UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Engenharia de Alimentos

ANÁLISES REOLÓGICAS E CALORIMÉTRICAS DE SISTEMAS-MODELO DE PROTEÍNAS DO LEITE ADICIONADOS DE CARRAGENA E SACAROSE.

KATIUCHIA PEREIRA TAKEUCHI

Engenheira de Alimentos, 2000 (FEA – UNICAMP)

PROFA. DRA. ROSIANE LOPES DA CUNHA

Orientadora

Dissertação apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Campinas, Março de 2003.

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

Takeuchi, Katiuchia Pereira
T139a Análises reológicas e calorimétricas de sistemas-modelo de proteínas do leite adicionados de carragena e sacarose / Katiuchia Pereira Takeuchi. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

1.Caseinato de sódio. 2.Carragena. 3.Reologia. 4.Calorimetria. I.Cunha, Rosiane Lopes da. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

(Orientadora) – DEA / FEA - UNICAMP

Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral

(Membro) – ZAZ / FZEA - USP

Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger

(Membro) – DEA / FEA - UNICAMP

Profa. Dra. Isabel Cristina Freitas Moraes

(Membro) – Fundação Educacional de Barretos.

Dedicatória

Aos meus pais, Hideichi e Leonilde, todo meu amor e gratidão.
Aos meus irmãos, Hidekazu, Akikazu e Kelly pelo carinho e por me darem força para lutar.
Ao Elói, meu amor, minha felicidade...

"O coração do homem traça seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos... Porque o Senhor dá sabedoria e da sua boca vem a inteligência e o entendimento".

Provérbios 16: 9 e 2: 6

Agradecimentos

À Deus,

À Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha, por sua valiosa orientação, incentivo, apoio e amizade. Muito obrigada por contribuir e estimular minha vontade de aprender.

Aos membros da Banca Examinadora, Prof. Dr. Paulo Sobral, Profa. Dra. Miriam Hubinger e Profa. Dra. Isabel Moraes, pelas valiosas correções e sugestões que contribuíram muito para aperfeiçoar este trabalho.

Aos queridos professores da FEA, que foram os responsáveis pela minha formação em Engenharia de Alimentos.

Aos funcionários da FEA, técnicos de laboratório, bibliotecários, secretários, etc pela cooperação e contribuição à minha formação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi, por permitir a realização dos ensaios de Eletroforese em seu laboratório CBMEG-Genoma Funcional e pelas explicações e discussões científicas.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos por fornecer a infra-estrutura para a realização desta pesquisa.

À FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 99/12917-7), que viabilizou este trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Arla Foods Ingredients, por ter gentilmente doado o isolado de proteínas do soro, indispensável para a realização deste trabalho.

À Ana Braga, pelas inúmeras contribuições, discussões intelectuais, por ter me ensinado a trabalhar com os equipamentos. Muito obrigada...

Ao Ângelo, companheiro de laboratório, amigo, pelas horas felizes, tristes, pelo apoio, pelas discussões científicas... por tudo.

À Alline, pelos “helps” intelectuais, pelos cafezinhos, pelas brincadeiras...

À Delia, Mari, Leila, Eliana, Alfredo, Seve, Edméia, pessoal do laboratório pela ajuda...

Ao pessoal do CBMEG – Laboratório do Genoma Funcional, Carol, Juliana, Sandra, Jorge, Melina, Geraldo, Danizinha, por terem me ajudado. Em especial, ao Paulino, por tanta dedicação e cuidado em ensinar-me Eletroforese.

Aos meus companheiros de graduação, Kátia, Frampton, Vitor, Tatiana, Mariana, Janaína, por continuarem meus amigos... Vocês são muito especiais para mim.

Às minhas companheiras de casa, Luciene, Josi e Dani, pelas conversas agradáveis e pela ótima convivência.

Aos meus pais maravilhosos, por tudo que me ensinaram, pela forma como fui educada, pelo amor, atenção, repreensão. Reconheço tudo o que fizeram por mim, para chegar até aqui... Devo tudo a vocês... Deus os abençoe!!!

Aos meus queridos irmãos, Hidekazu, Akikazu e Kelly, por todo o carinho que recebo... Amo demais vocês... Deus os abençoe!!!

Ao meu grande amor: Elói, por me fazer tão feliz, por me amar, por passar por momentos tão felizes e, às vezes, estressantes. Eu te amo, você é muito especial pra mim...

À Maria e Acyr, pelo carinho, pela força, vocês são muito especiais para mim, muito obrigada...

À todos que de uma forma ou outra contribuíram para a elaboração desta tese.

Termino agradecendo novamente a Deus, pela força divina, saúde, graça e misericórdia. Glória a Deus!!!

ÍNDICE

Resumo Geral ..... **xxiii**

General Abstract ..... **xxv**

Capítulo 1 – Introdução Geral

1.1 Introdução **3**

1.2 Objetivos do trabalho **5**

1.2.1 Objetivo geral 5

1.2.2 Objetivos específicos 5

1.3 Referências Bibliográficas **6**

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

2.1 Proteínas do leite **11**

2.1.1 Caseínas 11

2.1.2 Proteínas do soro 13

2.2 Polissacarídeos em produtos lácteos **15**

2.2.1 Carragena 17

2.2.2 Reatividade da carragena com proteínas do leite 20

2.3 Propriedades reológicas de sistemas proteínas-polissacarídeos **20**

2.3.1 Ensaios reológicos oscilatórios dinâmicos 22

2.3.1.1 Modelo de Maxwell *27*

2.3.2 Ensaios reológicos em altas deformações 31

2.4 Comportamento reológico de géis de proteínas do leite-carragena **32**

2.5 Análise térmica de sistemas proteínas do leite-polissacarídeos **35**

2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida **37**

2.7 Referências Bibliográficas **39**

Capítulo 3 – Propriedades reológicas a altas e baixas deformações de sistemas proteínas do leite-carragena-sacarose

Resumo.....51

3.1 Introdução.....52

3.2 Material e Métodos.....56

3.2.1 Material.....56

3.2.2 Formulações dos sistemas-modelo.....57

3.2.3 Preparo das formulações.....59

3.2.3.1 Ensaios reológicos a baixas deformações.....60

3.2.3.2 Ensaios reológicos a altas deformações.....61

3.3 Resultados e Discussões.....63

3.3.1 Propriedades reológicas a baixas deformações.....63

3.3.1.1 Efeitos dos componentes do sistema na temperatura de transição conformacional da κ-carragena.....63

3.3.1.2 Varredura de tempo.....72

3.3.1.3 Espectro mecânico.....74

3.3.1.4 Análise do efeito dos componentes das formulações sobre tan(δ).....77

3.3.1.5 Modelo generalizado de Maxwell.....83

3.3.2 Propriedades reológicas a altas deformações.....93

3.4 Conclusões.....98

3.5 Agradecimentos.....98

3.6 Referências Bibliográficas.....99

Capítulo 4 – Efeito das interações entre as proteínas sobre as ligações da água em sistemas proteínas do leite-carragena-sacarose

Resumo.....107

4.1 Introdução.....108

4.2 Material e Métodos.....110

4.2.1 Material.....110

4.2.2 Composição das formulações: Planejamento Experimental.....111

4.2.3 Preparo dos sistemas.....112

4.2.3.1 Ensaios de Calorimetria Diferencial de Varredura.....112

4.2.3.2 Ensaios de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE).....113

4.2.4 Ensaios de calorimetria.....113

4.2.5 Análises de Eletroforese em gel de poliacrilamida.....115

4.3 Resultados e Discussões.....118

4.3.1 Propriedades térmicas.....118

4.3.1.1 Avaliação dos efeitos dos componentes do sistema sobre a quantidade de água não-congelável (UFW).....118

4.3.1.2 Análise dos efeitos dos componentes sobre a temperatura de início de fusão da água.....126

4.3.2 Ensaios de Eletroforese em gel de poliacrilamida.....128

Análise das frações de proteínas do leite livres em solução.....132

A - α_{S2}-caseína.....132

B - α_{S1}-caseína.....135

C - κ-caseína.....137

D – β-lactoglobulina.....140

E – α-lactoalbumina.....143

F – Agregado de alto peso molecular (~81 kDa).....145

4.4 Conclusões.....147

4.5 Agradecimentos.....147

4.6 Referências Bibliográficas.....148

Capítulo 5 – Conclusões Gerais **.....151**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição dos ingredientes do sistema proteínas do leite-carragena-sacarose. 56

Tabela 3.2 – Variáveis independentes e seus níveis referentes aos ensaios reológicos em altas e baixas deformações dos sistemas-modelo de proteínas do leite-carragena-sacarose. 57

Tabela 3.3 – Formulações do Planejamento Experimental 2^4, com pontos axiais e pontos centrais, utilizados para a avaliação de propriedades reológicas a altas e baixas deformações de sistemas-modelo de proteínas do leite-carragena-sacarose. 58

Tabela 3.4 – Valores de tan(δ) nas freqüências de oscilação de 0,1, 1 e 5 Hz das formulações de sistemas-modelo proteínas do leite-carragena-sacarose (Tabela 3.3). 76

Tabela 3.5 – Parâmetros dos modelos matemáticos codificados para tan(δ) nas freqüências 0,1, 1 e 5 Hz. O nível de confiança foi de 90%. 80

Tabela 3.6 – Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo generalizado de Maxwell aos espectros mecânicos das formulações de sistemas-modelo proteínas do leite-carragena-sacarose. 84

Tabela 3.7 – Parâmetros dos modelos matemáticos codificados para o maior tempo de relaxação de Maxwell (λ_M), do tempo médio de relaxação (θ) e do maior valor de viscosidade de Maxwell (η_M). O nível de confiança foi desses modelos foi de 95%. 92

Tabela 3.8 – Parâmetros dos modelos matemáticos codificados para a tensão na ruptura (σ_R), deformação na ruptura (ε_R) e módulo de elasticidade (E). O nível de confiança foi desses modelos foi de 95%. 97

Tabela 4.1 – Composição dos ingredientes do sistema proteínas do leite-carragena-sacarose. 110

Tabela 4.2 – Variáveis independentes e seus níveis referentes aos ensaios de calorimetria diferencial de varredura. 111

Tabela 4.3 – Níveis de concentração de caseína e IPS utilizados nos ensaios de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida. 111

Tabela 4.4 – Combinação das concentrações de caseína e IPS utilizadas nos ensaios de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida. 112

Tabela 4.5 – Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos codificados de α_{S2}-caseína e parâmetros estatísticos desses modelos. 135

