Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos

Influência da conformação da gelana sobre a gelificação das proteínas do leite

Carolina Siqueira Franco Picone
Engenheira de Alimentos, 2005 - UNICAMP

Prof[a] Dra. Rosiane Lopes da Cunha
Orientadora

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

Campinas, Março de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Picone, Carolina Siqueira Franco
P588i Influência da conformação da gelana sobre a gelificação das proteínas do leite / Carolina Siqueira Franco Picone. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Rosiane Lopes Cunha
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Goma gelana. 2. Leite - Proteínas. 3. Reologia. 4. Microestrutura. 5. Capacidade de retenção da água. I. Cunha, Rosiane Lopes. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Influence of gellan conformation on milk protein gelation
Palavras-chave em inglês (Keywords): Gellam gum, Milk - Proteins, Rheology, Microstructure, Water holding capacity
Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos
Banca examinadora: Rosiane Lopes Cunha
Luiz Antonio Viotto
Divair Christ
Alessandra Faria Baroni
Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

(ORIENTADORA) – DEA/FEA/UNICAMP

_____

Prof. Dr. Luiz Antonio Viotto

(MEMBRO) – DEA / FEA / UNICAMP

_____

Prof. Dr. Divair Christ

(MEMBRO) – CCET / UNIOEST

_____

Profa. Dra. Alessandra Faria Baroni

(MEMBRO) – EEM / IMT

À Rosi e meus pais…

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha pela dedicada orientação. Pelo grande apoio e amizade, empenho e palavras sábias.

À UNICAMP, à Faculdade de Engenharia de Alimentos e seus funcionários.

À FAPESP, CNPQ E CAPES pelo apoio financeiro.

À banca examinadora pelas sugestões na conclusão do trabalho.

A todos os professores que durante toda minha vida acadêmica contribuíram para minha formação e crescimento profissional.

Aos meus pais pelo apoio e suporte durante toda minha vida acadêmica e à minha irmã, Fernanda.

À Aninha, pela amizade sincera, companheirismo, pelo ombro amigo, pelo incentivo, otimismo, por estar sempre disposta a ajudar e pelas várias orientações.

À Fabi, que me convidou para esse caminho, pela amizade, pela ajuda diária e pelo apoio nas horas difíceis.

À Marcela, minha grande amiga, pela amizade, carinho, companheirismo e pela valiosa ajuda em todas as horas que precisei.

A todos os amigos da pós, especialmente aos 06 e a Nenis pelas risadas e bons momentos que vivemos juntos.

À Louise, Renata e Cris, pela amizade e preciosa assessoria estatística.

Ao Ângelo, Kátia, Luiz, Nilson e a todos os integrantes do grupo de pesquisa pelo auxílio e colaboração.

À Joicinha, pela amizade e grande ajuda nas análises de microscopia.

Ao Gui pelas risadas, ajuda, amizade e por ter voltado para a UNICAMP na pós, nos privilegiando com a sua companhia!

À Val, pela amizade e bons momentos que vivemos juntas durante todos esses anos de graduação e pós.

A todos os colegas do LEP.

À Katiuchia, por ter me despertado o gosto pela pesquisa.

Ao Thiago pelo apoio.

À Fer e todos os amigos de Graduação.

À Carol, Irede, Elis e Carina que me receberam de braços abertos.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO XV

ABSTRACT XVII

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL 1

CAPÍTULO 2 – REVISAO BIBLIOGRÁFICA 7

1. BIOPOLÍMEROS: COMPOSIÇÃO E INTERAÇÕES 9

2. GOMA GELANA 13

3. PROTEÍNAS DO LEITE 17

4. INFLUÊNCIA DO PH E TRATAMENTO TÉRMICO NAS INTERAÇÕES PROTEÍNAS-POLISSACARÍDEOS. 26

5. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE GÉIS BIOPOLIMÉRICOS 29

6. CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA E SINERESE 33

CAPÍTULO 3 – INFLUÊNCIA DO PH NO MECANISMO DE TRANSIÇÃO CONFORMACIONAL DA GELANA 35

RESUMO 37

1. INTRODUÇÃO 38

2. MATERIAIS E MÉTODOS 40

3. RESULTADOS E DICUSSÃO 42

4. CONCLUSÕES 55

CAPÍTULO 4 – INFLUÊNCIA DA GELANA NAS PROPRIEDADES FÍSICAS DE GÉIS PROTÉICOS 57

RESUMO 59

1. INTRODUÇÃO 60

2. MATERIAIS E MÉTODOS 62

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 68

4. CONCLUSÕES 109

CONCLUSÕES GERAIS 111

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 115

APÊNDICE 1– ESTUDO DO PROCESSO DE ACIDIFICAÇÃO DE SISTEMAS TRIPOLIMÉRICOS 127

1. INTRODUÇÃO 129

2. MATERIAIS E MÉTODOS 129

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 131

4. CONCLUSÕES 138

ANEXO 1 – PRINCIPAIS AMINOÁCIDOS PROTÉICOS 139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos possíveis rearranjos estruturais de sistemas mistos proteína – polissacarídeo. 12

Figura 2. Unidade tetramérica da gelana desacilada..... 14

Figura 3. Representação esquemática do processo de transição conformacional da gelana. 15

Figura 4. Composição aminoacídica da α_{s1}-caseína. 18

Figura 5. Composição aminoacídica da α_{s2}-caseína. 19

Figura 6. Composição aminoacídica da β-caseína. 19

Figura 7. Composição aminoacídica da κ-caseína. 20

Figura 8. Composição aminoacídica da β-lactoglobulina..... 22

Figura 9. Representação esquemática da estrutura terciária da β-lactoglobulina. 23

Figura 10. Composição aminoacídica da α-lactoalbumina. 24

Figura 11. Representação esquemática da estrutura terciária da α-lactoalbumina. 24

Figura 12. Obtenção de T_m a partir das curvas de viscosidade complexa (η^*) em função da temperatura no aquecimento para amostras de gelana 1,5% (m/v) em diferentes valores de pH..... 44

Figura 13. Viscosidade complexa η^* (Pa.s) em função da temperatura (°C) de todas as etapas do ensaio oscilatório da solução de gelana 1,5% (m/v) em pHs 3,5, 5,3 e 7,0. 47

Figura 14. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') durante o aquecimento das amostras em pHs 3,5, 5,3 e 7,0..... 51

Figura 15. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') durante a primeira etapa de resfriamento para amostras com pH 3,5, 5,3 e 7,0. 52

Figura 16. Micrografias SEM de géis de gelana (GN) 1,5% (m/v) em diferentes pHs..... 54

Figura 17. Tensão de ruptura de géis de gelana (GN) com ou sem proteínas do soro de leite (WPC), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m),

avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis..... 68

Figura 18. Esquema da transição *Coil-Helix* da gelana na presença de proteínas. 70

Figura 19. Tensão de ruptura de géis de gelana (GN) com ou sem caseinato de sódio (CN), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. 72

Figura 20. Tensão de ruptura de géis de caseinato de sódio, gelana (GN), e proteínas do soro (WPC), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis e a concentração de caseinato de sódio. 73

Figura 21. Deformação na ruptura (ε_R) de géis de gelana (GN) com ou sem proteínas do soro de leite (WPC), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. 77

Figura 22. Deformação na ruptura (ε_R) de géis de gelana (GN) com ou sem caseinato de sódio (CN), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis..... 78

Figura 23. Deformação na ruptura (ε_R) de géis de caseinato de sódio, gelana (GN), e proteínas do soro (WPC), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis e a concentração de caseinato de sódio. 80

Figura 24. Módulo de elasticidade (E) de géis de gelana (GN) com ou sem proteínas do soro de leite (WPC), seguido de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliado em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis..... 82

Figura 25. Módulo de elasticidade (E) de géis de gelana (GN) com ou sem caseinato de sódio (CN), seguido de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliado em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. 83

Figura 26. Módulo elástico de géis de caseinato de sódio, gelana (GN), e proteínas do soro (WPC), seguido de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliado em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis e a concentração de caseinato de sódio. 84

Figura 27. Capacidade de retenção de água expressa em quantidade de água retida em relação à quantidade de água total do gel de sistemas de gelana (GN) com ou sem proteínas do soro de leite (WPC), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. 86

Figura 28. Capacidade de retenção de água expressa em quantidade de água retida em relação à quantidade de água total do gel de sistemas de gelana (GN) com ou sem caseinato de sódio (CN), seguidos de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliados em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. 88

Figura 29. Capacidade de retenção de água (WHC) expressa em quantidade de água retida em relação à quantidade de água total de géis de caseinato de sódio, gelana (GN), e proteínas do soro (WPC), seguidos de suas respectivas concentrações (m/m), avaliados em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis e a concentração de caseinato de sódio. 90

Figura 30. Valores de porcentagem de sinerese expressos em quantidade de água liberada em relação à quantidade de água total do gel de sistemas de gelana (GN) com ou sem proteínas do soro de leite (WPC), seguidos de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliados em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. 92

Figura 31. Valores de porcentagem de sinerese expressos em quantidade de água liberada em relação à quantidade de água total do gel de sistemas de gelana (GN) com ou sem caseinato de sódio (CN), seguidos de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliados em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. 93

Figura 32. Valores de porcentagem de sinerese expressos em quantidade de água liberada em relação à quantidade de água total do gel de sistemas de

caseinato de sódio, gelana (GN), e proteínas do soro (WPC), seguidos de suas respectivas concentrações (m/m), avaliados em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis e a concentração de caseinato de sódio. 95

Figura 33. Micrografias SEM de géis de proteínas do soro (WPC) de leite e gelana (GN). 100

Figura 34. Micrografias SEM de géis de caseinato de sódio (CN) e gelana (GN). 104

Figura 35. Micrografias SEM de géis de caseinato de sódio (CN), proteínas do soro (WPC) e gelana (GN). 107

Figura 36. Variação do pH com o tempo (horas) para amostras de 2% (m/m) de caseinato e 5% (m/m) de IPS acidificadas com diferentes razões de GDL..... 133

Figura 37. Superfície de resposta relacionando o pH final obtido com a concentração de isolado protéico de soro (IPS) e a razão de GDL..... 136

Figura 38. Superfície de resposta relacionando o pH final obtido com a concentração de gelana (GN) e a razão de GDL..... 137

Figura 39. Superfície de resposta relacionando o pH final obtido com a concentração de caseinato de sódio (CN) e a razão de GDL. 137

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Ponto isoelétrico e peso molecular das principais frações da caseína. 18

Tabela 2. Temperaturas de início de transição (T_{onset}), temperaturas intermediárias de transição (T_1 e T_2) e temperaturas médias de transição (T_m) durante o aquecimento de soluções de gelana 1,5% (m/v) em pHs 5,3 e 7,0. 43

Tabela 3. Valores de viscosidade complexa (Pa.s) das amostras de gelana 1,5% (m/v) em pHs 3,5; 5,3 e 7,0. 46

Tabela 4. Valores do módulo de armazenamento, G' (Pa), das amostras de gelana 1,5% (m/v) em pHs 3,5; 5,3 e 7,0. 49

Tabela 5. Valores do módulo de dissipação, G" (Pa), das amostras de gelana 1,5% (m/v) em pHs 3,5; 5,3 e 7,0. 49

Tabela 6. Temperaturas de cruze (℃) de G' e G" das amostras em diferentes valores de pH. 50

Tabela 7. Composição do concentrado protéico (WPC) de soro, caseína e gelana em relação ao teor de umidade, proteínas e minerais. 63

Tabela 8. Composição dos sistemas poliméricos. 64

Tabela 9. Porcentagem de proteínas solúveis de amostras de proteínas do soro, caseinato de sódio e gelana (estado *Coil* e *Helix*) em pH 4,0. 96

Tabela 10. Porcentagem de proteínas solúveis de amostras de proteínas do soro, caseinato de sódio e gelana (estado *Coil* e *Helix*) em pH 7,0. 96

Tabela 11. Razão de GDL e concentrações de isolado protéico de soro, caseinato de sódio e gelana avaliadas no planejamento experimental. 131

Tabela 12. Valores aproximados de pH de equilíbrio obtidos para cada razão de GDL utilizada. 133

Tabela 13. Valores de pH obtidos de acordo com as formulações do planejamento experimental. 134

Tabela 14. Coeficientes de regressão, erro puro e p-valor. 135

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) e coeficientes de determinação. 135

Tabela A1. Principais aminoácidos protéicos e suas características. 141

RESUMO

Tendo em vista a necessidade do entendimento das interações entre ingredientes para o desenvolvimento de novos produtos lácteos e para o controle e manipulação de suas características de estabilidade e textura, este trabalho teve como objetivo elucidar as interações entre as proteínas do leite e a goma gelana. Foi estudado o efeito de diferentes concentrações de gelana, caseinato de sódio e concentrado protéico de soro de leite, assim como o estado conformacional do polissacarídeo, nas propriedades de textura, microestrutura e estabilidade em relação à perda de água dos sistemas formados. A transição conformacional da gelana em diversos valores de pH foi estudada por ensaios reológicos oscilatórios a baixas freqüências. Foi observado que a transição de estado desordenado – ordenado do polissacarídeo é irreversível com a temperatura em pH 3,5, enquanto em maiores valores de pH os géis formados são termorreversíveis. Além disso, sistemas em pH 3,5 apresentaram viscosidade e caráter elástico mais pronunciados, enquanto que na faixa de pH de 5,3 a 7,0, não foram observadas mudanças significativas nas características reológicas do material. Em sistemas mistos proteínas-polissacarídeos, diferentes estruturas foram observadas de acordo com as concentrações de biopolímeros e o estado conformacional do polissacarídeo, resultando em alterações das propriedades mecânicas, de retenção de água e de solubilidade dos sistemas. Sistemas bipoliméricos caseinato de sódio – gelana formaram coacervados em altas concentrações de proteína e apresentaram microestrutura compacta, refletindo em maiores valores de tensão de ruptura, elasticidade e baixa capacidade de retenção de água. Já nos sistemas tripoliméricos, não foram observados coacervados devido ao favorecimento das interações entre as proteínas que ocasionou um aumento dos valores de capacidade de retenção de água das amostras. A gelana e as proteínas do soro apresentaram incompatibilidade termodinâmica em altas concentrações poliméricas, confirmada pelos

ensaios de solubilidade protéica em água, levando a formação de sistemas mais frágeis, menos deformáveis e com uma estrutura mais porosa, que contribuiu para o aumento da capacidade de retenção de água e redução da sinerese dos mesmos. O uso de gelana em estado desordenado no preparo das amostras com alta concentração protéica induziu a formação de complexos eletrostáticos entre as proteínas e as moléculas de gelana individuais, diminuindo a rigidez dos sistemas.

ABSTRACT

As the ingredient interactions are important for the development of new milk products and for the control and management of its stability and texture properties, the aim of this work was to elucidate the milk proteins and gellan gum interactions. The effect of different concentrations of gellan gum, sodium caseinate and whey protein concentrate, as well as the polysaccharide conformational transition on the systems texture properties, microstructure and water release were studied. The gellan gum conformational transition was studied in different pH values by oscillatory shear measurements at low frequencies. It was observed that the conformational polysaccharide transition (coil-helix) was thermo-irreversible at pH 3.5 while at higher pH values the gels were temperature reversible. Moreover, systems at pH 3.5 showed higher viscosity and storage modulus, but at 5.3 – 7.0 pH range it was not observed significant differences on the material rheological properties. Protein-polysaccharide systems showed different structures according to the polymers concentration and polysaccharide conformation, resulting on variations of its mechanical properties, water binding and solubility. Bi-polymeric systems composed of caseinate and gellan formed coacervates at high protein concentration leading to a compact structure which reflected in higher rupture stress, elasticity and water holding capacity. Nevertheless, on multipolymeric samples it was not observed coacervates probably due the enhance of protein-protein interactions that lead to increase on water holding capacity values. Gellan gum and whey proteins showed thermodynamic incompatibility at high polymer concentrations, confirmed by the solubility measurements, and induced the formation of weaker and less deformable gels, which had a porous structure with more ability to hold water. The use of coil gellan on the preparation of the samples with high protein concentration resulted on electrostatic complexes formation between the proteins and the individual gellan molecules, reducing the gels hardness.

– CAPÍTULO 1 –

Introdução geral

A textura é um parâmetro de qualidade que influencia fortemente a aceitação de produtos alimentícios por parte dos consumidores (VAN DER BERG *et al.,* 2007), podendo ser mensurada através de propriedades reológicas e estruturais. Os alimentos são uma mistura complexa formada por diferentes componentes que interagem entre si formando variadas estruturas e texturas dependendo da sua composição e do processo a que são submetidos. Assim, o estudo de sistemas mais simples, formados por uma pequena quantidade de ingredientes, tem sido uma ferramenta útil para o entendimento das interações entre os componentes dos alimentos. Géis multicomponentes são um bom modelo para produtos alimentícios naturais e manufaturados, que contenham elevado teor de umidade (50-90%). Sua consistência semi-sólida se dá devido à presença de redes formadas por biopolímeros que retém grande quantidade de água (MORRIS, 1985). Muitos ingredientes podem compor a estrutura dos géis multicomponentes, porém as proteínas e os polissacarídeos são os mais importantes (TOLSTOGUZOV, 1986). A combinação de proteínas nativas ou desnaturadas e polissacarídeos neutros ou aniônicos possibilita a obtenção de um grande número de estruturas e, conseqüentemente, de texturas. (BROWNSEY & MORRIS, 1998; DE JONG & VAN DE VELDE, 2007, TOLSTOGUZOV, 2000; VAN DER BERG *et al.,* 2007). Vários são os exemplos de géis mistos de proteínas e polissacarídeos reportados na literatura (OLSSON *et al.,* 2000; TURGEON & BEAULIEU, 2001; TAVARES & DA SILVA, 2003).

A goma gelana é um polissacarídeo de grande interesse e aplicabilidade em alimentos por possuir propriedades funcionais únicas (TANG *et al*., 1994). Além de ser um agente gelificante, a gelana é um biopolímero estabilizante formador de filme, espessante e liberador de sabor. Por formar um gel transparente, inclusive a baixas concentrações, e apresentar resistência ao calor e a ácidos quando comparado a géis de outros polissacarídeos, a gelana tem grande potencial de uso na indústria de alimentos e

biotecnologia (MIYOSHI *et al.*, 1996; CHANDRASEKARAN & RADHA, 1995; SANDERSON, 1990). No entanto, as interações da gelana com outros componentes dependem do seu estado conformacional, que está relacionado à temperatura, da concentração do polímero e da composição do solvente (KASAPIS *et a*l., 1999; LAU *et al.*, 2000). A aplicação bem sucedida da gelana visando à obtenção dos atributos de textura desejados depende de um amplo entendimento das relações entre as propriedades mecânicas e as interações de ordem molecular entre os componentes dos sistemas (TANG *et al.*, 1995).

O setor de laticínios é de grande importância na economia brasileira, sendo um dos maiores geradores de receita da indústria de alimentos (ABIA, 2006). Na atualidade, muitos produtos lácteos são uma combinação de inúmeros ingredientes, visando à obtenção de novos sabores e texturas, como é o caso de iogurtes, requeijões e queijos análogos. Assim, estudos que visam o entendimento das interações entre ingredientes são muito relevantes nessa área, por permitir a manipulação e o controle de atributos desejáveis em alimentos, bem como o desenvolvimento de novas texturas.

Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes concentrações de sistemas tripoliméricos gelana - caseinato de sódio - proteínas do soro de leite e a influência do estado conformacional do polissacarídeo, nas interações estabelecidas entre estes ingredientes e nas propriedades obtidas de textura, microestrutura e estabilidade em relação à perda de água dos sistemas formados. Para isso foram realizados ensaios de solubilidade em água, ensaios de compressão uniaxial, microscopia eletrônica de varredura e ensaios de sinerese e capacidade de retenção de água. A interação da gelana (em diferentes estados conformacionais) com cada uma das proteínas também foi estudada pela avaliação das interações e das características de

sistemas bipoliméricos: gelana – proteínas do soro e gelana – caseinato em diferentes concentrações, de forma que os sistemas tripoliméricos fossem melhor compreendidos.

Inicialmente foi realizado um estudo do mecanismo de transição conformacional da gelana em diferentes valores de pHs por ensaios reológicos oscilatórios (Capítulo 3), onde se obteve as temperaturas de transição conformacional da goma. No Capítulo 4 são apresentados os resultados de propriedades mecânicas, capacidade de retenção de água, sinerese, solubilidade e a microestrutura dos sistemas bi e tripoliméricos compostos por diferentes concentrações de cada polímero e dois diferentes estados conformacionais da gelana. O Apêndice 1 mostra o estudo do processo de acidificação com GDL de sistemas gelana – caseinato de sódio – proteínas do soro, a partir do qual se determinou a razão de GDL que seria utilizada na acidificação dos sistemas.

– CAPÍTULO 2 –

Revisão Bibliográfica

1. Biopolímeros: Composição e Interações

A natureza e composição dos biopolímeros influenciam não só a sua estrutura, como também as interações estabelecidas com outros componentes, determinando suas propriedades funcionais e suas características reológicas e estruturais. Proteínas e polissacarídeos são os dois biopolímeros mais estudados em alimentos visando o controle e manipulação de suas propriedades estruturais, de textura e estabilidade (DICKINSON, 1998).

Os polissacarídeos são biopolímeros constituídos de monômeros de açúcares simples ricos em grupos funcionais – OH, capazes de formar pontes de hidrogênio. Polissacarídeos estereoregulares (especialmente os de origem bacteriana, como a gelana) podem apresentar pontes de hidrogênio intramoleculares, que estabilizam sua estrutura helicoidal, e pontes intermoleculares possibilitando a formação de gel (RINAUDO, 2004).

As proteínas são macromoléculas complexas compostas por aminoácidos unidos por amidas substituídas, ou ligações peptídicas. A natureza e tipo desses aminoácidos (Anexo 1) definem as estruturas primárias, secundária e terciária das moléculas protéicas, determinando suas interações com outros biopolímeros. Os aminoácidos são classificados em quatro grupos segundo sua polaridade: apolares, polares não ionizáveis, polares ionizáveis ácidos e polares ionizáveis básicos (CHEFTEL, 1996), como apresenta o Anexo 1.

Os aminoácidos polares, de forma geral, são aptos a formar pontes de hidrogênio que exerce papel fundamental na estabilização das estruturas secundarias e terciárias das proteínas. Estas interações são moderadamente fortes (10-40kJ mol^{-1}) e de curto alcance. No entanto, sua importância nas interações proteínas – polissacarídeos perdem a relevância a altas temperaturas.

Os aminoácidos polares ionizáveis estão relacionados à quantidade de interações eletrostáticas atrativas e repulsivas intra e intermoleculares das moléculas protéicas. Dependendo do grau de ionização, esta interação pode ser de curto alcance (fraca) ou de longo alcance (forte). Normalmente sua ordem de magnitude varia de 42 a 84 kJ mol^{-1}. De forma geral, as interações eletrostáticas polímero – polímero são sensíveis a variações de pH e força iônica (DICKINSON, 1998; CHEFTEL, 1996), diminuindo de intensidade com o aumento da força iônica (MCCLEMENTS, 2006).

Os aminoácidos apolares recebem essa classificação de acordo com a hidrofobicidade média de suas cadeias laterais, que não interagem com moléculas polares (exceto por interações de Van der Waals). Eles são responsáveis pelas interações hidrofóbicas que possuem origem entrópica e são moderadamente fortes (5-100 kJ mol^{-1}). As interações hidrofóbicas são de longo alcance e se fortalecem com o aumento de temperatura (acima de 60ºC). Através delas, os aminoácidos apolares se associam tendendo a permanecer na região interna das moléculas de proteína (DICKINSON, 1998; CHEFTEL, 1996).

Outro tipo de interação possível entre proteínas, porém de pouca influência nas interações proteínas - polissacarídeos, são as interações de Van der Waals. Inerente a todos os compostos em diferentes intensidades, as interações de Van der Waals possuem origem eletromagnética e são consideravelmente fracas (1 - 9 kJ mol^{-1}). Sua intensidade depende da distância entre os átomos. A grandes distâncias as interações são inexistentes, mas à medida que a distância entre as moléculas diminui, uma força atrativa surge entre elas. Quando se reduz ainda mais a distância entre as moléculas, as forças repulsivas tornam-se predominantes (DICKINSON, 1998; CHEFTEL, 1996).

De forma contrária às interações de Van der Waals, as interações do tipo covalente são as mais relevantes para sistemas protéicos e de proteínas-polissacarídeos.

Elas são extremamente fortes (330 - 338 kJ mol^{-1}) e ocorrem entre grupos reativos específicos de diferentes macromoléculas (DICKINSON, 1998). Nas proteínas as interações covalentes normalmente estão associadas a resíduos de cisteína e cistina presentes na cadeia peptídica, que são capazes de formar pontes dissulfeto. Em valores de pH extremos e a altas temperaturas, mudanças na estrutura terciária das proteínas expõem grupos tiol livres desses resíduos possibilitando a formação de pontes dissulfeto, que devido à sua grande estabilidade, tornam o processo de desnaturação protéica irreversível. Dentre as interações proteína – polissacarídeo, as interações covalentes são de grande relevância e conferem permanência aos complexos formados (DICKINSON, 1998; CHEFTEL, 1996).

As proteínas e polissacarídeos também estão sujeitos aos efeitos de exclusão de volume ou interações estéricas que são de origem repulsiva e de curto alcance. Elas restringem o rearranjo espacial relativo de segmentos macromoleculares, reduzindo a entropia dos sistemas (DICKINSON, 1998; MC CLEMENTS, 2006).

Assim, o balanço de todas as interações citadas acima, aliado a condições do meio, como pH, força iônica e concentração dos polímeros pode induzir a formação de sistemas monofásicos ou bifásicos, conforme ilustrado na Figura 1.

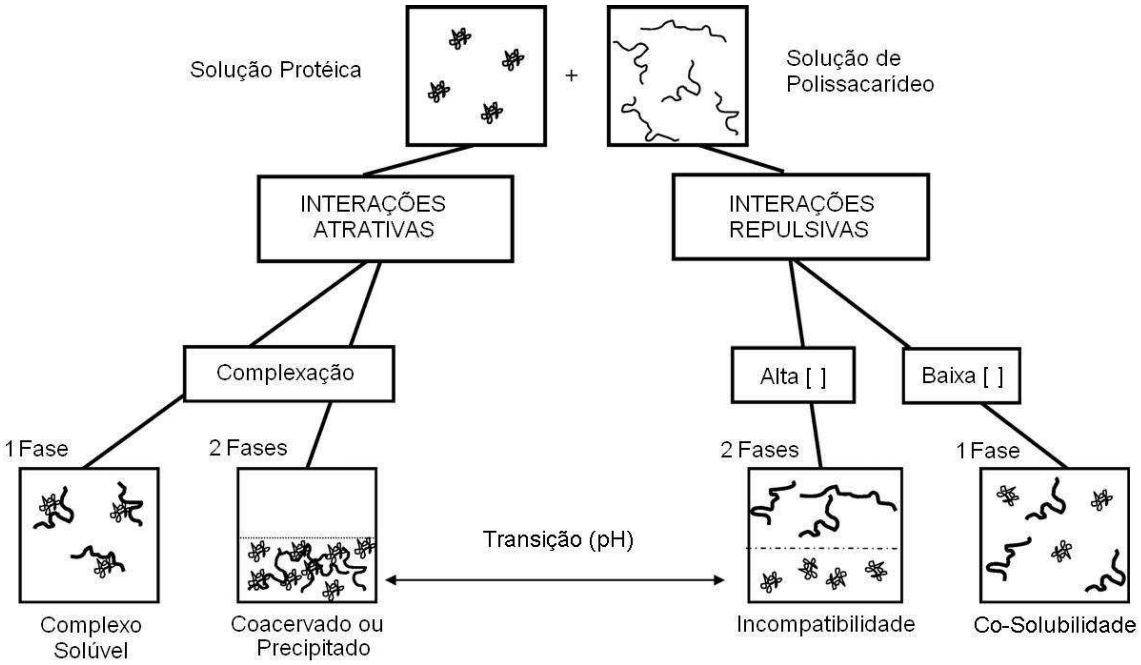


Figura 1. Representação esquemática dos possíveis rearranjos estruturais de sistemas mistos proteína – polissacarídeo (MCCLEMENTES, 2006).

Em um sistema monofásico dois biopolímeros podem existir como moléculas individuais ou como complexos solúveis homogeneamente distribuídos. A formação de complexos solúveis entre proteínas e polissacarídeos aniônicos ocorre normalmente em soluções de baixa concentração polimérica e em valores de pH próximos ou acima do ponto isoelétrico das proteínas. O aumento da concentração de polímeros e a redução do pH para valores abaixo do pI das proteínas podem induzir a formação de complexos insolúveis e separação de fases (BUROVA *et al.,* 2007). A separação de fases pode ocorrer a partir de dois mecanismos físico-químicos diferentes que irão determinar se ela é associativa ou segregativa. (MCCLEMENTES, 2006; DE KRUIF & TUINIER, 2001). Na separação associativa interações relativamente fortes são estabelecidas entre dois biopolímeros diferentes induzindo a associação dos mesmos. Isto normalmente acontece em sistemas poliméricos com moléculas de cargas elétricas opostas que são atraídos por interações eletrostáticas, como polissacarídeos aniônicos e proteínas abaixo do ponto isoelétrico. O resultado desse tipo de separação é uma fase rica em ambos biopolímeros

e uma fase com baixa concentração polimérica. A fase rica em polímeros pode ser tanto um coacervado, como um precipitado, dependendo da força das atrações e da natureza dos biopolímeros presentes (MCCLEMENTES, 2006). Na separação segregativa, forças repulsivas relativamente forte são estabelecidas entre dois biopolímeros diferentes, ou seja, há uma energia livre de mistura positiva relativamente alta (desfavorável). A origem molecular deste fenômeno normalmente é a exclusão estérica existente entre as moléculas. Este tipo de separação de fase ocorre entre biopolímeros não carregados ou quando ambos biopolímeros possuem a mesma carga. Em concentrações poliméricas suficientemente baixas, os dois polímeros podem apresentar alta miscibilidade, formando uma solução monofásica, mas quando as concentrações excedem certos limites duas fases são formadas, cada qual rica em um biopolímero (GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997; POLYAKOV *et al.,* 1997; MCCLEMENTES, 2006).

2. Goma Gelana

A gelana é um polissacarídeo gelificante que pode ser utilizado em produtos confeitados, geléias, cremes, géis a base de água, recheios para tortas, pudins, produtos resfriados e congelados e produtos lácteos, como sorvetes, iogurtes e “milk-shakes” (MORRIS, 1995; BAYARRI *et al*., 2001). É um polissacarídeo aniônico extracelular, produzido pela bactéria *Sphingomonas elodea*. O produto direto da fermentação é o polissacarídeo em sua forma altamente acilada, cuja repulsão estérica impede a gelificação. A desacilação por tratamento com álcali resulta na forma desacilada, que é a normalmente comercializada e possui elevado poder gelificante. Em sua forma desacilada a gelana apresenta uma seqüência complexa de tetrassacarídeos (Figura 2) que se repetem: β -D- glicose, β- D- ácido glicurônico e α- L- ramnose na proporção molar de 2: 1: 1, e um grupo lateral carboxílico em cada unidade tetramérica repetida (MIYOSHI *et al*., 1996; MILAS & RINAUDO, 1996; SANDERSON, 1990). Sua densidade de carga é

relativamente baixa quando comparada à de outros polissacarídeos como as pectinas e carragenas, sendo de 0,25 mol de cargas negativas/mol de monossacarídeo.

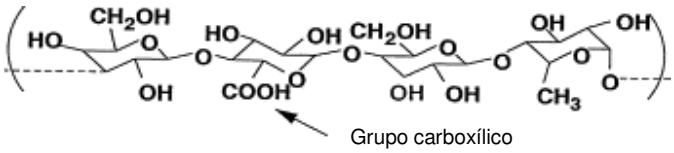


Figura 2. Unidade tetramérica da gelana desacilada (OGAWA *et al.,* 2006).

Em solução aquosa (sol), a gelana apresenta repulsão eletrostática intra e intermolecular entre seus grupos carboxílicos laterais, o que impede tanto a formação quanto a agregação das hélices para a formação de gel. A gelificação de soluções de gelana pode ser induzida pela mudança da força iônica do meio, por alterações de pH, tratamento térmico ou aumento da concentração do polímero (YAMAMOTO, 2006; RODRÍGUEZ- HERNÁNDEZ *et al*., 2003). Dois modelos são propostos na literatura para explicar a gelificação da goma gelana (ROBINSON *et al*., 1991), o fibroso e o de domínios. Eles são bem similares, mas diferem entre si na descrição dos agregados. No entanto, o modelo mais comumente aceito é o de domínios. Este modelo afirma que a altas temperaturas, a gelana se apresenta em estado desordenado (cadeias simples) e na conformação enovelada. Assim, resfriando-se a solução em condições não gelificantes, os novelos se convertem reversivelmente em duplas-hélices (estado ordenado) e a associação dessas duplas-hélices por forças de van der Waals leva à gelificação macroscópica (transição sol – gel), como pode ser observado na Figura 3. Na presença de cátions, conjuntos de dupla-hélices se associam formando a rede de gel (ROBINSON *et al*., 1991; MIYOSHI *et al*., 1996; NICKERSON *et al*., 2003; RODRÍGUEZ- HERNÁNDEZ *et al.,* 2003). As concentrações de gelana normalmente utilizadas em alimentos variam de 0,2 a 0,4% (m/m). No entanto ela apresenta capacidade de gelificação em concentrações bem menores quando em baixos valores de pH e presença do tipo e quantidade ideal de cátions (LAU *et al*., 2000; MILAS & RINAUDO, 1996).

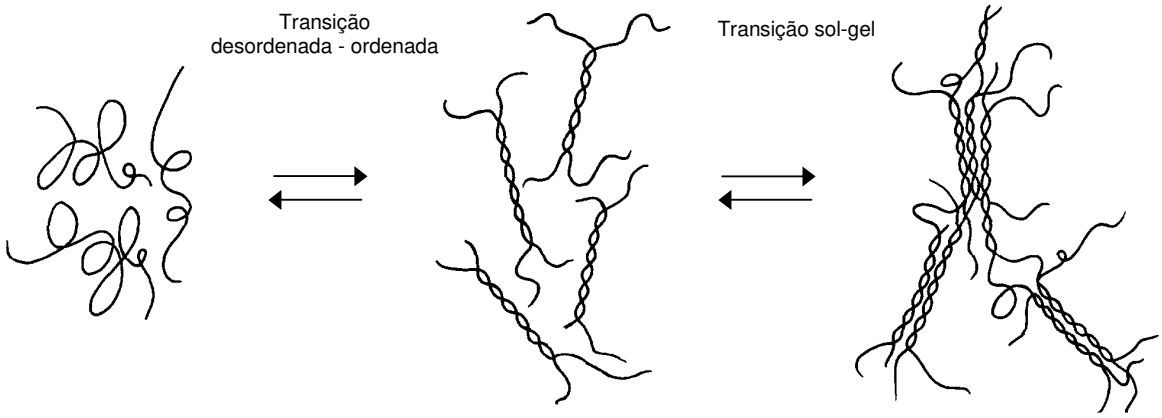


Figura 3. Representação esquemática do processo de transição conformacional da gelana (MIYOSHI *et al.,*1995).

A temperatura de transição conformacional da gelana varia entre 30 e 50°C, dependendo da concentração do polímero e da composição do solvente (principalmente pH e presença de sais) (GIVANASIS *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2004; KASAPIS *et al.*, 1999; LAU *et al.,* 2000; OGAWA *et al.,* 2002; RODRÍGUEZ- HERNÁNDEZ *et al.,* 2003), tal como ocorre com a goma xantana (LEE & BRANT, 2002; IKEDA *et al.*, 2004). Assim como a xantana, em diferentes artigos da literatura afirma-se que essa mudança conformacional seja reversível (MIYOSHI *et al.*, 1996; NAKAJIMA *et al.*, 1996). No entanto, no caso da xantana essa mudança não se mostrou reversível quando uma solução deste polissacarídeo foi submetida a tratamento térmico prévio com caseinato de sódio, levando a diferentes características estruturais (BRAGA & CUNHA, 2004). Porém, ainda não há estudos nesse sentido sobre a goma gelana, embora isso possa afetar profundamente as propriedades dos géis formados com proteínas.

