, RIBEIRO *et al.*, 2004, VEGA *et al.*, 2005) e as interações deste

polissacarídeo com as proteínas do soro foram ainda mais raramente estudadas (DE LA FUENTE *et al.*, 2004).

As interações entre os polissacarídeos e as proteínas do leite são controladas não somente pela composição do sistema (RIBEIRO *et al.*, 2004, DICKINSON, 2003, VERHEUL & ROEFS, 1998, SCHORSCH *et al.*, 1999, MLEKO *et al.*, 1997, BRAGA, 2006), mas também pelas condições de processamento, como o tratamento térmico (YAMUL & LUPANO, 2003, CAPRON *et al.*, 1999, JU & KILARA, 1998, SINGH *et al.*, 1996) ou o cisalhamento (ELEYA *et al.*, 2006, WALKESTRÖM *et al.*, 1998a, WALKESTRÖM *et al.*, 1998b).

O tratamento térmico, que é aplicado no leite por razões de segurança alimentar, exerce um papel importante nas interações biopoliméricas, devido ao impacto no estado conformacional (grau de desnaturação) das proteínas. O uso da calorimetria diferencial de varredura possibilita a quantificação de eventos térmicos ocorridos durante uma rampa de temperatura, tais como a temperatura de desnaturação das proteínas do soro e a entalpia associada a este processo (YAMUL & LUPANO, 2003, SEMENOVA *et al.*, 2002, DICKINSON & CASANOVA, 1999, ROOS, 1995). As caseínas são extremamente estáveis a altas temperaturas, porém as proteínas do soro são altamente susceptíveis ao calor. A desnaturação das proteínas do soro tem forte influência sobre a microestrutura da rede protéica e, conseqüentemente, na textura do produto final (TOBITANI *et al.*, 1995, TURGEON & BEAULIEU, 2001). Por outro lado, a magnitude de cisalhamento aplicado durante o tratamento térmico pode promover diferentes estruturas de géis, devido a modificações da estrutura conformacional dos biopolímeros e, conseqüentemente, de suas interações (DE LA FUENTE *et al.*, 2002).

Além da agregação polimérica induzida por calor, a gelificação ácida também é bastante utilizada na indústria de laticínios e a rede formada é causada principalmente pela

formação de agregados da proteína no seu ponto isoelétrico, devido principalmente a interações eletrostáticas e hidrofóbicas. O leite pode ser acidificado por culturas lácticas ou pela adição de precursores ácidos, como o glucono- δ -lactona (GDL), cuja velocidade de hidrólise do éster a ácido glucônico depende da temperatura (RIBEIRO *et al.*, 2004). A acidificação de proteínas do leite com GDL tem sido bastante estudada recentemente, pois seu uso evita alguns problemas associados com as culturas bacterianas, incluindo atividade variável. No entanto, a presença de outros biopolímeros poderia modificar o processo de gelificação ácida, devido ao aumento da exposição de grupos hidrofóbicos da proteína (THAIUDOM & GOFF, 2003, Vega *et al.*, 2005) em baixos pH e possíveis interações eletrostáticas entre a proteína e o polissacarídeo carregado eletricamente.

Os mecanismos de interações e o comportamento dos fluidos ou géis formados podem ser monitorados através de análises reológicas (ROSS-MURPHY, 1998). O comportamento reológico a baixas deformações tem sido amplamente utilizado para obter informações sobre a estrutura e viscoelasticidade do produto formado (BARNES *et al.*, 1989). Adicionalmente às propriedades reológicas, estudos da capacidade de retenção de água da malha estrutural (RIBEIRO *et al.*, 2004, LUCEY, 2001, SCHKODA, *et al.*, 1999), e microestrutura também contribuem para o entendimento das interações entre os componentes dos alimentos (DICKINSON *et al.*, 2003, YAMUL & LUPANO, 2003, HEMAR *et al.*, 2002, SCHORSCH *et al.*, 1999). Já o estudo reológico a altas deformações é importante na determinação das propriedades mecânicas, as quais estão associadas com a ruptura do gel e refletem as características de textura do produto.

O entendimento do efeito dos componentes e das condições de processo é uma tarefa bastante complexa quando o número de variáveis é elevado. A metodologia de superfície de

resposta ou análise multivariável é uma ferramenta interessante para avaliar sistemas complexos, com elevado número de variáveis independentes, como foi o caso deste trabalho. Além disso, esta ferramenta estatística permite entender o efeito combinado das variáveis independentes sobre a resposta analisada (TAKEUCHI, 2003, RIBEIRO *et al.*, 2004). Em geral, os trabalhos encontrados na literatura avaliam as interações entre componentes em sistemas-modelo relativamente simples, com duas ou três variáveis independentes. No entanto, os resultados observados nestes sistemas podem não ser os mesmos que os ocorridos em produtos alimentícios, cuja composição é muito mais complexa, tornando relevante o estudo de sistemas-modelo multicomponentes mais complexos obtidos em diferentes condições de processo, de maneira a aprofundar o entendimento das interações entre os componentes dos alimentos.

1.2. Objetivos

1.2.1. Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as interações ocorridas em sistemas modelo compostos por diferentes concentrações de proteínas do leite (caseinato de sódio e concentrado protéico de soro), κ -carragena e co-soluto (sacarose ou mistura de KCl/NaCl), bem como produzidos em diversas condições de processo (tratamento térmico e velocidade de agitação da mistura) acidificados com GDL (glucona- δ -lactona) até o ponto isoelétrico da caseína, utilizando planejamentos experimentais fatoriais.

1.2.2. Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

A) Utilizar planejamentos experimentais fatoriais fracionários, visando avaliar quais variáveis independentes (temperatura de mistura dos componentes, tempo de aquecimento, velocidade de agitação, concentrações de caseinato de sódio, concentrado protéico do soro, carragena e sacarose) exerciam efeito significativo sobre as propriedades reológicas a baixas e altas deformações dos sistemas-modelo lácteos acidificados.

B) Realizar planejamentos fatoriais completos utilizando as variáveis selecionadas na primeira etapa do trabalho, com o intuito de avaliar os efeitos significativos das variáveis de composição e processo sobre as interações entre proteínas e polissacarídeos em sistemas acidificados, permitindo a obtenção de modelos matemáticos que pudessem prever as seguintes respostas avaliadas:

- Propriedades reológicas a baixas (relaxação de tensões e módulo de elasticidade) e altas (tensão, deformação e módulo de ruptura) deformações.

- Capacidade de retenção de água.

C) Avaliar a estrutura dos géis formados a partir de microscopia eletrônica de varredura, com o intuito de correlacionar as propriedades estudadas.

D) Realizar ensaios em calorimetria diferencial de varredura para a obtenção das temperaturas de desnaturação das proteínas do soro em diferentes condições de solvente.

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas do leite

O leite pode ser considerado uma emulsão de glóbulos de gordura diluídos em água ou uma suspensão coloidal de partículas de proteínas altamente hidratadas (WALSTRA, 1990). As proteínas do leite são usadas como valiosos ingredientes alimentícios devido ao seu elevado valor nutricional, além de sua funcionalidade como espessantes de soluções, agentes gelificantes, espumantes ou emulsificantes (SGARBIERI, 1998). As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos: caseínas, proteínas do soro, proteínas das membranas dos glóbulos de gordura e outras. O leite bovino tem aproximadamente 3,5% de proteína, sendo 2,9% de caseína e 0,6% de proteínas do soro (SGARBIERI, 1998).

A caseína possui quatro frações principais (α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína), as quais possuem um grupo fosfato esterificado nos resíduos de serina, e encontram-se no leite combinadas com uma grande quantidade de fosfato de cálcio micelar ou coloidal na forma de agregados de caseína, denominados micelas (LUCEY & SINGH, 1998). As diferentes frações de caseína são organizadas dentro das micelas de acordo com seu caráter predominante, hidrofóbico ou hidrofílico. As micelas de caseína são agregados mais ou menos esféricos com uma distribuição de tamanho que varia entre 50 e 500 nm, com um diâmetro médio de 200 nm (ROLLEMA & BRINKHUIS, 1989).

As α_{s1} -caseínas apresentam um segmento hidrofílico, com elevada densidade de carga e segmentos com caráter hidrofóbico, bastante ricos em prolina, o que dificulta a formação de uma estrutura secundária em α -hélice. Esta fração apresenta uma forte tendência a realizar interações hidrofóbicas (endotérmicas), o que sugere que essa proteína desempenha

importante função na formação das micelas de caseína. As α_{s2} -caseínas possuem uma distribuição de carga, hidrofobicidade e padrão de auto-associação, similares aos das α_{s1} -caseínas (HORNE, 1998). As α_s -caseínas possuem altos teores de fosfato e são muito sensíveis à presença de íons Ca^{+2} , que causam a precipitação dessas frações de proteína.

As caseínas do grupo β - apresentam o fenômeno de associação-dissociação, cujo equilíbrio depende da concentração de proteína, da temperatura e do pH. Possuem elevada densidade de carga e caráter bastante hidrofílico na região N-terminal, enquanto que o restante do polipeptídeo é fortemente hidrofóbico (região C-terminal), da mesma maneira que as α_s -caseínas. As β -caseínas contêm quantidades intermediárias de fosfato e são moderadamente sensíveis à presença do cálcio (BRIGNON *et al.*, 1977). Já as κ -caseínas reagem com as α_{s1} - e β - caseínas para formar micelas termodinamicamente estáveis na presença de íons Ca^{+2} . Ao contrário das frações α_{s1} - e β -, as cargas da κ -caseína não são provenientes do fosfato, o que provavelmente explica a sua não reatividade com o cálcio. A fração de κ -caseína, devido à sua natureza hidrofílica, está localizada majoritariamente na periferia da micela, proporcionando uma estabilização estérica e eletrostática da camada externa (HOLT & HORNE, 1996).

As forças necessárias para a manutenção da estabilidade das micelas são: interações hidrofóbicas, eletrostáticas, pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto, além do complexo coloidal de fosfato de cálcio. Em função de seu caráter amorfo, a estrutura exata das sub-unidades e das micelas de caseína ainda não é completamente conhecida, apesar de alguns modelos terem sido sugeridos por diversos autores. Esses modelos recaem basicamente em três categorias. A primeira sugere um conceito de “capa-núcleo” em que as sub-unidades de α_s - e β -caseínas formariam núcleos termodinamicamente estáveis, em forma de roseta

coberta por camadas periféricas de κ -caseína. O segundo modelo é representado por uma estrutura aberta, composta de subunidades de tamanho uniforme contendo α_s - e β -caseína no centro e κ -caseína na periferia (Figura 2.1). Ambos os modelos sugerem a associação das subunidades através de ligações de cálcio ou fosfato de cálcio coloidal (SGARBIERI, 1998). O terceiro e mais recente modelo (HORNE, 1998) considera as moléculas individuais de caseína como blocos de co-polímeros, sendo que a estrutura micelar é obtida a partir de uma reação de polimerização entre estes blocos, cuja ligação é feita através de interações hidrofóbicas ou por fosfato de cálcio (Figura 2.2). Uma particularidade deste modelo é que considera a κ -caseína como um terminal da cadeia polimérica, ou seja, esta fração da caseína estaria localizada na superfície da rede agregada. É interessante observar que esta posição periférica da κ -caseína é um pré-requisito para todos os modelos propostos para a formação da micela de caseína.

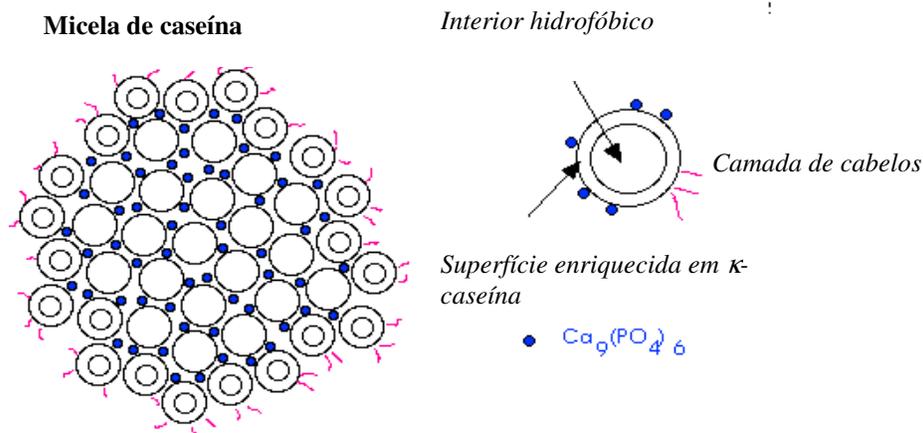


Figura 2.1: Forma das submicelas e da micela de caseína (Fonte: GOFF, 1999).

As micelas de caseína são altamente estáveis a altas temperaturas e à adição de sal ou etanol, mas se dissociam em unidades menores denominadas submicelas após a remoção do

fosfato de cálcio coloidal (CCP). Agentes quelantes, como o EDTA (PEPPER & FARRELL, 1982), diálise contra tampões sem Ca^{2+} (AOKI *et al.*, 1988) ou acidificação são usados para remover ou dissolver o CCP e dissociar as micelas.

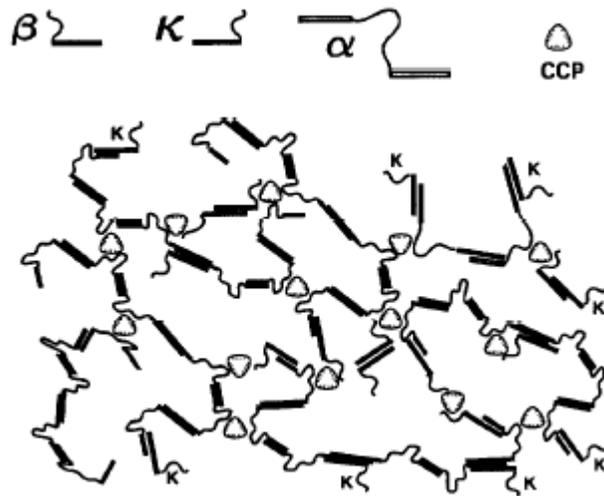


Figura 2.2: Forma das micelas de caseína de acordo com o modelo de HORNE (1999). As interações hidrofóbicas estão representadas por barras retangulares e as regiões hidrofílicas contendo resíduos de fosfoserina estão unidas pelo fosfato de cálcio coloidal (CCP).

Um ingrediente muito utilizado na indústria de laticínios, obtido a partir das micelas de caseína, é o caseinato de sódio, cujas propriedades funcionais incluem capacidade emulsificante, ligante de água e gordura, agente espessante e gelificante. O caseinato de sódio é produzido a partir da precipitação ácida da caseína do leite no seu ponto isoelétrico (pH= 4,6). A proteína lavada é redissolvida através da adição de hidróxido de sódio, de maneira que a neutralidade do meio seja restaurada. Nestas condições, os caseinatos formam agregados ou submicelas devido à alta proporção de cadeias laterais dos aminoácidos hidrofóbicos que se auto-associam em soluções aquosas. A estrutura micelar da caseína não é restabelecida na formação do caseinato de sódio (HEMAR *et al.*, 2002), devido à solubilização do cálcio coloidal durante a acidificação que é removido juntamente com o soro do leite.

O concentrado e o isolado protéico do soro são importantes ingredientes obtidos a partir das proteínas do soro do leite, amplamente utilizado na indústria de alimentos, sendo a gelificação térmica uma de suas mais importantes propriedades funcionais. As proteínas do soro de leite bovino são a α -lactoalbumina, a β -lactoglobulina, a albumina bovina sérica (BSA) e as imunoglobulinas. Mais de 50% do total das proteínas do soro é constituído pela β -lactoglobulina, que é composta por 162 aminoácidos, possui massa molecular de 18,4 kDa e seu pI em solução é de 5,2 (BOBBIO & BOBBIO, 1989, ROESCH *et al.*, 2004).

A β -lactoglobulina possui duas pontes dissulfeto, um grupo sulfidril e nenhum fosfato. Abaixo de pH 3,0 e acima de pH 8,0, a β -lactoglobulina existe como um monômero, porém a baixas temperaturas, altos teores de proteína e entre os pH 3,1 e 5,1, esta proteína se associa para formar um octâmero. Em outros valores de pH, incluindo o pH natural do leite, a β -lactoglobulina tende a ser um dímero. O complexo comportamento de associação-dissociação da β -lactoglobulina tem sido objeto de muitos estudos (GOTTSCHALK *et al.*, 2003, VERHEUL *et al.*, 1999).

A α -lactoalbumina representa 12% do total das proteínas do soro, as imunoglobulinas, 10% e a albumina bovina sérica, 5%, enquanto que o restante das proteínas são proteases-peptonas e proteínas menores. A α -lactoalbumina também é uma proteína globular como a β -lactoglobulina, possui pI entre 4,2 e 4,5 e massa molecular de 14,175 kDa (BOTTOMLEY *et al.*, 1990). A α -lactoalbumina possui 4 pontes dissulfeto e nenhum grupo fosfato. A β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina são formadas por cadeias de aminoácidos dobradas em uma compacta estrutura tridimensional, mantidas por ligações não covalentes e pelas pontes dissulfeto citadas anteriormente (YAMUL & LUPANO, 2003).

As proteínas do soro são sensíveis ao aquecimento a temperaturas superiores a 65°C e durante o tratamento térmico, mudanças estruturais e agregações ocorrem simultaneamente, dependendo de fatores como pH, força iônica, concentração protéica e temperatura de aquecimento, o que pode levar à formação de um gel ou uma dispersão de polímeros solúveis (JU & KILARA, 1998).

2.2 Polissacarídeos em alimentos

As carragenas são gomas ou hidrocolóides amplamente utilizados em alimentos processados, como espessantes e ou estabilizantes. Em especial, as carragenas têm demonstrado ser de grande importância tecnológica, devido à sua interação com outros polímeros, como as proteínas, sendo largamente utilizada na indústria de laticínios em produtos como achocolatados, pudins, sorvetes e mousses. No entanto, o mecanismo pelo qual estes polissacarídeos reagem com as proteínas do leite não está completamente esclarecido e é ainda objeto de muitos estudos (ARLTOFT *et al.*, 2007, DE LA FUENTE *et al.*, 2004, RIBEIRO *et al.*, 2004, SPAGNUOLO *et al.*, 2005, VEGA *et al.*, 2005).

As carragenas são polissacarídeos de origem marinha, lineares, aniônicos e sulfatados, que são extraídos de algas vermelhas (classe das *Rhodophyceae*). Possuem elevado peso molecular (entre 400-560 kDa) e são bastante polidispersas (IMESON, 2000). Elas podem ser classificadas em diferentes tipos e as três principais frações são a ι -, κ - e λ -carragenas, as quais mostram grandes diferenças em termos de propriedades gelificantes e reatividade com proteínas. Os diferentes tipos de carragenas variam no número e posição dos grupos sulfato no dímero galactose, sendo a λ -carragena a mais sulfatada e que não gelifica devido à sua incapacidade de formar hélices ordenadas. A ι - e κ -carragena podem formar géis

termorreversíveis na presença de sais de cálcio e potássio, respectivamente. As soluções e géis de carragena são estáveis a pH maiores que 4,3 e podem ser solubilizados a quente ou a frio, dependendo do tipo de carragena (IMESON, 2000). Entre os diferentes tipos de carragena, a κ - é a mais comumente adicionada em produtos lácteos. A κ -carragena é composta de unidades de D-galactose-4-sulfato, unidas em $\alpha(1\rightarrow3)$ e 3,6-anidro-D-galactose ligadas em $\beta(1\rightarrow4)$, que se alternam na cadeia principal (Figura 2.3).

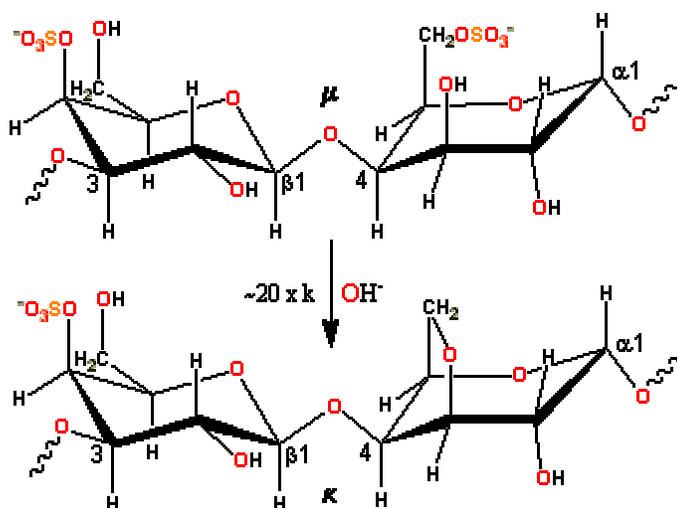


Figura 2.3: Unidade estrutural da κ -carragena (Fonte: CHAPLIN, 2007).

Esses polissacarídeos passam por uma transição conformacional de estrutura, dependendo da força iônica e da temperatura (ROSS-MURPHY, 1998). A elevadas temperaturas ($> 50^{\circ}\text{C}$) e dependendo da concentração de sais, a κ -carragena existe em solução em uma conformação desordenada (“random coil”). No entanto, a temperaturas suficientemente baixas este polímero passa por uma transição de estrutura de desordenada a ordenada (helicoidal). A formação das hélices e sua subsequente agregação são essenciais para a gelificação da carragena (NISHINARI & TAKAHESI, 2003). O esquema proposto por Nishinari *et al.* (1990), em que a estrutura do gel de κ -carragena é composta pela

associação de duplas hélices e sua estrutura pode ser interpretada em termos do modelo “zíper” com N ligações, é um dos mais aceitos. Esta estrutura do gel de carragena pode ser observada na Figura 2.4.

A temperatura de gelificação da carragena varia de acordo com seu tipo e concentração, presença de solutos iônicos e não iônicos bem como de outros polímeros. De todos os tipos de carragena, a κ - fornece os géis mais fortes. A rigidez dos géis de κ -carragena é diretamente dependente da concentração da goma e dos seguintes cátions nessa ordem, $K^+ > Ca^{+2} \gg Na^+$. Um gel rígido e elástico é formado com K^+ , ao passo que com Ca^{+2} o gel é mais quebradiço e frágil. Tanto com K^+ ou com Ca^{+2} , a κ -carragena possui alto poder gelificante que é marcado por um efeito sinérgico entre estes dois cátions (THERKELSEN, 1993).

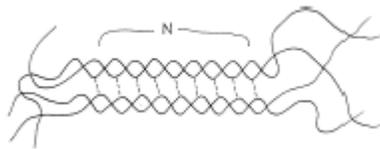


Figura 2.4: Modelo proposto para a gelificação da κ -carragena pela associação de duplas hélices (Fonte: NISHINARI *et al.*, 1990).

2.3 Géis

Há 50 anos, um gel era definido como um sistema coloidal com características sólidas, cuja estrutura seria formada por partículas coloidais com uma fase líquida nas regiões intersticiais. Mais recentemente, um gel passou a ser descrito como um sólido viscoelástico (HORNE, 1999), ou seja, é um sistema que dependendo das circunstâncias pode-se comportar como um líquido viscoso ou como um sólido elástico. Em termos de constituintes químicos, os géis contêm uma substância que na forma pura é líquida e, comparativamente, de baixa massa molecular. A característica elástica dos géis se deve à

existência de um segundo componente presente em quantidades muito menores e de massa molecular muito maior, como é o caso dos polímeros. Parte deste último componente deve estar agrupada em uma rede tridimensional, a qual confere o comportamento elástico ao gel (CLARK, 1991).

Uma outra maneira de classificar os géis seria em termos de elementos estruturais da rede contínua, como sugerido por Flory (1974) e que é apresentada a seguir:

1. Estruturas lamelares perfeitamente ordenadas.
2. Redes poliméricas covalentes completamente ordenadas.
3. Redes poliméricas formadas por agregação física: predominantemente desordenadas, mas com regiões ordenadas.
4. Géis particulados: estruturas desordenadas.

Sabões e géis inorgânicos de argila ou outros minerais encontram-se na classe 1, enquanto que na classe 2, estão os géis poliméricos contínuos formados por ligações covalentes que levam a uma estrutura tridimensional ramificada. Como exemplo da classe 2 estão os géis de poliácridamida e as borrachas. Os géis físicos (classe 3) são formados por polímeros entrelaçados, como é o caso dos géis de gelatina, cujas moléculas com estruturas lineares agregam-se fisicamente em determinadas regiões da cadeia protéica. Os géis de polissacarídeos, em sua maioria, também podem ser classificados nesta categoria. A maioria dos géis físicos são termorreversíveis e podem ser divididos em fortes e fracos. Estes dois tipos de géis possuem características de sólidos a baixas deformações. No entanto, géis fortes rompem a altas deformações, enquanto que os géis fracos (fluidos estruturados) escoam ao invés de romper (ROSS-MURPHY, 1998). Géis lácteos acidificados são formados por agrupamentos de partículas agregadas e, portanto, classificados no tipo 4 (HORNE, 1999). Por outro lado, os géis lácteos induzidos termicamente podem ser

classificados nas classes 2 ou 3, dependendo dos tipos de ligações formadas (covalentes e/ou não-covalentes). O ponto de gel e a classificação deste sistema, como gel forte ou fraco, são mais facilmente avaliados através da medida de suas propriedades reológicas.

2.4 Reologia de alimentos

A reologia é o estudo da resposta a uma tensão ou deformação aplicada em um corpo, e está diretamente relacionada a sua microestrutura. 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 correlação com a textura. Os ensaios reológicos podem ser realizados com aplicação de baixas ou altas deformações, dependendo da finalidade do teste aplicado e das propriedades a serem obtidas (STEFFE,1996).

2.4.1 Comportamento reológico de géis a baixas deformações

A combinação de elementos elásticos e viscosos é a mais utilizada para descrever o comportamento viscoelástico de materiais complexos como os alimentos. As propriedades viscoelásticas dos materiais são dependentes do tempo e da tensão ou deformação aplicadas, sendo que a relação entre estas duas últimas variáveis pode ser linear. No intervalo de viscoelasticidade linear, a magnitude da força ou deformação aplicada é pequena, sendo as propriedades reológicas somente dependentes do tempo e um reflexo da estrutura do material em estudo. Os testes transientes como o “creep” (fluência) e relaxação de tensões, juntamente com os ensaios oscilatórios são os mais comumente utilizados na determinação do comportamento viscoelástico de alimentos. Todos estes ensaios são realizados a deformações ou tensões muito baixas, assegurando o comportamento linear da

relação tensão-deformação, porém no caso das medidas oscilatórias, as propriedades reológicas podem ser determinadas a várias frequências. Nestes ensaios, as respostas de tensão ou deformação bem como a diferença de fase entre tensão e deformação oscilatórias são obtidas (Figura 2.5a), sendo adequados para monitorar o processo de gelificação e definir a estrutura de um gel (LAPASIN & PRICL, 1995). Nos ensaios de “creep”, a deformação de um material é medida em função do tempo sob tensão constante, enquanto que nos testes de relaxação ocorre o decréscimo da tensão com o tempo (Figura 2.5b) em um material sob deformação constante (ϵ_0). Verifica-se que o material elástico ideal não relaxa, enquanto o material viscoso ideal relaxa instantaneamente. Materiais viscoelásticos relaxam gradualmente até um valor de tensão de equilíbrio (σ_e), a qual é função da estrutura do material testado. Esses testes podem ser conduzidos sob cisalhamento, tensão uniaxial ou compressão uniaxial (STEFFE, 1996).

Modelos mecânicos compostos por molas e amortecedores são usualmente utilizados na representação do comportamento viscoelástico de alimentos. As molas e amortecedores podem ser conectados de várias formas descrevendo o comportamento reológico dos materiais, existindo várias combinações possíveis desses elementos. A mola representa o sólido ideal, que obedece à lei de Hooke (Equação 2.1):

$$\sigma = E\epsilon \quad (2.1)$$

onde σ é a tensão (Pa), E o módulo de elasticidade (Pa) e ϵ a deformação.

Por outro lado, o amortecedor representa o fluido ideal, que obedece à lei de Newton (equação 2.2):

$$\sigma = \mu \dot{\epsilon} \quad (2.2)$$

onde μ é a viscosidade (Pa.s) e $\dot{\epsilon}$ taxa de deformação (s^{-1}).

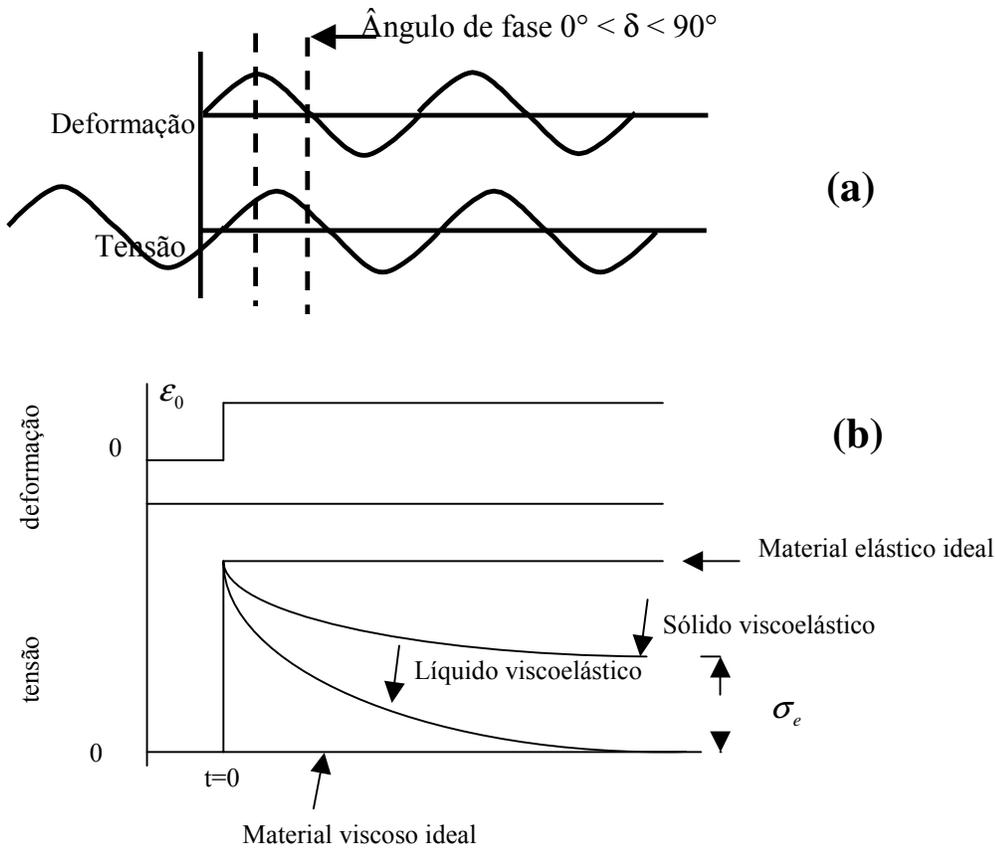


Figura 2.5: Curvas de a) ensaios oscilatórios e de b) relaxação de tensões com diferentes materiais (Steffe, 1996).

Modelos como os de Maxwell e Kelvin-Voigt utilizam essas representações mecânicas e podem ser visualizados na Figura 2.6. No modelo de Maxwell, a mola está em série com o amortecedor (Figura 2.6a), enquanto que no de Kelvin-Voigt (Figura 2.6b), os elementos estão em paralelo (STEFFE, 1996).

Comumente, o comportamento de relaxação de tensões é descrito por um modelo generalizado com n elementos de Maxwell em paralelo com uma mola independente, de maneira a descrever materiais mais complexos. Com uma deformação constante, a tensão total é a soma das tensões individuais do sistema. O modelo generalizado de Maxwell pode ser expresso de acordo com a Equação 2.3:

$$\sigma = f(t) = \sigma_e + \sum_{i=1}^n S_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \quad (2.3)$$

onde t representa o tempo de ensaio (s), o subscripto refere-se aos diferentes elementos mecânicos i do sistema, S_i (Pa) representa os i parâmetros de ajuste do modelo que são dependentes das propriedades viscoelásticas do material e τ_i (s) são os i tempos de relaxação.

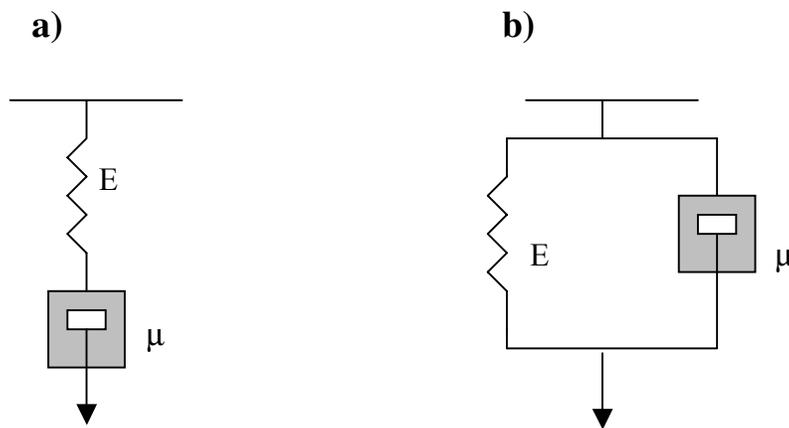


Figura 2.6: Representação dos modelos mecânicos de a) Maxwell e b) Kelvin-Voigt.

2.4.2 Comportamento reológico de géis a altas deformações

Ensaio que envolvem grandes deformações de uma amostra de gel, seja sob compressão, extensão ou cisalhamento chegam no ponto de ruptura ou passam dele. Esses resultados fornecem informações importantes, pois os alimentos são sujeitos a altas tensões, bem fora do intervalo de viscoelasticidade linear, tanto em condições de processamento, como de consumo.

Estudos reológicos a altas deformações ou testes destrutivos proporcionam informação sobre a consistência do gel durante o consumo e também sobre a resistência dos mesmos quando submetidos a condições como agitação e bombeamento, que são partes do processo de produção de iogurtes batidos. Em compressão uniaxial, os experimentos podem ser realizados com lubrificação ou sem, mas muitos autores têm dado preferência à lubrificação devido à maior facilidade de operação nas medidas na ruptura. Os parâmetros de maior interesse nestes ensaios são a tensão na ruptura, a deformação na ruptura e a razão entre esses dois últimos, que é denominada módulo de ruptura. Esses parâmetros possuem uma forte dependência com a taxa de deformação e temperatura, sendo que, em geral, os materiais se mostram mais rígidos a maiores taxas de deformação e mais macios com o aumento da temperatura. A energia necessária para a ruptura de um material é uma medida de sua dureza e pode ser calculada como a área sob a curva tensão-deformação (STEFFE, 1996). Além destes parâmetros, obtidos dentro do intervalo de viscoelasticidade não-linear, a partir da curva tensão-deformação também é possível obter o módulo de elasticidade, que é calculado a partir da inclinação inicial da curva, quando a deformação aplicada é reversível. A predição do módulo é bem mais clara que no caso das outras propriedades mecânicas, pois o aumento do número de reticulações deveria levar ao aumento deste parâmetro. No entanto, em géis físicos a situação é um pouco mais complexa, porque não só o aumento das reticulações é o parâmetro mais relevante, tendo também significativa importância a concentração do polímero (ROSS-MURPHY, 1998). Os parâmetros obtidos a partir das curvas de tensão-deformação podem levar à classificação arbitrária dos materiais em 5 categorias representadas na Tabela 2.1:

Tabela 2.1: Classificação das curvas de tensão-deformação obtidas por compressão uniaxial.

Categoria do material	Módulo de Elasticidade	Tensão na Ruptura	Deformação na ruptura	Exemplo
Macio, Frágil	Baixo	Baixa	Baixa a moderada	Iogurtes
Duro, Frágil	Alto	Alta	Baixa (< 2%)	Biscoitos
Duro, Forte	Alto	Alta	5%	Queijo Duro
Macio, Consistente	Baixo	Moderada	Muito alta	Gomas de mascar
Duro, Consistente	Alto	Alta	Alta	Fibras

Fonte: KAVANAGH & ROSS-MURPHY, 1998.

2.5 Sistemas formados por proteínas e polissacarídeos

2.5.1 Géis protéicos

A rede formada em géis de proteína é resultante do equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-solvente, bem como das forças repulsivas e de atração entre cadeias próximas. Entre as forças atrativas se encontram fundamentalmente as interações hidrofóbicas (maximizadas por temperaturas elevadas), forças eletrostáticas entre grupos com cargas contrárias na mesma proteína, pontes de Ca^{++} e outros íons divalentes, ligações de hidrogênio e pontes dissulfeto. O grau de distribuição de todas essas forças varia em função da natureza da proteína, do solvente e de várias etapas do processo de gelificação (CLARK & LEE-TUFFUEL, 1986).

Géis de proteína podem ser distinguidos por dois tipos: 1) géis particulados compostos de precipitados de proteínas mais ou menos esféricos, que formam uma estrutura fractal irregular, com partículas de tamanho micrométrico, e 2) géis finos compostos de moléculas de polímeros estendidas, as quais formam enlaces e zonas de junção, com partículas de tamanho nanométrico. A ocorrência de um ou outro tipo de gel depende de condições externas, tais como pH e concentração de íons. Em condições de baixa repulsão eletrostática (alta força iônica e/ou pH próximo ao pI) e concentrações de proteína acima de um valor crítico são formados géis opacos particulados, porém em condições de repulsão

moderadamente forte e sob aquecimento há o favorecimento da formação de géis finos. Por outro lado, em condições de repulsão muito forte (força iônica muito baixa e longe do pI) não há formação de gel, a não ser que haja mudança de pH e adição de sais no sistema protéico (LIVNEY *et al.*, 2003), sendo este processo denominado de gelificação a frio. Neste caso, a rede formada tem características de géis particulados.

As propriedades reológicas dos géis particulados e finos mostram grandes diferenças. O gel mais fino é mais extensível que os géis de partículas agregadas, porém a tensão de ruptura tem uma dependência complexa com a concentração. Abaixo ou próximo da concentração de gelificação crítica, o gel de textura fina tem uma tensão de ruptura baixa. Contudo, acima da concentração crítica de gelificação, os géis de textura fina são mais fortes que os géis particulados, pois as regiões de baixa concentração de proteína agem como pontos frágeis, resultando em um valor baixo de tensão na ruptura (HEERTJE, 1993).

Em se tratando de proteínas do leite, a formação do gel é um passo crucial na manufatura de queijo e iogurte, bem como de muitos outros produtos lácteos. No caso do queijo, a caseína é o principal componente formador do gel; porém no caso do iogurte e de muitos outros produtos lácteos feitos com leite tratado termicamente, tanto a caseína como as proteínas do soro estão envolvidos na formação da rede (VAN VLIET *et al.*, 2004).

Os géis de caseína podem ser formados por ação enzimática (coalho na fabricação de queijos), por acidificação ou ainda pela combinação da ação enzimática com a acidificação (LUCEY, 2001). No processo tradicional de acidificação do leite se utilizam culturas lácticas, porém um segundo processo vem obtendo a atenção da indústria de alimentos que é a acidificação direta pela adição de glucona- δ -lactona (GDL). O GDL é um éster que, em condições de alta atividade de água, se hidrolisa para formar ácido glucônico. Neste caso, o

pH final e a velocidade de acidificação obtida é função da quantidade de GDL adicionada no início do processo, porém em qualquer dos processos ocorre a solubilização do fosfato de cálcio da caseína do leite com a queda do pH. Um outro ponto importante a se considerar é a composição mineral da caseína, pois a liberação gradual de íons Ca^{+2} , P^{+5} , Na^+ ou K^+ durante a acidificação é parte fundamental na formação de géis lácteos ácidos (KELLY & O'KENNEDY, 2001).

A formação de géis ácidos de caseína é obtida devido à coagulação desta proteína, a qual ocorre em diferentes etapas, sendo que a rede protéica formada apresenta um caráter heterogêneo com áreas densas de partículas de caseína e outras regiões sem caseína (VAN VLIET *et al.*, 2004). O primeiro passo na formação de géis ácidos de caseína é a solubilização do fosfato de cálcio, que faz as ligações covalentes no interior das micelas, juntamente com os minerais. As partículas individuais ou sub-partículas, particularmente de β - e κ -caseína a baixas temperaturas, são solubilizadas devido ao enfraquecimento das interações hidrofóbicas. Este processo ocorre em um valor de pH por volta de 5,1. Um maior abaixamento do pH permite que as ligações internas se refaçam e a dureza do gel aumente até um valor máximo, que ocorre por volta do ponto isoelétrico da caseína (pI=4,6).

O endurecimento do gel após o início de sua formação é devido a rearranjos da rede protéica que ocorrem em várias escalas de observação (MELLEMA *et al.*, 2002, Braga, 2006). Quatro tipos de rearranjos têm sido identificados, os quais vão desde as sub-partículas até a sinerese macroscópica (Figura 2.7). Os rearranjos entre as sub-partículas levam à fusão das partículas, promovendo o fortalecimento das ligações e aumentando a elasticidade da rede. Quanto mais lento é o processo para alcançar o pH de equilíbrio, mais

o sistema se comportará como uma suspensão de partículas agregadas (HORNE, 2003). A sinerese é um processo importante no processo de gelificação, que está relacionado à propensão ao rearranjo da rede no processo final de formação do gel. Quando a interação cadeia-cadeia é mais forte, a separação de fases pode ocorrer, levando à sinerese. No caso da fabricação de queijos, é essencial para conferir a umidade característica de cada tipo de queijo, porém a separação do soro do leite é o maior defeito que ocorre na fabricação do iogurte.

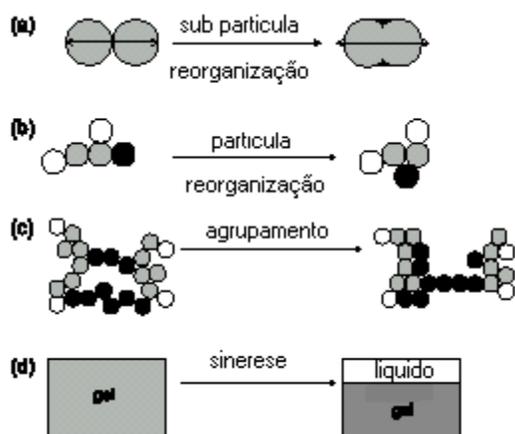


Figura 2.7: Quatro níveis de rearranjos que podem ocorrer em géis de caseína. (a) Nível molecular ou de subpartícula, levando à fusão; (b) nível de partícula levando ao rearranjo interpartículas; (c) agrupamento de partículas e (d) nível macroscópico levando à sinerese (Fonte: MELLEMA *et al.*, 2002).

Estudos reológicos de acidificação do leite sugerem que a gelificação ácida do leite sem aquecimento ocorre através do processo de agregação explicado anteriormente, que nestas medidas é visualizado em um único estágio (DALGLEISH *et al.*, 2004). Porém, com aquecimento e acidificação, a obtenção dos géis lácteos (processo de coagulação) pode ocorrer em dois estágios; sendo o primeiro atribuído à desnaturação das proteínas do soro do leite, a β -lactoglobulina (β -lg) e a α -lactoalbumina (α -la). A mudança conformacional induzida pelo calor resulta na exposição de partes hidrofóbicas e dos grupos tiol reativos da

β -lg. Estes grupos tiol reativos podem fazer pontes dissulfeto com subsequente agregação das β -lg, o que se assemelha a um processo de polimerização. O processo inicial da formação de géis induzidos por calor pode ser físico, mas a interação final é predominantemente covalente, isto é por ligações dissulfeto. No entanto, a reatividade dos grupos tiol decresce significativamente em baixos valores de pH, favorecendo as interações não covalentes em condições ácidas. A α -la pura não se polimeriza com o aquecimento, devido à ausência de grupos tiol livres, mas suas quatro pontes dissulfeto são irreversivelmente desnaturadas na presença da β -lg e/ou BSA. Neste caso, existe uma interação sinérgica entre as diferentes proteínas do soro levando à formação de grandes agregados (LIVNEY *et al.*, 2003).

As proteínas do soro complexadas exibem ainda interações com a caseína através das ligações do grupamento tiol-dissulfeto com a κ - e a α_{s2} -caseína, ocorrendo a coagulação. Em suma, o tratamento térmico leva a uma mistura de agregados de proteínas do soro e caseína recobertos com proteínas do soro (VASBINDER & DE KRUIF, 2003). Como consequência, o aquecimento induz várias interações proteína-proteína e, caso a β -lg, esteja presente em concentração suficiente, é possível a formação do gel (ROESCH *et al.*, 2004). A força da rede é, em geral, muito maior em géis induzidos termicamente que a obtida em géis ácidos que não passaram por aquecimento (HORNE, 1999).