Tabela 4.6 – Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos codificados de α_{S1}-caseína e parâmetros estatísticos desses modelos. 137

Tabela 4.7 – Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos codificados de κ-caseína e parâmetros estatísticos desses modelos. 140

Tabela 4.8 – Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos codificados da β-lactoglobulina e parâmetros estatísticos desses modelos. 143

Tabela 4.9 – Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos codificados da α-lactoalbumina e parâmetros estatísticos desses modelos. 145

Tabela 4.10 – Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos codificados do agregado de alto peso molecular e parâmetros estatísticos desses modelos. 146

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Esquema-modelo (secção transversal) de uma micela de caseína (Walstra, 1999). 12

Figura 2.2 – Principais tipos de carragenas e respectivas estruturas (Falshaw *et al.*, 2001). 17

Figura 2.3 – Modelo esquemático para a gelificação da carragena (Belton *et al.*, 1984). 19

Figura 2.4 – Espectro mecânico típico para sistemas poliméricos (Graessley, 1984). 25

Figura 2.5 – Diagrama esquemático dos modelos de Maxwell (a) e Kelvin (b). 27

Figura 2.6 – Diagrama esquemático do modelo generalizado de Maxwell. 28

Figura 3.1 – Comportamento do módulo complexo (G^*(Pa)) durante a varredura de temperatura, para as formulações 01, 03, 17 e 27 (Tabela 3.3). 65

Figura 3.2 – (A) Efeito ($p<0,05$) da carragena, caseinato e IPS na temperatura de transição conformacional. (B) Variação da temperatura de transição em relação à composição de carragena e caseinato, com a concentração de IPS e sacarose fixas, em 1% (p/v) e 10% (p/v), respectivamente. 70

Figura 3.3 – Variação dos módulos dinâmicos G' (símbolos abertos) e G" (símbolos fechados) durante a varredura de tempo realizada dentro do intervalo de viscoelasticidade linear dos sistemas. Na Figura foram apresentadas as formulações 05, 06 e 15. 73

Figura 3.4 – Espectro mecânico das formulações 06, 08 e 28 (Tabela 3.3). Os símbolos fechados representam os módulos elásticos e os abertos representam os módulos viscosos. 75

Figura 3.5 – (A), (C) e (E) Efeito ($p<0,10$) da carragena, caseinato de sódio, IPS e sacarose nos valores de tan(δ) nas freqüências 0,1; 1 e 5 Hz. (B), (D) e (F) Variação dos valores de tan(δ) em relação a concentração de caseinato de sódio e carragena. Os valores das concentrações de IPS e sacarose foram fixados em 1% e 10% (p/v), respectivamente. 79

Figura 3.6 – (A), (C) e (E) Efeito ($p<0,05$) da carragena, caseinato de sódio e IPS nos valores da viscosidade de Maxwell (η_M), tempo de relaxação de Maxwell (λ_M) e tempo médio de relaxação (θ), respectivamente; (B), (D) e (F) Variação dos valores da viscosidade de Maxwell (η_M), tempo de relaxação de Maxwell (λ_M) e tempo médio de relaxação (θ) em relação à concentração de caseinato de sódio e carragena. Os valores das concentrações de IPS e sacarose foram fixados em 1,5% e 15% (p/v), respectivamente. 91

Figura 3.7 – Efeito ($p<0,05$) da concentração das variáveis independentes, carragena caseinato de sódio e IPS nas respostas obtidas em ensaios reológicos em altas deformações: (A) tensão de ruptura, (C) deformação na ruptura e (E) módulo de elasticidade, em relação à variação de concentrações de carragena e caseinato. Em (A) e (B) os valores das concentrações de IPS e sacarose foram fixadas em 1,25% e 12,5% (p/v), em (C) e (D) 1,5% e 15% (p/v) e em (E) e (F) 1% e 10% (p/v), respectivamente. 95

Figura 4.1 – Fusão de cristais de água em gel de caseína, IPS, carragena e sacarose com taxa de aquecimento de 2ºC/min na faixa de temperatura de –45ºC a 20ºC. 119

Figura 4.2 – Efeito ($p<0,10$) das variáveis caseinato e sacarose na quantidade de água não-congelável (UFW). 122

Figura 4.3 – Superfícies de respostas mostrando a influência da variação da concentração de caseinato e sacarose (A, B e C), sendo que a concentração de IPS em (A) foi fixada em 0,5% (p/v), em (B) fixada em 1% (p/v) e em (C) fixada em 1,5% (p/v). As superfícies de resposta (D, E e F) mostram a influência da sacarose e IPS, sendo que a concentração de caseinato em (D) foi fixado em 2% (p/v), em (E) 4% (p/v) e em (F) 6% (p/v). A concentração de carragena, para todas as superfícies foi fixada em 0,3%. 124

Figura 4.4 – (A) Efeito ($p<0,05$) da concentração de sacarose e superfícies de resposta mostrando a influência do caseinato, IPS e sacarose na T_{onset}. Análise na concentração de carragena fixa em 0,3% (p/v) e concentrações de sacarose: (B) em 5% (p/v), (C) em 10% (p/v) e (D) em 15% (p/v). 127

Figura 4.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida analisado em condições nativas (Nativo-PAGE). PP são os pesos moleculares padrão, MC é o peso molecular comercial, CN é a caseína, LG é lactoglobulina e LA é lactoalbumina. As formulações apresentadas na Figura são: 03, 04, 07, 08, 11 e 12 – Tabela 4.4. 129

Figura 4.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida analisado sob condição desnaturante e não-redutora (SDS-PAGE não redutor). PP são os pesos moleculares padrão, MC é o peso molecular comercial, CN é a caseína, LG é lactoglobulina e LA é lactoalbumina. As formulações apresentadas na Figura são: 01, 02, 05, 06, 09 e 10 – Tabela 4.4. 130

Figura 4.7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida analisado em condições desnaturante e redutora (SDS-PAGE redutor). PP são os pesos moleculares padrão, MC é o peso molecular comercial, CN é a caseína, LG é lactoglobulina e LA é lactoalbumina. As formulações apresentadas na Figura são: 01, 02, 05, 06, 09 e 10 – Tabela 4.4. 131

Figura 4.8 – Efeito ($p<0,10$) das concentrações de caseinato e IPS nas quantidades de α_{S2}-caseínas livres em solução, analisadas em condições (A) desnaturantes e redutoras e (C) desnaturante e não-redutoras. Superfícies de resposta da quantidade de α_{S2}-caseínas em relação à concentração de IPS e caseinato no sistema. (B) Análise sob condições desnaturantes e não-redutoras. 134

Figura 4.9 – (A) Efeito ($p<0,10$) da concentração de caseinato na quantidade de α_{S1}-caseínas livres em solução e (B) Superfície de resposta das quantidades de α_{S1}-caseína em relação à variação de concentração de IPS e caseinato no sistema. Análise sob condição nativa. 135

Figura 4.10 – (A, C e E) Efeito ($p<0,10$) das concentrações de caseinato e IPS nas quantidades de κ-caseínas livres em solução. (B, D e F) Superfícies de resposta das quantidades de κ-caseínas em relação às concentrações de IPS e caseinato. (A) e (B) analisado sob condição nativa, (C) e (D) analisado em condição desnaturante e não-redutoras e (E) e (F) analisado sob condição desnaturante e redutora. 139

Figura 4.11 – (A), (C) e (E) Intensidade de efeito ($p<0,10$) das concentrações de caseinato e IPS na quantidade de β-lactoglobulina livre em solução. (B, D e F) Superfícies de resposta das quantidades de β-lactoglobulina em relação às concentrações de IPS e caseinato. (A) e (B) analisado sob condição nativa, (C) e (D) analisado em condição desnaturante e não-redutoras e (E) e (F) analisado sob condição desnaturante e redutora. 142

Figura 4.12 – (A) Efeitos ($p<0,10$) da concentração de IPS e caseinato na quantidade de α-lactoalbumina livre em solução e (B) superfície de resposta das quantidades de α-lactoalbumina em relação à concentração de IPS e caseinato no sistema, analisados em condição nativa. 144

Figura 4.13 – (A) Intensidade de efeito ($p<0,10$) da concentração de caseinato na quantidade de agregados de alto peso molecular (~81 kDa). (B) Superfície de resposta da quantidade destes agregados em relação à variação de concentração de IPS e caseinato no sistema, analisado sob condição desnaturante e não-redutora. 146

TESE DE MESTRADO

AUTORA: Katiuchia Pereira Takeuchi

TÍTULO: Análises reológicas e calorimétricas de sistemas-modelo de proteínas do leite adicionados de carragena e sacarose.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – FEA – UNICAMP

RESUMO GERAL

Neste trabalho, as interações entre as proteínas do leite-carragena-sacarose em meio aquoso foram estudadas em sistemas mantidos em pH 6,7 e submetidos a tratamento térmico de 70ºC por 30 minutos. Estas interações foram estudadas através da avaliação do comportamento reológico em cisalhamento sob regime oscilatório da mistura dos biopolímeros e sacarose, durante e após a gelificação. As propriedades mecânicas dos produtos gelificados foram analisadas em ensaios a altas deformações sob compressão uniaxial, possibilitando um estudo das características de rigidez e elasticidade dos géis formados. As propriedades reológicas foram fortemente influenciadas pela carragena, que mostrou interação com as proteínas do leite e favoreceu a característica elástica dos sistemas. O isolado protéico de soro (IPS) promoveu o fortalecimento da rede, enquanto que o caseinato de sódio pareceu diminuir a rigidez da rede do gel, pois beneficiou a característica viscosa dos sistemas. A sacarose

favoreceu a interação do IPS com a carragena levando à formação de uma rede mais interconectada, portanto mais elástica e resistente à ruptura. As interações entre as proteínas do leite-carragena-sacarose também foram avaliadas através da medida do estado da água nestes sistemas por meio de calorimetria diferencial de varredura, com a determinação da fração de água livre e não-congelável e a temperatura de início de fusão. A quantidade de água não-congelável e a temperatura de início de fusão foram fortemente influenciadas pela sacarose, provavelmente pelo favorecimento de interações entre as proteínas e destas com a água. O tratamento térmico (70ºC por 30 min) permitiu a interação das proteínas do soro com as frações hidrofílicas da caseína e sua interação com a carragena. As interações que ocorreram entre as proteínas do leite após o tratamento térmico, relacionadas à agregação intermolecular ou intramolecular, foram analisadas através de eletroforese de gel de poliacrilamida. Essa análise permitiu verificar que as concentrações das proteínas presentes no sistema influenciam na quantidade das unidades livres em solução, possibilitando a interação delas com os outros componentes do sistema, como a água e a carragena.