Produtos acidificados correspondem a uma grande gama de produtos alimentícios. Entretanto, pouca informação sobre o efeito do pH nas propriedades dos géis de gelana está disponível na literatura (YAMAMOTO, 2006; MAO *et al.*, 1999). Sabe-se que a redução do pH gera dissociação dos grupos carboxílicos laterais das moléculas de gelana, tornando-a um polieletrólito menos aniônico, com menor repulsão eletrostática.

Isso leva a uma redução das dimensões das cadeias permitindo a formação de duplas-hélices pela associação de duas moléculas, com a presença de pontes de hidrogênio entre o ácido glucurônico de uma cadeia e a glicose e a ramnose de outra cadeia. Além disso, íons H^+ se ligam à superfície das hélices individuais e diminuem sua densidade de carga, reduzindo a barreira eletrostática para a agregação das hélices e possibilitando a formação de "zonas de junção". Interações secundárias, incluindo pontes de hidrogênio, ligam as cadeias às zonas de junção, o que resulta na gelificação macroscópica (transição sol – gel) (HORINAKA *et al*., 2004a; GIVANASIS *et al*., 2000; IKEDA *et al*., 2004; KANI *et al*., 2005; KASAPIS *et al*., 1999; LAU *et al.,* 2000; MAO *et al*., 1999; MIYOSHI *et al*., 1994; MORITAKA *et al*., 1995; NICKERSON *et al*., 2003; OGAWA *et al*., 2002; OGAWA, 1996; RODRÍGUEZ – HERNÁNDEZ *et al*., 2003).

O pH natural de uma solução típica de gelana contendo íons cálcio em concentrações de 1,5 a 60 mM, comumente estudada na literatura, está em torno de 5,0 (SANDERSON, 1990). Em pH alcalino e sob aquecimento, ocorre desacetilação das moléculas de gelana (KANG *et al*., 1982) o que favorece a agregação e contribui para a formação de géis mais fortes que em pH natural, como observado por MORITAKA *et al.* (1995). No entanto, essas condições são pouco usuais na produção de alimentos. A acidificação de sistemas de gelana até valores de pH próximos de 4,0 também resulta no aumento da força dos géis, independentemente do tipo de acidificação empregada (MORITAKA *et al.,* 1995; YAMAMOTO & CUNHA, 2007), visto que nestas condições a repulsão eletrostática entre as moléculas é reduzida e a formação de zonas de junções é favorecida. No entanto, em valores de pH próximos a 2,0, dois comportamentos distintos são relatados na literatura. Moritaka e colaboradores (1995) observaram que soluções de gelana acidificadas de forma direta com HCl até pH 2,0 apresentam aspecto turvo e separação de fase que possivelmente estariam relacionados à hidrólise ácida das

moléculas (MORITAKA *et al.,* 1995). Já Yamamoto (2006) estudou a acidificação indireta de soluções de gelana a partir da adição de GDL e obteve maiores valores de tensão de ruptura em sistemas formados em pH 2,0. Aparentemente, a acidificação indireta não provoca hidrólise das moléculas de gelana mesmo a baixos valores de pH e, portanto seria a maneira mais adequada de se acidificar os sistemas compostos por este polissacarídeo. O pH também afeta a mobilidade das cadeias de gelana, a qual diminui com o decréscimo do pH. Como já afirmado, as cadeias de gelana se tornam menos aniônicas à medida que o pH diminui e a redução da repulsão eletrostática entre segmentos intramoleculares pode resultar no impedimento da expansão da cadeia (HORINAKA *et al.*, 2004 a, b). Quanto menor a mobilidade das moléculas, maior a facilidade de agregação e gelificação.

3. Proteínas do leite

O leite possui cerca de 3,5% de proteínas que podem ser classificadas em quatro grupos: caseínas, proteínas do soro (α-lactoglobulina, β-lactoglobulina, albumina sérica (BSA) e imunoglobulinas (Ig)), proteínas das membranas dos glóbulos de gordura e outras. Deste total, 80% é caseína, 19% são proteínas do soro e 1% são frações restantes (FOX & MCSWEENEY, 1998; SGARBIERI, 1998).

3.1. Caseínas

As caseínas são fosfoproteínas com características ácidas devido à grande quantidade de ácido glutâmico e aspártico em sua cadeia peptídica. Sua composição de aminoácidos confere às caseínas uma hidrofobicidade média, ligeiramente superior a da maioria das proteínas globulares, possibilitando que essa proteína se associe mais facilmente a complexos de alto peso molecular (CHEFTEL, 1996). As caseínas são

constituídas de quatro frações principais: α_{s1}-, α_{s2}-, β- e κ-caseína (WONG *et al.*, 1996). O ponto isoelétrico e massa molecular das principais frações são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Ponto isoelétrico e massa molecular das principais frações da caseína (SGARBIERI, 2005; CHEFTEL, 1996)

Fração Protéica	Ponto isoelétrico	MM (Da)
α_{s1}	4,9	23.612
α_{s2}	5,3	25.228
β	4,5	24.000
κ	4,1	21.000

A α_{s1}-caseína é quantitativamente a principal fração protéica do leite bovino, sendo insolúvel nas condições de pH, temperatura e força iônica que ocorrem naturalmente no leite. Ela é composta por 199 resíduos de aminoácidos e apresenta estrutura pouco ordenada, correspondendo à fração com maior carga iônica (SGARBIERI, 2005). Sua composição aminoacídica é apresentada na Figura 4.

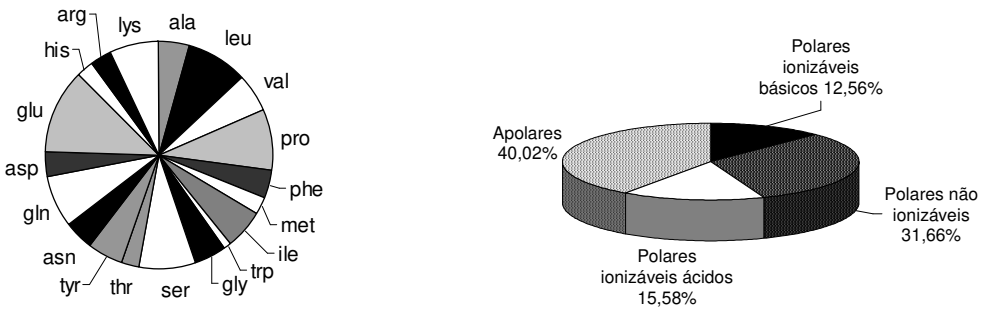


Figura 4. Composição aminoacídica da α_{s1}-caseína. Baseado em Sgarbieri (2005) e Cheftel (1996).

As α_{s2}-caseínas são compostas por 207 resíduos de aminoácidos e contêm mais resíduos com cadeias laterais carregadas que a α_{s1}. Ela é a mais hidrofílica das frações devido à maior fosforilação e quantidade de resíduos catiônicos em sua cadeia (SGARBIERI, 2005). Sua composição é apresentada na Figura 5.

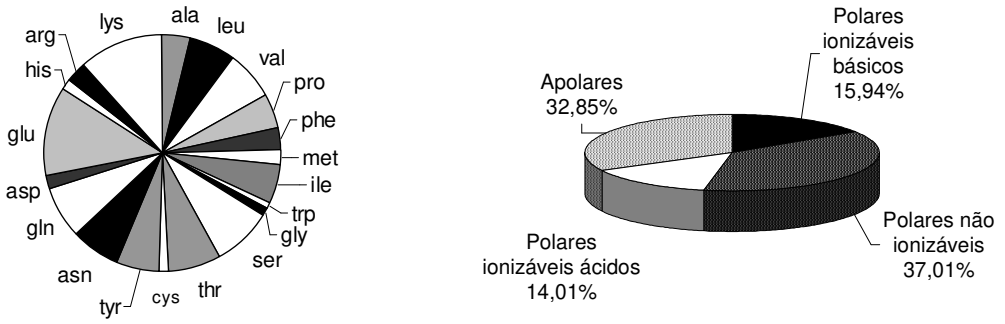


Figura 5. Composição aminoacídica da α_{s2}-caseína. Baseado em Sgarbieri (2005) e Cheftel (1996).

As β-caseínas são as que apresentam maior hidrofobicidade, e diferentemente das outras caseínas, a sua auto-associação é dependente da temperatura. Em razão da composição e da seqüência de aminoácidos característicos, as caseínas α e β apresentam estruturas flexíveis com baixíssimo grau de estrutura secundária (α-hélice) e com menos de 10% da estrutura em conformação β. Essa estrutura relativamente aberta e flexível das caseínas deve-se ao elevado teor de prolina (Pro) uniformemente distribuída ao longo da cadeia polipeptídica. A prolina tem a propriedade de interromper a continuidade das estruturas secundárias, particularmente a α-hélice, promovendo uma estrutura bastante randomizada (SGARBIERI, 2005). A composição aminoacídica da β-caseína é apresentada na Figura 6.

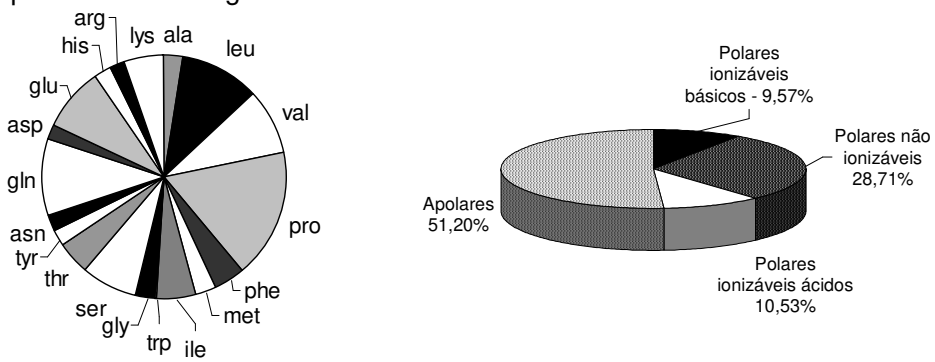


Figura 6. Composição aminoacídica da β-caseína. Baseado em Sgarbieri (2005) e Cheftel (1996).

A κ-caseína é a fração que possui o mais baixo teor de fosfato e não precipita em baixos valores de pH, nem em presença de cálcio. Ela possui uma região N-terminal hidrofóbica e a região C-terminal hidrofílica (BRIGNON *et al.*, 1977). A região terminal

hidrofílica é glicosilada e concentra a maioria dos aminoácidos ácidos e hidrófilos, sendo designada glicomacropeptídio (GMP). Os resíduos de aminoácidos básicos e os apolares estão agrupados na região N-terminal hidrofóbica, compondo uma região apolar e insolúvel denominada para-κ-caseína. A região da seqüência primária da para-κ-caseína, por ser de natureza apolar, orienta-se para o interior das micelas e interage por meio de grupos hidrofóbicos com as caseínas α e β dispostas no núcleo, ao passo que o glicomacropeptídio (GMP) em virtude de sua polaridade, orienta-se para a fase soro interagindo com a água. Essas interações da seqüência primária da κ-caseína são as responsáveis pela estabilização das micelas de caseína no leite (SGARBIERI, 2005). A composição aminoacídica da κ-caseína é apresentada na Figura 7.

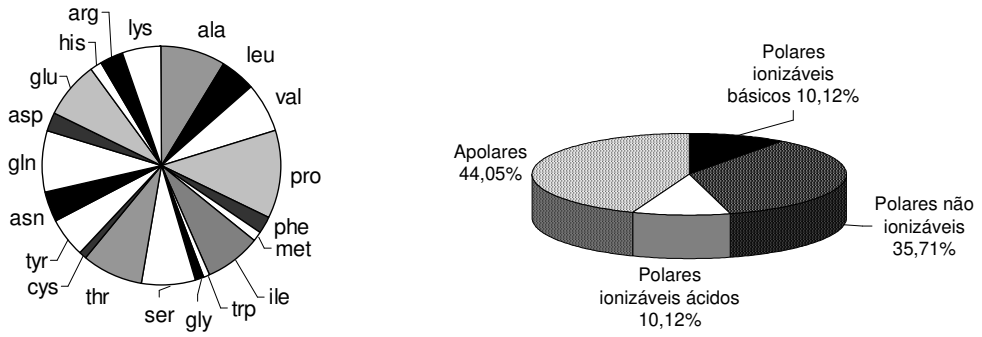


Figura 7. Composição aminoacídica da κ-caseína. Baseado em Sgarbieri (2005) e Cheftel (1996).

A hidrofobicidade média das quatro frações de caseína indica a natureza das interações (hidrofóbicas ou eletrostáticas) que ocorrerão entre as moléculas. Elas são em ordem decrescente: β (5,56) > κ (5,37) > α_{s1} (4,89) > α_{s2} (4,64) kJ/mol de resíduo e estão baseadas na energia livre de transferência das cadeias laterais dos aminoácidos de um meio orgânico para um meio aquoso (BRIGNON *et al.*, 1977).

A conformação das caseínas de um modo geral é similar a de proteínas globulares desnaturadas, com um elevado número de resíduos de prolina que causa uma curvatura particular na cadeia da proteína, de maneira que inibe a formação de estruturas secundárias ordenadas. Além disso, a ausência de estrutura terciária contribui para a

estabilidade das caseínas à desnaturação térmica e à exposição dos resíduos hidrofóbicos. As diferentes frações de caseína agregam-se através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, formando submicelas. Essas submicelas possuem a parte interna hidrofóbica que é coberta por uma camada hidrofílica formada, em grande parte, por κ-caseína que adquire uma estrutura flexível em água, como já mencionado. As submicelas associadas por pontes de fosfato de cálcio constituem as micelas de caseína (GOFF, 2006; WALSTRA, 1999).

O abaixamento de pH induz reações de associação, devido à neutralização parcial das cargas negativas da caseína e conseqüente diminuição da repulsão eletrostática intermolecular (ROEFS & VAN VLIET, 1990), levando à precipitação da proteína no ponto isoelétrico. A proteína lavada e redissolvida com hidróxido de sódio até alcançar pH neutro induz a formação de caseinato de sódio. A alta proporção de cadeias de aminoácidos hidrofóbicos em toda a estrutura primária da caseína leva o caseinato de sódio a formar agregados (ou submicelas) em soluções aquosas, com a maior parte das regiões hidrofóbicas localizadas no interior de um denso núcleo com pouca água associada (FARREL *et al.*, 1990). A associação subseqüente das submicelas de caseína para formar as grandes micelas não é possível devido à remoção da maior parte do cálcio da micela durante o processo de acidificação (OAKENFULL *et al.*, 1999). O caseinato de sódio é um importante ingrediente utilizado na indústria de alimentos, principalmente em produtos lácteos como em queijos tipo “cottage” e “cheddar”, bebidas e sobremesas (BRAGA, 2006). O pH é o fator predominante na formação de géis de caseína/caseinato. A redução do pH promove a neutralização dos grupos carboxílicos presentes ao longo da cadeia diminuindo a repulsão eletrostática entre as moléculas (HORNE & LEAVER, 1995). Caso as interações atrativas (interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de van der Waals) sejam suficientemente fortes, as partículas de caseinato se agregam podendo formar uma

rede de gel tridimensional (CHEN *et. al.,* 1999). O ponto isoelétrico do caseinato (4,6) é o valor de pH mais favorável para a formação de gel e não há evidências de gelificação em valores de pH inferiores a 3,2 e superiores a 5,8 (CHEN *et al*, 1999).

3.2. Proteínas do soro

As proteínas do soro são a segunda maior fonte protéica do leite, sendo comercializadas em geral na forma de concentrado (WPC) ou isolado protéico de soro (IPS). Além de serem utilizadas como gelificantes, emulsificantes, espessantes, formador de filmes e modificador de textura, as proteínas do soro apresentam alto valor nutritivo. Elas constituem um grupo bastante diversificado de proteínas com características estruturais bem diferentes (WONG *et al*., 1996). São constituídas por 50% de β-lactoglobulina, 12% de α-lactoalbumina, 5% de albumina sérica, 10% de imunoglobulinas e 23% de proteases-peptonas, proteínas menores e traços de caseína, e possuem peso molecular entre 14 e 1.000 kDa (STEVENTON *et al*., 1991; BRYANT & MCCLEMENTS 1998).

A β-lactoglobulina é uma proteína globular de PM 18.362 composta por 162 resíduos de aminoácidos, cujo pI encontra-se na faixa de pH entre 5,35-5,49. (SGARBIERI, 2005). A Figura 8 apresenta sua composição aminoacídica.

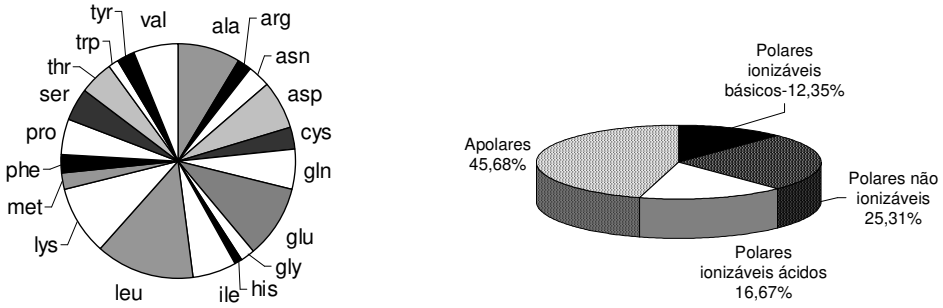


Figura 8. Composição aminoacídica da β-lactoglobulina. Baseado em Sgarbieri (2005) e Cheftel (1996).

A estrutura secundária da β-lactoglobulina possui duas pontes dissulfeto internas e um grupo tiol livre. Estas características possibilitam um intercâmbio entre as ligações dissulfeto durante mudanças conformacionais associadas com o tratamento térmico ou alterações de pH, conferindo várias características funcionais à proteína, entre elas a formação de gel (CHEFTEL, 1996). A conformação espacial da β-LG foi completamente elucidada por Brownlow *et al.* (1997). A molécula apresenta nove segmentos em folhas β antiparalelas que se arranjam formando uma espécie de cálice ou barril achatado capaz de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas no seu interior (SGARBIERI, 2005), conforme ilustra a Figura 9.

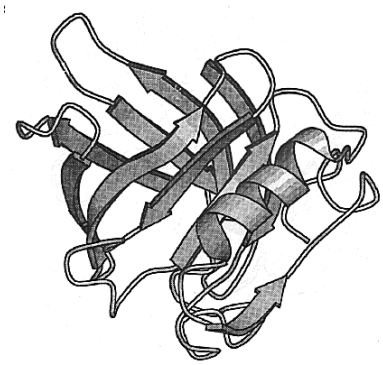


Figura 9. Representação esquemática da estrutura terciária da β-lactoglobulina (SWAISGOOD, 1996).

A α-lactoalbumina (α-LA) é a segunda proteína do soro mais abundante. É uma proteína globular com peso molecular de 14,175 kDa composta por 123 aminoácidos, dentre os quais, oito são grupos cisteína capazes de estabelecer pontes dissulfeto intramoleculares (BOTTOMLEY *et al.*, 1990). Sua composição aminoacídica é apresentada na Figura 10.

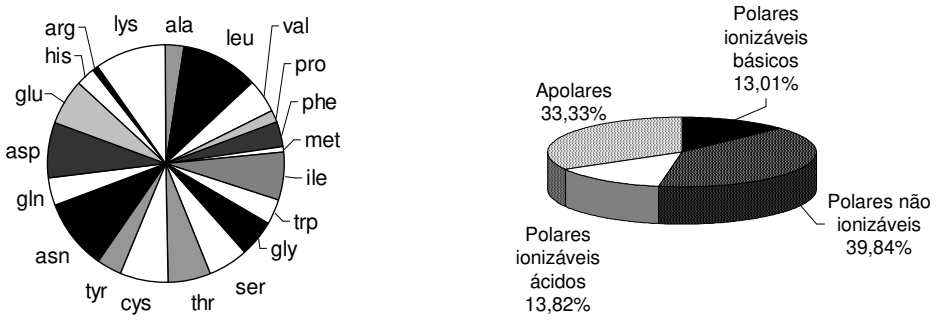


Figura 10. Composição aminoacídica da α-lactoalbumina. Baseado em Sgarbieri (2005) e Cheftel (1996).

Ela possui uma estrutura ternária esférica (Figura 11) estabilizada por pontes dissulfeto, além de uma estrutura secundária altamente ordenada, composta por 26% de α-hélice, 14% de folhas β e 60% de estrutura casualizada (LOURENÇO, 2000; BOTTOMLEY *et al.*, 1990). Devido ao grande ordenamento de sua estrutura secundária e a inexistência de grupos tiol livres, as interações entre a α-lactoalbumina e outras moléculas é dificultada, salvo a altas temperaturas, quando modificações estruturais são induzidas (CHEFTEL, 1996).

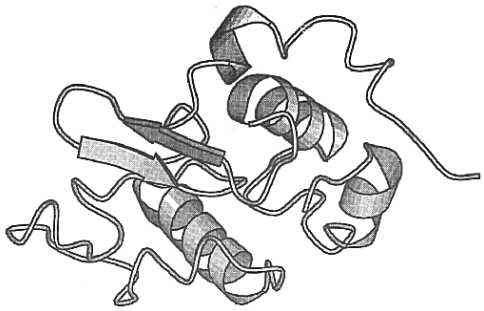


Figura 11. Representação esquemática da estrutura terciária da α-lactoalbumina (SWAISGOOD, 1996).

O ponto isoelétrico da α-lactoalbumina é no pH 4,2 e ela apresenta uma conformação estável na faixa de pH de 5,4 a 9,0, (FOX & MCSWEENEY, 1998; MORR & HA, 1993). No pH natural do leite, pH 6,6 e acima, a α-LA apresenta-se como monômero com estrutura terciária. No entanto, a propriedade mais característica desta proteína é a

forte tendência de formar associações em pH abaixo de seu pI. Em pHs inferiores a 4,0 e acima de 5,5 suas moléculas associam-se em dímeros e trímeros que se agregam gerando polímeros (SGARBIERI, 2005). Quando desnaturada esta proteína apresenta uma estrutura secundária típica em que o núcleo hidrofóbico é exposto ao solvente, e possui tamanho compacto com raio de giração apenas 10% maior que seu estado nativo, porém ela perde a maioria dos sítios de interações disponíveis originalmente nas cadeias laterais (KATOAKA *et al.,* 1997; KUWAJIMA, 1989; PTITSYN, 1995). Estudos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) mostraram que a α-LA sofre desnaturação reversível a 64°C e irreversível quando aquecida em mistura com β-lactoglobulina e soroalbumina bovina (ARAI *et al.,* 2002).

A funcionalidade das proteínas do soro como ingrediente depende do seu grau de desnaturação. A maioria dos processos industriais envolvendo proteínas alimentares (globulares) leva à desnaturação parcial das proteínas. A aparente ordem de temperatura de desnaturação térmica das proteínas do soro é Ig > BSA > β-Lg > α-La, no entanto seus valores são fortemente influenciados pelo pH, composição iônica e concentração total de sólidos solúveis do meio (MORR & HA, 1993). O grau de desnaturação dessas proteínas alcançado durante o tratamento térmico interfere diretamente na quantidade de interações estabelecidas no sistema e portanto, nas características reológicas dos géis formados. Menores temperaturas de início de desnaturação da α-lactoalbumina e da β-lactoglobulina são observadas em pH 6,7 quando comparada às obtidas em pH 5,8. Por este motivo, PICONE *et al.* (2005) observaram que soluções de IPS (15% m/m) submetidas a tratamento térmico de 70°C/ 30 minutos resultaram em géis menos rígidos em pH 5,8 que em pH 6,7, devido à menor desnaturação protéica e ao menor número de interações estabelecidas. Normalmente, quando submetidas a temperaturas superiores a 55°C as proteínas do soro sofrem um progressivo desdobramento da estrutura globular, ocorrendo

exposição de grupos cistina e cisteína e superfícies hidrofóbicas, o que permite a agregação e o possível estabelecimento de ligações com outros constituintes do sistema (BOTTOMLEY *et al.*, 1990; VERHEUL *et al.,* 1998). A princípio essa transição conformacional é reversível. No entanto, as moléculas desnaturadas podem formar agregados irreversíveis via ligações covalentes e não covalentes (ROEFS & DE KRUIF, 1994; HOFFMANN *et al.*, 1997; VERHEUL & ROEFS, 1998).

As condições de pH e força iônica do meio em que a proteína está dispersa também interferem no tipo de gel térmico formado. Quando a força iônica é baixa e o pH está distante do pI das proteínas do soro, a agregação induzida pelo calor ocorre relativamente devagar, a repulsão eletrostática no sistema é alta e ocorre a formação do chamado 'gel de estrutura fina', que é composto por ligações na escala nanométrica e que possui aspecto translúcido com estrutura homogênea e textura elástica (IKEDA & FOEGEDING,1999; KAVANAGH *et al.*, 2002; LANGTON & HERMANSSON, 1992; STADING & HERMANSSON, 1991). No entanto, quando o sistema possui alta força iônica e o pH está próximo ao pI das proteínas do soro, a agregação induzida pelo calor é rápida, a repulsão eletrostática do sistema é mais baixa e o gel formado tem aspecto opaco e coloração branca. A estrutura desse gel é composta por agregados de partículas de tamanho micrométrico e normalmente são chamados de 'géis particulados' (LANGTON & HERMANSSON, 1992; STADING & HERMANSSON, 1991). Esses géis são menos rígidos, possuem menor elasticidade que os géis de estrutura fina (JU & KILARA, 1998) e tendem a apresentar sinerese (IKEDA & FOEGEDING, 1999; STADING & HERMANSSON, 1991).

4. Influência do pH e tratamento térmico nas interações proteínas-polissacarídeos

As propriedades de um gel protéico, como textura e sinerese podem ser alteradas pela adição de polissacarídeos visto que a temperatura de desnaturação de algumas

proteínas é modificada na presença destes (BRAGA, 2006). Interações entre esses dois biopolímeros dependem dos fatores envolvidos nas condições dos sistemas, tais como pH, força iônica, temperatura e também das estruturas químicas destes polímeros (ZHANG & FOEGEDING, 2003). A formação de uma rede protéica é o resultado da agregação das moléculas de proteína, a partir da desnaturação destas e/ou acidificação do sistema (BRAGA, 2006) e a presença de polissacarídeo que pode modificar o tipo de estrutura formada.

A redução do pH causa aumento das interações proteína-proteína e proteína-polissacarídeo, devido ao decréscimo de carga no ponto isoelétrico, reduzindo a repulsão eletrostática nos sistemas (LUCEY *et al*., 1998). A quantidade dessas interações estabelecidas e a força de cada ligação irão interferir diretamente na textura das amostras (VAN VLIET *et al.,* 1991), na microestrutura e sua capacidade de retenção de água. Tziboula & Horne (1999) estudaram a influência das proteínas do leite na gelificação da κ-carragena, um polissacarídeo aniônico que também passa por transição conformacional com a temperatura, e observaram que a caseína tem efeito inibitório na gelificação quando interage com a κ-carragena. Ribeiro *et al.* (2004) também observaram uma redução na tensão de ruptura de géis de caseinato e κ-carragena ao se aumentar a concentração de biopolímeros no ponto isoelétrico da proteína, enquanto os sistemas puros apresentaram aumento da rigidez. Segundo os autores, a redução da tensão de ruptura de géis mistos estaria associada ao efeito de exclusão de volume, que resulta em interações repulsivas entre os componentes dos sistemas (TOSTOGUZOV, 2003). Já os estudos de Braga & Cunha (2004) apontam que a interação proteína-polissacarídeo possui efeito positivo na rigidez e deformabilidade de géis de caseinato de sódio e xantana em pH 4,6, enquanto o aumento isolado da concentração de caseinato possui efeito negativo nestas propriedades. Em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico da

proteína, Braga & Cunha (2005) observaram coacervação complexa entre o caseinato e a xantana em sistemas contendo sacarose, o que resultou em elevados valores de sinerese.

A redução do pH pode ser realizada de maneira direta, pela adição de ácidos ou de forma indireta, através da utilização de culturas bacterianas ou de glucona-δ-lactona (GDL) (LUCEY *et al.*, 1997). A glucona-δ-lactona é um éster de ácido glucônico que possui a propriedade de se hidrolisar em água até que o equilíbrio entre ácido glucônico e GDL seja estabelecido. Por sua vez, o ácido glucônico se dissocia em gluconato e íons H^+, levando a uma progressiva acidificação do meio (SANCHEZ *et al.*, 2006; DE KRUIF, 1997). Este processo é extremamente dependente da temperatura e concentração de biopolímeros do sistema, o que possibilita um fácil controle da taxa de acidificação e do pH de equilíbrio, pois ambos são função da quantidade de GDL adicionada (CAVALLIERI & CUNHA, 2007; SANCHEZ *et al.*, 2006; KOH *et al.,* 2002). Quanto maior a temperatura, maior a taxa de acidificação (RUIZ *et al.*, 2007). Por ser dependente da concentração de biopolímeros, a quantidade de GDL utilizada normalmente é mensurada em razão de concentração de GDL/ concentração de polímeros (RUIZ *et al.*, 2007; CAVALLIERI & CUNHA, 2007; BRAGA *et al.*, 2006). Cavallieri (2007) investigou as características reológicas e estruturais de sistemas acidificados com GDL compostos por proteínas do soro de leite desnaturadas adicionadas de goma guar e xantana e observou que as propriedades dos sistemas dependiam não apenas do tipo de polissacarídeo e sua concentração, mas também das condições de acidificação e do pH final dos sistemas. Além disso, ele observou a ocorrência de três fenômenos simultâneos durante o processo de acidificação até valores abaixo do pI das proteínas do soro: 1) separação de fases na etapa inicial do processo de acidificação, 2) gelificação resultante da redução do pH até o

pI das proteínas, 3) agregação entre as proteínas positivamente carregadas e os polissacarídeos com cargas negativas em valores de pH < pI.

O tratamento térmico também é uma etapa de processo importante e afeta de maneira significativa as propriedades reológicas e de textura de géis biopoliméricos. Em sistemas proteínas-polissacarídeos, além da exposição dos grupos reativos das proteínas, o tratamento térmico também promove mudanças conformacionais em alguns polissacarídeos como a xantana e a gelana, modificando suas estruturas favorecendo interações entre os biopolímeros. No caso destes polissacarídeos, o aumento da temperatura do meio promove mudanças conformacionais e as moléculas dos biopolímeros deixam de apresentar estado ordenado e assumem um estado desordenado. A formação dessa estrutura enovelada disponibiliza sítios reativos das moléculas e possibilita interações com os demais componentes do sistema (WANG & CUI, 2005). Braga & Cunha estudaram a influência de diferentes temperaturas de tratamento térmico da xantana em sistemas mistos caseinato – xantana – sacarose acidificados com GDL até o pI da proteína. Eles observaram que o tempo de relaxação das amostras diminuiu com o aumento da temperatura do tratamento térmico, pois provavelmente a mudança estrutural do polissacarídeo para um estado enovelado ocasionou o estabelecimento de interações mais fracas entre os biopolímeros. No entanto, a temperatura não influenciou de forma significativa as propriedades de ruptura dos géis.

5. Propriedades Reológicas de géis biopoliméricos

5.1. Ensaios reológicos oscilatórios

Ensaios reológicos oscilatórios é o método mais comum para o estudo do comportamento viscoelástico de alimentos (STEFFE, 1996). Os resultados são muito

sensíveis à composição química e à estrutura física do material avaliado, o que torna este tipo de ensaio particularmente útil para a caracterização da conformação macromolecular e interações intermoleculares de soluções poliméricas (Braga, 2006). Através de ensaios reológicos oscilatórios, Braga (2006) identificou as temperaturas de transição conformacional '*Helix - Coil'* da xantana em diferentes concentrações e também as temperaturas relacionadas à transição de estado anisotrópico-isotrópico das soluções. Foi observado que o aumento da concentração de polissacarídeo levou a um aumento de todas as temperaturas de transição.

Esse tipo de ensaio também pode ser útil na determinação de temperaturas de gelificação. Nickerson *et al.* (2004) observaram que a temperatura de gelificação de sistemas de gelana depende da quantidade de co-soluto (sacarose) presente. Em sistemas de gelana 0,5% (m/m) puros, a temperatura de gelificação observada foi de 25,6°C sendo maior, quanto maior a quantidade de co-solutos adicionada. Já Yamamoto & Cunha (2007) estudaram o efeito de diferentes condições de aquecimento, pH final e concentração de biopolímero no tempo necessário para se atingir o ponto de gel (t_g) de soluções de gelana acidificadas com GDL. Maiores valores de t_g foram relacionados a menores valores de pH, enquanto menores valores t_g foram obtidos com o aumento da concentração de GDL e de gelana.

5.2. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas estão correlacionadas às características sensoriais e de textura do produto, que são importantes fatores relacionados à qualidade de alimentos. A avaliação destas propriedades é de grande importância prática uma vez que os alimentos são submetidos a tais deformações durante o processamento e o consumo.

As propriedades de ruptura de géis podem ser determinadas através da curva de tensão-deformação de Hencky, sendo o ponto de ruptura o valor máximo desta curva. As características do material neste ponto, como tensão e deformação de ruptura, podem ser correlacionadas com a textura do produto. A tensão e a deformação de Hencky são determinadas a partir das Equações 1 e 2 respectivamente (STEFFE, 1996).

$$\sigma_H = F(t)\left[\frac{H(t)}{H_0 A_0}\right] \tag{1}$$

$$\varepsilon_H = -\ln\left[\frac{H(t)}{H_0}\right] \tag{2}$$

onde F(t) é a força [N], A_0 [m^2] e H_0 [m] são, respectivamente, a área e a altura iniciais da amostra e H(t) é a altura do material no tempo t.

Um outro parâmetro característico do material e de grande importância na caracterização de sua textura é o módulo de elasticidade (E) (WALKENSTRÖM & HERMANSSON, 1994). Ele é determinado a partir da tangente da região linear inicial (Equação 3) da curva tensão-deformação (ROSENTHAL, 1999; STEFFE, 1996).

$$E = \frac{d\sigma_H}{d\varepsilon_H}\Big|_{\varepsilon \approx 0} \tag{3}$$

onde σ_H é a tensão de ruptura e ε_H a deformação de ruptura, calculadas pelas Equações 1 e 2.

Apesar das propriedades mecânicas dos géis obtidas por ensaios a altas deformações estarem fortemente relacionadas às suas características sensoriais, ainda são poucos os estudos da literatura que se utilizam dessa ferramenta para a avaliação das propriedades de géis mistos proteínas-polissacarídeos (VAN DEN BERG *et al.*, 2007).

Os fatores que afetam as propriedades de ruptura de géis incluem o número de ligações por seção transversal da rede e a força de cada ligação (VAN VLIET *et al.,*

1991), que dependem do pH, natureza e concentração das macromoléculas e força iônica do meio. Segundo estudos de cinética de gelificação e agregação de caseinato de sódio acidificado com GDL realizados por Braga e colaboradores (2006), o pH ótimo para a obtenção de géis com alta tensão de ruptura é próximo ao ponto isoelétrico das caseínas (4,6). Neste pH ocorre o favorecimento da fusão e rearranjos contínuos das partículas de caseinato, levando a agregação das moléculas devido a interações hidrofóbicas.

A avaliação das propriedades mecânicas de sistemas de proteínas do soro de leite acidificadas a frio realizada por Cavallieri & Cunha (2007) permitiu a distinção dos efeitos da taxa, pH e tempo de armazenamento na organização estrutural e na força dos géis formados. Menores taxas de acidificação resultaram em maiores valores de tensão de ruptura, pois a estrutura formada dispôs de maior tempo para a reorganização e formação da rede de gel, visto que o tempo de acidificação foi mais longo. Géis mais rígidos foram formados na faixa de pH entre 4,7 e 4,9 que corresponde ao ponto isoelétrico das proteínas do soro.

De Jong & van de Velde (2007) estudaram as propriedades mecânicas de géis de proteínas do soro e gelana e observaram um aumento da tensão de ruptura, da elasticidade e da deformação dos géis com o aumento da concentração de polissacarídeo. Yamamoto & Cunha também observaram aumento da rigidez de géis acidificados de gelana devido ao aumento da concentração da goma, assim como outros trabalhos cuja gelificação deste polissacarídeo foi induzida pela adição de cátions (MIYOSHI *et al.,* 1995; TANG *et al.,* 1994; TANG *et al.,* 1998). Além disso, a redução do pH do meio pela adição de GDL também contribui para a formação de géis de gelana mais rígidos e deformáveis (YAMAMOTO & CUNHA, 2007). No entanto, alguns autores relatam que quando a acidificação é feita de maneira direta, como pelo uso de HCl e ácido acético, a tensão de ruptura tende a diminuir com a redução do pH do meio (MAO *et*

al., 1999; MORITAKA *et al.*, 1995; MORITAKA *et al.*, 1999; SANDERSON, 1990) devido à provável hidrólise do polissacarídeo.