2.5.2. Misturas de proteínas-polissacarídeos

As misturas proteínas-polissacarídeos são encontradas em vários produtos alimentícios, porém o estudo aprofundado de suas interações tem recebido maior atenção apenas recentemente. Estes sistemas são complexos, mostrando uma extensa faixa de interações e

comportamentos. A interação entre proteínas e polissacarídeos é um bom indicativo do quão forte é a rede formada, sendo que o comportamento do gel em medidas de altas deformações pode descrever a matriz polimérica (HEMAR *et al.*, 2002). O comportamento das interações depende de um grande número de parâmetros associados ao histórico do processamento e da formulação dos produtos. Sendo assim, o estudo das propriedades de sistemas constituídos por proteínas e polissacarídeos é de fundamental importância para a compreensão dos eventos relacionados a processos de gelificação e no desenvolvimento de novas aplicações para estes produtos (SYRBE *et al.*, 1998).

O uso de polissacarídeos como a carragena pode minimizar os efeitos negativos da sinerese ou separação de água em sistemas lácteos, pois estes hidrocolóides possuem alta capacidade de ligar a água livre do sistema, sendo que essas ligações ocorrem fisicamente ou por pontes de hidrogênio (HANSEN, 1982). A identificação das condições nas quais o polissacarídeo pode ser mais efetivo é bastante importante, uma vez que a mistura de biopolímeros pode mostrar efeitos antagônicos ou sinérgicos, dependendo de um grande número de parâmetros como concentração dos ingredientes, pH, força iônica, conteúdo de açúcares e sais, entre outros (SYRBE *et al.*, 1998).

A incompatibilidade entre proteínas e polissacarídeos em solução é um fenômeno natural (GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997; ZASYPKIN *et al.*, 1997). A incompatibilidade termodinâmica que ocorre entre biopolímeros não idênticos, sob certas condições de pH e/ou força iônica, leva à separação de fases, a qual ocorre quando a concentração total dos componentes macromoleculares excede um certo valor crítico (TOLSTOGUZOV, 2000). Por outro lado, em certas condições de pH (ex: proteína abaixo do pI e polissacarídeo aniônico) ocorre um predomínio das forças de atração entre biopolímeros diferentes que é denominada coacervação. Este fenômeno acontece quando as cargas individuais dos

polímeros são opostas, o que pode ocorrer em misturas de polissacarídeos aniônicos, como a carragena, e proteínas em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico (GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997).

A separação de fases em biopolímeros devido à incompatibilidade termodinâmica, provavelmente, está relacionada à diminuição da entropia do sistema, resultando no decréscimo da energia livre da mistura. O entendimento da incompatibilidade termodinâmica tem sido relacionado à teoria de Flory-Huggins ou à depleção-floculação, dependendo das características da proteína estudada (TURGEON *et al.*, 2003). No caso da depleção-floculação, a agregação das partículas é causada pela exclusão das moléculas poliméricas do espaço entre as partículas, resultando em diferenças na concentração dos polímeros entre a região interpartículas e a zona externa que circunda as mesmas. A pressão osmótica da solução polimérica é maior que a pressão osmótica da região interpartícula sem polímeros, levando a uma força atrativa entre as partículas. Essa força atrativa depende do tamanho, da forma e da concentração das moléculas dos polímeros e das partículas (HEMAR *et al.*, 2001).

Existem duas teorias que explicam as interações entre a carragena e as proteínas do leite e, mais especificamente, com as micelas de caseína. A primeira delas sugere que existe uma alta reatividade entre a carragena e as proteínas do leite no intervalo de pHs entre 6 e 7 (HEERTJE, 1993). Esta interação seria de natureza eletrostática, entre a carga negativa da carragena e uma região carregada positivamente da κ -caseína (resíduos 97-112), levando à adsorção do polissacarídeo na superfície da proteína (LANGENDORFF *et al.*, 2000). No entanto, a superfície da micela de caseína está carregada negativamente e estabilizada estericamente pela κ -caseína, fazendo com que esta teoria não pareça muito adequada. Em

especial, resultados de microestrutura mostraram que misturas de proteínas do leite e carragena podem se separar em duas fases, devido à incompatibilidade termodinâmica do sistema atribuída ao fenômeno de depleção-floculação (HEMAR *et al.*, 2001). Esta separação microscópica também foi observada com misturas de caseinato de sódio e carragena (HEMAR *et al.*, 2002), apesar de que neste caso a proteína possui um massa molecular bem menor que a micela.

Uma segunda teoria mais recente propõe que a separação macroscópica entre proteínas do leite e carragena não é observada, pois a formação de um gel fraco de polissacarídeo mantém as micelas de caseína presas na rede (BOURRIOT *et al.*, 1999). Schorsch *et al.* (2000) verificaram que a concentração crítica para a gelificação da carragena diminui na presença de caseína. No leite, a carragena pode gelificar (gel firme) em concentrações tão baixas como 0,15% p/p, que é uma concentração até cinco vezes menor que a necessária para gelificar em água, ou seja, juntamente com a capacidade de reticulação e a rigidez estrutural das partículas micelares de caseína, o gel de carragena fica mais forte (THERKELSEN, 1993). Oakenfull *et al.* (1999) sugerem que a formação de géis mistos envolve um mecanismo de dois passos, que pode ser observado na Figura 2.8. A altas temperaturas, acima da de transição da carragena, as moléculas do polissacarídeo estão livres em solução, na conformação desordenada (A) ou ligada ao caseinato de sódio (B). Abaixo da temperatura de transição, as moléculas de carragena livres ou ligadas estão na conformação helicoidal (C) e a gelificação ocorre pela interação entre estas hélices (D), como no caso da gelificação do polissacarídeo puro. Mecanismo similar foi sugerido para as interações entre micelas de caseína e κ -carragena (SPAGNUOLO *et al.*, 2005).

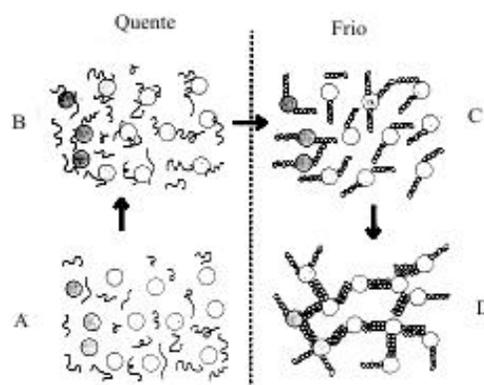


Figura 2.8: Mecanismo de dois estágios para gelificação de mistura de caseinato de sódio e carragena. A) conformação desordenada B) ligada ao caseinato de sódio C) conformação helicoidal D) interação entre estas hélices (Fonte: OAKENFULL *et al.*, 1999).

Sistemas formados por κ -carragena e β -lactoglobulina foram estudados por Syrbe *et al.* (1998) e Tolstoguzov (2003), que observaram a formação de um gel com rede fraca, sendo que a falta de associação é atribuída à separação de fases. Análise dos mesmos sistemas através de microscopia de força atômica também mostrou que houve separação de fases e falta de interação entre os biopolímeros (ROESCH *et al.*, 2004). No entanto, a β -lactoglobulina após aquecimento e no pH neutro torna-se desnaturada e expõe grupos carregados positivamente, tornando-se mais disponível para interações com a carragena (DE LA FUENTE *et al.*, 2004).

Geralmente, em produtos lácteos se adicionam solutos como sal e açúcar, conferindo características próprias de sabor ao alimento processado. A presença de co-solutos pode modificar o processo de gelificação, contribuindo, por exemplo, para a estabilidade das micelas de caseína durante a acidificação (SCHKODA *et al.*, 1999). No caso de mistura de polissacarídeos e proteínas há um aumento da co-solubilidade dos biopolímeros com o aumento da concentração de sacarose (ANTIPOVA & SEMENOVA, 1995), sendo que a altas

concentrações de sacarose (30 a 60% p/p) o processo de agregação das frações micelares de caseína pode ser reduzido e em concentrações superiores a 60%, é completamente inibido (SCHORSCH *et al.*, 1999). Outro ponto a ser considerado são as mudanças conformacionais e térmicas ocorridas com as proteínas do soro na presença de açúcar que podem modificar a textura dos alimentos.

A adição de açúcares também pode alterar o mecanismo de gelificação das proteínas globulares pelo aumento da temperatura de gelificação (KULMYRZAEV *et al.*, 2000). Este fato pode ser atribuído ao aumento da temperatura de desnaturação das proteínas do soro na presença de sacarose. Em análise calorimétrica, os valores de temperatura de desnaturação da β -lactoglobulina em presença de solução 20% p/v de açúcar foram de 71,7, 73,4, 73,3, 76,8 e 77 °C para sacarose, lactose, frutose, glicose e galactose, respectivamente. Na ausência de açúcar, a temperatura de desnaturação dessa proteína é próxima de 69,1°C (BOYE & ALLI, 2000). Além disso, a presença de açúcar diminui a taxa de gelificação das proteínas do soro, o que pode ser atribuído a um aumento da viscosidade da fase contínua, causando um decréscimo da frequência de encontro entre as moléculas de proteína. Outro aspecto importante é que os açúcares promovem um significativo aumento na rigidez dos géis de proteína, pois o aquecimento a valores de temperatura acima do ponto de desnaturação causa desdobramento irreversível do polipeptídeo (KULMYRZAEV *et al.*, 2000).

A presença de sacarose em sistemas formados por caseinato de sódio e κ -carragena e acidificados até o ponto isoelétrico da caseína levou a um deslocamento da incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros a valores mais altos de concentração da proteína. Este efeito foi explicado pela redução da afinidade da proteína

pelo solvente desde o início da acidificação ou pela hidratação preferencial da caseína, levando à formação de mais ligações entre as proteínas. A sacarose também contribuiu para a estabilização das zonas de junção da carragena facilitando a formação de uma rede de polissacarídeo, a qual é a principal responsável pela estrutura destes sistemas mistos (RIBEIRO *et al.*, 2004).

O uso de sal em baixas concentrações, em leites acidificados, contribuiu para a estabilidade das micelas de caseína, pois os íons aparentemente ligam-se às cargas negativas da κ -caseína favorecendo a formação de géis. Porém, a altas concentrações de sal, ocorre um colapso em que o grau de solvatação é alto e a viscosidade é baixa, sendo que nessa condição de pH próximo ao pI a capacidade de retenção de água é pequena (SCHKODA *et al.*, 1999). Dessa forma, devido ao aumento da concentração iônica, a força dos géis ácidos diminui (ROEFS & VAN VLIET, 1990). A adição de sal também pode estabilizar as moléculas de proteína do soro, levando ao aumento da temperatura de desnaturação destas (BOYE *et al.*, 1997a, PUPPO & ANON, 1999), porém o efeito do sal na gelificação das proteínas depende do efeito eletrostático causado na malha protéica.

CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O material utilizado no preparo dos sistemas lácteos foi concentrado protéico do soro (CPS), caseína, κ -carragena, glucono-delta-lactona (GDL), sacarose, cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de potássio (KCl). A caseína, a κ -carragena e o GDL foram adquiridos da Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). O concentrado protéico do soro (CPS - AlacemTM 392) foi gentilmente cedido pela New Zealand Milk Products (NZMP) – Brasil. A sacarose, NaCl e KCl, com grau analítico, eram da marca Synth (São Paulo - Brasil).

A composição dos biopolímeros em pó utilizados neste trabalho é apresentada na Tabela 3.1. O teor de umidade foi obtido por análise gravimétrica (A.O.A.C.1990), o conteúdo de lactose por Lanara (1981), a concentração de proteínas por Kjehdal (A.O.A.C. 1980) e a determinação dos íons por absorção atômica feita no Instituto de Química – Unicamp.

Tabela 3.1: Composição dos biopolímeros utilizados nos sistemas-modelo lácteos.

	Proteína (%)	Na ⁺ (%)	Ca ²⁺ (%)	K ⁺ (%)	Lactose (%)	Umidade (% b.u.)
Caseína	89,66	0,80	0,40	0,40	-	7,22
κ -Carragena	-	0,10	0,70	2,70	-	8,40
CPS	83,60	0,25	0,36	0,58	6,70	3,90

Nos ensaios de microscopia eletrônica foram empregados glutaraldeído (da E.M.S. – Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA), cacodilato de sódio (Sigma-Aldrich

Corporation St. Louis, MO, EUA) e tetróxido de ósmio, adquirido da Fluka Chemie GmbH (Buchs, Alemanha).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo dos sistemas modelo

Os sistemas modelo foram preparados de acordo com as condições de processo e concentrações definidas pelos planejamentos fatoriais fracionários e completos, que estão descritos nas seções 3.2.1.1 e 3.2.1.2. A metodologia para a elaboração destes sistemas lácteos acidificados será descrita a seguir.

Primeiramente, o caseinato de sódio foi preparado a partir da dissolução da caseína em água deionizada utilizando agitação magnética. O pH foi controlado para manter-se entre 6,8-7,0, utilizando NaOH 10 M e a temperatura máxima do sistema foi de 50°C. A hidratação completa da caseína para formação do caseinato de sódio foi alcançada após um período de 2 horas. A solução de CPS foi preparada separadamente, à temperatura ambiente, sob agitação manual até sua homogeneização e hidratação. Posteriormente, a solução de CPS foi rapidamente misturada à solução de caseinato de sódio sob agitação magnética, para a obtenção da solução mista de proteínas do leite.

Separadamente, a carragena foi dissolvida em água deionizada sob agitação mecânica, em um tanque encamisado com velocidade de agitação controlada ($88 \text{ rpm} \approx 19 \text{ s}^{-1}$) à temperatura ambiente, até sua visual dissolução. Posteriormente, a solução protéica do sistema foi misturada na solução de carragena utilizando o mesmo tanque encamisado, porém sob diferentes velocidades de agitação e condições de tratamento térmico (seção

3.2.1.1). As condições de agitação foram variadas para verificar a influência do cisalhamento nas características do gel formado, enquanto que o efeito do tratamento térmico sobre a conformação das proteínas do soro foi avaliado em diferentes condições de processo (tempo e temperatura). Nas formulações com co-soluto (sacarose ou mistura salina KCl/NaCl), este foi adicionado à solução protéica juntamente com a κ -carragena. Após o tratamento térmico, a mistura de biopolímeros foi equilibrada rapidamente na temperatura de 35 °C com o auxílio de um banho de gelo, quando, então, foi adicionado o éster glucona- δ -lactona (GDL) em pó, em concentrações cuja razão GDL/caseína fosse igual a 0,135 (BRAGA, 2002, 2006). Após a adição de GDL, a temperatura foi novamente diminuída a 10 °C com o auxílio de banho de gelo. A razão GDL/caseína foi definida de maneira que os sistemas alcançassem pH próximo a 4,6 (pI da caseína), a 10°C em aproximadamente 48 horas.

Após a adição do GDL, foram retiradas amostras dessa solução que foram submetidas a diferentes formas de acondicionamento de acordo com a análise a ser realizada, as quais são descritas nas próximas seções.

3.2.1.1 Condições preliminares usadas no preparo dos géis: planejamentos experimentais fatoriais fracionários

Dois planejamentos fatoriais fracionários com seis (2^{6-2}) e sete (2^{7-3}) variáveis independentes foram realizados com o intuito de avaliar as variáveis que exerciam efeito significativo sobre as propriedades reológicas dos géis. A diferença entre os dois planejamentos experimentais foi que em um deles foi adicionado sacarose (2^{7-3}) em diferentes concentrações e no outro não (2^{6-2}), de maneira que fosse possível verificar a

influência da adição deste co-soluto nas propriedades dos géis estudados. Além da concentração de sacarose, as outras variáveis independentes foram as concentrações de caseinato de sódio, de concentrado protéico do soro e de κ -carragena, bem como a temperatura de mistura dos componentes, o tempo de aquecimento da mistura e a velocidade de agitação. As concentrações dos componentes e as condições de processamento utilizadas nos planejamentos fatoriais fracionários $2^{(6-2)}$ e $2^{(7-3)}$, encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Valores reais e codificados das variáveis utilizadas nos planejamentos fatoriais fracionários.

	CAS	CPS	CAR	SAC	T	t	Vel/ $\dot{\gamma}$
Nível (-1)	2,0	0,8	0,3	5	30	5	88 / 19
Nível (0)	6,0	1,75	0,65	10	55	17,5	188 / 41
Nível (+1)	10,0	2,7	1,0	15	80	30	288 / 62

CAS: Concentração de caseinato de sódio (% p/p)

CPS: Concentração de concentrado protéico de soro (% p/p)

CAR: Concentração de κ -carragena (% p/p)

SAC: Concentração de sacarose (% p/p)

T: Temperatura ($^{\circ}$ C) de mistura dos componentes

t: Tempo de aquecimento da mistura (min) na temperatura T

Vel: Velocidade de agitação (rpm)/ $\dot{\gamma}$: taxa de deformação (s^{-1})

Em cada planejamento foram feitos quatro pontos centrais, sendo que os extremos de concentração utilizados (+1, -1) para as proteínas e a sacarose foram determinados com base em valores encontrados em produtos lácteos existentes no mercado. No caso da carragena, o valor máximo foi determinado em função da legislação vigente, a qual permite a adição de até 1% deste polissacarídeo. As condições de tratamento térmico da mistura

foram estabelecidas de maneira que as proteínas passassem por condições muito brandas (30°C/5min) a relativamente drásticas (80°C/30min), o que permitiria avaliar a importância do tratamento térmico sobre as proteínas do soro, nas propriedades dos géis formados. A velocidade de agitação variou entre valores que permitiam mistura branda até relativamente forte, mas sem formação de espuma. Estes valores foram convertidos em taxa de deformação ($\dot{\gamma}$), para que ficasse mais clara a intensidade de agitação utilizada neste trabalho (SHEKHAR & JAYANTI, 2003).

O esquema codificado dos planejamentos fatoriais fracionários sem co-soluto ($2^{(6-2)}$) e com sacarose ($2^{(7-3)}$) encontram-se na Tabela 3.3. As respostas avaliadas nos planejamentos fatoriais foram as propriedades mecânicas na ruptura, bem como os parâmetros do modelo de Maxwell ajustados aos dados obtidos, a partir de ensaios de relaxação de tensões. Após a definição das variáveis independentes que exerceram efeitos significativos sobre as propriedades reológicas dos géis, estas foram utilizadas nos planejamentos fatoriais completos para um estudo mais aprofundado das propriedades macro- e microscópicas dos géis lácteos-modelo.

A partir da Tabela 3.3, pode-se observar que foi realizado um total de quarenta formulações, na avaliação preliminar das variáveis que influenciavam o comportamento reológico dos géis. Os ensaios foram realizados em ordem aleatória e os resultados avaliados de acordo com o item 3.2.2.5 (Tratamento estatístico dos dados experimentais).

Tabela 3.3: Esquema codificado dos planejamentos fatoriais fracionários. A) Sem sacarose ($2^{(6-2)}$) e B) com sacarose ($2^{(7-3)}$).

A							B							
Ensaio	CAS	CPS	CAR	T	t	Vel	Ensaio	CAS	CPS	CAR	SAC	T	t	Vel
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1	-1	1	2	1	-1	-1	-1	1	-1	1
3	-1	1	-1	1	1	-1	3	-1	1	-1	-1	1	1	-1
4	1	1	-1	-1	1	1	4	1	1	-1	-1	-1	1	1
5	-1	-1	1	1	1	1	5	-1	-1	1	-1	1	1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	6	1	-1	1	-1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	7	-1	1	1	-1	-1	-1	1
8	1	1	1	1	-1	-1	8	1	1	1	-1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	-1	1	1	9	-1	-1	-1	1	-1	1	1
10	1	-1	-1	1	1	-1	10	1	-1	-1	1	1	1	-1
11	-1	1	-1	1	-1	1	11	-1	1	-1	1	1	-1	1
12	1	1	-1	-1	-1	-1	12	1	1	-1	1	-1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	-1	-1	13	-1	-1	1	1	1	-1	-1
14	1	-1	1	-1	-1	1	14	1	-1	1	1	-1	-1	1
15	-1	1	1	-1	1	-1	15	-1	1	1	1	-1	1	-1
16	1	1	1	1	1	1	16	1	1	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0

3.2.1.2 Condições usadas no preparo dos géis: planejamentos experimentais fatoriais completos

Após a definição das variáveis independentes significativas pelos planejamentos fatoriais fracionários (seção 4.1), dois planejamentos fatoriais completos 2^5 foram realizados: um com adição de sacarose e outro com uma mistura salina composta por KCl e NaCl. As variáveis estudadas nos planejamentos completos foram: concentrações de caseinato de sódio, de concentrado protéico de soro, de κ -carragena, de sacarose ou mistura salina (KCl e NaCl), bem como a temperatura de tratamento térmico dos componentes. Os extremos de concentração utilizados foram similares aos dos planejamentos fracionários, mantendo-se os valores do ponto central (0), enquanto os demais valores foram calculados de acordo com a nova definição dos níveis codificados (interpolação), sendo que no caso

dos co-solutos o valor real do nível $-\alpha$ (-2,38) foi zero (sem adição de sacarose ou da mistura salina de KCl/NaCl). Com relação à variação da relação KCl/NaCl utilizada, o valor máximo de KCl foi definido em função do sabor residual que este sal apresenta em altas concentrações. Dessa maneira, as concentrações de sal utilizadas nesse sistema foram baseadas nas razões de KCl/NaCl estudadas anteriormente (JAROSZEWSKI *et al.*, 2003). De maneira a se ter em um único valor as concentrações dos diferentes sais, estas foram convertidos em força iônica (M), de acordo com a Equação 3.1, que se encontram na Tabela 3.4. Nessa Tabela encontram-se também os valores reais e codificados das variáveis independentes dos sistemas.

$$Fi = \frac{1}{2} \sum \sqrt{C_i Z_i^2} \quad (3.1)$$

onde C_i é a concentração da espécie (M) e Z_i a carga da espécie.

Tabela 3.4: Valores reais e codificados da mistura salina utilizados nos planejamentos fatoriais completos e as concentrações dos diferentes sais convertidas em Força Iônica (FI).

	CAS	CPS	CAR	KCl+ NaCl	KCl (%)	NaCl (%)	FI	T
Nível (-2,47)	1,24	0,62	0	0	0	0	0	30
Nível (-1)	4,0	1,27	0,37	0,58	0,13	0,45	0,21	44,5
Nível (0)	6,0	1,75	0,65	1,00	0,33	0,67	0,28	55
Nível (+0,53)	8,0	2,22	0,79	1,21	0,46	0,75	0,31	65,5
Nível (+ 1,06)	10,76	2,88	1,00	1,50	0,64	0,86	0,34	80

CAS: Concentração de caseinato de sódio (% p/p)

CPS: Concentração de concentrado protéico de soro (% p/p)

CAR: Concentração de κ -Carragena (% p/p)

FI: Força Iônica (M)

T: Temperatura ($^{\circ}$ C) de mistura dos componentes

Os valores reais e codificados das variáveis independentes dos sistemas com adição de sacarose encontram-se nas Tabela 3.5 e as condições dos ensaios utilizados nos planejamentos fatoriais completos, na Tabela 3.6.

Tabela 3.5: Valores reais e codificados utilizados nos planejamentos fatoriais completos.

	CAS	CPS	CAR	SAC	T
Nível (-2,38)	1,24	0,62	0	0	30
Nível (-1)	4,0	1,27	0,37	5,79	44,5
Nível (0)	6,0	1,75	0,65	10,0	55
Nível (+1)	8,0	2,22	0,79	14,20	65,5
Nível (+ 2,38)	10,76	2,88	1,00	20,00	80

CAS: Concentração de caseinato de sódio (% p/p)

CPS: Concentração de concentrado protéico de soro (% p/p)

CAR: Concentração de κ -Carragena (% p/p)

SAC: Concentração de sacarose (% p/p)

T: Temperatura ($^{\circ}$ C) de mistura dos componentes

Em cada planejamento foram realizados quatro pontos centrais e dez axiais, totalizando 46 ensaios cada um, sendo que as propriedades dos géis foram mensuradas em triplicata. Os ensaios foram feitos em ordem aleatória e as respostas avaliadas foram: propriedades mecânicas, parâmetros do modelo de Maxwell ajustado aos dados de relaxação de tensões e capacidade de retenção de água. Os resultados foram obtidos de acordo com as seções 3.2.2.1. e 3.2.2.2, respectivamente, tal como os planejamentos fatoriais fracionários.

Tabela 3.6: Esquema codificado dos planejamentos fatoriais completos $2^{(5)}$.

Ensaio	CAS	CPS	CAR	SAC / FI	T
1	-1	-1	-1	-1 / -1	-1
2	1	-1	-1	-1 / -1	-1
3	-1	1	-1	-1 / -1	-1
4	1	1	-1	-1 / -1	-1
5	-1	-1	1	-1 / -1	-1
6	1	-1	1	-1 / -1	-1
7	-1	1	1	-1 / -1	-1
8	1	1	1	-1 / -1	-1
9	-1	-1	-1	1 / 0,53	-1
10	1	-1	-1	1 / 0,53	-1
11	-1	1	-1	1 / 0,53	-1
12	1	1	-1	1 / 0,53	-1
13	-1	-1	1	1 / 0,53	-1
14	1	-1	1	1 / 0,53	-1
15	-1	1	1	1 / 0,53	-1
16	1	1	1	1 / 0,53	-1
17	-1	-1	-1	-1 / -1	1
18	1	-1	-1	-1 / -1	1
19	-1	1	-1	-1 / -1	1
20	1	1	-1	-1 / -1	1
21	-1	-1	1	-1 / -1	1
22	1	-1	1	-1 / -1	1
23	-1	1	1	-1 / -1	1
24	1	1	1	-1 / -1	1
25	-1	-1	-1	1 / 0,53	1
26	1	-1	-1	1 / 0,53	1
27	-1	1	-1	1 / 0,53	1
28	1	1	-1	1 / 0,53	1
29	-1	-1	1	1 / 0,53	1
30	1	-1	1	1 / 0,53	1
31	-1	1	1	1 / 0,53	1
32	1	1	1	1 / 0,53	1
33	-2,38	0	0	0 / 0	0
34	2,38	0	0	0 / 0	0
35	0	-2,38	0	0 / 0	0
36	0	2,38	0	0 / 0	0
37	0	0	-2,38	0 / 0	0
38	0	0	2,38	0 / 0	0
39	0	0	0	-2,38 / -2,47	0
40	0	0	0	2,38 / 1,06	0
41	0	0	0	0 / 0	-2,38
42	0	0	0	0 / 0	2,38
43	0	0	0	0 / 0	0
44	0	0	0	0 / 0	0
45	0	0	0	0 / 0	0
46	0	0	0	0 / 0	0

3.2.2. Metodologia da avaliação das propriedades físicas, químicas e estruturais dos sistemas modelo.

3.2.2.1. Propriedades mecânicas obtidas sob compressão uniaxial

Após o procedimento de preparo dos sistemas modelo (3.2.1), as amostras foram colocadas em formas cilíndricas (30mm de altura e 30mm de diâmetro) e armazenadas por 48 horas em uma estufa BOD (Tecnal, modelo TE - 391) a 10 °C. Posteriormente, os géis foram desenformados e utilizados nos ensaios de ruptura e de relaxação de tensões, em um texturômetro TA-XT2i Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Inglaterra) com uma célula de carga de 25 kg. Estes ensaios foram realizados à temperatura de 10 ± 1 °C e a geometria utilizada foi uma placa de acrílico de 35mm de diâmetro que foi lubrificada com óleo de silicone de baixa viscosidade, com o intuito de evitar o atrito entre a superfície da amostra e a geometria.

Nos ensaios de ruptura, os géis foram comprimidos a diferentes velocidades (0,1, 1, 5 e 9 mm/s) até 80% da sua altura inicial, nos ensaios dos planejamentos experimentais fracionários. No caso dos ensaios do planejamento fatorial completo, a mesma deformação final (80%) foi utilizada, mas as medidas foram conduzidas somente a 1 mm/s. Os dados fornecidos pelo equipamento nos ensaios de ruptura foram força em função da altura de material, os quais foram utilizados na determinação dos valores de tensão e deformação, respectivamente. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Na compressão uniaxial, o material é deformado em uma só direção e a taxa de deformação é a mesma em cada elemento de volume. Neste caso, a deformação pode ser definida pela deformação de Hencky (ϵ_H), de acordo com a Equação (3.2):

$$\varepsilon_H = \left| \ln \left(\frac{H(t)}{H_0} \right) \right| \quad (3.2)$$

onde ε_H é a deformação de Hencky (adimensional), $H(t)$ é a altura da amostra em um tempo t (mm) e H_0 é altura inicial da amostra (mm).

Considerando que o material é incompressível, a tensão real ou de Hencky (σ) pode ser escrita de acordo com a Equação (3.3):

$$\sigma = \frac{F(t)H(t)}{A_0H_0} \quad (3.3)$$

onde σ é a tensão real ou de Hencky (Pa), $F(t)$ é a força medida em um tempo t (N) e A_0 é a área de contato da amostra no início do ensaio (mm^2).

A partir da curva tensão versus deformação ($\sigma \times \varepsilon_H$) da amostra, foi possível determinar propriedades como: o ponto de ruptura (o valor máximo da curva) e a partir deste, os parâmetros relacionados à resistência do material que são a tensão na ruptura (σ_{rup}) e a deformação na ruptura (ε_{rup}). A tensão e a deformação na ruptura são associadas com os parâmetros de textura, dureza e deformabilidade, respectivamente. Também foi avaliada a razão entre tensão e deformação na ruptura, denominada de módulo de ruptura, a qual pode ser um indicativo da tenacidade ou mastigabilidade do produto. O módulo de elasticidade (módulo de Young) foi obtido a partir do intervalo linear inicial da curva tensão-deformação ($\varepsilon < 5\%$) (STEFFE, 1996), quando a deformação aplicada é reversível e pode-se considerar que o material está dentro do intervalo de viscoelasticidade linear. Com relação à sua associação com parâmetros de textura, o módulo de elasticidade é

normalmente associado à firmeza do material. Os valores do módulo de elasticidade, de tensão, deformação e módulo na ruptura foram respostas dos planejamentos fatoriais fracionários e completos.

Os ensaios de relaxação de tensões foram conduzidos durante 300s, utilizando-se a velocidade de compressão inicial de 5mm/s e deformação final de aproximadamente 3%. Ensaios preliminares foram realizados e verificou-se que este valor de deformação garantia que os resultados obtidos estavam dentro do intervalo linear. Os dados obtidos de força em função do tempo foram ajustados a um modelo de Maxwell de dois elementos com uma mola acoplada em paralelo. Nessa equação utilizou-se a razão adimensional $F(t)/F_0$ em função do tempo (BERTOLA *et al.*, 1991), onde $F(t)$ é a força instantânea durante o tempo de relaxação e F_0 é a força inicial antes do seu declínio. O modelo utilizado está representado na Equação (3.4):

$$F^*(t) = F(t)/F_0 = S_\infty + S_1 \exp(-t/\tau_1) + S_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (3.4)$$

onde S_∞ , S_1 , S_2 são parâmetros de ajuste dependentes das propriedades viscoelásticas do material (adimensional) e τ_1 , τ_2 os tempos de relaxação (s). Os módulos elásticos de Maxwell (E_i) podem ser expressos de acordo com a Equação (3.5):

$$E_i = S_i F_0 / \varepsilon A \quad \text{com } i = 1, 2, \dots, \infty \quad (3.5)$$

onde A é a área de compressão (mm^2) e ε é a deformação utilizada durante o ensaio.

Os valores de η_i denominados de viscosidade ou módulos viscosos de Maxwell foram estimados da seguinte forma (Equação 3.6):

$$\eta_i = E_i \tau_i \quad (3.6)$$

Os maiores valores de η_i e E_i foram as respostas avaliadas dos planejamentos fatoriais fracionários e completos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (totalizando para o planejamento fatorial fracionário 360 ensaios sem soluto e 360 com sacarose, para o planejamento fatorial completo 276 ensaios para a sacarose e mais 276 para a mistura salina KCl/NaCl), sendo que a média dos valores obtidos foi utilizada na avaliação estatística dos planejamentos fatoriais.

3.2.2.2. Capacidade de retenção de água (CRA)

Após o preparo dos sistemas-modelo, amostras, de aproximadamente 50g, foram colocadas em tubos de centrífuga e permaneceram por 48 horas em estufa BOD (Tecnal, modelo TE - 391) a 10°C, antes de serem centrifugadas entre 400 a 10000g-força em 5 passos de 10 minutos cada (400, 1.500, 3.500, 6.200 e 10.000g), totalizando 50 minutos de ensaio. Nestes ensaios foi utilizada uma centrífuga da marca DuPont modelo Sorvalle RC26 Plus, rotor SLA (EUA) do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (DEA-FEA-Unicamp). Depois da centrifugação foi quantificado o volume da fase líquida e o da fase sólida foi obtido pela diferença com o volume total inicial (SCHKODA *et al.*, 1999). A capacidade de retenção de água dos géis foi determinada de acordo com a Equação 3.7. Todos os ensaios foram feitos em duplicata, pois ensaios preliminares realizados em triplicata mostraram que o desvio entre as medidas era inferior a 5%.

$$CRA(\%) = 100 \left(1 - \frac{m_{\text{água liberada}}}{m_{\text{água inicial}}} \right) \quad (3.7)$$

3.2.2.3. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram preparadas de acordo com o item 3.2.1 (preparo dos sistemas modelo) nas condições dos ensaios 39, 40 e 43, ou seja, concentrações dos pontos axiais para sacarose e mistura salina e central, respectivamente. Os géis foram confeccionados em finas lâminas (géis formados em placa de Petri com aproximadamente 1mm de espessura) para a análise de microscopia eletrônica de varredura que foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica (Instituto de Biologia – Unicamp). Estas amostras foram cortadas em tiras retangulares (de aproximadamente 5x30mm) e fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M a pH 7,2 durante toda a noite. Após este período, as amostras foram lavadas no tampão cacodilato de sódio (duas lavagens de vinte minutos) e, em seguida, com tetróxido de ósmio (2%) em tampão cacodilato de sódio (0,1M) por mais duas horas e meia. Essa etapa é denominada de pós-fixação. Novamente, as amostras foram lavadas (duas lavagens de vinte minutos) em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Entre as lavagens foi realizada a crio-fratura da amostra utilizando nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram desidratadas em solução alcoólica, ficando vinte minutos nas seguintes concentrações de etanol 30, 50, 70, 90 e 100%, sendo que na de 100% o procedimento foi repetido duas vezes.

A etapa subsequente, denominada de secagem no ponto crítico, foi realizada em um equipamento da marca Balzers, modelo CPD 030 (Bal-Tec-Liechtenstein). Para este procedimento, as amostras ainda úmidas com etanol foram colocadas em uma câmara hermética do equipamento dotada de uma conexão que permitia a entrada de CO₂ resfriado (5-6°C). Nesta condição, o gás estava no estado líquido, permitindo que as amostras ficassem imersas no mesmo. Como ainda existia um pouco de solvente nas amostras

(impedindo o alcance do ponto crítico do CO₂), este resíduo teve que ser eliminado, o que foi feito através de repetidos “enxagues” com CO₂ para que ocorresse o arraste do etanol. A câmara foi aquecida (quase que totalmente cheia de gás carbônico) e quando atingiu a temperatura de 30°C, alcançou-se o ponto crítico do CO₂. A temperatura foi aumentada até cerca de 40°C quando, então, eliminou-se o gás lentamente e a amostra ficou seca. Este procedimento foi realizado com o intuito de evitar problemas de injúrias na superfície dos géis.

As amostras secas foram imediatamente aderidas (montadas) no porta-amostras (“stubs”) e recobertas com ouro, cuja função seria evitar problemas de “charging up” (porções da superfície da amostra tornarem-se intensamente brilhantes), que prejudicam a observação ao microscópio eletrônico de varredura. A cobertura com ouro, de espessura da ordem de 10-20nm, foi feita em um metalizador modelo SCD 050 da marca Balzers (Bal-Tec-Liechtenstein) por evaporação à vácuo. As amostras foram, então, observadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL Technics LTD. modelo JSM – 5800LV (Tóquio, Japão), com voltagem de 15kV.

3.2.2.4. Calorimetria diferencial de varredura

Ensaio de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram utilizados na determinação da temperatura de desnaturação das proteínas do soro quando adicionadas de sacarose ou da mistura salina. Esta análise foi importante para a avaliação do impacto do tratamento térmico sobre as proteínas do soro na presença de co-soluto.

As soluções foram preparadas utilizando somente CPS (concentrado protéico de soro) e co-solutos, com concentração de 25% (p/p) de CPS e variadas concentrações de

sacarose (0, 5,7, 10, 14,2, 20, 25 e 30%) e de mistura salina KCl/NaCl com força iônica de 0, 0,21, 0,28, 0,31, 0,34 e 0,39 M. Foi necessário o uso de maior concentração de proteína que as utilizadas nas formulações estudadas de maneira que fosse detectado o evento térmico de desnaturação. Um intervalo mais amplo de concentrações de co-soluto foi utilizado, considerando que a razão entre proteína e co-soluto seria mais relevante para avaliar a temperatura de desnaturação. Em função da elevada concentração de proteína utilizada, a solubilização das amostras foi difícil e as concentrações de co-soluto adicionado não puderam ser superiores às estudadas (30% de sacarose e FI de 0,39 M). Na Tabela 3.6 pode-se observar que estas concentrações eram proporcionalmente menores às utilizadas nas formulações dos planejamentos, considerando a concentração de CPS necessária.

As amostras das soluções com pesos variando de 10 a 15 mg foram colocadas em cápsulas herméticas com o auxílio de uma micropipeta, recravadas e novamente pesadas. O equipamento utilizado foi um TA-DSC-2920 (TA Instruments, EUA) com uma unidade de resfriamento mecânico acoplada.

Tabela 3.6: Razões entre a concentração de CPS e sacarose (CPS/Sac) ou força iônica (CPS/FI) da mistura KCl/NaCl utilizadas no planejamento fatorial completo e nos ensaios de calorimetria diferencial de varredura.

Razão entre concentração de CPS e co-soluto				
Sistema	Planejamentos fatoriais		Calorimetria diferencial de varredura	
	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
CPS/SAC	0,03	0,5	0,83	4,38
CPS/FI	5,5	61	64	119

Seguindo o procedimento de operação do equipamento, inicialmente promoveu-se o aquecimento (até 110°C equilibrado por 5 minutos e retornando a 30 °C), visando a eliminação da possível condensação de água no seu interior. O passo seguinte foi a calibração do DSC, realizada através das calibrações da linha base e da temperatura. Na calibração da linha base é realizado um procedimento que compreende a utilização da faixa

de temperatura do evento térmico em estudo (de 30 a 120°C) com a mesma taxa de aquecimento do experimento em questão (10°C/min), utilizando uma cápsula vazia como referência. A calibração de entalpia e temperatura foi feita usando Índio como referência (temperatura de fusão = 156,60°C e entalpia = 28,71 J/g).

O procedimento utilizado nos ensaios consistiu na variação da temperatura de 30 a 120°C, com uma rampa de aquecimento de 10°C/min, sendo que cada formulação foi analisada em triplicata. A temperatura de desnaturação do concentrado protéico do soro foi determinada na região em que se obteve a variação da linha base, ou seja, a aparição de um pico de fluxo de calor, que nesse caso foi endotérmico. A partir do encontro da linha base e a máxima tangente da curva de fluxo de calor, foram obtidas as temperaturas de desnaturação do CPS. A entalpia de desnaturação foi calculada pela integração da curva de fluxo de calor, no intervalo de temperaturas em que ocorreu o evento térmico.

3.2.2.5. Tratamento estatístico dos dados experimentais

Através da metodologia de planejamento fatorial foi possível avaliar os efeitos principais, de interação e quadráticos das variáveis independentes, sobre as respostas analisadas. No caso do planejamento fatorial fracionário só foi possível a avaliação dos efeitos principais, o que permitiu a escolha das variáveis significativas sobre as propriedades dos géis, para posterior realização dos planejamentos fatoriais completos. Trabalhou-se com um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) na avaliação dos efeitos dos planejamentos fatoriais fracionários e completos.

Foi utilizado o pacote Statística[®] (Statsoft, v. 5.0) nas análises dos efeitos significativos das variáveis independentes sobre as propriedades mecânicas (planejamentos fatoriais

fracionários e completos) e de capacidade de retenção de água (planejamentos fatoriais completos). Esse mesmo software foi utilizado para a estimativa dos parâmetros do modelo de Maxwell, ajustado aos dados de relaxação de tensões dos planejamentos estudados.

A partir da análise de variância (ANOVA), realizada nos planejamentos fatoriais completos, pode-se propor modelos probabilísticos adequados, que correlacionassem as respostas em função das variáveis estudadas, com a construção de superfícies de resposta. O seguinte modelo polinomial de segunda ordem foi usado na análise estatística:

$$\begin{aligned} Y = & b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \\ & + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2 + b_{55}X_5^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{15}X_1X_5 + \\ & b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{25}X_2X_5 + b_{35}X_3X_5 + b_{45}X_4X_5 \end{aligned} \quad (3.7)$$

onde:

Y – propriedades mecânicas (módulo de elasticidade, tensão ou deformação na ruptura), ou, parâmetros do modelo de Maxwell (módulos elástico ou viscoso), ou capacidade de retenção de água (% de separação de água)

sendo,

b_i - coeficientes da regressão;

X_1 – Concentração de caseinato de sódio (%p/p),

X_2 - Concentração de Concentrado Protéico do Soro (CPS) (%p/p),

X_3 - Concentração de Carragena (%p/p),

X_4 – Concentração de Sacarose (%p/p) ou força iônica (mM)

X_5 – Temperatura (°C) de mistura dos componentes.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram apresentados da seguinte maneira: em primeiro lugar, os planejamentos fatoriais fracionários (com e sem adição da sacarose) que possibilitaram a avaliação de quais variáveis exerceram efeitos significativos sobre as propriedades reológicas a baixas e altas deformações (relaxações de tensão e ruptura) dos géis lácteos acidificados. As variáveis estudadas foram as concentrações de caseinato de sódio, concentrado protéico do soro e carragena, bem como a velocidade de mistura, o tempo e a temperatura de tratamento térmico. Em segundo lugar, com a avaliação global dos efeitos apresentados pelas variáveis dos planejamentos fatoriais fracionários foi possível compor novos planejamentos completos, com reduzido número de variáveis. Nesta última etapa, além da adição de sacarose também foi estudada a variação da qualidade do solvente através da modificação da força iônica, manipulando a concentração e o tipo de sal adicionado (mistura KCl/NaCl). Nestes dois últimos planejamentos também foi estudada como resposta a capacidade de retenção de água e análise da microscopia eletrônica de varredura foi feita em alguns géis destes sistemas multicomponentes.