Palavras-chave: Caseinato de sódio, carragena, isolado protéico de soro, reologia, calorimetria diferencial de varredura.

MASTER DEGREE THESIS

AUTHOR: Katiuchia Pereira Takeuchi

TITLE: Rheological and Calorimetry Analysis of milk proteins systems-models with carrageenan and sucrose added.

SUPERVISOR: Rosiane Lopes da Cunha

DEPARTAMENT OF FOOD ENGINEERING – FEA – UNICAMP

GENERAL ABSTRACT

Interactions among milk proteins-carrageenan-sucrose in aqueous medium were studied in systems at pH 6.7 and submitted to thermal treatment at 70ºC for 30 min. These interactions were studied by evaluation of rheological behavior under oscillatory and steady shear of biopolymers mixture and sucrose during and after gelation. The mechanical properties of gelified products were determined in studies under uniaxial compression at high deformations, allowing a study of the characteristics of rigidity and elasticity of formed gels. The rheological properties were strongly influenced by carrageenan, wich showed interactions with milk proteins and favored the elasticity characteristic of the systems. Whey protein isolate (WPI) favored the formation of a more strength network, while sodium caseinate seemed decrease the rigidity of the gel network, since improved the viscous characteristic of the systems. Sucrose enhanced the interaction between WPI and carrageenan causing the formation of a more elastic network and resistant to the rupture. The interactions among milk proteins-carrageenan-

sucrose were evaluated by quantification of state of water in these systems using a differential scanning calorimetry, with determination of free and unfreezable water fractions and the melting temperature onset. The unfreezable water (UFW) and temperature onset were strongly influenced by sucrose, probably by the enhancement of interactions protein-protein and protein-water. The thermal treatment (70ºC for 30 min) supported the interactions between the whey protein with the hydrophilic fractions of casein and their interactions with carrageenan. The interactions between milk proteins after thermal treatment were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis related to intermolecular and intramolecular aggregation. This analysis allowed to verify that the protein concentration of the system had an effect on the amount of the free units in solution, making possible the interactions of them with the other systems components, as water and carrageenan.

Key-words: sodium caseinate, carrageenan, whey protein isolate, rheology, differential scanning calorimetry.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

Ìndice

1.1 Introdução **3**

1.2 Objetivos do trabalho **5**

1.2.1 Objetivo geral 5

1.2.2 Objetivos específicos 5

1.3 Referências bibliográficas **6**

1.1 Introdução

A produção de leite no Brasil em 2001 foi de 21 bilhões de litros (Ministério da Agricultura) e vem aumentando na produção a cada ano. A indústria de laticínios é muito importante na economia brasileira, ocupando o primeiro posto no ranking dos maiores geradores de receita da indústria de alimentos. Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (Abia), em 2001, o setor de laticínios passou a responder por cerca de 30% dos US$ 54,7 bilhões faturados (líquido de impostos indiretos) pela Indústria da Alimentação (produtos alimentícios e bebidas), ou seja, o equivalente a US$ 16,4 bilhões (Revista Indústria de Laticínios).

Há uma crescente demanda por produtos alimentícios com propriedades especiais, como por exemplo, produtos com baixo teor de gordura e açúcares. No entanto, os alimentos são sistemas complexos, o que dificulta a interpretação das interações que ocorrem entre os componentes. Este fato fez com que houvesse um aumento no uso de sistemas-modelo para a interpretação das propriedades físicas de alimentos. No caso de produtos lácteos existem inúmeros estudos de géis mistos de proteínas e polissacarídeos. Estes géis podem apresentar uma ampla faixa de características de textura, estrutura e estabilidade, que dependem não somente das propriedades das proteínas e polissacarídeos, mas também da natureza e força das interações polissacarídeo/proteína (Dickinson, 1995), as quais são dependentes do pH, força iônica e temperatura de tratamento térmico. Assim, o conhecimento dos mecanismos de interação que ocorrem em sistemas polissacarídeos-proteínas é importante no desenvolvimento das propriedades desejáveis nos produtos alimentícios.

No processamento de produtos derivados de leite ocorre tratamento térmico, como forma de segurança alimentar, como a pasteurização (72 a 75ºC por 15 a 20 s), tratamento HTST (High Temperature Short Time, 98ºC por 0,5 a 1,87 min) e UHT (Ultra High Temperature, 140ºC por 2 a 8 s). O tratamento térmico causa significativas mudanças nas proteínas do leite, como desnaturação das proteínas do soro, promovendo sua interação com as caseínas, enfim, influenciando as características do produto final (Parnell-Clunies *et al*., 1988).

Os polissacarídeos podem ser neutros ou carregados eletricamente. Em especial, a carragena, que é um polissacarídeo aniônico, possui alta reatividade com as proteínas do leite favorecendo a formação de géis. As interações entre os polissacarídeos e as proteínas do leite podem ser controladas em função da composição do sistema (Schorsch *et al*., 1999) ou das condições de processamento, como o tratamento térmico (Capron *et al.*, 1999).

Os mecanismos de interação e o comportamento dos fluidos ou géis formados podem ser monitorados através de análises reológicas (Ross-Murphy, 1998). O comportamento reológico a baixas deformações tem sido uma técnica bastante utilizada para se obter informações sobre a estrutura e viscoelasticidade do produto formado (Stanley *et al.*, 1996). Por outro lado, o estudo das propriedades reológicas a altas deformações é importante para a determinação das propriedades mecânicas, que estão associadas com a ruptura do gel, além de fornecer indicações das características sensoriais do produto.

A eletroforese em gel de poliacrilamida é importante na análise experimental de proteínas e suas misturas. Embora haja outras técnicas, a eletroforese unidimensional é a mais usada, pois oferece suficiente resolução para muitas situações, é de fácil uso e possibilita a comparação de várias amostras simultaneamente. Na caracterização da agregação das proteínas do leite é necessária a utilização de diferentes métodos de eletroforese como o Nativo-PAGE, SDS-PAGE não-redutor e SDS-PAGE redutor.

A análise térmica do sistema proteínas do leite-carragena-sacarose durante o congelamento fornece ferramentas para o entendimento das interações entre os componentes do sistema e a água, através da quantificação da fração de água livre congelável, presente no produto e da temperatura de início da fusão, que é influenciada pela adição de solutos. O uso do calorímetro diferencial de varredura (DSC) para a análise térmica do sistema proteínas do leite-sacarose-carragena, possibilita a análise do efeito das concentrações dos componentes na temperatura de início de fusão da água (T_{onset}) e na quantidade de água congelável no sistema, ou seja, na energia requerida nessa fusão.

1.2 Objetivos do trabalho

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi analisar o comportamento reológico sob cisalhamento e compressão, a baixas e altas deformações de sistemas-modelo contendo caseinato de sódio, isolado protéico de soro, carragena e sacarose em diferentes composições de forma a entender os mecanismos de interação entre estes componentes. A fração de água congelável, não-congelável e a temperatura de início de fusão foram analisadas em calorímetro diferencial de varredura (DSC) e permitiram entender as interações entre as macromoléculas e sacarose em meio aquoso. O comportamento de agregação das proteínas do leite foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições nativa, desnaturante e não-redutora, desnaturante e redutora.

1.2.2 Objetivos específicos

1 – Uso da metodologia de Planejamento Experimental de Segunda Ordem para estudar o comportamento dos sistemas-modelo compostos por caseinato de sódio, carragena, isolado protéico de soro e sacarose, quanto às propriedades reológicas, mecânicas e calorimétricas. Esta metodologia também foi utilizada para estudar o comportamento das proteínas do leite após tratamento térmico por eletroforese em gel de poliacrilamida, porém nesse caso, foi analisada apenas a influência das concentrações de caseinato e isolado protéico de soro.

2 - Análise do comportamento reológico do sistema modelo composto por caseinato de sódio, isolado protéico de soro, carragena e sacarose, sob cisalhamento oscilatório em baixas deformações e em compressão uniaxial sob altas deformações (Capítulo 3). A varredura de temperatura sob cisalhamento oscilatório (baixas deformações) foi realizada para verificar o comportamento de transição conformacional da carragena nos sistemas-modelo no processo de gelificação. O espectro mecânico das formulações do Planejamento Experimental foi realizado dentro do intervalo de viscoelasticidade linear, com o objetivo de entender as características das ligações formadas e os dados foram ajustados pelo modelo generalizado de Maxwell. As

propriedades mecânicas dos sistemas e os parâmetros associados à textura (tensão e deformação na ruptura e módulo de elasticidade) também foram analisados.

3 – Estudo do efeito da concentração dos componentes do sistema-modelo na quantidade de água não-congelável, de forma a entender como a água está associada no sistema. Análise do comportamento de interação das proteínas do sistema após tratamento térmico, através da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições: nativas, desnaturantes e redutoras e desnaturantes e não-redutoras (Capítulo 4).

1.3 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 31/01/2003.

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

DICKINSON, E. (1995) Emulsion stabilization by polysaccharides and protein-polysaccharide complexes. In: STEPHEN, A. M. (Ed.), **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker Inc., p. 501-515.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Receita Bruta da Produção Agropecuária (a) - Brasil - 1999 e 2000. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/spa/52.xls>. Acesso em 15/04/2002.

PARNELL-CLUNIES, E.; KAKUDA, Y.; IRVINE, D.; MULLEN, K. (1988) Heat-induced protein changes in milk processed by vat and continuous heating systems. **Journal of Dairy Science**, **v. 71**, p. 1472-1483.

REVISTA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, Retratos da Crise e Quem é quem na Indústria de Alimentos, v. 41, Set/Out, Disponível em <http://www.revistalaticinios.com.br/>. Acesso em 20/11/2002.

ROSS-MURPHY, S. (1998) Reversible and irreversible biopolymer gels-structure and mechanical properties. **Berichte der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry-Chemical Physics**, **v. 102,** p. 1534-1539.

SCHORSCH, C.; JONES, M. G.; NORTON, I. T. (1999) Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. **Food Hydrocolloids**, **v. 13**, p. 89-99.