6. Capacidade de retenção de água e sinerese

A perda de água é uma característica muito comum em géis de polissacarídeos (GLICKSMAN, 1978) e de proteínas. Ela pode ocorrer após um longo tempo de estocagem devido à difusão passiva (SANDERSON, 1990), pode ser causada pela aplicação de forças externas ou como resultado de flutuações de temperatura como durante o processo de congelamento-descongelamento (MAO *et al.*, 2001).

A sinerese é definida como encolhimento do gel que ocorre concomitantemente com a expulsão de líquido da rede. Na sinerese espontânea, ocorre a contração da rede do gel sem a aplicação de forças externas (como centrifugação) e este evento está correlacionado à instabilidade da rede do gel devido a rearranjos de alta escala, resultando na perda da habilidade da rede de reter líquidos com o tempo (WALSTRA, 1993; LUCEY *et al.*, 1998) o que interfere diretamente na qualidade e aceitação dos produtos. A avaliação da estabilidade dos géis também pode ser feita por ensaios de centrifugação onde é determinada a capacidade de retenção de água dos géis, ou *Water Holding Capacity* (WHC).

O aumento da concentração de polissacarídeo normalmente está relacionado a maiores valores de WHC, como observado por Yamamoto & Cunha (2007). Maiores concentrações de gelana em sistemas acidificados com GDL ocasionou a formação de uma estrutura composta por poros menores e conseqüentemente, mais apta a reter água por forças capilares (YAMAMOTO & CUNHA, 2007).

Normalmente, géis puros de gelana possuem boa capacidade de retenção de água quando comparados aos géis de outros polissacarídeos, como os de carragena e alginato devido a sua elevada deformabilidade (YAMAMOTO, 2006). Géis protéicos

também podem apresentar boa WHC (PICONE *et al.,* 2005), porém qualquer parâmetro que modifique a rede de proteína também pode afetar a sua capacidade de reter água, como por exemplo, a adição de outras macromoléculas e a taxa de acidificação empregada (BRAGA & CUNHA, 2005; VAN VLIET *et al.*, 1991).

Braga & Cunha estudaram a taxa de perda de água ao longo do tempo de sistemas mistos de sacarose, xantana e caseinato de sódio acidificados com GDL. Através de ensaios de centrifugação eles observaram que o caseinato apresentou efeito positivo sobre a WHC no equilíbrio pois proporcionou a formação de uma estrutura mais homogênea. A sacarose diminuiu a WHC dos géis visto que induziu a formação de estruturas mais particuladas. Já a concentração de xantana não apresentou influência significativa sobre WHC de equilíbrio, porém a taxa de perda de água com o tempo foi menor em sistemas com maior concentração deste polissacarídeo.

No entanto, não há estudos na literatura sobre a estabilidade de géis mistos de gelana e proteínas do leite em relação à perda de água, sendo que apenas hidrogéis foram estudados (YAMAMOTO, 2006; MAO *et al.*, 2001). Resultados obtidos por Mao *et al.* (2001) mostraram que a WHC dos géis puros de gelana relacionou-se diretamente com as propriedades de textura, tendo se mostrado proporcional à deformação de ruptura dos géis. Ele sugere que a estrutura de géis menos deformáveis é mais fácil de ser danificada, portanto eles apresentam menor capacidade de reter água quando submetidos a forças externas. Yamamoto & Cunha (2007) notaram que a realização do tratamento térmico das amostras antes da acidificação com GDL aumentou a capacidade de retenção de água dos géis formados.

– CAPÍTULO 3 –

Influência do pH no mecanismo de transição conformacional da gelana

Resumo

A gelana é um polissacarídeo de grande versatilidade em relação aos outros comumente utilizados em alimentos devido ao seu poder de gelificação em uma ampla faixa de pH. No entanto, poucos estudos existem na literatura acerca do efeito do pH sobre seu processo de transição conformacional e as características reológicas dos sistemas formados. Assim, neste trabalho estudou-se o processo de transição conformacional e mudança de isotropia da gelana através de ensaios reológicos oscilatórios, além da observação das estruturas formadas por microscopia eletrônica de varredura. Através do comportamento reológicos de soluções de gelana frente a repetidos ciclos de aquecimento e resfriamento, constatou-se a formação de uma estrutura termorresistente e muito elástica em pH 3,5. O aumento do pH da solução de gelana de seu valor natural (5,3) para pH 7,0 não afetou o caráter elástico e viscoso dos sistemas e em ambos valores de pH o processo de gelificação mostrou-se reversível com a temperatura. As temperaturas de transição conformacional também foram determinadas por método gráfico de acordo com cada valor de pH estudado e, apesar dos mecanismos de gelificação terem sido diferentes em cada pH, a temperatura de gelificação não foi afetada por esta variável.

1. Introdução

Produtos acidificados correspondem a uma grande gama de produtos alimentícios. Textura e propriedades sensoriais diferenciadas podem ser obtidas pela adição de polissacarídeos, por mudanças no processamento e variações do meio, como força iônica e pH. A gelana é um polissacarídeo com propriedades funcionais muito interessantes do ponto de vista tecnológico devido à sua alta capacidade de formação de filmes e gelificação, inclusive a baixas concentrações. Além disso, sabe-se que a gelana é capaz de promover a gelificação de sistemas em uma ampla faixa de pH, ao contrário de outros polissacarídeos como a agarose e a carragena (YAMAMOTO, 2006). No entanto, pouca informação sobre o efeito do pH sobre as propriedades mecânicas dos géis de gelana está disponível na literatura (YAMAMOTO & CUNHA, 2007; MAO *et al.*, 1999). O pH natural de uma solução típica de gelana está em torno de 5,0 (SANDERSON, 1990). Com a redução do pH ocorre uma dissociação dos grupos carboxílicos laterais das moléculas de gelana, tornando-a um polieletrólito menos aniônico, com menor repulsão eletrostática. Isso leva a uma redução das dimensões das cadeias permitindo a formação de duplas-hélices pela associação de duas moléculas do polissacarídeo. Além disso, os íons H^+ se ligam à superfície das hélices formadas, diminuindo a densidade de carga e reduzindo a barreira eletrostática para a sua agregação, possibilitando a formação de "zonas de junção" (HORINAKA *et al.*, 2004a; GIVANASIS *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2004; KANI *et al.*, 2005; KASAPIS *et al.*, 1999; LAU *et al.,* 2000; MAO *et al.*, 1999; MIYOSHI *et al.*, 1994; MORITAKA *et al.*, 1995; NICKERSON *et al.*, 2003; OGAWA *et al.*, 2002; OGAWA, 1996; RODRÍGUEZ – HERNÁNDEZ *et al.*, 2003). O decréscimo do pH também diminui a mobilidade das cadeias de gelana facilitando a agregação e gelificação (HORINAKA *et al.*, 2004 a, b).

O mecanismo de gelificação da gelana ocorre em duas etapas, sendo a primeira a transição conformacional de um estado desordenado (cadeias simples) a um estado

ordenado (dupla-hélice) com a redução da temperatura. Na segunda etapa ocorrem interações entre as hélices (transição sol – gel) (MIYOSHI *et al*. 1996; NICKERSON *et al*., 2003; RODRÍGUEZ- HERNÁNDEZ *et al.,* 2003), tal como ocorre com a goma xantana (LEE & BRANT, 2002; IKEDA *et al*., 2004). A goma xantana é um polissacarídeo aniônico que possui um mecanismo de gelificação muito semelhante ao da gelana, passando de um estado ordenado a um estado desordenado com o aumento da temperatura (MIYOSHI & NISHINARI, 1999; PARADOSSI *et al.,* 1982). Assim como a gelana, em diferentes artigos da literatura afirma-se que essa mudança conformacional seja reversível (MIYOSHI *et al*., 1996; NAKAJIMA *et al*., 1996).

Recentemente, Lee & Brant (2002) e Braga (2006) observaram que a xantana também passa por uma transição anisotrópica-isotrópica que é dependente tanto da temperatura da solução, como da concentração de polissacarídeo. Através de ensaios oscilatórios a baixas deformações, foram observadas três diferentes regiões na curva de viscosidade complexa (η^*) em função da temperatura de soluções de xantana (Lee & Brant, 2002; Braga, 2006) que foram associadas a três transições distintas, descritas a seguir.

Primeira transição (T_a): definida como transição de um estado completamente anisotrópico para um bifásico. Ocorre a baixas temperaturas, quando o valor inicial de η^* deixa de ser constante.

Segunda transição (T_i): definida como transição entre o estado bifásico para completamente isotrópico. Caracterizada por uma deflecção acentuada da inclinação da viscosidade complexa (η^*) com o aumento da temperatura.

Terceira transição: transição hélice-enovelada ("melting"). Ocorre a uma temperatura definida como T_m, que pode ser obtida através da intersecção da inclinação

máxima da curva η^* em função da temperatura com a reta definida pela região cujo valor de η^* é constante (BRAGA, 2006).

Não existe nenhum estudo semelhante para gelana, portanto não se conhecem as temperaturas referentes a cada transição e se todas ocorrem para este polissacarídeo. Sabe-se apenas que a temperatura de transição conformacional (T_m) da gelana varia entre 30 e 50°C, dependendo da concentração do polímero e da composição do solvente (principalmente pH e presença de sais) (GIVANASIS *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2004; KASAPIS *et al.*, 1999; LAU *et al.*, 2000; OGAWA *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ- HERNÁNDEZ *et al.*, 2003). Também não se sabe qual o efeito do pH na transição isotrópica - anisotrópica e como isso afeta as características reológicas das soluções de gelana.

Por isso, esta etapa do trabalho teve como objetivo estudar as transições conformacionais da gelana por ensaios reológicos a baixas deformações em soluções aquosas (1,5% m/v), além de avaliar qual a influência do pH sobre essas transições e na estrutura da rede formada.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

As soluções foram preparadas com goma gelana desacilada (Kelcogel® F) gentilmente cedida pela Kelco (San Diego, EUA), a qual continha 10,53% (m/m) de cinzas e 3,55% de umidade em base seca. O teor de minerais deste polissacarídeo analisado por Espectroscopia de Absorção Atômica (Instituto de Química - Unicamp) correspondia a: 0,068% (m/m) de magnésio, 0,1795% (m/m) de cálcio, 4,13% (m/m) de potássio e 0,431% (m/m) de sódio. Para o ajuste do pH utilizou-se ácido láctico e NaOH de grau analítico.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo das soluções de gelana

Soluções de gelana na concentração de 1,5% (m/v) em diferentes valores de pH foram preparadas pela dissolução do pó em água deionizada sob agitação magnética à temperatura de 80°C por 30 minutos. Após completa d issolução, os pHs das soluções foram ajustados para 3,5 e 7,0 com ácido láctico 0,22M e NaOH 0,02M. Também foi estudada a solução no pH natural da gelana, aproximadamente 5,3 ± 0,1.

2.2.2. Ensaios reológicos oscilatórios

Ensaios reológicos oscilatórios foram realizados em um reômetro de tensão controlada Carri - Med CSL2 500 (TA Instruments, Inglaterra) com geometria cone-placa de aço inoxidável de 60mm de diâmetro. Para se evitar evaporação, colocou-se uma fina camada de óleo de silicone ao redor da amostra.

As amostras foram colocadas no equipamento a 60°C e aquecidas até 90°C. Primeiramente realizou-se um pré-cisalhamento a 90°C para homogeneização da amostra por 2 minutos com taxa de deformação de $100s^{-1}$ e posteriormente, uma varredura de temperatura de 90 a 20°C a uma taxa de resfriamento de 1°C/min. Então, fez-se uma varredura de temperatura de 20 a 90°C e logo após, as amostras foram resfriadas de 90 a 20°C, ambas as varreduras a 1°C/ min. Em todos os ensaios utilizou-se freqüência de 0,1 Hz. Para as amostras de pH 3,5 e 5,3 utilizou-se uma tensão de 0,5 Pa e para as amostras em pH 7,0 utilizou-se 0,8 Pa. Figuras de Lissajous foram traçadas para cada temperatura de forma a assegurar que os experimentos estivessem sempre na região de viscoelasticidade linear das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.3. Microscopia eletrônica de varredura

Parte das amostras preparadas conforme o item 2.2.1 foi armazenada em placas de Petri a 10°C por 24 horas. Então, foram cortadas em pedaços de dimensões 10mm x 2mm x 2mm e fixadas em glutaraldeído (2,5% m/v) em tampão cacodilato a pH 7,2 por 12 horas. Posteriormente, foi realizada uma lavagem em tampão cacodilato e as amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido. Foi feita uma nova lavagem em tampão cacodilato e uma pós-fixação das amostras fraturadas em tetróxido de ósmio. Após mais duas lavagens em tampão cacodilato, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções alcoólicas (30, 50, 70, 90 e 100% v/v). De forma a se evitar danos à estrutura durante a secagem, as amostras foram secas no ponto crítico do CO_2 (Critical Point Dryer CPD03 Balzers). Posteriormente, foram colocadas em *stubs* de alumínio e cobertas com ouro em um Sputter Coater SCD 050-Balzers. A visualização das estruturas foi feita em um microscópio JEOL JSM 5800 LV (Tóquio, Japão) operado a 10 kV. Foram feitas no mínimo três imagens de cada estrutura com aumento de 1.000 vezes.

2.2.4. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi validada através da análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias dos resultados foi avaliada pelo Teste de Tukey com o programa Statistica (StatSoft v. 5.5).

3. Resultados e Discussão

Vários trabalhos da literatura (GIVANASIS *et al.*, 2000; IKEDA *et al.,* 2004; KASAPIS *et al.*, 1999; LAU *et al.*, 2000; OGAWA *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2003), relatam que a temperatura de transição conformacional da gelana (T_m) varia entre 30 e 50°C. A temperatura de transição (T_m) pode ser obtida pela

intersecção entre a tangente da região mais inclinada da curva $\eta^*(T)$ no aquecimento e a tangente da região onde η^* não varia com a temperatura (BRAGA, 2006), como mostra a Figura 12. Nos ensaios realizados com gelana, os valores de T_m obtidos foram de 66,2°C para as amostras em pH 5,3 e de 66,5°C pa ra as amostras em pH 7,0, não havendo diferença significativa entre os dois valores (Tabela 2).

Devido à linearidade e pouca variação de η^* durante o aquecimento das amostras em pH 3,5, não foi possível a determinação de T_m e T_{onset} dessas amostras.

Tabela 2. Temperaturas de início de transição (T_{onset}), temperaturas intermediárias de transição (T_1 e T_2) e temperaturas médias de transição (T_m) durante o aquecimento de soluções de gelana 1,5% (m/v) em pHs 5,3 e 7,0. Letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais (p>0,05)

	pH 5,3	**pH 7,0**
$\mathbf{T_{onset}}$	$55,7^a$	$55,3^a$
$\mathbf{T_1}$	$59,7^b$	-
$\mathbf{T_2}$	$63,5^c$	-
$\mathbf{T_m}$	$66,2^d$	$66,5^d$

Era esperado que as temperaturas de transição conformacional encontradas neste trabalho (Tabela 2) fossem maiores que as reportadas na literatura, visto que os resultados publicados foram obtidos em concentrações menores que 0,5% (m/m). Em soluções mais concentradas, como as do presente estudo, o caráter iônico do polímero contribui para o aumento da força iônica e conseqüentemente, o aumento de T_m (LEE & BRANT, 2002).

Apesar da temperatura de início de transição conformacional (T_{onset}) e da temperatura média de transição (T_m) da gelana não apresentarem variações significativas na faixa de pH de 5,3 a 7,0, o mecanismo de transição conformacional ocorre de forma distinta nos diferentes valores de pH (Figura 12). Enquanto que em pH 7,0 o decaimento da viscosidade é aparentemente constante na faixa de temperatura de

55 a 70℃ para a maioria das amostras, em pH 5,3 o decaimento da viscosidade ocorre visivelmente em duas etapas.

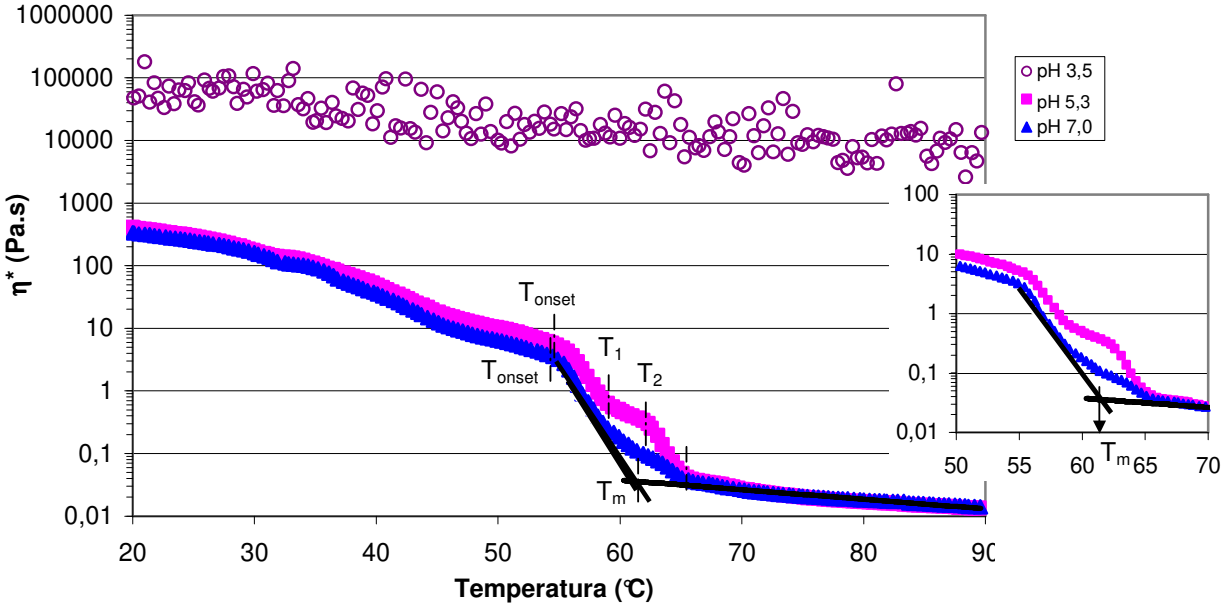


Figura 12. Obtenção de T_m a partir das curvas de viscosidade complexa (η*) em função da temperatura no aquecimento para amostras de gelana 1,5% (m/v) em diferentes valores de pH.

Na Figura 12 observam-se cinco regiões distintas nas curvas de viscosidade complexa em função da temperatura para valor de pH 5,3 e três regiões para pH 7,0. Braga (2006) e Lee & Brant (2002) relataram a existência de quatro regiões para soluções de xantana 1 e 1,5% (m/m), respectivamente. A primeira região correspondia ao estado completamente anisotrópico, estando compreendida entre 10 e 19℃. A segunda a um estado bifásico, entre 19 e 46℃, que seria a dispersão de uma fase anisotrópica em uma fase isotrópica. A terceira região estaria associada a um estado bifásico em que há uma dispersão de uma fase isotrópica em uma fase anisotrópica, entre 46 e 68℃. E, finalmente, a última região corresponderia a um estado completamente isotrópico, a partir de 68℃.

Em pH 7,0, o mecanismo de transição conformacional da gelana parece ser mais simples, porém não tão bem definido como o da xantana. Na faixa de temperatura

de 20 a 55°C (T_{onset}) as moléculas de gelana estariam predominantemente em um estado anisotrópico. Devido à leve inclinação da curva nesta região é possível que haja uma pequena fração das moléculas em estado isotrópico, no entanto o estado anisotrópico seria predominante. Na faixa de 55 a 66°C, as moléculas provavelmente estão em um estado bifásico (parte anisotrópico e parte isotrópico) e a partir de 66°C as moléculas estariam em um estado completamente isotrópico.

Em pH 5,3 o mecanismo de transição conformacional da gelana é mais complexo. A primeira e a última região com menor inclinação das curvas η^* *versus* Temperatura, em pH 5,3, corresponderiam às fases predominantemente anisotrópica e completamente isotrópica, respectivamente. Na fase predominantemente anisotrópica as moléculas de gelana estariam na forma de dupla hélice, interagindo entre si através de zonas de junção. Com o aquecimento, se inicia a mudança conformacional (T_{onset} = 55,7°C). A partir deste ponto, pode-se supor que as zonas de junção de mesma estabilidade térmica começam a se romper e um sistema bifásico é formado. Assim, na faixa de temperatura entre T_{onset} e T_m (55,7 - 66,2°C) a solução de gelana seria uma dispersão com diferentes razões de fase anisotrópica em uma isotrópica e é onde ocorreria a transição denominada "*Helix-Coil*". As temperaturas T_1 e T_2 corresponderiam a temperaturas de transição em que zonas de junção de diferentes estabilidades térmicas são rompidas. A partir de T_m (66,2°C) a solução é completamente isotrópica e todas as moléculas possuem conformação enovelada. Esses resultados confirmam a hipótese de Moritaka e colaboradores (1995) de que o gel de gelana é formado em duas etapas devido à formação de zonas de junção de estabilidade térmica distintas. Eles observaram por ensaios calorimétricos que após cinco ciclos repetitivos de aquecimento e resfriamento, os picos exotérmicos das amostras em pH 8,0 se dividiram em dois. No presente estudo, a visualização dessas duas etapas é mais clara nas amostras em pH

5,3, indicando que o pH influencia a estabilidade térmica dessas zonas de junção. Com a redução do pH os íons H^+ se ligam à superfície das hélices individuais, diminuindo a sua densidade de carga e reduzindo a barreira eletrostática para a agregação das hélices, favorecendo a formação de zonas de junção que provavelmente possuem melhor estabilidade térmica que as formadas em pHs elevados (HORINAKA *et al.*, 2004a; GIVANASIS *et al.,* 2000; IKEDA *et al.*, 2004; KANI *et al.*, 2005; KASAPIS *et al.,* 1999; LAU *et al.,* 2000; MAO *et al.,* 1999; MIYOSHI *et al.,* 1994; MORITAKA *et al.*, 1995; NICKERSON *et al.*, 2003; OGAWA *et al.,* 2002; OGAWA, 1996; RODRÍGUEZ – HERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

A Tabela 3 apresenta os valores de viscosidade complexa média das temperaturas iniciais e finais de cada etapa do ensaio oscilatório para os três valores de pH estudados. A Figura 13 e a Tabela 3 confirmam que a viscosidade no final do resfriamento 1 (20°C) é estatisticamente igual à viscosidade complexa do início do aquecimento para todas as amostras, assim como a viscosidade do final do aquecimento (90°C) é estatisticamente igual à inicial do resfriamento 2. As amostras em pH 3,5 apresentaram valores de viscosidade muito superiores (aproximadamente 100 vezes maior) que as amostras formadas em pHs 5,3 e 7,0. No entanto, o aumento do pH de 5,3 para 7,0, não resultou em alteração significativa dos valores de viscosidade complexa iniciais e finais de cada etapa dos ensaios.

Tabela 3. Valores de viscosidade complexa (Pa.s) das amostras de gelana 1,5% (m/v) em pHs 3,5; 5,3 e 7,0 em cada etapa do ensaio oscilatório. Letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais (p>0,05)

	Viscosidade Complexa (Pa.s)					
	Resfriamento 1		Aquecimento		Resfriamento 2	
	20°C	90°C	20°C	90°C	20°C	90°C
pH 3,5	37460[a]	0,0323[d]	55380[a]	6869[b]	89796[a]	4965[b]
pH 5,3	475,97[c]	0,0152[d]	480,03[c]	0,0136[d]	436,07[c]	0,0136[d]
pH7,0	475,33[c]	0,0193[d]	468,37[c]	0,0165[d]	452,67[c]	0,0165[d]

Todas as amostras apresentaram aumento de viscosidade com o resfriamento, visto que com a redução da temperatura as moléculas de gelana passaram de um estado desordenado para um estado predominantemente ordenado, devido ao alinhamento das moléculas e à formação de zonas de junções intermoleculares. O aumento da viscosidade entre 90 e 20°C para as amos tras em pHs 5,3 e 7,0 foi de aproximadamente 0,47 kPa.s para ambas amostras, enquanto que para os sistemas em pH 3,5 o aumento foi muito superior (aproximadamente 37,46 kPa.s), confirmando que as interações das moléculas de gelana são favorecidas a baixos valores de pH.

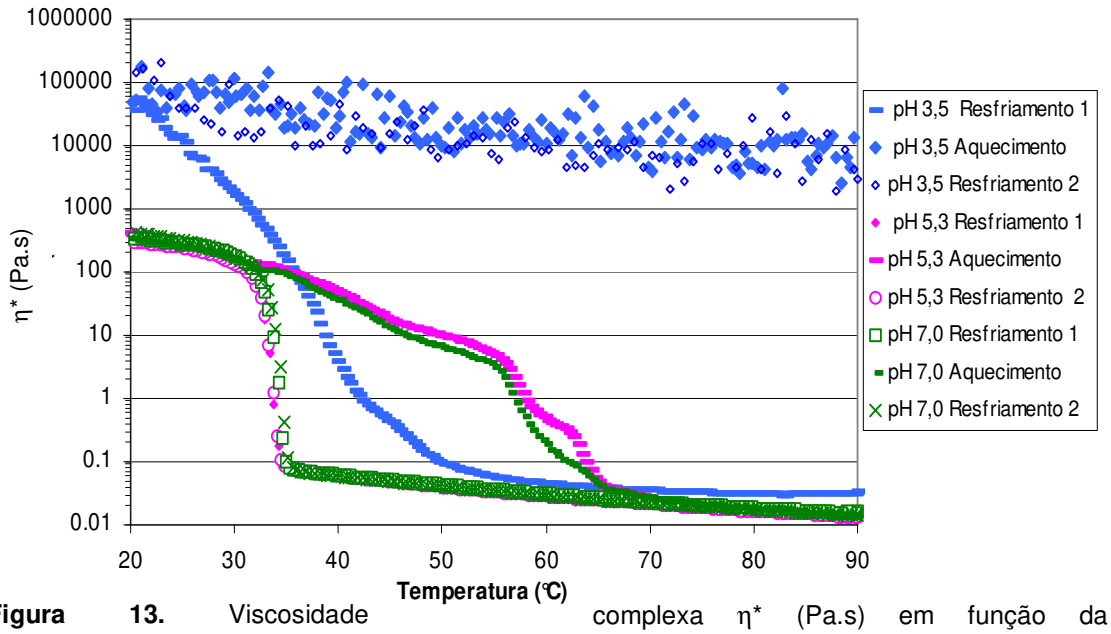


Figura 13. Viscosidade complexa η* (Pa.s) em função da temperatura (°C) de todas as etapas do ensaio oscil atório da solução de gelana 1,5% (m/v) em pHs 3,5, 5,3 e 7,0. Para melhor visualização apenas uma replicata foi apresentada.

Pela Figura 13 e Tabela 3 verifica-se que os valores de viscosidade complexa nas temperaturas de 20 e 90°C das amostras em pHs 5 ,3 e 7,0 não se alteraram mesmo após as seguidas etapas de aquecimento e resfriamento. Isso sugere que, para essa faixa de pH, a mudança conformacional da gelana é reversível com a temperatura do ponto de vista reológico. Já as amostras em pH 3,5, além de apresentarem um grande aumento de viscosidade no primeiro resfriamento, não recuperaram a viscosidade inicial após o aquecimento. Estes resultados sugerem que a baixos valores

de pH a transição conformacional *Helix - Coil* da gelana e as interações estabelecidas não são reversíveis com a temperatura. Os resultados de Moritaka *et al.* (1995) também contribuem para essa hipótese. Através de ensaios calorimétricos foi estudado o comportamento térmico de soluções de gelana 1,0% (m/m) em uma faixa de pH de 4,0 a 10,0 e observados baixíssimos valores de ΔH durante o aquecimento de soluções em pH 4,0 quando comparados a soluções de pHs mais elevados.

Além disso, em pHs 5,3 e 7,0 observa-se que a formação de hélices durante o primeiro resfriamento ocorreu em um único passo, enquanto em pH 3,5 vários passos foram observados (Figura 13). Provavelmente, um desses passos é irreversível e seria responsável pela termoestabilidade dos géis nesta condição de pH mais ácido. Durante o aquecimento, a transição gel-sol ocorre em apenas um passo para as amostras em pH 7,0 e dois passos são visíveis para os sistemas em pH 5,3. Esse maior número de passos, tanto no aquecimento (para amostras de maior pH) quanto no resfriamento (para amostras mais ácidas), parece estar associado à maior dificuldade de formação e rompimento das interações entre as moléculas de biopolímero em diferentes condições de solvente.

As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores do módulo de armazenamento (G') e dissipação (G'') no início e final de cada etapa do ensaio oscilatório para as amostras em pHs 3,5, 5,3 e 7,0. As amostras em pH 3,5 apresentaram caráter elástico muito mais pronunciado que os sistemas em outros valores de pH, sendo G' aproximadamente 100 vezes maior em pH 3,5 quando comparado às amostras em pHs 5,3 e 7,0, tal como observado para a viscosidade complexa. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Moritaka *et al.* (1995) e Yamamoto & Cunha (2007), que também observaram valores maiores de tensão de ruptura em pHs menores que 5,0. Assim como a viscosidade complexa, os valores finais e iniciais de G' e G'' em cada ciclo

(resfriamento 1, aquecimento e resfriamento 2) foram estatisticamente iguais na respectiva temperatura, independentemente do ciclo. Isso confirma que a variação do pH na faixa de 5,3 a 7,0 não provocou mudanças significativas nas propriedades reológicas do material.

Tabela 4. Valores do módulo de armazenamento, G' (Pa), das amostras de gelana 1,5% (m/v) em pHs 3,5; 5,3 e 7,0 em cada etapa do ensaio oscilatório. Letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais (p>0,05)

	Módulo de Armazenamento (Pa)					
	Resfriamento 1		Aquecimento		Resfriamento 2	
	20℃	90℃	20℃	90℃	20℃	90℃
pH 3,5	22030^{d}	0,0001^{a}	29794^{cd}	2359,9^{c}	12841^{c}	1012^{c}
pH 5,3	291,7^{b}	0,0008^{a}	294,8^{b}	0,0007^{a}	267,3^{b}	0,0008^{a}
pH 7,0	292,2^{b}	0,0008^{a}	288,1^{b}	0,0008^{a}	279,0^{b}	0,0007^{a}

A 20℃ todas as amostras possuíam G' maior que G", ou seja, suas características reológicas eram típicas de gel, mas a 90℃ as amostras em pHs 5,3 e 7,0 sempre apresentaram módulo viscoso maior que o módulo elástico, portanto têm caráter líquido e, provavelmente de baixa viscosidade em função dos pequenos valores de G' e G". Para as amostras em pH 3,5 o módulo de armazenamento permaneceu estatisticamente igual desde o início do aquecimento até o final do último resfriamento, demonstrando que as características elásticas se mantiveram mesmo após o aquecimento sendo o gel formado termorresistente, provavelmente devido à termoestabilidade das zonas de junções estabelecidas neste pH, tal como havia indicado a análise da viscosidade complexa.

Tabela 5. Valores do módulo de dissipação, G" (Pa), das amostras de gelana 1,5% (m/v) em pHs 3,5; 5,3 e 7,0 em cada etapa do ensaio oscilatório. Letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais (p>0,05)

	Módulo de Dissipação (Pa)					
	Resfriamento 1		Aquecimento		Resfriamento 2	
	20℃	90℃	20℃	90℃	20℃	90℃
pH 3,5	2645^{b}	0,0203^{d}	7964^{ab}	2405^{b}	11681^{ab}	2797^{b}
pH 5,3	65,1^{c}	0,0095^{d}	62,6^{c}	0,01^{d}	59,2^{c}	0,0085^{d}
pH7,0	59,7^{c}	0,0121^{d}	58,6^{c}	0,01^{d}	53,6^{c}	0,0104^{d}

A Tabela 6 apresenta os valores de cruze de G' com G" para os diferentes valores de pH em cada etapa dos ensaios. Reologicamente, a interseção de G' e G" é conhecida como um dos critérios para definição do ponto de gel (Horne, 1999). Em uma varredura de temperatura onde a freqüência é constante, o cruze desses dois parâmetros pode ser interpretado como a mudança da característica viscoelástica predominante da amostra. O ponto de cruze de G' e G" durante o primeiro resfriamento ocorreu estatisticamente à mesma temperatura (aproximadamente 33°C) para todas as amostras, independentemente do valor de pH estudado. Nessa temperatura a característica reológica das amostras passou de predominantemente viscosa para predominantemente elástica. Para as amostras em pHs 5,3 e 7,0, o ponto de cruze do segundo resfriamento é estatisticamente igual ao do primeiro, confirmando que a transição conformacional da gelana é reversível nestes valores de pH. Já para as amostras em pH 3,5 não foi possível determinar o ponto de cruze de G' e G" durante o aquecimento e o segundo resfriamento devido à termo-irreversibilidade da rede do gel.

Tabela 6. Temperaturas de cruze (°C) de G' e G" das amostras em diferentes valores de pH em cada etapa do ensaio. Letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais (p>0,05)

	Temperaturas de Cruze de G' e G" (°C)		
	Resfriamento 1	Aquecimento	Resfriamento 2
pH 3,5	35,4[a]	-	-
pH 5,3	33,3[a]	62,1[b]	33,4[a]
pH 7,0	34,1[a]	61,5[b]	34,5[a]

As temperaturas de cruze de G' e G" foram maiores no aquecimento que nos resfriamentos (Tabela 6). No aquecimento, os géis formados em pHs 5,3 e 7,0 começaram a ter um predomínio do caráter viscoso a aproximadamente 62°C, cujo valor é um pouco inferior a T_m, que é de aproximadamente 66,3°C (Tabela 2). A quantidade de energia necessária para a transição ordenada-desordenada é muito

elevada, o que pode ser denotado pela histerese presente nas curvas de η* em função da Temperatura (Figura 13).

As Figuras 14 e 15 mostram como os valores de G' e G" variam com a temperatura no primeiro resfriamento e no aquecimento, respectivamente. Como já citado, no segundo resfriamento os valores de G' e G" se comportam da mesma forma que no resfriamento 1 para as amostras em pHs 5,3 e 7,0 e por isso, o gráfico não foi apresentado. É interessante observar que o perfil das curvas de G' e G" em pHs 5,3 e 7,0 é praticamente igual. Já as curvas de G' e G" das amostras em pH 3,5 é estatisticamente constante com a temperatura, comprovando a termoestabilidade desses sistemas.

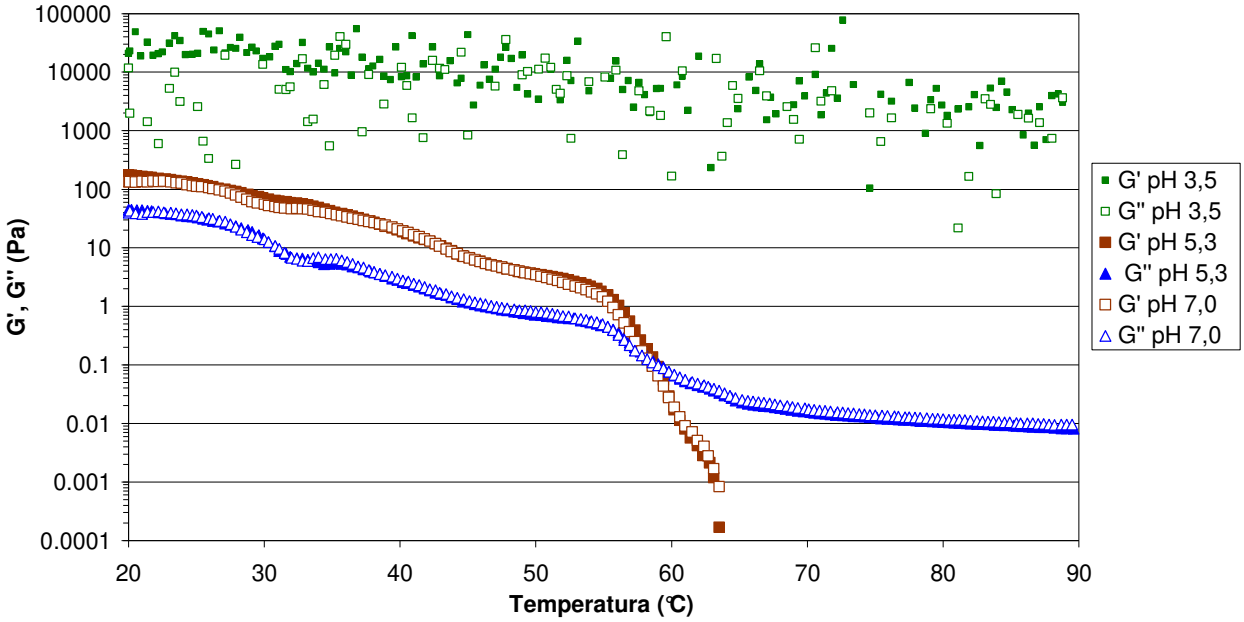


Figura 14. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G") durante o aquecimento das amostras em pHs 3,5, 5,3 e 7,0.