4.1. Planejamento fatorial fracionário

4.1.1 Ensaios de compressão uniaxial até a ruptura

Nas diferentes condições estabelecidas pelos planejamentos fracionários, foram obtidos géis com características diversas, podendo-se observar estruturas mais ou menos rígidas, dependendo da combinação dos diferentes níveis estudados. Dessa maneira, a avaliação das propriedades mecânicas permitiu quantificar essas diferenças, tendo sido analisados como resposta dos ensaios de compressão, a tensão e deformação na ruptura e o módulo de

elasticidade para cada formulação do planejamento fatorial fracionário. As respostas (tensão e deformação na ruptura e módulo de elasticidade) do planejamento fatorial $2^{(6-2)}$ sem adição de sacarose proposto nesse estudo, podem ser observadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Esquema codificado do planejamento fatorial fracionário $2^{(6-2)}$ e as respostas das análises de tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade dos sistemas-modelo sem adição de sacarose, obtidos em diferentes velocidades de compressão.

ensaio	Variáveis Independentes						Tensão na ruptura(kPa)				Deformação na ruptura(-)				Módulo de Elasticidade(kPa)			
							Velocidade (mm/s)				Velocidade (mm/s)				Velocidade (mm/s)			
	CAS	CPS	CAR	T	t	Vel	0,1	1,0	5,0	9,0	0,1	1,0	5,0	9,0	0,1	1,0	5,0	9,0
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	12,32	17,38	20,23	20,92	0,46	0,48	0,47	0,41	26,11	26,68	35,94	65,52
2	1	-1	-1	1	-1	1	20,72	33,41	33,69	38,95	0,41	0,46	0,48	0,50	57,15	73,34	88,63	89,25
3	-1	1	-1	1	1	-1	9,89	16,11	20,60	22,07	0,44	0,44	0,45	0,46	27,64	30,12	45,65	57,60
4	1	1	-1	-1	1	1	11,70	16,31	21,59	23,21	0,43	0,47	0,40	0,38	30,58	39,31	64,78	75,90
5	-1	-1	1	1	1	1	33,60	37,53	41,47	45,40	0,44	0,48	0,59	0,70	77,39	83,39	90,06	96,73
6	1	-1	1	-1	1	-1	9,38	14,26	19,52	20,79	0,37	0,38	0,41	0,43	31,53	45,03	56,16	56,63
7	-1	1	1	-1	-1	1	1,63	3,10	4,71	4,88	0,16	0,17	0,22	0,26	9,83	17,41	18,63	20,81
8	1	1	1	1	-1	-1	20,75	30,23	38,03	38,77	0,25	0,27	0,30	0,30	99,36	135,88	167,48	169,00
9	-1	-1	-1	-1	1	1	11,09	18,68	24,76	25,17	0,48	0,55	0,59	0,55	17,94	26,85	27,74	28,41
10	1	-1	-1	1	1	-1	15,12	22,95	29,22	32,21	0,38	0,38	0,38	0,40	48,68	70,31	89,83	100,60
11	-1	1	-1	1	-1	1	10,07	16,42	18,40	20,03	0,56	0,60	0,51	0,55	15,04	23,36	29,72	30,68
12	1	1	-1	-1	-1	-1	11,25	19,92	26,75	28,55	0,30	0,32	0,37	0,39	46,24	74,42	83,65	85,02
13	-1	-1	1	1	-1	-1	21,53	29,67	34,22	36,35	0,57	0,59	0,59	0,59	41,69	58,56	59,96	69,57
14	1	-1	1	-1	-1	1	18,65	25,09	34,69	36,88	0,29	0,41	0,34	0,36	88,14	70,21	122,06	123,70
15	-1	1	1	-1	1	-1	0,84	1,47	2,16	2,48	0,11	0,14	0,15	0,16	9,31	11,61	14,10	16,74
16	1	1	1	1	1	1	16,11	24,32	31,91	34,71	0,26	0,30	0,31	0,33	81,46	108,01	132,80	137,80
17	0	0	0	0	0	0	28,05	34,95	53,97	64,08	0,41	0,51	0,49	0,51	68,83	85,01	96,02	99,63
18	0	0	0	0	0	0	27,70	34,84	53,48	63,29	0,41	0,52	0,48	0,52	68,45	84,77	95,48	99,43
19	0	0	0	0	0	0	27,33	34,48	53,62	62,78	0,43	0,51	0,50	0,50	68,12	84,78	95,57	98,43
20	0	0	0	0	0	0	26,23	34,65	53,40	63,98	0,40	0,52	0,47	0,51	68,93	85,56	95,21	99,23

Nota-se uma clara tendência de aumento nos valores de tensão na ruptura e do módulo de elasticidade com o incremento da velocidade de compressão, comportamento característico de materiais viscoelásticos. NAKAMURA *et al.* (2001), THYBO *et al.* (2000) e RIBEIRO *et al.* (2004) que estudaram a influência da velocidade de compressão em géis de gelana, batata cozida e em géis ácidos de caseinato de sódio com carragena, respectivamente, observaram comportamento semelhante. O comportamento típico da variação da tensão e da deformação na ruptura dos géis lácteos ácidos com adição de carragena, em função da velocidade de compressão, pode ser visto na Figura 4.1. Em geral, os valores de deformação na ruptura parecem aumentar com a velocidade de compressão,

mas em alguns ensaios (1, 5 e 9) a deformabilidade diminuiu para as velocidades mais altas (Tabela 4.1).

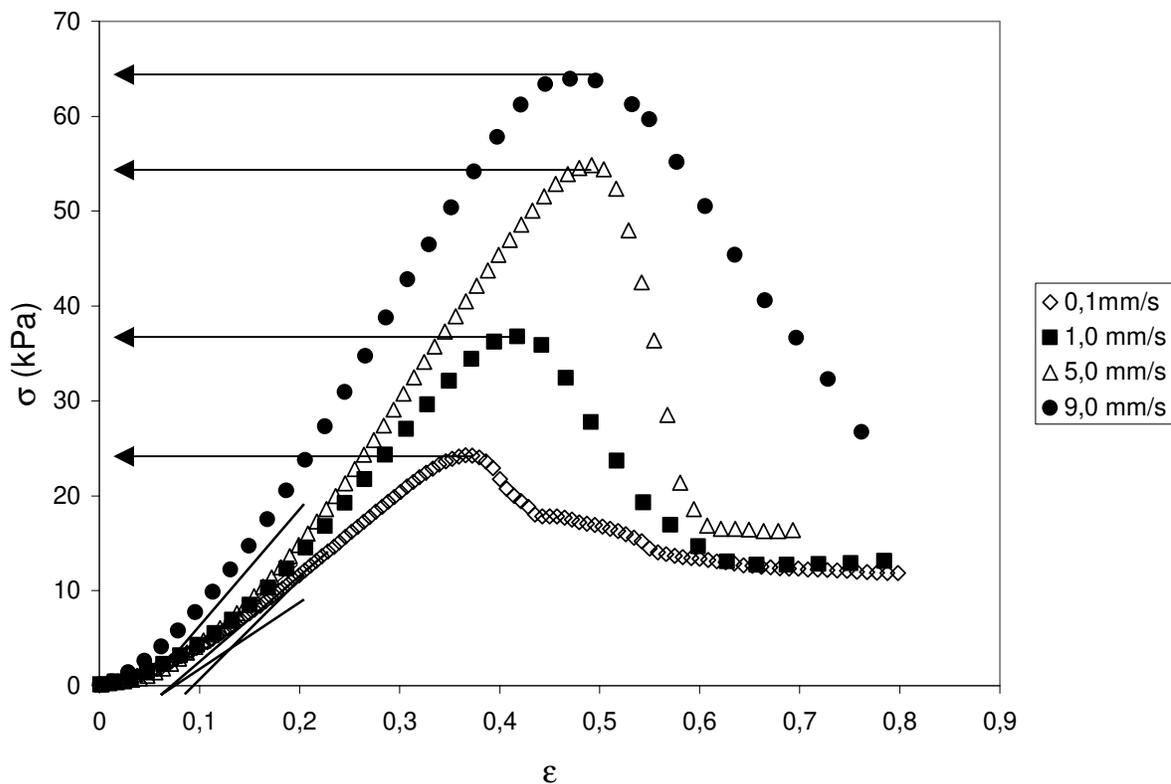


Figura 4.1.: Relação tensão - deformação típica a diferentes velocidades de compressão (0,1, 1,0, 5,0 e 9,0 mm/s) de géis sem adição de açúcar do planejamento fatorial $2^{(6-2)}$ fracionário. Ensaio 20.

Na Figura 4.2 pode-se observar os efeitos significativos das variáveis independentes sobre as propriedades mecânicas de géis sem adição de açúcar, obtidas a diferentes velocidades de compressão (0,1, 1,0, 5,0 e 9,0 mm/s). Todas as variáveis estudadas apresentaram efeitos significativos nas propriedades mecânicas, sendo que, em geral, estes efeitos mostraram valores mais elevados que os obtidos a velocidades de compressão mais altas. Em estudos com queijos ultra-filtrados do tipo Feta, Wium *et al* (1997) constataram que o módulo de elasticidade também aumentava com a velocidade de compressão.

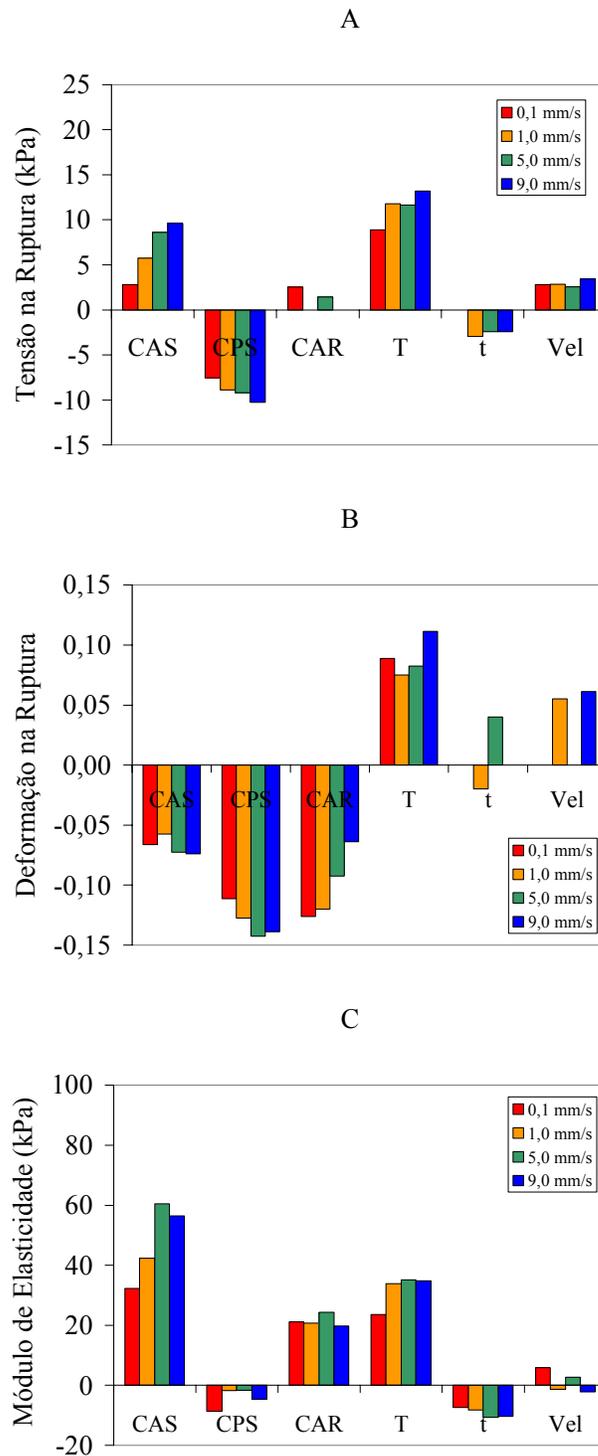


Figura 4.2: Efeitos significativos ($p < 0,05$) das variáveis independentes obtidos no planejamento fatorial fracionário sobre (A) tensão na ruptura, (B) deformação na ruptura e (C) módulo de elasticidade dos sistemas-modelo sem adição de sacarose nas velocidades de compressão de 0,1, 1,0, 5,0 e 9,0 mm/s. Onde Cas - concentração de caseinato de sódio, CPS - concentração de concentrado protéico de soro, Car- concentração de carragena, T - temperatura de mistura dos componentes, t – tempo de aquecimento da mistura e Vel – velocidade de agitação.

Nota-se que a variável significativa que exerceu o efeito mais pronunciado na tensão na ruptura foi a temperatura de mistura dos componentes (Figura 4.2A). Este efeito foi positivo tanto para esta propriedade mecânica como também para a deformação na ruptura e o módulo de elasticidade. As únicas variáveis com efeito negativo na tensão de ruptura e módulo de elasticidade foram o concentrado protéico do soro (CPS) e o tempo de aquecimento da mistura, ou seja, o aumento destas variáveis levou a uma diminuição da dureza e firmeza dos géis.

Na Figura 4.2B verifica-se que, todas as variáveis foram significativas para a deformação na ruptura, porém, o efeito do tempo de aquecimento foi fortemente dependente da velocidade de compressão. A variável de maior contribuição (negativa) foi o CPS, sendo que também foi observado que a maior parte das variáveis contribuiu para a diminuição da deformabilidade do gel formado, com exceção da velocidade de agitação, que atuou de maneira a tornar a rede mais elástica. Quanto ao módulo de elasticidade (Figura 4.2C) a tendência dos efeitos foi similar à tensão na ruptura, porém a magnitude dos efeitos foi menor para o CPS e maior para o caseinato de sódio e para a carragena. É interessante observar que as variáveis que exerceram menor influência sobre as propriedades mecânicas foram o tempo de aquecimento da mistura e a velocidade de agitação, enquanto as demais variáveis estudadas foram bastante relevantes para a força e elasticidade da rede formada.

As respostas obtidas com o planejamento fatorial fracionário dos géis formados com sacarose para tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade são apresentadas na Tabela 4.2, onde se podem observar as mesmas tendências mostradas no planejamento sem adição de sacarose, com relação à velocidade de compressão.

Em geral, os valores das propriedades mecânicas foram superiores nos géis com

sacarose em comparação com os sem açúcar, tal como pode ser observado nos valores do ponto central (ensaios 17-20). Como o módulo de elasticidade, a tensão e a deformação na ruptura são propriedades mecânicas associadas à firmeza, dureza e deformabilidade, respectivamente, a adição de sacarose levou a géis mais firmes, duros e deformáveis que os géis acidificados sem açúcar.

Tabela 4.2: Esquema codificado do planejamento fatorial fracionário $2^{(7-3)}$ e as respostas obtidas nas análises de tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade dos sistemas-modelo com adição de sacarose, obtidos em diferentes velocidades de compressão.

ensaio	Variáveis Independentes						Tensão na ruptura(kPa)				Deformação na ruptura(-)				Módulo de Elasticidade(kPa)			
							Velocidade (mm/s)				Velocidade (mm/s)				Velocidade (mm/s)			
	CAS	CPS	CAR	T	t	Vel	0,1	1,0	5,0	9,0	0,1	1,0	5,0	9,0	0,1	1,0	5,0	9,0
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	13,02	14,32	15,89	17,28	0,40	0,42	0,44	0,46	28,90	39,90	53,97	55,54
2	1	-1	-1	1	-1	1	9,07	13,25	16,94	19,20	0,36	0,36	0,37	0,37	31,37	45,38	60,77	63,60
3	-1	1	-1	1	1	-1	4,44	6,20	8,35	8,57	0,23	0,24	0,24	0,25	22,42	30,39	42,76	43,83
4	1	1	-1	-1	1	1	13,70	21,27	29,15	29,44	0,33	0,38	0,39	0,43	48,69	63,13	75,52	90,91
5	-1	-1	1	1	1	1	5,53	6,49	8,12	21,52	0,37	0,46	0,47	0,49	12,67	24,73	34,51	81,33
6	1	-1	1	-1	1	-1	19,40	30,93	43,50	53,72	0,34	0,37	0,43	0,42	69,73	107,80	126,30	155,30
7	-1	1	1	-1	-1	1	0,75	0,95	1,64	1,67	0,13	0,15	0,19	0,19	6,12	7,18	10,65	10,85
8	1	1	1	1	-1	-1	16,99	26,11	33,54	34,35	0,34	0,35	0,37	0,39	70,80	104,50	126,40	127,90
9	-1	-1	-1	-1	1	1	9,30	14,10	14,76	18,20	0,43	0,48	0,49	0,51	26,54	37,79	46,63	52,39
10	1	-1	-1	1	1	-1	16,72	23,45	26,92	30,29	0,40	0,39	0,40	0,39	55,02	76,50	85,31	101,20
11	-1	1	-1	1	-1	1	8,41	11,91	11,28	13,54	0,61	0,54	0,58	0,46	19,41	29,36	31,44	40,80
12	1	1	-1	-1	-1	-1	8,23	11,65	15,69	18,47	0,35	0,35	0,35	0,38	18,33	39,88	52,96	59,37
13	-1	-1	1	1	-1	-1	25,86	27,21	30,66	36,17	0,52	0,52	0,53	0,53	64,04	65,62	72,46	79,47
14	1	-1	1	-1	-1	1	29,49	44,48	55,94	61,91	0,33	0,36	0,37	0,37	108,10	154,10	192,0	211,90
15	-1	1	1	-1	1	-1	1,79	2,63	3,35	3,51	0,17	0,19	0,22	0,23	11,69	15,12	16,80	19,63
16	1	1	1	1	1	1	18,63	28,72	41,69	52,41	0,23	0,26	0,30	0,31	103,40	142,50	192,00	253,70
17	0	0	0	0	0	0	32,66	54,80	71,91	79,36	0,43	0,53	0,56	0,58	96,59	135,00	153,70	173,00
18	0	0	0	0	0	0	33,67	55,24	72,35	80,33	0,44	0,53	0,55	0,59	96,15	133,40	163,30	175,70
19	0	0	0	0	0	0	32,95	54,00	72,07	79,70	0,44	0,53	0,56	0,58	95,75	134,20	148,00	174,50
20	0	0	0	0	0	0	32,52	54,86	72,28	80,03	0,44	0,53	0,55	0,59	96,51	135,10	171,10	175,70

Na Figura 4.3 são apresentados os efeitos significativos das variáveis independentes sobre as propriedades mecânicas dos sistemas com adição de sacarose. A variável que exerceu o efeito mais pronunciado na tensão de ruptura (Figura 4.3A) foi o caseinato de sódio seguido das seguintes variáveis: carragena, CPS e sacarose. A velocidade de agitação, o tempo e temperatura de mistura dos componentes apresentaram pequeno efeito significativo na tensão de ruptura dos géis lácteos adoçados. Os fortes aumento e diminuição dos efeitos significativos da carragena e da temperatura de mistura dos

componentes, respectivamente, foram a maior diferença entre os géis com e sem adição de sacarose. O aumento da dureza promovido pela carragena na presença da sacarose pode ser atribuído à capacidade do açúcar de formar pontes de hidrogênio, aumentando o número e a estabilização das zonas de junção do polissacarídeo (RIBEIRO, *et al.* 2004). Por outro lado, a presença da sacarose leva ao aumento da temperatura de desnaturação da proteína (KULMYRZAEV *et al.*, 2000), podendo explicar a diminuição do efeito significativo desta variável independente na tensão de ruptura dos géis com açúcar.

Com relação à deformação na ruptura (Figura 4.3B), todas as variáveis exerceram efeito significativo sobre esta propriedade mecânica, sendo que os tempos de mistura, as concentrações de caseinato de sódio, carragena e CPS contribuíram negativamente a esta propriedade, porém o CPS foi a variável que exerceu a maior influência. Por outro lado, a presença de sacarose fez com que a temperatura de mistura apresentasse efeito positivo na deformabilidade de géis lácteos mistos. No caso do módulo de elasticidade (Figura 4.3C), as variáveis que exerceram maiores efeitos significativos foram as concentrações de caseinato de sódio, CPS, carragena e sacarose, mostrando comportamento similar à tensão na ruptura. Entre estas variáveis significativas, somente o CPS mostrou efeito negativo, sendo que as demais variáveis contribuíram no aumento da firmeza do gel, principalmente a concentração de caseinato de sódio.

Nota-se que, de maneira geral, as variáveis que exerceram efeitos significativos e sua ordem de importância sobre a tensão na ruptura foram similares nos dois planejamentos fatoriais, porém, a magnitude dos efeitos foi fortemente afetada. O efeito apresentado pelo caseinato de sódio nos sistemas-modelo com sacarose foi de aproximadamente três vezes o valor do efeito nos sistemas sem sacarose. De maneira similar ao caseinato, o efeito da carragena sobre a dureza do gel dobrou nos sistemas com sacarose.

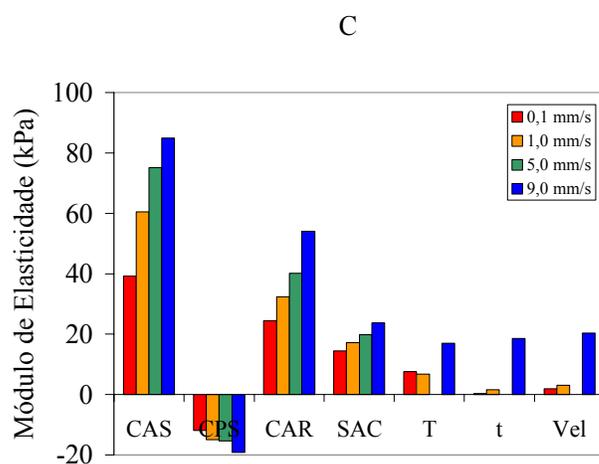
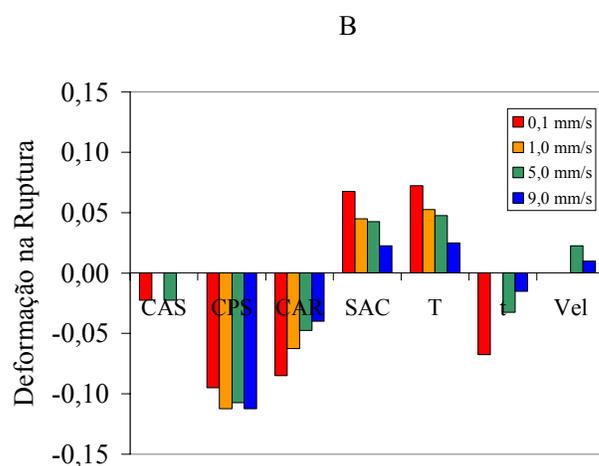
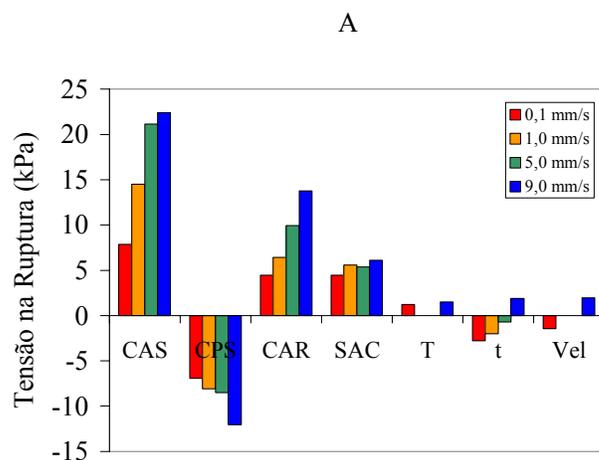


Figura 4.3: Efeitos significativos ($p < 0,05$) obtidos no planejamento fatorial fracionário sobre a (A) tensão na ruptura, (B) deformação na ruptura e (C) módulo de elasticidade dos sistemas-modelo com adição de sacarose nas velocidades de compressão de 0,1, 1,0, 5,0 e 9,0 mm/s. Onde Cas - concentração de caseinato de sódio, CPS - concentração de concentrado protéico de soro, Car - concentração de carragena, Sac - concentração de sacarose, T - temperatura de mistura dos componentes, t - tempo de aquecimento da mistura e Vel - velocidade de agitação.

Este resultado indica que a presença do açúcar pode estar modificando as interações proteína-polissacarídeo ou poderia estar atuando na estabilização da proteína, em termos de mudanças na conformação, estado de agregação e interação proteína-solvente (ARAKAWA & TIMMASHEFF, 1982). DICKINSON & MERINO (2002) verificaram que com adição de açúcar, os géis de caseinato de sódio mostravam uma distribuição mais homogênea do material protéico ao longo da cadeia do polissacarídeo e eram também mais fortes, provavelmente devido à ligação preferencial entre a água e a sacarose, o que levou a um aumento das interações proteína-proteína.

Com relação ao CPS, este apresentou efeito negativo na dureza do gel nos dois planejamentos estudados (com e sem adição de sacarose), porém nota-se, em geral, que com a adição de sacarose esse efeito decresceu ligeiramente quando comparado com os sistemas-modelo sem adição de açúcar. Essa característica apresentada nos dois planejamentos fatoriais pode estar relacionada à presença de lactose (6,7% de lactose no CPS), que eleva a temperatura de desnaturação da β -Lg (SPIEGEL, 1999), diminuindo a efetividade do tratamento térmico. Uma outra possível explicação para o efeito negativo da concentração de CPS sobre as propriedades mecânicas de géis lácteos, seria a reduzida interação da carragena com as proteínas do concentrado protéico do soro (TZIBOULA & HORME, 1999) ou ainda a exclusão destas proteínas da rede elástica em função da forte interação preferencial entre o caseinato de sódio e este polissacarídeo.

De forma contrária aos estudos de tensão na ruptura, a concentração de caseinato de sódio foi uma das variáveis que exerceu menor influência na deformação na ruptura dos géis e nesse caso o efeito apresentado foi negativo. Além disso, com a adição de sacarose o efeito da concentração de proteína foi ainda menor. HEMAR *et al.* (2002), trabalhando com

o sistema proteínas do leite/carragena, constatou que a deformação na ruptura foi independente do tipo ou concentração da proteína, diferente do que ocorreu neste trabalho, pois o aumento da concentração e o tipo de proteína mostraram efeitos significativos sobre esta propriedade, ainda que no caso do caseinato o efeito fosse de menor magnitude. Aparentemente, a diminuição do efeito negativo dos biopolímeros na deformabilidade dos géis formados está associada à ação da sacarose no favorecimento das interações macromoleculares. MLEKO (1997) estudou as propriedades reológicas de sobremesas preparadas com proteínas do leite e carragena, sendo que a adição de 10-15% de sacarose diminuiu a habilidade gelificante das proteínas do soro. Porém, neste trabalho, a sacarose colaborou positivamente em todas as propriedades mecânicas dos géis formados, mostrando que a complexidade das interações entre os ingredientes é que determina o comportamento final do sistema.

A adição de sacarose também aumentou significativamente os efeitos principais das variáveis independentes sobre os valores do módulo de elasticidade, quando comparados aos géis sem açúcar. Essa tendência de aumento foi mantida nas diferentes velocidades de compressão estudadas, nota-se, por exemplo, que para o caseinato de sódio a diferença dos géis sem e com sacarose chegou a 37% a 9 mm/s e para a carragena foi de 175%, nessa mesma velocidade. Com relação ao CPS, a adição de sacarose no meio também potencializou o efeito negativo sobre o módulo de elasticidade, como havia sido observado para a tensão e deformação na ruptura. Um fato que chamou a atenção foi de que em todas as propriedades avaliadas (tensão e deformação na ruptura e módulo de elasticidade), quando se adicionou a sacarose o efeito da temperatura de mistura diminuiu, podendo isto estar associado a um deslocamento da temperatura de desnaturação das proteínas do soro, tal como descrito anteriormente sobre a presença da lactose.

4.1.2. Ensaios de relaxação de tensões

Em paralelo aos ensaios de ruptura, os géis também foram submetidos a medidas de relaxação de tensões, visando complementar o entendimento da relação reologia-estrutura dos sistemas-modelo. Na análise de relaxação de tensões, o material relaxa depois de submetido a uma deformação instantânea, sendo então medida a variação de força com o tempo, tendo como requisito que esta análise seja realizada dentro do intervalo de viscoelasticidade linear, para o ajuste de determinados modelos mecânicos. Como a deformação é constante, através do decaimento da força pelo tempo e do valor de tensão no equilíbrio, é possível encontrar uma relação com a estrutura do material. Na Figura 4.4 pode-se visualizar o comportamento característico dos géis obtidos com e sem sacarose, representado pela relação entre a força temporal e a força inicial (F/F_0). As curvas exemplificadas são referentes a ensaios no ponto central dos planejamentos fatoriais fracionários com e sem sacarose.

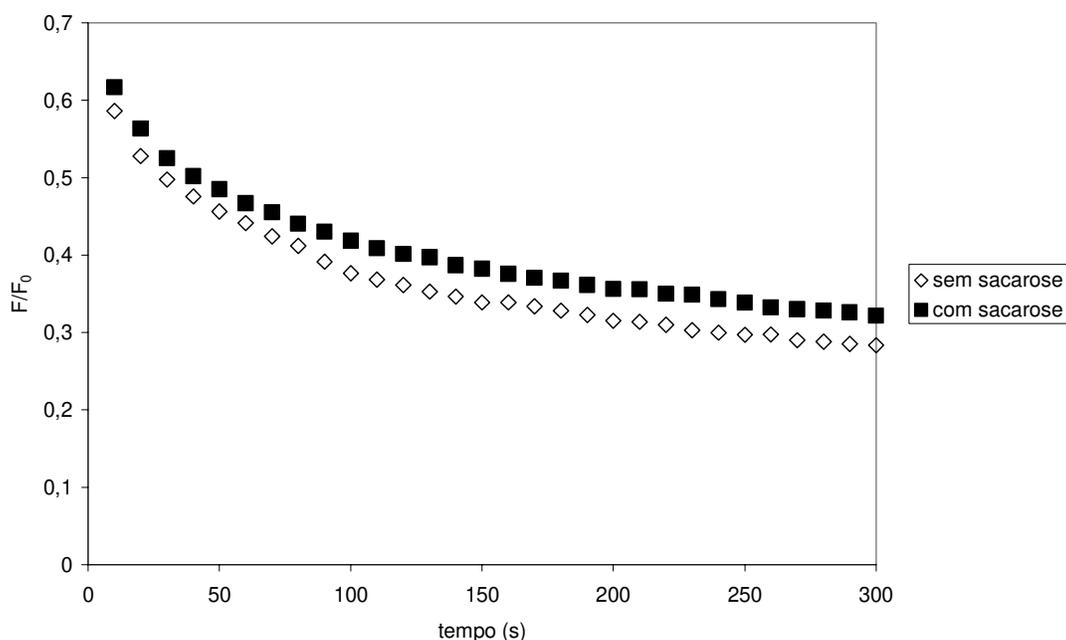


Figura 4.4: Curvas de relaxação de tensões, obtidas no ensaio 19 dos planejamentos fatoriais fracionários com e sem adição de sacarose.

Na Figura 4.4 pode-se observar a diferença nas respostas dos sistemas estudados, sendo que a força detectada em elevados valores de tempo mostram que, sem a sacarose, a força era menor e, portanto mais frágil e menos estruturado era o gel. No entanto, para a obtenção de uma análise mais profunda dos dados obtidos, estes foram ajustados ao modelo de Maxwell generalizado para determinação dos parâmetros viscoelásticos. Foram utilizados apenas dois elementos (Equação 3.4) dos i elementos que compõem este modelo, pois o aumento de elementos praticamente não alterou as respostas determinadas. Portanto, a partir desses ajustes pôde-se calcular os módulos elásticos (equação 3.6) e os viscosos (equação 3.6) dos géis que foram utilizados como respostas do planejamento fatorial fracionário, e que podem ser visualizados nas Tabelas 4.3 e 4.4. Os valores dos efeitos obtidos com seus respectivos p sobre os módulos elásticos (E_i) e viscosos (η_i), encontram-se na Tabela 4.5 para os géis sem adição de sacarose e na Tabela 4.6 para os sistemas com adição de açúcar.

Nestas tabelas foram apresentados todos os efeitos obtidos nos planejamentos fatoriais fracionários, em que foi possível, através do tratamento estatístico, constatar certas tendências quanto às variáveis significativas ($p < 0,05$) em ambos os planejamentos. Sem adição de sacarose, a concentração de caseinato de sódio, a de carragena e a temperatura de mistura dos componentes foram as únicas variáveis a apresentar efeitos significativos e positivos sobre os módulos elásticos. As demais variáveis foram negativas, porém não estatisticamente significativas a 95% de confiança.

Tabela 4.3: Esquema codificado do planejamento fatorial fracionário²⁽⁶⁻²⁾ sem sacarose e as respostas do modelo de Maxwell obtidas pelo ajuste das curvas de relaxação de tensões dos sistemas-modelo.

	CAS	CPS	CAR	T	t	Vel	E _∞ (kPa)	E ₁ (kPa)	E ₂ (kPa)	η ₁ (kPa.s)	η ₂ (kPa.s)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	6,74	6,34	6,49	598,89	26,51
2	1	-1	-1	1	-1	1	14,93	16,64	20,06	1399,50	81,73
3	-1	1	-1	1	1	-1	7,28	6,31	5,48	588,24	25,80
4	1	1	-1	-1	1	1	5,47	10,94	12,01	983,73	44,73
5	-1	-1	1	1	1	1	31,30	24,12	22,74	2657,40	90,95
6	1	-1	1	-1	1	-1	10,85	8,94	9,19	783,40	40,54
7	-1	1	1	-1	-1	1	8,61	6,40	5,29	661,64	25,12
8	1	1	1	1	-1	-1	43,47	40,58	54,31	3595,30	201,45
9	-1	-1	-1	-1	1	1	6,18	5,96	4,68	680,76	25,06
10	1	-1	-1	1	1	-1	17,62	21,54	26,00	1859,50	101,03
11	-1	1	-1	1	-1	1	4,71	4,64	3,42	519,69	16,39
12	1	1	-1	-1	-1	-1	14,86	18,08	24,74	1524,70	80,92
13	-1	-1	1	1	-1	-1	15,44	14,48	10,06	1430,90	42,21
14	1	-1	1	-1	-1	1	16,50	22,60	29,95	1687,20	117,18
15	-1	1	1	-1	1	-1	7,85	7,80	6,19	910,41	32,04
16	1	1	1	1	1	1	23,38	25,11	32,55	1251,60	58,29
17	0	0	0	0	0	0	12,90	14,54	11,26	1659,80	61,16
18	0	0	0	0	0	0	13,39	14,51	12,27	1510,70	60,68
19	0	0	0	0	0	0	13,22	14,65	11,78	1654,90	60,34
20	0	0	0	0	0	0	13,30	14,71	11,90	1501,00	62,64

Tabela 4.4: Esquema codificado do planejamento fatorial fracionário²⁽⁷⁻³⁾ com sacarose e as respostas do modelo de Maxwell obtidas pelo ajuste das curvas relaxação de tensões dos sistemas-modelo.

	CAS	CPS	CAR	T	CAS	t	Vel	E _∞ (kPa)	E ₁ (kPa)	E ₂ (kPa)	η ₁ (kPa.s)	η ₂ (kPa.s)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,32	8,59	6,15	1143,99	30,65
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1	26,08	21,61	30,55	2231,77	115,47
3	-1	1	-1	-1	1	1	-1	7,68	8,02	6,89	1031,31	36,05
4	1	1	-1	-1	-1	1	1	17,12	15,58	18,65	1946,66	103,20
5	-1	-1	1	-1	1	1	1	20,31	13,57	27,04	378,78	52,29
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	31,80	20,31	43,29	2056,84	99,24
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	7,98	8,82	7,14	970,75	29,07
8	1	1	1	-1	1	-1	-1	52,51	44,82	60,20	3953,39	266,43
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	7,99	7,08	4,94	793,73	22,03
10	1	-1	-1	1	1	1	-1	18,40	22,52	31,82	1947,62	112,30
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	4,45	4,75	4,25	542,15	24,08
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	26,24	22,85	29,63	1940,40	100,15
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1	8,81	10,47	7,15	1042,07	22,82
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	32,57	28,61	36,53	2171,23	103,97
15	-1	1	1	1	-1	1	-1	8,78	8,64	6,27	1017,03	25,84
16	1	1	1	1	1	1	1	45,05	39,42	50,67	3186,22	182,53
17	0	0	0	0	0	0	0	11,97	11,92	12,03	1337,12	62,57
18	0	0	0	0	0	0	0	12,03	12,10	11,96	1350,39	62,48
19	0	0	0	0	0	0	0	13,05	13,00	13,11	1448,45	67,79
20	0	0	0	0	0	0	0	12,03	12,27	11,79	1398,80	54,71

Quando se adicionou sacarose no sistema, comportamento semelhante foi obtido na análise dos efeitos sobre os parâmetros de Maxwell, como pode ser observado na Tabela

4.6. Os valores determinados para o efeito principal com adição de sacarose foram maiores, quando comparados aos sem sacarose. Com relação aos efeitos das concentrações dos biopolímeros, pode-se verificar que com a adição do açúcar estes foram maiores, porém o efeito da concentração de caseinato de sódio foi mais pronunciado que o da concentração de carragena.

Tabela 4.5: Efeitos obtidos nos ensaios de relaxação de tensões, para géis sem adição de sacarose, utilizando o planejamento fatorial fracionário.

Efeitos / Parâmetros de Maxwell	Principal	CAS	CPS	CAR	T	t	Vel
E_{∞} (kPa)	14,40	7,37	-0,49	9,95	10,14	-1,92	-1,63
p	$4,11 \cdot 10^{-7}$	$5,28 \cdot 10^{-2}$	$8,89 \cdot 10^{-1}$	$1,30 \cdot 10^{-2}$	$1,17 \cdot 10^{-2}$	$5,89 \cdot 10^{-1}$	$6,46 \cdot 10^{-1}$
E_1 (kPa)	14,94	11,05	-0,09	7,45	8,29	-2,38	-0,96
p	$4,6 \cdot 10^{-8}$	$2,60 \cdot 10^{-3}$	$9,75 \cdot 10^{-1}$	$2,64 \cdot 10^{-2}$	$1,54 \cdot 10^{-2}$	$4,39 \cdot 10^{-1}$	$7,52 \cdot 10^{-1}$
E_2 (kPa)	16,02	18,06	1,85	8,43	9,51	-4,43	-1,47
p	$1,69 \cdot 10^{-6}$	$1,17 \cdot 10^{-3}$	$6,79 \cdot 10^{-1}$	$7,56 \cdot 10^{-2}$	$4,83 \cdot 10^{-2}$	$3,28 \cdot 10^{-1}$	$7,41 \cdot 10^{-1}$
η_1 (kPa.s)	1373,00	629,65	-132,82	602,87	683,96	-212,86	-181,21
p	$3,54 \cdot 10^{-7}$	$7,52 \cdot 10^{-2}$	$6,90 \cdot 10^{-1}$	$8,69 \cdot 10^{-2}$	$5,57 \cdot 10^{-2}$	$5,25 \cdot 10^{-1}$	$5,87 \cdot 10^{-1}$
η_2 (kPa.s)	62,74	55,22	-5,06	25,70	28,22	-21,64	-11,38
p	$1,31 \cdot 10^{-6}$	$5,69 \cdot 10^{-3}$	$7,67 \cdot 10^{-1}$	$1,48 \cdot 10^{-1}$	$1,15 \cdot 10^{-1}$	$2,18 \cdot 10^{-1}$	$5,08 \cdot 10^{-1}$

Tabela 4.6: Efeitos obtidos nos ensaios de relaxação de tensões para os géis com adição de sacarose utilizando o planejamento fatorial fracionário.

Efeitos / Parâmetros de Maxwell	Principal	CAS	CPS	CAR	SAC	T	t	Vel
E_{∞} (kPa)	18,66	21,93	1,94	11,44	-2,44	5,31	-1,23	-0,13
p	$1,81 \cdot 10^{-7}$	$1,17 \cdot 10^{-4}$	$6,29 \cdot 10^{-1}$	$1,28 \cdot 10^{-2}$	$5,45 \cdot 10^{-1}$	$2,00 \cdot 10^{-2}$	$7,59 \cdot 10^{-1}$	$9,75 \cdot 10^{-1}$
E_1 (kPa)	16,75	18,22	2,52	7,96	0,38	5,59	-1,92	-0,85
p	$3,37 \cdot 10^{-8}$	$5,93 \cdot 10^{-5}$	$4,21 \cdot 10^{-1}$	$2,18 \cdot 10^{-2}$	$9,02 \cdot 10^{-1}$	$8,93 \cdot 10^{-2}$	$5,37 \cdot 10^{-1}$	$7,84 \cdot 10^{-1}$
E_2 (kPa)	21,00	28,94	-0,47	13,18	-3,58	8,24	1,00	-1,45
p	$2,19 \cdot 10^{-7}$	$3,18 \cdot 10^{-5}$	$9,18 \cdot 10^{-1}$	$1,25 \cdot 10^{-2}$	$4,41 \cdot 10^{-1}$	$9,12 \cdot 10^{-2}$	$8,28 \cdot 10^{-1}$	$7,52 \cdot 10^{-1}$
η_1 (kPa.s)	1594,43	1564,29	352,73	399,83	-134,13	284,08	-204,69	-238,92
p	$3,50 \cdot 10^{-9}$	$2,39 \cdot 10^{-5}$	$1,60 \cdot 10^{-1}$	$1,15 \cdot 10^{-2}$	$5,80 \cdot 10^{-1}$	$2,51 \cdot 10^{-2}$	$4,02 \cdot 10^{-1}$	$3,30 \cdot 10^{-1}$
η_2 (kPa.s)	78,68	105,06	26,07	29,78	-17,34	37,23	-7,39	-7,60
p	$2,25 \cdot 10^{-7}$	$4,36 \cdot 10^{-5}$	$1,48 \cdot 10^{-1}$	$1,03 \cdot 10^{-2}$	$3,24 \cdot 10^{-1}$	$4,74 \cdot 10^{-2}$	$6,69 \cdot 10^{-1}$	$6,60 \cdot 10^{-1}$

Fato oposto ocorreu com a temperatura de mistura no sistema de biopolímeros, pois este efeito diminuiu com a adição da sacarose. Esse resultado pode estar associado à estabilização do CPS à desnaturação (KULMYRZAEV, *et al.*, 2000) como observado para as demais propriedades mecânicas.

O aumento do módulo elástico implica em aumento da elasticidade do gel (BERTOLA *et al.*, 1991), mostrando que a adição da sacarose favoreceu este comportamento. O módulo viscoso médio também aumentou com adição de sacarose, além da presença desta também majorar os demais efeitos significativos. A rigidez de géis de caseinato acidificados pode aumentar substancialmente na presença de açúcares, principalmente a elevadas razões açúcar/proteína, devido ao aumento da força de interação proteína-proteína (DICKINSON & MERINO, 2002). Vale ressaltar que os valores obtidos para os parâmetros ajustados estão na mesma ordem de grandeza dos determinados para queijos, em estudo feito por Bertola *et al.* (1991).

Com o uso do planejamento fatorial fracionário, foi possível avaliar as variáveis que exerceram efeitos significativos ($p < 0,05$) no comportamento reológico a altas e baixas deformações desse sistema complexo, permitindo determinar as variáveis para compor o planejamento fatorial completo. Em ambos os casos (com e sem sacarose) na análise de relaxação de tensões, as variáveis que mostraram efeito significativo foram o caseinato de sódio, a carragena e a temperatura de mistura para a maioria dos parâmetros avaliados. No entanto, pode-se observar que a concentração de CPS e de sacarose foram determinantes nas propriedades do gel na ruptura.

Portanto, a partir dos resultados obtidos escolheu-se estudar os efeitos das concentrações de caseinato de sódio, CPS, carragena e sacarose, bem como a temperatura de mistura dos componentes sobre as propriedades reológicas e de retenção de água,

utilizando um planejamento fatorial completo. Além da adição de açúcar nestes sistemas, a alteração da força iônica do meio também foi estudada, com o intuito de comparar géis doces e salgados. Adicionalmente foi feito um estudo do efeito da adição de açúcar ou mistura salina KCl/NaCl sobre a temperatura de desnaturação das proteínas do soro. Este estudo será apresentado antes do estudo das propriedades dos géis ácidos.

4.2. Análise Calorimétrica

Com as tendências mostradas no planejamento fatorial fracionário, um estudo complementar do concentrado protéico do soro (CPS) foi realizado, utilizando a calorimetria diferencial de varredura, visto que este ingrediente tem recebido considerável atenção devido a seu excelente valor nutricional e vasta funcionalidade, e que na gelificação das proteínas globulares, a desnaturação térmica é de grande importância (TOLSTOGUZOV, 1991). As estruturas dos géis de proteínas são mantidas por interações moleculares do tipo hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e dissulfeto, e também devido à interação Coulombiana dos grupamentos iônicos das proteínas. A eficácia de tais interações dependerá fortemente das condições do meio. Além disso, a presença de co-solutos como açúcar (ou sal), amplamente utilizados na indústria de alimentos, afeta na desnaturação e propriedades funcionais das proteínas globulares (YAMUL & LUPANO, 2003). Muitos atributos funcionais das proteínas podem ser manipulados pela adição de solutos de baixo peso molecular no sistema e que afetam a termoestabilidade das moléculas de proteína, a sua capacidade de agregação e conseqüentemente a formação da estrutura tridimensional do gel (DAMODARAN & KINSELLA, 1982; BAIER & MCCLEMENTS, 2006). Esses co-solutos que atuam na estabilidade térmica das proteínas também são conhecidos como “*osmolytes*”

quando estabilizam a proteína como é o caso da sacarose (“*osmolytes*“ estabilizante) ou como “*osmolytes*” desnaturantes, como da adição de sal (BAIER & MCCLEMENTS, 2006).