STANLEY, D. M.; GOFF, H. D.; SMITH, A. K. (1996) Texture-structure relationships in foamed dairy emulsions. **Food Research International**, **v. 29 (1)**, p. 1-13.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ÍNDICE

2.1 Proteínas do leite **11**
2.1.1 Caseínas 11
2.1.2 Proteínas do soro 13

2.2 Polissacarídeos em produtos lácteos **15**
2.2.1 Carragena 17
2.2.2 Reatividade da carragena com proteínas do leite 20

2.3 Propriedades reológicas de sistemas proteínas-polissacarídeos **20**
2.3.1 Ensaios reológicos oscilatórios dinâmicos 22
2.3.1.1 Modelo de Maxwell 27
2.3.2 Ensaios reológicos em altas deformações 31

2.4 Comportamento reológico de géis de proteínas do leite - carragena **32**

2.5 Análise térmica de sistemas proteínas-polissacarídeos **35**

2.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida **37**

2.7 Referências Bibliográficas **40**

2.1 Proteínas do leite

Normalmente, considera-se que o leite possui cerca de 3,5% de proteínas que podem ser classificadas em quatro grupos: caseína, proteínas do soro (α-lactoalbumina e β-lactoglobulina), proteínas das membranas dos glóbulos de gordura e outras, sendo 2,78% de caseína, 0,67% de proteínas do soro e 0,05% das frações restantes (Sgarbieri, 1998).

2.1.1 Caseínas

As caseínas (Cn) são fosfoproteínas, constituídas de quatro frações principais (α_{s1}-, α_{s2}-, β- e κ-caseína), as quais possuem grupos fosfatos esterificados nos resíduos de serina. Os pesos moleculares monoméricos são 23.614 Da para a α_{s1}-Cn; 24.350 Da para a α_{s2}-Cn; 23.982 Da para a β-Cn e 19.023 Da para a κ-Cn (Wong *et al.*, 1996).

Nas α- e β-caseínas, todos os sítios fosforilados estão localizados em aglomerados na região N-terminal, enquanto que nas κ-caseínas, os poucos resíduos serina disponíveis para a fosforilação, estão no segmento C-terminal e não são encontrados em aglomerados (Holt & Sawyer, 1988).

As α_{s1}-Cn apresentam estruturas pouco ordenadas e correspondem à fração que apresenta a maior carga iônica. As α_{s2}-Cn são as mais hidrofílicas devido à maior fosforilação e maior quantidade de resíduos catiônicos. As α_{s1}-Cn e α_{s2}-Cn possuem altos teores de fosfato e são muito sensíveis à presença de íons Ca^{2+}, os quais causam a precipitação dessas frações de caseínas. As β-Cn são as que apresentam maior hidrofobicidade, sendo que sua molécula possui uma região N-terminal polar e uma região C-terminal altamente hidrofóbica. Esta concentração de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas nas regiões terminais torna a β-Cn mais surfactante que as outras caseínas. As β-Cn contêm quantidades intermediárias de fosfato, são moderadamente sensíveis ao cálcio e diferentemente das outras caseínas, a auto-associação da β-Cn é dependente da temperatura. A κ-Cn é a fração que possui o mais baixo teor de fosfato, não precipita em baixos valores de pH, nem em presença de cálcio. As κ-Cn possuem uma região N-terminal hidrofóbica e a região C-terminal hidrofílica (Brignon *et al.*, 1977).

A hidrofobicidade média das quatro frações de caseínas, em ordem decrescente é: β (5,56) > κ (5,37) > α_{s1} (4,89) > α_{s2} (4,64) kJ/mol de resíduo, baseada na energia livre de transferência de cadeias laterais de aminoácidos de um meio orgânico para um meio aquoso (Brignon *et al.*, 1977; Cheftel *et al.,* 1989) e isso indica os tipos de interações que ocorrerão entre as moléculas de proteína.

As diferentes frações da caseína agregam-se através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, formando submicelas. Essas submicelas possuem uma parte interna hidrofóbica que é coberta por uma camada hidrofílica formada, em grande parte, por κ-caseína que adquire uma estrutura flexível em água. Por outro lado, essas submicelas associam-se através de pontes de fosfato de cálcio constituindo as "micelas" (Goff, 1999; Walstra, 1999), conforme esquematizado na Figura 2.1.

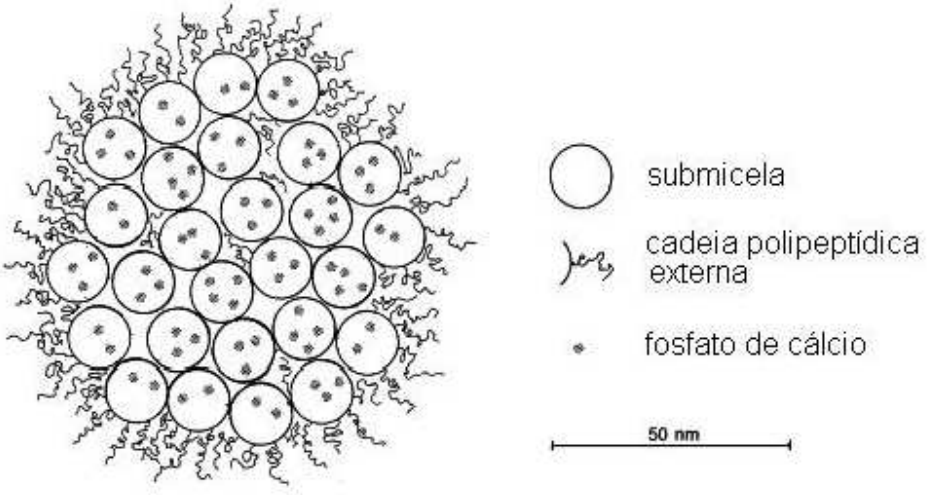


Figura 2.1. Esquema-modelo (secção transversal) de uma micela de caseína (Walstra, 1999).

Sais de caseinato são preparados pela dissociação das micelas através da adição de ácidos. No caso do caseinato de sódio, após a lavagem das proteínas precipitadas, estas são re-dissolvidas pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) para restaurar a neutralidade. A alta proporção de cadeias de aminoácidos hidrofóbicos em toda a estrutura primária da caseína leva o caseinato de sódio a formar agregados (ou "sub-micelas") em soluções aquosas, com a maior parte das regiões não-polares

(hidrofóbicos) localizadas no interior de um denso núcleo com pouca água associada (Farrel *et al.*, 1990). A associação subseqüente das sub-micelas para formar as grandes micelas de caseína é prevenida devido à da remoção da maior parte do cálcio da micela, durante o processo de acidificação (Oakenfull *et al.*, 1999).

2.1.2 Proteínas do soro

O concentrado e o isolado protéico de soro são importantes fontes de ingredientes nutricionais e funcionais para a indústria de alimentos e a gelificação é uma das principais propriedades funcionais destas proteínas.

As proteínas do soro de leite bovino são a β-lactoglobulina, a α-lactalbumina, a albumina bovina sérica e as imunoglobulinas. A β-lactoglobulina corresponde a aproximadamente 50% do total de proteínas do soro, seguido da α-lactoalbumina com 12%, de imunoglobulinas com 10%, albumina sérica bovina com 5% e 23% de proteases-peptonas, proteínas menores e traços de caseínas (Bottomley *et al.*, 1990).

A α-lactoalbumina e a β-lactoglobulina consistem em cadeias de aminoácidos dobradas em estruturas compactas tridimensionais, mantidas por ligações não-covalentes. Estas proteínas possuem estruturas lábeis, que podem ser desnaturadas por mudanças na temperatura e pH como conseqüência da fragilidade destas ligações não-covalentes (Steventon *et al.,* 1991). A desnaturação quase sempre é seguida de agregação, que modifica o comportamento reológico dos sistemas lácteos, podendo inclusive levar a gelificação. Há dois tipos de ligações nestes sistemas: algumas ligações covalentes, como as que são formadas na agregação da β-lactoglobulina entre os grupos sulfidrilas expostos de moléculas desnaturadas adjacentes, e numerosas interações não-covalentes, tais como as de van der Waals, pontes de hidrogênio e principalmente, as interações hidrofóbicas (Steventon *et al.,* 1991).

A β-lactoglobulina é uma proteína globular, cujo monômero possui peso molecular de 18.363 Da, apresentando uma estrutura secundária que possui duas pontes dissulfeto internas e um grupo tiol livre. Estas características possibilitam um

intercâmbio entre as ligações dissulfeto durante mudanças conformacionais associadas com as alterações de pH e tratamento térmico. O ponto isoelétrico da β-lactoglobulina encontra-se na faixa de pH entre 5,35–5,49. A β-lactoglobulina é sensível à desnaturação pelo calor e pH, além de mudanças na força iônica (Bottomley *et al.,* 1990). Em soluções com pH entre 3,5 e 5,2 o monômero estruturalmente estável associa-se e forma um dímero. Esta reação de associação ocorre em temperatura ambiente e em concentrações moderadas. No entanto, na mesma faixa de pH (3,5-5,2), mas em temperaturas próximas de 0ºC, a β-lactoglobulina na forma de dímero, associa-se a outros dímeros e forma um octâmero de peso molecular de 147 kDa (Morr & Ha, 1993), devido à proximidade do pI, que favorece a agregação. Este octâmero é uma estrutura cíclica compactada e as mudanças conformacionais acompanham estas reações de associação (Townend *et al.,* 1969; Timasheff *et al.*, 1966). Na região alcalina, a proteína passa por uma mudança conformacional no pH 7,5 acompanhada por uma expansão molecular. Acima do pH 7, há um rápido aumento na reatividade do grupo tiol; a dissociação do dímero também ocorre nesta região. Em pH ≥ 8, a proteína pode ser considerada instável, pois ocorre a formação de agregados a partir da proteína desnaturada (Lyster, 1972).

Acima de 30ºC, os dímeros de β-lactoglobulina dissociam-se em dois monômeros, enquanto que em temperaturas acima de 55ºC há um progressivo desdobramento da estrutura globular, ocorrendo a exposição de grupos cistina e cisteína e superfícies hidrofóbicas, permitindo a agregação (Bottomley *et al.*, 1990).

A α-lactalbumina é a segunda proteína do soro mais abundante. É uma proteína globular e possui uma estrutura ternária esférica estabilizada por quatro pontes dissulfeto, além de uma estrutura secundária altamente ordenada, o que provavelmente dificulta interações com outras moléculas. Ela apresenta uma conformação estável na faixa de pH 5,4 a 9,0. O peso molecular desta proteína é de 14.175 Da (Bottomley *et al.*, 1990).