Na Figura 15 nota-se a grande diferença no perfil de G' e G" das amostras em pH 3,5 em relação às amostras em outros valores de pH, durante o primeiro resfriamento. Em pHs 5,3 e 7,0 os perfis de G' e G" são praticamente iguais e G" tem um comportamento linear antes do ponto de cruze. Já nas amostras em pH 3,5 os perfis

de G' e G" possuem diferentes inclinações antes do ponto de cruze, o que pode novamente estar relacionado à formação de zonas de junções de diferentes estabilidades térmicas.

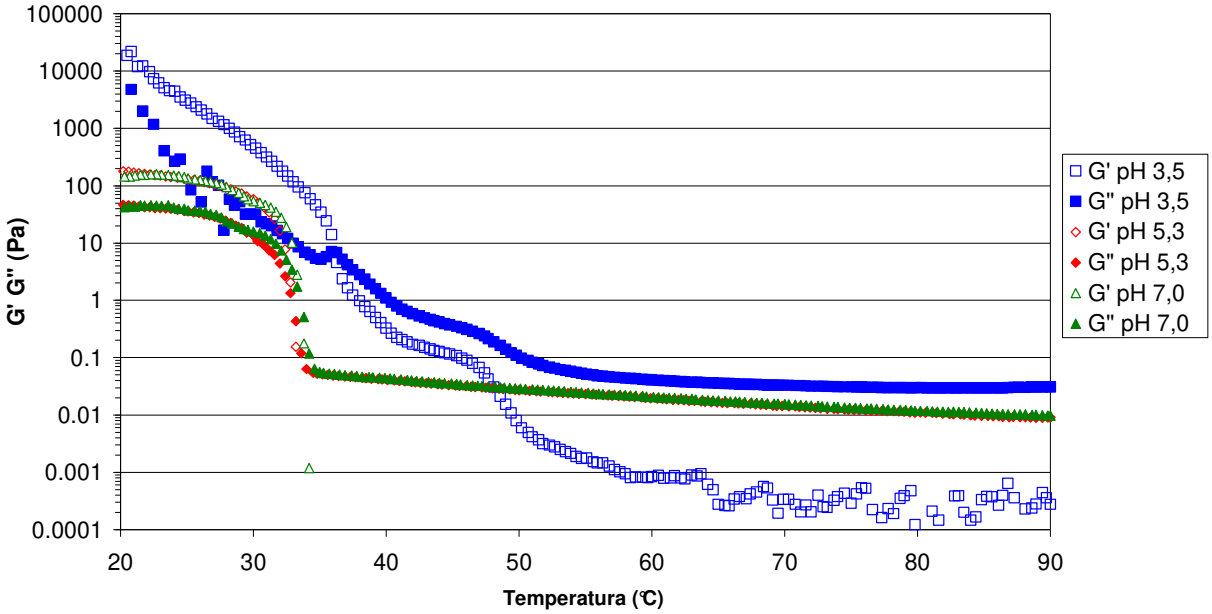
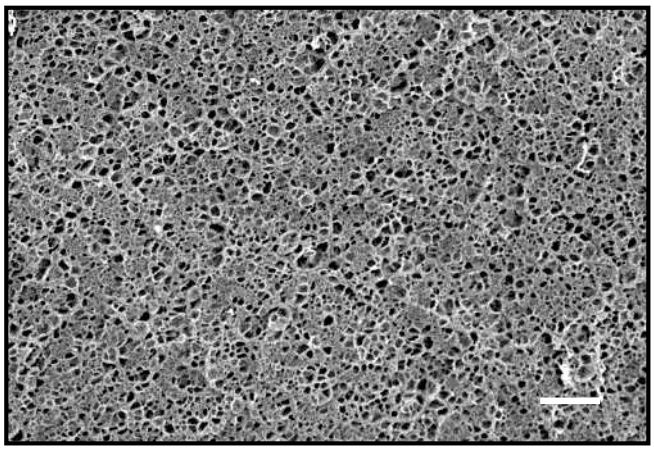


Figura 15. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') durante a primeira etapa de resfriamento para amostras com pH 3,5, 5,3 e 7,0.

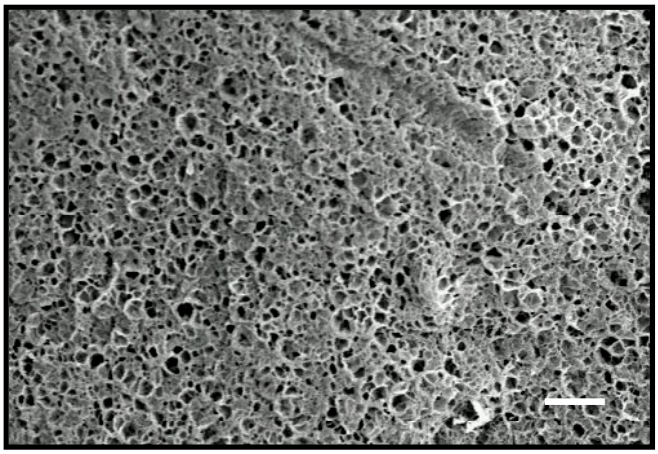
A Figura 16 apresenta as microestruturas dos géis formados nos diferentes valores de pH estudados, nas mesmas concentrações dos ensaios reológicos. Aparentemente, as amostras possuem estruturas bastante semelhantes, compactas e porosas. De forma geral, todas as amostras apresentaram uma grande quantidade de poros arredondados, típicos da rede de gelana (YAMAMOTO, 2006; DE JONG & VAN DER VELDE, 2007). No entanto, apesar dos ensaios reológicos apontarem grande semelhança entre as amostras em pHs 5,3 e 7,0, as microestruturas observadas foram diferentes. As amostras em pH 7,0 apresentam uma rede muito lisa, cuja estrutura é visualmente fechada. A redução do pH para 5,3, resultou na formação de uma rede principal mais continua e com menor número de poros porém de maior tamanho. A acidificação parece contribuir para a abertura dos poros. Estas alterações estruturais

observadas para amostras e pH 5,3 em relação às em pH 7,0 podem estar relacionadas ao mecanismo de transição conformacional da rede, que apresentou duas etapas distintas ao invés de apenas uma como o ocorrido para as amostras em outros valores de pH. Em pH 3,5, a rede principal torna-se mais contínua o que aparentemente induz o fechamento dos poros que se tornam menores e mais homogeneamente distribuídos pela estrutura. Isso explicaria os maiores valores de caráter elástico observados para as amostras formadas neste valor de pH, visto que a tensão aplicada é melhor distribuída pela estrutura que suporta maiores deformações.

(A) GN 1,5% pH 3,5



(B) GN 1,5% pH 5,3



(C) GN 1,5% pH 7,0

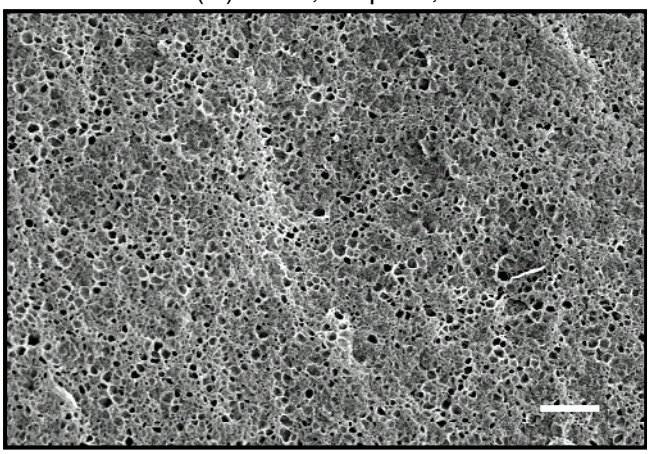


Figura 16. Micrografias SEM de géis de gelana (GN) 1,5% (m/v). A) pH = 3,5, B) pH = 5,3 C) pH = 7,0. A barra de escala corresponde a 10μm.

4. Conclusões

A transição conformacional da gelana foi fortemente afetada pelo pH. Amostras de gelana em pH 3,5 formaram géis termorresistentes, porém o aumento do pH até valores próximos de 7,0 levou à formação de géis termorreversíveis, com características elásticas menos pronunciadas. O mecanismo de transição conformacional da gelana é mais evidente em pH 5,3 e sugere que a transição *Helix-Coil* ocorre em duas etapas devido à formação de zonas de junção com estabilidades térmicas distintas. O início da transição conformacional *Helix-Coil* acontece a aproximadamente 55°C na faixa de pH 5,3 a 7,0, sendo que abaixo desta temperatura as moléculas se encontram em estado predominantemente anisotrópico e a partir de 66°C e las se encontram em estado predominantemente isotrópico. A temperatura de gelificação mostrou-se independente do pH, sendo de aproximadamente 34,3°C para todas a s amostras. O pH também afetou a microestrutura das amostras que apresentaram redes com características distintas. A redução do pH de 7,0 para 5,3 tornou a rede mais contínua e com poros mais abertos, enquanto em pH menores (3,5) a continuidade da rede aumenta ainda mais ocasionando o aparente fechamento dos poros.

– CAPÍTULO 4 –

Influência da conformação da gelana nas propriedades físicas de géis protéicos

Resumo

Através de ensaios reológicos a altas taxas de deformação, capacidade de retenção de água, sinerese, solubilidade em água e microscopia, estudou-se as interações estabelecidas e as características de sistemas bipoliméricos: caseinato-gelana e proteínas do soro - gelana, de forma a se compreender melhor e conseguir separar o efeito de cada variável (concentração e tipo de proteína) nas características estruturais, reológicas e de estabilidade de sistemas tripoliméricos. Também foi avaliado o efeito do estado conformacional do polissacarídeo nas características de textura, estabilidade e microestrutura das amostras. Comportamentos distintos foram observados quando a gelana foi adicionada em estado *Coil* e em estado *Helix* aos sistemas. A adição da goma a quente possibilitou a formação de agregados complexos com as proteínas que modificaram as propriedades mecânicas, a WHC, sinerese e a estrutura dos géis. Essas propriedades também se mostraram dependentes das concentrações de biopolímeros, sendo que a altas concentrações observou-se incompatibilidade termodinâmica entre a gelana e as proteínas do soro, confirmada pelos ensaios de solubilidade protéica em água.

1. Introdução

A textura e estabilidade de produtos lácteos são propriedades essenciais para uma boa aceitação dos mesmos pelos consumidores, sendo que tais propriedades podem ser alteradas pela adição de polissacarídeos (BRAGA, 2006). Interações entre proteínas e polissacarídeos dependem dos fatores envolvidos nas condições dos sistemas, tais como pH, força iônica, temperatura e também das estruturas químicas destes polímeros (ZHANG & FOEGEDING, 2003). A formação de uma rede protéica é o resultado da agregação das moléculas de proteína a partir da desnaturação destas e/ou acidificação do sistema (BRAGA, 2006). No caso de produtos lácteos, as proteínas encontradas em maior quantidade são as caseínas e as proteínas do soro.

As caseínas possuem ponto isoelétrico próximo à 4,6 e são negativamente carregadas em pH neutro. O abaixamento do pH promove a neutralização dos grupos carboxílicos presentes ao longo da cadeia diminuindo a repulsão eletrostática entre as moléculas (HORNE & LEAVER, 1995). Caso as interações atrativas (interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de van der Waals) sejam suficientemente fortes, as partículas se agregarão e poderão formar uma rede de gel tridimensional (CHEN *et al.,* 1999). O mesmo efeito é observado na presença de polissacarídeos aniônicos. A redução do pH causa aumento das interações entre os biopolímeros (proteína/proteína, proteína/polissacarídeo e polissacarídeo/polissacarídeo) devido ao decréscimo de carga no ponto isoelétrico, reduzindo a repulsão eletrostática nos sistemas (LUCEY *et al*., 1998). A quantidade dessas interações estabelecidas e a força de cada ligação irão interferir diretamente na textura do sistema (VAN VLIET *et al.,* 1991), na microestrutura e sua capacidade de retenção de água. Yamamoto & Cunha (2007) observaram que a redução do pH induz a formação de géis de gelana mais rígidos, deformáveis e turvos devido à maior densidade da rede formada, visto que a diminuição da repulsão eletrostática entre

as moléculas de caráter aniônico da gelana, contribui para o aumento do número de interações estabelecidas. Em géis protéicos, o aumento da rigidez com a redução do pH foi confirmado por Cavallieri & Cunha (2007). Através do estudo de sistemas de proteínas de soro gelificadas a frio com diferentes razões de GDL, eles observaram que menores valores de pH estavam relacionados ao aumento da rigidez e elasticidade dos géis pois a redução do pH possibilitou o estabelecimento de interações entre os grupos hidrofóbicos das proteínas.

O tratamento térmico é uma etapa de processo muito importante, pois afeta de maneira significativa as propriedades reológicas e de textura de géis biopoliméricos. Em sistemas protéicos, a desnaturação térmica de proteínas globulares ocasiona a exposição de regiões hidrofóbicas das moléculas, que se apresentam voltadas para dentro da estrutura na conformação nativa (BERLI *et al.*, 1999) e expõe grupos tiol reativos possibilitando o intercâmbio de grupos sulfidrilas (tiol) e interações hidrofóbicas e eletrostáticas com os demais componentes dos sistemas (OLDFIELD *et al.*, 1998). Em sistemas proteínas-polissacarídeos, além da exposição dos grupos reativos das proteínas, o tratamento térmico também promove mudanças conformacionais em alguns polissacarídeos como a xantana e a gelana, modificando suas estruturas favorecendo interações entre os biopolímeros. No caso da gelana, o aumento de temperatura do meio promove mudanças conformacionais e as moléculas do polissacarídeo assumem um estado desordenado. A formação dessa estrutura enovelada disponibiliza sítios reativos das moléculas e possibilita interações com os demais componentes do sistema. O posterior resfriamento induz a formação de duplas hélices entre as moléculas de gelana e pode levar à formação de gel, dependendo das condições do sistema e concentração da goma (WANG & CUI, 2005). A temperatura e o tempo de tratamento térmico são fatores importantes do processo. Braga & Cunha (2004) estudaram a influência de diferentes

temperaturas de tratamento térmico sobre as propriedades reológicas a baixas deformações de soluções de xantana. Eles observaram que o aumento da temperatura de tratamento da solução de xantana diminuiu as propriedades elásticas (G') e viscosas (G") dos sistemas, sendo a última, a mais afetada. Segundo os autores este fenômeno possivelmente reflete o fato de que durante o tratamento térmico, as moléculas de xantana se reorganizam, podendo se distribuir mais homogeneamente pelo sistema de acordo com a temperatura utilizada, e assim causariam mudanças irreversíveis no comportamento reológico deste polissacarídeo.

Assim, visto a importância do entendimento das interações estabelecidas em sistemas protéicos adicionados de polissacarídeos no desenvolvimento de novos produtos, este trabalho teve o objetivo de estudar as interações macromoleculares de sistemas bipoliméricos (gelana - caseinato de sódio e gelana – proteínas do soro) e tripoliméricos (gelana – caseinato de sódio – proteínas do soro) através da avaliação de suas características reológicas, estruturais e de estabilidade (capacidade de reter água e sinerese). Este estudo também teve a pretensão de elucidar o efeito de diferentes concentrações de gelana e proteínas nessas propriedades, além de investigar qual a importância do estado conformacional da gelana nas interações ocorridas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Utilizou-se caseína técnica adquirida da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, EUA), goma gelana desacilada (Kelcogel® F) cedida pela Kelco (San Diego, EUA) e concentrado protéico de soro (WPC) doado pela Fonterra (Clandeboye, Nova Zelândia) cujas composições são apresentadas na Tabela 7. O éster glucona-δ-lactona foi obtido da Sigma-Aldrich Co (Irlanda). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Tabela 7. Composição do concentrado protéico (WPC) de soro, caseína e gelana em relação ao teor de umidade, proteínas e minerais

	Teor de proteína (%)*	Umidade (%BU)**	K^+ (%)***	Na^+ (%)***	Ca^{2+}(%)***	Cinzas (%)**
Caseína	86,29 ± 0,13	6,25 ± 0,43	0,08	0,16	0,14	0,78 ± 0,08
Gelana	-	3,42 ± 0,15	4,13	0,43	0,18	10,53 ± 0,05
WPC	77,62 ± 0,09	2,30 ± 0,30	0,46	0,38	0,41	2,49 ± 0,09

* teor de nitrogênio determinado por método de Kjeldhal (AOAC, 1996).
** determinação por gravimetria.
*** quantificação por espectrometria de Absorção Atômica (Instituto de Química - Unicamp).

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo das soluções estoque

A partir de ensaios preliminares determinou-se a concentração das soluções estoques de forma que não gelificassem no resfriamento logo após o tratamento térmico, impedindo a preparação das amostras. Optou-se por trabalhar com soluções estoque 0,7% (m/m) de gelana, 7% (m/m) de IPS e 14% (m/m) de caseinato de sódio.

2.2.1.1. Solução estoque de caseinato de sódio

Foi feita a dissolução da caseína em água deionizada na concentração de 14% (m/m), sob agitação magnética, a uma temperatura inferior a 50°C. O pH da solução foi constantemente ajustado para 6,7 com adição de solução de NaOH 10 M, até completa dissolução da caseína e formação do caseinato de sódio.

2.2.1.2. Solução estoque de concentrado protéico de soro

O concentrado protéico de soro foi diluído em água deionizada na concentração de 7% (m/m) sob agitação magnética por 30 minutos a temperatura ambiente até completa solubilização. Então foi realizado um tratamento térmico em béquer encamisado a 80°C por 30 minutos para indução da desnaturação protéica e posterior resfriamento até 10°C em banho de gelo.

2.2.1.3. Solução estoque de gelana

A solução estoque de gelana foi preparada na concentração de 0,7% (m/m) pela dissolução do pó em água deionizada sob tratamento térmico de 80°C por 30 minutos em béquer encamisado com agitação magnética. Após o tratamento foi feito resfriamento a 10°C em banho de gelo.

2.2.2. Composição dos géis

A partir das temperaturas de transição conformacional da gelana apresentadas no Capítulo 3, determinou-se a temperatura de mistura das soluções-estoque para a obtenção de sistemas formados por gelana em estado desordenado ou *Coil* (soluções estoques misturadas a quente) e estado ordenado ou *Helix* (soluções estoques preparadas a frio).

Nas amostras formadas por gelana em estado *Helix*, as soluções estoque foram misturadas a 10°C conforme a composição final apresentada na Tabela 8. Então, se adicionou GDL na quantidade calculada a partir da razão de GDL/biopolímeros determinada no Apêndice 1 e agitaram-se as amostras por 2 minutos até completa solubilização. Após, as amostras foram imediatamente acondicionadas a 10°C em formas cilíndricas de 21mm de diâmetro e 21mm de altura por 72 horas para a formação e estabilização da rede dos géis.

Tabela 8. Composição dos sistemas poliméricos. CN: caseinato, WPC: concentrado protéico de soro

	Gelana (% m/m)					
	Estado ordenado			Estado desordenado		
WPC % (m/m)	*CN 0% (m/m)*	*CN 1% (m/m)*	*CN 2% (m/m)*	*CN 0% (m/m)*	*CN 1% (m/m)*	*CN 2% (m/m)*
0	0,1 0,3	0,1 0,3	0,1 0,3	0 0	0,1 0,3	0,1 0,3
1	0,1 0,3	0,1 0,3	0,1 0,3	0,1 0,3	0,1 0,3	0,1 0,3
3	0,1 0,3	0,1 0,3	0,1 0,3	0,1 0,3	0,1 0,3	0,1 0,3

Os sistemas compostos por gelana em estado *Coil* foram formados pela mistura das soluções estoque a 80°C sob leve agitação magnética de forma a se obter a composição final desejada (Tabela 8). As amostras foram resfriadas em banho de gelo até atingirem 10°C, quando se adicionou o GDL. Após agitação por 2 minutos para a solubilização do GDL, as amostras foram acondicionadas em formas cilíndricas (21mm de diâmetro por 21mm de altura) a 10°C por 72 horas.

Para ambos os estados conformacionais da gelana, o pH final das amostras foi de 4,0 ± 0,2 visto que se utilizou concentrado protéico de soro de leite, ao invés do isolado protéico. Tal pH foi utilizado pois nesta condição ambas as proteínas encontram-se abaixo do seu ponto isoelétrico e portanto, as interações com o polissacarídeo são favorecidas. As faixas de concentração estudadas (Tabela 8) foram determinadas de acordo com os valores usualmente utilizados em alimentos e de forma que as soluções não gelificassem durante o resfriamento, antes da adição de GDL.

2.2.3. Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos géis obtidos foram avaliadas por ensaios de compressão uniaxial até a ruptura da estrutura. Os ensaios foram feitos por compressão do material até aproximadamente 80% de sua altura inicial, sob velocidade de compressão de 1 mm/s em um TA-XT plus Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, Inglaterra) à temperatura de 10°C.

As propriedades dos géis foram mensuradas usando-se uma célula de carga de 25 kg e geometria do tipo placa cilíndrica de acrílico com 60 mm de diâmetro, lubrificada com óleo de silicone de baixa viscosidade de forma a evitar o atrito com a amostra (Rao, 1992; Lau *et al.*, 2000). Todas as medidas foram realizadas em quintuplicatas. A partir dos dados de força e altura obtidos calculou-se a tensão (σ_H) e deformação (ε_H) de Hencky

segundo as Equações 1 e 2 apresentadas no item 5.2 do Capítulo 2 (STEFFE, 1996). O ponto de ruptura foi considerado como o pico máximo da curva tensão *versus* deformação.

O módulo de elasticidade (E) foi determinado a partir da tangente da região linear inicial da curva tensão-deformação (ROSENTHAL, 1999; STEFFE, 1996), conforme a Equação 3 do item 5.2 do Capítulo 2, quando a deformação do material é reversível.

2.2.4. Capacidade de Retenção de Água (WHC)

A capacidade de retenção de água dos géis foi determinada após 72 horas a 10°C, sendo realizadas seis replicatas de cada amostra utilizando-se uma centrífuga modelo Allegra 25 – R (Beckman Coulter, Alemanha) com rotor A-10. Os géis foram preparados conforme o item 2.2.2 e colocados em tubos de centrífuga de 50ml previamente pesados e fechados hermeticamente para que se procedesse a centrifugação. A centrifugação foi realizada em um programa de 5 etapas (200g / 800g / 1800g / 3100g / 5000g) conforme modificação do método de Schkoda *et al.* (1999) e Picone *et al.* (2005), cada qual com a duração de 10 minutos possibilitando um aumento gradativo da força centrífuga durante o experimento e a saída gradual de água do gel.

A quantidade de água liberada dos géis foi quantificada gravimetricamente e a WHC calculada de acordo com a equação 4, sendo expressa em porcentagem de água retida:

$$WHC = 100 \cdot \left[1 - \left(\frac{água_{liberada}(g)}{água_{gel}(g)} \right) \right] \qquad (4)$$

2.2.5. Sinerese

A sinerese dos géis foi avaliada em quintuplicata após armazenamento por 72 horas a 10°C. Para a quantificação da água exsudada espontaneamente pelos géis, eles foram acondicionados por 1 hora a 10°C em béqueres de 100 ml com quatro camadas de papel de filtro qualitativo (MOTTA *et al.,* 2004). A água liberada foi quantificada por gravimetria e a sinerese foi calculada segundo a Equação (5), sendo expressa em porcentagem de água liberada em relação à quantidade de água total do gel.

$$Sinerese = 100 \cdot \left(\frac{água_{liberada}(g)}{água_{gel}(g)} \right) \quad (5)$$

2.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias dos géis foram obtidas de acordo com a metodologia de preparo apresentada no item 2.2.3 do Capítulo 3.

2.2.7. Solubilidade

Os géis foram triturados em água deionizada a pH 7,0 para induzir o rompimento das interações eletrostáticas e também em água deionizada em pH similar às amostras (pH 4,0). A trituração foi realizada a temperatura ambiente em um homogeneizador Ultra Turrax modelo T18 (IKA, Alemanha) durante 2 minutos a 10.000 rpm e depois as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 45 minutos a 25°C em uma centrífuga Allegra 25 – R (Beckman Coulter, Alemanha) com rotor A-10. A solubilidade protéica foi determinada no sobrenadante obtido e expressa como porcentagem de proteína solúvel em relação ao conteúdo total de proteína do gel. As extrações foram feitas em triplicata para cada tipo de solvente. A concentração protéica foi determinada a 280 nm em um espectrofotômetro Beckman Du-70 (Beckman, EUA) usando coeficiente de extinção

aparente ($E_{1cm}^{1\%}$) de 27,15 que foi determinado medindo-se a absorbância a 280nm de uma solução 1% (m/m) de proteínas do soro, cuja concentração foi determinada pelo método de Kjeldhal.

3. Resultados e Discussão

3.1. Propriedades mecânicas

3.1.1. Tensão de ruptura

Através da avaliação da tensão de ruptura dos géis bi e tripoliméricos pode-se entender qual a funcionalidade de cada biopolímero na rigidez dos géis formados e como a adição da gelana em diferentes estados conformacionais aos sistemas interfere na força da rede.

A Figura 17 apresenta os valores de tensão de ruptura de géis bipoliméricos formados por WPC e gelana, sendo a mistura feita com o polissacarídeo no estado desordenado (*Coil*) e estado ordenado (*Helix*).

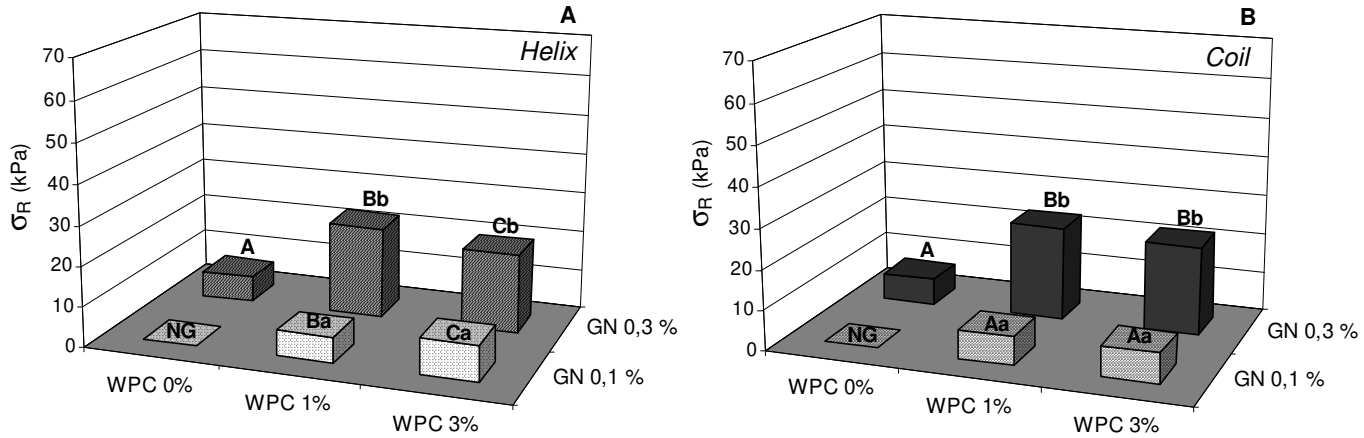


Figura 17. Tensão de ruptura de géis de gelana (GN) com ou sem proteínas do soro de leite (WPC), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. A) Mistura dos biopolímeros realizada a 10°C. B) Mistura dos biopolímeros feita a 80°C. As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). NG - não formação de gel auto-sustentável.

Observa-se que para ambas as conformações de gelana a tensão de ruptura aumenta significativamente quando se adicionam as proteínas do soro. Além disso, a presença de WPC foi essencial para a formação de géis auto-sustentáveis para concentração de gelana de 0,1% (m/m). Este aumento da tensão de ruptura com a adição de proteínas do soro é, possivelmente, devido à conhecida capacidade de gelificação dessas proteínas (VAN DER BERG *et al.,* 2007; AGUILERA, 2005). Quando desnaturadas elas expõem regiões hidrofóbicas e grupos sulfidrilas (BOTTOMLEY *et al.*, 1990; VERHEUL *et al.,* 1998) possibilitando o estabelecimento de interações do tipo covalentes e não covalentes entre si e demais componentes do sistema durante a acidificação, levando à formação de rede e conseqüente aumento das características elásticas dos sistemas.

No entanto, um aumento da quantidade de WPC de 1 para 3% (m/m) não levou a grandes alterações dos valores de tensão de ruptura apesar de apresentar diferenças significativas em alguns sistemas. Nos géis formados por gelana 0,1% (m/m) em estado *Helix*, observou-se aumento da tensão de ruptura com o aumento da concentração de WPC, indicando que a rigidez da rede dos géis teve uma importante contribuição das interações formadas pelas proteínas do soro desnaturadas. Já para os sistemas formados por gelana 0,3% (m/m) *Helix*, o aumento da concentração de WPC resultou em uma pequena queda da tensão de ruptura, sugerindo uma possível incompatibilidade entre os biopolímeros a elevadas concentrações.

Para os sistemas formados por gelana em estado *Coil* a variação da concentração de proteínas do soro de 1 para 3% (m/m) não alterou a rigidez dos géis apesar de teoricamente mais sítios de interações estarem disponíveis para o estabelecimento de ligações. Isso sugere que ao invés das proteínas do soro estarem se ligando às zonas de junções da gelana e estabelecendo interações entre si, a parte positiva delas

provavelmente está interagindo com sítios ativos negativos das moléculas individuais de gelana. Essas ligações podem se dar por meio de interações eletrostáticas ocorridas nos sistemas desordenados, antes da formação de duplas hélices, como ilustra a Figura 18, e assim não estariam contribuindo para o aumento da rigidez dos sistemas. Burova *et al.* (2007) estudou a formação desses complexos eletrostáticos em sistemas de β-caseína e ι- e κ-carragena, um polissacarídeo cuja transição conformacional é muito similar a da gelana e constatou que a quantidade de interações desse tipo são favorecidas com a redução do pH do meio, aumento da concentração de proteínas e elevação da força iônica dos sistemas.

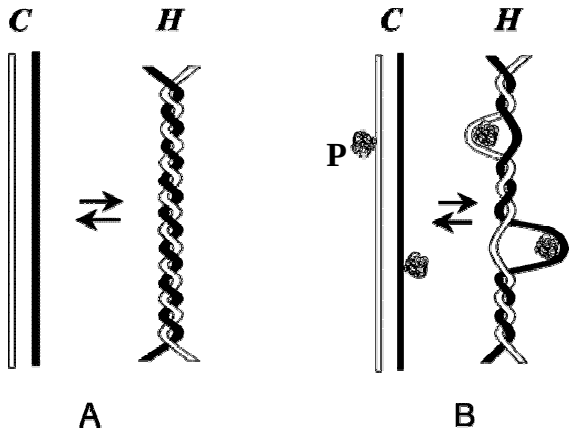


Figura 18. Esquema da transição *Coil-Helix* da gelana. A) em uma solução referência, B) quando complexada com proteínas do soro. C e H representam respectivamente as conformações *Coil* e *Helix* da gelana. P representa as proteínas do soro desnaturadas. Adaptado de Burova *et al.* (2007).

Nos géis formados por baixas concentrações de proteínas do soro (Figura 17), a análise estatística dos resultados (não apresentada) indica que o estado conformacional da gelana ao ser adicionada aos sistemas não influenciou de forma significativa a rigidez dos géis, indicando que nessas concentrações as interações entre os biopolímeros ocorrem predominantemente no resfriamento, quando a gelana está na forma de dupla-hélice e não em sua forma enovelada. Apenas nos sistemas formados com maiores concentrações de WPC (3% (m/m)) pode-se perceber variações significativas nos valores

de tensão de ruptura. Para as amostras formadas por gelana 0,3% (m/m) e WPC 3% (m/m), os géis em estado *Coil* apresentaram maior tensão de ruptura que os formados por gelana em estado *Helix*, sugerindo que a possível incompatibilidade entre os biopolímeros é reduzida quando a gelana é adicionada em estado desordenado aos sistemas provavelmente, devido à formação dos complexos eletrostáticos durante a mistura a quente. Já para as amostras formadas por gelana 0,1% (m/m) e WPC 3% (m/m), a tensão de ruptura dos géis formados em estado *Coil* foi menor que os formados em estado *Helix*, confirmando a provável formação de complexos eletrostáticos.

Para todos os sistemas, o aumento da concentração de gelana de 0,1 para 0,3 % (m/m) aumentou consideravelmente a tensão de ruptura da rede, devido ao alto poder gelificante deste polissacarídeo. Em sistemas de gelana puros, só foi possível obter géis auto-sustentáveis na maior concentração utilizada (Figura 17) visto que o aumento da concentração de polissacarídeo contribuiu para que a rede de gel formada fosse mais densa.

A tensão de ruptura dos sistemas caseinato de sódio – gelana são apresentadas na Figura 19. Amostras puras de gelana também são apresentadas para facilitar a interpretação dos resultados. Assim como observado para as proteínas de soro, a presença de caseinato foi essencial para formação de géis auto-sustentáveis quando na concentração 0,1% (m/m) de gelana. No entanto, quando comparados com géis de gelana e WPC, os géis de caseinato de sódio e gelana são estatisticamente menos rígidos, embora sigam a mesma tendência de aumento da tensão de ruptura com o aumento da concentração de proteína observada para menores concentrações da goma. Além disso, não foi observada diferença estatística entre os géis formados por gelana em diferentes estados conformacionais e caseinato de sódio, o que sugere que as interações

entre estes dois biopolímeros ocorrem predominantemente após o resfriamento, quando a gelana está na forma de dupla-hélice.

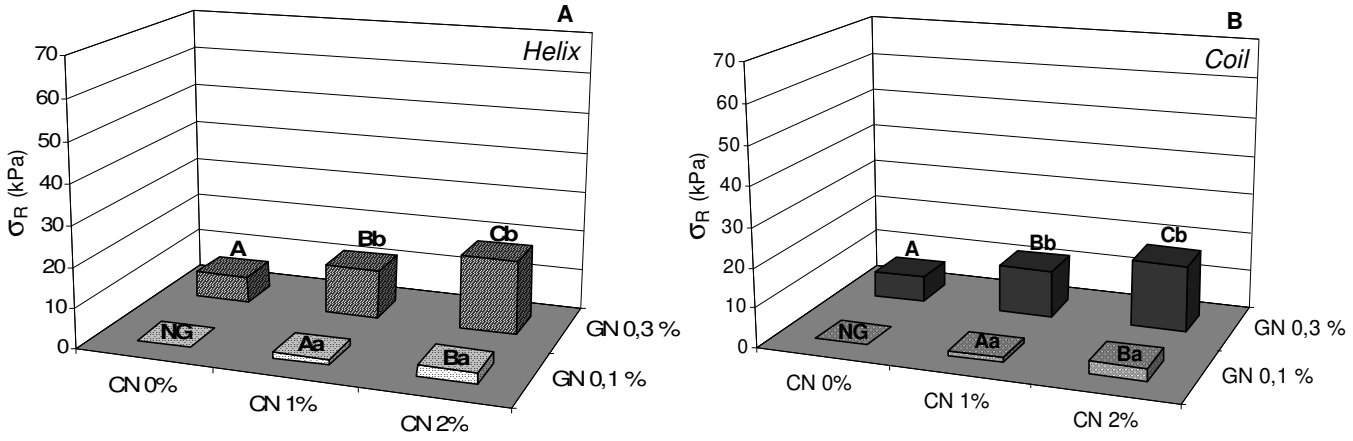


Figura 19. Tensão de ruptura de géis de gelana (GN) com ou sem caseinato de sódio (CN), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. A) Mistura dos biopolímeros realizada a 10°C. B) Mistura dos biopolímeros feita a 80°C. As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). NG - não formação de gel auto-sustentável.