Sob o ponto de vista fundamental, a compreensão das interações entre co-solutos e proteínas pode permitir o conhecimento da termoresistência dos géis protéicos ampliando as possíveis aplicações tecnológicas da matriz. Com ênfase principal no aspecto tecnológico, foram investigados os efeitos de co-solutos sobre a estabilidade térmica das proteínas majoritárias no soro de leite, ou seja α -lactoalbumina (α -La) e β -lactoglobulina (β -Lg). Nas Figuras 4.5 e 4.6 são apresentados termogramas obtidos com o concentrado protéico do soro (25% p/p) sem soluto, na presença de sacarose e de misturas salinas, nas mesmas concentrações utilizadas nos planejamentos fatoriais completos. De acordo com a literatura, mistura α -La/ β -Lg apresenta dois picos de temperatura de desnaturação (T_d) a 37,5°C (correspondente a desnaturação da α -lactoalbumina) e 69,1°C (relacionada à β -lactoglobulina) (BOYLE & ALLI, 2000).

De maneira similar, pode-se observar que nas situações apresentadas (sem soluto) aparece um pico endotérmico na região entre 70 e 80°C que, provavelmente, é referente à desnaturação da β -Lg. Na região próxima a 40 °C, que, corresponderia à temperatura de desnaturação da α -La, não foi detectado um evento térmico evidente, além do fato de que nesse sistema apresentar ocasionando aumento na temperatura de desnaturação. É provável que a não detecção desta transição esteja relacionada à baixa concentração de α -lactoalbumina, uma vez que representa somente 20% da proteína do soro do leite (FOX, 1989) Deve ser enfatizado que a concentração de proteína de soro usada foi de 25 %, pois acima deste valor a solubilidade era parcial e, sendo assim, a concentração absoluta de α -La correspondia à cerca de 5 % da solução.

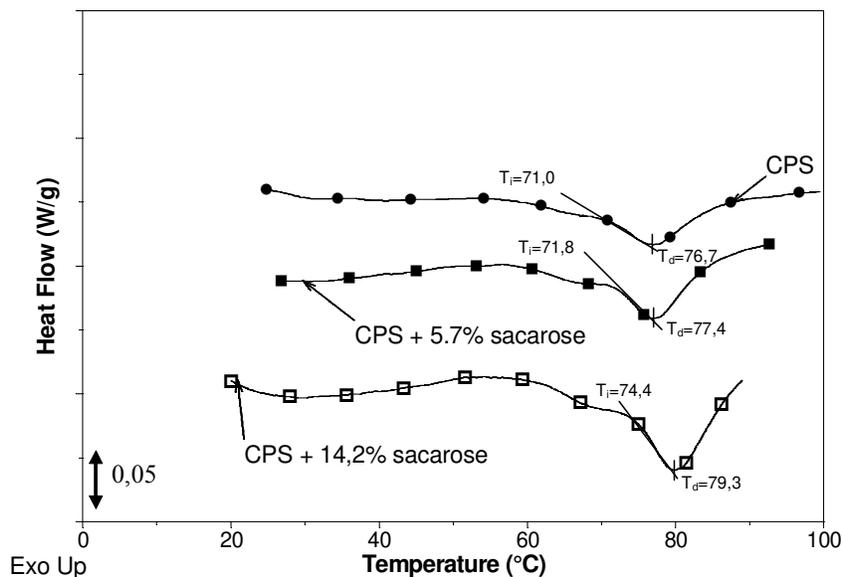


Figura 4.5: Termograma do concentrado protéico do soro e deste com adição de diferentes concentrações de sacarose. T_i temperatura no início do pico e T_d temperatura no pico de desnaturação do CPS

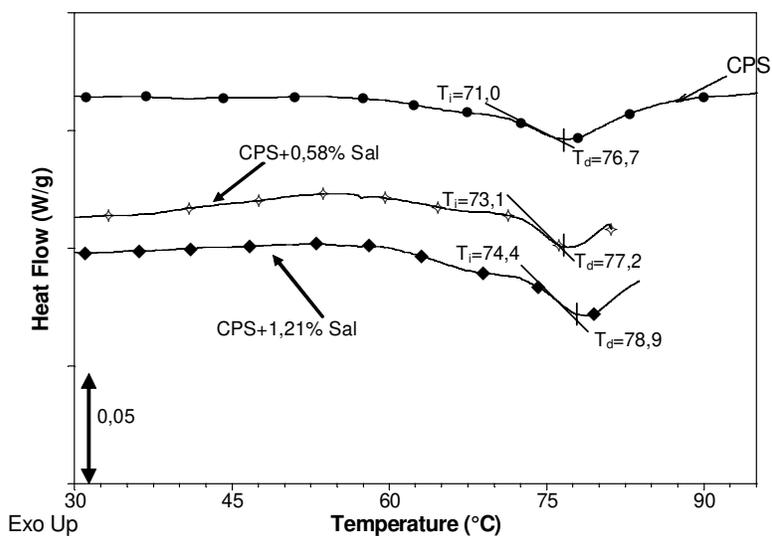


Figura 4.6: Termograma do concentrado protéico do soro e deste com adição de diferentes concentrações da mistura salina KCl/NaCl (0,58 e 1,21% correspondentes a forças iônicas de 0,21 e 0,31M, respectivamente). T_i temperatura no início do pico e T_d temperatura no pico de desnaturação do CPS

No nosso trabalho, o valor obtido para a temperatura de desnaturação do concentrado protéico do soro sem soluto foi de 76,7°C, que é superior ao detectado por Boyle & Alli, (2000)., O CPS utilizado no nosso estudo foi comercial e apresentava em sua composição 6,7% de lactose, a presença desse componente provavelmente fez com que a temperatura de desnaturação do material fosse superior ao determinado por Boyle & Alli, (2000), que trabalharam na ausência de açúcares. Estes autores ao adicionar lactose (40% p/v) à solução, observaram que o valor da temperatura de desnaturação da β -lactoglobulina também foi maior (73,4°C).

Nota-se ainda nas Figuras 4.5 e 4.6 que com a adição de soluto ocorreu um deslocamento nos valores obtidos na temperatura de desnaturação. Na presença de sacarose, as temperaturas de desnaturação aumentaram, sendo que para as concentrações de sacarose de 5,7 e 14,2 % os valores obtidos foram 77,4 e 79,3 °C, respectivamente. No caso da mistura KCl/NaCl, as temperaturas de desnaturação também aumentaram, passando para 77,2 e 78,9 °C na presença de mistura salina com concentrações de 0,58 e 1,21%, respectivamente (correspondentes a forças iônicas de 0,21 e 0,31M).

Uma vez verificado que estes solutos alteraram a estabilidade térmica da β -lactoglobulina, um estudo sistemático da estabilidade térmica do concentrado protéico de soro em ampla faixa de concentração de co-solutos foi realizado. Os resultados estão apresentados na Figura 4.7, na qual se encontram os valores da temperatura de início (*onset*) e de pico do processo de desnaturação, obtidos para o concentrado protéico do soro, na presença de diferentes concentrações de sacarose. Resultados para o concentrado protéico do soro contendo as misturas salinas (KCl/NaCl) estão apresentados na Figura 4.8.

Nota-se na Figura 4.7 que o aumento da concentração de sacarose resultou no aumento (aproximadamente linear) da temperatura de início e de pico de desnaturação. O aumento é de cerca de 10 °C, quando a concentração de sacarose é de 30 %. No caso da mistura salina, como apresentado na Figura 4.8, também se observaram aumentos das temperaturas (início e pico) na medida em que a concentração salina aumentou, porém, o aumento foi muito menos dependente do aumento da concentração de sais, oscilando entre 77 e 82°C no intervalo estudado na temperatura de pico e de 71 a 74 °C considerando o início do pico.

Pode-se verificar que ambos co-solutos levaram a um aumento da temperatura de desnaturação, sendo que este aumento pode ser discutido, em termos gerais, considerando os fatores que podem afetar a estabilidade das proteínas. A influência do soluto pode ocorrer em separado ou simultaneamente pela: a) neutralização das cargas das cadeias laterais dos aminoácidos reduzindo a repulsão inter e/ou intramolecular (no caso de solutos iônicos) e b) modificações na estrutura da água (DAMODARAN, 1988, BRAGA *et al.*, 2006). No caso do sistema aqui estudado, pode-se inferir que a sacarose afetou a estruturação das moléculas de água, com conseqüente alteração na conformação das proteínas do soro do leite. A adição de açúcares decresce a afinidade termodinâmica das moléculas da proteína pelo solvente (TIMASHEFF & ARAKAWA, 1988). Por outro lado, a desnaturação térmica de uma proteína globular causa um aumento na área superficial exposta ao solvente, bem como um aumento na hidrofobicidade superficial (DAMODARAN, 1996).

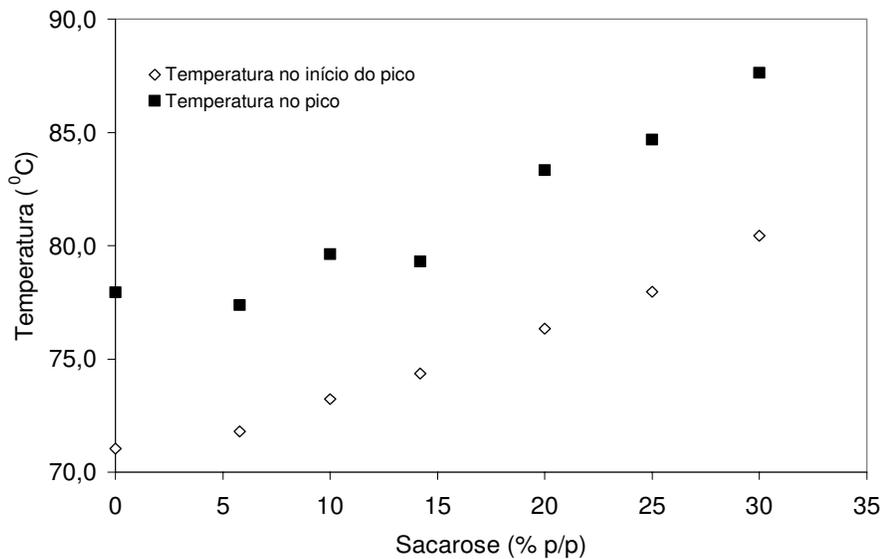


Figura 4.7: Temperatura de início e de pico para a desnaturação de proteína em concentrado protéico de soro em função da concentração de sacarose adicionada.

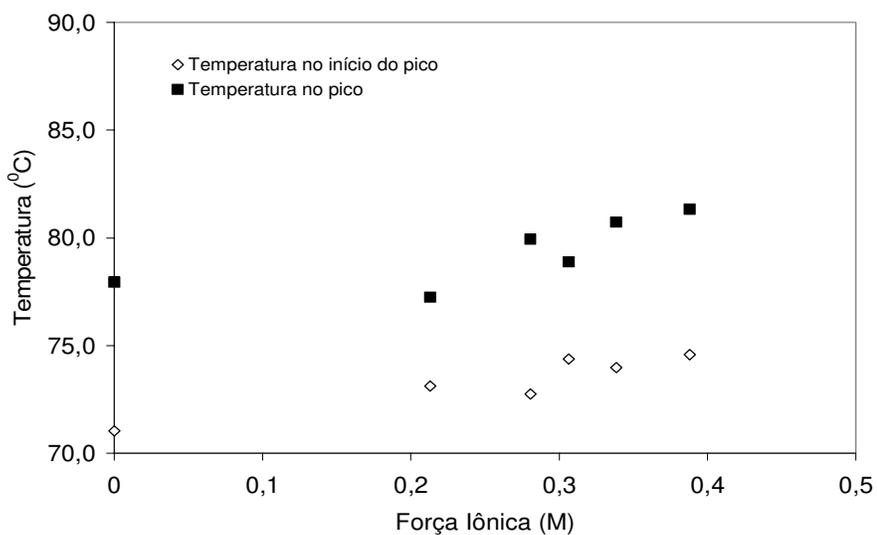


Figura 4.8: Temperatura de início e temperatura de pico para a desnaturação de proteína em concentrado protéico de soro em função da força iônica gerada pela adição da mistura salina KCl/NaCl.

Já na Figura 4.9 pode-se observar o comportamento geral das entalpias obtidas do evento térmico quando o sistema foi adicionado de sacarose e da mistura salina KCl/NaCl.

Com relação aos valores de entalpia obtidos pela área do pico endotérmico (os valores de ΔH são baseados na massa total das proteínas em solução), estes estão na mesma ordem de grandeza aos determinados por Boye & Alli, 2000, que estudou a desnaturação térmica de misturas de α -la e β -lg. No presente estudo os valores de entalpia de desnaturação das proteínas do soro indicaram pouca variação, oscilando com o aumento da concentração do açúcar entre 22 e 25 J/g de proteína na amostra (Figura 4.9A). Comportamento similar resultou com a elevação de força iônica do meio devido à mistura KCl/NaCl (Figura 4.9B), em que se nota que os valores da entalpia para a mistura salina parecem ligeiramente maiores que os obtidos com adição de sacarose porém, não houve diferença significativa entre elas ($p < 0,05$).

O intuito deste estudo prévio visou compreender e complementar os comportamentos detectados no planejamento fatorial fracionário e dessa maneira caminhar para a próxima etapa, com o estudo dos sistemas biopoliméricos utilizando o planejamento fatorial completo.

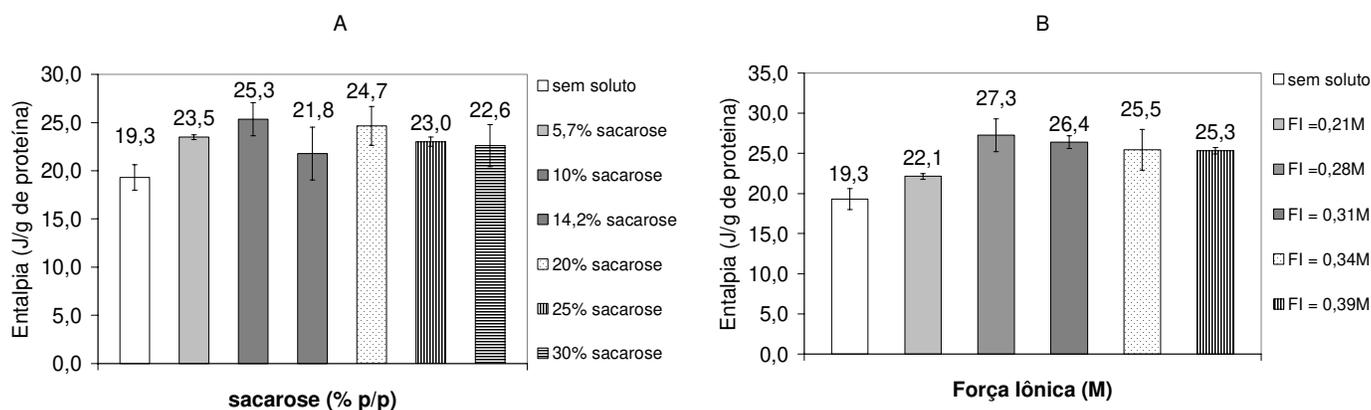


Figura 4.9: Entalpia do concentrado protéico do soro quando adicionado A) de sacarose e B) da mistura salina KCl/NaCl (força iônica (FI) do sistema).

4.3. Planejamento fatorial completo

Com o uso de planejamentos fatoriais completos, pode-se avaliar quantitativamente a influência das variáveis mais importantes sobre as respostas de interesse, bem como suas possíveis interações. Com base nas análises obtidas com o planejamento fatorial fracionário, foram definidos quais componentes deveriam ser estudados nessa etapa, que foram: as concentrações de caseinato de sódio, de concentrado protéico do soro, de carragena e de sacarose. Na avaliação das variáveis de processo, a temperatura de mistura dos componentes foi a que exerceu maior efeito nos resultados dos ensaios de ruptura (Figuras 4.2 e 4.3) e de relaxação de tensões (Tabelas 4.5 e 4.6), sendo esta a quinta e última variável a compor o planejamento fatorial completo. Dessa maneira, o planejamento fatorial completo apresentava cinco variáveis independentes, ou seja, 2^5 ensaios (32 ensaios) mais 10 pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 46 formulações. Um segundo planejamento completo foi realizado, em que a variável concentração de sacarose foi substituída pela força iônica, sendo esta controlada pela relação entre a concentração e proporção dos sais KCl/NaCl.

Quanto às demais condições de processo, ou seja, o tempo de mistura e a velocidade de agitação, estas foram fixadas nos valores definidos no ponto central do planejamento fatorial fracionário (17,5 minutos e 188 rpm, respectivamente). Com relação à velocidade de compressão a ser utilizada nas análises a altas deformações, optou-se por 1mm/s, sendo essa velocidade bastante utilizada na literatura (RIBEIRO, *et al.* 2004, TAKEUCHI, 2003, BRAGA, 2002) e também por mostrar boa correlação com avaliação sensorial (WIUM *et al.* 1997) de alguns produtos lácteos. Com relação ao estudo de relaxação de tensões, o procedimento de condução dos ensaios não foi alterado.

4.3.1. Ensaio de ruptura - géis com adição de sacarose

Na Tabela 4.7 são mostrados os resultados de propriedades mecânicas das diferentes formulações estudadas e na Figura 4.10 estão apresentados os efeitos lineares das variáveis independentes sobre os resultados de tensão na ruptura, deformação na ruptura, módulo de elasticidade e do módulo de ruptura (Tabela 4.7) para os sistemas de biopolímeros com sacarose obtidos através da análise do planejamento fatorial completo.

Pode-se observar que a tensão na ruptura foi influenciada positivamente pelas concentrações de caseinato de sódio e carragena (Figura 4.10A), enquanto que o concentrado protéico do soro (CPS) exerceu efeito negativo sobre esta propriedade, semelhantemente ao que havia sido observado no planejamento fatorial fracionário. Nota-se ainda que a carragena foi a variável de maior contribuição no aumento da tensão na ruptura ou dureza do gel, seguida do caseinato de sódio. Estatisticamente, a sacarose e a temperatura de mistura não foram variáveis significativas sobre a tensão na ruptura dos géis com açúcar. Comportamento semelhante foi obtido com os efeitos significativos sobre os módulos de elasticidade e de ruptura (Figura 4.10C e D). A carragena também foi a variável de maior influência sobre a deformação na ruptura (Figura 4.10B), sendo esta positiva. Também com efeito positivo, a sacarose influenciou na ϵ_{rup} , enquanto que as concentrações de caseinato de sódio e de CPS mostraram efeitos negativos, levando à diminuição da deformabilidade do sistema. É interessante notar que as variáveis que exerceram efeito significativo sobre as propriedades mecânicas foram somente as de composição dos géis, que foram as que apresentaram os maiores efeitos no estudo do planejamento fracionário. Considerando-se a Tabela 2.1 que classifica as curvas de tensão-deformação obtidas por compressão uniaxial (KAVANAGH & ROSS-MURPHY, 1998) em

categorias de material, pode-se concluir através de comparação que as características dos géis avaliados estariam entre macio e moderadamente consistente.

Tabela 4.7: Propriedades mecânicas dos géis lácteos acidificados com adição de sacarose. Respostas do planejamento fatorial completo 2⁵.

	Variáveis					Tensão na ruptura (kPa)	Deformação na ruptura	Módulo de elasticidade	Módulo de ruptura (kPa)
	CAS	CPS	CAR	SAC	T				
1	-1	-1	-1	-1	-1	13,79	0,41	42,65	33,63
2	1	-1	-1	-1	-1	29,04	0,53	71,24	54,79
3	-1	1	-1	-1	-1	17,41	0,47	54,11	37,04
4	1	1	-1	-1	-1	21,88	0,57	51,59	38,39
5	-1	-1	1	-1	-1	28,54	0,56	66,91	50,96
6	1	-1	1	-1	-1	43,28	0,47	119,10	92,09
7	-1	1	1	-1	-1	36,02	0,45	61,36	80,04
8	1	1	1	-1	-1	49,32	0,44	136,57	112,09
9	-1	-1	-1	1	-1	20,96	0,41	78,87	51,12
10	1	-1	-1	1	-1	32,15	0,39	116,79	82,44
11	-1	1	-1	1	-1	13,70	0,34	51,13	40,29
12	1	1	-1	1	-1	21,28	0,36	32,13	59,11
13	-1	-1	1	1	-1	18,22	0,56	49,68	32,54
14	1	-1	1	1	-1	45,85	0,62	102,12	73,95
15	-1	1	1	1	-1	25,62	0,47	79,79	54,51
16	1	1	1	1	-1	49,62	0,50	131,31	99,24
17	-1	-1	-1	-1	1	20,23	0,45	63,17	44,96
18	1	-1	-1	-1	1	24,42	0,43	66,26	56,79
19	-1	1	-1	-1	1	13,30	0,39	49,69	34,10
20	1	1	-1	-1	1	14,87	0,39	55,56	38,13
21	-1	-1	1	-1	1	30,23	0,56	70,64	53,98
22	1	-1	1	-1	1	38,08	0,38	133,87	100,21
23	-1	1	1	-1	1	32,50	0,62	74,84	52,42
24	1	1	1	-1	1	16,55	0,26	80,67	63,65
25	-1	-1	-1	1	1	35,11	0,57	86,56	61,60
26	1	-1	-1	1	1	24,83	0,40	72,52	62,08
27	-1	1	-1	1	1	14,23	0,44	41,58	32,34
28	1	1	-1	1	1	25,76	0,42	72,01	61,33
29	-1	-1	1	1	1	54,53	0,67	122,82	81,39
30	1	-1	1	1	1	42,78	0,58	94,24	73,76
31	-1	1	1	1	1	25,76	0,58	44,88	44,41
32	1	1	1	1	1	18,57	0,52	51,63	35,71
33	-2,38	0	0	0	0	6,20	0,44	15,06	14,09
34	2,38	0	0	0	0	18,15	0,35	65,30	51,86
35	0	-2,38	0	0	0	34,15	0,65	70,14	52,54
36	0	2,38	0	0	0	23,74	0,56	59,28	42,39
37	0	0	-2,38	0	0	11,67	0,40	24,64	29,18
38	0	0	2,38	0	0	47,50	0,61	110,12	77,87
39	0	0	0	-2,38	0	25,68	0,48	118,88	53,50
40	0	0	0	2,38	0	37,76	0,68	54,74	55,53
41	0	0	0	0	-2,38	26,97	0,50	75,26	53,94
42	0	0	0	0	2,38	35,22	0,55	86,88	64,04
43	0	0	0	0	0	53,40	0,51	128,23	104,71
44	0	0	0	0	0	52,70	0,52	126,35	101,35
45	0	0	0	0	0	53,05	0,51	127,29	104,02
46	0	0	0	0	0	53,40	0,51	128,23	104,71

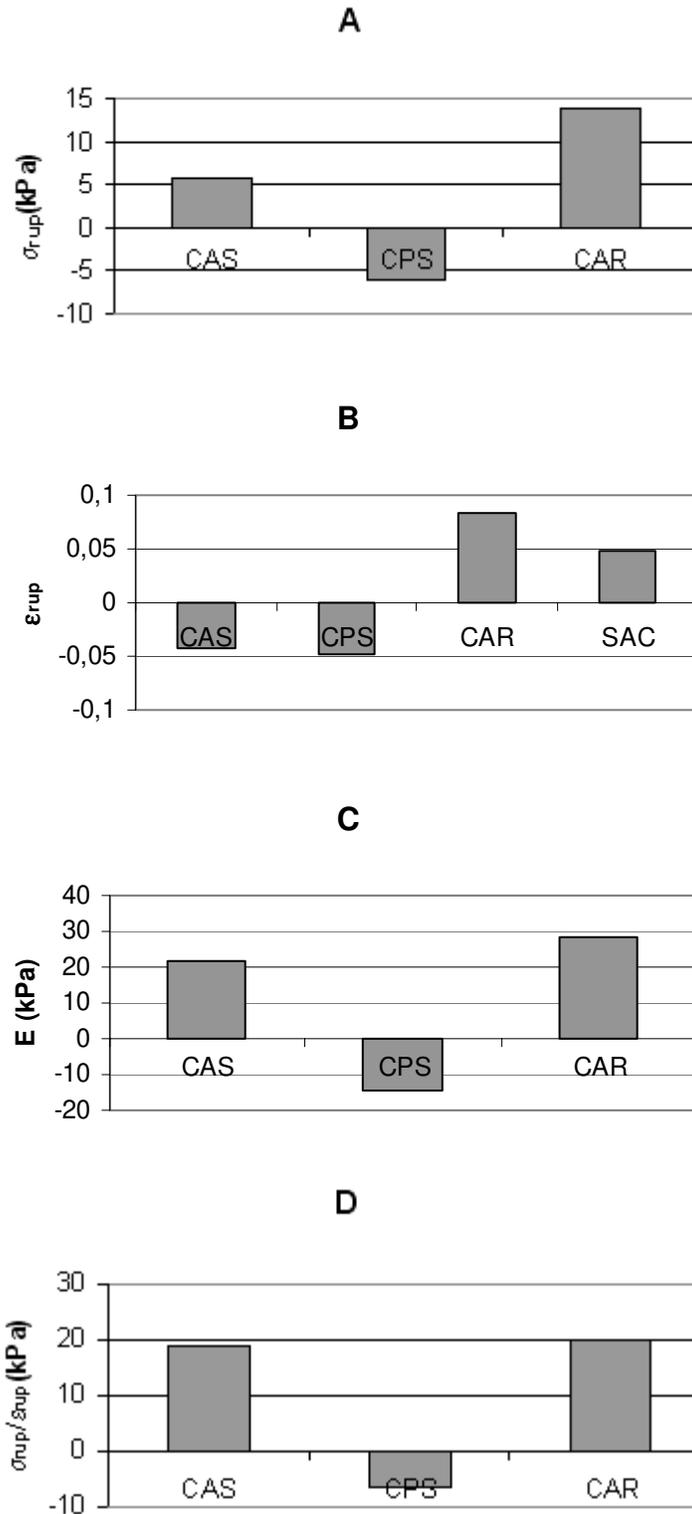


Figura 4.10: Efeitos lineares significativos ($p < 0,05$) das variáveis independentes dos sistemas acidificados de biopolímeros com adição de sacarose sobre (A) tensão na ruptura, (B) deformação na ruptura, (C) módulo de elasticidade, e (D) módulo de ruptura. Onde CAS - concentração de caseinato de sódio, CPS - concentração de concentrado protéico de soro, CAR - concentração de carragena, SAC - concentração de sacarose.

Para melhor compreender as tendências e interações ocorridas neste sistema complexo, a partir da avaliação do planejamento experimental completo, foram gerados modelos matemáticos em que se utilizou um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 3.7).

Os valores dos coeficientes das variáveis significativas e interações ocorridas na análise da tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulos de elasticidade e de ruptura encontram-se na Tabela 4.8. Através da análise de variância (ANOVA) foi verificada a significância dos modelos matemáticos, dentro do limite de confiança de 95%. Nas Tabelas 4.9, 4.10, 4.11 e 4.12 encontra-se a ANOVA dos modelos obtidos para as quatro propriedades mecânicas estudadas. Pode-se constatar que os modelos obtidos são estatisticamente válidos, pois o valor de $f_{\text{calculado}}$ (f_{cal}) sempre foi maior que o f_{tabelado} (f_{tab}), o que possibilitou gerar as superfícies de respostas, que estão apresentadas nas Figuras 4.11 e 4.12 para tensão na ruptura (σ_{rup}), 4.13, 4.14 e 4.15 para deformação na ruptura (ϵ_{rup}), 4.16 para módulo de elasticidade (E) e 4.17 para o módulo de ruptura (Rup). Além disso, o coeficiente de correlação, R foi razoável, sendo maior que 0,79 para todos os modelos.

Observa-se que a tensão na ruptura (σ_{rup}) foi influenciada fortemente pelas concentrações de carragena e caseinato de sódio (CN-Na), sendo que a primeira apresentou efeitos linear e quadrático, enquanto a segunda além do quadrático, também mostrou interação com a temperatura (Tabela 4.8). A concentração de concentrado protéico do soro também apresentou efeitos linear, quadrático e de interação com a temperatura. De acordo com os valores significativos obtidos, o efeito linear da concentração da carragena foi o maior responsável pelo fortalecimento da rede do gel.

Tabela 4.8: Valores dos coeficientes significativos dos modelos matemáticos codificados das propriedades mecânicas dos sistemas de biopolímeros com adição de sacarose ($p < 0,05$). Onde: b_i são os coeficientes da regressão com os sub-índices, 1 – concentração de caseinato de sódio, 2 - concentração de CPS, 3 - concentração de carragena, 4 - concentração de sacarose, 5 - $T(^{\circ}C)$ de mistura dos componentes e Y - tensão na ruptura, deformação na ruptura, módulo de elasticidade ou módulo de ruptura.

	Coeficientes	Y			
		Tensão na ruptura (kPa)	Deformação na ruptura	Módulo de Elasticidade (kPa)	Módulo de ruptura (kPa)
	b_0	52,89	0,514	127,74	104,48
Linear	b_1	2,92	-0,021	10,81	9,45
	b_2	-3,01	-0,024	-7,26	-
	b_3	6,87	0,041	14,26	9,83
	b_4	-	0,022	-	-
	b_5	-	-	-	-
quadrático	b_{11}	-7,39	-0,027	-15,34	-12,20
	b_{22}	-4,43	-	-11,02	-9,63
	b_{33}	-4,32	-	-10,54	-8,58
	b_{44}	-3,94	-	-7,11	-8,41
	b_{55}	-4,10	-	-8,13	-7,54
interações	b_{12}	-	-	-	-
	b_{13}	-	-0,022	-	-
	b_{14}	-	-	-	-
	b_{15}	-4,32	-0,035	-	-4,55
	b_{23}	-	-	-	-
	b_{24}	-	-	-	-
	b_{25}	-3,49	-	-	-6,98
	b_{34}	-	0,033	-	-6,91
	b_{35}	-	-	-	-
	b_{45}	-	0,029	-	-

Tabela 4.9: Análise de variância do modelo matemático obtido para a tensão na ruptura do planejamento fatorial completo com adição de sacarose.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f_{calc}	f_{tab}
Regressão	$7,10 \cdot 10^{+3}$	10	709,64	25,21	2,11
Resíduos	$9,85 \cdot 10^{+2}$	35	$2,81 \cdot 10^{+1}$		
Erro	985,20	35			
Total	8081,59	45			
$R^2 =$	0,82				
$R =$	0,91				

Tabela 4.10: Análise de variância do modelo matemático obtido para a deformação na ruptura a partir do planejamento fatorial completo com adição de sacarose.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f_{calc}	f_{tab}
Regressão	$2,94 \cdot 10^{-1}$	9	0,03	10,51	2,15
Resíduos	$1,12 \cdot 10^{-1}$	36	$3,11 \cdot 10^{-3}$		
Erro	0,11	36			
Total	0,41	45			
$R^2 =$	0,72				
$R =$	0,85				

Tabela 4.11: Análise de variância do modelo matemático obtido para o módulo de elasticidade a partir do planejamento fatorial completo com adição de sacarose.

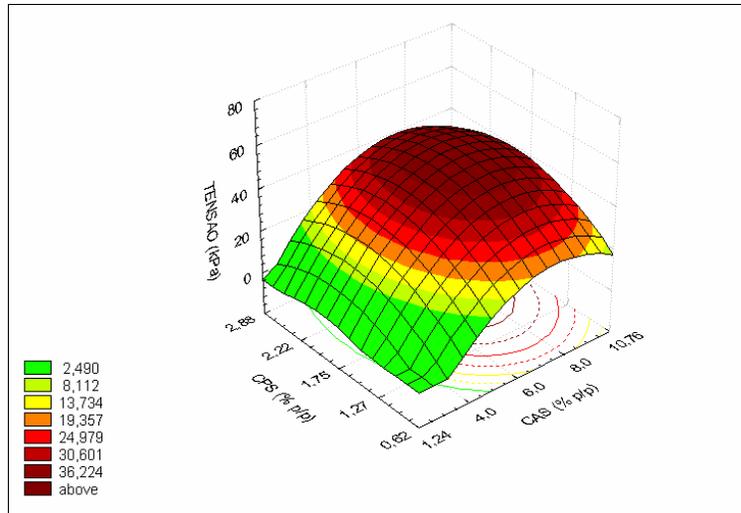
Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f _{calc}	f _{tab}
Regressão	2,97 10 ⁺⁴	8	3714,48	7,71	2,20
Resíduos	1,78 10 ⁺⁴	37	4,8210 ⁺²		
Erro	17821,52	37			
Total	47537,36	45			
R ² =	0,63				
R=	0,79				

Tabela 4.12: Análise de variância do modelo matemático obtido para o módulo de ruptura a partir do planejamento fatorial completo com adição de sacarose.

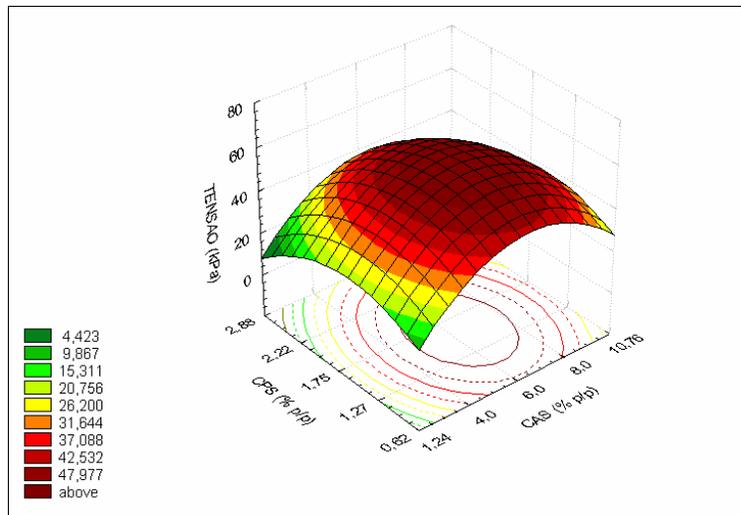
Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f _{calc}	f _{tab}
Regressão	2,13 10 ⁺⁴	10	2127,89	14,94	2,11
Resíduos	4,98 10 ⁺³	35	1,42 10 ⁺²		
Erro	4983,70	35			
Total	26262,61	45			
R ² =	0,81				
R=	0,90				

Para melhor visualização dos efeitos ocorridos na tensão de ruptura, foram construídas superfícies de respostas obtidas a partir da combinação entre os componentes, que mostraram efeitos significativos não lineares. Inicialmente, na Figura 4.11, foi avaliado o comportamento das duas proteínas do sistema, ou seja, a interação entre o caseinato de sódio e o concentrado protéico do soro (CPS), em que estão apresentadas as superfícies geradas para a tensão na ruptura (σ_{rup}) em função dessas variáveis com variação da temperatura (30, 55 e 80°C).

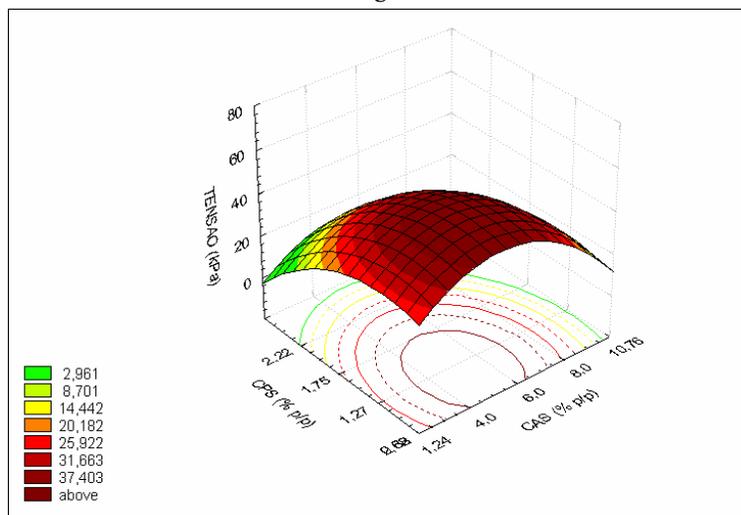
Nota-se que com o aumento da temperatura, de maneira geral, os valores de tensão na ruptura diminuíram, porém é notório que o ponto de máxima tensão se deslocou para menores valores de concentração de CPS, à medida que a temperatura de tratamento térmico aumentou. O efeito negativo da concentração do concentrado protéico do soro sobre todas as propriedades avaliadas foi um fato marcante, tanto na análise do planejamento fatorial fracionário como no completo.



a



b

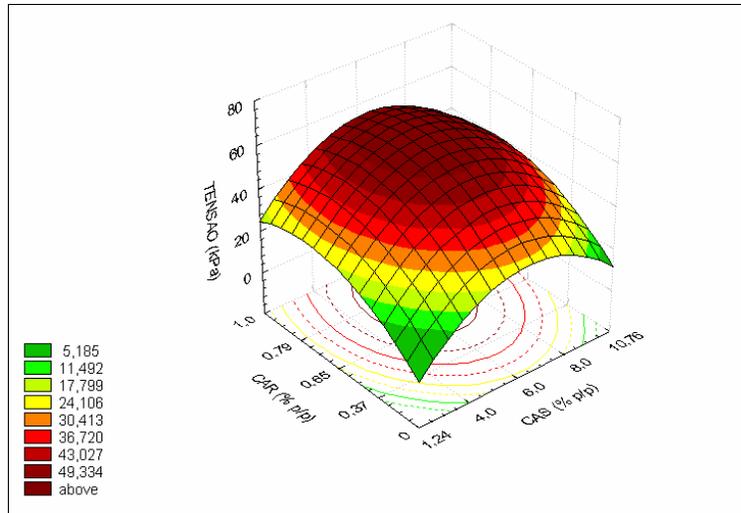


c

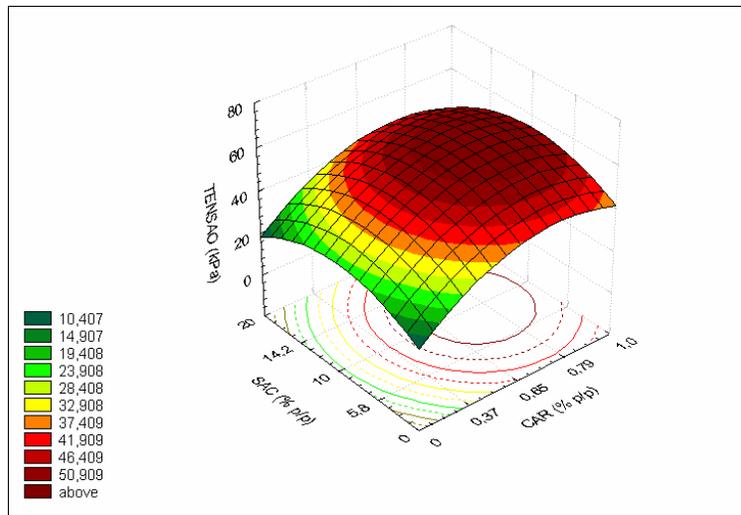
Figura 4.11: Superfícies de resposta na análise da tensão na ruptura. Comportamento das variáveis caseinato de sódio (CAS) e concentrado protéico do soro (CPS) com a variável temperatura (T) a) (30°C), b) (55°C) e c) (80°C).

Esperava-se que a colaboração do CPS fosse positiva na formação de géis, como relatado em vários estudos, pois as proteínas se agregam de maneira irreversível via ligações covalentes e não-covalentes devido às mudanças conformacionais que ocorrem nas mesmas durante o aquecimento (VERHEUL & ROEFS, 1998). Géis de proteína do soro formados sob a ação do calor são mais rígidos que os formados por acidificação, como foi constatado por Ju & Kilara (1988), a partir de resultados obtidos em compressão. No entanto, é possível que esse efeito negativo possa estar associado à formação de agregados de elevada massa molar de proteínas do soro durante o tratamento térmico. Estes agregados favorecem a separação entre os biopolímeros, o que acaba dificultando as interações das proteínas do soro com a caseína e desta com a carragena, enfraquecendo a rede principal. Nesta figura também pode ser observado que maiores valores de concentração de caseinato de sódio levaram a uma rede mais forte, sendo que o ponto de máxima tensão variou com a temperatura de tratamento térmico.

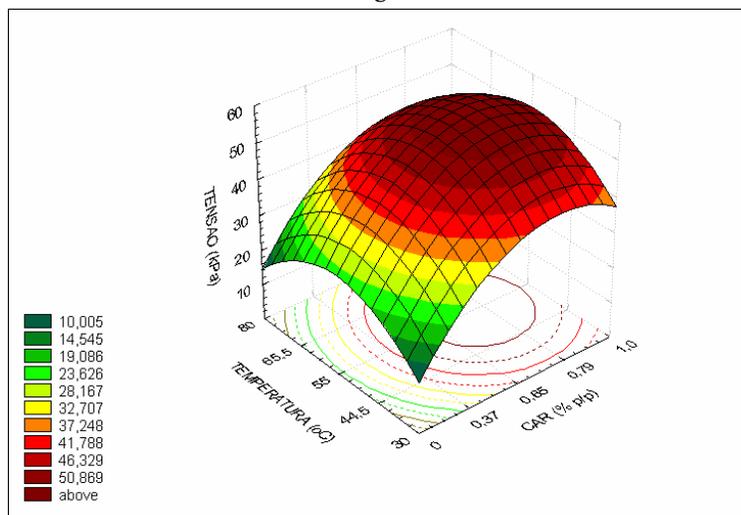
Na Figura 4.12 podem ser visualizados os efeitos das demais variáveis sobre a tensão na ruptura. Nessa figura, podem ser observados os valores dos pontos de máxima tensão na ruptura nas interações entre a carragena com o caseinato de sódio (4.12a), com a sacarose (4.12b) e com a temperatura de tratamento térmico (4.12c), considerando as demais variáveis com valores no ponto central. Nota-se, na Figura 4.12a, que os maiores valores de tensão na ruptura foram obtidos quando a concentração de caseinato de sódio está faixa de 6 a 8%, e a de carragena no valor máximo estudado (em torno de 1%), ou seja, na concentração máxima permitida pela legislação vigente.



a



b



c

Figura 4.12: Superfícies de resposta na análise da tensão na ruptura. Comportamento da carragena (CAR) com a) caseinato de sódio (CAS), b) sacarose (SAC) e c) temperatura de tratamento térmico (T).

Nesse estudo, estatisticamente não foram detectados efeitos de interação entre o caseinato de sódio (CN-Na) e a carragena, porém vários estudos constataam a afinidade entre esses componentes. Estudos realizados por Ribeiro *et al.* (2004) com caseinato de sódio e a carragena mostraram interações entre esses componentes, de forma a promover o fortalecimento da rede do gel.

Provavelmente as interações que ocorrem entre a κ -carragena e o caseinato de sódio são de origem eletrostática (SNOEREN *et al.*, 1975, DALGLEISH, & LAW, 1998) ou ainda esse efeito pode ser ocasionado pela formação de um gel fraco de carragena que mantém a caseína presa na rede polimérica (BOURRIOT *et al.*, 1999). Como as interações entre as proteínas do leite são devido à formação de agregados entre o caseinato de sódio e proteínas do soro, provavelmente estes ficam aprisionados na rede de carragena (TZIBOULA & HORNE, 1999), estruturando a rede polimérica.

Outro ponto a ser considerado é que o máximo de tensão na ruptura ocorre com o caseinato de sódio na concentração intermediária, como observado por outros autores (RIBEIRO *et al.*, 2004), porém nas maiores concentrações de carragena. Isso pode estar indicando que partir de determinada concentração há um excesso de polímeros que leva à sua exclusão e enfraquecimento do gel.

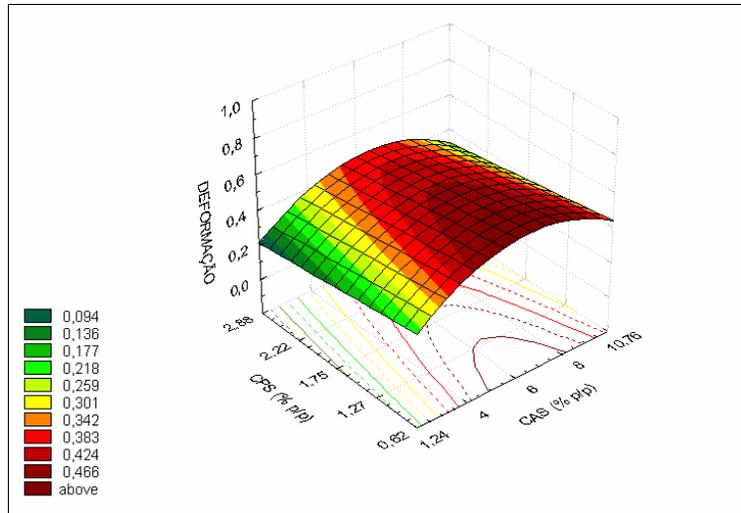
Na Figura 4.12 b pode-se ver o efeito da sacarose, que colaborou na estrutura do gel de forma a deixá-lo com os maiores valores de tensão na ruptura, à medida que a concentração do açúcar aumentava, este efeito foi mais pronunciado na maior concentração do polissacarídeo. Já na Figura 4.12c pode-se verificar que os maiores valores de tensão foram observados com temperaturas de tratamento térmico entre 40 e 60°C.