2.2 Polissacarídeos em produtos lácteos

Os polissacarídeos são macromoléculas formadas pela condensação de monossacarídeos ou seus derivados, unidos por ligações glicosídicas. As moléculas dos polissacarídeos podem ser lineares ou ramificadas, com o aumento do grau de ramificação ocorrem mudanças nas propriedades físicas referentes à solubilidade, viscosidade e comportamento de gelificação. A solubilidade destes compostos geralmente é afetada pelo pH e por cátions ou agentes complexantes. As soluções destes compostos são normalmente viscosas e esta propriedade é influenciada pelo tamanho da macromolécula, forma e conformação (Stephen & Churms, 1995). Os polissacarídeos solúveis são amplamente usados nas indústrias de alimentos, pois atuam como espessantes e estabilizantes, devido à sua capacidade de aumentar a viscosidade dos produtos nos quais são adicionados, podendo até formar géis (Syrbe *et al.*, 1998), influenciando as propriedades dos alimentos, como a aparência e textura. Atualmente, geralmente são utilizados em produtos com redução total ou parcial de gordura, de forma a minimizar as alterações da textura do produto e evitar a separação de fases em emulsões (Katzbauer, 1998). Efeitos positivos são obtidos em alimentos que são consumidos congelados ou que são preservados pelo congelamento no sentido de reduzir os efeitos negativos relacionados à transição de fases (Herceg *et al.*, 2000). A influência dos hidrocolóides pode depender das interações entre os mesmos e também entre outros biopolímeros e/ou outros componentes do alimento. Conseqüentemente, é importante identificar as condições ótimas nas quais o polissacarídeo pode ser mais efetivo para as propriedades desejadas no produto.

Quando soluções de dois diferentes biopolímeros são misturadas, três situações podem ocorrer: co-solubilidade, associação e incompatibilidade. A co-solubilidade é muito rara (Tolstoguzov, 1991) e a complexação ou associação dos biopolímeros ocorre se as interações entre eles são favoráveis (poliânion-policátion). Como resultado da complexação ou associação dos biopolímeros, um sistema de duas fases é formado, sendo uma fase composta por ambos biopolímeros presentes em altas concentrações, enquanto que a outra fase é composta principalmente por água (sinerese). Por outro lado,

a incompatibilidade termodinâmica, que é uma situação mais comum, ocorre se as interações entre os diferentes biopolímeros são repulsivas e/ou quando os dois tipos de polímeros apresentam variação de afinidade em relação ao solvente (Picullel & Lindmann, 1992; Tolstoguzov, 1991). O comportamento da mistura resulta em um sistema bifásico com cada fase rica em um determinado polissacarídeo. A incompatibilidade termodinâmica é fortemente influenciada pelo pH, força iônica, conformação, densidade de carga e a concentração de biopolímeros (Tolstoguzov, 1991).

O efeito do pH no comportamento da mistura de proteína-polissacarídeo em solução depende da natureza do polímero, se neutro ou carregado eletricamente. Neste último caso, também depende do grupo iônico do polissacarídeo (Gringberg & Tolstoguzov, 1997). No sistema com proteína e polissacarídeo aniônico (carboxilados ou sulfatados), o pH tem efeito na auto-associação das proteínas e também na associação entre proteína e polissacarídeo (Syrbe *et al.*, 1998). O complexo coacervado é observado a pHs abaixo do pI das proteínas, onde os dois polímeros (proteína-polissacarídeo) possuem cargas opostas. Em valores de pH acima do pI das proteínas, ambos os polímeros possuem cargas predominantemente negativas. No caso de alguns polissacarídeos pode ocorrer a formação de complexos solúveis nessas condições, devido à atração entre as regiões positivamente carregadas na molécula da proteína com o polissacarídeo aniônico (Nguyen, 1986; Park *et al.*, 1992).

Dentre os inúmeros polissacarídeos utilizados em alimentos, a carragena vem sendo largamente utilizada na indústria de alimentos, em particular, em produtos lácteos tais como leites achocolatados, pudins, sorvetes, mousses, recheio de tortas e cremes, promovendo um aumento na vida de prateleira de produtos lácteos, evitando a expulsão do soro ("wheying off"), sedimentação de partículas em suspensão ou em emulsão e floculação de gotas dispersas em uma emulsão (Syrbe *et al.*, 1998).

2.2.1 Carragena

A carragena é um polissacarídeo aniônico de origem marinha (*Rhodophyta*) que forma géis termorreversíves (Schorsch *et al.*, 2000) e que pode apresentar várias configurações. Os diferentes tipos de carragenas variam no número e posição dos grupos sulfatos no dímero galactose-galactose unidos por ligação glicosídica (Figura 2.2). A κ(capa)-carragena é composta de unidades de D-galactose-4-sulfato, unidas em α-(1→3) e 3,6-anidro-D-galactose ligadas em β(1→4), que se alternam na cadeia principal. A ι(iota)-carragena difere somente pela presença de um grupo sulfato adicional no C2 da unidade de galactose ligada em β(1→4). A λ(lambda)-carragena é o tipo que contém o maior número de grupos sulfatos. Essa carragena não gelifica, pois sua estrutura não possibilita a formação de hélices ordenadas.

Esses biopolímeros, do tipo gelificantes, sofrem uma transição conformacional de estrutura ordenada para desordenada (Figura 2.3) dependendo da força iônica e da temperatura (Schorsch *et al.*, 2000).

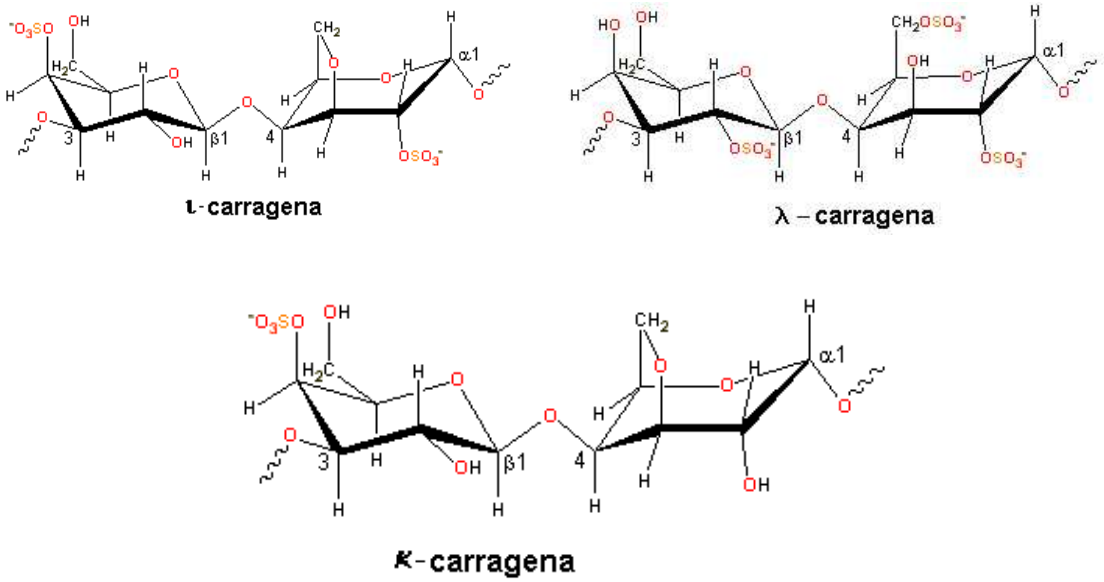


Figura 2.2. Principais tipos de carragenas e respectivas estruturas (Falshaw *et al.,* 2001).

As carragenas do tipo κ e ι são gelificantes, mas a do tipo λ não é gelificante, mesmo em temperaturas abaixo do ponto de gelificação das outras carragenas. Sob resfriamento os tipos gelificantes aumentam rapidamente a viscosidade aparente quando o ponto de gelificação é alcançado, promovido pela presença de íons, principalmente K^+ ou Ca^{2+} (Figura 2.3). As carragenas também podem interagir com outras macromoléculas carregadas e tais interações são especialmente observadas quando adicionadas ao leite.

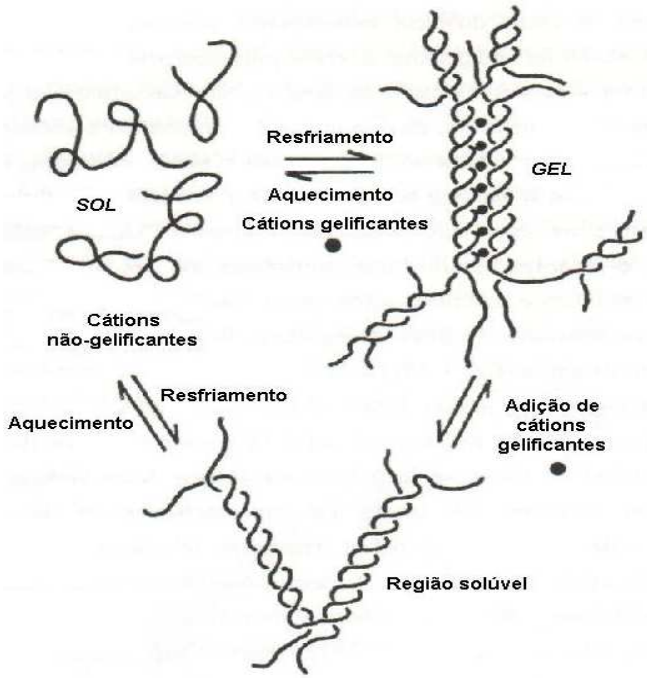


Figura 2.3. Modelo esquemático para a gelificação da carragena (Belton *et al.*, 1984).

2.2.2 Reatividade da carragena com proteínas do leite

A reatividade das proteínas do leite com a carragena é devida à interação eletrostática que pode ocorrer entre as carragenas negativamente carregadas e sítios carregados positivamente nas proteínas. No entanto, estas interações eletrostáticas podem ser específicas e não-específicas. A reatividade de carragenas e proteínas do leite é um fenômeno de gelificação envolvendo uma interação altamente específica entre a carragena e a κ-caseína. Os seguintes eventos ocorrem: (1) A carragena e κ-caseína interagem para formar um complexo e (2) o complexo resultante se agrega em uma rede tridimensional (gel) (Stainsby, 1980).