A diminuição da concentração de gelana novamente diminuiu a tensão de ruptura dos géis para todas as concentrações de caseinato, pois provavelmente o número de interações estabelecidas foi menor e a estrutura formada mais fraca. Os géis compostos por gelana 0,1% (m/m) e caseinato apresentaram tensão de ruptura muito menor que os formados por WPC. Isso confirma a hipótese de que esses géis são formados em grande parte por interações protéicas, visto que a faixa de concentração de caseinato estudada foi menor que a de WPC.

A partir do conhecimento das propriedades e tendências dos sistemas bipoliméricos torna-se mais fácil a compreensão de sistemas tripoliméricos. A Figura 20 apresenta os dados de tensão de ruptura de amostras contendo caseinato de sódio, proteínas do soro e gelana.

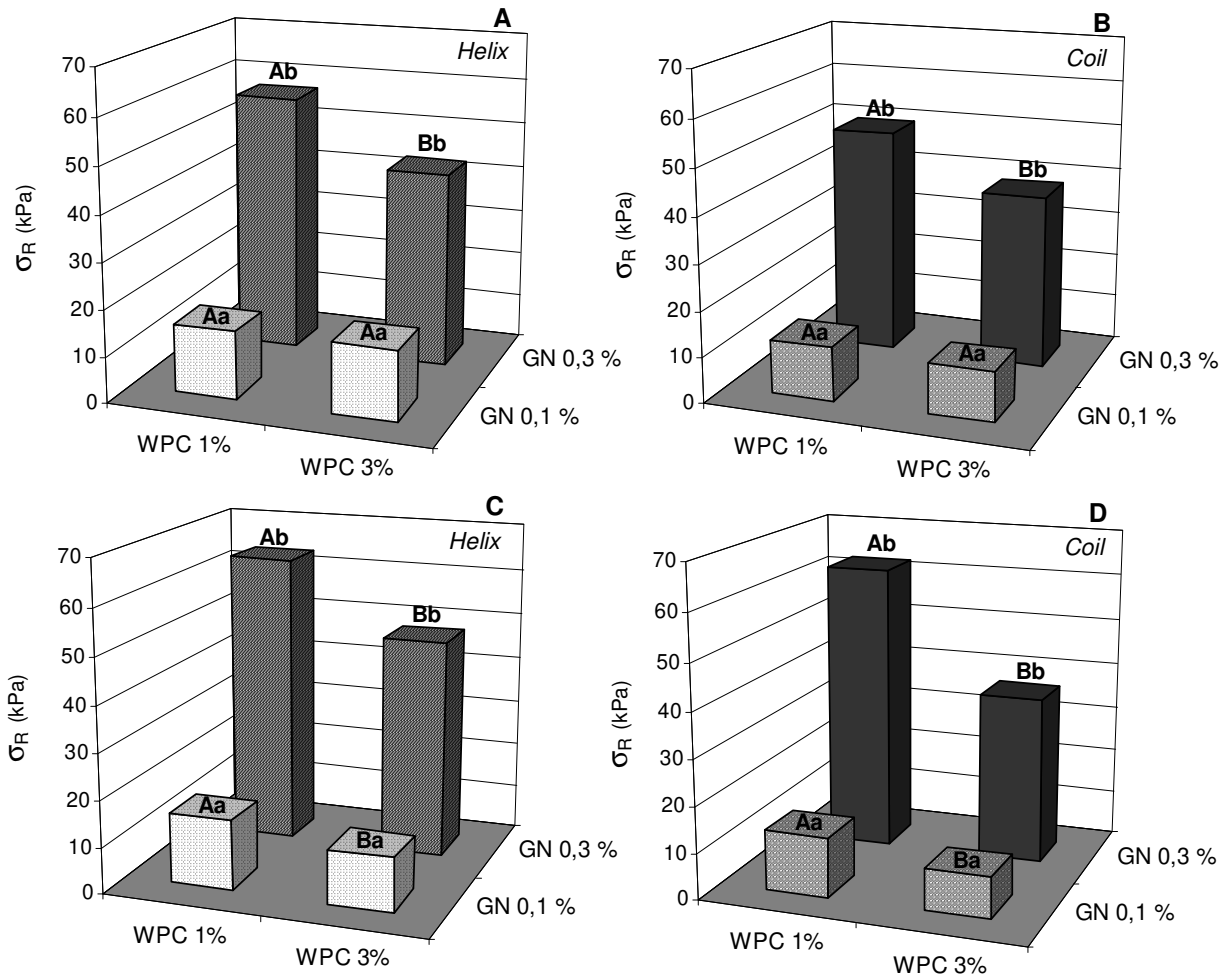


Figura 20. Tensão de ruptura de géis de caseinato de sódio, gelana (GN), e proteínas do soro (WPC), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis e a concentração de caseinato de sódio. A e B) Sistemas com caseinato de sódio 1% (m/m), C e D) Sistemas com caseinato de sódio 2% (m/m). As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$).

De forma geral, os valores de tensão de ruptura das amostras tripoliméricas são notavelmente maiores que os das amostras bipoliméricas, chegando a ser duas vezes maior em alguns casos. Devido à maior quantidade de polímeros, os choques entre as moléculas em solução são mais freqüentes e o estabelecimento de interações intermoleculares é favorecido. Porém, novamente se observa incompatibilidade entre os polímeros ao se aumentar a concentração de WPC em todas as amostras compostas por

caseinato 2% (m/m) e nas compostas por caseinato 1% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) em ambos estados conformacionais, apesar do predomínio de cargas positivas nas proteínas e negativas no polissacarídeo. Nestes casos houve redução da tensão de ruptura com o aumento da concentração protéica. Ribeiro e colaboradores (2004) também observaram incompatibilidade termodinâmica e redução da tensão de ruptura ao aumentar a concentração de biopolímeros em sistemas caseinato de sódio - κ-carragena. Segundo os autores, o aumento da concentração de macromoléculas dos sistemas teria ocasionado um efeito de exclusão de volume que está associado ao aparecimento de interações repulsivas entre os biopolímeros devido ao aumento da concentração (TOLSTOGUZOV, 2003).

O aumento da concentração de caseinato de sódio nos sistemas tripoliméricos contribuiu significativamente para o aumento da rigidez dos géis na maioria dos sistemas contendo gelana 0,3% (m/m) (Figuras 20 A, B, C e D) independentemente da concentração de proteínas do soro e do estado conformacional da goma, exceto pela amostra com 3% (m/m) de WPC em estado coil, cuja diferença não foi significativa. Isso confirma que a incompatibilidade polimérica ocorre predominantemente entre as proteínas do soro e a gelana, enquanto que o caseinato contribui de forma positiva para a estruturação da rede de gel. Provavelmente esta incompatibilidade estaria associada à formação de agregados de grande massa molecular durante o aquecimento das proteínas do soro que podem alcançar mais de 200 kDa (CAVALLEIRI *et al.*, 2007). Neste caso, a incompatibilidade seria favorecida entre as duas macromoléculas de maior massa molar (TOLSTOGUZOV, 2003). Nos sistemas compostos por gelana 0,3% (m/m) *Coil* e caseinato 2% (m/m), o aumento da concentração de WPC levou a uma redução dos valores de tensão estatisticamente maior que nos outros casos. Nessas amostras, além

do fenômeno de incompatibilidade termodinâmica, a formação de agregados complexos também é favorecida, contribuindo para a redução da rigidez dos sistemas.

Nos sistemas formados por gelana 0,1% (m/m), em que as interações foram predominantemente protéicas, também se observou uma tendência de enfraquecimento das estruturas com o aumento da concentração de WPC para as amostras com caseinato 2% (m/m) (Figuras 20 C e D). Estes resultados diferem de outros encontrados na literatura para sistemas protéicos acidificados caseinato - proteínas do soro. Normalmente o aumento da concentração de proteínas do soro em sistemas com caseinato, contribui para o aumento do número de interações e conseqüentemente da rigidez dos géis (PICONE *et al.,* 2005). Porém, a presença da gelana interfere nestas interações e, provavelmente, há predomínio da separação de fases.

Nos sistemas tripoliméricos de maneira geral, a mistura dos biopolímeros a quente reduziu a tensão de ruptura de quase todas as amostras de forma significativa, exceto pela amostra com 2% (m/m) de caseinato, 1% (m/m) de WPC e 0,3% (m/m) de gelana, em que não foram observadas diferenças. Este efeito da conformação da gelana poderia ser atribuído a formação de complexos eletrostáticos. Nos sistemas tripoliméricos o estado conformacional da gelana exerceu influência bem mais marcante na tensão de ruptura das amostras, quando comparado aos sistemas bipoliméricos. O aumento da concentração de macromoléculas desses sistemas em relação aos compostos apenas por uma proteína provavelmente gerou um efeito de exclusão de volume que contribuiu para a formação de agregados complexos entre as proteínas do soro e a gelana.

Assim, devido aos efeitos de incompatibilidade termodinâmica e à formação de agregados complexos, os sistemas mais rígidos foram formados nas concentrações de 2% (m/m) de caseinato de sódio, 1% (m/m) de WPC e 0,3% (m/m) de gelana em estado *Helix*, e não nas maiores concentrações de polímeros.

3.1.2. Deformação na Ruptura

A deformação de ruptura dos géis esta relacionada à variação de altura que a amostra suporta antes de se romper, ou à deformabilidade dos géis.

Em sistemas simples de proteínas do soro e gelana, a concentração de polissacarídeo apresentou influência significativa sobre a deformabilidade das amostras apenas quando a goma foi adicionada em estado *Helix* aos sistemas. O aumento da concentração de gelana de 0,1 para 0,3% (m/m) em estado *Helix* interferiu de forma distinta na deformação dos sistemas para diferentes concentrações de WPC (Figura 21). Nas amostras compostas por WPC 1% (m/m), o aumento da concentração de gelana aumentou a deformabilidade dos géis na ruptura, enquanto que para a concentração de 0,3% (m/m) de proteínas do soro, o incremento na concentração de gelana reduziu a deformabilidade das amostras. No primeiro caso, o aumento da quantidade de interações devido ao aumento da quantidade de gelana, provavelmente induziu à formação de uma rede mais entrelaçada e densa, assim a força aplicada durante o ensaio de compressão foi melhor distribuída pela estrutura tornando-a mais deformável. Em altas concentrações de WPC, a diminuição da deformabilidade das amostras com o aumento da concentração de gelana parece ser resultado da incompatibilidade entre os polímeros, como observado na análise de tensão de ruptura (Figura 17).

Nos sistemas formados por gelana em estado *Coil* (Figura 21 B) não se observou variação significativa da deformação na ruptura ao se variar a concentração de gelana. Porém, maiores valores de deformação foram observados para menores concentrações de WPC. Nestes casos, a deformação foi estatisticamente similar a de géis puros de gelana 0,3% (m/m) e de géis nas mesmas concentrações em estado ordenado (Figura 21A). Nas maiores concentrações de WPC, a redução da deformabilidade provavelmente está relacionada com a incompatibilidade entre os polímeros e a formação de agregados

eletrostáticos. Resultado similar foi observado para as misturas a baixas temperaturas ou no estado ordenado. Géis em estado *Coil* com concentração de WPC de 1% (m/m) e gelana 0,1% (m/m) (Figura 21 B) são estatisticamente mais deformáveis que os formados nas mesmas concentrações em estado *Helix* (Figura 21 A). No entanto, vale ressaltar que os géis misturados a quente foram muito mais deformáveis que os misturados com a gelana ordenada, indicando a relevância dos complexos eletrostáticos formados para a flexibilidade da rede.

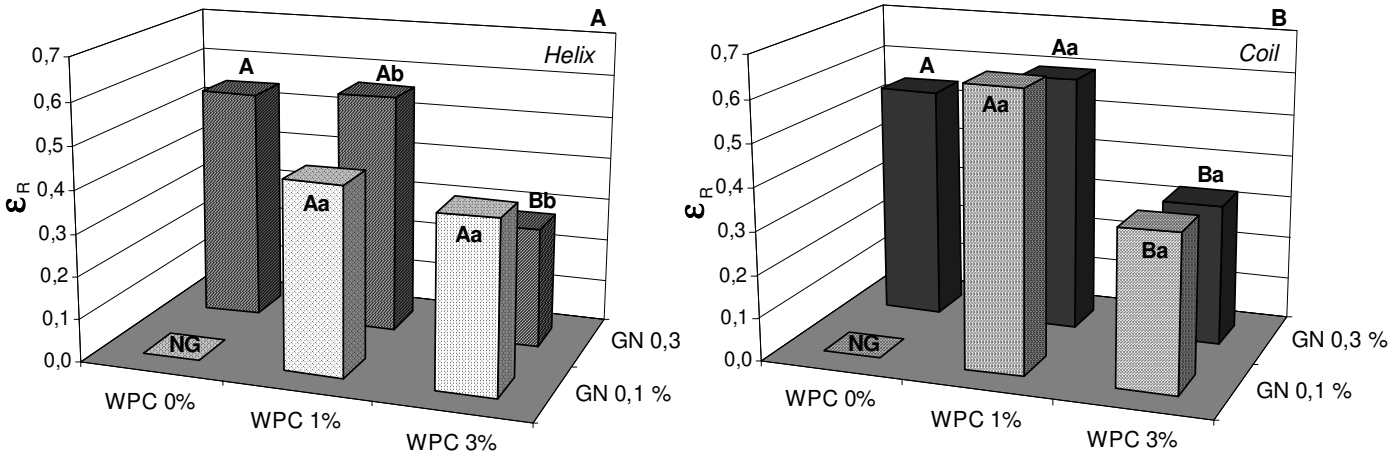


Figura 21. Deformação na ruptura (ε_R) de géis de gelana (GN) com ou sem proteínas do soro de leite (WPC), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. A) Mistura dos biopolímeros realizada a 10°C. B) Mistura dos biopolímeros feita a 80°C. As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). NG - não formação de gel auto-sustentável.

As deformações na ruptura dos géis bipoliméricos de caseinato de sódio e gelana são apresentados nas Figuras 22 A e B. A adição de caseinato diminuiu drasticamente a deformabilidade dos géis em relação à amostra de gelana pura 0,3% (m/m), enquanto que a concentração de gelana não interferiu na extensibilidade dessas amostras.

Para os sistemas formados por gelana em estado *Coil* (Figura 22 B) foi observado um aumento significativo da deformabilidade dos géis quando a concentração de caseinato aumentou de 1 para 2% (m/m), enquanto que os sistemas compostos por

gelana em estado ordenado não mostraram diferenças de deformação com a variação da concentração de caseinato. É interessante observar que esses géis são estatisticamente mais deformáveis que os formados por gelana em estado *Helix*.

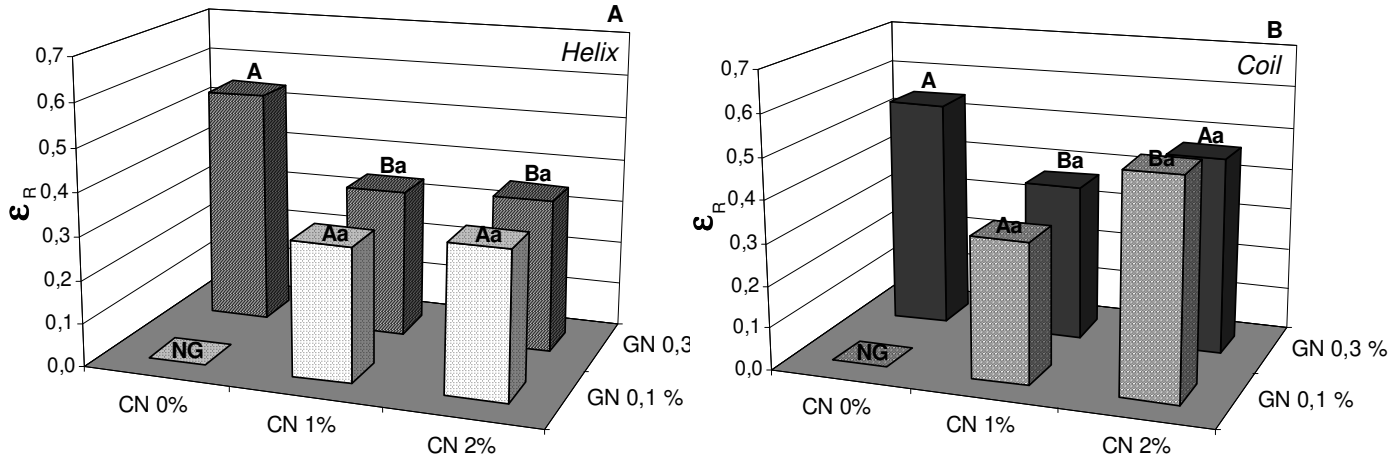


Figura 22. Deformação na ruptura (ε_R) de géis de gelana (GN) com ou sem caseinato de sódio (CN), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. A) Mistura dos biopolímeros realizada a 10°C. B) Mistura dos biopolímeros feita a 80°C. As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). NG - não formação de gel auto-sustentável.

Comparativamente, a deformabilidade das amostras de caseinato e gelana em *Helix* (Figura 22 A) é estatisticamente menor que das amostras de WPC e gelana para todas as concentrações estudadas (Figura 21 A). No entanto, uma tendência diferente foi observada quando a gelana é adicionada a quente às proteínas. Enquanto a deformabilidade das amostras com proteínas do soro diminuiu drasticamente ao se aumentar a concentração de proteína, nas amostras com caseinato de sódio, a extensibilidade dos géis aumentou. Observa-se que os géis com 1% (m/m) de WPC foram muito mais deformáveis que os com 1% (m/m) de caseinato de sódio, e os géis com 2% (m/m) de caseinato possuíam maior deformação na ruptura que os com 3% (m/m) de proteínas do soro para ambas concentrações de gelana estudadas.

As deformações na ruptura dos sistemas formados pelas duas proteínas juntamente com a gelana são apresentadas na Figura 23. Nos sistemas tripoliméricos, as proteínas do soro continuaram exercendo influência negativa sobre a deformabilidade dos sistemas. Em todas as amostras, o aumento da concentração de WHC provocou queda na deformação de ruptura, provavelmente devido à incompatibilidade entre os biopolímeros induzida pelas altas concentrações de macromoléculas. De forma geral, o aumento da concentração de caseinato de sódio (Figuras 23 A, B, C e D) também reduziu de forma significativa a deformabilidade dos géis formados a quente e a frio, porém de maneira muito menos pronunciada que o WPC. Isto pode estar relacionado aos efeitos de exclusão de volume, visto que os agregados de proteínas do soro desnaturada podem atingir altos valores de massa molecular (Cavallieri, 2007) e, portanto exercem maior efeito estérico que as moléculas de caseinato.

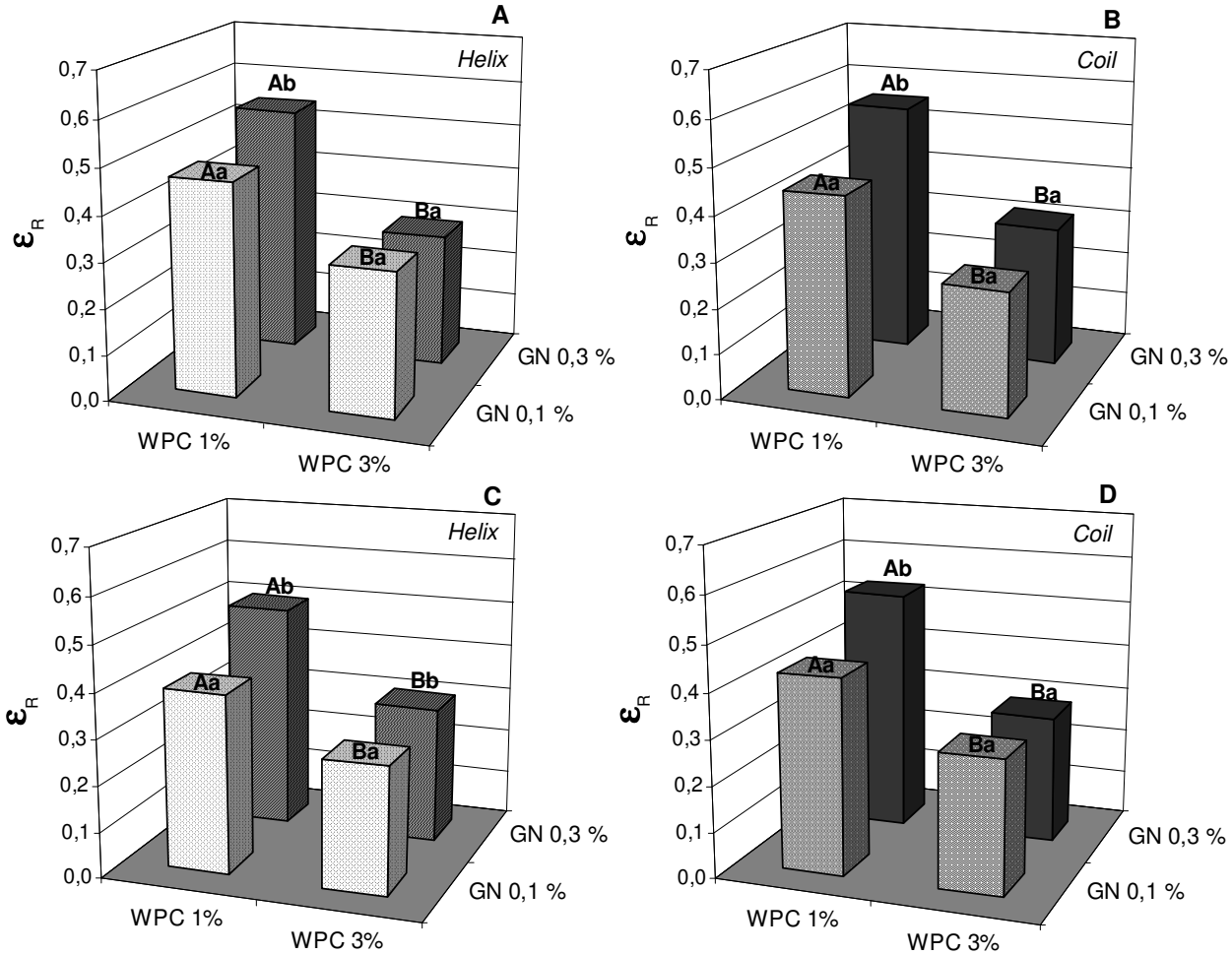


Figura 23. Deformação na ruptura (ε_R) de géis de caseinato de sódio, gelana (GN), e proteínas do soro (WPC), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis e a concentração de caseinato de sódio. A e B) Sistemas com caseinato de sódio 1% (m/m), C e D) Sistemas com caseinato de sódio 2% (m/m). As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$).

As amostras formadas por caseinato 1% (m/m), WPC 1% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) apresentaram deformabilidade estatisticamente igual às amostras de gelana 0,3% (m/m) pura, independentemente do estado conformacional, sendo as que apresentaram maior deformação antes da ruptura.

3.1.3. Módulo de Elasticidade

A região linear das curvas de tensão em função da deformação de Hencky corresponde à faixa de deformação reversível dos géis, ou seja, onde não ocorrem danos irreversíveis à sua estrutura. O coeficiente angular da curva nesta região corresponde ao módulo de elasticidade de cada sistema e representa a firmeza dos géis ou força da rede a baixas deformações.

A Figura 24 apresenta os módulos de elasticidade de sistemas de proteínas de soro e gelana. Assim como os resultados de tensão de ruptura (Figura 17), géis mais elásticos foram formados com maiores concentrações de proteínas do soro, resultado do maior número de interações estabelecidas. No entanto, comportamentos diferentes foram observados ao se variar a concentração de WPC para cada concentração fixa de gelana. Para sistemas formados por gelana 0,1% (m/m), o aumento da concentração de proteínas do soro dos sistemas levou a um aumento significativo da elasticidade dos géis formados, enquanto que em amostras contendo 0,3% (m/m) de gelana, a concentração de WPC não interferiu significativamente no módulo de elasticidade dos sistemas. Também não foram observadas variações significativas do módulo de elasticidade em relação ao estado conformacional da gelana, apesar de uma aparente tendência de redução da elasticidade das amostras em estado *Coil* em relação às formadas em estado *Helix*.

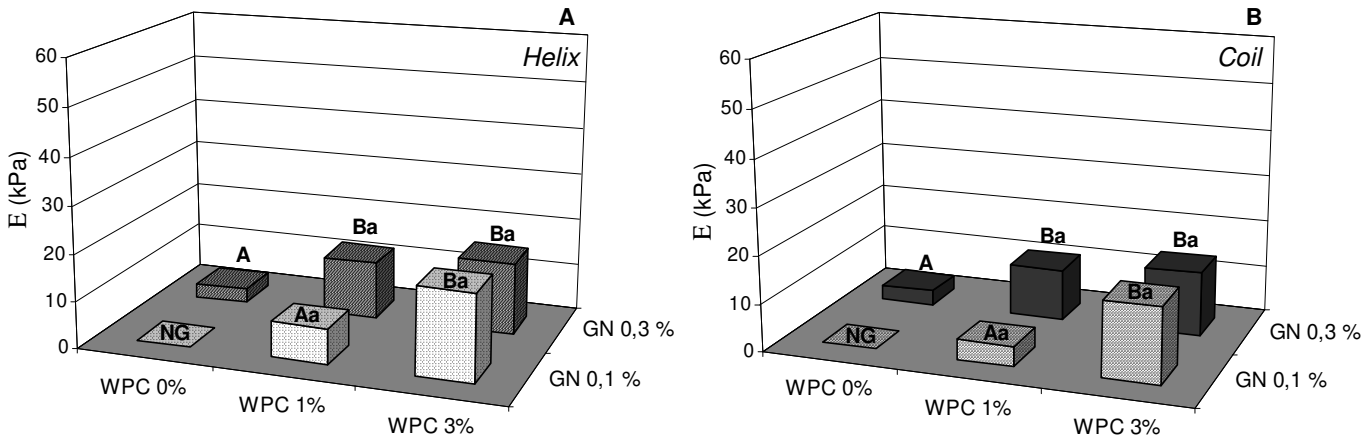


Figura 24. Módulo de elasticidade (E) de géis de gelana (GN) com ou sem proteínas do soro de leite (WPC), seguido de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliado em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. A) Mistura dos biopolímeros realizada a 10°C. B) Mistura dos biopolímeros feita a 80°C. As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). NG - não formação de gel auto-sustentável.

Nos sistemas de gelana e caseinato, a concentração de gelana influenciou fortemente o módulo de elasticidade dos géis (Figura 25). As amostras com maior concentração da goma foram muito mais elásticas que as com gelana 0,1% (m/m) tanto para a conformação *Coil*, quanto para *Helix*. Diferentemente do observado para as proteínas do soro, a concentração protéica dos sistemas com caseinato influenciou mais a elasticidade dos géis quando a concentração de gelana era de 0,3% (m/m), de maneira similar ao observado para tensão na ruptura (Figura 18). Nestes casos, também foi observado um aumento do módulo de elasticidade com o aumento da concentração de caseinato de sódio. Já para a menor concentração de gelana (0,1% (m/m)), onde a estrutura da rede foi formada predominantemente devido às interações entre proteínas, observou-se apenas um pequeno aumento da elasticidade dos géis com o aumento da concentração de caseinato, que foi significativo apenas para as amostras formadas por gelana em estado *Coil*. Isso sugere a elasticidade dos géis possivelmente está relacionada às interações entre o caseinato e a gelana, sendo os efeitos mais visíveis a

altas concentrações. Essa hipótese também é corroborada pelo aumento de elasticidade observado ao se adicionar caseinato aos sistemas puros de gelana.

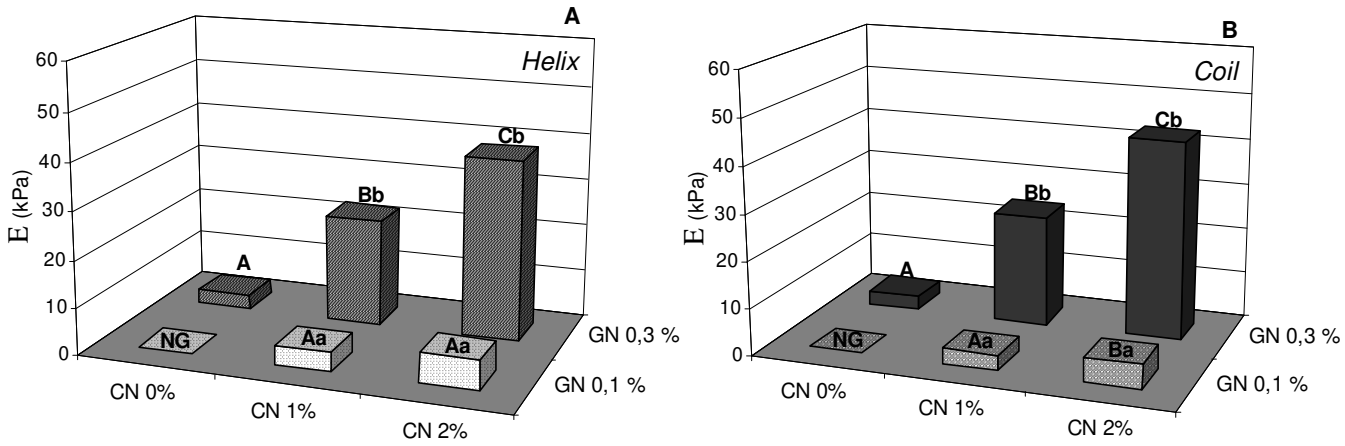


Figura 25. Módulo de elasticidade (E) de géis de gelana (GN) com ou sem caseinato de sódio (CN), seguido de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliado em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. A) Mistura dos biopolímeros realizada a 10°C. B) Mistura dos biopolímeros feita a 80°C. As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). NG - não formação de gel auto-sustentável.

Apesar da rigidez dos géis caseinato - gelana ter sido menor que as dos géis proteínas do soro - gelana, a elasticidade das amostras contendo caseinato e gelana 0,3% (m/m) foi significativamente maior que as formadas por proteínas do soro. Isso pode estar associado ao tamanho das moléculas em questão. Como o caseinato de sódio é muito menor que as proteínas do soro desnaturadas (CHEFTEL, 1996), a estrutura dos géis formados provavelmente é mais densa e, portanto a rede é mais elástica. Já os géis formados por gelana 0,1% (m/m), onde a rede é formada por interações predominantemente protéicas, as amostras com caseinato mostraram-se menos elásticas que as com proteínas do soro, confirmando a hipótese que a elasticidade dos géis caseinato - gelana está relacionada fundamentalmente às interações entre esta proteína e a gelana.

A Figura 26 apresenta a elasticidade de sistemas tripoliméricos gelana - proteínas do soro - caseinato. Seguindo a tendência da tensão na ruptura, o módulo elástico dos géis diminuiu com o aumento da concentração de WPC nos sistemas de gelana 0,3% (m/m) que, como comentado anteriormente, pode estar associado à incompatibilidade entre as proteínas do soro e a gelana. No entanto, nos sistemas com menor concentração de gelana (0,1% (m/m)), em que as interações proteína-proteína são mais relevantes, o aumento da quantidade de proteínas do soro aumentou a elasticidade dos géis.

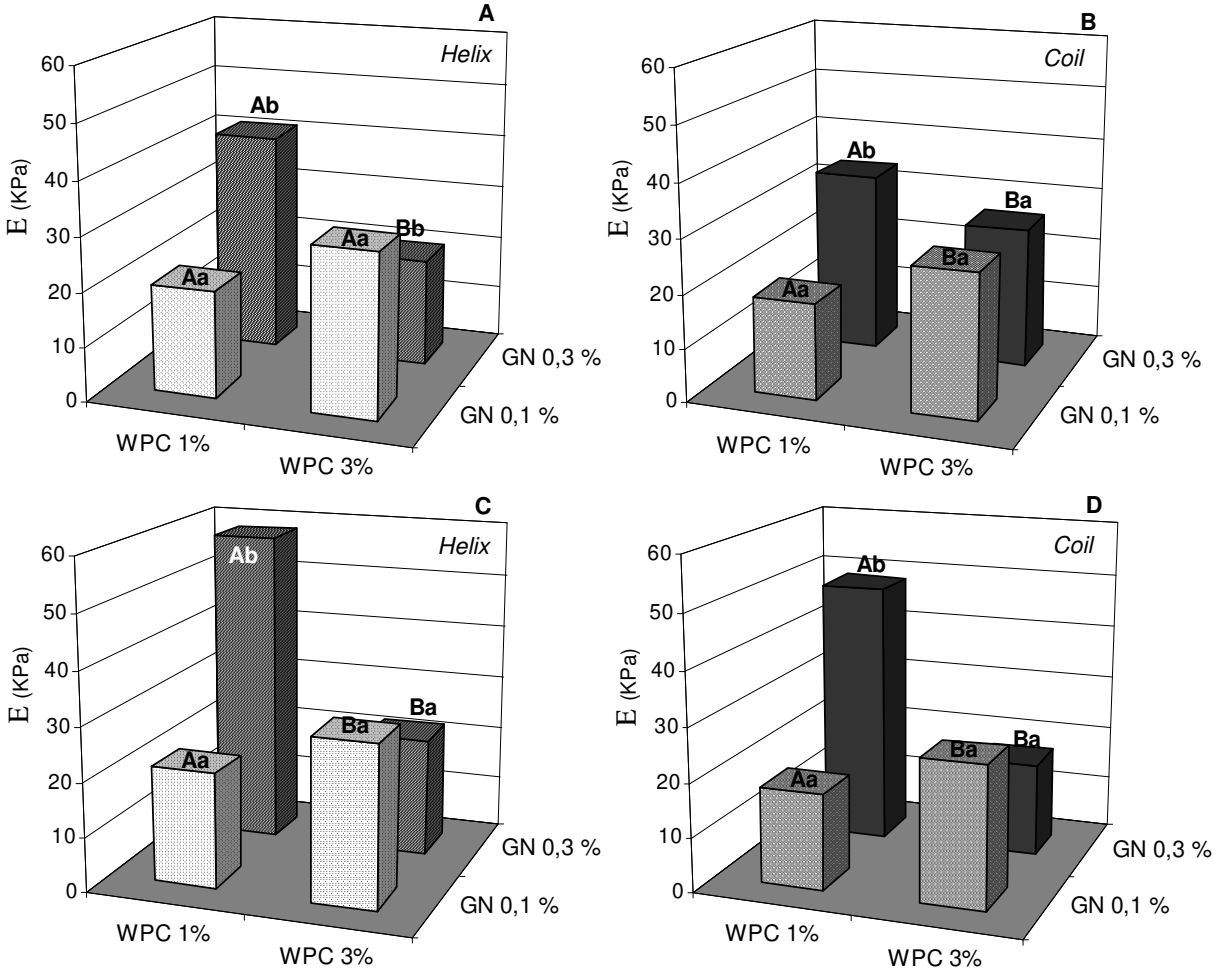


Figura 26. Módulo elástico de géis de caseinato de sódio, gelana (GN), e proteínas do soro (WPC), seguido de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliado em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis e a concentração de caseinato de sódio. A e B) Sistemas com caseinato de sódio 1% (m/m), C e D) Sistemas com caseinato de sódio 2% (m/m). As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$).

Em relação ao estado conformacional da gelana, menores valores de módulo elástico foram observados na conformação *Coil* da goma (Figuras 26 B e D). Os sistemas formados dessa maneira estão sujeitos à formação de agregados complexos entre as proteínas do soro e a gelana, que pode ter contribuído para a redução da elasticidade das amostras.

O aumento da concentração de caseinato aumentou de forma significativa a elasticidade apenas dos géis formados a frio e a quente por gelana 0,3 % (m/m) e WPC 1% (m/m). Nos outros casos, a incompatibilidade entre os polímeros e a formação de agregados complexos exerceram maior influência sobre a elasticidade dos sistemas e por isso, não foi observado aumento significativo do módulo elástico com o aumento da concentração de caseinato.

3.2. Capacidade de Retenção de Água (WHC)

A capacidade de retenção de água está intimamente relacionada à estrutura da rede dos géis e é uma característica que influencia fortemente a aceitação dos produtos pelos consumidores.