Neste trabalho, em que se acidificou o sistema pelo uso de GDL, variou-se a

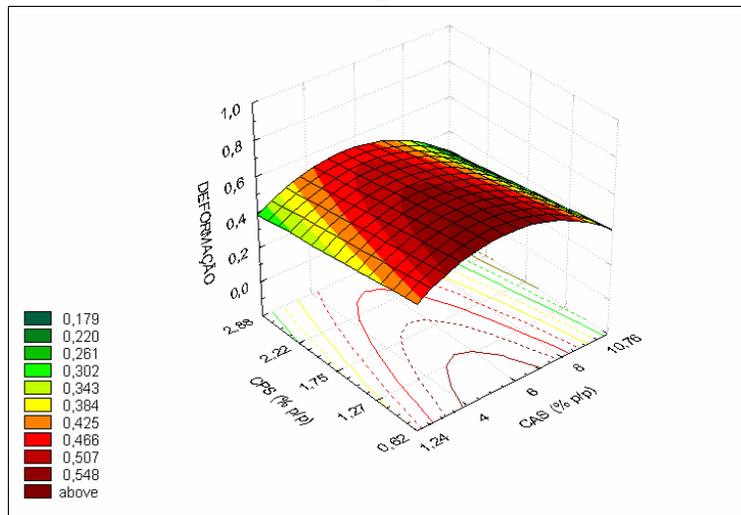
temperatura de mistura e que também se adicionou sacarose, observou-se que o entendimento das interações é mais complexo que para sistemas modelo com menor número de variáveis. Existem alguns estudos relacionados ao efeito dos açúcares na desnaturação e propriedades funcionais das proteínas do soro (KULMYRZAEV *et al*, 2000; SPIEGEL, 1999), mostrando que a adição de sacarose diminui a capacidade de gelificação e aumenta a temperatura de início de gelificação da β -lactoglobulina (β -Lg) (YAMUL & LUPANO, 2003). SINGH *et al* (1996), relataram que após tratamento térmico a 90°C por 10 min, a β -Lg se complexa com a caseína (em pHs inferiores a 6,9), devido à interação com a κ -caseína por pontes dissulfeto.

A concentração de sacarose intensificou a estrutura do sistema, como também observado por Dickinson & Merino (2002). Esse aumento na força do gel pode ser resultado de uma distribuição mais homogênea do material protéico ao longo da cadeia do polissacarídeo e, das interações ocorridas entre a rede de carragena e os agregados protéicos (HEERTJE, 1993), ou, provavelmente, está no fato de que as ligações caseinato de sódio-caseinato de sódio e caseinato de sódio-carragena foram mais efetivas com a hidratação preferencial da proteína na presença de sacarose. Nesse caso o açúcar é excluído do contato com a superfície da proteína, possibilitando o aumento destas ligações (FARRELL & MORA-GUTIERREZ, 2000).

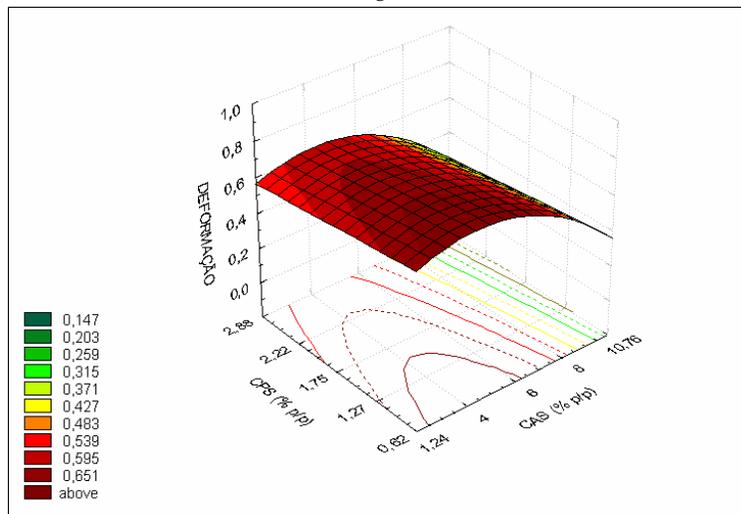
Na Figura 4.13 estão apresentadas as superfícies geradas para a deformação na ruptura, que foram obtidas pela combinação das variáveis significativamente importantes nesta propriedade, ou seja, efeitos significativos mostrados na Tabela 4.8. Por esta tabela nota-se que a carragena foi a variável que exerceu efeito mais expressivo sobre a deformabilidade,



a



b



c

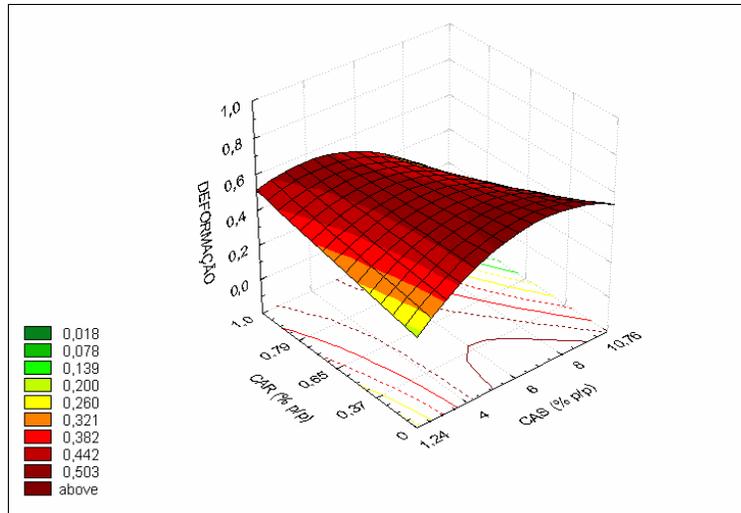
Figura 4.13: Superfícies de resposta na análise da deformação na ruptura ($p < 0,05$). Comportamento das variáveis concentração de concentrado protéico do soro (CPS) e caseinato de sódio (CAS), com a concentração de carragena (CAR) em a) 0% b) 0,65% e c) 1% (p/p).

provavelmente porque mostra interações com o CN-Na e, principalmente porque apresenta o maior efeito linear.

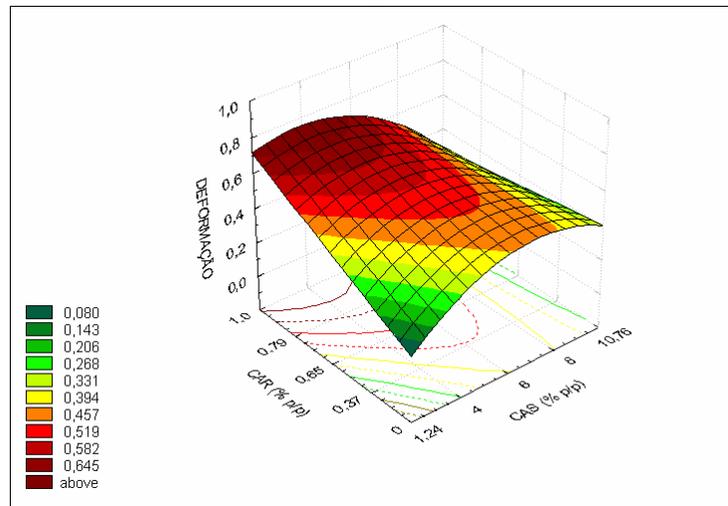
Na Figura 4.13, nota-se que em geral, os valores de deformabilidade aumentam com o aumento da concentração de carragena, porém diminuem com o aumento dos teores de CPS e de CN-Na. A formação desse gel está ligada à acidificação do meio e sua ação direta no estabelecimento de uma rede de caseinato e/ou CPS, porém a ação da temperatura sobre a carragena e as proteínas do soro também são fundamentais para a força e deformabilidade destes géis. Assim, estes resultados indicam a forte relevância da carragena nas interações observadas.

As proteínas do soro complexadas pelo calor poderiam interagir com CN-Na, formando uma mistura de agregados recobertos com proteína do soro (VASBINDER & KRUIF, 2003). No entanto, como a máxima deformabilidade está também associada às menores concentrações de CPS, parece confirmar que esta proteína não está participando da rede principal, apesar de que a maior parte destas (β -Lg) está abaixo do seu pI, e poderia formar complexos com a carragena. Isso sugeriria a maior afinidade deste polissacarídeo pelo caseinato de sódio, que por outros componentes do sistema.

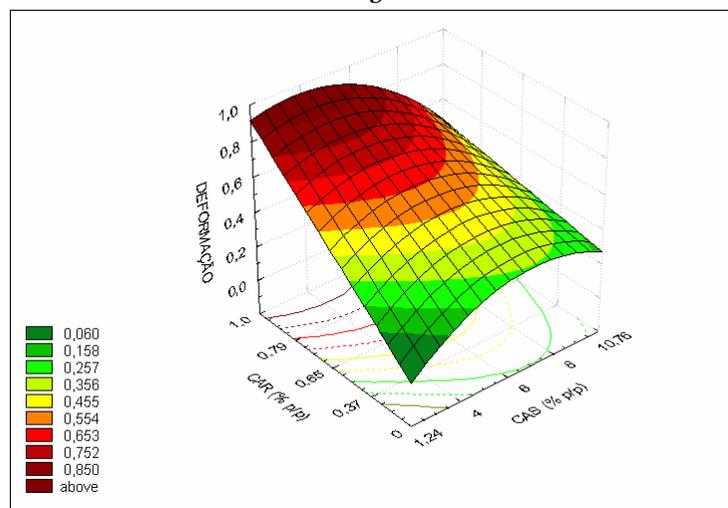
Quando se avalia o comportamento do CN-Na com a carragena, na Figura 4.14 a, b e c, observa-se que o aumento da concentração do polissacarídeo é a maior responsável pela elasticidade do sistema. O aumento da concentração de caseinato de sódio colaborou com a diminuição da deformabilidade a altos valores da concentração de carragena, porém a baixas concentrações do polissacarídeo, o comportamento foi inverso. No primeiro caso esse fato pode ser atribuído ao predomínio dos agregados protéicos formados pela ação ácida, característica de géis particulados (HORNE, 1999) na rede tridimensional (obtida pelo



a



b

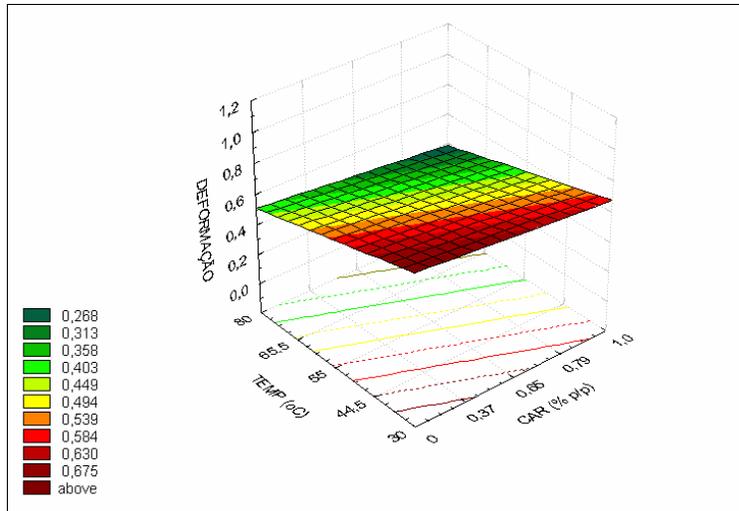


c

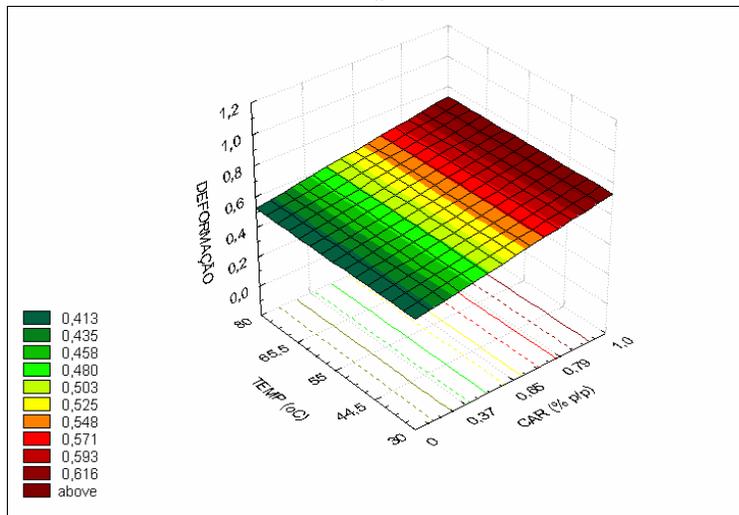
Figura 4.14: Superfícies de resposta na análise da deformação na ruptura ($p < 0,05$). Comportamento das variáveis concentrações de caseinato de sódio (CAS) e carragena (CAR) em a) 0% de sacarose b) 10% de sacarose e c) 20% de sacarose.

modelo na Tabela 4.8) e uma possível micro separação de fases. Isso pode ser corroborado pelo fato de que na menor concentração do polissacarídeo, os maiores valores de deformação ocorreram a maiores concentrações de proteína. Neste caso, a rede principal deve ser formada da proteína (CN-Na), enquanto que no primeiro caso a rede seria de carragena com a proteína aprisionada. Nota-se que no valor superior de concentração de sacarose são obtidos os maiores valores de deformação, desde que a concentração de carragena também seja máxima (Figura 4.14), devido a um provável favorecimento da formação da rede biopolimérica com a diminuição das interações destes com a água (interação preferencial sacarose-água). A presença de sacarose que interage preferencialmente por pontes de hidrogênio com a água presente devido a sua alta hidrofiliabilidade, favoreceu as interações biopoliméricas quando a concentração de caseinato era baixa e a de carragena alta. De maneira similar, o aumento da concentração de proteína elevou a deformabilidade do sistema na presença de menor concentração de polissacarídeo, e este efeito ficou menos pronunciado com a elevação da concentração de sacarose. Este fato poderia estar associado a um aumento das interações proteína-proteína, que nessas condições formaria um gel mais particulado e quebradiço.

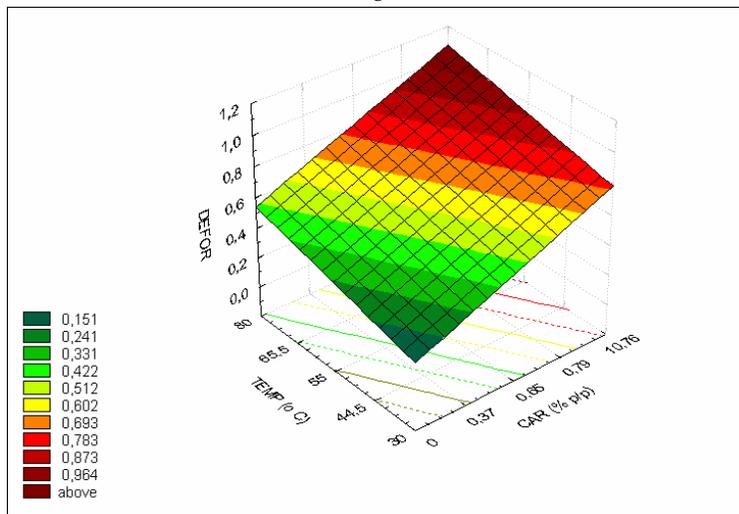
Observa-se também que o decréscimo da temperatura na mistura (Figura 4.15) facilitou as interações proteína-proteína, proteína-polissacarídeo ou polissacarídeo-polissacarídeo. Este efeito da temperatura parece estar associado especialmente a este último caso, devido à formação de hélices em estado ordenado que deve ser responsável pela rede principal (Spagnuolo, *et al.*, 2005). Tal influência foi mais pronunciada a mais elevada concentração de sacarose, devido ao aumento do efeito de hidratação preferencial (FARRELL & MORA-GUTIERREZ, 2000), já comentado anteriormente.



a



b



c

Figura 4.15: Superfícies de resposta na análise da deformação na ruptura ($p < 0,05$). Comportamento das variáveis concentrações e da carragena (CAR) com a temperatura de mistura (TEMP) em a) 0% de sacarose b) 10% de sacarose e c) 20% de sacarose.

Na Figura 4.16 encontram-se as superfícies geradas para o módulo de elasticidade, em que se pode observar o comportamento das variáveis concentrado protéico do soro (CPS) e caseinato de sódio (Figura 4.16a), caseinato de sódio e carragena (Figura 4.16b), sacarose e carragena (Figura 4.16 c) e carragena e temperatura (Figura 4.16d).

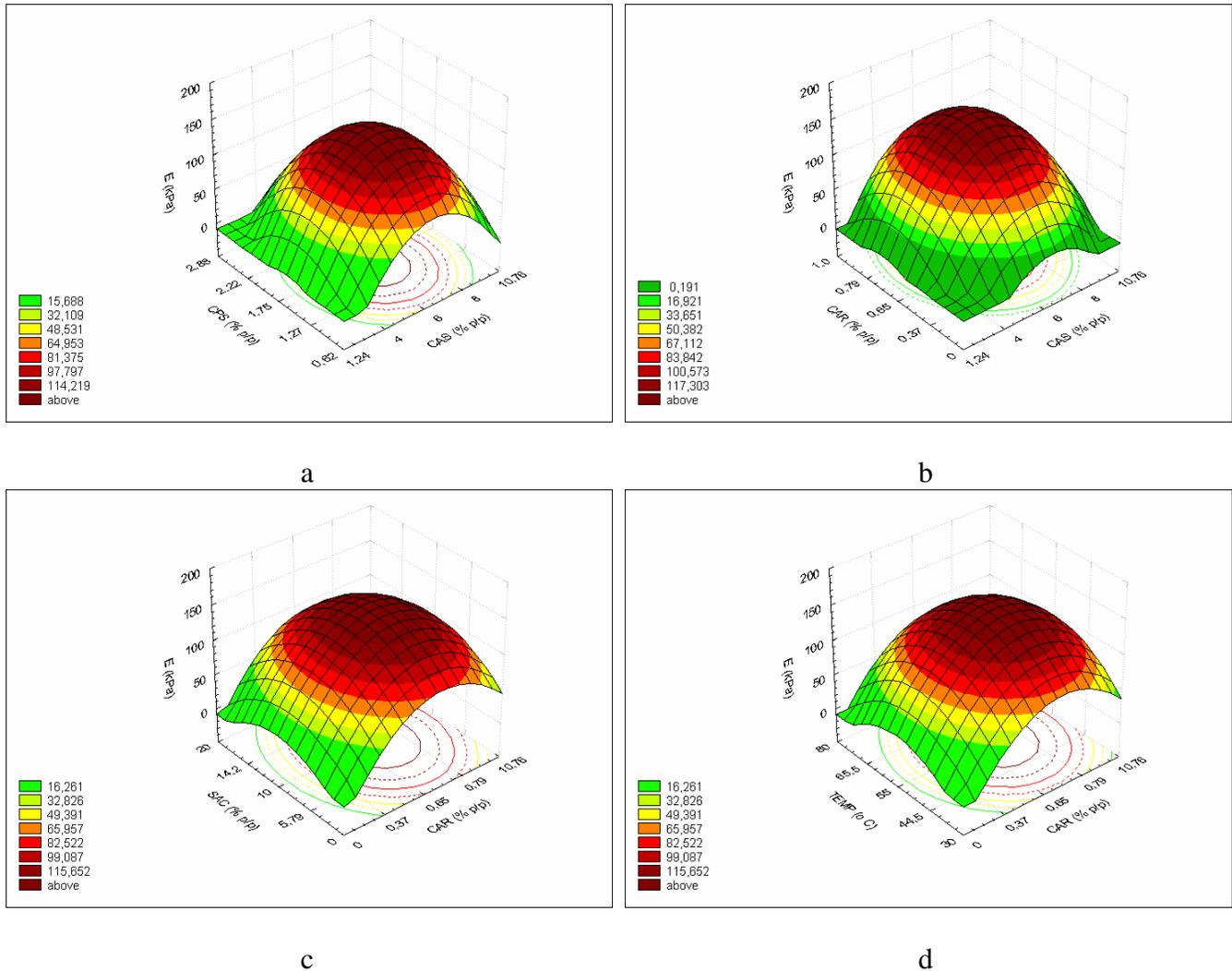


Figura 4.16: Superfícies de resposta ($p < 0,05$) na análise do módulo de elasticidade. Comportamento das variáveis a) concentrado protéico do soro (CPS) e caseinato de sódio (CAS), b) caseinato de sódio (CAS) e a carragena (CAR), c) sacarose (SAC) e a carragena (CAR) e d) carragena (CAR) e a temperatura de mistura (TEMP).

Nota-se que o módulo de elasticidade foi fortemente influenciado pelas concentrações do caseinato de sódio e carragena até uma determinada concentração, porém vale ressaltar que todas as variáveis apresentaram efeitos quadráticos. Os maiores valores do módulo de

elasticidade estão na faixa de concentrações entre 6-8% de caseinato de sódio, 1,27-1,75% de CPS, superior a 0,65% de carragena e ao redor de 10% de sacarose. Além disso, a temperatura entre 55 e 65°C levou aos maiores valores de módulo de elasticidade. É interessante observar que esses valores foram os aplicados no ponto central do planejamento experimental. Os componentes biopoliméricos atuaram de modo a fortalecer a rede formada e suportar maiores valores de tensão em baixas deformações, sem sofrer danos estruturais irreversíveis.

Como a carragena foi o componente que mais influenciou nos valores do módulo de elasticidade, esse fato pode estar relacionado à elevada resistência a baixas deformações em compressão dos agregados de carragena-caseinato de sódio e de carragena-carragena, o que também foi observado em condições de ruptura. Ou seja, a característica dos efeitos obtidos sobre o módulo de elasticidade foi similar à da tensão na ruptura, mostrando que a rigidez dos géis a altas e baixas deformações segue comportamentos similares.

Outro parâmetro estudado foi o módulo de ruptura, obtido pela razão entre a tensão e a deformação em condições de fratura do gel. Seguindo a mesma linha de avaliação relacionada aos principais efeitos ocorridos, na Figura 4.17, pode-se observar o comportamento das proteínas do sistema com o aumento da temperatura de mistura nessa propriedade. Verifica-se que o módulo de ruptura diminuiu com o aumento da temperatura, como detectado na análise da tensão na ruptura. Porém, é possível observar que o maior valor do módulo de ruptura se deu nas maiores concentrações de biopolímeros e de sacarose.

Todos os resultados indicam que o açúcar modificou as interações entre a proteína e o polissacarídeo ou estabilizou a proteína em termos da sua conformação, estado de agregação e interação proteína-solvente como sugerido por Arakawa & Timasheff (1982).

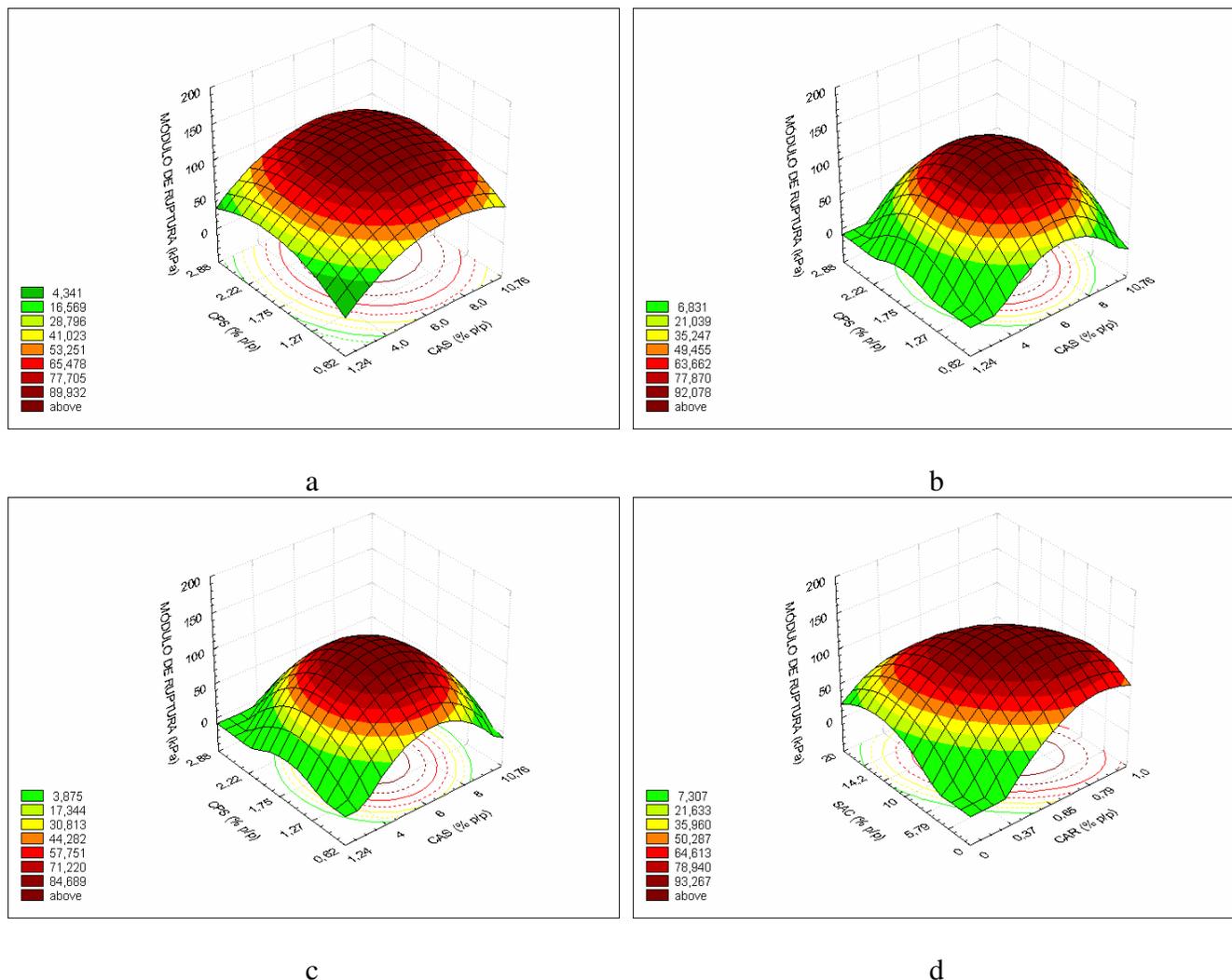


Figura 4.17: Superfícies de resposta ($p < 0,05$) na análise do módulo de ruptura. Comportamento das variáveis concentrado protéico do soro (CPS) e caseinato de sódio (CAS) em: a) com a temperatura à 44,5°C, b) com a temperatura à 55 °C, c) com a temperatura à 65,5 °C e d) da carragena (CAR) com a sacarose (SAC) à temperatura de 55 °C.

Segundo Dickinson & Merino (2002), o que acontece quando se adiciona açúcar em um sistema lácteo, é um aumento na interação proteína-proteína, ou seja: (i) aumento da atração entre as moléculas das proteínas do soro, (ii) uma forte interação eletrostática entre as moléculas de caseína causada pela adição de açúcares e (iii) uma correspondente força atrativa das interações proteína-proteína no caseinato. As forças interativas mais importantes em géis ácidos de caseína são provavelmente as hidrofóbicas.

Em estudos com açúcares de baixa massa molecular, em particular a sacarose, são relatadas mudanças nas propriedades funcionais da caseína e sua capacidade de interação com outros ingredientes: (a) aumento da solubilidade do caseinato de sódio próximo do seu ponto isolétrico (ANTIPOVA & SEMENOVA, 1995); (b) aumento na compatibilidade termodinâmica da caseína com o polissacarídeo em baixas concentrações (ANTIPOVA & SEMENOVA, 1995; SCHORSCH *et al.*, 1999, RIBEIRO *et al.*, 2004); (c) aumento na atividade superficial do caseinato de sódio na interface ar-água (ANTIPOVA *et al.*, 1999); (d) um substancial aumento na capacidade de formação de gel de caseinato de sódio (DICKINSON & MERINO, 2002) e (e) um marcante aumento na viscosidade de géis ácidos de caseína, devido ao efeito da sacarose na auto-associação do caseinato de sódio (BELYAKOVA *et al.*, 2003).

Por outro lado, o efeito da sacarose sobre a carragena está associado à diminuição das interações polissacarídeo-solvente devido à competição da sacarose pela água levando ao aumento das interações das hélices do biopolímero e fortalecendo a rede do gel (DOYLE *et al.*, 2006).

O efeito negativo da concentração de CPS na dureza, firmeza e elasticidade dos géis nesse estudo pode estar associado à desnaturação parcial da β -lactoglobulina (SPIEGEL, 1999) com a adição de sacarose, levando a uma formação dessa rede protéica de gel mais fraco. Outra explicação possível para esse efeito negativo da concentração do CPS nas propriedades mecânicas do gel lácteo pode ser a forte interação entre o caseinato e a carragena, com a diminuição interativa desse biopolímero com o CPS (TZIBOULA & HORNE, 1999) ou simplesmente sua exclusão da rede elástica, devido à formação de agregados de elevada massa molar.

4.3.2. Ensaios de Ruptura - Géis com adição de Sal (KCl/NaCl)

O aspecto visual dos géis em que se adicionou a mistura de KCl/NaCl foi totalmente diferente dos géis com sacarose e dos géis sem adição de açúcar, mostrando-se muito mais particulados. Comparando-se os resultados das propriedades mecânicas dos géis com adição de sacarose (Tabela 4.7) ou sal (Tabela 4.13) em cada formulação é possível verificar que os com sal foram muito inferiores quanto à tensão de ruptura, módulo de elasticidade e o módulo de ruptura, enquanto que a deformação não diferiu tão fortemente, apesar de serem um pouco menor. O frágil gel formado com a adição de sal, em comparação com os que tiveram adição de sacarose, provavelmente ocorreu pelas tênues interações ocorridas nesse sistema complexo, em função do aumento da força iônica.

Quatro das formulações preparadas com sais (ensaios 9, 12, 13 e 15) não formaram géis auto-sustentáveis impossibilitando a realização dos ensaios de ruptura. Essas formulações possuíam em comum a mesma temperatura de mistura (44,5 °C) e força iônica (0,31M) (níveis -1 e +0,53), as quais correspondiam à menor temperatura e à maior força iônica do planejamento principal, respectivamente. No ensaio 40, mesmo com a maior força iônica estudada (0,34M), a combinação das variáveis nesse caso, possibilitou a realização dos ensaios mecânicos. Por outro lado, as formulações 14, 16 e 41 mostraram duas fases, porém gelificadas. Em recentes estudos, o mecanismo de depleção-floculação é sugerido para explicar a separação de fases em sistemas envolvendo caseína-carragena, devido à transição ordenada/desordenada do polissacarídeo (SCHORSCH *et al.*, 2000), e isto aparentemente ocorre quando a carragena está ordenada, como é o caso deste trabalho.

Tabela 4.13: Propriedades mecânicas dos géis lácteos acidificados com adição da mistura salina (KCl/NaCl). Respostas do planejamento fatorial completo 2⁵.

	Variáveis					Tensão na ruptura (kPa)	Deformação na ruptura	Módulo de elasticidade (kPa)	Módulo de ruptura (kPa)
	CAS	CPS	CAR	SAC/FI	T				
1	-1	-1	-1	-1 / -1	-1	4,35	0,22	16,26	19,77
2	1	-1	-1	-1 / -1	-1	3,83	0,34	22,26	11,26
3	-1	1	-1	-1 / -1	-1	2,44	0,26	15,37	9,38
4	1	1	-1	-1 / -1	-1	3,91	0,39	16,79	10,03
5	-1	-1	1	-1 / -1	-1	3,62	0,18	16,44	20,11
6	1	-1	1	-1 / -1	-1	3,82	0,33	18,29	11,58
7	-1	1	1	-1 / -1	-1	2,8	0,21	18,2	13,33
8	1	1	1	-1 / -1	-1	4,5	0,33	16,72	13,64
9	-1	-1	-1	1 / 0,53	-1	-	-	-	-
10	1	-1	-1	1 / 0,53	-1	0,48	0,43	0,45	1,12
11	-1	1	-1	1 / 0,53	-1	0,68	0,4	1,64	1,70
12	1	1	-1	1 / 0,53	-1	-	-	-	-
13	-1	-1	1	1 / 0,53	-1	-	-	-	-
14	1	-1	1	1 / 0,53	-1	1,97	0,66	0,78	2,98
15	-1	1	1	1 / 0,53	-1	-	-	-	-
16	1	1	1	1 / 0,53	-1	3	0,26	2,86	11,54
17	-1	-1	-1	-1 / -1	1	15,97	0,4	45,86	39,93
18	1	-1	-1	-1 / -1	1	12,11	0,3	43,39	40,37
19	-1	1	-1	-1 / -1	1	14,04	0,42	43,40	33,43
20	1	1	-1	-1 / -1	1	12,85	0,27	38,50	47,59
21	-1	-1	1	-1 / -1	1	13,23	0,23	40,31	57,52
22	1	-1	1	-1 / -1	1	12,12	0,26	47,09	46,62
23	-1	1	1	-1 / -1	1	14,71	0,39	41,13	37,72
24	1	1	1	-1 / -1	1	10,85	0,31	42,07	35,00
25	-1	-1	-1	1 / 0,53	1	0,5	0,16	12,87	3,13
26	1	-1	-1	1 / 0,53	1	1,54	0,28	14,87	5,50
27	-1	1	-1	1 / 0,53	1	0,55	0,22	14,10	2,50
28	1	1	-1	1 / 0,53	1	1,12	0,31	15,70	3,61
29	-1	-1	1	1 / 0,53	1	1,05	0,22	17,77	4,77
30	1	-1	1	1 / 0,53	1	0,97	0,27	15,85	3,59
31	-1	1	1	1 / 0,53	1	1,57	0,21	12,58	7,48
32	1	1	1	1 / 0,53	1	2,87	0,31	15,44	9,26
33	-2,38	0	0	0 / 0	0	1,75	0,05	6,00	35,00
34	2,38	0	0	0 / 0	0	2,12	0,38	13,84	5,58
35	0	-2,38	0	0 / 0	0	2,08	0,23	31,35	9,04
36	0	2,38	0	0 / 0	0	3,15	0,28	18,66	11,25
37	0	0	-2,38	0 / 0	0	0,64	0,32	3,90	2,00
38	0	0	2,38	0 / 0	0	1,15	0,29	6,98	3,97
39	0	0	0	-2,38 / -2,47	0	33,52	0,48	108,78	69,83
40	0	0	0	2,38 / 1,06	0	0,98	0,29	13,16	3,38
41	0	0	0	0 / 0	-2,38	1,28	0,4	3,18	3,20
42	0	0	0	0 / 0	2,38	9,7	0,33	32,08	29,39
43	0	0	0	0 / 0	0	1,1	0,24	5,86	4,58
44	0	0	0	0 / 0	0	1,11	0,24	5,86	4,63
45	0	0	0	0 / 0	0	1,11	0,23	5,86	4,83
46	0	0	0	0 / 0	0	1,11	0,23	5,89	4,83

De acordo com o mecanismo de depleção-floculação, a carragena seria excluída do espaço entre as moléculas de caseinato e proteínas do soro que estariam agregadas, devido ao processo de acidificação e/ou desnaturação térmica das proteínas do CPS. Esse processo é facilitado quando as concentrações dos biopolímeros são altas, sendo que de fato a separação foi observada em formulações contendo a máxima concentração estudada de caseinato de sódio e carragena. Além disso, o aquecimento moderado deste sistema também favorece as interações hidrofóbicas e o aumento da força iônica reduz a formação de interações eletrostáticas (TURGEON & BEAULIEU, 2001), o que deve ter facilitado a separação de fases. O fato de ter sido observada separação de fases quando a carragena está no estado ordenado contrapõe os resultados obtidos por Bourriot *et al.*, (1999), que observaram separação de fases entre micelas de caseína e carragena quando o polissacarídeo estava na forma espiralada (“coil”), independente da força iônica do meio. No entanto, estes autores estudaram as micelas de caseína que possuem massa molar muito maior que o caseinato de sódio e, portanto mais propenso à separação de fases. Porém, a baixa temperatura de mistura não influenciou somente a conformação do polissacarídeo, mas também a desnaturação das proteínas do soro. Nessas condições, as proteínas do soro não exporiam grupos que estariam contribuindo em manter uma estrutura mais uniforme do gel, o que poderia dificultar a separação macroscópica de fases.

Os efeitos lineares referentes à análise de tensão na ruptura, deformação na ruptura e dos módulos de elasticidade e de ruptura do planejamento experimental utilizando a mistura de sal (KCl/NaCl), encontram-se na Figura 4.18. A adição da mistura salina produziu efeito negativo sobre a tensão na ruptura, módulos de elasticidade e de ruptura (Figuras 4.18A, C e D). Observa-se na Figura 4.18 que a tensão na ruptura foi influenciada de forma positiva pela temperatura, entretanto o efeito da força iônica possuía maior magnitude negativa.

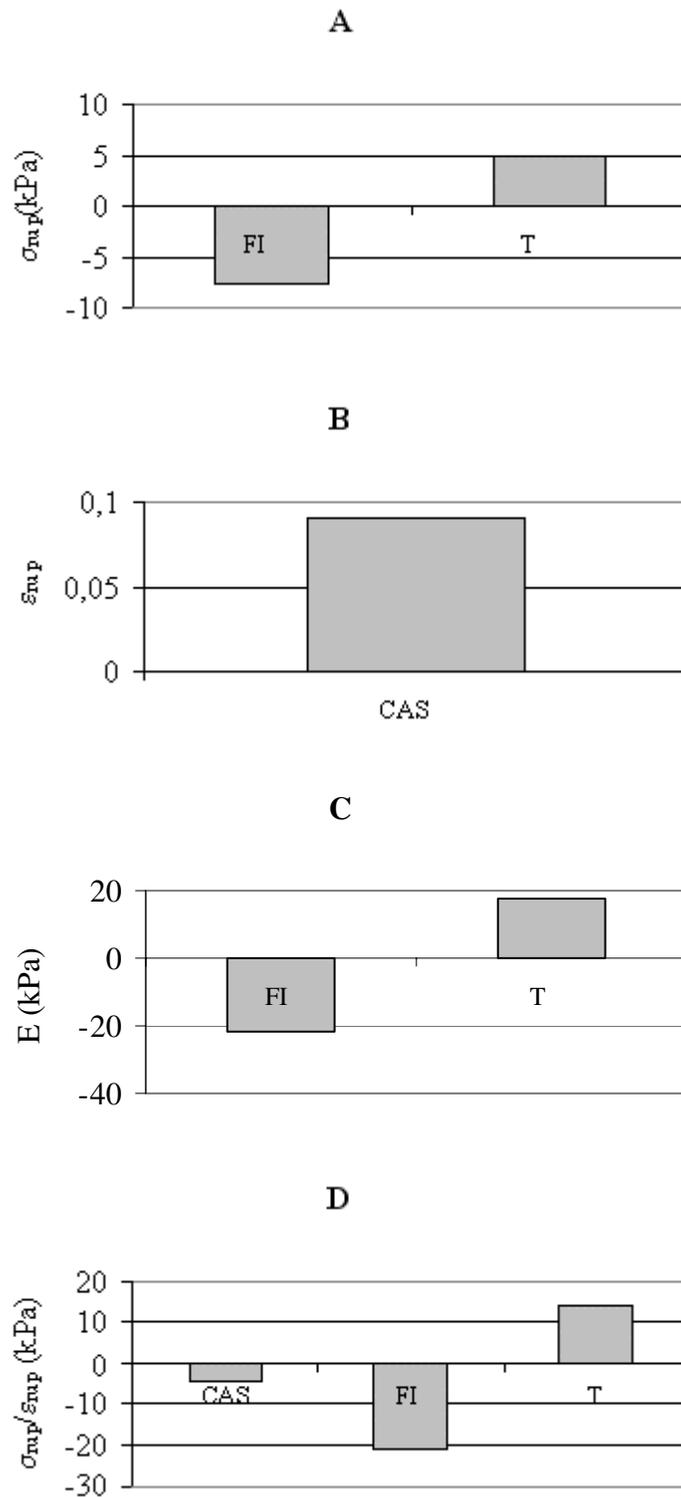


Figura 4.18: Efeitos lineares significativos ($p < 0,05$) das variáveis dos sistemas de biopolímeros com adição da mistura salina (KCl/NaCl) obtidos a partir do planejamento fatorial completo sobre (A) tensão na ruptura, (B) deformação na ruptura, (C) módulo de elasticidade e (D) módulo de ruptura. Onde CAS - concentração de caseinato de sódio, FI - força iônica e T - temperatura de mistura dos componentes.

Nota-se ainda que, estatisticamente, as proteínas do leite e a carragena não foram variáveis linearmente significativas (Figura 4.18A) sobre a tensão na ruptura. Comportamento semelhante foi obtido com os efeitos significativos ocorridos sobre o módulo de elasticidade e com o módulo de ruptura, sendo que nesse último o caseinato de sódio apresentou um pequeno efeito negativo.

Quanto à deformação na ruptura, o caseinato de sódio foi a única variável a apresentar efeito significativo linear sobre esta propriedade (Figura 4.18 B). Além dos coeficientes lineares, na Tabela 4.14 também se encontram os coeficientes quadráticos e de interação para a tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade.

Tabela 4.14: Valores dos coeficientes significativos dos modelos matemáticos codificados do sistema de biopolímeros com adição da mistura de sais (KCl/NaCl). Onde: b_i são os coeficientes da regressão com os sub-índices, 1 – concentração de caseinato de sódio, 2 - concentração de CPS, 3 - concentração de carragena, 4 - concentração da mistura salina KCl/NaCl, 5 - $T(^{\circ}C)$ de mistura dos componentes e Y - tensão na ruptura, deformação na ruptura, módulo de elasticidade ou módulo de ruptura.

Coeficientes	Y				
	Tensão na ruptura (kPa)	Deformação na ruptura	Módulo de Elasticidade (kPa)	Módulo de ruptura (kPa)	
b_0	1,98	0,25	6,92	5,77	
linear	b_1	-	0,045	-	-1,98
	b_2	-	-	-	-
	b_3	-	-	-	-
	b_4	-3,74	-	-10,81	-11,76
	b_5	2,45	-	8,80	5,00
quadrático	b_{11}	-	-	-	2,53
	b_{22}	-	-	3,19	-
	b_{33}	-	-	-	-
	b_{44}	2,30	0,027	8,21	5,88
	b_{55}	0,70	-	1,89	1,82
interações	b_{12}	-	-	-	-
	b_{13}	-	-	-	-
	b_{14}	0,51	0,021	-	-
	b_{15}	-0,52	-0,032	-	-
	b_{23}	-	-	-	-
	b_{24}	-	-	-	-
	b_{25}	-	-	-	-
	b_{34}	-	-	-	-
	b_{35}	-	-	-	-
	b_{45}	-2,34	-0,041	-3,46	-9,43

Através da análise de variância (ANOVA) puderam ser avaliados os modelos ajustados aos dados experimentais. Nas Tabelas 4.15, 4.16, 4.17 e 4.18 são mostradas as Tabelas da análise de variância para tensão na ruptura, deformação na ruptura, módulos de elasticidade e de ruptura, respectivamente.