Na presença de cálcio e em valores de pH na faixa de 6,6-7,0 a formação do complexo foi observada entre a κ-carragena e todas as caseínas, analisado por sedimentação (Snoeren *et al.*, 1975) e eletroforese (Grindrod & Nickerson, 1968). Também foi demonstrado por Grindrod & Nickerson (1968) que a κ-caseína e κ-carragena interagem na ausência de cálcio. Snoeren *et al.* (1975) encontraram que, em um sistema livre de cálcio, em pH 6,7 a κ-carragena interage com a κ-caseína, enquanto que nenhuma interação pode ser detectada entre a κ-carragena e α_{s1}- ou β-caseína. A interação κ-carragena/κ-caseína mostrou ser eletrostática e ocorreu quando ambas moléculas possuíam uma carga líquida negativa neste pH.

2.3 Propriedades reológicas de sistemas proteínas-polissacarídeos

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

A teoria clássica de reologia divide os materiais em líquidos ou sólidos, e o conceito de elasticidade se aplica somente a sólidos, enquanto que a viscosidade é um termo aplicado a líquidos.

Em um líquido perfeitamente viscoso, a tensão depende apenas da taxa de deformação. O trabalho mecânico necessário para produzir qualquer deformação é dissipado instantaneamente. Por outro lado, em um sólido perfeitamente elástico, a tensão depende somente da magnitude da deformação aplicada. O trabalho mecânico empregado na deformação é armazenado em forma de energia elástica (Graessley, 1984).

No entanto, os alimentos são materiais complexos e podem ser considerados corpos viscoelásticos, ou seja, comportam-se como líquido ou sólido, dependendo da tensão aplicada e da escala de tempo do processo de deformação. Assim, um corpo sólido pode apresentar propriedades da fase líquida e um material líquido pode mostrar propriedades de um corpo sólido. Esta distinção de comportamento é determinada pelo número adimensional de Deborah (De), representado pela equação 2.1:

$$De = \frac{\lambda}{Te} \tag{2.1}$$

onde λ é o tempo de relaxação (tempo característico do material) e Te representa a escala de tempo necessária para que ocorram mudanças significativas no material em análise, ou seja, é o tempo característico do processo. O tempo de relaxação característico do material é zero para um líquido newtoniano viscoso e infinito para um sólido Hookeano elástico, logo, considera-se que o fluido comporta-se como um líquido viscoso, quando $De \ll 1$ e um sólido elástico quando $De \gg 1$ (Lapasin & Pricl, 1995).

Os parâmetros reológicos de materiais viscoelásticos podem ser determinados a partir de ensaios que envolvam a aplicação de forças tangenciais (cisalhamento) ou normais (extensional ou sem atrito). A aplicação do escoamento extensional pode ser feita através de ensaios em compressão ou em tração.

A análise de um material viscoelástico é relativamente simples quando o mesmo apresenta comportamento linear. Nessas condições, a razão entre a tensão e a deformação, em qualquer instante ou freqüência, é independente da magnitude de tensão

ou deformação aplicada, sendo apenas função do tempo (Ferry, 1980). No intervalo linear, trabalha-se com deformações muito pequenas e a estrutura molecular praticamente não é afetada e, neste caso, pode-se dizer que os efeitos elásticos seguem a lei de Hooke e os efeitos viscosos obedecem à Lei de Newton (Barnes *et al.*, 1989). Na caracterização da viscoelasticidade linear existem vários tipos de experimentos que determinam as relações entre tensão, deformação e tempo. Os mais importantes são os testes de fluência e recuperação (transientes), relaxação de tensões (transientes) e ensaios oscilatórios (dinâmicos).

Ensaios reológicos oscilatórios dinâmicos

Os ensaios oscilatórios são particularmente úteis para se caracterizar a conformação macromolecular e interações intermoleculares em solução. Em um experimento dinâmico ou periódico, uma tensão ou deformação oscilatória senoidal, a uma freqüência ω, é aplicada ao material, sendo medidas a amplitude e a diferença de fase entre tensão e deformação oscilatória. Em ensaios, no qual a deformação (γ) é controlada, esta varia com o tempo, de acordo com a relação (2.2):

$$\gamma = \gamma_0 \text{ sen } \omega t \tag{2.2}$$

onde γ_0 é a amplitude máxima de deformação.

A tensão (σ) correspondente à deformação aplicada pode ser expressa da seguinte forma:

$$\sigma = \sigma_0 \text{ sen}(\omega t + \delta) \tag{2.3}$$

onde σ_0 é a amplitude máxima de tensão.

A tensão (σ) pode ser representada como a soma dos componentes que estão em fase com a deformação, e 90º fora de fase com a deformação (2.4):

$$\sigma = \gamma_0 \left(G'(\omega) \text{sen}\, \omega t + G''(\omega) \cos \omega t \right) \tag{2.4}$$

onde $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ são os módulos de armazenamento e de dissipação de energia, respectivamente. No caso de um sólido perfeitamente elástico, toda energia é estocada, isto é, G" é zero e a tensão e deformação estão em fase. Já para um líquido perfeitamente viscoso, toda energia é dissipada em forma de calor, ou seja, G' é igual a

zero e a tensão e deformação estão 90º fora de fase. Assim, G' é uma propriedade associada a eventos moleculares de natureza elástica enquanto G'' está associado a eventos moleculares de origem viscosa.

As equações (2.2) e (2.4) podem ser combinadas para obter-se os parâmetros viscoelásticos G' e G'':

$$G'(\omega) = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0}\right).\cos\delta \tag{2.5}$$

$$G''(\omega) = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0}\right).\operatorname{sen}\delta \tag{2.6}$$

$$\tan(\delta) = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \tag{2.7}$$

O módulo complexo G*(ω) expressa a magnitude da resposta global do fluido, onde G'(ω) é o componente real e G''(ω) é o componente imaginário. A expressão do módulo complexo é dado pela equação (2.8):

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \tag{2.8}$$

A magnitude de $G^*(\omega)$ corresponde à razão entre a amplitude de máxima tensão (σ_0) e a amplitude de máxima deformação aplicada (γ_0), representada pela equação (2.9):

$$\left|G^*(\omega)\right| = \sqrt{\left(G'(\omega)\right)^2 + \left(G''(\omega)\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_0\cos\delta}{\gamma_0}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_0\operatorname{sen}\delta}{\gamma_0}\right)^2} = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0}\right) \tag{2.9}$$

Os dados experimentais de G' e G'' podem ser avaliados em função da freqüência (ω) produzindo o denominado "espectro mecânico" (Figura 2.4) (Giboreau *et al.*, 1994), que é útil para classificar um sistema em gel forte ou fraco, ou ainda como solução concentrada (Ross-Murphy, 1998).

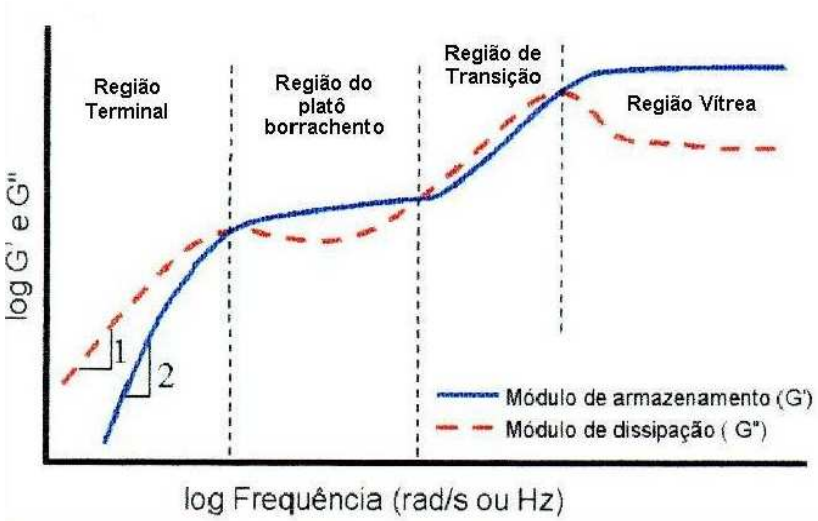


Figura 2.4 – Espectro mecânico típico para sistemas poliméricos (Graessley, 1984).

Segundo o comportamento característico de soluções de biopolímeros em baixas freqüências, ambos os módulos crescem com o aumento da freqüência. Nesse caso, G'(ω) é sempre menor que G"(ω), ou seja, a resposta viscosa predomina, indicando que as cadeias moleculares podem desentrelaçar-se e rearranjar-se durante o longo período de oscilação. O comportamento do escoamento é controlado pelo movimento translacional das macromoléculas. Em freqüências intermediárias, G' torna-se maior que G", tomando valores aproximadamente constantes, o que demonstra que os curtos períodos de oscilação não permitem o desentrelaçamento das moléculas. Nesse caso, os entrelaçamentos desempenham o papel de zonas de junção intermoleculares temporárias. Uma nova inversão nas magnitudes é observada na região de transição e finalmente, quando o estado vítreo é atingido, G" diminui e G' torna-se predominante. Essas regiões características podem ser associadas qualitativamente com diferentes tipos de respostas moleculares e aparecem com diferentes graus de definição e proeminência, pois dependem do peso molecular, do estado físico, da concentração dos polímeros presentes e da temperatura de análise (Graessley, 1984; Ferry, 1980).

2.3.1.1 Modelo de Maxwell

Uma aproximação clássica para a descrição da resposta dos materiais que apresentam propriedades viscoelásticas está baseada em analogias com a resposta de certos elementos mecânicos, compostos por molas e amortecedores. A mola é considerada um elemento de sólido ideal, que obedece à Lei de Hooke (Equação 2.10) e o amortecedor é considerado um elemento de fluido ideal, seguindo a Lei de Newton (Equação 2.11).

$$\sigma = G.\gamma \tag{2.10}$$

$$\sigma = \eta.\dot{\gamma} \tag{2.11}$$

onde σ é a tensão, γ é a deformação, $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação, G é o módulo de rigidez e η é a viscosidade newtoniana.

Os modelos mecânicos são representados pela associação entre molas e amortecedores, sendo o Modelo de Maxwell e o de Kelvin os mais utilizados.

O modelo de Maxwell, uma mola em série com um amortecedor (Figura 2.5 a), é freqüentemente usado para interpretar dados obtidos a partir de testes dinâmicos de líquidos poliméricos. Já no modelo de Kelvin, a mola está em paralelo com o amortecedor (Figura 2.5 b) e é bastante utilizado na interpretação de resultados de testes de fluência (“creep compliance”).