Os resultados obtidos para capacidade de retenção de água de géis compostos por proteínas do soro e gelana são apresentados na Figura 27. De maneira geral, os géis mostraram ótima capacidade de retenção de água (acima de 50%). As amostras com maior WHC foram as com maior concentração de gelana, visto que este polissacarídeo apresenta ótima capacidade de reter água mesmo a baixas concentrações (YAMAMOTO, 2006). No entanto, a retenção de água dos sistemas diminuiu significativamente na presença de proteínas do soro em relação às amostras de gelana pura (Figura 27). Ao serem adicionadas à gelana, as proteínas do soro podem induzir à formação de uma estrutura menos apta à retenção de água, como também podem interagir com os sítios

ativos da gelana impedindo a ligação da água que ficaria livre no sistema. Entretanto, ao se aumentar a concentração de WPC, a capacidade de retenção de água foi favorecida. As proteínas do soro também possuem elevada capacidade de reter água, mesmo quando desnaturadas (PICONE *et al.*, 2005, CAVALLIERI *et al.,* 2007), o que pode explicar o aumento de capacidade de retenção de água dos géis com o aumento da concentração de WPC, tanto para os sistemas *Coil*, quanto para os formados por gelana em estado *Helix* (Figuras 27 A e B).

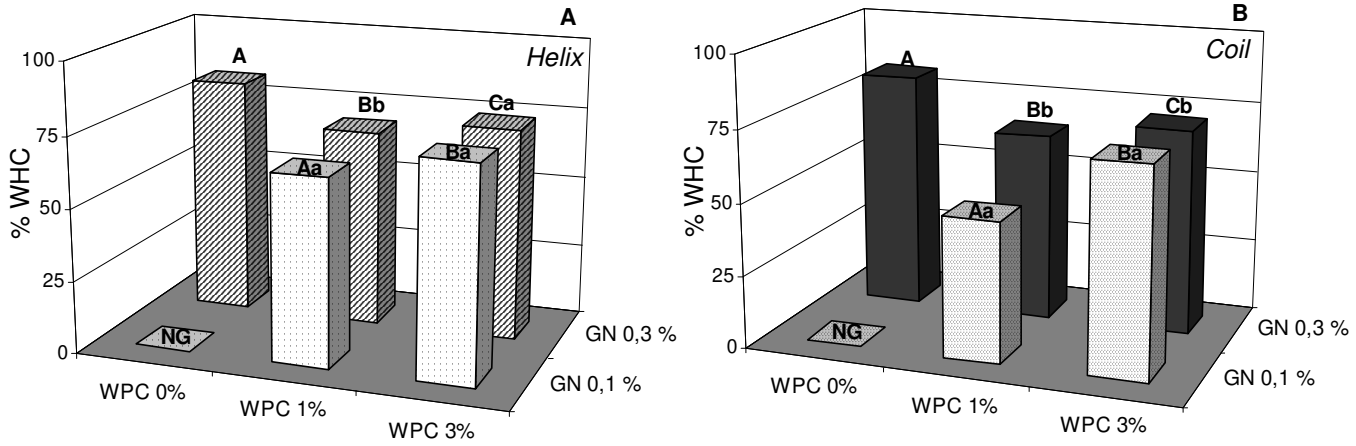


Figura 27. Capacidade de retenção de água expressa em quantidade de água retida em relação à quantidade de água total do gel de sistemas de gelana (GN) com ou sem proteínas do soro de leite (WPC), seguida de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliada em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. A) Mistura dos biopolímeros realizada a 10°C. B) Mistura dos biopolímeros feita a 80°C. As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). NG - não formação de gel auto-sustentável.

O estado conformacional da gelana influenciou de forma significativa apenas algumas amostras (1% (m/m) de WPC, 0,1% (m/m) de gelana e 3% (m/m) de WPC, 0,3% (m/m) de gelana) sendo que em geral, a mistura dos polímeros a quente reduziu a capacidade de reter água dos sistemas. Aparentemente, o fenômeno de incompatibilidade entre o WPC e a gelana não interferiu na capacidade de reter água dos sistemas, apesar de influenciar as propriedades mecânicas dos mesmos. No entanto, a formação de agregados complexos eletrostáticos levou a uma pequena diminuição da capacidade de

retenção de água, uma vez que reduziu o número de sítios capazes de formar pontes de hidrogênio com a água.

Em sistemas caseinato de sódio – gelana (Figura 28), o aumento da concentração de proteína exerceu efeitos diferentes sobre a WHC das amostras de acordo com a concentração de gelana independentemente do seu estado conformacional. Para as amostras com gelana 0,3% (m/m) o aumento da concentração de caseinato reduziu a WHC dos sistemas, enquanto que nos sistemas com gelana 0,1 % (m/m) a capacidade de retenção de água foi favorecida independentemente do estado conformacional da goma. No primeiro caso, a grande quantidade de interações entre o caseinato e a gelana pode ter exercido um efeito de exclusão da água da rede. Na segunda situação, como a concentração de caseinato é muito superior à da gelana, as interações proteína - água acabaram sendo favorecidas. Braga (2006) também observou um aumento de WHC de 10 para 50% ao se aumentar a concentração de caseinato de 2 para 6% (m/v) em sistemas de caseinato de sódio acidificados com GDL.

Assim como nos sistemas de WPC - gelana, as maiores capacidades de retenção de água foram observadas nos sistemas puros de gelana. A adição de proteínas reduziu a característica natural da gelana de ser um bom agente retentor de água devido à diminuição dos sítios hidrofílicos que, provavelmente, se ligaram à proteína ao invés da água. Isto é corroborado pelo fato de que a adição de gelana em estado *Coil* aos sistemas (Figura 28 B) reduziu de forma significativa a capacidade de retenção de água destes em relação aos formados por gelana *Helix* (Figura 28 A) devido ao favorecimento das interações eletrostáticas entre os biopolímeros nestas condições.

Todos os géis de caseinato - gelana estudados (Figura 28) se mostraram menos capazes de reter água que os formados com proteínas do soro (Figura 27). Enquanto o aumento da concentração de proteínas do soro aumentou a WHC dos géis

independentemente da concentração de gelana, a concentração de caseinato só contribuiu para aumentar a capacidade de retenção de água dos géis com menor concentração de gelana. Nos géis com 0,1% (m/m) de gelana houve uma queda drástica da WHC ao se substituir as proteínas do soro pelo caseinato de sódio nas concentrações estudadas.

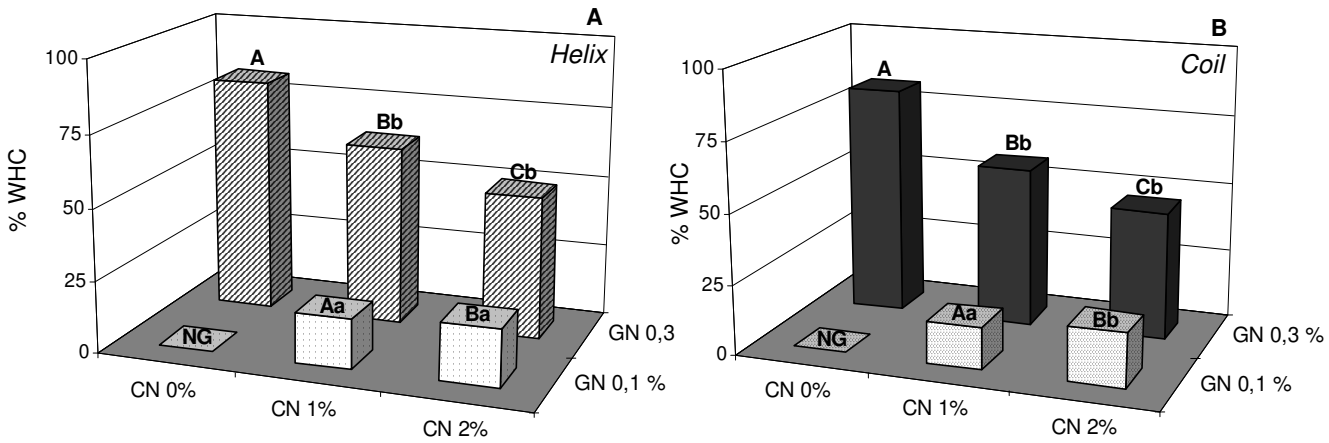


Figura 28. Capacidade de retenção de água expressa em quantidade de água retida em relação à quantidade de água total do gel de sistemas de gelana (GN) com ou sem caseinato de sódio (CN), seguidos de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliados em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. A) Mistura dos biopolímeros realizada a 10°C. B) Mistura dos biopolímeros feita a 80°C. As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo y, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). NG - não formação de gel auto-sustentável.

Nos sistemas tripoliméricos (Figura 29) a presença de mais de uma proteína contribuiu positivamente para a retenção de água, sendo os valores de WHC maiores para os sistemas tripoliméricos que para os bipoliméricos. Os géis com maior concentração de gelana (0,3% (m/m)) tiveram um significativo aumento da capacidade de reter água para todas as concentrações de proteínas, exceto pelas amostras com 2% (m/m) de caseinato e 3% (m/m) de WPC, cuja capacidade de reter água mostrou-se independente estatisticamente da quantidade de gelana. Para todos os sistemas tanto o aumento da concentração de caseinato, como o aumento da concentração de proteínas do soro influenciaram positivamente a WHC das amostras.

O estado conformacional da goma também exerceu efeito significativo nessa propriedade para apenas alguns sistemas. Os géis formados por gelana 0,1% (m/m) e caseinato 2% (m/m) e diferentes concentrações de WPC, assim como os géis com gelana 0,3% (m/m), caseinato 1% (m/m) e 3% (m/m) de proteínas do soro apresentaram aumento significativo da capacidade de reter água quando a gelana foi adicionada em estado *Coil* (Figuras 29 B e D). Estes resultados apontam para uma possível interação hidrofóbica entre as proteínas do soro e o caseinato, favorecida a altas temperaturas (Dickinson, 1998), diminuindo o número de ligações eletrostáticas entre a gelana e as proteínas do soro. Com isso, a gelana que é altamente hidrofílica fica com maior número de sítios ativos disponíveis para se ligar com a água. Isso se confirma pelo fato de que os sistemas contendo a maior quantidade de polímeros (0,3% (m/m) de gelana, 3% (m/m) de WPC e 2% (m/m) de caseinato) tiveram maior capacidade de retenção de água que os géis de gelana pura. Tais resultados mostram que é necessário o estudo de sistemas modelo mais complexos para o entendimento das interações que ocorrem em alimentos, pois de acordo com o estudo de sistemas caseinato – gelana, esta proteína desfavorece a retenção de água, o que não foi observado nos sistemas tripoliméricos.

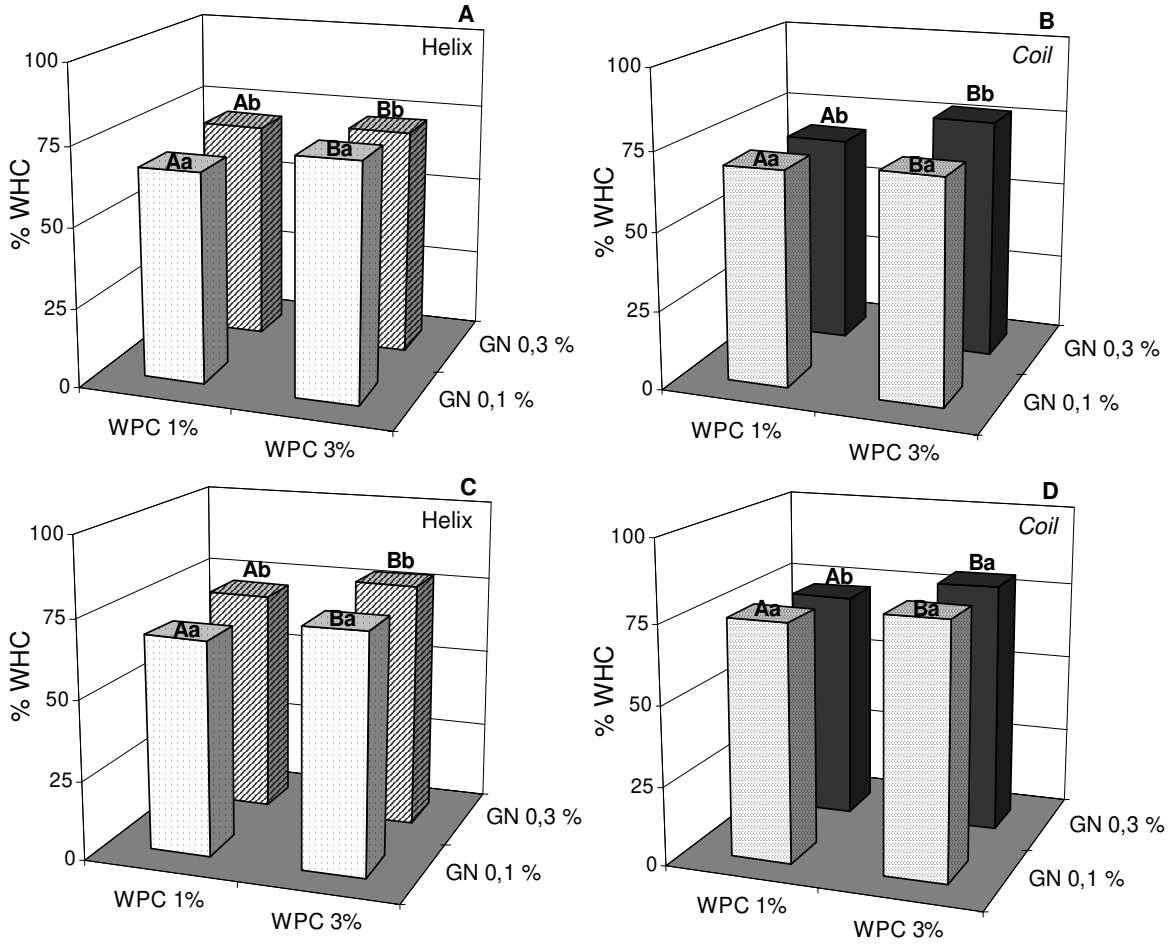


Figura 29. Capacidade de retenção de água (WHC) expressa em quantidade de água retida em relação à quantidade de água total de géis de caseinato de sódio, gelana (GN), e proteínas do soro (WPC), seguidos de suas respectivas concentrações (m/m), avaliados em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis e a concentração de caseinato de sódio. A e B) Sistemas com caseinato de sódio 1% (m/m), C e D) Sistemas com caseinato de sódio 2% (m/m). As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo y, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$).

3.3. Sinerese

A sinerese corresponde à liberação espontânea de água na ausência de forças externas e pode ser um fator determinante na vida de prateleira de alguns produtos. Tendências bem distintas foram observadas para sinerese em relação à capacidade de retenção de água dos sistemas estudados.

Nas amostras compostas por gelana e proteínas do soro (Figura 30), os géis que apresentaram menor perda de água foram os com maior concentração de biopolímeros. Assim como observado nos ensaios de WHC (Figura 27), a incorporação de pequena quantidade de proteínas do soro aos sistemas puros de gelana aumentou a perda de água dos mesmos, que só foi de fato significativa nos géis formados por gelana em estado *Coil* (Figura 30 B). No entanto, ao se aumentar a concentração protéica para 3% (m/m) a exsudação de água diminuiu drasticamente, independentemente da concentração e do estado conformacional da goma. Esta diferença foi menos pronunciada nos resultados de WHC, pois nesta análise a aplicação de forças externas provavelmente promoveu melhor e mais homogênea remoção de água, enquanto nos ensaios de sinerese, a força gravitacional não foi tão eficaz.

Não foram observadas diferenças estatísticas de sinerese para as amostras com WPC 3% (m/m) e diferentes concentrações de gelana. Porém, para as amostras com 1% (m/m) de proteínas do soro a gelana exerceu papel fundamental na retenção de água dos sistemas, visto que quantidade de água exsudada foi maior para as amostras com menor quantidade do polissacarídeo. A mistura dos polímeros a quente ou a frio, não afetou de forma significativa a sinerese dos géis avaliados, apesar de aparentemente haver uma leve tendência dos sistemas em *Helix* reterem mais água (Figura 30 B), assim como observado para WHC.

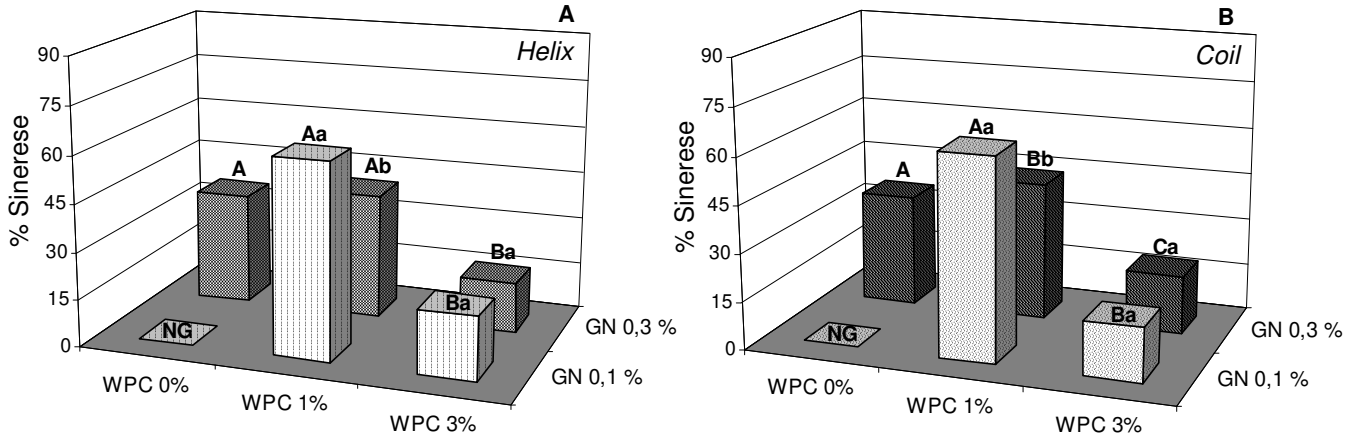


Figura 30. Valores de porcentagem de sinerese expressos em quantidade de água liberada em relação à quantidade de água total do gel de sistemas de gelana (GN) com ou sem proteínas do soro de leite (WPC), seguidos de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliados em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. A) Mistura dos biopolímeros realizada a 10°C. B) Mistura dos biopolímeros feita a 80°C. As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). NG - não formação de gel auto-sustentável.

Nas amostras compostas por caseinato e gelana o estado conformacional do polissacarídeo também não afetou de forma significativa a sinerese dos sistemas, como mostra a Figura 31. Porém, a concentração de gelana exerceu influência comprovada estatisticamente em todos os sistemas. Maiores concentrações da goma contribuíram para a redução da sinerese dos géis, independentemente da concentração de proteína.

A concentração de caseinato só exerceu influência significativa na sinerese dos sistemas quando a concentração de gelana era de 0,1% (m/m). Neste caso, o caseinato contribuiu significativamente para o aumento da retenção de água, sendo a sinerese menor nos sistemas com maior concentração protéica, como observado para o ensaio de WHC. No entanto, a 0,3% (m/m) de gelana o aumento da concentração de proteína não levou a alterações no valor de sinerese. A diferença entre os resultados de WHC e sinerese pode indicar a existência de uma estrutura com poros de tamanhos variados e com diferentes capacidades de reter água via forças capilares. Apesar da contribuição positiva do caseinato nesses sistemas, a quantidade de água exsudada dos géis de

gelana 0,1% (m/m) e caseinato de sódio foi muito maior que as dos sistemas compostos por proteínas de soro e gelana 0,1% (m/m), mostrando que esta proteína é menos hidrofílica ou ainda que o montante de interações caseinato – gelana foi maior que o de WPC - gelana.

Pela análise estatística dos resultados, nenhuma amostra adicionada de caseinato apresentou menor sinerese que os géis puros de gelana 0,3% (m/m). Esse resultado, aliado ao aumento dos valores de tensão de ruptura observado para os sistemas caseinato - gelana (Figura 19) sugere que a adição desta proteína contribuiu para o aumento do número de ligações nos géis formando uma estrutura menos apta a reter água.

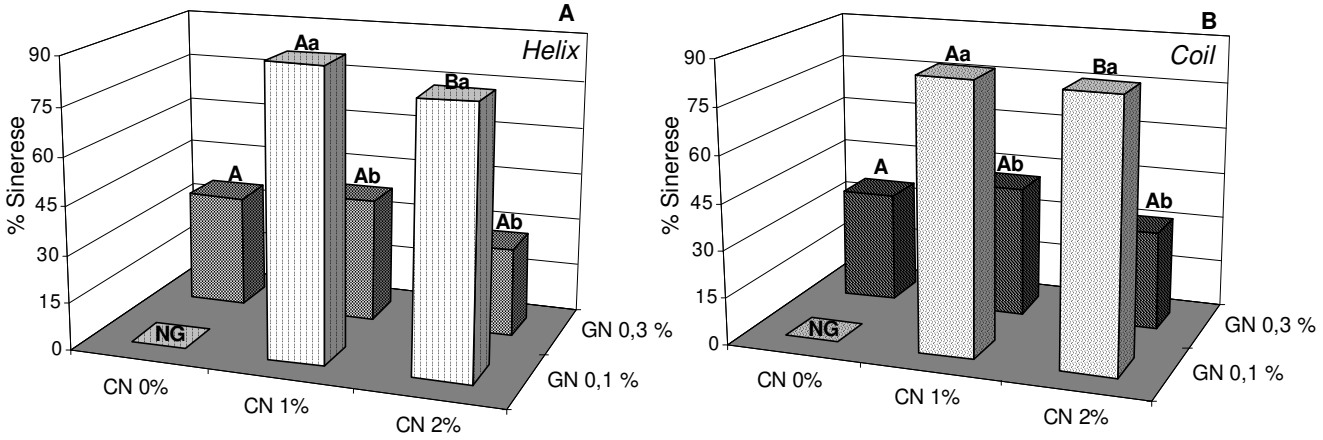


Figura 31. Valores de porcentagem de sinerese expressos em quantidade de água liberada em relação à quantidade de água total do gel de sistemas de gelana (GN) com ou sem caseinato de sódio (CN), seguidos de suas respectivas concentrações (%m/m), avaliados em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis. A) Mistura dos biopolímeros realizada a 10°C. B) Mistura dos biopolímeros feita a 80°C. As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). NG - não formação de gel auto-sustentável.

Nos sistemas tripoliméricos (Figura 32), a sinerese foi sensivelmente menor que nos formados pela gelana e apenas uma proteína (Figuras 30 e 31). Resultado similar foi observado para WHC, mas no caso da sinerese esta diferença foi muito mais pronunciada.

O aumento da concentração de proteínas diminuiu a sinerese de todos os sistemas. Essa redução foi mais intensa com o aumento da concentração de WPC de 1 para 3% (m/m), embora o aumento da concentração de caseinato também tenha resultado em aumento da quantidade de água retida (Figuras 32 A, B, C e D). O estado conformacional da gelana só interferiu na sinerese das amostras com gelana 0,1% (m/m), WPC 1% (m/m) e caseinato 1% (m/m). Neste caso, a adição do polissacarídeo em estado *Coil* diminuiu a sinerese dos géis, o que pode ser explicado pelas interações proteínas do soro – caseinato como observado para WHC.

A amostra que exsudou menos água espontaneamente foi formada nas maiores concentrações de proteínas e na menor concentração de gelana 0,1% (m/m) em estado *Helix*. Já o maior valor de sinerese foi observado para os géis com menores concentrações de proteínas e menor concentração do polissacarídeo também em estado *Helix*, assim como observado nos resultados de WHC.

De um modo geral, os resultados de sinerese seguem as mesmas tendências dos de WHC. No entanto, como o ensaio de sinerese expõe a água que está mais fracamente ligada, ele é menos conclusivo devido à sua menor sensibilidade. Assim, o ensaio de WHC é uma ferramenta que permite inferir mais sobre as interações poliméricas dos sistemas, enquanto que a sinerese, apenas as interações com a água.

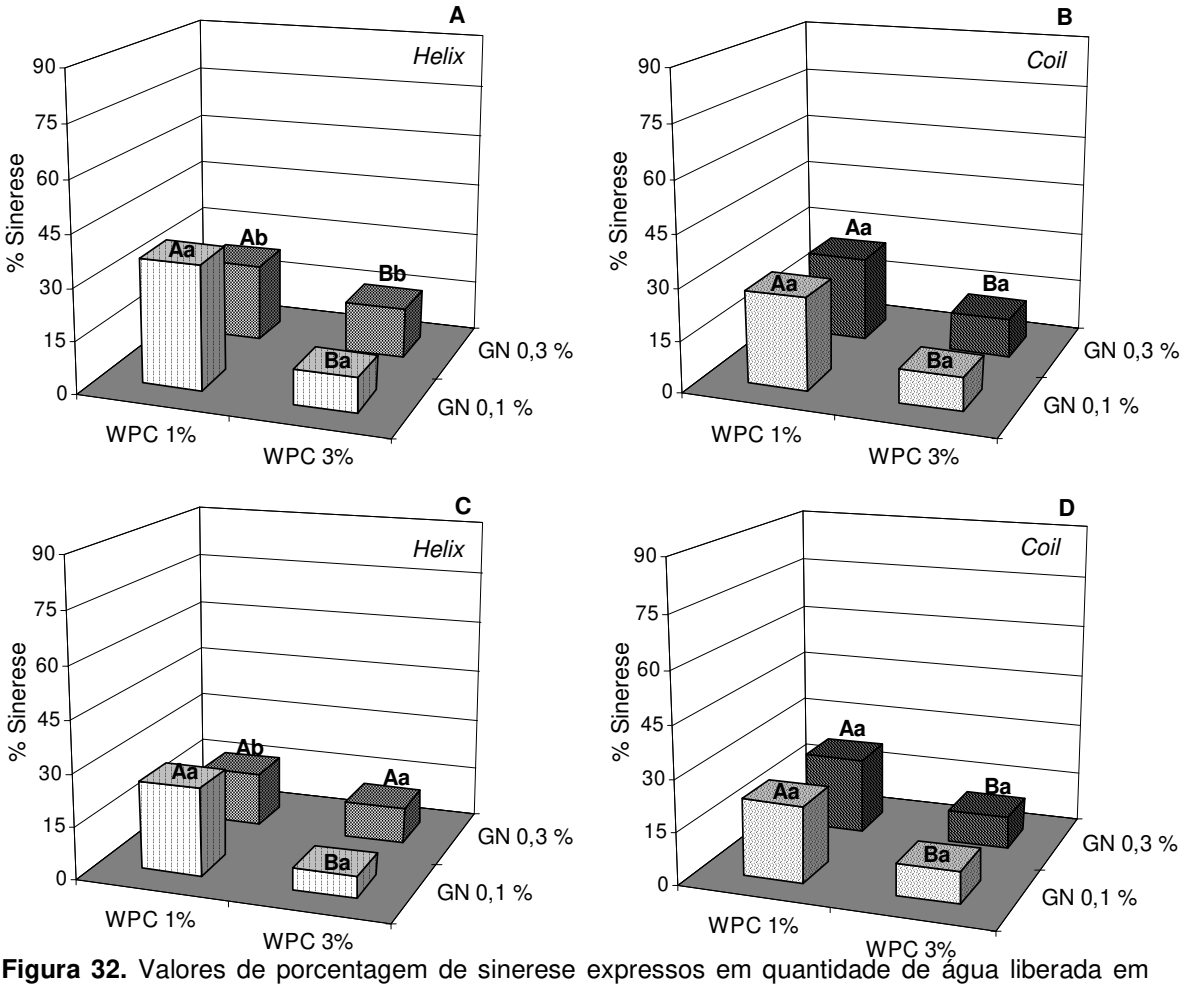


Figura 32. Valores de porcentagem de sinerese expressos em quantidade de água liberada em relação à quantidade de água total do gel de sistemas de caseinato de sódio, gelana (GN), e proteínas do soro (WPC), seguidos de suas respectivas concentrações (m/m), avaliados em relação ao estado conformacional da gelana durante o preparo dos géis e a concentração de caseinato de sódio. A e B) Sistemas com caseinato de sódio 1% (m/m), C e D) Sistemas com caseinato de sódio 2% (m/m). As médias (ABC) no eixo x, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si. As médias (ab) no eixo z, quando não acompanhadas das mesmas letras, são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$).

3.4. Solubilidade em água

A solubilidade protéica pode fornecer informações interessantes sobre os tipos de interações presentes nos sistemas.

Devido às pequenas diferenças entre as propriedades mecânicas e de retenção de água das amostras formadas em estado *Coil* e *Helix*, apenas alguns sistemas na

conformação *Coil* foram escolhidos para a análise de solubilidade. As Tabelas 9 e 10 apresentam os resultados obtidos.

Tabela 9. Porcentagem de proteínas solúveis de amostras de proteínas do soro (WPC), caseinato de sódio (CN) e gelana (GN) em estado *Coil* e *Helix* em pH 4,0. As médias (ABC) na Tabela 9, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05). As médias (ab) entre as Tabelas 9 e 10, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05)

		pH 4,0					
		Estado ordenado (Helix)			*Estado desordenado (Coil)*		
WPC %(m/m)	*GN %(m/m)*	*CN 0% (m/m)*	*CN 1% (m/m)*	*CN 2% (m/m)*	*CN 0% (m/m)*	*CN 1% (m/m)*	*CN 2% (m/m)*
0	*0,1*	-	-	$0,052^{Ga}$	-	-	-
	0,3	-	$0,023^{Da}$	$0,021^{Ha}$	-	-	$0,023^{Ha}$
1	*0,1*	-	-	-	-	-	-
	0,3	$0,011^{Aa}$	-	$0,061^{Ia}$	-	-	$0,066^{Ia}$
3	*0,1*	$0,175^{Ba}$	-	$0,625^{Ja}$	-	-	-
	0,3	$0,042^{Ca}$	$0,135^{Fa}$	$0,368^{Ka}$	$0,055^{La}$	-	$0,369^{Ka}$

Tabela 10. Porcentagem de proteínas solúveis de amostras de proteínas do soro (WPC), caseinato de sódio (CN) e gelana (GN) em estado *Coil* e *Helix* em pH 7,0. As médias (ABC) na Tabela 10, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05). As médias (ab) entre as Tabelas 9 e 10, quando não seguidas da mesma letra, são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05)

		pH 7,0					
		Estado ordenado (Helix)			*Estado desordenado (Coil)*		
WPC %(m/m)	*GN %(m/m)*	*CN 0% (m/m)*	*CN 1% (m/m)*	*CN 2% (m/m)*	*CN 0% (m/m)*	*CN 1% (m/m)*	*CN 2% (m/m)*
0	*0,1*	-	-	$0,040^{Gb}$	-	-	-
	0,3	-	$0,009^{Db}$	$0,018^{Ha}$	-	-	$0,022^{Ha}$
1	*0,1*	-	-	-	-	-	-
	0,3	$0,024^{Ab}$	-	$0,093^{Ia}$	-	-	$0,022^{Ia}$
3	*0,1*	$0,224^{Bb}$	-	$0,489^{Jb}$	-	-	-
	0,3	$0,041^{Ca}$	$0,112^{Fb}$	$0,323^{Ka}$	$0,047^{Lb}$	-	$0,347^{Ka}$

Nas amostras CN0%WHC3%GN0,1% e CN0%WHC1%GN0,3%, o aumento da concentração de gelana de 0,1 para 0,3% (m/m) e a redução da quantidade de proteínas do soro diminuiu drasticamente a solubilidade dos sistemas para ambos os valores de pH (Tabelas 9 e 10). Esta redução de uma amostra para outra certamente está relacionada à

diminuição da quantidade de proteínas do soro, que são bastante solúveis, na composição das amostras. Braga (2006) também observou uma redução da solubilidade protéica em água em pH 8,0 com a diminuição da concentração de proteínas em amostras compostas por caseinato de sódio 4 e 6% (m/v), o que supostamente estaria relacionada a diminuição do conteúdo protéico total das amostras. No entanto, no presente trabalho também é observada uma queda de solubilidade da amostra CN0%WHC3%GN0,1% para a amostra CN0%WHC3%GN0,3%, que possui a mesma concentração protéica. Isto sugere que a queda da porcentagem de proteínas solúveis pode estar relacionada não somente à concentração protéica inicial das amostras, mas também às interações proteína - gelana. Aparentemente, quanto maior a concentração de gelana, maior o número de interações entre os biopolímeros e menor a quantidade de proteína que permanece solúvel nos sistemas. Ainda nas duas primeiras amostras citadas, é observado um aumento da solubilidade significativo em tampão 7,0 (Tabela 10) em relação ao tampão 4,0 (Tabela 9), porém para a amostra CN0%WHC3%GN0,3%, não houve diferença de solubilidade entre os dois tampões. Isso indica que mais interações eletrostáticas foram estabelecidas quando as concentrações de biopolímeros foram menores, ou seja, indicaria uma provável incompatibilidade a altas concentrações de macromoléculas. Assim nas amostras com maior concentração de gelana e proteínas (CN0%WHC3%GN0,3%) a quantidade total de interações eletrostáticas estabelecidas é reduzida em função do efeito de exclusão de volume.

A amostra CN0%WHC3%GN0,3% foi a única em que o estado conformacional da gelana afetou de forma significativa a quantidade de interações eletrostáticas estabelecidas (Tabelas 9 e 10). A adição de gelana em estado *Coil* aos sistemas aumentou igualmente a quantidade de proteínas solúveis em ambos os solventes, o que significaria que menor quantidade de proteínas participou de forma ativa da estrutura de

rede do gel. Isso contradiria a hipótese de formação dos complexos eletrostáticos entre as proteínas do soro e a gelana, pois teoricamente a formação destes diminuiria a proporção de proteínas solúveis nos sistemas. No entanto, as diferenças são muito pequenas e a adição de um agente dissociante de interações eletrostáticas poderia contribuir para um melhor entendimento destes sistemas.

Os sistemas compostos por caseinato 1% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) em pH 4,0 apresentaram maior quantidade de proteínas solúveis que os formados por proteínas do soro nas mesmas concentrações, o que poderia ser atribuído a uma maior distância do ponto isoelétrico da caseína ($pI_{caseína}$ = 4,6, $pI_{\alpha La}$= 4,2) em relação ao pH avaliado. Cavallieri (2007) também observou diferentes graus de solubilização protéica de amostras de proteínas do soro em água de acordo com o pH do tampão água. Maior solubilização foi obtida em valores de pH distantes do ponto isoelétrico das proteínas, enquanto em valores de pH próximos ao pI das proteínas (4,2- 4,9) a solubilidade foi significativamente menor. No entanto, na maioria dos sistemas contendo caseinato do sódio menor quantidade de proteínas foi solubilizada em pH 7,0 que em pH 4,0, o que pode estar relacionado a uma possível reorganização molecular do caseinato e a formação de complexos insolúveis em altos valores de pH.

Observa-se nas Tabelas 9 e 10 que os maiores valores de solubilidade protéica foram obtidos nos sistemas com maior concentração de biopolímeros (CN2%WHC3%GN0,1% e CN2%WHC3%GN0,3%), devido ao maior número de sítios hidrofílicos para ligar-se à água.

A amostra CN1%WHC3%GN0,3% apresentou uma solubilidade muito maior que as amostras bipoliméricas CN0%WHC%3GN0,3% e CN1%WHC0%GN0,3%, provavelmente devido a maior quantidade total de proteínas nos sistemas. Além disso, observa-se que a redução da quantidade de gelana de 0,3% (m/m) nos sistemas

CN2%WHC0%GN0,3% e CN2%WHC3%GN0,3% para 0,1% (m/m) nos sistemas CN2%WHC0%GN0,1% e CN2%WHC3%GN0,1%, aumentou a quantidade de proteínas solúveis detectadas, pois provavelmente a quantidade de interações entre a gelana e as proteínas foi limitada, restando mais moléculas livres para ligar-se à água. Já para a concentração de gelana de 0,3% (m/m), o aumento da quantidade de caseinato (amostras CN1%WHC0%GN0,3% e CN2%WHC0%GN0,3%) não afetou de forma significativa a solubilidade protéica dos géis.

A adição de 3% (m/m) de proteínas do soro às amostras CN2%WHC0%GN0,1% aumentou consideravelmente a quantidade de proteínas solúveis, pois provavelmente a gelana estabeleceu interações preferenciais com o caseinato, excluindo as proteínas do soro da estrutura, como sugerido anteriormente no estudo das propriedades mecânicas. No entanto, ao se aumentar a quantidade de gelana (amostra CN2%WHC3%GN0,3%), maior número de zonas de junções ficam disponíveis no sistema e as proteínas do soro conseguem participar da formação da estrutura.