Tabela 4.15: Análise de variância do modelo matemático da tensão na ruptura do planejamento fatorial completo com adição de sal.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f_{calc}	f_{tab}
Regressão	$1,70 \cdot 10^{+03}$	7	242,90	223,97	2,29
Resíduos	$3,69 \cdot 10^{+01}$	34	1,08		
Erro	36,87	34			
Total	1737,19	41			
$R^2=$	0,98				
$R=$	0,99				

Tabela 4.16: Análise de variância do modelo matemático da deformação na ruptura do planejamento fatorial completo com adição de sal.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f_{calc}	f_{tab}
Regressão	$2,45 \cdot 10^{-01}$	6	0,04	8,26	2,37
Resíduos	$1,73 \cdot 10^{-01}$	35	$4,93 \cdot 10^{-03}$		
Erro	0,17	35			
Total	0,42	41			
$R^2=$	0,59				
$R=$	0,77				

Tabela 4.17: Análise de variância do modelo matemático do módulo de elasticidade do planejamento fatorial completo com adição de sal.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f_{calc}	f_{tab}
Regressão	$1,54 \cdot 10^{+04}$	6	2562,75	208,10	2,37
Resíduos	$4,31 \cdot 10^{+02}$	35	$1,23 \cdot 10^{+01}$		
Erro	431,02	35			
Total	15807,51	41			
$R^2=$	0,97				
$R=$	0,99				

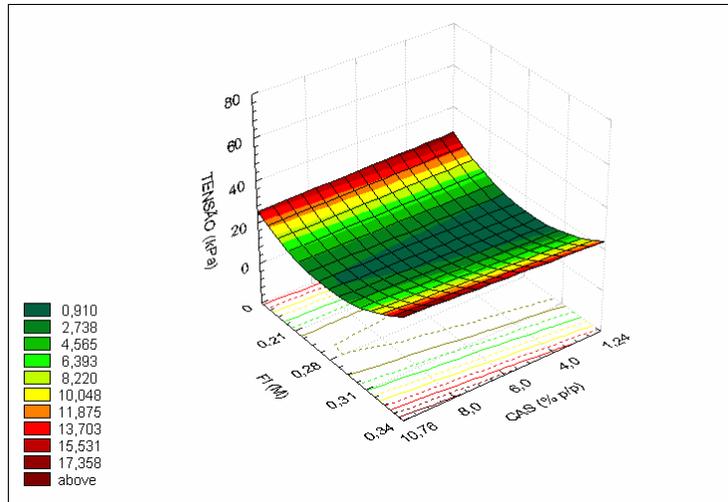
Tabela 4.18: Análise de variância do modelo matemático do módulo de ruptura do planejamento fatorial completo com adição de sal.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f_{calc}	f_{tab}
Regressão	$1,15 \cdot 10^{+04}$	7	1641,53	53,69	2,29
Resíduos	$1,04 \cdot 10^{+03}$	34	$3,06 \cdot 10^{+01}$		
Erro	1039,44	34			
Total	12530,14	41			
$R^2=$	0,92				
$R=$	0,96				

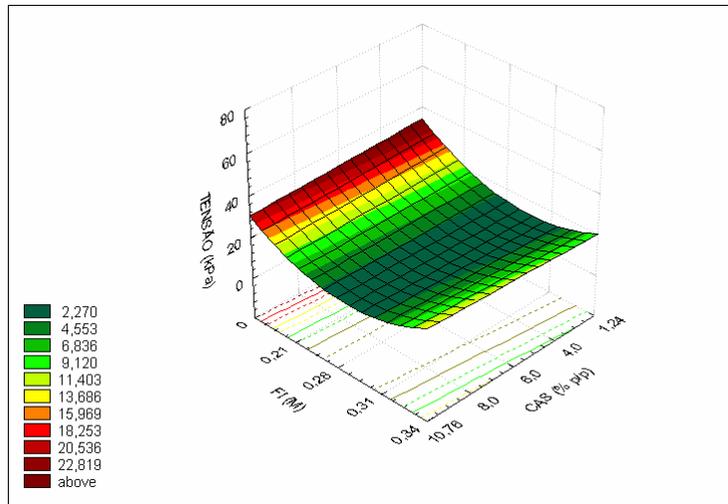
Constatou-se que todos os modelos obtidos foram significativos a um nível de confiança de 95%, pois os valores de $f_{\text{calculado}}$ (f_{cal}) foram muito maiores que o f_{tabelado} (f_{tab}), sendo, portanto válidos para explicar o comportamento das variáveis no sistema.

Através dos modelos obtidos, é possível explicar o comportamento das variáveis independentes e de suas interações, notando-se que na análise de tensão de ruptura há nítida influência do aumento da temperatura sobre a força do gel. Os valores de tensão na ruptura obtidos (Tabela 4.13) mostram que a interação do sal com a água não favoreceu a obtenção de géis duros, sendo estes formados, provavelmente, por interações CPS-temperatura devido à desnaturação (mudanças conformacionais) dessa proteína, que se agregam via ligações covalentes e não-covalentes (VERHEUL & ROEFS, 1998). Tal resultado indica que com temperaturas superiores a 80°C, poderia haver um aumento da tensão de ruptura.

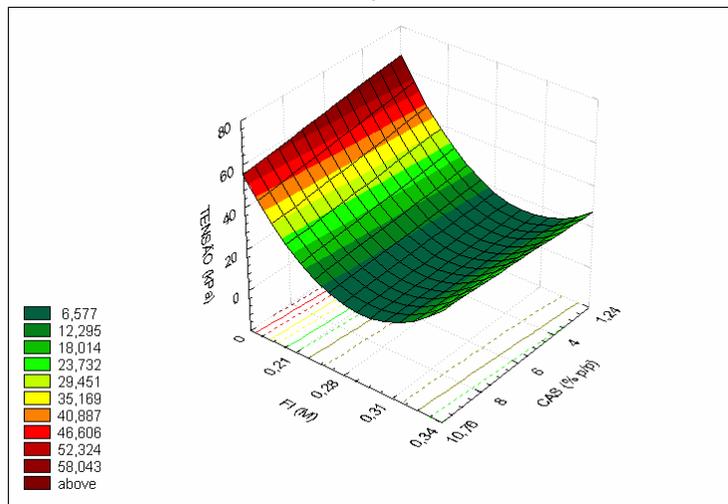
Na Figura 4.19, este efeito pode ser melhor observado a partir da superfície de resposta representando o caseinato e a força iônica com a variação de temperatura. Observa-se que com o aumento da temperatura ocorre um forte aumento na tensão de ruptura, porém a elevação da força iônica levou a um decréscimo nessa propriedade. Tanto a adição de sacarose quanto a adição de sal modificaram as interações nestes sistemas devido à mudança da qualidade do solvente, porém no primeiro caso facilitou as interações biopoliméricas e no segundo uma agregação desordenada. O modelo para tensão na ruptura mostra ainda uma interação de pequena intensidade entre o caseinato de sódio-FI, que pode ser visualizado nos extremos de concentração de sal. De maneira geral, a força iônica decresceu a tensão, pois diminui a repulsão eletrostática, facilitando a rápida agregação proteína-proteína antes de alcançar o pI (decrécimo lento do pH), diminuindo a força do gel, devido à formação de estruturas heterogêneas e particuladas.



a



b

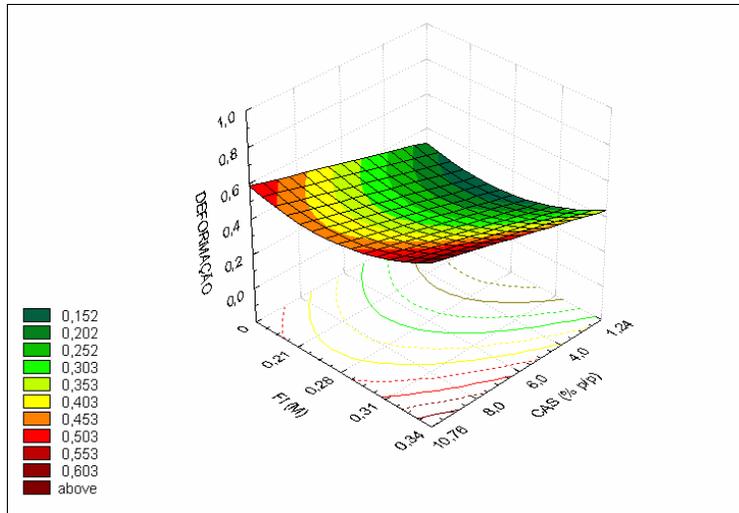


c

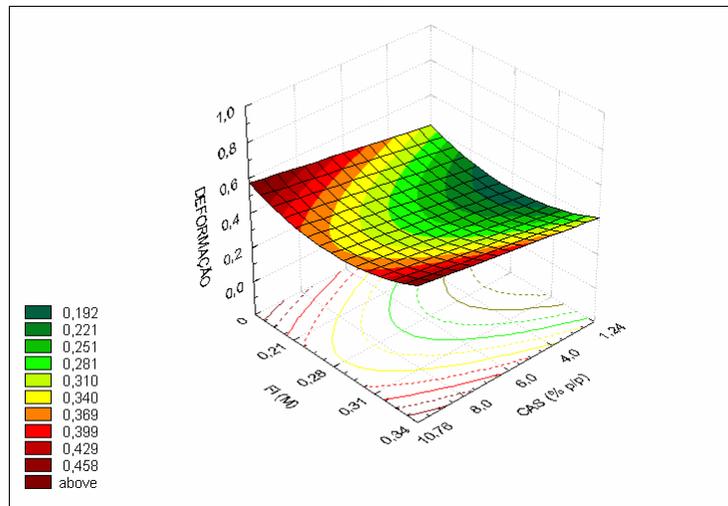
Figura 4.19: Superfícies de resposta ($p < 0,05$) na análise de tensão na ruptura dos géis com adição de sal. Comportamento das variáveis caseinato de sódio (CAS) e força iônica (FI) nas temperaturas de: a) 30°C b) 55°C e c) 80°C.

A adição de sal aumenta a temperatura de desnaturação das proteínas do soro (BOYE *et al.*, 1997a, PUPPO & ANON, 1999), como pode ser observado na seção 4.2, porém o efeito do sal na gelificação destes biopolímeros também depende de seu efeito eletrostático, como visto anteriormente. A quantidade de íons no sistema estudado proveniente dos biopolímeros, especialmente do caseinato de sódio, e da mistura salina (KCl e NaCl), contribuíram para o aumento da força iônica. No entanto, deve-se considerar que esse balanço de cargas é complexo, pois vale lembrar que, além da adição de sais, o pH é baixo devido à ação do GDL. O sal, em baixas concentrações, pode proteger as cargas superficiais das moléculas de proteína, contribuindo no balanço entre forças atrativas e repulsivas. Além disso, se o pH estiver longe do ponto isoelétrico da proteína e a força iônica do sistema for baixa, finos agregados lineares (da ordem de nm) são formados, devido a forças repulsivas entre as moléculas de proteína.

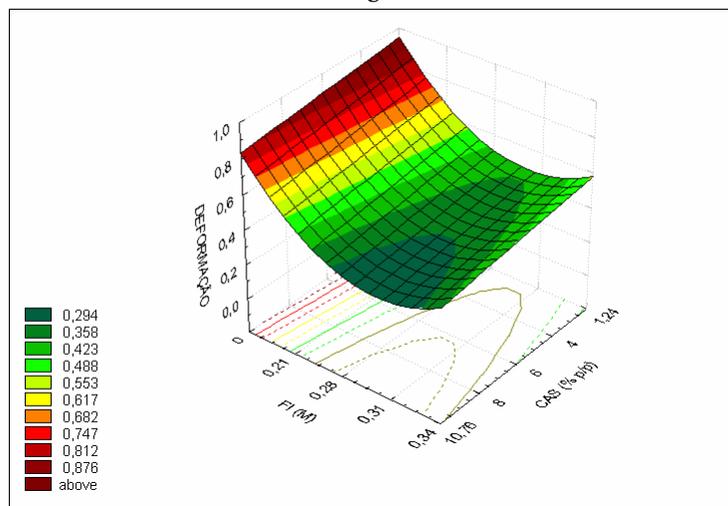
O comportamento desse sistema quando se avaliou a deformação na ruptura, pode ser visto na Figura 4.20. Nessa Figura podem ser observados os efeitos obtidos da concentração do caseinato de sódio e da força iônica, com a variação da temperatura nos níveis estudados. É notável que a rede de caseinato de sódio foi a responsável pela deformabilidade dos géis e que a adição de sais modificou esta propriedade. Nota-se que o aumento da força iônica diminuiu a deformabilidade da rede devido à agregação desordenada do caseinato, mas este efeito foi observado nas menores concentrações de proteína. Além disso, dependendo da temperatura de mistura, ou seja, a medida que esta aumenta, um gel mais forte é formado com baixas concentrações de caseinato de sódio e de sais.



a



b



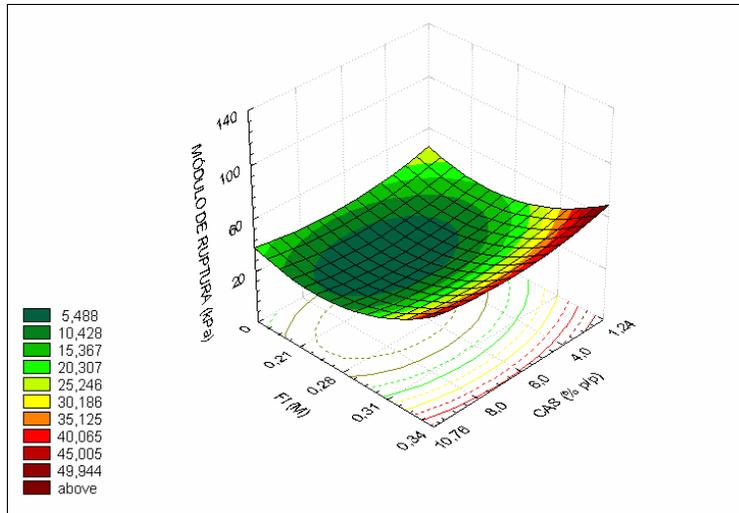
c

Figura 4.20: Superfícies de resposta ($p < 0,05$) na análise de deformação na ruptura. Comportamento das variáveis caseinato de sódio (CAS) e força iônica (FI) nas temperatura de a) 30°C, b) 55°C e c) 80°C.

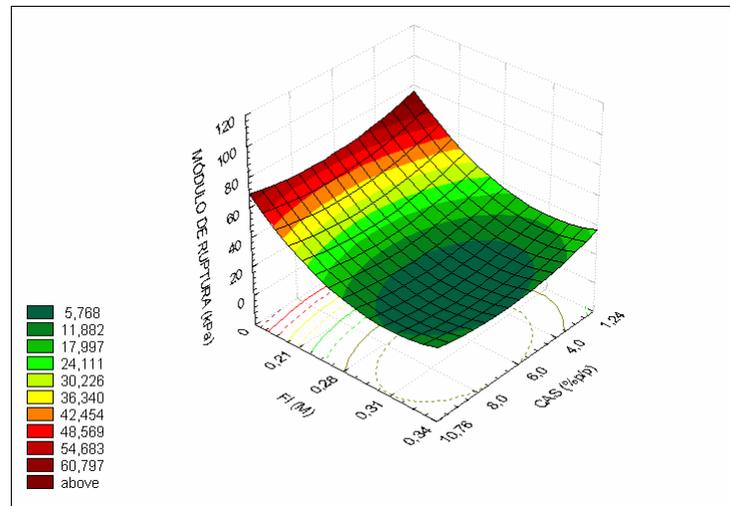
A temperatura também influenciou de maneira efetiva nos módulos de elasticidade e de ruptura. O módulo de elasticidade seguiu as mesmas tendências da tensão da ruptura e, por isto, a superfície de resposta para esta propriedade não foi apresentada. Com relação ao módulo de ruptura, novamente, com o aumento da temperatura e a menor força iônica, ocorreu o aumento dessa propriedade como pode ser observado na Figura 4.21. Assim, os menores valores do módulo de ruptura foram obtidos com a diminuição da temperatura e tendo a força iônica alta, porém a concentração do caseinato de sódio exerceu pouca influência sobre esta propriedade, como pode ser observado.

A pH próximos ao pI ou com alta força iônica, a agregação é rápida, devido à diminuição das interações repulsivas entre as moléculas das proteínas e/ou polissacarídeo. Agregados esféricos (da ordem de μm) com separação de fase local são formados, levando a géis particulados com baixa capacidade de retenção de água (BOYE *et al.*, 1997b, VERHEUL & ROEFS, 1998), semelhantes aos obtidos nesse trabalho.

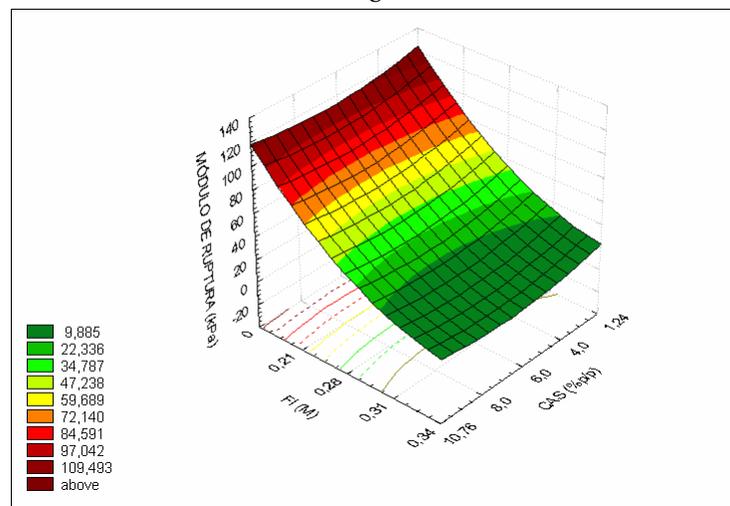
Portanto, a força iônica e a temperatura de mistura definiram as características reológicas do sistema com sal, provavelmente afetando mais a rede de caseinato de sódio-CPS que a de carragena-caseinato ou carragena-carragena. Provavelmente ocorre um aumento das ligações hidrofóbicas e eletrostáticas, e diminuição das pontes de hidrogênio, levando a uma rede muito mais fraca.



a



b



c

Figura 4.21: Superfícies de resposta ($p < 0,05$) na análise do módulo de ruptura. Comportamento das variáveis caseinato de sódio (CAS) e força iônica (FI) nas temperatura de: a) 30°C, b) 55°C e c) 80°C.

4.3.3 Ensaios relaxação de tensões - géis com adição de sacarose

Nas análises dos resultados de relaxação de tensões os géis, obtidos nas condições estabelecidas pelo planejamento fatorial completo, também se utilizaram dois elementos na equação de Maxwell generalizada, tal como no planejamento fatorial fracionário, bem como os mesmos critérios de ajuste. Os módulos elástico e viscoso dos géis foram determinados através das Equações 3.5 e 3.6, sendo que os valores obtidos foram utilizados na análise estatística do planejamento fatorial completo 2^5 (Tabela 4.19). Os parâmetros ajustados estão na mesma ordem de grandeza dos determinados para o queijo “Port Salut Argentino” em estudo realizado anteriormente por Bertola *et al.* (1991). Nas Figuras 4.22 e 4.23 estão apresentadas as variáveis que produziram efeito significativo nos módulos elástico (E_1) e viscoso (η_1), respectivamente, que eram os de maior magnitude e, portanto, os mais importantes.

Na Figura 4.22 pode-se constatar, pela análise estatística, que as concentrações de caseinato de sódio e carragena apresentaram efeitos significativos e positivos no módulo elástico dos géis com açúcar, ou seja, contribuíram no aumento da firmeza e elasticidade da rede. Por outro lado, as variáveis concentração de CPS e sacarose mostraram efeitos significativos negativos. Estes resultados foram similares aos obtidos para tensão na ruptura e módulo de elasticidade, com exceção do fato de a sacarose ter apresentado efeito significativo. Com relação à análise do módulo viscoso dos géis, as variáveis que exerceram efeitos significativos foram as mesmas e seguiram o mesmo comportamento do módulo elástico, tal como pode ser observado na Figura 4.23.

Tabela 4.19: Respostas do planejamento completo 2^5 , parâmetros da equação de Maxwell ajustados aos dados de relaxação de tensões dos géis com adição de sacarose.

Ensaio	Variáveis					Parâmetros				
	CAS	CPS	CAR	SAC	T	E_1 (kPa)	E_2 (kPa)	η_1 (kPa.s)	η_2 (kPa.s)	E_∞ (kPa)
1	-1	-1	-1	-1	-1	6,26	3,98	1034,11	28,49	2,44
2	1	-1	-1	-1	-1	15,25	11,46	1760,51	64,94	2,90
3	-1	1	-1	-1	-1	6,84	3,65	767,22	19,45	3,23
4	1	1	-1	-1	-1	12,88	9,28	1346,02	65,46	2,74
5	-1	-1	1	-1	-1	13,00	6,03	1937,95	45,83	6,28
6	1	-1	1	-1	-1	29,56	24,38	3870,61	176,81	9,62
7	-1	1	1	-1	-1	7,27	2,91	827,01	25,38	2,37
8	1	1	1	-1	-1	9,83	4,57	1021,59	33,36	2,20
9	-1	-1	-1	1	-1	2,30	4,45	216,55	1,47	2,20
10	1	-1	-1	1	-1	9,69	23,22	833,50	8,45	10,41
11	-1	1	-1	1	-1	4,55	3,70	909,93	23,15	3,46
12	1	1	-1	1	-1	6,53	6,16	1006,13	37,29	2,72
13	-1	-1	1	1	-1	7,85	4,76	760,49	29,61	6,04
14	1	-1	1	1	-1	14,72	12,63	1441,56	79,39	7,41
15	-1	1	1	1	-1	4,78	4,49	890,50	30,70	6,63
16	1	1	1	1	-1	9,43	13,34	1342,99	98,16	5,05
17	-1	-1	-1	-1	1	5,38	5,65	872,07	31,61	4,22
18	1	-1	-1	-1	1	11,95	14,44	1688,73	109,68	2,90
19	-1	1	-1	-1	1	5,76	4,70	383,86	32,17	2,37
20	1	1	-1	-1	1	9,24	10,29	849,04	56,58	6,57
21	-1	-1	1	-1	1	10,12	6,35	1404,27	52,49	8,46
22	1	-1	1	-1	1	16,84	17,81	2276,13	91,69	15,26
23	-1	1	1	-1	1	6,93	5,89	477,57	41,21	6,07
24	1	1	1	-1	1	11,88	13,55	1061,14	55,60	10,20
25	-1	-1	-1	1	1	7,43	5,47	682,81	36,40	8,30
26	1	-1	-1	1	1	9,83	9,89	950,16	54,54	9,58
27	-1	1	-1	1	1	6,80	3,26	962,30	27,65	4,09
28	1	1	-1	1	1	8,63	9,88	1248,62	72,53	1,66
29	-1	-1	1	1	1	17,63	17,67	1869,44	126,10	14,24
30	1	-1	1	1	1	17,47	19,75	1937,63	128,20	10,79
31	-1	1	1	1	1	7,18	4,46	988,59	37,31	6,56
32	1	1	1	1	1	7,05	5,27	1072,36	30,12	6,12
33	-2,38	0	0	0	0	3,13	2,09	415,26	9,38	4,74
34	2,38	0	0	0	0	12,81	11,22	1520,66	55,68	9,78
35	0	-2,38	0	0	0	11,11	7,45	1425,09	41,10	9,46
36	0	2,38	0	0	0	5,42	4,58	704,74	21,65	8,58
37	0	0	-2,38	0	0	2,58	1,72	306,10	8,27	0,77
38	0	0	2,38	0	0	12,31	8,43	1588,56	55,87	9,37
39	0	0	0	-2,38	0	12,82	8,34	1578,62	51,40	7,49
40	0	0	0	2,38	0	9,55	6,62	1113,35	33,41	8,94
41	0	0	0	0	-2,38	10,83	7,50	1267,90	48,19	5,86
42	0	0	0	0	2,38	11,45	8,76	1278,94	55,00	6,90
43	0	0	0	0	0	12,07	8,83	1466,08	52,26	4,53
44	0	0	0	0	0	12,00	9,86	1428,24	52,85	4,62
45	0	0	0	0	0	12,00	8,91	1451,85	57,70	4,50
46	0	0	0	0	0	12,05	8,80	1418,15	50,22	4,64

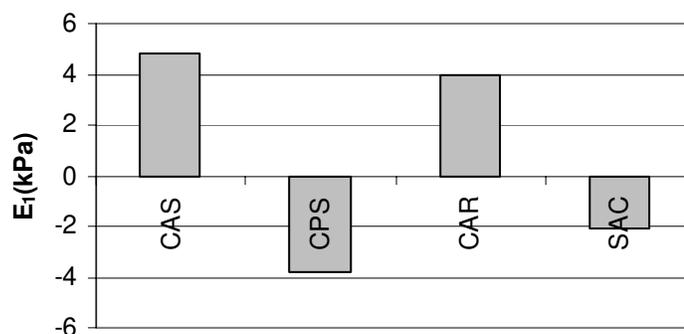


Figura 4.22: Efeitos lineares significativos sobre o módulo elástico obtidos a partir da análise do planejamento fatorial completo ($p < 0,05$) para o sistema de biopolímeros quando adicionados de sacarose. Onde CAS - concentração de caseinato de sódio, CPS - concentração de concentrado protéico de soro, CAR - concentração de carragena, SAC – concentração de sacarose.

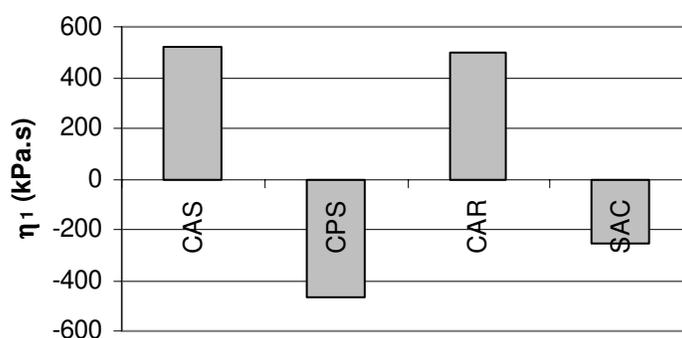


Figura 4.23: Efeitos lineares significativos sobre o módulo viscoso obtidos a partir da análise do planejamento fatorial completo ($p < 0,05$) para o sistema de biopolímeros quando adicionados de sacarose. Onde CAS - concentração de caseinato de sódio, CPS - concentração de concentrado protéico de soro, CAR - concentração de carragena, SAC – concentração de sacarose.

Os modelos matemáticos para a predição dos módulos elástico e viscoso dos géis, gerados a partir dos dados obtidos pelo planejamento experimental fatorial completo, encontram-se na Tabela 4.20. Nas Tabelas 4.21 e 4.22 podem ser visualizados os resultados da análise de variância (ANOVA), verifica-se que o $f_{\text{calculado}}$ é muito maior que o f_{tabelado} (aproximadamente dez vezes) em ambos os casos, dessa maneira foi possível gerar superfícies de respostas que são apresentadas nas Figuras 4.24 a 4.26.

O modelo para o módulo elástico mostra que os efeitos lineares foram mais pronunciados que os efeitos quadráticos e de interação, sendo esta propriedade mais influenciada positivamente pela concentração de caseinato de sódio e carragena (Tabela 4.20). A sacarose pode agir favorecendo as interações proteína-proteína, tal como observado em sistemas contendo proteínas do leite e sacarose (KULMYRZAEV *et al.*, 2000).

Tabela 4.20: Valores dos coeficientes significativos dos modelos matemáticos codificados para a predição dos módulos elástico e viscoso do sistema de biopolímeros com adição de sacarose ($p < 0,05$). Onde: b_i são os coeficientes da regressão com os sub-índices, 1 – concentração de caseinato de sódio, 2 - concentração de CPS, 3 - concentração de carragena, 4 - concentração de sacarose, 5 - $T(^{\circ}C)$ de mistura dos componentes e Y- módulo elástico ou módulo viscoso.

Coeficientes		Y	
		Módulo Elástico	Módulo Viscoso
b ₀		11,81	1209,89
Linear	b ₁	2,39	262,02
	b ₂	-1,92	-233,01
	b ₃	1,97	247,42
	b ₄	-1,04	-128,59
	b ₅	-	-
quadrático	b ₁₁	-0,62	-
	b ₂₂	-0,57	-
	b ₃₃	-0,71	-
	b ₄₄	-	-
	b ₅₅	-	-
interações	b ₁₂	-0,94	-101,26
	b ₁₃	-	-
	b ₁₄	-0,97	-113,04
	b ₁₅	-0,92	-
	b ₂₃	-1,75	-226,59
	b ₂₄	-	245,01
	b ₂₅	-	-
	b ₃₄	-	-
	b ₃₅	-	-
	b ₄₅	1,41	183,20

Tabela 4.21: Análise de variância do modelo matemático do planejamento fatorial completo para o módulo elástico do sistema de biopolímeros, com adição de sacarose.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f _{calc}	f _{tab}
Regressão	8,69 10 ⁺²	9	96,57	21,30	2,15
Resíduos	1,63 10 ⁺²	36	4,53		
Erro	1,63 10 ⁺²	36			
Total	1,03 10 ⁺³	45			
R ² =	0,84				
R=	0,92				

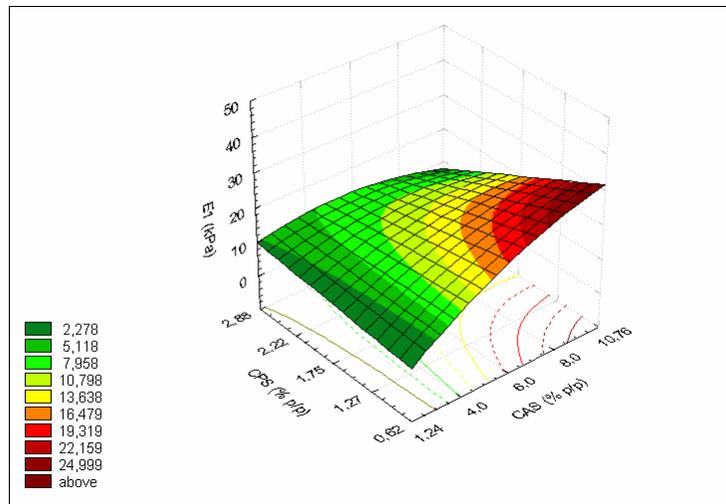
Tabela 4.22: Análise de variância do modelo matemático do planejamento fatorial completo para o módulo viscoso do sistema de biopolímeros, com adição de sacarose.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	fcalc	ftab
Regressão	1,41 10 ⁺⁷	9	1,56 10 ⁺⁶	21,71	2,15
Resíduos	2,59 10 ⁺⁶	36	72007,11		
Erro	2,59 10 ⁺⁶	36			
Total	1,67 10 ⁺⁷	45			
R ² =	0,84				
R=	0,92				

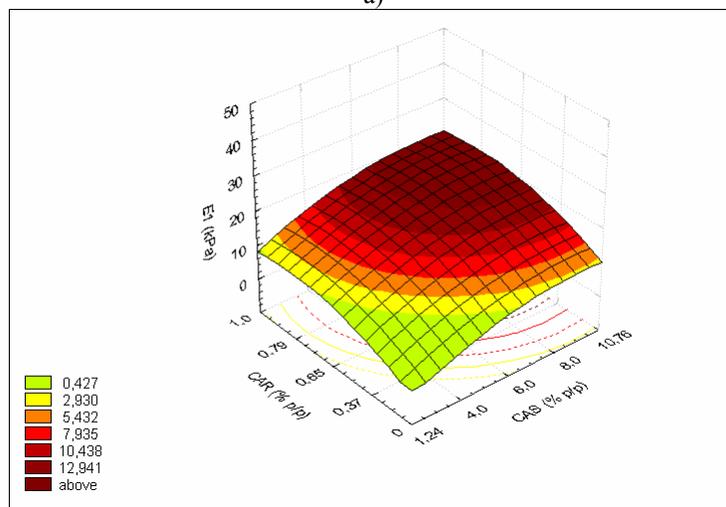
A adição de açúcar favorece interações atrativas mais fortes entre proteínas (FARRELL & MORA-GUTIERREZ, 2000), como em géis de caseinato de sódio (ANTIPOVA *et al.*, 1999). Dickinson & Merino (2002) no estudo de emulsões estabilizadas por caseinato, notaram que a presença de açúcares pode ter aumentado efetivamente o número de interações entre as partículas, levando a um maior grau de interconectividade da microestrutura do gel.

No entanto, o módulo elástico diminuiu na presença de sacarose, apesar de um provável aumento das interações entre as proteínas do caseinato de sódio. Isso pode estar indicando que a força da rede está mais associada às interações caseinato-carragena e que também pode haver uma exclusão do CPS da rede, favorecida pela sacarose, tal como se observa na Figura 4.24. O efeito negativo da sacarose sobre o módulo elástico também poderia estar associado à diminuição das interações entre as proteínas do soro, uma vez que os grupos sulfidrila não foram totalmente expostos durante o tratamento térmico, devido a um possível aumento da temperatura de desnaturação da β -Lg com adição de açúcar.

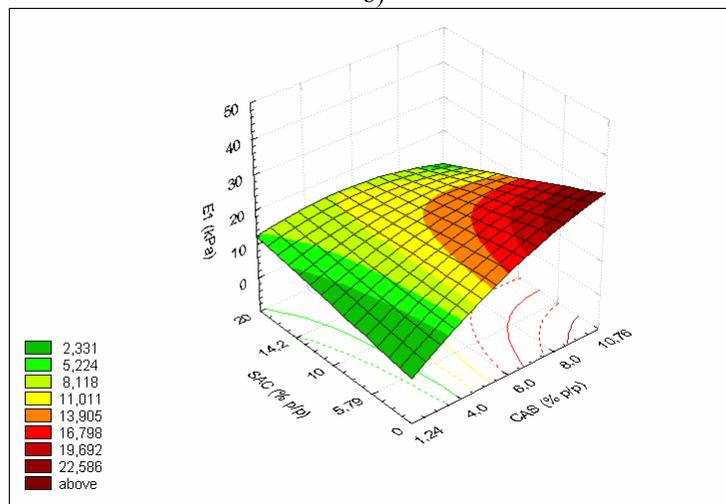
Na Figura 4.24 a, pode ser observada a superfície de resposta obtida com o CPS e com o caseinato de sódio, em que se nota que o aumento do módulo acontece com o aumento da concentração de caseinato e diminuição da concentração de CPS, indicando que esse efeito poderia ser ainda mais pronunciado na ausência do CPS.



a)



b)



c)

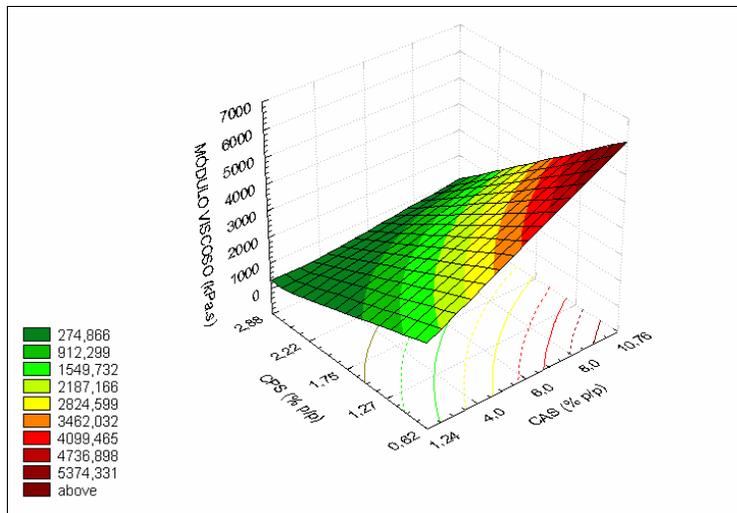
Figura 4.24: Superfícies de resposta na análise do módulo elástico dos géis com adição de sacarose. Comportamento das variáveis a) concentrado protéico de soro (CPS) e caseinato de sódio (CAS), b) caseinato de sódio (CAS) e carragena (CAR) e c) caseinato de sódio (CAS) e sacarose (SAC). As demais variáveis foram fixadas no valor do ponto central.

O efeito interativo caseinato-carragena pode ser visualizado na Figura 4.21b, em que o aumento da concentração de ambos implicou no aumento do módulo elástico. Segundo TZIBOULA & HORNE (1999), na mistura de carragena com proteínas do leite podem ocorrer dois eventos independentes e antagônicos: (i) a formação de um complexo entre a carragena e as proteínas do soro, que interfere na formação do gel, e (ii) formação de uma rede elástica de carragena e o meio gelificado.

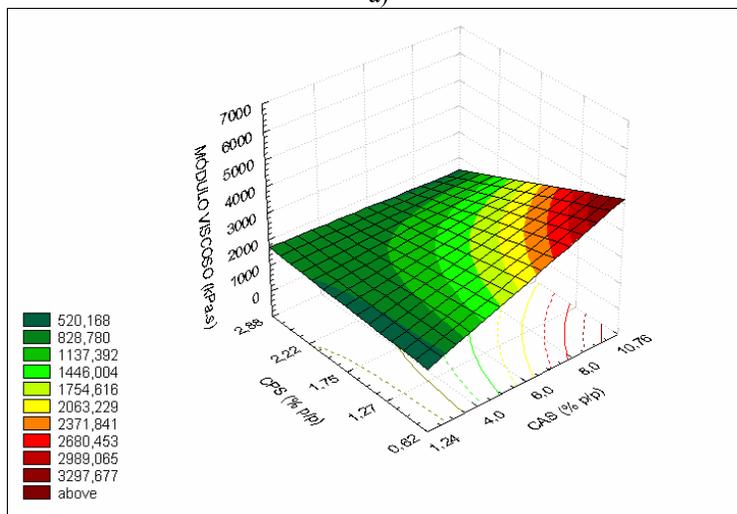
O complexo proteínas do leite-carragena é aprisionado nesta rede e as características reológicas dessas misturas são governadas por fatores que influenciam ambos os eventos citados. Na Figura 4.24c, pode-se ver o efeito antagônico mostrado pela sacarose, pois nota-se que em baixas concentrações, o módulo elástico teria um aumento fortemente dependente da concentração de caseinato de sódio, pois o efeito negativo do açúcar é mais notório que a elevação da concentração da proteína.

A diminuição do módulo elástico (E_i) representa um decréscimo da elasticidade ou firmeza do produto, já o módulo viscoso (η_i), está associado à característica de maciez do mesmo (BERTOLA *et al.* 1991). O comportamento descrito pelo ajuste do modelo para o módulo viscoso dos géis, mostra que o caseinato de sódio e a carragena contribuíram no aumento desta propriedade, ou seja, diminuíram a maciez do sistema, já o CPS e a sacarose produziram efeito contrário.

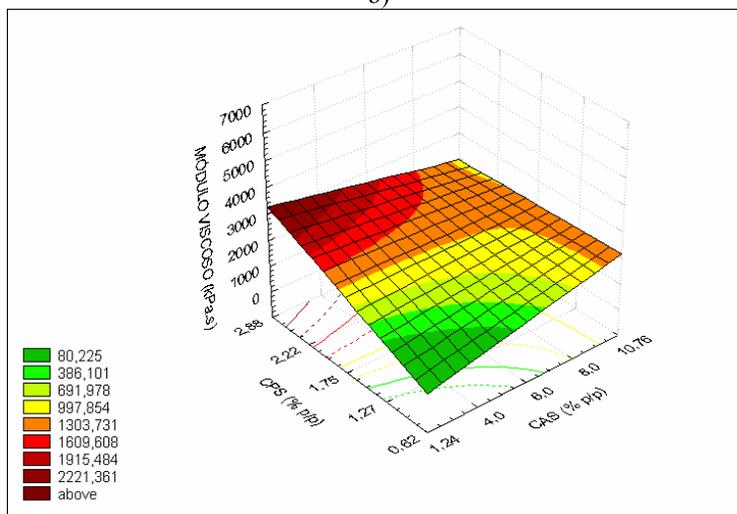
Na Figura 4.25, pode-se observar que com o aumento da concentração de CPS há uma tendência de diminuição do módulo viscoso do material, exceto a baixas concentrações de caseinato e a altas concentrações de sacarose. No entanto, os maiores valores foram obtidos na faixa superior de concentração (8 a 10,76 %) do caseinato de sódio no sistema e baixas concentrações de sacarose e CPS.



a)



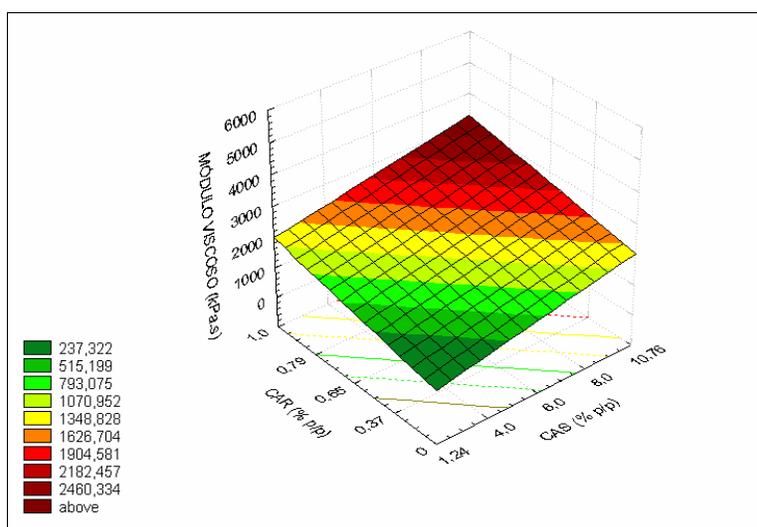
b)



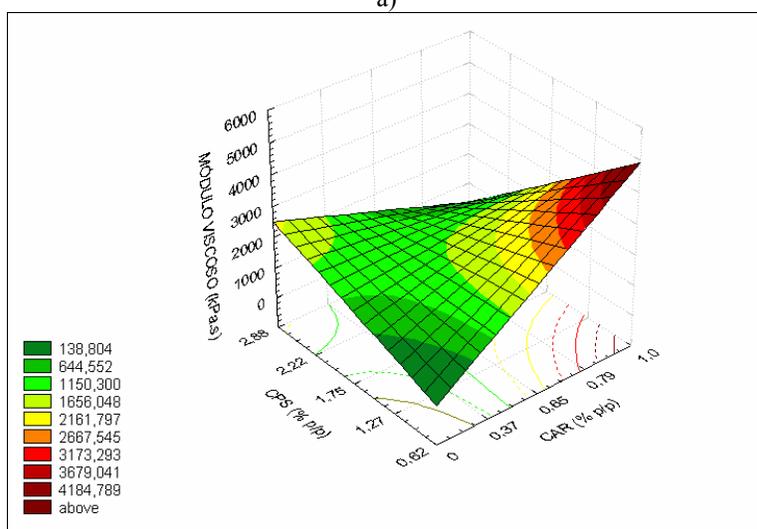
c)

Figura 4.25: Superfícies de resposta na análise do módulo viscoso dos géis com adição de sacarose. Comportamento das variáveis concentrado protéico de soro (CPS) e caseinato de sódio (CAS). Sacarose nas concentrações de: a) 0%, b) 10% (p/p) e c) 20% (p/p).

O comportamento ocorrido entre o polissacarídeo e as proteínas pode ser visualizado na Figura 4.26. Os resultados observados nas Figura 4.26a e a 4.26b, indicam novamente que a interação entre o caseinato e a goma foi importante na formação da rede destes géis, pois a carragena e a κ -caseína interagem para formar um complexo que se agrega em uma rede tridimensional (STAINSBY, 1980), sendo responsável pelo aumento dos módulos.



a)



b)

Figura 4.26: Superfícies de resposta na análise do módulo viscoso dos géis com adição de sacarose. Comportamento das variáveis a) caseinato de sódio (CAS) e carragena (CAR) e b) carragena (CAR) e concentrado protéico de soro (CPS). Outras variáveis com valor no ponto central.

Na Figura 4.26b é apresentado o comportamento do CPS e da carragena, sendo que o módulo viscoso tem um valor máximo em elevadas concentrações de polissacarídeo e baixos valores de concentração do CPS. As interações entre proteínas do soro e κ -carragena são favoráveis a valores de pH superiores a 5 e este efeito sinérgico é maior, quando a proteína passa por tratamento térmico (MLEKO *et al.*, 1997).

Esse mecanismo não está relacionado com a penetração da κ -carragena nos agregados de β -lactoglobulina, porém está claro que a κ -carragena acelera o processo de agregação das proteínas do soro (CAPRON *et al.*, 1999). No entanto, neste trabalho esta sinergia não foi observada e um dos motivos pode estar associado ao pH estudado, que era ao redor de 4,6, favorecendo a agregação proteína-proteína e, em função dos resultados obtidos, também a forte interação caseína-carragena.

4.3.4 Ensaios de relaxação de tensões - géis com adição de sal (KCl/NaCl)

Da mesma maneira que foi realizado para os géis com adição de açúcar, o ajuste da equação de Maxwell aos dados dos ensaios de relaxação de tensões permitiu a determinação dos módulos elástico e viscoso dos géis com adição da mistura salina KCl/NaCl. Nas Figuras 4.27 e 4.28 são apresentadas as variáveis que produziram efeito significativo sobre os principais módulos elástico (E_1) e viscoso (η_1), respectivamente.