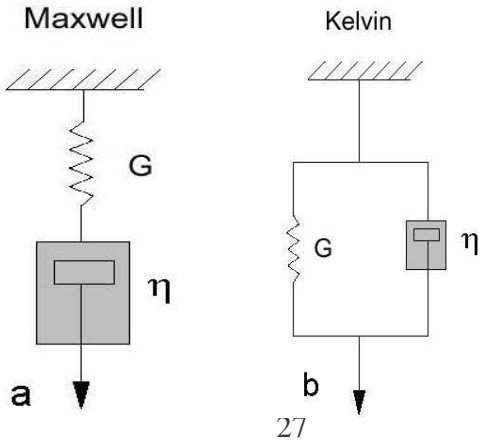


Figura 2.5 – Diagrama esquemático dos modelos de Maxwell (a) e Kelvin (b).

No modelo de Maxwell, quando um sistema é submetido a uma tensão (σ), a deformação total é a soma da deformação elástica da mola (γ_e) e da deformação do amortecedor (γ_v):

$$\gamma = \gamma_e + \gamma_v \tag{2.12}$$

Derivando a expressão anterior em relação ao tempo, obtém-se:

$$\dot{\gamma} = \dot{\gamma}_e + \dot{\gamma}_v = \frac{\dot{\sigma}}{G} + \frac{\sigma}{\eta} \tag{2.13}$$

Agrupando os termos da equação anterior, tem-se:

$$\sigma + \lambda\dot{\sigma} = \eta\dot{\gamma} \tag{2.14}$$

onde λ é o tempo de relaxação definido como o quociente entre a viscosidade newtoniana e o módulo de rigidez (G) (Lapasin & Pricl, 1995).

Se $G \rightarrow \infty$, então $\lambda \rightarrow 0$, assim trata-se de um fluido newtoniano e a velocidade de relaxação das tensões é infinita. Entretanto, para $\eta \rightarrow \infty$, então $\lambda \rightarrow \infty$, assim trata-se de um sólido Hookeano, no qual não há relaxações de tensões.

Modelo Generalizado de Maxwell

É um dos modelos mais usados para descrever o comportamento de materiais viscoelásticos. Consiste em supor que o fluido possui vários tempos de relaxação ao invés de somente um. A representação do modelo analógico, no qual vários elementos de Maxwell individuais são dispostos em paralelo, é mostrada na Figura 2.6:

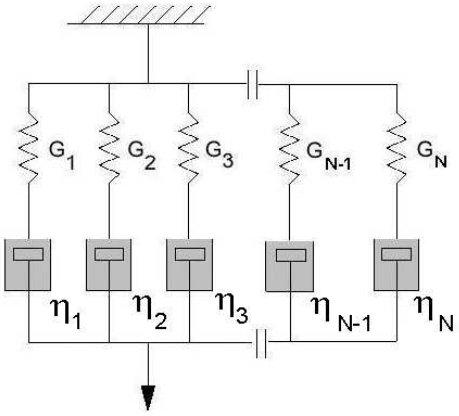


Figura 2.6 - Diagrama esquemático do Modelo generalizado de Maxwell.

A equação 2.14 é válida para cada elemento (i) do sistema e pode ser representada no modelo generalizado de Maxwell pela equação 2.15:

$$\sigma_i + \lambda_i \dot{\sigma}_i = \eta_i \dot{\gamma}_i \tag{2.15}$$

Se o sistema consta de n elementos, tem-se:

$$\sigma = \sum_{i=1}^{n} \sigma_i \tag{2.16}$$

A partir da integração da equação 2.15, a função relaxação pode ser descrita pela equação 2.17:

$$G(t) = \sum_{i=1}^{n} G_i e^{\left(\frac{-t}{\lambda_i}\right)} \tag{2.17}$$

A viscosidade (η_i) de cada elemento (i) amortecedor de Maxwell é dada pela equação (2.18):

$$\eta_i = \lambda_i . G_i \tag{2.18}$$

O tempo médio de relaxação (θ) de Maxwell é dado pela equação (2.19):

$$\theta = \frac{\sum_{i=1}^{n} G_i \lambda_i^2}{\sum_{i=1}^{n} G_i \lambda_i} \tag{2.19}$$

onde G(t) é a função relaxação, G_i é o módulo de relaxação e λ_i é o tempo de relaxação para cada elemento (i) do sistema.

Além da função de relaxação, a partir do modelo de Maxwell é possível predizer outras funções viscoelásticas lineares. Assim, os módulos elástico (G') e o viscoso (G") são dados por (Michailova *et al.*, 2000; Ferry,1980):

$$G'(\omega) = \sum_{i=1}^{n} \frac{G_i \omega^2 \lambda_i^2}{1 + \omega^2 \lambda_i^2} \tag{2.20}$$

$$G''(\omega) = \sum_{i=1}^{n} \frac{G_i \omega \lambda_i}{1 + \omega^2 \lambda_i^2} \tag{2.21}$$

onde G(t) é a função relaxação, G_i é o módulo de relaxação e λ_i é o tempo de relaxação para cada elemento (i) do sistema e ω é a freqüência angular de oscilação.

Michailova *et al.* (2000) aplicaram o modelo generalizado de Maxwell para hidrogéis de hidroxipropilmetil-celulose e obtiveram um bom ajuste aos dados. O modelo permitiu a descrição do sistema como um gel homogêneo no qual a compatibilidade termodinâmica do polímero e solvente foi observada. O modelo pode ser extrapolado para freqüências baixas, mostrando a curva de escoamento na região terminal baseado nas constantes que caracterizam uma rede tridimensional entrelaçada que forma o gel. Provavelmente, neste trabalho, os autores utilizaram o modelo com infinitos elementos e só consideraram os significativos.

2.3.2 Ensaios reológicos em altas deformações

Ensaios que envolvem grandes deformações, sob compressão, tração ou cisalhamento chegam no ponto de ruptura ou passam dele. Esses resultados são muito importantes para o engenheiro de alimentos, pois os alimentos são normalmente sujeitos a altas tensões, tanto em processamento, como em análise sensorial.

Ensaios de compressão uniaxial são freqüentemente utilizados na caracterização da textura de alimentos sólidos. Estes testes podem ser realizados com ou sem lubrificação, mas muitos autores têm dado preferência à lubrificação, devido à maior facilidade de operação (Rao, 1992; Chiralt *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2000).

Em ensaios de compressão uniaxial, uma determinada deformação final (ε) é imposta e a tensão correspondente (σ) é avaliada em função do tempo. Esta deformação é, em geral, suficientemente elevada para levar à ruptura do material. No entanto, a parte inicial da curva é linear, indicando que a deformação é reversível e o módulo de elasticidade (E), que é um parâmetro intrínseco do material, pode ser determinado (Equação 2.22):

$$\sigma = E.\varepsilon \tag{2.22}$$

A tensão (σ_H) e a deformação de Hencky (ε_H), definidas respectivamente pelas equações 2.23 e 2.24, devem ser utilizadas em ensaios com altos valores de deformação, porque consideram o histórico de deformação pelo qual o material passa durante o experimento:

$$\sigma_H = F(t)\left[\frac{H(t)}{H_0 A_0}\right] \tag{2.23}$$

$$\varepsilon_H = -\ln\left[\frac{H(t)}{H_0}\right] \tag{2.24}$$

onde F(t) é a força [N] no tempo t, 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.

As propriedades mecânicas do gel são determinadas através da curva de tensão-deformação de Hencky, sendo o ponto de ruptura o valor máximo desta curva. Neste ponto, pode-se determinar as propriedades que fornecem informações sobre as características do material e correlacioná-las com a textura do produto. Os parâmetros de maior interesse são a tensão na ruptura (σ_R), a deformação na ruptura (ε_R) e o módulo de elasticidade (E), que é determinado a partir da tangente da região linear inicial da curva tensão-deformação (Rosenthal, 1999; Steffe, 1996). Esses parâmetros possuem uma forte dependência com a taxa de deformação e temperatura, que aumenta com a elasticidade do produto. A energia necessária para ruptura de um material é uma medida de sua dureza e pode ser calculada como a área sob a curva tensão-deformação (Wium & Qvist, 1997).

2.4 Comportamento reológico de géis de proteínas do leite - carragena

As proteínas podem formar géis agregados ou filamentados, dependendo do pH, força iônica e tipo de tratamento térmico. Géis protéicos transparentes com estrutura fina são formados sob condições de alta repulsão eletrostática entre as proteínas, ou seja, em sistemas de baixa força iônica ou longe do ponto isoelétrico. Entretanto, géis turvos de estrutura particulada, que apresentam baixos valores de G', são formados em condições de alta força iônica ou nas proximidades do ponto isoelétrico da proteína (Verheul & Roefs, 1998, Verheul *et al.*, 1998).

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

As propriedades físicas e reológicas de géis acidificados com GDL (glucona-δ-lactona) diferem dos formados por processos fermentativos, devido às diferenças observadas na taxa de acidificação que modifica a dissociação das caseínas na taxa de agregação, assim como no tempo disponível para o rearranjo das partículas de proteína na agregação (Lucey *et al.,* 1998).

Braga (2002) avaliou a cinética de gelificação e agregação de caseína acidificada com GDL e verificou que o pH ótimo para a obtenção de géis mais fortes é próximo do ponto isoelétrico das caseínas, porque há favorecimento da fusão e rearranjos contínuos das partículas de caseína, apontando para uma agregação com predomínio de interações hidrofóbicas. Em valores de pH muito baixo, Braga (2002) verificou um decréscimo da característica elástica, que pode ter sido causado pelo aumento na carga positiva entre as moléculas de caseína, resultando em um aumento na repulsão eletrostática.

As proteínas do soro quando submetidas a aquecimento sofrem mudanças conformacionais (desnaturação) e, em seguida, agregam-se de maneira irreversível, via ligações covalentes e não-covalentes podendo formar um gel (Verheul & Roefs, 1998), em uma concentração suficiente de proteína (maior que 5%). As propriedades físicas e estruturais dos géis de proteínas globulares, induzidos por calor podem variar muito e são dependentes das condições de aquecimento, concentração de proteína, pH, força iônica e natureza dos íons. Géis de proteínas do soro formados sob a ação do calor são mais rígidos que os formados por acidificação, quando observados em ensaios de compressão (Ju & Kilara, 1998). Neste caso, a reticulação das proteínas do soro desnaturadas favorece o aumento da rigidez dos géis e, conseqüentemente, dos valores de G'. Esses géis, quando formados em pH neutro e altos valores de força iônica, são menos rígidos, apresentam menores valores de G' (Ju & Kilara, 1998).