3.5. Microestrutura

Os resultados de WHC, sinerese e propriedades mecânicas são melhor compreendidos ao se analisar a estrutura dos géis, a qual foi observada por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 33 apresenta as estruturas de géis com diferentes concentrações de WPC e gelana, além das diferentes conformações do polissacarídeo.

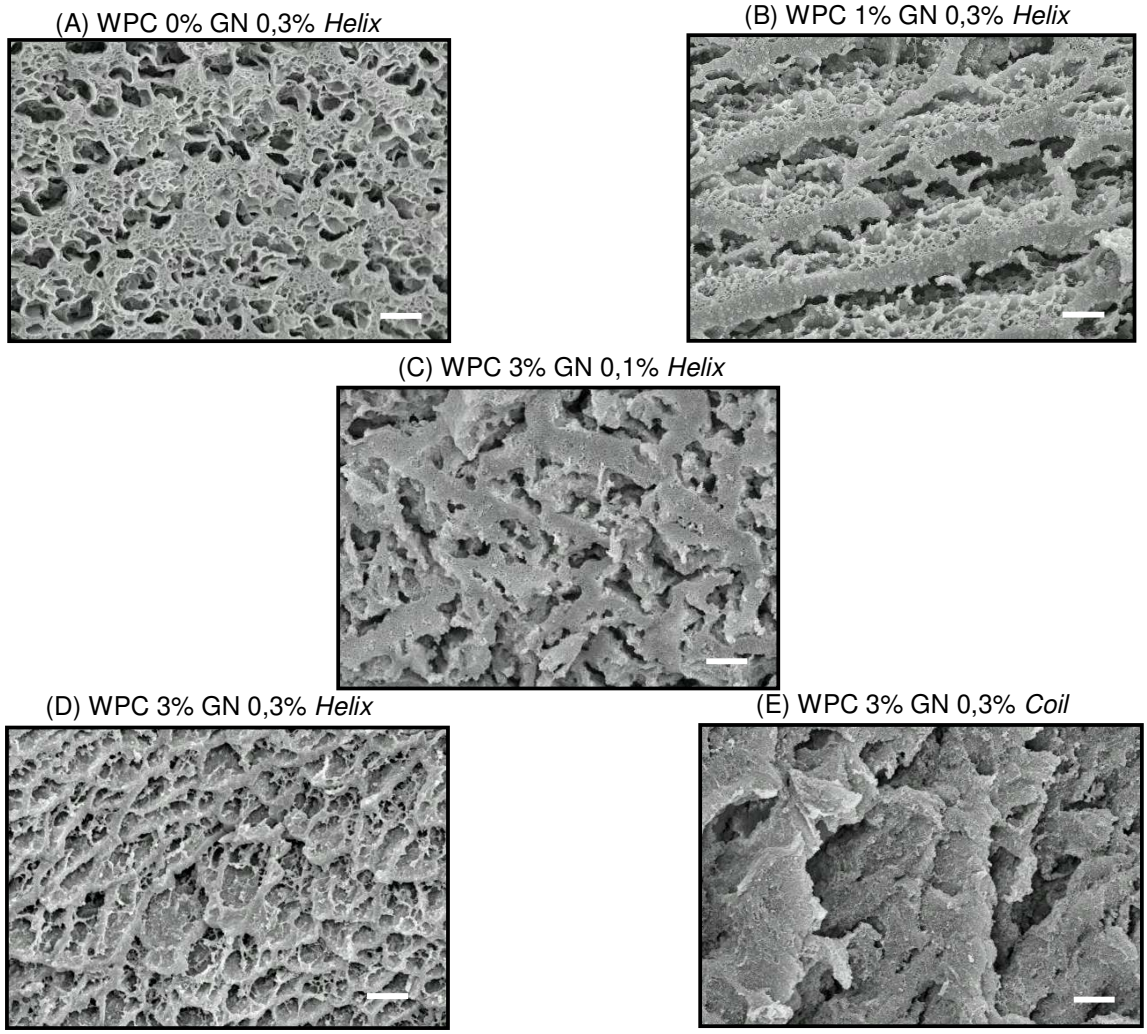


Figura 33. Micrografias SEM de géis de proteínas do soro (WPC) de leite e gelana (GN). A) WPC 0% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) *helix,* B) WPC 1% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) *helix,* C) WPC 3% (m/m) e gelana 0,1% (m/m) *helix,* D) WPC 3%(m/m) e gelana 0,1% (m/m) *helix,* E) WPC 3% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) c*oil*. A barra de escala corresponde a 10μm.

Nas amostras de gelana pura (Figura 33 A) a rede formada é bastante porosa e homogênea, o que a confere aspecto esponjoso. São observados poros muito pequenos e outros de dimensões maiores, que se distribuem homogeneamente pela estrutura. Essa variação de tamanho dos poros provavelmente contribui com a alta capacidade de retenção de água desses géis e menor sinerese destes quando comparados às amostras compostas por 0,1% (m/m) de WPC e 0,3% (m/m) de gelana (Figura 33 B). Normalmente, poros menores estão relacionados à boa capacidade de retenção de água dos géis

quando submetidos a forças externas, pois são mais aptos a reter água por forças capilares, enquanto os poros maiores contribuem para o aumento da sinerese (ZEIGLER & FOEGEDING, 1990). Mao e colaboradores (2001) observaram uma estrutura de rede bem semelhante em micrografias de géis de gelana adicionados de cálcio, assim como diferentes comportamentos entre a sinerese e a WHC dos géis. A partir de ensaios reológicos realizados com diferentes concentrações de cálcio, eles sugerem que os poros maiores seriam responsáveis pela deformabilidade da estrutura quando submetida a forças externas e os poros menores à força da rede do gel. No presente estudo, apesar da micrografia da amostra de gelana pura 0,3% (m/m) mostrar uma estrutura bem interligada, a grande quantidade de poros observada reduz a continuidade da rede e confere baixa elasticidade e rigidez à estrutura quando comparadas às amostras com proteínas do soro.

A adição de uma pequena quantidade de proteínas de soro às amostras de gelana pura (Figura 33 B) levou à formação de uma estrutura mais compacta, com filamentos lisos e alongados, de aspecto similar aos formados por proteínas do soro, interligados por uma rede mais ramificada, provavelmente de gelana. A maior compactação da rede provavelmente foi responsável pelos maiores valores de tensão de ruptura e menor capacidade de retenção de água observados para essa amostra em relação à amostra pura de gelana. Além disso, o aumento de continuidade da rede formada com proteínas pode estar relacionado à maior elasticidade dessa rede quando comparada à amostra composta apenas por gelana.

Ao se aumentar a concentração de WPC de 1% (m/m) para 3% (m/m) (Figuras 33 B e D), observa-se que a estrutura da rede se torna bem mais compacta e entrelaçada e o número de ramificações aumenta consideravelmente. Devido à grande quantidade de polímeros no sistema, observa-se a formação de duas redes. A primeira rede possui

aspecto ramificado, similar à rede formada pela gelana, e se sobrepõe a uma segunda estrutura, aparentemente mais contínua e lisa, provavelmente formada predominantemente pelas proteínas do soro. Essa estrutura formada por duas redes estaria associada à incompatibilidade entre os biopolímeros sugerida nos ensaios de propriedades mecânicas, levando à diminuição da rigidez e deformabilidade desses géis (Figuras 17A e 21A) quando comparados às amostras com menor quantidade de proteína. Como a estrutura formada com maior concentração protéica possui poros menores, ela apresentou melhor capacidade de retenção de água que a amostra formada por 1% (m/m) de WPC e 0,3% (m/m) de gelana (Figura 27 A). A presença de grandes poros na rede do gel inibe a capacidade de imobilizar solvente via forças capilares (ZEIGLER & FOEGEDING, 1990). Vardhanabhuti e colaboradores (2000) também observaram uma tendência de diminuição do tamanho dos poros da rede do gel com o aumento da concentração de proteínas do soro que esteve acompanhado de mudanças na turbidimetria do gel e capacidade de retenção de água. O aumento da ramificação da rede também pode estar relacionado à maior elasticidade da estrutura e menor deformabilidade observadas ao se aumentar a concentração de proteínas dos sistemas (Figuras 24A e 21A).

A diminuição da concentração de gelana de 0,3 para 0,1% (m/m) mantendo-se a concentração de WPC fixa em 3% (m/m) (Figuras 33 D e C) decresceu o número de ramificações e a estrutura formada parece ser mais lisa e filamentosa, refletindo os resultados obtidos de propriedades mecânicas em que também foi observado um enfraquecimento da rede do gel seguido de aumento da deformabilidade (Figuras 17A e 21A). No entanto, essas alterações estruturais não afetaram significativamente a capacidade de retenção de água e sinerese dos géis (Figuras 27A e 39A), sugerindo que

nessas concentrações, as proteínas do soro possuíram o papel mais relevante na retenção de água da rede.

A Figura 33 E apresenta a estrutura obtida pela adição de gelana em estado *Coil* às amostras com 3% (m/m) de proteínas do soro. Neste caso, a formação de agregados complexos entre a proteína e o polissacarídeo foi intensamente favorecida e a estrutura obtida foi muito diferente da formada por gelana em estado *Helix* (Figura 33 D). Nas amostras em estado *Coil* a estrutura foi composta por uma única rede sem ramificações e com poros maiores, ao contrário das formadas em estado *Helix*. Isso indica que as interações entre os biopolímeros são realmente favorecidas e a formação de uma única rede se deve à complexação das proteínas com as duplas-hélices das moléculas de gelana através de ligações eletrostáticas, confirmadas no ensaio de solubilidade (Tabela 9 e 10). Essa rede tende a ser ligeiramente mais rígida, deformável e menos elástica que a formada em estado *Helix*. Já a capacidade de retenção de água diminuiu de forma significativa, provavelmente devido ao aumento do tamanho dos poros (Figuras 27A e B).

A Figura 34 mostra as micrografias das amostras compostas por caseinato de sódio e gelana. O gel de gelana pura é novamente apresentado para facilitar a comparação das estruturas (Figura 34 A). De forma geral, as estruturas observadas nos géis de caseinato de sódio e gelana diferem fortemente das observadas para os sistemas proteínas do soro - gelana. As amostras com caseinato apresentam uma rede muito mais compacta, com pouquíssimos poros e muito mais homogênea que reflete sua menor rigidez, menor deformabilidade, porém maior elasticidade que a rede formada por proteínas do soro (Figura 33).

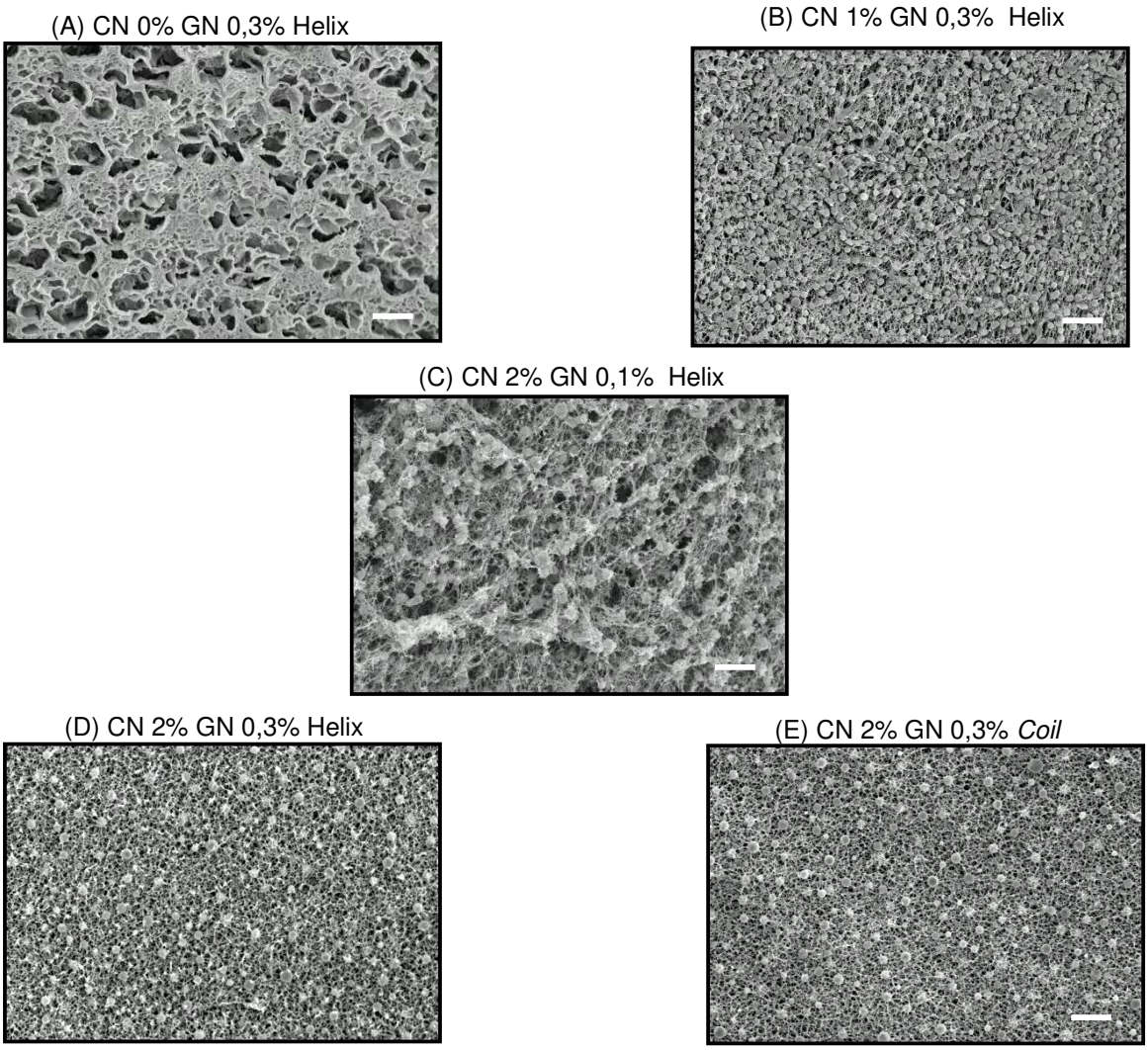


Figura 34. Micrografias SEM de géis de caseinato de sódio (CN) e gelana (GN). A) CN 0% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) *helix*, B) CN 1% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) *helix*, C) CN 2% (m/m) e gelana 0,1% (m/m) *helix*, D) CN 2%(m/m) e gelana 0,1% (m/m) *helix,* E) CN 2% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) *coil*. A barra de escala corresponde a 10μm.

Além disso, as micrografias mostram que os géis de gelana com caseinato também apresentam uma microestrutura muito diferente dos de gelana pura. Como dito anteriormente, a estrutura do gel de gelana pura possui aspecto esponjoso e poroso, enquanto que os géis com caseinato de sódio apresentam uma estrutura bem mais compacta que confere mais rigidez, elasticidade e menor deformabilidade à rede destes géis (Figuras 34 A, B, C, D e E).

Nas micrografias das amostras com caseinato são observadas pequenas esferas entrelaçadas por uma rede ramificada e compacta. A primeira vista, as esferas se assemelham a submicelas de caseinato de sódio, porém observa-se que a quantidade de esferas independe da concentração dessa proteína e sim da concentração de gelana (Figuras 34 B, C, D e E). Tendo em vista que a maioria das proteínas forma coacervados complexos com polissacarídeos aniônicos na região intermediária de pH onde as duas macromoléculas possuem cargas opostas (DICKINSON, 1998), a hipótese mais provável é que as estruturas esféricas correspondam a um coacervado entre o caseinato de sódio que se encontra positivamente carregado em pH 4,0 e a gelana que é um polissacarídeo aniônico. Aparentemente, a condição ótima estudada para a formação desse tipo de coacervado seria nas concentrações de 1% (m/m) de caseinato de sódio e 0,3% (m/m) de gelana (Figura 34 B), pois o número de esferas é maior e seu tamanho mais uniforme. Aumentando-se a concentração de caseinato observa-se um aumento das ramificações e da compactação da rede em segundo plano, enquanto que a quantidade de esferas permanece similar ou diminui um pouco (Figura 34 D). Isso ocasiona um aumento da rigidez dos géis e de sua elasticidade, porém como a quantidade de poros parece diminuir, a capacidade de reter água desses sistemas também decresce (Figura 28 A). Neste caso, é provável que toda a gelana esteja coacervada (já que sua concentração é bem inferior à de caseinato) e a rede em segundo plano seja formada predominantemente por interações caseinato - caseinato. Ao se reduzir a concentração de gelana, a quantidade de esferas diminui e sua distribuição de tamanho é menos uniforme, pois menor quantidade do polissacarídeo está disponível para interações (Figura 34 C). Nestas concentrações, a rede ramificada formada por de caseinato de sódio não complexado se torna predominante e é muito menos compacta e uniforme que a observada em altas concentrações de gelana. Essas características se refletem nos resultados de propriedades mecânicas apresentados, pois os géis com maior quantidade de gelana

apresentaram maior rigidez, elasticidade e menor deformabilidade que os com menor quantidade do polissacarídeo em sua composição (Figuras 19A, 21A, 24A). A sinerese desses géis (Figura 31A) também foi muito maior, assim como a quantidade de água exsudada nos ensaios de WHC (Figura 28A), provavelmente devido ao maior tamanho e quantidade de poros presentes.

A utilização de gelana em estado *Coil* na composição dos sistemas (Figura 34 E), aparentemente levou à formação de menos coacervados que os sistemas formados com gelana *Helix*. Uma rede mais compacta e fechada foi observada em segundo plano que deve ser responsável pelo aumento da deformabilidade e da elasticidade dessas amostras em relação às formadas a frio, apesar de ambas apresentarem mesma rigidez. A capacidade de reter água desta rede foi menor que a de amostras em estado *Helix* devido à grande compactação da rede.

A Figura 35 apresenta as micrografias de alguns dos sistemas tripoliméricos estudados. As estruturas visualizadas diferem consideravelmente das observadas nas amostras bipoliméricas e variam bastante conforme a concentração dos polímeros. De forma geral, as redes são mais compactas e com poros mais alongados. Apesar de todas as amostras conterem caseinato e gelana, não são observadas as estruturas esféricas identificadas como coacervados. Como a concentração protéica dos sistemas é relativamente alta quando comparada à da gelana, provavelmente as interações entre as proteínas são favorecidas.

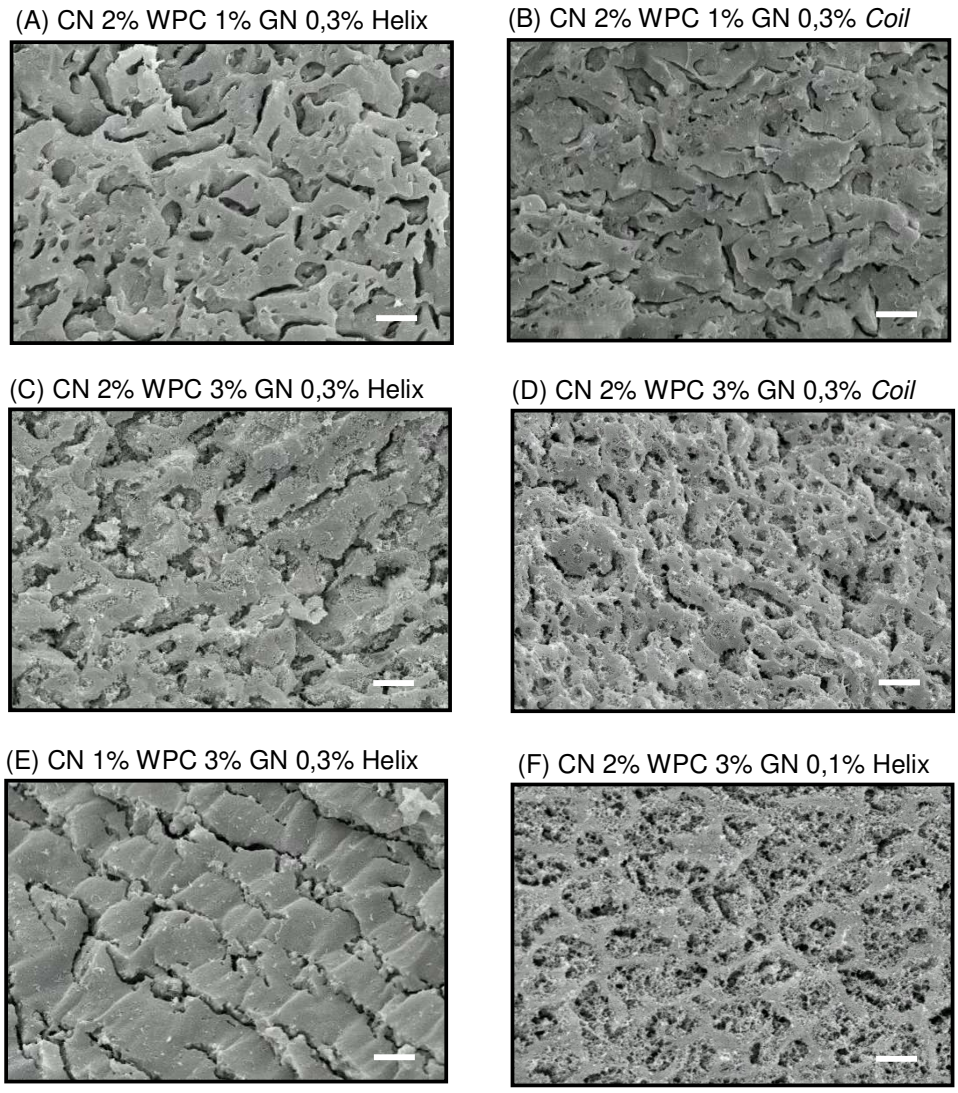


Figura 35. Micrografias SEM de géis de caseinato de sódio (CN), proteínas do soro (WPC) e gelana (GN). A) CN 2% (m/m), WPC 1% (m/m) e GN 0,3% (m/m) helix, B) CN 2% (m/m), WPC 1% (m/m) e GN 0,3% (m/m) coil, C) CN 2% (m/m), WPC 3% (m/m) e GN 0,3% (m/m) helix, D) CN 2% (m/m), WPC 3% (m/m) e GN 0,3% (m/m) coil, E) CN 1% (m/m), WPC 3% (m/m) e GN 0,3% (m/m) helix, F) CN 2% (m/m), WPC 3% (m/m) e GN 0,1% (m/m) helix. A barra de escala corresponde a 10μm.

As amostras formadas por caseinato 2% (m/m), proteínas do soro 1% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) em estado *Helix* apresentou uma estrutura lisa e fragmentada, com poros alongados (Figura 35 A) que possuem a maior rigidez e elasticidade entre todos os sistemas estudados. Nos sistemas com mesma composição, porém com gelana em estado *Coil* (Figura 35 B), a rede formada é bem semelhante embora seja aparentemente

mais compacta, o que refletiu em um aumento da deformabilidade e redução da elasticidade dos géis.

O aumento da concentração de proteínas do soro em sistemas contendo caseinato 2% (m/m) e gelana 0,3% (m/m) (Figuras 35 A e C) resultou em uma estrutura menos lisa e uniforme. Os ensaios de capacidade de retenção de água indicaram que esta estrutura reteve mais água que a formada com menor concentração de WPC (Figura 29 C e D), porém todas as propriedades mecânicas foram reduzidas consideravelmente (Figuras 20, 23 e 26 C e D). Provavelmente, como a estrutura é menos organizada ela é menos deformável, menos elástica e mais frágil. As amostras com mesmas concentrações, mas preparadas a quente, possuem uma rede mais fechada e com poros menores (Figura 35 D) e foram ainda mais frágeis, menos deformáveis e menos elásticas que as formadas a frio. Já sua capacidade de retenção de água e sinerese permaneceram inalteradas (Figuras 29 e 32 C e D).

Uma estrutura menos compacta e mais ramificada foi visualizada com a redução da concentração de gelana de 0,3 para 0,1% (m/m) nas amostras contendo caseinato de sódio 2% (m/m) e 3% (m/m) de proteínas do soro (Figuras 35 C e F). Essas características podem ter sido responsáveis pela redução da tensão de ruptura e deformabilidade da estrutura, no entanto, não afetou sua capacidade de reter água.

Por fim, a redução da concentração de caseinato de sódio de 2% (m/m) para 1% (m/m) nas amostras formadas por gelana 0,3% (m/m) e 3% de proteínas do soro (Figuras 35 C e E), levou à formação de uma estrutura extremamente lisa e alongada, com poucos poros transversais, sendo mais frágil e menos deformável e elástica que as formadas por maior concentração de caseinato.

De forma geral, as microestruturas apresentaram boa correlação com os resultados de propriedades mecânicas, WHC, sinerese e solubilidade e sua análise foi fundamental para elucidar as interações entre as proteínas e o polissacarídeo.

4. Conclusões

A análise dos sistemas bipoliméricos foi fundamental no entendimento das interações e propriedades das amostras tripoliméricas. Em sistemas caseinato - gelana as micrografias da estrutura sugerem a ocorrência de coacervação entre os dois biopolímeros, cuja condição de formação ótima foi na concentração de 1% (m/m) de caseinato de sódio e 3% (m/m) de gelana. O aumento da concentração de caseinato diminuiu a rigidez, deformabilidade e a WHC dos géis formados. No entanto, em sistemas tripoliméricos não foi observado coacervação devido à alta concentração de protéica que favoreceu interações entre as proteínas. Neste caso, o aumento da concentração de caseinato fortaleceu a rede e melhorou a capacidade de retenção de água dos géis, porém diminuiu a deformabilidade dos mesmos.

Sistemas proteínas do soro – gelana apresentaram incompatibilidade termodinâmica a altas concentrações poliméricas, com consecutiva diminuição da rigidez e deformabilidade dos géis. Além disso, a adição de WPC diminuiu a capacidade de retenção de água das amostras em relação aos sistemas puros de gelana. A incompatibilidade entre os biopolímeros, confirmada pelo ensaio de solubilidade protéica, foi ainda mais intensa em sistemas tripoliméricas devido à alta concentração de macromoléculas. Neste caso, o aumento da concentração de WPC levou a uma queda brusca da tensão de ruptura dos géis, seguida de redução da deformabilidade e elasticidade dos mesmos. Além disso, observou-se um leve aumento da WHC e diminuição da sinerese com o aumento da concentração desta proteína.

O estado conformacional da gelana também afetou as propriedades das amostras. Quando o polissacarídeo foi adicionado em estado desordenado (*Coil*) aos sistemas, foi observada a formação de complexos eletrostáticos entre as proteínas e as moléculas individuais da gelana, induzindo a formação de estruturas mais compactas, com menor tensão de ruptura e em geral, mais deformáveis e com menor habilidade de reter água.

– Conclusões Gerais –

A transição conformacional da gelana é fortemente influenciada pelo pH do meio. A redução do pH aumenta a estabilidade térmica das zonas de junções das moléculas de gelana, levando a formação de estruturas termorresistentes em pH 3,5, enquanto na faixa de pH de 5,3 a 7,0 as estruturas formadas são reversíveis com a temperatura. A variação do pH também refletiu em alterações estruturais dos géis formados. Uma rede mais contínua e com poros mais abertos foi observada em pH 5,3 quando comparada à de amostras formadas em pH 7,0. Em pH 3,5 a estrutura formada possui ainda mais continuidade, resultando em um aparente fechamento dos poros. No entanto, apesar de todas as variações estruturais e reológicas, a temperatura de gelificação da gelana mostrou-se independente do pH, sendo de aproximadamente 34,3ºC para todos os valores de pH estudados.

Na interação da gelana com outros biopolímeros, como as proteínas, o estado conformacional do polissacarideo mostrou-se extremamente relevante por ser um fator determinante do tipo de interações estabelecidas e das características dos sistemas formados. Quando a gelana foi adicionada a frio às proteínas do soro de leite, uma incompatibilidade termodinâmica foi observada a altas concentrações, resultando em redução da rigidez e da deformabilidade dos géis formados. A adição de gelana em estado *Coil* às proteínas levou a formação de complexos eletrostáticos entre os dois biopolímeros o que também contribuiu para o enfraquecimento da rede, diminuição da sua deformabilidade e capacidade de retenção de água.

No entanto, nas condições estudadas, as concentrações dos biopolímeros exerceram papel muito mais relevante nas propriedades das amostras que o estado conformacional do polissacarídeo. O aumento da concentração de gelana de 0,1% (m/m) para 0,3% (m/m) levou a formação de géis muito mais rígidos e capazes de reter água, o

aumento da quantidade de caseinato nos sistemas, aumentou a tensão de ruptura, a elasticidade e reduziu a sinerese dos géis, enquanto que amostras com maiores concentrações de WPC apresentaram menores valores de tensão de ruptura, de deformação e aumento da WHC. Além disso, sistemas gelana - caseinato apresentaram coacervação, que foi favorecida nas concentrações de 1% (m/m) de caseinato e 3% (m/m) de gelana.

Os sistemas bipoliméricos apresentaram características reológicas, estruturais e de estabilidade distintas dos tripoliméricos. Algumas interações foram intensificadas em sistemas com maior quantidade de polímeros, como a incompatibilidade entre o WPC e a gelana, enquanto outras foram suprimidas, como a formação de coacervados entre a gelana e o caseinato, resultando em diferentes propriedades e microestruturas, cujo entendimento só foi possível a partir do conhecimento dos sistemas bipoliméricos. As características das amostras bi e tripoliméricas mostraram-se dependentes não apenas das variações de concentrações individuais de cada biopolímero, mas também das interações entre os diferentes ingredientes, confirmando a importância do estudo de sistemas multipoliméricos para o controle e entendimento das interações ocorridas em alimentos.

– Referências Bibliográficas –

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 22/03/2007.

AGUILERA, J. M. (2005). Why food microstructure? **Journal of Food Enginnering, v. 67**, p. 3-11.

ALTING, A.C. (2003). Cold gelation of globular proteins. Thesis Wageningen University, The Netherlands, ISBN 90-5808-850-2. Disponível em: <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis3396.pdf.> Acesso em 27/10/2007.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**- 16 th ed. Arlington, 1996. **v.2**

ARAI, M., ITO, K., INOBE, T., NAKAO, M., MAKI, K., KAMAGATA, K., KIHARA, H., AMEMIYA, Y., KUWAJIMA, K. (2002). Fast Compaction of a-Lactalbumin During Folding Studied by Stopped-flow X-ray Scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 321, p. 121–132.

BARBUT S. (1996). Determining water and fat holding, in: Hall G.M. (Ed.), **Methods of testing protein functionality**, Chapman &Hall, London, p. 187-225.

BAYARRI, E. S., COSTELL, L. D. (2001). Influence of low sucrose concentrations on the compression resistance of gellan gum gels. **Food Hydrocolloids, v.16**, p.593-597

BERLI, C. L. A., DEIBER, J. A., AÑÓN, M. C. (1999). Heat-Induced phenomena in soy protein suspensions. Rheometric data and theoretical interpretation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 47**, p. 893-900.

BOTTOMLEY, R. C.; EVANS, M.T. A.; PARKINSON, D. J. (1990) Whey proteins. In: HARRIS, P. (Ed.). **Food Gels**. London/New York: Elsevier Applied Science, Chapter 11, p. 435-466.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. (1973).Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. **Technical Report**. University of Wisconsin, n. 9.

BRAGA, A.L.M. (2006). **Formação, estrutura e propriedades reológicas de sistemas biopoliméricos.** Dissertação (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BRAGA, A.L.M., AZEVEDO, A., MARQUES, M.J., MENOSSI, M., CUNHA, R.L. (2006). Interactions between soy protein isolate and xanthan in heat-induced gels: the effect of salt addition. **Food Hydrocolloids, v. 20,** p. 1178-1189

BRAGA, A.L.M., CUNHA, R.L. (2004). The effects of xanthan conformation and sucrose concentration on the rheological properties of acidified sodium caseinate–xanthan gels. **Food Hydrocolloids, v. 18**, p.977-986.

BRIGNON, G.; RIBADEAU-DUMAS, B.; MERCIER, J. C.; PELISSIER, J. P. (1977). Complete amino acid sequence of bovine α_{s2}-casein. **FEBS Letters, v. 76**, p. 274-279.

BROWNLOW, S., MORAES CABRAL, J.H., COUPER, R., FLOWER, D.R., YEWDALL, S.J., POLIKARPOV, I., NORTH, A.C.T., SAWYER, L. (1997). Bovine β-lactoglobulin at 1.8 A resolution-still an enigmatic lipocalin. **Structure, v.5**, p. 481-495.

BROWNSEY, G.J., MORRIS, V. J. (1998). Mixed and filled gels: Models for foods. In Blanshard, J. M, V., Mitchell, J. R. (Eds.), **Food Structure: Its interactions and evolution.** London: Elsevier Applied Science, p. 7-23.

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

BUROVA, T. V., GRINBERG, N. V., GRINBERG, V. Y., USOV, A. I., TOLSTOGUZOV, V. B., DE KRUIF, C. G. (2007). Conformational changes in ι- and κ-carrageenans induced by complex formation with bovine β-casein. **Biomacromolecules, v. 8**, p. 368-375.

CAVALLIERI, A. L. F (2007). **Gelificação a frio de proteínas do soro do leite: Efeitos da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos.** Dissertação (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CAVALLIERI, A. L. F., COSTA-NETO, A. P., MENOSSI, M., CUNHA, R. L. (2007). Whey protein interactions in acidic cold-set gels at different pH values. **Lait, v. 87**, p.1-20.

CAVALLIERI, A. L. F.; CUNHA, R. L. (2008). The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. **Food Hydrocolloids**, **v. 22**, p.439-448.

CHANDRASEKARAN, R.; RADHA. (1995). A. Molecular architectures and functional properties of gellan gum and related polysaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, **v. 6**, p. 143-148.

CHEFTEL J.C., CUQ J.L., LORIENT D. (1996). Aminoacidos, peptidos y proteinas, in: Fennema O.R. (Ed.), **Química de los alimentos**, Editorial Acribia, Zaragoza, p. 275-414.

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

DE JONG, S., VAN DE VELDE, F. (2007).Charge density of polisaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. **Food Hydrocolloids, v. 21**, p, 1172-1187.

DE KRUIF, G. C., TUINIER, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids, v. 15,** p.555-563.

DE KRUIF, G. G. (1997). Skim milk acidification. **Journal of Colloid and Interface Science,v. 185,** p.19-25.

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

FARREL Jr, H. M.; PESSEN, H.; BROWN, E. M.; KUMOSINSKI, T. F. (1990). Structural insights into the bovine casein micelle - small-angle X-ray -scattering studies and correlations with spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, **v. 73**, p. 3592-3601.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (1998). **Dairy Chemistry and Biochemistry.** Blackie Academic & Professional: London, v. 19, p. 187, 188.

GIVANASIS, I.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. (2000). Gellan gum. **Critical Reviews in Biotechnology**, **v. 20**, p. 177 – 211.

GLICKSMAN, M. (1978). Gelling hydrocolloids in food product applications. In. J. M. V. Blanshard and J. R. Mitchell, **Polysaccharides in foods**, London: Butterworths, p. 185-204.

GOFF, H.D. (2006) **Dairy Science and Technology Education** Series. Disponível em: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html>. Acesso em 10/03/2007.

GRINBERG, V. Y., TOLSTOGUZOV, V. B. (1997). Thermodynamic incompability of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids, v. 11**, p.145-158.

HOFFMANN, M. A. A., ROEFS, S. P. F. M., VAN MIL, P.J.M., VERHEUL, M., DE KRUIF, C. G. (1997). Aggregation of beta-lactoglobulin studied by in situ light scattering **Journal of Dairy Research**, **v. 63**, p. 423 – 440.

HONGSPRABHAS, P., BARBURT, S. (1997). Ca^{2+}-induced cold gelation of whey protein isolate: Effect of two-stage gelation. **Food Research International, v. 30**, p. 523-527.

HORINAKA, J.; KANI, K.; HORI, Y.; MAEDA, S. (2004a). Effect of pH on the conformation of gellan chains in aqueous systems. **Biophysical Chemistry**, **v. 111**, p. 223 – 227.

HORINAKA, J.; MORI, H.; KANI, K.; MAEDA, S. (2004b). Chain mobility of pectin in aqueous solutions studied by the fluorescence depolarization method. **Macromolecules, v. 37**, p. 10063 – 10066.

HORNE, D. S, LEAVER, J. (1995). Milk proteins on surfaces. **Food hydrocolloids, v. 9**, p. 91-95.