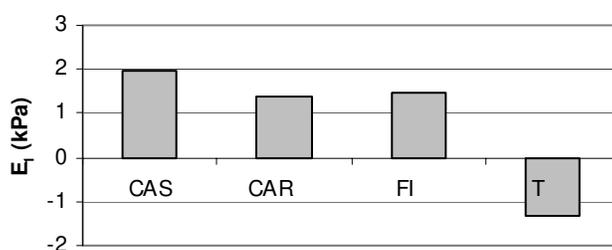


Figura 4.27: Efeitos lineares significativos do planejamento fatorial completo ($p < 0,05$) sobre o módulo elástico ocorridos para o sistema de biopolímeros quando adicionado da mistura salina KCl/NaCl. Onde CAS - concentração de caseinato de sódio, CPS - concentração de concentrado protéico de soro, CAR - concentração de carragena, FI - força iônica e T - temperatura de mistura dos componentes.

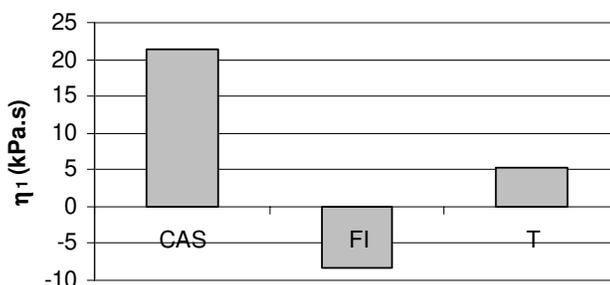


Figura 4.28: Efeitos lineares significativos do planejamento fatorial completo ($p < 0,05$) sobre o módulo viscoso ocorridos para o sistema de biopolímeros quando adicionado da mistura salina KCl/NaCl. Onde CAS - concentração de caseinato de sódio, FI - força iônica e T - temperatura de mistura dos componentes.

As respostas do planejamento experimental fatorial completo 2^5 encontram-se na Tabela 4.23. A partir dos resultados obtidos no ponto central (formulações 43 - 46) pode-se

observar que houve uma forte queda dos valores médios dos módulos elástico e viscoso, quando comparados com os géis com açúcar (Tabela 4.23).

Tabela 4.23: Respostas do planejamento completo 2⁵ dos parâmetros de ajuste do modelo de Maxwell aos dados de relaxação de tensões dos géis com adição da mistura salina KCl/NaCl.

Ensaio	Variáveis independentes					Respostas				
	Cas	CPS	Car	FI	T	E ₁ (kPa)	E ₂ (kPa)	η ₁ (kPa.s)	η ₂ (kPa.s)	E _∞ (kPa)
1	-1	-1	-1	-1	-1	3,04	3,10	12,31	3,10	1,16
2	1	-1	-1	-1	-1	0,96	0,40	60,13	5,80	9,62
3	-1	1	-1	-1	-1	2,67	0,27	12,98	4,09	4,10
4	1	1	-1	-1	-1	2,45	0,29	32,82	3,63	0,11
5	-1	-1	1	-1	-1	1,48	0,01	5,88	0,12	0,99
6	1	-1	1	-1	-1	5,02	0,22	34,36	1,92	0,01
7	-1	1	1	-1	-1	5,23	0,51	17,23	5,80	4,27
8	1	1	1	-1	-1	7,29	0,14	57,34	1,33	0,13
9	-1	-1	-1	0,53	-1	-	-	-	-	-
10	1	-1	-1	0,53	-1	16,54	1,46	77,76	1,02	5,93
11	-1	1	-1	0,53	-1	2,52	0,54	8,98	2,56	0,32
12	1	1	-1	0,53	-1	-	-	-	-	-
13	-1	-1	1	0,53	-1	-	-	-	-	-
14	1	-1	1	0,53	-1	14,12	1,02	60,76	7,99	2,74
15	-1	1	1	0,53	-1	-	-	-	-	-
16	1	1	1	0,53	-1	19,55	4,29	60,66	3,33	30,56
17	-1	-1	-1	-1	1	12,20	0,59	45,49	7,49	5,78
18	1	-1	-1	-1	1	2,45	1,00	57,73	1,19	10,19
19	-1	1	-1	-1	1	5,40	0,59	50,96	8,36	3,31
20	1	1	-1	-1	1	1,37	0,94	43,56	1,06	2,13
21	-1	-1	1	-1	1	6,74	21,47	12,78	2,69	13,99
22	1	-1	1	-1	1	6,66	0,86	41,87	1,43	5,56
23	-1	1	1	-1	1	4,30	0,92	52,40	1,54	10,23
24	1	1	1	-1	1	2,75	1,19	62,65	2,21	8,67
25	-1	-1	-1	0,53	1	2,66	0,33	29,85	3,84	0,71
26	1	-1	-1	0,53	1	2,14	0,29	33,34	3,15	0,44
27	-1	1	-1	0,53	1	2,90	0,53	15,06	6,89	1,97
28	1	1	-1	0,53	1	1,15	0,49	6,34	4,60	1,59
29	-1	-1	1	0,53	1	2,78	0,58	13,20	6,33	6,36
30	1	-1	1	0,53	1	5,84	0,35	32,61	4,14	0,63
31	-1	1	1	0,53	1	4,50	0,41	31,29	5,10	3,69
32	1	1	1	0,53	1	5,98	0,34	34,26	2,77	5,04
33	-2,38	0	0	0	0	0,77	0,04	5,10	0,33	0,18
34	2,38	0	0	0	0	6,25	0,42	48,54	5,14	3,11
35	0	-2,38	0	0	0	8,17	1,10	59,30	14,56	5,83
36	0	2,38	0	0	0	5,51	0,34	35,85	4,56	1,08
37	0	0	-2,38	0	0	1,90	0,17	9,75	1,27	0,06
38	0	0	2,38	0	0	3,26	0,05	9,38	0,59	0,13
39	0	0	0	-2,47	0	12,67	8,30	1578,47	51,34	7,22
40	0	0	0	1,06	0	6,27	0,15	20,91	1,80	0,06
41	0	0	0	0	-2,38	5,32	0,20	20,91	2,40	0,93
42	0	0	0	0	2,38	3,93	0,53	37,13	6,23	4,34
43	0	0	0	0	0	4,05	0,43	26,88	5,10	0,66
44	0	0	0	0	0	3,96	0,44	27,42	4,95	1,10
45	0	0	0	0	0	3,95	0,43	29,14	4,95	0,76
46	0	0	0	0	0	3,96	0,31	25,14	3,63	0,39

Nota-se que com a adição da mistura salina KCl/NaCl, o módulo elástico foi afetado positivamente pela presença do caseinato de sódio, carragena e sais, ou seja, estes componentes acarretaram em aumento da força da rede elástica dos géis formados. No entanto, o aumento da temperatura de mistura foi uma variável que influenciou na redução da elasticidade dos géis. No módulo viscoso, o caseinato de sódio também produziu efeito positivo juntamente com a temperatura de mistura e, nesse caso, o aumento da força iônica colaborou negativamente.

Em comparação com as propriedades obtidas em compressão até a ruptura, somente o comportamento do módulo viscoso foi similar à tensão na ruptura e módulo de elasticidade. Isso mostra que as propriedades reológicas obtidas em diferentes condições de deformação aplicada, trazem informações importantes sobre o comportamento da rede em diferentes situações. Neste caso, o módulo elástico obtido nos ensaios reflete o comportamento da rede em longos tempos de observação, ao contrário do módulo de elasticidade.

A partir dos dados experimentais (Tabela 4.23), modelos matemáticos foram determinados para os módulos elástico e viscoso, que se encontram na Tabela 4.24. Na análise de variância (ANOVA, Tabelas 4.25 e 4.26) observa-se que os modelos mostraram os $f_{\text{calculados}}$ maiores que os $f_{\text{tabelados}}$ para ambos os casos analisados. Dessa maneira foi possível gerar as superfícies de resposta, baseados nos modelos matemáticos para os módulos elástico e viscoso que se encontram nas Figuras 4.29 e 4.30, respectivamente.

O comportamento das variáveis caseinato de sódio e temperatura de mistura com a força iônica nos níveis inferior (0M), médio (0,28M) e superior (0,34M) pode ser observado nas Figuras 4.29a, b e c, respectivamente. Nota-se que o aumento da força iônica influenciou fortemente o comportamento da interação entre o caseinato e a temperatura de

Tabela 4.24: Valores dos coeficientes significativos dos modelos matemáticos codificados dos módulos elástico e viscoso dos sistemas de biopolímeros adicionados da mistura KCl/NaCl ($p < 0,05$). Onde: b_i são os coeficientes da regressão com os sub-índices, 1 – concentração de caseinato de sódio, 2 - concentração de CPS, 3 - concentração de carragena, 4 - concentração de sacarose, 5 - $T(^{\circ}\text{C})$ de mistura dos componentes e Y- módulo elástico ou módulo viscoso.

	Coeficientes	Y	
		Módulo Elástico	Módulo Viscoso
	b_0	3,81	29,92
Linear	b_1	1,64	10,75
	b_2	-	-
	b_3	0,65	-
	b_4	2,28	-5,77
	b_5	-1,29	0,51
quadrático	b_{11}	-	-
	b_{22}	0,59	3,74
	b_{33}	-	-2,97
	b_{44}	2,40	-
	b_{55}	-	-
interações	b_{12}	-	-4,41
	b_{13}	1,09	3,15
	b_{14}	2,51	-
	b_{15}	-1,97	-7,49
	b_{23}	0,77	8,82
	b_{24}	-	-4,95
	b_{25}	-	2,47
	b_{34}	-	-
	b_{35}	-	-
	b_{45}	-2,37	-8,54

Tabela 4.25: Análise de variância do modelo matemático do planejamento fatorial completo para o módulo elástico do sistema de biopolímeros, com adição da mistura KCl/NaCl.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f_{calc}	f_{tab}
Regressão	$5,94 \cdot 10^{+2}$	11	54,03	11,80	2,11
Resíduos	$1,42 \cdot 10^{+2}$	31	4,58		
Erro	141,96	31			
Total	736,24	42			
Rquad=	0,81				
R=	0,90				

Tabela 4.26: Análise de variância do modelo matemático do planejamento fatorial completo para o módulo viscoso do sistema de biopolímeros, com adição da mistura KCl/NaCl.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	f_{calc}	f_{tab}
Regressão	$1,38 \cdot 10^{+4}$	12	$1,15 \cdot 10^{+3}$	26,07	2,09
Resíduos	$1,32 \cdot 10^{+3}$	30	44,09		
Erro	1322,67	30			
Total	15.117,65	42			
Rquad=	0,91				
R=	0,96				

mistura. Com baixo valor de FI, a força da rede elástica foi favorecida pelo aumento da temperatura de mistura, pois a maior temperatura acarretou em E_1 mais elevado ou mais interações biopoliméricas, nas menores concentrações de caseinato de sódio.

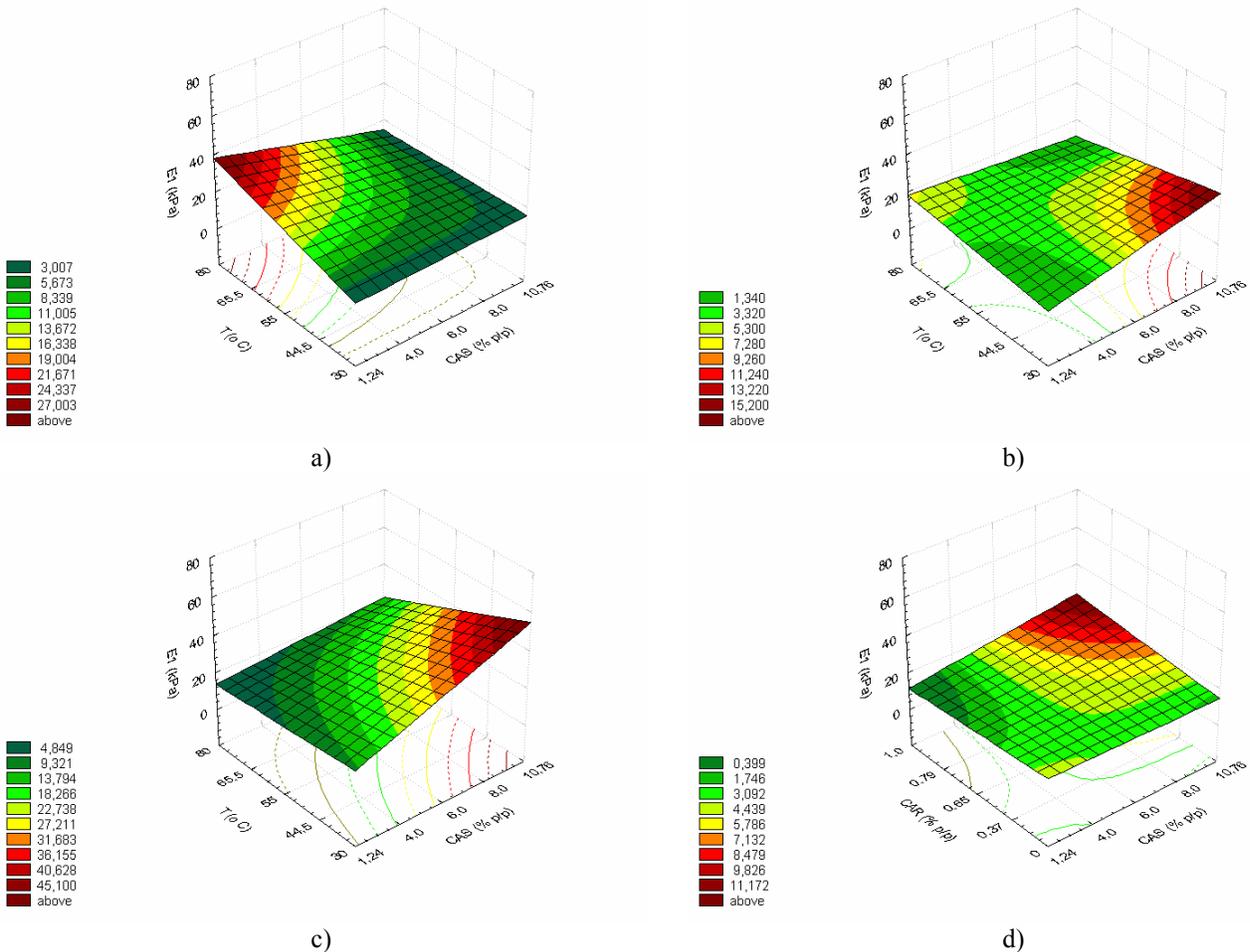


Figura 4.29: Superfícies de resposta na análise do módulo elástico dos géis com adição da mistura KCl/NaCl. Comportamento das variáveis caseinato de sódio (CAS) e temperatura de mistura (T) em força iônica (FI) a) 0M, b) 0,28M, c) 0,34M e d) caseinato de sódio (CAS) e carragena (CAR) demais variáveis no ponto central.

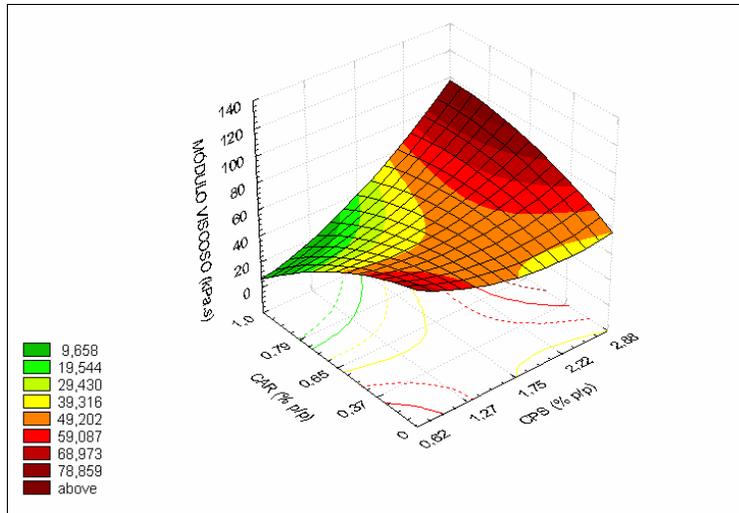
À medida que o teor desta proteína foi mais elevado, o efeito da temperatura foi pouco relevante, uma vez que o papel das proteínas do soro na rede do gel passou a ter importância menor. No entanto, à alta FI, a rede mais forte foi obtida a altas concentrações de caseinato e a baixas temperaturas, pois a rede desordenada provavelmente foi formada pela neutralização das cargas da proteína com os íons de KCl/NaCl. O modelo mostra esta

interação de significativa intensidade entre o caseinato de sódio-sal, pois estes contribuíram na formação e força do gel devido aos agregados entre a carragena, caseinato de sódio e proteínas do soro, sendo que, provavelmente a rede principal era formada pela carragena (TZIBOULA & HORNE, 1999).

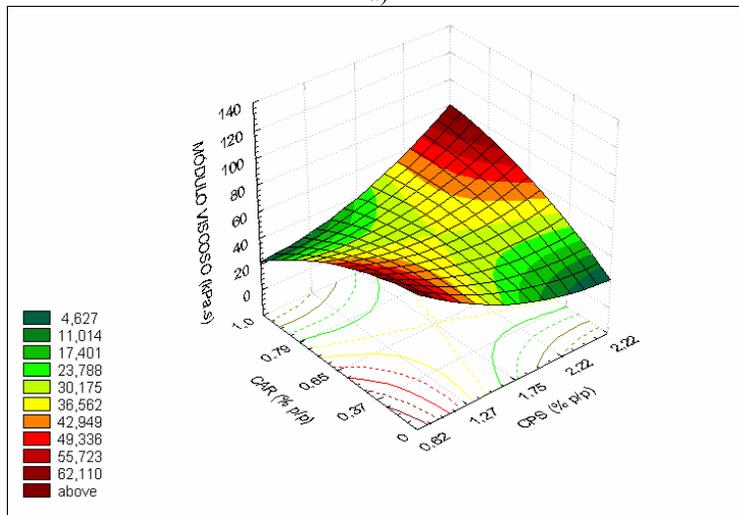
Já na Figura 4.29d, verifica-se a variação do módulo elástico com a concentração de carragena e do caseinato de sódio. Nota-se que com o aumento da concentração do caseinato de sódio e da carragena aumentaram os valores do módulo elástico (E_1), devido ao aumento das prováveis interações carragena–caseinato de sódio, o que é confirmado pelo menor módulo que, nesse caso, se deu com a diminuição da concentração de ambos os biopolímeros.

A Figura 4.30 mostra o comportamento do módulo viscoso em função das concentrações de CPS e da carragena com a força iônica nos níveis mínimo, central e máximo (0, 0,28 e 0,34M, respectivamente), na qual se verifica que essa propriedade do material diminuiu com o aumento da força iônica. Este efeito é mais evidente quando as concentrações de carragena e de CPS são elevadas, sendo que o maior valor do módulo viscoso (η_1) foi obtido à baixa força iônica, colocando em evidência a interação CPS-carragena, detectada estatisticamente (Tabela 4.24).

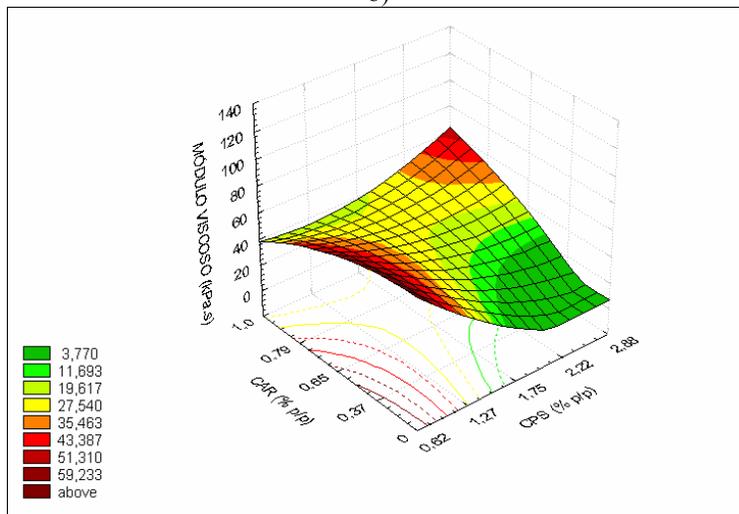
Em estudos feitos por Mleko, *et. al.* (1997) com κ -carragena e isolado protéico do soro (IPS), foi observada a formação de um coágulo dessa mistura em pH 4 e 5, fato atribuído à proximidade do ponto isolétrico das proteínas do soro. Polissacarídeos como a κ -carragena, a pH baixos, podem atuar como flocculantes na precipitação de proteínas em suspensão. Sendo assim, as proteínas do soro devem estar interagindo com a carragena nas condições estudadas (pH final igual a 4,6).



a)

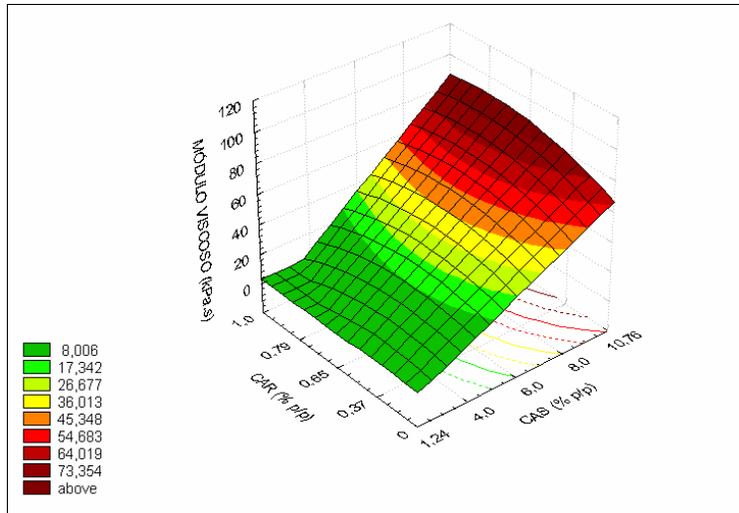


b)

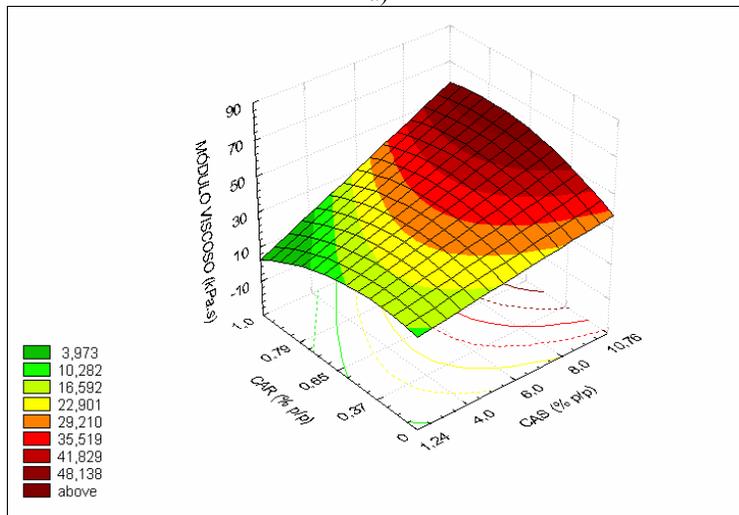


c)

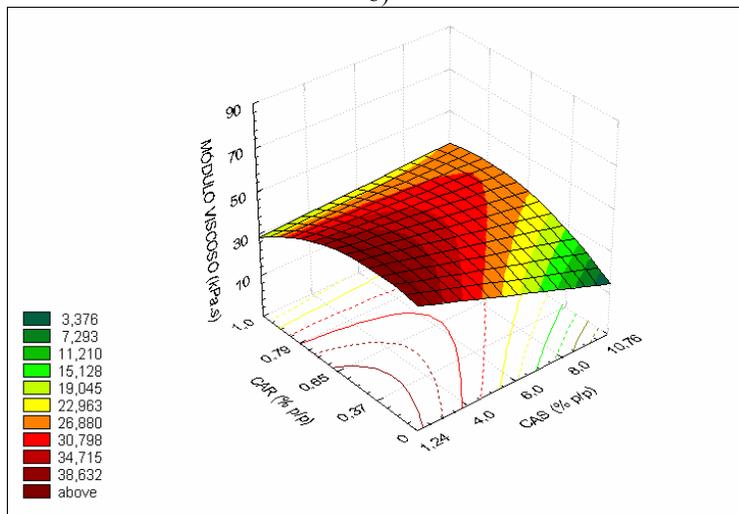
Figura 4.30: Superfícies de resposta na análise do módulo viscoso dos géis com adição da mistura KCl/NaCl. Comportamento das variáveis concentrado protéico de soro (CPS) e carragena (CAR) com força iônica em a) 0M, b) 0,28M e c) 0,34M.



a)



b)



c)

Figura 4.31: Superfícies de resposta na análise do módulo viscoso em géis com adição da mistura KCl/NaCl. Comportamento das variáveis caseinato de sódio (CAS) e carragena (CAR) à temperatura de mistura no nível a) mínimo (30°C), b) central (55°C) e c) máximo (80°C).

Na Figura 4.31 está representado o comportamento do módulo viscoso (η_1) em função das concentrações de carragena e caseinato de sódio com a variação da temperatura nos níveis central (30°C), mínimo (55°C) e máximo (80°C). O aumento da temperatura de mistura diminuiu o valor de η_1 , mostrando que o valor máximo do módulo viscoso se deu à menor temperatura, juntamente com as maiores concentrações de caseinato de sódio e carragena, onde novamente se vê a predominância da rede de caseinato-carragena.

Schkoda *et al.* (1999) verificaram que o módulo viscoso de géis lácteos acidificados diminuiu com o aumento da concentração de NaCl em leite nanofiltrado, decrescendo a tendência das micelas de caseína se agregarem, devido a altas forças repulsivas, implicando também em sistemas com baixa capacidade de retenção de água. Neste trabalho também foi verificado um forte efeito negativo da força iônica sobre esta propriedade reológica. A adição de co-solutos no sistema estudado afetou os módulos elástico e viscoso dos géis formados, de maneira a aumentá-los ou diminuí-los, dependendo do soluto adicionado. Com relação ao módulo elástico, o valor médio apresentado para o sal foi de 3,27 kPa, já com adição da sacarose esse valor foi de 12,16 kPa. Para o módulo viscoso, a adição da mistura salina KCl/NaCl produziu um valor médio de 31,43 kPa.s, porém adicionando açúcar o efeito nessa propriedade foi muito mais pronunciado, conferindo um valor médio de 1.454,50 kPa.s no sistema modelo de biopolímeros estudado.

4.3.5. Capacidade de retenção de água - géis com adição de sacarose

Na Figura 4.32 estão apresentados os efeitos lineares ocorridos no sistema de biopolímeros com sacarose, obtidos a partir da avaliação da capacidade de retenção de água do planejamento fatorial completo (Tabela 4.27). Os resultados mostram capacidade de retenção de água (CRA) entre 38 e 85%, sendo que os menores valores foram associados a baixas concentrações de polissacarídeo. A carragena foi a variável de maior efeito no aumento da capacidade de retenção de água, devido ao seu pronunciado caráter hidrofílico. Nota-se, inclusive, que o menor valor da capacidade de retenção de água correspondeu ao ponto axial (ensaio 37, Tabela 4.27) em que não houve adição de carragena. Seguindo a mesma tendência, as concentrações de CPS e de sacarose também produziram efeito positivo na capacidade de retenção de água dos géis formados. No entanto, a concentração de caseinato de sódio produziu efeito negativo no sistema avaliado, colaborando na redução da capacidade de retenção de água do sistema de biopolímeros.

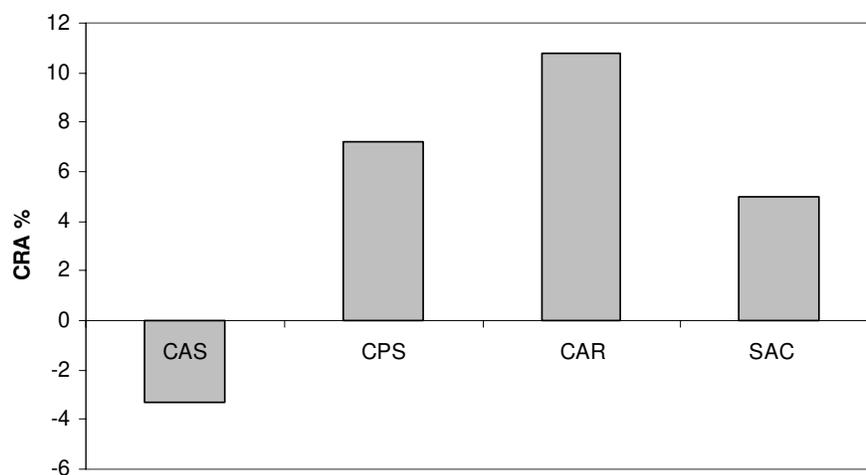


Figura 4.32: Efeitos lineares significativos das variáveis independentes ($p < 0,05$) sobre a capacidade de retenção de água dos sistemas de biopolímeros acidificados quando adicionados de sacarose. Onde CAS - concentração de caseinato de sódio, CPS - concentração de concentrado protéico de soro, CAR - concentração de carragena, SAC - concentração de sacarose.

Tabela 4.27: Respostas do planejamento completo 2⁵ para análise de capacidade de retenção de água (CRA) nos sistemas adicionados de sacarose.

Ensaio	CAS	CPS	CAR	SAC	T	CRA (% p/p)
1	-1	-1	-1	-1	-1	64,19
2	1	-1	-1	-1	-1	48,51
3	-1	1	-1	-1	-1	70,18
4	1	1	-1	-1	-1	56,36
5	-1	-1	1	-1	-1	76,71
6	1	-1	1	-1	-1	73,72
7	-1	1	1	-1	-1	83,62
8	1	1	1	-1	-1	78,43
9	-1	-1	-1	1	-1	65,43
10	1	-1	-1	1	-1	60,28
11	-1	1	-1	1	-1	71,77
12	1	1	-1	1	-1	64,26
13	-1	-1	1	1	-1	72,33
14	1	-1	1	1	-1	74,47
15	-1	1	1	1	-1	78,97
16	1	1	1	1	-1	78,46
17	-1	-1	-1	-1	1	61,23
18	1	-1	-1	-1	1	55,48
19	-1	1	-1	-1	1	69,58
20	1	1	-1	-1	1	64,64
21	-1	-1	1	-1	1	66,59
22	1	-1	1	-1	1	68,51
23	-1	1	1	-1	1	75,63
24	1	1	1	-1	1	63,42
25	-1	-1	-1	1	1	64,40
26	1	-1	-1	1	1	64,66
27	-1	1	-1	1	1	75,04
28	1	1	-1	1	1	72,63
29	-1	-1	1	1	1	69,91
30	1	-1	1	1	1	75,20
31	-1	1	1	1	1	76,93
32	1	1	1	1	1	85,87
33	-2,38	0	0	0	0	82,57
34	2,38	0	0	0	0	76,56
35	0	-2,38	0	0	0	58,57
36	0	2,38	0	0	0	80,61
37	0	0	-2,38	0	0	38,26
38	0	0	2,38	0	0	65,08
39	0	0	0	-2,38	0	57,92
40	0	0	0	2,38	0	72,62
41	0	0	0	0	-2,38	81,01
42	0	0	0	0	2,38	78,24
43	0	0	0	0	0	79,49
44	0	0	0	0	0	79,71
45	0	0	0	0	0	79,27
46	0	0	0	0	0	79,70

A compreensão das tendências e interações ocorridas no sistema foi possível através da avaliação dos modelos matemáticos gerados a partir do planejamento experimental completo, sendo que na Tabela 4.28 são apresentados os valores dos coeficientes das variáveis significativas e interações ocorridas nos ensaios de capacidade de retenção de água.

Tabela 4.28: Valores dos coeficientes significativos dos modelos matemáticos codificados para a predição da capacidade de retenção de água dos sistemas de biopolímeros com adição de sacarose. Onde: b_i são os coeficientes da regressão com os sub-índices, 1 – concentração de caseinato de sódio, 2 - concentração de CPS, 3- concentração de carragena, 4 - concentração de sacarose, 5 - $T(^{\circ}C)$ de mistura dos componentes.

Coeficientes		CRA (% p/p)
Linear	b_0	79,15
	b_1	-1,66
	b_2	3,61
	b_3	5,40
	b_4	2,51
	b_5	-
quadrático	b_{11}	-
	b_{22}	-1,80
	b_{33}	-4,96
	b_{44}	-2,56
	b_{55}	-
interações	b_{12}	1,64
	b_{13}	1,87
	b_{14}	1,24
	b_{23}	-
	b_{24}	-
	b_{25}	-
	b_{34}	-
	b_{35}	-1,92
	b_{45}	1,42

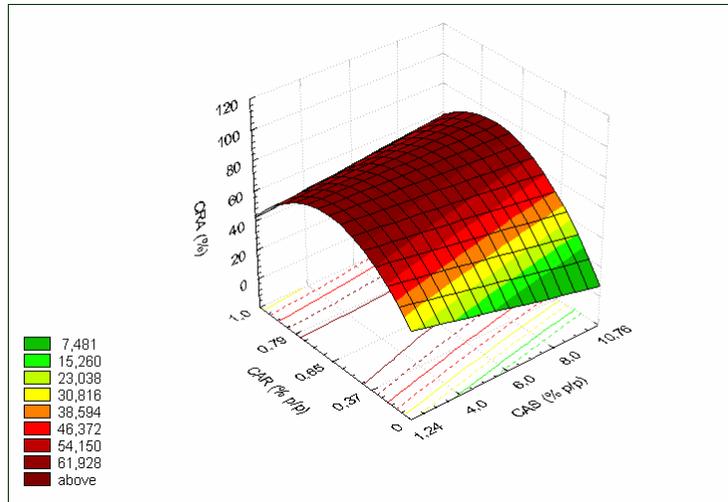
Através da análise de variância (ANOVA) Tabela 4.29, verificou-se que pelo modelo matemático obtido o valor de $f_{\text{calculado}}$ (f_{calc}) foi muito maior que o f_{tabelado} (f_{tab}), possibilitando gerar as superfícies de respostas, que estão apresentadas na Figura 4.33.

Tabela 4.29: Análise de variância do modelo matemático obtido para a capacidade de retenção de água para os sistemas com adição de sacarose.

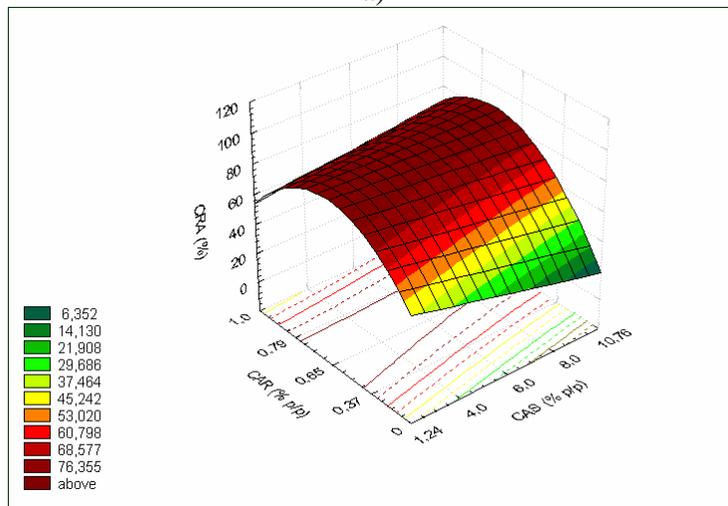
Fonte de variação	Soma Ouadrática	Graus de Liberdade	Média Ouadrática	f_{calc}	f_{tab}
Regressão	$4,09 \cdot 10^{+03}$	12	341,11	48,29	2,06
Resíduos	$2,33 \cdot 10^{+02}$	33	7,06		
Erro	233,095	33			
Total	4326,46	45			
$R^2=$	0,95				
$R=$	0,97				

Na Figura 4.33, pode-se observar através das superfícies de resposta o efeito das concentrações de caseinato de sódio, CPS e carragena e na Figura 4.34 da carragena com a sacarose. A concentração de caseinato de sódio apresentou efeito linear negativo, porém vale ressaltar que a interação entre a carragena e o caseinato de sódio foi positiva. Verifica-se que com o aumento da concentração de CPS a capacidade de retenção de água aumentou, até a concentração do ponto central dessa variável, a partir do qual a CRA se manteve estável como pode ser visto nas Figuras 4.33b e 4.33c. Nessas figuras também se verifica que nas maiores concentrações de carragena a CRA é maior, indicando sua importância na interação com água.

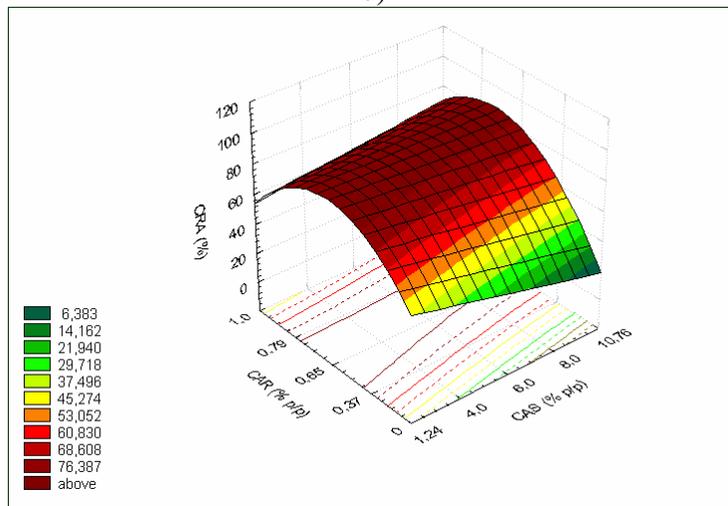
Na Figura 4.34 pode-se ver o efeito positivo do açúcar, especialmente a baixas concentrações de carragena. As interações entre as proteínas do leite que favorecem o aumento da força do gel, parecem também contribuir com o aumento de CRA, porém, seu efeito é bem menor que o da carragena. A formação de agregados entre o caseinato de sódio e as proteínas do soro, que provavelmente estariam aprisionados na rede de carragena (TZIBOULA & HORNE, 1999) também poderia dificultar a perda de água. No entanto, a maior capacidade de retenção de água ocorreu a níveis intermediários de concentração de proteínas, uma vez que nas maiores concentrações pode haver incompatibilidade entre os biopolímeros, facilitando a expulsão da água.



a)



b)



c)

Figura 4.33: Superfícies de resposta na análise das variáveis carragena (CAR) e caseinato de sódio (CAS) sobre a capacidade de retenção de água com concentração de concentrado protéico (CPS) nível: a) inferior, b) central e c) superior.

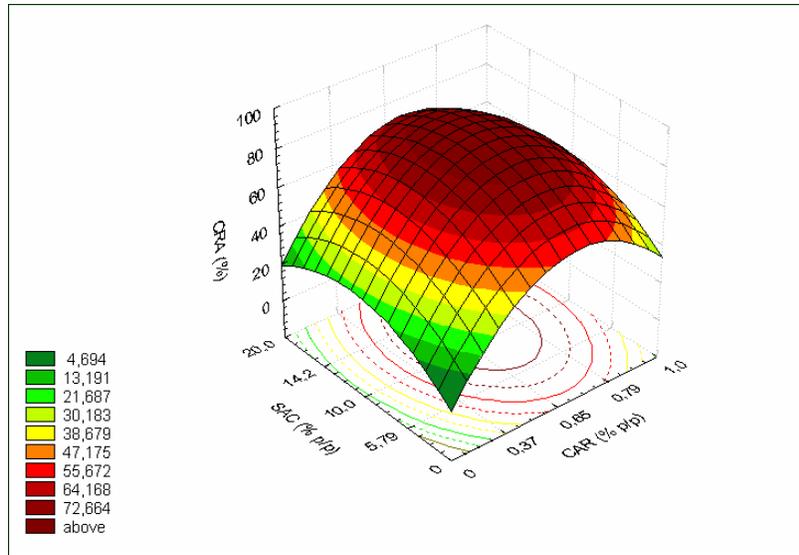
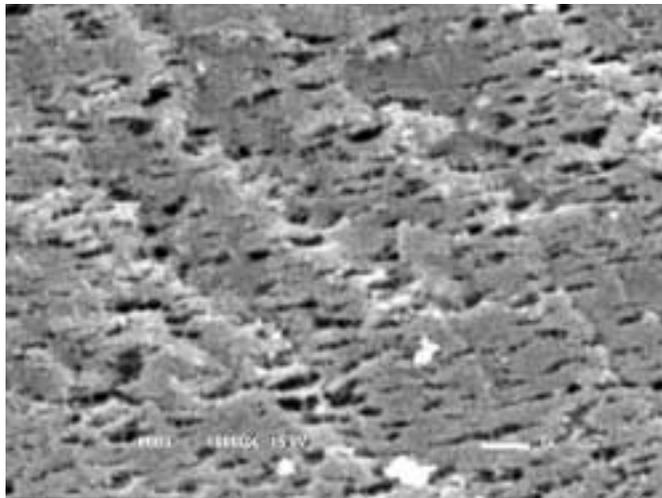


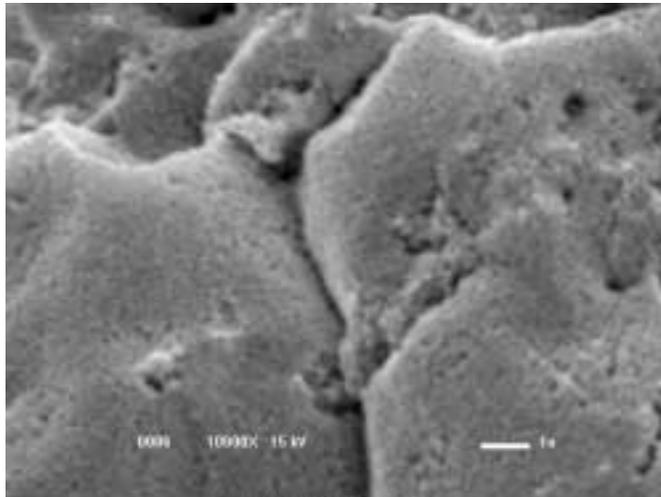
Figura 4.34: Superfícies de resposta na análise das variáveis carragena (CAR) e sacarose (SAC) sobre a capacidade de retenção de água.

A Figura 4.35 mostra a estrutura dos géis, visualizada por microscopia eletrônica de varredura. Na Figura 4.35a pode-se observar o gel sem adição do soluto, na 4.35b com a adição de 10 % (p/p) de sacarose e na 4.35c com 20% (p/p) de açúcar. As condições de processo e as concentrações dos biopolímeros foram mantidas no ponto central (equivalentes aos ensaios 39, 40 e 43). Nota-se que sem a adição de açúcar a estrutura formada apresenta um número elevado de poros, quando comparada com géis preparados com 10 e 20% (p/p) de sacarose. A adição do açúcar promoveu o fortalecimento da rede do gel levando à formação de uma rede mais homogênea e coesa. Belyakova *et al.* (2003) também verificaram que na presença de sacarose, a microestrutura do gel de caseinato de sódio acidificado foi mais homogênea e composta por pequenas partículas de proteína.

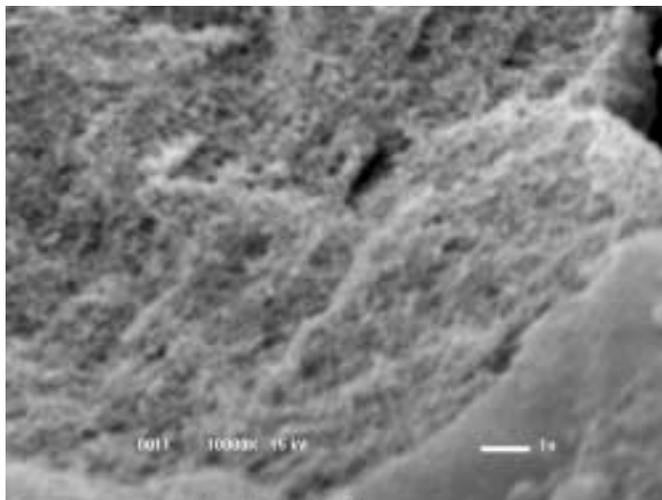
A comparação dos resultados de microscopia mostrados na Figura 4.35 com os valores obtidos na análise de capacidade de retenção de água mostra que a adição de açúcar contribuiu tanto para uma rede mais homogênea, como para uma maior interação com a água.



a



b



c

Figura 4.36: Microscopia eletrônica de varredura (aumento de 10.000 vezes) dos géis biopoliméricos com adição de sacarose a) 0% b) 10% (p/p) e c) 20% (p/p).

A estrutura que manteve a malha do sistema de biopolímeros, e que de certa maneira reteve mais água, provavelmente foi proveniente das interações entre o caseinato de sódio e carragena (DALGLEISH, & LAW, 1998), favorecidas pela hidratação preferencial desta proteína na presença de sacarose. Neste caso, o açúcar foi excluído do contato com a superfície da proteína, possibilitando tais ligações (FARRELL & MORA-GUTIERREZ, 2000) e ligando-se à água, ou simplesmente, a adição de açúcar levou ao aumento do número de colisões efetivas entre as partículas e fortaleceu as interações entre as mesmas (DICKISON & MERINO, 2002, BELYAKOVA *et al.*, 2003).

4.3.6. Capacidade de retenção de água - géis com adição de sal (KCl/NaCl)

A mistura de KCl/NaCl quando adicionada aos sistemas de biopolímeros proporcionou um efeito diferente ao da sacarose. Analisando os valores obtidos nos ensaios do planejamento fatorial completo (Tabela 4.30), nota-se que a capacidade de retenção de água (CRA) foi muito menor com a adição sal que com a de açúcar. Verifica-se que na ausência da mistura de sais (ensaio 39) obteve-se a maior porcentagem de retenção de água (57,70), resultado similar ao sistema sem sacarose (57,92).

O comportamento global ocorrido no sistema de biopolímeros pode ser melhor compreendido quanto à CRA na Figura 4.37, em que são mostrados os efeitos lineares significativos das variáveis estudadas a partir da avaliação do planejamento fatorial completo. Na Figura 4.37 verifica-se que a mistura salina (representada pela força iônica) produziu efeito negativo na CRA, ou seja, colaborou no aumento da separação de solvente, devido à formação de uma rede mais porosa e, provavelmente, mais frágil, como foi observado nos resultados de tensão na ruptura.

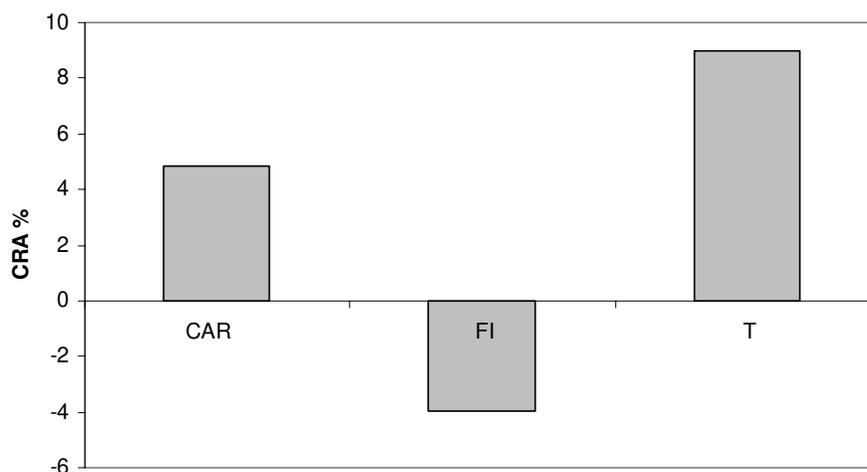


Figura 4.37: Efeitos lineares significativos ($p < 0,05$) das variáveis independentes dos sistemas acidificados de biopolímeros quando adicionados da mistura de KCl/NaCl sobre a CRA. Onde , CAR - concentração de carragena, FI – força iônica, T - temperatura de mistura dos componentes.

Tabela 4.30: Respostas do planejamento fatorial completo 2^5 da análise de capacidade de retenção de água no sistema adicionado da mistura salina KCl/NaCl.

ensaios	CAS	CPS	CAR	FI	T	CRA (%)
1	-1	-1	-1	-1	-1	36,61
2	1	-1	-1	-1	-1	33,69
3	-1	1	-1	-1	-1	35,38
4	1	1	-1	-1	-1	40,44
5	-1	-1	1	-1	-1	43,47
6	1	-1	1	-1	-1	44,42
7	-1	1	1	-1	-1	43,73
8	1	1	1	-1	-1	43,61
9	-1	-1	-1	0,53	-1	28,56
10	1	-1	-1	0,53	-1	34,40
11	-1	1	-1	0,53	-1	36,66
12	1	1	-1	0,53	-1	46,71
13	-1	-1	1	0,53	-1	44,16
14	1	-1	1	0,53	-1	48,82
15	-1	1	1	0,53	-1	42,15
16	1	1	1	0,53	-1	43,54
17	-1	-1	-1	-1	1	51,54
18	1	-1	-1	-1	1	51,28
19	-1	1	-1	-1	1	53,64
20	1	1	-1	-1	1	51,85
21	-1	-1	1	-1	1	50,59
22	1	-1	1	-1	1	52,15
23	-1	1	1	-1	1	52,14
24	1	1	1	-1	1	50,65
25	-1	-1	-1	0,53	1	49,51
26	1	-1	-1	0,53	1	48,35
27	-1	1	-1	0,53	1	47,72
28	1	1	-1	0,53	1	48,48
29	-1	-1	1	0,53	1	51,26
30	1	-1	1	0,53	1	51,02
31	-1	1	1	0,53	1	48,43
32	1	1	1	0,53	1	47,70
33	-2,38	0	0	0	0	49,10
34	2,38	0	0	0	0	56,66
35	0	-2,38	0	0	0	56,17
36	0	2,38	0	0	0	55,91
37	0	0	-2,38	0	0	30,30
38	0	0	2,38	0	0	47,86
39	0	0	0	-2,47	0	57,70
40	0	0	0	1,06	0	29,29
41	0	0	0	0	-2,38	42,14
42	0	0	0	0	2,38	56,90
43	0	0	0	0	0	48,30
44	0	0	0	0	0	48,39
45	0	0	0	0	0	48,26
46	0	0	0	0	0	48,20

Esse comportamento sugere que uma diminuição no número de agregados e/ou que a agregação mais rápida e desordenada com a adição de sal poderiam explicar a diminuição da força do gel (BOYE *et al.*, 1997). Por outro lado, as ligações ocorridas no sentido de formação, retenção e estrutura do gel estão fortemente relacionadas à ação da temperatura de mistura dos componentes e não somente em relação à concentração dos biopolímeros, tal como pode ser observado nos resultados, e novamente pode-se observar a ação da carragena atuando positivamente no sistema. Os coeficientes do modelo matemático determinado para a capacidade de retenção de água dos géis adicionados de mistura salina, encontram-se na Tabela 4.31.

Tabela 4.31: Valores dos coeficientes significativos do modelo matemático codificado para a predição da capacidade de retenção de água dos sistemas de biopolímeros com adição da mistura de sais KCl/NaCl. Onde: b_i são os coeficientes da regressão com os sub-índices, 1 – concentração de caseinato de sódio, 2 - concentração de CPS, 3- concentração de carragena, 4 - concentração da mistura salina, 5 - $T(^{\circ}C)$ de mistura dos componentes.

		Coeficientes	CRA
		b_0	48,11
Linear		b_1	-
		b_2	-
		b_3	2,42
		b_4	-1,97
		b_5	4,50
quadrático		b_{11}	-1,87
		b_{22}	-
		b_{33}	-
		b_{44}	-
		b_{55}	-
interações		b_{12}	-
		b_{13}	-
		b_{14}	-
		b_{15}	-
		b_{23}	-
		b_{24}	-
		b_{25}	-
		b_{34}	-
		b_{35}	-1,87
		b_{45}	-

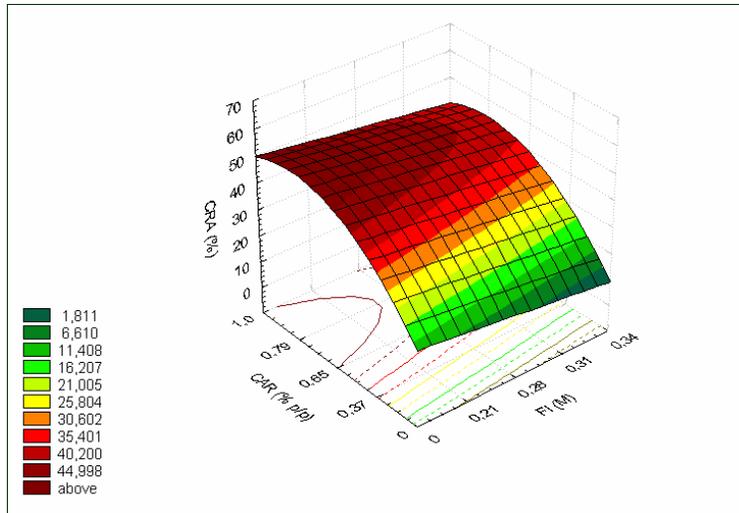
Na Figura 4.38 é apresentada algumas superfícies de resposta referentes à análise da capacidade de retenção de água, quando se adicionou a mistura KCl/NaCl aos sistemas poliméricos, cujos modelos foram avaliados por análise de variância (ANOVA - na Tabela 4.32).

Tabela 4.32: Análise de variância do modelo matemático obtido a partir da avaliação do planejamento fatorial completo para a CRA dos sistemas biopoliméricos com adição da mistura KCl/NaCl.

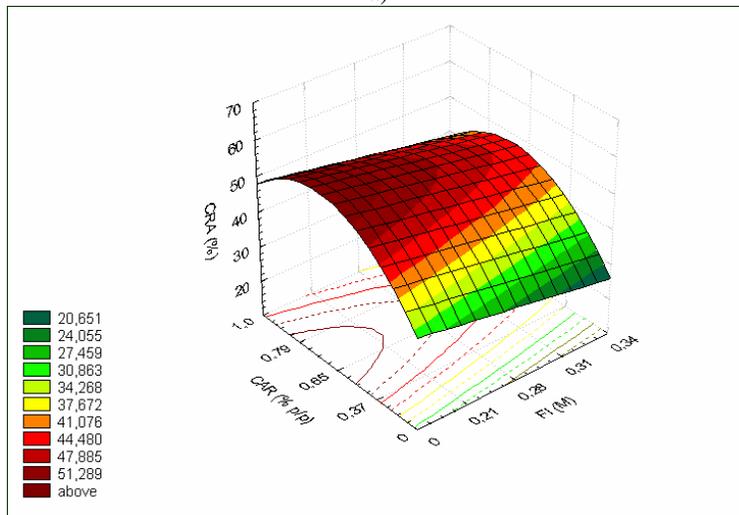
Fonte de variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	f _{calc}	f _{tab}
Regressão	1,16 10 ⁺³	9	128,71	4,40	2,15
Resíduos	1,05 10 ⁺³	36	2,92 10 ⁺¹		
Erro	1052,786	36			
Total	2211,173	45			
R ² =	0,79				
R=	0,89				

Pode ser verificado na Figura 4.38, o efeito da temperatura com relação à capacidade de retenção de água, sendo que a baixas temperaturas de mistura, quando praticamente não há desnaturação das proteínas do soro, a quantidade de solvente liberada foi menor devido à elevada solubilidade da β -Lg não desnaturada. Além disso, é possível que a carragena no estado ordenado possa se ligar mais facilmente à água, que no estado desordenado.

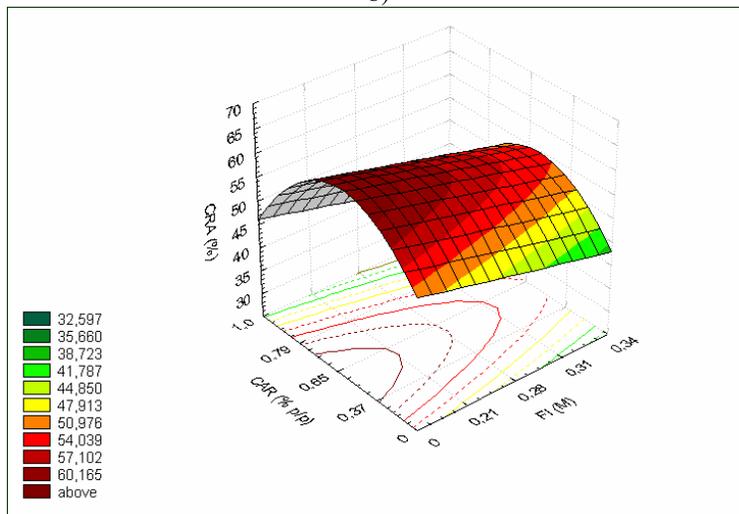
Normalmente, o tratamento térmico dado ao leite, próximo a 70°C, causaria a desnaturação das proteínas do soro que poderiam complexar com a caseína por interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto (KELLY & O'KENNEDY, 2001). Quando o meio é acidificado, alguns autores sugerem que essas interações ocorrem devido à agregação das proteínas desnaturadas do soro próximas ao seu ponto isoelétrico e destas com as partículas de caseína, aumentando o número e a força das ligações (LUCEY & SINGH, 1998). Neste caso, a reatividade dos grupos SH diminuiria significativamente em condições ácidas e dessa maneira, interações não covalentes são envolvidas na estrutura do gel ácido, enquanto



a)



b)



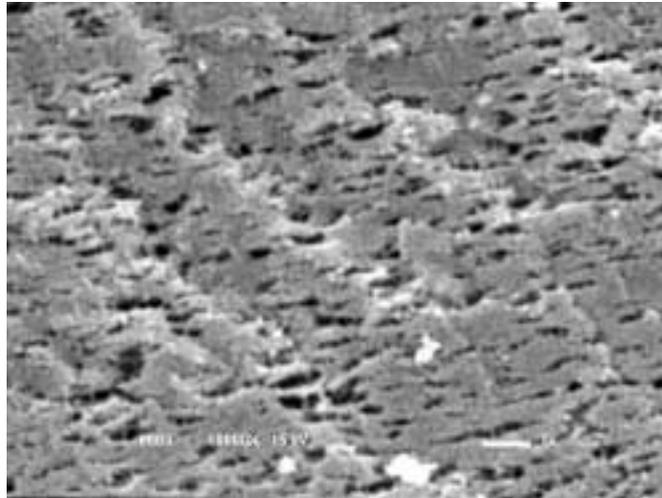
c)

Figura 4.38: Superfícies de resposta na análise do efeito das variáveis carragena (CAR) e força iônica (FI) sobre a capacidade de retenção de água dos géis com mistura salina com temperatura no nível a) inferior, b) central e c) superior.

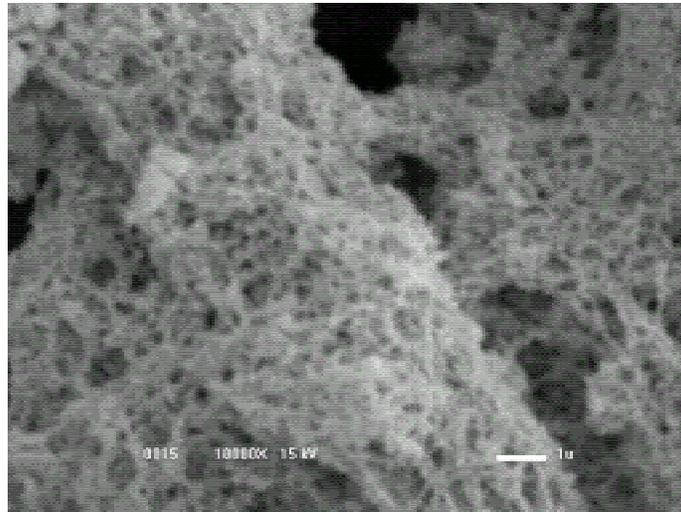
que em pH neutro o intercâmbio das reações moleculares dissulfeto – dissulfeto são favorecidas, como é o caso dos géis térmicos de proteína do leite. Estas interações proteína-proteína desfavorecem as pontes de hidrogênio entre proteína-água, levando a uma maior expulsão de água da matriz.

A adição de sal influenciou a ação da carragena, pois esta aumentou fortemente a liberação de solvente com alta força iônica, especialmente a baixas concentrações de polissacarídeo. Esse biopolímero passa por uma transição conformacional de estrutura ordenada para desordenada entre 20 e 50°C, dependendo da força iônica e da temperatura (ROSS-MURPHY, 1998). A temperatura de gelificação da carragena varia de acordo com o tipo e concentração, solutos iônicos e não iônicos e presença de outros polímeros. De todos os tipos de carragena, a kappa fornece os géis mais fortes. A rigidez dos géis de κ -carragena é diretamente dependente da concentração da goma e dos seguintes cátions nessa ordem, $K^+ > Ca^{+2} \gg Na^+$. Um gel rígido e elástico é formado com K^+ , ao passo que com Ca^{+2} o gel é quebradiço e frágil. Tanto com K^+ e Ca^{+2} , a κ -carragena possui alto poder gelificante, marcado por um efeito sinérgico com os dois cátions (THERKELSEN, 1993). No sistema-modelo estudado estão presentes todos esses íons (Tabela 3.1) sendo que o sódio está presente em maior quantidade (caseinato e NaCl), seguido pelo potássio (KCl), os quais podem ter elevado a temperatura da transição conformacional ou de gelificação.

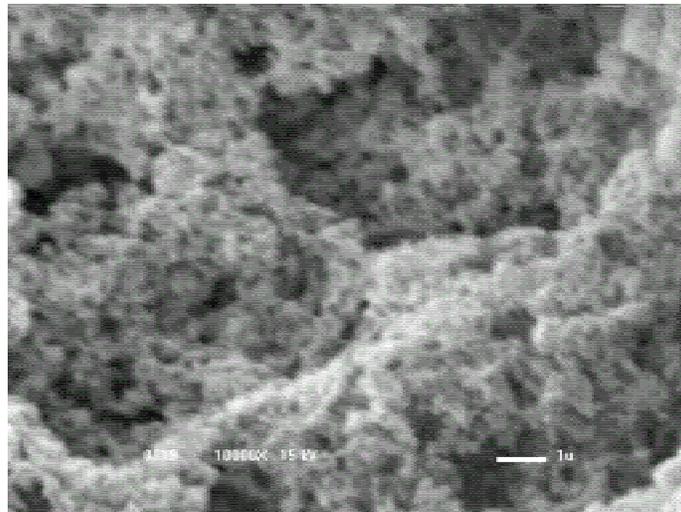
Neste caso, o efeito positivo do aumento da temperatura sobre a CRA pode estar associado também à sua influência sobre a conformação da carragena. Diferentemente do ocorrido com a adição de sacarose, os géis obtidos com adição da mistura salina KCl/NaCl aumentaram o número e o tamanho dos poros formados, como pode ser observado na Figura 4.39, o que claramente favoreceu a saída de água (Tabela 4.30).



a



b



c

Figura 4.39: Microscopia eletrônica de varredura (aumento de 10.000 vezes) dos géis com mistura salina KCl/NaCl a) 0% b) 1,0% p/p; e c) 1,5% p/p.

A adição de co-solutos no sistema afetou na capacidade de retenção de água dos géis formados, de maneira a aumentar ou diminuir esta propriedade, dependendo do soluto adicionado. Com ausência de co-solutos, a CRA foi em torno de 57 %, sendo que com adição da mistura salina KCl/NaCl (ponto central), este valor caiu para 48 %. Já com a adição de sacarose o efeito nessa propriedade foi positivo, apresentando um valor próximo a 79% (ponto central) na capacidade de retenção de água nos sistemas modelo estudados.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS

⇒ O uso da metodologia de planejamento experimental fatorial, no estudo das propriedades de sistemas de biopolímeros, possibilitou a detecção das variáveis que exercem efeitos nas propriedades mecânicas e capacidade de retenção de água de géis protéicos adicionados de polissacarídeo e dos co-solutos, sacarose e mistura salina KCl/NaCl.

⇒ Constatou-se que, nos sistemas contendo sacarose, a tensão de ruptura e o módulo de elasticidade foram fortemente influenciados pelas concentrações de carragena e de caseinato de sódio. Os maiores valores de tensão na ruptura estão na faixa de concentração de caseinato de sódio entre 6 e 8%, e de carragena em torno de 1%. A deformação na ruptura, que fornece a característica de flexibilidade da rede do gel, foi influenciada negativamente pelas proteínas do leite. Isso mostra a importância das interações biopoliméricas com a água na maior ductilidade ou plasticidade do sistema.

⇒ Os sistemas contendo a mistura salina (KCl/NaCl) foram mais frágeis e particulados, fato este constatado na diminuição da firmeza e dureza dos géis obtidos. No entanto, a força do gel aumentou com o incremento da temperatura de mistura. Com relação à deformação na ruptura, o caseinato de sódio foi a única variável significativa sobre esta propriedade.

⇒ A temperatura de desnaturação (T_d) das proteínas do soro sem adição de soluto, foi de 76,7°C, sendo que na presença de sacarose ou sal, as temperaturas de desnaturação aumentaram. Ambos afetaram a estabilidade das proteínas, com a adição do açúcar a temperatura de desnaturação foi maior (87,6 °C na concentração máxima de sacarose,

30%), já com a mistura salina, o aumento da força iônica (FI), indica que o sal efetivamente atuou mais fortemente na estabilidade das proteínas desnaturando-as a temperaturas inferiores.

⇒ O aspecto visual dos géis contendo a mistura KCl/NaCl, foi totalmente diferente dos de sacarose. A adição do açúcar promoveu o fortalecimento da rede do gel, levando à formação de uma malha mais firme e coesa. Os resultados da microscopia foram relacionados aos valores obtidos na análise de capacidade de retenção de água (CRA), pois, quanto maior foi o valor da CRA, menor o número de poros formados no sistema e conseqüentemente maior a capacidade de retenção de água dos géis na presença de sacarose. Os géis obtidos com adição da mistura salina KCl/NaCl aumentaram, em número e tamanho, os poros formados e conseqüentemente, mostraram menor capacidade de retenção de água. Com ausência de co-solutos, a CRA foi em torno de 57%, sendo que com a adição da mistura salina KCl/NaCl este valor caiu para 48% e com a adição de sacarose obteve-se um valor próximo de 79%.

⇒ Géis adicionados de sacarose levaram à formação de um gel mais duro, devido à agregação do polissacarídeo e o caseinato de sódio, de interações carragena-carragena, pois o efeito do açúcar está associado à diminuição das interações polissacarídeo-solvente.

⇒ No caso dos géis com sal, o aquecimento moderado deste sistema favoreceu as interações hidrofóbicas e o aumento da força iônica, reduzindo a formação de interações eletrostáticas. A temperatura do tratamento térmico e a força iônica foram de fundamental importância na tênue formação da rede do gel. Assim como quando se adicionou sacarose no sistema, a adição de sal modificou as interações nestes sistemas devido à mudança da qualidade do solvente, porém no primeiro caso facilitou as interações biopoliméricas e no segundo uma agregação desordenada.

⇒ Com esse trabalho foi possível delinear as influências dos componentes e condições de processo, em um amplo espectro, podendo verificar quais parâmetros conferem/facilitam a aplicação tecnológica de biopolímeros em produtos lácteos, podendo em um futuro, minimizar etapas no desenvolvimento de novos produtos.

BIBLIOGRAFIA

- A.O.A.C. (1980) Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists Inc., Arlington, VA. Method 16193.
- A.O.A.C. (1990) Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists Inc., Arlington, VA. Method 927.05.
- ABIA - Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos. **Indústria da Alimentação – Ficha Técnica do setor.** (Departamento de Economia, Estatística e Planejamento (DECON - 05/12/2002)). Disponível em: <http://www.abia.org.br/vst/eco/FichaTecnica.pdf>. Acesso em 22/03/2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Alimentos.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/regutec.htm>. Acesso em 30 de abril de 2007.
- ANTIPOVA, A.S, SEMENOVA M.G. (1995) Effect of sucrose on the thermodynamic incompatibility of different biopolymers. *Carbohydrate Polymers*, **28**, 359-365.
- ANTIPOVA, A.S, SEMENOVA, M.G., BELYAKOVA, L.E. (1999) Effect of sucrose on the thermodynamic properties of ovalbumin and sodium caseinate in bulk solution and air-water interface. *Colloids and Surfaces B*, **12**, 261-270.
- AOKI, T., YAMADA, N., KAKO, Y., IMAMURA, T. (1988) Dissociation during dialysis of casein aggregates cross-linked by colloidal calcium-phosphate in bovine casein micelles. *Journal of Dairy Research*, **55**, 189-195.
- ARAKAWA, T., TIMASHEFF, S.N. (1982) Stabilization of protein structure by sugar. *Biochemistry* **21**, 6536-6544.
- ARLTOFT, D., IPSEN, R., MADSEN, F., DE VRIES, J. (2007) Interactions between carrageenans and milk proteins: a microstructural and rheological study. *Biomacromolecules*, **8**, 729 -736.
- BAIER, S., MCCLEMENTS, D.J. (2001) Impact of preferential interactions on thermal stability and gelation on of bovine serum albumin in aqueous sucrose solutions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**, 2600-2608.
- BAIER, S., MCCLEMENTS, D.J. (2006) The effect of binary cosolvent systems (glycerol-sucrose mixtures) on the heat-induced gelatination mechanism of bovine serum albumin. *International Journal of Food Science and Technology* **41**, 189-199.
- BARNES, H.A., HUTTON, J.F., WALTERS, K. (1989) *An introduction to rheology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 199 p.
- BELYAKOVA, L. E., ANTIPOVA, A. S., SEMENOVA, M. G., Dickinson, E., Merino, L. M., Tsapkina, E. N. (2003) Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **31**, 31-46.

- BERTOLA, N.C., BEVILACQUA, N.E., ZARITZKY, N.E. (1991) Changes in rheological and viscoelastic properties and protein breakdown during the ripening of “Port Salut Argentino” cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, **26**, 467-478.
- BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A. (1989) Introdução à química dos alimentos. Livraria Varela, Campinas.
- BOTTOMLEY, R. C., EVANS, M. T. A., PARKINSON, C. J. (1990). Whey proteins. In Food Gels. P. Harris, ed. Essex: Elsevier Applied Science, Essex, UK, p. 435–466.
- BOURRIOT, S., GARNIER, C., DOUBLIER J.L. (1999) Micellar-casein- κ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. *Carbohydrate Polymers*, **40**, 145-157.
- BOYE, J.I., ALLI, I. (2000) Thermal denaturation of mixture of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin : a differential scanning calorimetric study. *Food Research International*, **33**, 673-682.
- BOYE, J.I., ALLI, I., RAMASWAMY, H., RAGHAVAN, V.G.S., (1997b) Interactive effects of factors affecting gelation of whey proteins. *Journal of Food Science*, **62**, 57-65.
- BOYE, J.L., ALLI, I., ISMAIL, A.A. (1997) Use of differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy in study of thermal and structural stability of α -lactalbumin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45**, 1116-1125.
- BOYE, J.L., MA, C.Y., ISMAIL, A., HARWALKAR, V.R., KALAB, M. (1997A), Molecular and microstructural studies of thermal denaturation and gelation of β -lactoglobulins A and B. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45**, 1608-1118.
- BRAGA A.L.M., MENOSSI M., CUNHA R.L. (2006) The effect of the glucono-delta-lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. *International Dairy Journal*, **16**, 389-398.
- BRAGA, A L M, (2002) Caracterização das interações macromoleculares em géis ácidos de caseinato de sódio-xantana-sacarose: análises reológicas e térmica. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BRAGA, A L M. (2006) Formação, estrutura e propriedades reológicas de sistemas biopoliméricos. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BRIGNON, G., RIBADEAUDUMAS, B., MERCIER, J.C., PELISSIER, J.P., DAS, B.C. (1977) Amino-acid sequence of bovine α -s2-casein. *Febs Letters*, **76**, 274-279.
- CAPRON, I., NICOLAI, T., DURAND, D. (1999) Heat induced aggregation and gelation of β -lactoglobulin in the presence of κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids*, **13**, 1-5.
- CHAPLIN, M. (2007) Water structure and science. Disponível em: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycar.html>. Acesso em 15 de dezembro de 2007.
- CLARK, A. H. (1991) Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels. In *Food Polymers Gels and Colloids*, ED. Eric Dickinson, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 323-334.
- CLARK, A.H., LEE-TUFFUEL, C.D. (1986) Gelation of globular proteins . In *Functional*

Properties of Food Macromolecules. JR. Mitchell and D.A. Ledward (ED). Elsevier Applied Sci., New York.

DALGLEISH, D., ALEXANDER, M., CORREDIG, M. (2004) Studies of acid gelation of milk using ultrasonic spectroscopy and diffusing wave spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, **18**, 747-755.

DALGLEISH, D.G., LAW, A.J.R., (1998) pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I Analysis of liberated caseins. *Journal of Dairy Research*, **55**, 529-538.

DALGLEISH, D.G., MORRIS, E. R. (1998). Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles. *Food Hydrocolloids*, **11**, 13-18.

DAMODARAN, S. (1988) Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process - effect on gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 262-269.

DAMODARAN, S. (1996) Amino acids, peptides and proteins. In *Food Chemistry*, 3rd ed.; Fennema, O. R., Ed.; Dekker: New York, p 321.

DAMODARAN, S., KINSELLA, J.E. (1982) Stabilization of proteins by solvents – effect of pH and anions on positive cooperativity of 2-nonanone binding to bovine serum albumin. *Journal of Biological Chemistry*, **255**, 8503-8508.

DE LA FUENTE, M.A., HEMAR, Y., SINGH, H. (2004). Influence of κ -carrageenan on the aggregation behaviour of proteins in heated whey protein isolate solutions. *Food Chemistry*, **86**, 1-9.

DE LA FUENTE, M.A., HEMAR, Y., TAMEHANA, M., MUNRO, P.A., SINGH, H. (2002). Process-induced changes in whey protein during the manufacture of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, **12**, 361-369.

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

DICKINSON, E., CASANOVA, H. (1999) A thermoreversible emulsion gel based on sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, **13**, 285-289.

DICKINSON, E., MERINO, L. M. (2002) Effect of sugar on the rheological properties of acid caseinate -stabilized emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, **16**, 321-331.

DICKINSON, E., RADFORD S.J, GOLDING, M. (2003) Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloids*, **17**, 211-220.

DOYLE, JP, GIANNOULI, P, MARTIN, EJ, BROOKS, M, MORRIS, ER. (2006) Effect of sugars, galactose content and chainlength on freeze-thaw gelation of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, **64**, 391-401.

ELEYA, M.M.O., LENG, X.J., TURGEON, S.L. (2006) Shear effects on the rheology of beta-lactoglobulin/beta-carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids*, **20**, 946-951.

- FARREL, H. M., JR., PESSEN, H. BROWN, E. M., KUMOISINSKI, T. F. (1990). Structural insights into bovine casein micelle: small angle x-ray scattering studies and correlation with spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, **73**, 3592-3601.
- FARRELL, JR H. M., MORA-GUTIERREZ (2000) Sugar-Casein interaction in deuterated solutions bovine and caprine casein as determined by oxygen-17 and carbon-13 nuclear magnetic resonance: A case of preferential interactions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**, 3245-3255.
- FLORY, P. J. (1974) Gels and gelling processes. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, **57**, 7-18.
- FOX, P. (1989) The milk protein system. In P. F. Fox, *Developments in dairy chemistry* (vol. 4) (p.1-53). New York: Elsevier Applied Science.
- GOFF, H.D. (1999) Dairy Science and Technology Education Series. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html>.
- GOTTSCHALK, M., NILSSON, H., ROOS, H., HALLE, B. (2003) Protein self-association in solution: The bovine β -lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Science*, **12**, 2404-2411.
- GRINBERG, V., TOLSTOGUZOV, V.B. (1997) Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, **11**, 145-158.
- HANSEN, P.M.T. (1982) Hydrocolloid-protein interactions – Relationship to stabilization of fluid milk-products – A review. *Progress in Food Nutrition Science*, **6**, 127-138.
- HEERTJE, I. (1993) Structure and function of food products: a review. *Food Structure*, **12**, 343-364.
- HEMAR, Y., HALL, C.E., MUNRO, P.A., SINGH, H. (2002) Small and large deformation rheology and microstructure of κ -carrageenan gels containing commercial milk protein products. *International Dairy Journal* **12**, 371-381.
- HEMAR, Y., TAMEHANA, M., MUNRO, P.A., SINGH, H. (2001) Viscosity, microstructure and phase separation of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. *Food Hydrocolloids* **15**, 565-574.
- HOLT, C., HORNE, D.S. (1996) The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implications of dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **50**, 85-11.
- HORNE, D.S. (1998) Casein interactions: casting light on the *black boxes*, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, **8**, 171-177.
- HORNE, D.S. (1999) Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, **9**, 261-268.
- HORNE, D.S. (2003) Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **213**, 255-263.
- IMESON, A. (2000) Carrageenan In *Handbook of Hydrocolloids*. ED. G.O. Phillips, P.A. Williams, CRC Press, Cambridge, Inglaterra.
- JAROSZEWSKI, A. R., BRAGA, A. L. M., CUNHA, R. L. (2003) Effect of locust bean gum (LBG) and NaCl/KCl on the gelation process of acidified casein In: 3rd International

- Symposium on Food Rheology and Structure, 2003, Zurich, Suíça. Proceedings of the 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure. Lappersdorf - Alemanha: Kerschensteiner Verlag GmbH, v.1, p. 565 – 566.
- JU, Z.Y., KILARA, A. (1998) Texture properties of cold-set gels induced from heat-denatured β -lactoglobulin. *Journal of Food Science*, **63**, 298-292.
- KAVANAGH, G.M., ROSS-MURPHY, S.B. (1998) Rheological characterization of polymer gels. *Progress in Polymer Science*, **23**, 533-562.
- KELLY, P.M., O'KENNEDY, B.T. (2001) The effect of casein/whey protein ratio and minerals on the rheology of fresh cheese gels using a model system. *International Dairy Journal*, **11**, 525-532.
- KULMYRZAEV, A., BRYANT, C. McCLEMENTES, D.J. (2000) Influence of sucrose on thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilisation of whey proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**, 1593-1597.
- LANARA (1981) Secretaria de defesa agropecuária M.A.- Métodos analíticos oficiais de produtos de origem animal e seus ingredientes. II- Métodos físicos e químicos, Brasília – DF.
- LANGENDORFF, V., CUVELIER, G., MICHON, C., LAUNAY, B., PARKER, A., KRUIF, C. G. (2000) Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixture. *Food Hydrocolloids*, **14**, 273-280.
- LAPASIN, R., PRICL, S. (1995) In *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*. London, Blakie Academic & Professional, p. 163-249.
- LIVNEY, Y.D., CORREDIG, M., DALGLEISH, D.G. (2003) Influence of thermal processing on the properties of dairy colloids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **8**, 359-364.
- LUCEY, J. A. (2001) The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. *Food Hydrocolloids*, **15**, 603-608.
- LUCEY, J.A., SINGH, H. (1998) Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, **30**, 529-542
- MA, L., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. (1993) Review: Rheological properties of food gums and food gum mixtures. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **33**, 133-163.
- MARTIN, A.H., GOFF, H.D., SMITH, A., DALGLEISH, D.G. (2006) Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM). *Food Hydrocolloids*, **20**, 817-824.
- MELLEMA, M., WALSTRA, P., VAN OPHEUSDEN, J.H.J., VAN VLIET, T. (2002) Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid Interface and Science*, **98**, 25-50.
- MLEKO, S. (1997) Rheological properties of milk and whey protein desserts. *Milchwissenschaft*, **52**, 262-265.
- MLEKO, S., GUSTAW, W. (2000) Model whey protein polymer dessert. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, **55**, 149-151.

- MLEKO, S., LI-CHAN, E.C.Y., PIKUS, S. (1997) Interactions of κ -carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. *Food Research International*, **30**, 427-433.
- NAKAMURA, K., SHINODA, E. TOKITA, M. (2001) The influence of compression velocity on strength and structure for gellan gels. *Food Hydrocolloids*, **15**, 247-252.
- NISHINARI, K., TAKAHESI, R. (2003) Interaction in polysaccharide solutions and gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **8**, 396-400.
- NISHINARI, K., WATASE, M., WILLIAMS, P.A., PHILLIPS, G.O. (1990) κ -Carragenan gels: effect of sucrose, glucose, urea and guanidine hydrochloride on the rheological and thermal properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **38**, 1188-1193.
- OAKENFULL, D., MIYOSHI, E., NISHINARI, K. AND SCOTT, A. (1999) Rheological and Thermal Properties of Milk Gels Formed with κ -Carrageenan. I. Sodium Caseinate. *Food Hydrocolloids*, **13**, 525-533.
- PEPPER, L., FARRELL JR., H.M. (1982) Interactions leading to formation of casein submicelles. *Journal of Dairy Science*, **65**, 2259-2266.
- PUPPO MC, ANON MC, (1999) Rheological properties of acidic soy-bean protein gel: Salt addition effect. *Food Hydrocolloids*, **13**, 167-176.
- RIBEIRO, K. O., RODRIGUES, M. I., SABADINI, E., CUNHA, R. L. (2004) Mechanical properties of acid sodium caseinate - κ -carrageenan gels: effect of co-solute. *Food Hydrocolloids*, **18**, 71-79.
- ROEF, S.P.F.M., VAN VLIET, T. (1990) Structure of acid casein gels. 2. Dynamic measurements and type of interaction forces. *Colloids and Surfaces*, **50**, 161-175.
- ROESCH, R., COX, S., COMPTON, S., HAPPEK, U., CORREDIG, M. (2004) κ -Carrageenan and β -lactoglobulin visualized by atomic force microscopy. *Food Hydrocolloids*, **18**, 429-439.
- ROLLEMA, H.S., BRINKHUIS, J.A. (1989) A H-1-NMR Study of bovine casein micelles - Influence of pH, temperature and calcium-ions on micellar structure. *Journal of Dairy Research*, **56**, 417-425.
- ROOS, Y.H. (1995) Characterization of food polymers using state diagrams. *Journal of Food Engineering*, **24**, 339-360.
- ROSS-MURPHY, S. (1998) Reversible and irreversible biopolymer gels—structure and mechanical properties. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics*, **102**, 1534-1539.
- SACKS, F.M., SVETKEY, L.P., VOLLMER, W.M., APPEL, L.J., BRAY, G.A., HARSHA, D., OBARZANEK, E., CONLIN, P.R., MILLER, E.R., SIMONS-MORTON, D.G., KARANJA, N., LIN, P. (2001). Effects on Blood Pressure of Reduced Dietary Sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Diet. *The New England Journal of Medicine*, **344**, 3-10.
- SCHKODA, P., HECHLER A., KESSLER, H. G. (1999) Effect of minerals and pH on rheological properties and syneresis of milk-based acid gels. *International Dairy Journal*, **9**, 269-274
- SCHORSCH, C, JONES, M.G., NORTON, I.T. (1999) Thermodynamic incompatibility and

- microstructure of milk protein/ locust bean gum/ sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, **13**, 89-99.
- SCHORSCH, C., JONES, M. G. NORTON, I. (2000) Phase behavior of pure micellar casein/ κ -carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. *Food Hydrocolloids*, **14**, 347-358.
- SEMENOVA, M.G., ANTIPOVA A.S., BELYAKOVA, L.E. (2002) Food protein interactions in sugar solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **7**, 438-444.
- SGARBIERI, V.C. (1998) Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **32**, 105-126
- SHEKHAR, S.M., JAYANTI, S. (2003) Mixing of power-law fluids using anchors: Metzner-Otto concept revisited. *AIChE Journal*, **49**, 30-40.
- SINGH, H., ROBERTS, M.S., MUNRO, P.A., TEO, C.T. (1996) Acid-induced dissociation of casein micelles in milk: effects of heat treatment. *Journal of Dairy Science*, **79**, 1340-1346.
- SNOEREN, T.H.M., PAYENS, T.A., JEUNINK, J., BOTH, P. (1975) Electrostatic interactions between κ -carrageenan and κ -casein. *Milchwissenschaft*, **30**, 393-396.
- SPAGNUOLO, P.A., DALGLEISH, D.G., GOFF, H.D, MORRIS, E.R. (2005) Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*, **19**, 371-377.
- SPIEGEL, T. (1999) Whey protein aggregation under shear condition- effects of lactose and heating temperature on aggregate size and structure. *International Journal Food Science e Technology*, **34**, 523-531.
- STAINSBY, G. (1980) Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. *Food Chemistry*, **6**, 3-14.
- STEFFE, J.F. (1996) *Rheological Methods in Food Process Engineering*. Freeman Press, East Lansing, 1-93.
- SYRBE, A., BAUER, W.J., KLOSTERMEYER, H. (1998) Polymer Science Concepts in Dairy Systems – An Overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, **8**, 179-193.
- TAKEUCHI, K.P. (2003) Análises reológicas e calorimétricas de sistemas-modelo de proteínas do leite adicionados de carragena e sacarose. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- THAIUDOM, S., GOFF, H.D. (2003) Effect of κ -carrageenan on milk protein polysaccharide mixture. *International Dairy Journal*, **13**, 763-771.
- THERKELSEN, G.H. (1993) In: *Industrial gums*, Third edition, San Diego, Academic Press, cap. **7**, 145-180.
- THYBO, A. K., NIELSEN, M., MARTENS, M. (2000) Influence of uniaxial compression rate on parameters and sensory texture prediction of cooked potatoes. *Journal Textures Studies*, **31**, 25-40.

- TIMASHEFF, S.N., ARAKAWA T. (1988) Mechanism of protein precipitation and stabilization by co-solvents. *Journal of Crystal Growth*, **90**, 39-46.
- TOBITANI, A. YAMAMOTO, H., SHIOYA, T., ROSS-MURPHY, S. (1995). Rheological and structural studies on heat-induced gelation of concentrated skim milk. *Journal of Dairy Journal*, **62**, 257-267.
- TOLSTOGUZOV, V.B. (1991) Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, **4**, 429-468.
- TOLSTOGUZOV, V.B. (2000) The importance of glassy biopolymer components in food. *Nahrung-Food*, **44**, 76-84.
- TOLSTOGUZOV, V.B. (2003) Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, **17**, 1-23.
- TURGEON, S., BEAULIEU, M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **15**, 583-591.
- TURGEON, S.L., BEAULIEU, M., SCHMITT, C., SANCHEZ, C. (2003) Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **8**, 401-414.
- TZIBOULA, A., HORNE, D.S. (1999) Influence of milk protein on κ -carrageenan gelation. *International Dairy Journal*, **9**, 359-364.
- VAN VLIET, T., LAKEMON, M.M.C., VISSCHERS, R.W. (2004). Rheology and structure of milk protein gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **9**, 298-304.
- VASBINDER, A. J., KRUIF, C. G. (2003) Casein-whey protein interaction in heated milk: influence of pH. *International Dairy Journal*, **13**, 669-6677.
- VEGA, C., DALGLEISH, D.G., GOFF, H.D. (2005). Effect of κ -carrageenan addition to dairy emulsions containing sodium caseinate and locust bean gum. *Food Hydrocolloids*, **19**, 187-195.
- VERHEUL, M., PEDERSEN, J.S., ROEFS, S.P.F.M., DE KRUIF, K.G. (1999) Association behavior of native β -lactoglobulin. *Biopolymers*, **49**, 11-20.
- VERHEUL, M., ROEFS, S.P.F.M. (1998) Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids*, **12**, 17-24.
- WALKESTRÖM, P., PANIGHETTI, N., WINDHAB, E., HERMANSSON, A.M. (1998a) Effects of fluid shear and temperature on whey protein gels, pure or mixed with xanthan. *Food Hydrocolloids*, **12**, 469-479.
- WALKESTRÖM, P., WINDHAB, E., HERMANSSON, A.M. (1998b) Shear-induced structuring of particulate whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, **12**, 459-468.
- WALSTRA, P. (1990) On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, **73**, 1965-1979.
- WIUM, H., GROSS, M., QVIST, K.B. (1997) Uniaxial compression of UF-feta cheese related to sensory texture analysis. *Journal of Texture Studies*, **28**, 455-476.

XU, S.Y., STANLEY, D.W., GOFF, H., DAVIDSON, V. J., LE MAGUER, M. (1992). Hydrocolloid/milk gel formation and properties. *Journal of Food Science*, **57**, 96-102.

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

ZASYPKIN, D.V., BRAUDO, E.E., TOLSTOGUZOV, V.B. (1997) Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*, **11**, 159-170.