IKEDA, S., FOEGEDING, E. A. (1999). Effects of lecithin on thermally induced whey protein isolate gels. **Food Hydrocolloids, v 13**, p.239-244.

IKEDA, S.; NITTA, Y.; TEMSIRIPONG, T.; PONGSAWATMANIT, R.; NISHINARI, K.(2004). Atomic force microscopy studies on cation – induced network formation of gellan. **Food Hydrocolloids**, **v. 18,** p. 727 – 735.

KANG, K., S.; VEEDER, G. T; MIRRASOUL, P. T.; KANEKO, T.; COTTRELL, I. W. (1982). Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Applied and Environmental Microbiology, v. 43**, p. 1082-1091.

KANI, K.; HORINAKA, J.; MAEDA, S. (2005). Effects of monovalent cation and anion species on the conformation in aqueous systems. **Carbohydrate Polymers, v. 61,** p. 168-173.

KASAPIS, S., GIANNOULI, P.; HEMBER, M. W. N.; EVAGELIOU, V.; POULARD, C.; BENEDICTE, T. – B.; SWORN, G. (1999). Structural aspects and phase behaviour in deacylated and high acyl gellan systems. **Carbohydrate Polymers**, **v. 38**, p. 145 – 154.

KATOAKA, M., KUWAJIMA, K., TOKUNAGA, F., GOTO, Y. (1997). Structural characterization of the molten globule of a-lactalbumin by solution X-ray scattering. **Protein Science, v. 6**, p. 422–430.

KAVANAGH, G. M., CLARK, A. H., ROSS-MURPHY, S. B. (2002). Heat-induced gelation of globular proteins: part 3. Molecular studies on low pH β-lactoglobulin gels. **International Journal of Biological Macromolecules, v 28,** p.41-50.

KOH, M. W. W.; MERINO, L. M., DICKINSON, E. (2002). Rheologynod acid-induced sodium caseinate gels containing added gelatin**. Food Hydrocolloids, v. 16,** p. 619- 623.

KUWAJIMA, K. (1989). The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. **Proteins: Structure, Functionality and Genetic, v. 6**, p. 87–103.

LANGTON, M., HERMANSSON, A.-M. (1992). Fine-stranded and particulate gels of β-lactoglobulin and whey protein at varying pH. **Food Hydrocolloids, v 5,** p. 523-539.

LAU, M.H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. (2000). Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. **Food Research International, v. 33**, p. 665-671.

LEE, H. C., BRANT, D. A. (2002). Rheology of concentrated isotropic and anisotropic xanthan solutions: 3. Temperature dependence. **Biomacromolecules, v. 3**, p. 742 – 753.

LOURENÇO, E.J. (2000). **Tópicos de proteínas de alimentos.** Edição Funep, Jaboticabal, São Paulo, p.179-231.

LUCEY, J. A., TAMEHANA, M., SINGH, H., MUNRO, P. A. (1998). A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-δ-lactone. **Food Research international, v. 31**, p. 147-155.

LUCEY, J. A., TEO, C. T., MUNRO P. A., SINGH, H. (1997). Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. **Journal of Dairy Research, v 64***,* p. 591-600.

LUPANO C.E. (1994). Effect of Heat-Treatments in Very Acidic Conditions on Whey-Protein Isolate Properties. **Journal of Dairy Science, v. 77**, p. 2191-2198.

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

LUPANO C.E., DUMAY E., CHEFTEL J.C. (1992). Gelling Properties of Whey-Protein Isolate - Influence of Calcium Removal by Dialysis or Diafiltration at Acid or Neutral Ph. **International Journal of Food Science and Technology, v. 27**, p. 615-628.

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

MAO, R.; TANG, J.; SWANSON, B, G. (2001). Water holding capacity and microstructure of gellan gels. **Carbohydrate Polymers, v. 46**, p. 365-371.

MAO, R.; TANG, J.; SWANSON, B. G. (1999). Effect of pH buffers on mechanical properties of gellan gels. **Journal of Texture Studies**, **v. 30**, p. 151 – 166.

MCCLEMENTS, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. **Biotechnologies Advances, v. 24**, p. 621-625.

MILAS, M.; RINAUDO, M. (1996). The gellan sol- gel transition. **Carbohydrate Polymers, v. 30**, p. 177 – 184.

MIYOSHI, E., NISHINARI, E. (1999). Non-Newtonian flow behaviour of gellan gum aqueous solutions. **Colloid and Polymer Science, v 277**, p. 727-734.

MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. (1994). Gel – sol transition in gellan gum solutions. I. Rheological studies on the effects of salts. **Food Hydrocolloids, v. 8**, p. 505 – 527.

MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. (1995). Effects of salts on the gel – sol transition of gellan gum by differential scanning calorimetry and thermal scanning rheology. **Thermochimica Acta, v. 267**, p. 269 – 287.

MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. (1996). Rheological and thermal studies of gel- sol transition in gellan gum aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, **v. 30**, p. 109-119.

MORITAKA, H.; NAITO, S., NISHINARI, K.; ISHIHARA, M., FUKUBA, H. (1999). Effects of gellan gum, citric acid and sweetener on texture of lemon jelly. **Journal of Texture Studies**, **v. 30**, p. 29–41.

MORITAKA, H.; NISHINARI, K.; TAKI, M.; FUKUBA, H. (1995). Effects of pH, potassium chloride, and sodium chloride on the thermal and rheological properties of gellan gum gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 43**, p. 1685 – 1689.

MORR, C. V.; HA, E. Y. W. (1993). Whey proteins concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 33,** p.431-436.

MORRIS, V. J. (1985). Food gels –roles played by polisaccharides. **Chemistry and Industry, v. 4**, p. 159-164.

MORRIS, V. J. (1995). Bacterial Polysaccharides. In A. M. Stephen. **Food Polysaccharides and their Applications.** New York: Marcel Dekker, p. 341-375.

MOTTA, E. M. P., BRAGA, A. L. M., SANTOS-ZAGO, L. F., NETTO, F. M. (2004). **The effect of the ageing of soy protein isolates on the properties of the gel.** In; Proceedings of International Congress on Engineering and Food-ICEF, Montpelier, France, v.1, p. 440-445.

NAKAJIMA, K., IKEHARA, T., NISHI, T. (1996). Observation of gellan gum by scanning tunneling microscopy. **Carbohydrate Polymers**, **v. 30**, p. 77-81.

NICKERSON, M. T.; PAULSON, A. T.; SPEERS, R. A. (2003). Rheological properties of gellan solutions: effect of calcium ions and temperature on pre – gel formation. **Food Hydrocolloids**, **v. 17**, p. 577 – 583.

OAKENFULL, D.; MIYOSHI, E.; NISHINARI, K.; SCOTT, A. (1999). Rheological and thermal properties of milk gels formed with κ-carrageenan. I. Sodium caseinate. **Food Hydrocolloids**, **v 13**, p. 525-533.

OGAWA, E. (1996). Conformational transition of polysaccharide sodium – gellan gum in aqueous solutions. **Macromolecules, v. 29**, p. 5178 – 5182.

OGAWA, E.; MATSUZAWA, H.; IWAHASHI, M. (2002). Conformational transition of gellan gum of sodium, lithium, and potassium types in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids, v. 16**, p. 1 – 9.

OGAWAA, E., TAKAHASHIB, R., YAJIMAC, H., NISHINARI, K. (2006). Effects of molar mass on the *Coil* to *Helix* transition of sodium-type gellan gums in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids, v. 20**, p.378-385.

OLDFIELD, D. J., SINGH, H., TAYLOR, M. W. (1998). Association of β-lactoglobulin and α-lactoalbumin with the casein micelle in skim milk heated in an ultra-high temperature plant. **International Dairy Journal, v 8**, p. 765-770.

OLSSON, C.; STADING, M.; HERMANSSON, A. M. (2000). Rheological influence of nongelling amylopectins on beta-lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids, v. 14**, p. 473-483,

PARADOSSI, G.; BRANT, D.A. (1982). Light Scattering Study of a Series of Xanthan Fractions in Aqueous Solution. **Macromolecules. v.15**, p.874-879.

PICONE, C. S. F. (2004). **Influência do tratamento térmico e acidificação nas propriedades reológicas de géis de proteína do leite.** Relatório de iniciação científica. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PICONE, C. S. F., TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. (2005). **Effect of pH and heat Treatment on the mechanical properties and water-holding capacity of milk proteins gels.** In: V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, Puerto Vallarta. Annals of V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, 2005. p. XI55.

POLYAKOV, V. I., GRINBERG, V. Y., TOLSTOGUZOV, V. B. (1997). Thermodynamic incompability of proteins. **Food Hydrocolloids, v. 11**, p.171-180.

PTITSYN, O. B. (1995). Molten globule and protein folding. **Advances in Protein Chemistry, v. 47**, p. 83–229.

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

RIBEIRO, K.O., RODRIGUES, M.I., SABADINI, E., CUNHA, R.L. (2004). Mechanical properties of acid sodium caseinate - □-carrageenan gels: effect of co-solute addition. **Food Hydrocolloids***,* **v. 18,** p.71-79.

RINAUDO, M. (2004). Role os substituents on the properties of some polysaccharides. **Biomacromolecules, v.5**, p. 1155- 1165.

ROBINSON, G., MANNING, C.E., MORRIS, E.R. (1991). Conformation and physical properties of the bacterial polysaccharides gellan, welan and rhamsan**. In Food Polymers, Gels and Colloids**, ed. E. Dickinson. Special Publication n. 82, Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 22-33.

RODRÍGUEZ- HERNÁNDEZ, A I.; DURAND, S.; GARNIER, C.; TECANTE, A; DOUBLIER, J. L. (2003). Rheology- structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. **Food Hydrocolloids, v.17**, p. 621 – 628.

ROEFS, S. M., VAN VLIET, T. (1990). Structure of acid casein gels. 1. Formation and model network. **Colloids and Surfaces, v 50,** p. 141-159.

ROEFS, S. P. F. M.; DE KRUIF, C. G. (1994). A model for the denaturation and aggregation of bovine β-lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry, v. 226**, p. 883-889.

ROSENTHAL, A. J. (1999). **Food Texture**. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, p. 311.

RUIZ, H.G.M.; VENEMA, P.; VAN DER LINDEN, E. (2007). Relation between pH-induced stickiness and gelation behaviour of sodium caseinate aggregates as determined by light scattering and rheology. **Food Hydrocolloids, v. 21**, p. 545–554.

SABADINI, E., HUBINGER, M.D., CUNHA, R.L. (2006). Influence of sucrose on the mechanical properties of acid milk proteins-□-carrageenan gels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, **v. 23**, p. 55-65.

SANCHEZ, C.; MEKHLOUFI, G.; RENARD, D. (2006). Complex coacervation between β-lactoglobulin and Acacia gum: A nucleation and growth mechanism. **Journal of Colloid and Interface Science, v. 299**, p. 867–873.

SANDERSON, G. R. Gellan Gum (1990). In: HARRIS, P (Ed.). **Food Gels**. Elsevier Applied Science, p. 201- 231.

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, v. 19**, p. 269-273.

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

SGARBIERI, V.C. (2005). Review: Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins. **Brazilian Journal of Food Technologies, v. 8**, p. 43-56.

SHIMADA K., CHEFTEL J.C. (1988). Texture Characteristics, Protein Solubility, and Sulfhydryl-Group Disulfide Bond Contents of Heat-Induced Gels of Whey-Protein Isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.** 36, p. 1018-1025.

STADING, M., HERMANSSON, A.-M. (1991). Large deformation properties of β-lactoglobulin gels structures. **Food Hydrocolloids, v 5,** p. 339-352.

STEFFE, J. F. (1996). **Rheological methods in food process engineering**. Freeman Press, East Lansing, p. 1-93.

STEVENTON, A. J.; GLADDEN, L. F.; FRYER, P. J. (1991). A percolation analysis of the concentration dependence of the gelation of whey protein concentrates. **Journal of Texture Studies***,* **v. 22**, p. 201-218.

SWAISGOOD (1996). Disponível em <http://class.fst.ohio-state.edu/FST822/Lectures/Milk2.htm>. Acesso em 07/01/2008.

TANG, J.; LELIEVRE, J.; TUNG, M. A; ZENG, Y. (1994). Polymer and ion concentration effects on gellan gel strength and strain. **Journal of Food Science, v. 59**, p. 216-220.

TANG, J.; TUNG, M. A; ZENG, Y. (1995). Mechanical properties of gellan gels in relation to divalent cations. **Journal of Food Science, v. 60**, p. 748–752.

TANG, J.; TUNG, M. A; ZENG, Y. (1998). Characterization of gellan gels using stress relaxation. **Journal of Food Engineering, v. 38**, p. 279-295.

TAVARES, C.; SILVA, J. A. L. (2003). Rheology of galactomannan–whey protein mixed systems. **International Dairy Journal, v. 13**, p. 699–706,

TOLSTOGUZOV, V. B. (2000). Foods as dispersed sistems. Thermodinamic aspects of composition-property relationships in formulated food. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v. 61**, p.397-409.

TOLSTOGUZOV, V. B. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids, v.17**, p. 1-23.

TOLSTOGUZOV, V.B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. **Functional properties of food macromolecules.** Eds. J.R. Mitchell & D.A. Ledward. London: Elsevier, p. 385-415,

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

TZIBOULA, A., HORNE, D. S. (1999). Influence of whey protein denaturation on κ-carrageenan gelation. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces, v. 12**, p. 299-308.

Van den BERG, L.; van VLIET; van der LINDEN, E.; van BOEKEL, M. A. J.S; van de VELDE. (2007). Breakdown properties and sensory perception of whey proteins/polysaccharide mixed gels as a function of microstructure. **Food Hydrocolloids, v. 21**, p. 961-976.

Van VLIET, T., VAN DIJK, H.J.M., ZOON, P., WALSTRA, P. (1991). Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. **Colloid and Polymer Science, v 269**, p.620-627.

VARDHANABHUTI, B., FOEGEDING, E. A., MCGUFFEY, M. K., DAUBERT, C. R., SWAISGOOD, H. E. (2000). Gelation properties of dispersions containing polymerized and native whey protein isolate. **Food Hydrocolloids, v 15,** p. 165-175.

VERHEUL, M.; ROEFS, S.P.F.M. (1998). Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. **Food Hydrocolloids**, **v 12**, p. 17-24.

WALKENSTRÖM, P.; HERMANSsON, A. M. (1994). Mixed gels of fined-stranded and particulate network of gelatin and whey proteins. **Food Hydrocolloids, v. 8**, p. 589-607.

WALSTRA, P. (1993). The syneresis of curd. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology,** Chapman & Hall, Londom, **v. 1**, p. 141-191.

WALSTRA, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, **v 9,** p. 189-192.

WANG, C. e CUI, S. W. (2005). Understanding the Physical Properties of Food Polysaccharides. In: **FOOD CARBOHYDRATES: Chemistry, Physical Properties, and Applications.** USA: Taylor & Francis Group, capítulo 4.

WEINBRECK, F., TROMP, R. H., DE KRUIF, C. G. (2004). Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates. **Biomacromolecules, v. 5**, p. 1437-1445.

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

YAMAMOTO, F. (2006). **Reologia e microestrutura de géis ácidos de gelana.** Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

YAMAMOTO, F.; CUNHA, R. L. (2007). Acid gelation of gellan: Effect of final pH and heat treatment conditions. **Carbohydrate Polymers, v. 68,** p. 517-527.

ZEIGLER, G. R.; FOEGEDING, E. A. (1990.). The Gelation of Proteins. **Advances in Food and Nutrition Research, v. 34**, p. 203-298.

ZHANG, G. Y.; FOEGEDING, E. A. (2003). Heat-induced phase behavior of beta-lactoglobulin/polysaccharide mixtures. **Food Hydrocolloids, v.17**, p.785-792.

– Apêndice 1 –

Estudo do processo de acidificação de sistemas tripoliméricos :
Gelana - Caseinato de sódio - Isolado protéico de soro

1. Introdução

As propriedades de sistemas mistos proteínas – polissacarídeos podem ser alteradas por fatores físico-químicos como modificação de força iônica e pH do meio (RENKEMA *et al.*, 2000). A redução do pH pode ser feita de maneira direta, pela adição de ácidos ou de forma indireta, através da utilização de culturas bacterianas ou de glucona-δ-lactona (GDL) (LUCEY *et al.*, 1997). A glucona-δ-lactona é um éster do ácido glucônico que possui a propriedade de se hidrolisar o ácido glucônico levando a uma progressiva acidificação do meio (SANCHEZ *et al.*, 2006; DE KRUIF, 1997). Este processo é extremamente dependente da temperatura e concentração de biopolímeros do sistema, possibilitando um fácil controle da taxa de acidificação e do pH de equilíbrio, pois ambos são função da quantidade de GDL adicionada (CAVALLIERI & CUNHA, 2007; SANCHEZ *et al.*, 2006; DE KRUIF, 1997).

Esta etapa do trabalho teve como objetivo determinar a razão de GDL necessária para a obtenção de pH 3,5, inicialmente proposto no projeto, em soluções simples e mistas de caseinato de sódio, isolado protéico de soro e gelana. Também foi determinada a influência de cada composto no pH final das amostras e quanto tempo seria necessário para se atingir o pH de equilíbrio.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Para a composição dos sistemas utilizou-se goma gelana desacilada (Kelcogel® F) cedida pela Kelco (San Diego, EUA) e caseína técnica bovina obtida da Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis) cujas composições são apresentadas na Tabela 7 (Capítulo 4). Neste estudo preliminar só se dispunha de isolado protéico de soro de leite (IPS) cedido pela Arla Foods Ingredients (Dinamarca), portanto ele foi utilizado ao invés do concentrado

protéico usado no restante do trabalho. Seu teor de proteínas determinado pelo método de Kjedhal (AOAC, 1996) foi de 84,50% e a umidade em base seca 5,70%. A composição de íons foi determinada por espectrometria de absorção atômica (Instituto de Química – UNICAMP) correspondendo a: 0,65% de íons K^+, 0,63% de íons Na^+ e 0,05% de íons Ca^{2+}.

2.2 Métodos

2.2.1. Ensaios Preliminares

Os sistemas mistos foram compostos pela mistura das soluções estoque (seção 2.2.1 do Capítulo 4) sob agitação magnética a temperatura ambiente e, posteriormente, foram resfriados a 10°C. Então, adicionou-se ácido láctico 0,22M para redução do pH. No entanto, devido à presença de proteínas do soro desnaturadas e caseinato, os sistemas gelificaram instantaneamente impedindo a formação de amostras homogêneas. Assim, visando proporcionar uma lenta e homogênea redução do pH optou-se por utilizar glucona-δ-lactona ao longo de todo o trabalho para a formação dos géis.

2.2.2. Determinação do tempo de acidificação

Para a determinação aproximada do tempo necessário para o equilíbrio de pH e dos valores de pH finais obtidos para diferentes razões de GDL, foi realizado um ensaio preliminar de cinética de acidificação. Foram avaliadas soluções nas concentrações de 2% (m/m) de caseinato e 5% (m/m) de IPS utilizando diferentes razões de GDL (0,15; 0,17; 0,20; 0,23; 0,27; 0,30; 0,63; 0,71) em oito intervalos de tempo. As amostras foram preparadas pela mistura das soluções estoque a 10°C sob agitação magnética. Após completa homogeneização, adicionou-se o GDL e agitou-se por mais aproximadamente 3 minutos para sua dissolução. As amostras foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5ml a 10°C e imediatamente após a adição de GDL iniciou-se a medição do pH. Os

valores de pH obtidos foram ajustados por uma equação cinética de primeira ordem (Equação 6) em função do tempo (t).

$$pH = pH_0 + C\exp(-k\,t) \tag{6}$$

onde pH é o valor de pH medido, pH_0 o valor de pH após atingido o equilíbrio, C um parâmetro de ajuste, k a constante de reação e t o tempo transcorrido após a adição de GDL.

2.2.3. Determinação da razão GDL/biopolímeros

Para a determinação da razão GDL/biopolímeros a ser utilizada para a obtenção de pH 3,5 e da influência de cada biopolímero no pH final obtido, foi realizado um planejamento experimental 2^4 completo com 4 repetições no ponto central. As amostras foram preparadas como descrito no item anterior e mantidas a 10°C durante a avaliação do pH por 48 horas após a adição de GDL.

Os níveis estudados para cada variável independente são apresentados na Tabela 11. Cada amostra foi avaliada em quintuplicata.

Tabela 11. Razão de GDL e concentrações de isolado protéico de soro (IPS), caseinato de sódio (CN), gelana (GN) avaliadas no planejamento experimental e seus respectivos valores codificados

Variável	Nível				
	−α	**-1**	**0**	**1**	**+α**
% IPS (m/m)	0,01	0,76	1,51	2,26	3,01
% CN (m/m)	0,01	0,51	1,01	1,51	2,01
% GN (m/m)	0,05	0,13	0,20	0,28	0,35
Razão GDL/biopolímeros	0,10	0,30	0,50	0,70	0,90

3. Resultados e Discussão

3.1. Tempo de equilíbrio de pH

Para a avaliação do tempo de equilíbrio de pH foram utilizadas diferentes razões de GDL/biopolímeros visto que esse parâmetro influencia não só o pH final dos sistemas,

mas também o tempo de acidificação (CAVALLIERI & CUNHA, 2008). A Figura 36 apresenta os valores de pH em função do tempo de acidificação. Observa-se uma grande queda do pH nas primeiras 20 horas e um decaimento mais lento até aproximadamente 40 horas para todas as amostras. De um modo geral, 40 horas após a adição de GDL as amostras entraram em equilíbrio de pH, porém acima de 100 horas observa-se uma pequena queda do mesmo, provavelmente relacionada à degradação. Portanto, tomou-se como padrão para os planejamentos experimentais a avaliação do pH em 48 horas, de forma a garantir que as amostras estivessem entrado em equilíbrio. As duas razões maiores, 0,63 e 0,71 entraram em equilíbrio mais rapidamente, aproximadamente após 30 e 29 horas respectivamente, enquanto que menores razões demoraram mais tempo. O aumento do tempo de equilíbrio com a diminuição da razão de GDL também foi observado por Cavallieri & Cunha (2008) para amostras de isolado protéico de soro.

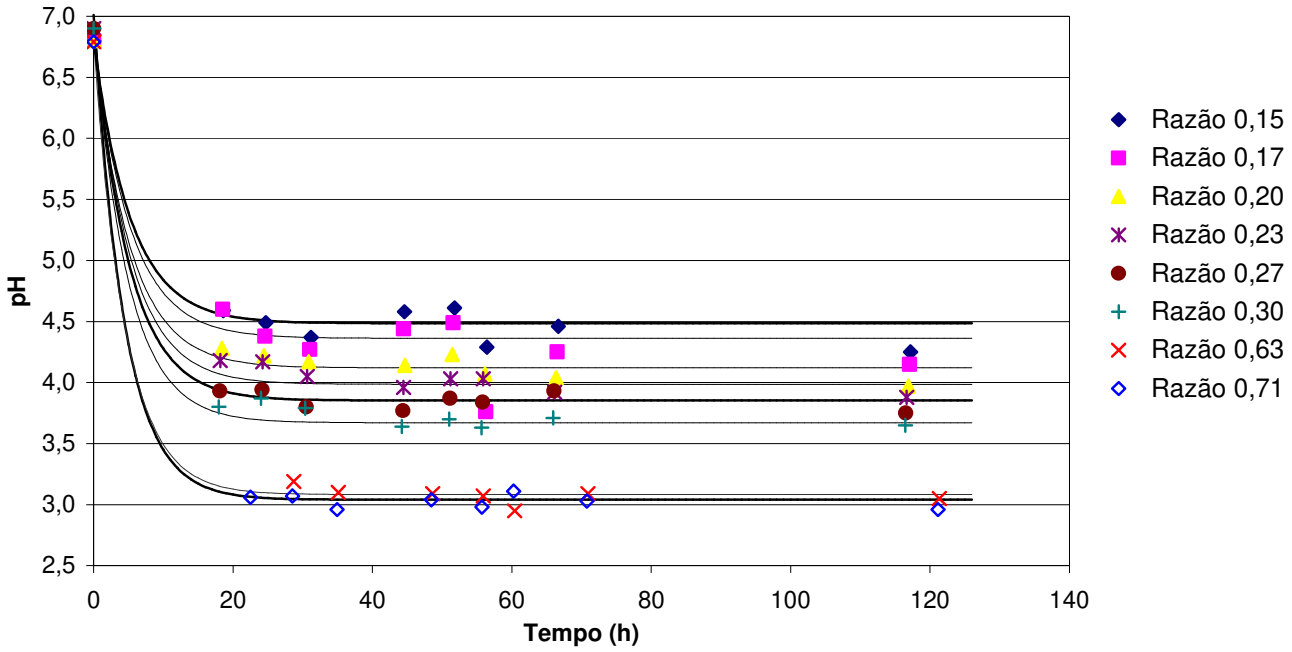


Figura 36. Variação do pH com o tempo (horas) para amostras de 2% (m/m) de caseinato e 5% (m/m) de IPS acidificadas com diferentes razões de GDL.

A Tabela 12 apresenta os valores aproximados de pH de equilíbrio que cada razão proporcionou a 10℃.

Tabela 12. Valores aproximados de pH de equilíbrio obtidos e seus respectivos desvios para cada razão utilizada

Razão	pH
0,15	4,51 ± 0,06
0,17	4,36 ± 0,05
0,20	4,13 ± 0,06
0,23	4,00 ± 0,07
0,27	3,84 ± 0,06
0,30	3,69 ± 0,06
0,63	3,06 ± 0,06
0,71	3,03 ± 0,06

3.2. Determinação da razão de GDL

Os valores de pH final das amostras formuladas de acordo com o planejamento experimental (Tabela 11) são apresentados na Tabela 13. Nesta tabela pode-se observar

que o pH de interesse (3,5) estava dentro do intervalo observado como resposta no planejamento experimental.

Tabela 13. Valores de pH obtidos de acordo com as formulações do planejamento experimental. IPS corresponde a isolado protéico de soro, CN a caseinato de sódio e GN a gelana

Amostras	IPS	CN	GN	GDL	pH
1	-1	-1	-1	-1	3,68
2	1	-1	-1	-1	3,90
3	-1	1	-1	-1	3,59
4	1	1	-1	-1	3,80
5	-1	-1	1	-1	3,72
6	1	-1	1	-1	3,67
7	-1	1	1	-1	3,72
8	1	1	1	-1	3,79
9	-1	-1	-1	1	3,68
10	1	-1	-1	1	3,01
11	-1	1	-1	1	3,09
12	1	1	-1	1	2,97
13	-1	-1	1	1	3,05
14	1	-1	1	1	2,96
15	-1	1	1	1	3,04
16	1	1	1	1	3,00
17	-2	0	0	0	3,24
18	2	0	0	0	3,31
19	0	-2	0	0	3,40
20	0	2	0	0	3,54
21	0	0	-2	0	3,21
22	0	0	2	0	3,16
23	0	0	0	-2	4,99
24	0	0	0	2	3,01
25	0	0	0	0	3,29
26	0	0	0	0	3,23
27	0	0	0	0	3,10
28	0	0	0	0	3,18

A Tabela 14 apresenta os valores dos coeficientes de regressão, erro puro e de p. Os coeficientes de regressão indicam o quanto cada fator influenciou na resposta estudada, ou seja, quanto maior foi seu valor, maior foi a sua influência positiva ou negativa.

Apenas quatro fatores apresentaram influência significativa ($p \leq 0,05$) sobre o pH das amostras: o fator quadrático da concentração de caseinato, os fatores lineares e quadrático da razão de GDL, e a interação entre IPS e GDL.

Tabela 14. Coeficientes de regressão, erro puro e p-valor. Valores em negrito representam efeitos estatisticamente significativos a 95% de confiança

	Coeficientes de regressão	Erro puro	p-valor
Média global	**3,191**	**0,041**	**<0,01**
(1)IPS (L)	-0,014	0,017	0,47
IPS (Q)	0,008	0,017	0,68
(2)CN (L)	-0,014	0,017	0,45
CN (Q)	**0,057**	**0,017**	**0,04**
(3)GEL (L)	-0,037	0,017	0,12
GEL (Q)	-0,014	0,017	0,47
(4)GDL (L)	**-0,376**	**0,017**	**<0,01**
GDL (Q)	**0,189**	**0,017**	**<0,01**
1L by 2L	0,045	0,020	0,12
1L by 3L	0,017	0,020	0,47
1L by 4L	**-0,086**	**0,020**	**0,02**
2L by 3L	0,062	0,020	0,06
2L by 4L	-0,033	0,020	0,20
3L by 4L	-0,039	0,020	0,15

Após a eliminação dos fatores não significativos, verificou-se a significância da regressão e a falta de ajuste em relação a 95% de confiança ($p<0,05$) através do teste F, utilizando análise de variância (ANOVA). De acordo com Box & Wetz (1973), se F calculado for superior a F tabelado, a regressão pode ser considerada significativa e ainda se F calculado for superior a três vezes ao F tabelado, o modelo pode ser considerado preditivo. A Tabela 15 apresenta os valores de F.

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) e coeficientes de determinação. Onde SQ equivale à soma quadrática; GL ao grau de liberdade; MQ à média quadrática. Valores tabelados de F a 5% de significância

Fontes de variação	SQ	GL	MQ	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$	R^2
Regressão	4,50	4,00	1,13	45,03	2,80	0,87
Resíduo	0,57	23,00	0,02			
Total	5,08					

O valor de F calculado foi aproximadamente 16 vezes maior que o valor de F tabelado, portanto o modelo pode ser considerado preditivo e é expresso pela Equação 7. Esta equação foi considerada no preparo das amostras utilizadas no estudo do Capítulo 4, visando a obtenção do pH final desejado.

$$pH = 3{,}19 + 0{,}06\,CN - 0{,}38\,GDL + 0{,}19\,GDL^2 - 0{,}09\,IPS \cdot GDL \qquad (7)$$

Nas Figuras 37, 38 e 39 são apresentadas as superfícies de resposta obtidas para os diferentes biopolímeros em relação à razão de GDL e os valores de pH obtidos.

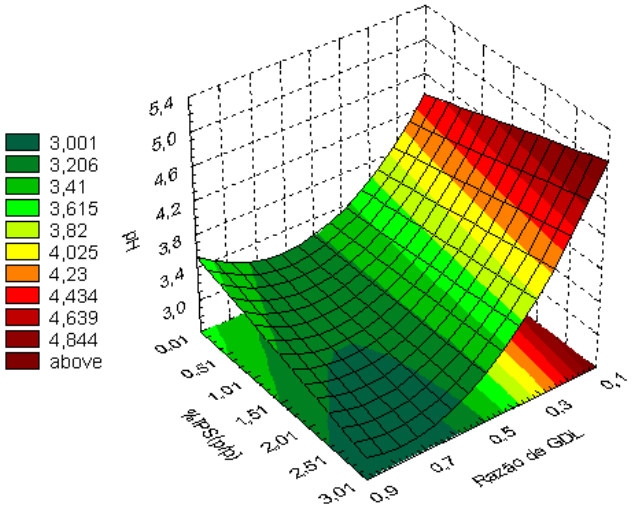


Figura 37. Superfície de resposta relacionando o pH final obtido com a concentração de isolado protéico de soro (IPS) e a razão de GDL.

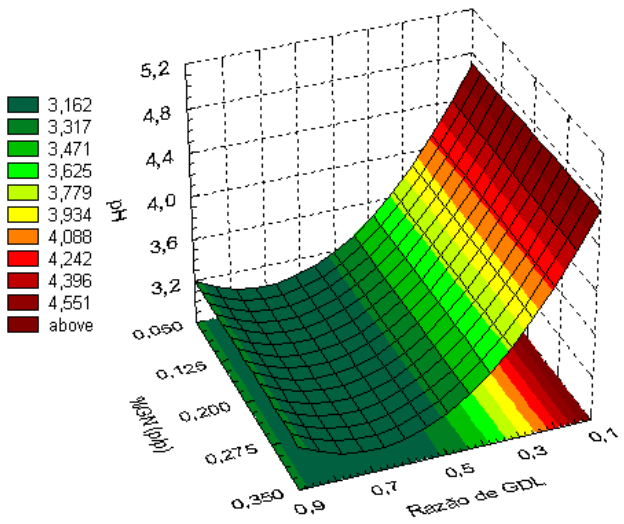


Figura 38. Superfície de resposta relacionando o pH final obtido com a concentração de gelana (GN) e a razão de GDL.

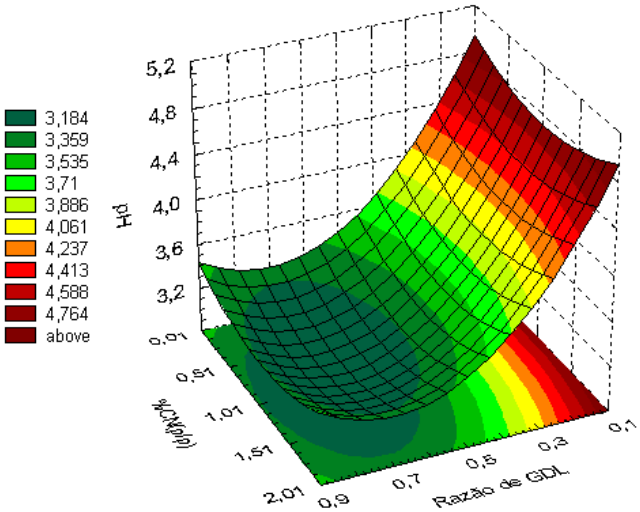


Figura 39. Superfície de resposta relacionando o pH final obtido com a concentração de caseinato de sódio (CN) e a razão de GDL.

Observando-se as Figuras 37, 38 e 39 nota-se que a razão de GDL exerceu forte influência sobre o pH dos sistemas como observado nos parâmetros do modelo (Equação 7), já que há um aumento da quantidade de moléculas dissociadas do éster e mais íons H^+ ficam disponíveis no meio. Para razões de GDL abaixo de 0,5, a concentração de isolado protéico de soro apresentou efeito positivo para o aumento de pH (Figura 37). Isto

era esperado, visto que em seu estado natural o isolado protéico de soro possui pH em torno de 6,8 e está negativamente carregado. Assim, quanto maior a sua concentração, mais íons H^+ são seqüestrados do meio para neutralizar suas moléculas, ocasionando aumento do pH do meio. A gelana, assim como as proteínas do leite estudadas, também possui caráter aniônico, porém não interferiu significativamente nos valores de pH das amostras (Figura 38 e Tabela 14) provavelmente devido à baixa faixa de concentração estudada. O caseinato mostrou efeito quadrático muito pequeno sobre o aumento de pH (Tabela 14) em relação à razão de GDL, que é possível se observar na Figura 39.

4. Conclusões

A acidificação indireta através da adição de GDL foi a melhor forma de se reduzir o pH dos sistemas estudados, visto que a acidificação direta é inviável devido à gelificação instantânea dos sistemas. A 10°C o equilíbrio de pH foi atingido aproximadamente 24 horas após a adição de GDL. Segundo o modelo obtido pelo planejamento experimental, para se atingir o valor de pH 3,5 proposto inicialmente é necessária uma razão de 0,72 de GDL (%GDL/ %proteínas). Além disso, as concentrações de caseinato, isolado protéico de soro e gelana não interferiram significativamente no pH final dos sistemas. A única variável que influenciou significativamente o pH final das amostras foi a razão de GDL e esta influência não foi linear.

– Anexo 1 –

Principais aminoácidos protéicos

Tabela A1: Principais aminoácidos protéicos e suas características, baseado em Cheftel (1996)

Sigla	*Aminoácido*	*Característica*
Ala	Alanina	Apolar
Arg	Arginina	Polar básico
Asn	Aspartina	Polar não ionizável
Asp	Ácido aspártico	Polar ácido
Cys	Cisteína	Polar não ionizável
Gln	Glutamina	Polar não ionizável
Glu	Ácido glutâmico	Pólar ácido
Gly	Glicina	Polar não ionizável
His	Histidina	Polar básico
Ile	Isoleucina	Apolar
Leu	Leucina	Apolar
Lys	Lisina	Polar básico
Met	Metionina	Apolar
Phe	Fenilalanina	Apolar
Pro	Prolina	Apolar
Ser	Serina	Polar não ionizável
Thr	Treonina	Polar não ionizável
Trp	Triptofano	Apolar
Tyr	Tirosina	Polar não ionizável
Val	Valina	Apolar