Recentemente, considerável interesse tem sido dado ao estudo de misturas de proteínas e polissacarídeos nos setores acadêmico e industrial. Tais combinações podem implicar em novos ingredientes de alimentos, particularmente como substitutos de gordura (Tolstoguzov & Vincent, 1997; Walkeström *et al.*, 1998; Schorsch *et al.*, 1999; Capron *et al.*, 1999), além de ser uma mistura comumente encontrada em alimentos que

mostra um intervalo de propriedades mecânicas e de textura mais amplo que os géis puros de proteína. Esta mistura de hidrocolóides pode mostrar efeitos antagônicos ou sinergísticos, dependendo de um grande número de parâmetros como concentração dos hidrocolóides, pH, força iônica, conteúdo de açúcares, temperatura, peso molecular, fonte da proteína do leite, história térmica do produto, cisalhamento, etc (Syrbe *et al.*, 1998).

A carragena possui alta reatividade com as proteínas do leite no intervalo de pHs entre 6 e 7, devido à forte interação eletrostática entre os grupos sulfato negativos da carragena e as cargas positivas da κ-caseína (Heertje, 1993; Tziboula & Horne, 1999; Schorsch *et al.*, 2000). Essa interação leva a um aumento do valor de G' no início da gelificação, mas com o tempo há uma acomodação estrutural que resulta na diminuição do valor do módulo de armazenamento, que pode ser induzida pela sinerese (Lundin & Hermansson, 1998).

Interações entre proteínas do leite e carragena à temperatura ambiente reduzem a capacidade de gelificação do polissacarídeo. A temperaturas bem acima do ponto de gel (> 50ºC), quando as moléculas de carragena comportam-se como cadeias desordenadas não-agregadas em água, um outro fenômeno de desestabilização é importante: a dispersão de caseína micelar torna-se susceptível à separação do polissacarídeo (Dickinson, 1998). Schorsch *et al.* (2000) estudaram sistemas de caseína micelar e κ-carragena e sugerem que para sistemas com alta fração volumétrica de micelas dispersas, uma baixa concentração de carragena é suficiente para formar pontes entre os grupos restantes das micelas e gelificar.

As interações entre as proteínas do soro e κ-carragena são favorecidas em valores de pH superiores a 5, e este efeito sinergístico é maior quando a proteína passa por tratamento térmico (Mleko *et al.*, 1997). Tal atração é particularmente forte e acontece ainda quando a proteína e o polissacarídeo sulfatado estão carregados negativamente (Gringberg & Tolstoguzov,1997). Na presença de proteínas do soro, a gelificação acontece em uma única etapa, mas o aumento inicial de G' pode diminuir com a formação de agregados. Na mistura de carragena com proteínas do leite dois eventos

independentes e antagônicos podem ocorrer: (1) a formação de um complexo entre a κ-carragena e as proteínas do soro, que interfere na formação do gel, e (2) formação da rede elástica de carragena e a gelificação. O complexo proteínas do leite-carragena é aprisionado nesta rede e as características reológicas dessas misturas são governadas por fatores que influenciam ambos os eventos citados (Tziboula & Horne, 1999).

2.5 Análise térmica de sistemas proteínas-polissacarídeos

A calorimetria diferencial de varredura é uma técnica de análise térmica que é aplicável a vários materiais incluindo polímeros, produtos farmacêuticos e alimentos. As medidas realizadas em um calorímetro diferencial de varredura (DSC) fornecem informações qualitativas e quantitativas em função do tempo e temperatura, considerando as transições em materiais que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos, ou ainda mudanças na capacidade calorífica. Algumas das vantagens que contribuíram para a ampla utilização do DSC são: a fácil preparação da amostra, aplicabilidade em sólidos e líquidos, rápido tempo de análise e ampla faixa de temperatura (Wunderlich, 2000).

Na análise térmica por DSC, efetua-se uma varredura de temperatura nas cápsulas de referência e com amostra e, simultaneamente, o calor adicionado à amostra em relação à referência é medido. Qualquer mudança induzida termicamente, que ocorra na amostra é registrada na forma de um pico no termograma, quando se trata de uma transição de primeira ordem. Em alguns equipamentos, a energia extra requisitada para aquecer a amostra (processo endotérmico) é apresentada convencionalmente, como um pico negativo, enquanto que um pico positivo no termograma indica um processo com liberação de energia (processo exotérmico).

No DSC, a diferença no fluxo de calor entre a amostra e a referência inerte é medida em função do tempo e temperatura, tanto da amostra como da referência, estando sujeitas a um ambiente controlado (pressão, purga do gás). O programa de temperatura pré-estabelecido pode ser isotérmico ou variar linearmente em função do tempo.

O DSC possui algumas limitações como a dificuldade de interpretação dos resultados de fluxo de calor se múltiplos processos estão ocorrendo em uma mesma faixa de temperatura. Em um material com um único componente pode ocorrer a sobreposição de diferentes tipos de transições, tais como fusão e recristalização, se o material for semi-cristalino, e mudanças na capacidade calorífica durante a reação de cura exotérmica. No caso de materiais multicomponentes, transições de diferentes componentes podem se sobrepor. Além disso, nem sempre é trivial identificar a natureza de uma transição: um pico de relaxação entálpica sobreposto à variação da capacidade calorífica na temperatura de transição vítrea pode ser confundido com uma fusão.

As propriedades funcionais e estruturais de hidrogéis são influenciadas pelo estado de hidratação dos polissacarídeos. A caracterização da água é importante para a compreensão da função da água em hidrogéis. O comportamento de transição de fase da água em sistemas contendo polímeros hidrofílicos, polieletrolíticos e polissacarídeos têm sido analisados por DSC e espectroscopia nuclear de ressonância magnética. A água nestes sistemas é classificada em três categorias: não-congelável, congelável ligada e livre, em relação à transição de fase e mobilidade molecular (Hatakeyama *et al.*, 1985; Yoshida *et al.,*1990). A mobilidade molecular e a coagulação molecular dos sistemas acima citados são influenciadas tanto pela água não-congelável como pela congelada ligada, que é retida no polímero (Yoshida *et al.*, 1992).

A avaliação das interações entre biopolímeros e sacarose pode ser avaliada através da análise do estado da água nestes sistemas complexos. Braga (2002) relatou que os géis de caseína-xantana-sacarose apresentaram um grau muito elevado de sinerese (água livre) que foi atribuído principalmente ao efeito da sacarose. Este co-soluto influenciou positivamente a fração de água não-congelável e estes sistemas apresentaram um teor reduzido de água congelável-ligada, que é característico de sistemas coacervados.

Hatakeyama *et al.* (1988) analisaram quantitativamente a água ligada em polímeros e complexos de polímeros por DSC. A água ligada foi classificada no tipo I (não-congelável com temperatura de fusão abaixo de –50ºC e para a qual a endoterma de

fusão não foi detectada); tipo II (água ligada com ponto de fusão entre –50º e 0ºC) e o tipo III (água ligada com temperatura de fusão variável). O calor de fusão foi constante para a água ligada com temperatura de fusão entre –50º e 0ºC. A água livre, observada em sistemas xantana-caseína-sacarose, pode ser quantificada por medidas de sinerese (Braga, 2002). Braga (2002) relatou que a formação da rede de xantana-xantana influencia a sinerese e ocorre em baixas concentrações de caseína, à medida que a concentração de caseína aumenta, esta passa a participar mais efetivamente da rede tridimensional do gel e atua diminuindo a influência da rede de polissacarídeos no sistema.

2.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

No processamento de produtos derivados de leite ocorre tratamento térmico como forma de segurança alimentar, tais com o tratamento HTST (High Temperature Short Time, 98ºC por 0,5 a 1,87 min) e UHT (Ultra High Temperature, 140ºC por 2 a 8 s). O tratamento térmico causa significativas mudanças nas proteínas do leite e influencia as características do produto final. A desnaturação das proteínas do soro presentes no leite promove suas interações com as caseínas. Em presença de cálcio e em temperaturas acima de 65 a 75ºC, a β-lactoglobulina (β-lg) começa a se desdobrar, expondo grupos originalmente internos na estrutura nativa e reage preferencialmente com a κ-caseína, formando complexos. Esta reação é estabilizada pela formação de pontes dissulfeto, normalmente estudadas por eletroforese e ultracentrifugação de misturas de caseínas e proteínas do soro (Parnell-Clunies *et al*., 1988; Oldfield *et al*., 1998 a, b).

A análise das interações entre as proteínas, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, fornece informações para o estudo das características de agregação destas proteínas (Corredig & Dalgleish, 1996). A análise da força destes agregados de proteínas poderia facilitar a compreensão da interação com a carragena e sacarose em um sistema complexo, de forma a entender o mecanismo de ligação de água do sistema.

A eletroforese em gel de poliacrilamida é importante na análise experimental de proteínas e suas misturas. Embora haja outras técnicas, a eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional é a mais usada, pois oferece suficiente resolução para muitas situações, é de fácil uso e possibilita a comparação entre várias amostras simultaneamente. O método de eletroforese em gel de poliacrilamida baseia-se no fato de que uma molécula carregada migra em um campo elétrico a uma taxa que é determinada pelo seu tamanho e carga (Hames, 1990). Na caracterização da agregação das proteínas do leite é necessária a utilização de diferentes métodos de eletroforese como o SDS-PAGE redutor, SDS-PAGE não-redutor e Nativo-PAGE.

O método SDS-PAGE redutor (sódio-dodecil sulfato-poliacrilamida gel) utiliza um sistema tampão que dissocia todas as proteínas em suas subunidades polipeptídicas individuais. O agente dissociante mais comumente utilizado é o detergente aniônico, sódio dodecil sulfato. A mistura de proteínas é desnaturada pelo aquecimento a 100ºC na presença de excesso de SDS e um reagente redutor de ligações dissulfetos. Sob estas condições, a maioria dos polipeptídeos liga-se ao SDS em uma razão mássica constante. As cargas intrínsecas dos polipeptídeos são insignificantes comparadas às cargas negativas provenientes do detergente ligante. Assim, o complexo SDS-polipeptídeo possui essencialmente densidades de cargas idênticas e migram no gel de poliacrilamida, estritamente de acordo com o tamanho do polipeptídeo. Além da análise da composição dos polipeptídeos, através desta técnica pode-se determinar o peso molecular dos mesmos (Copeland, 1994; Garfin, 1990).

O método desnaturante não-redutor (SDS-PAGE não-redutor) é similar ao SDS-PAGE redutor, exceto pelo fato de que a desnaturação da amostra ocorre sem a presença de um reagente tiol. Neste método, ocorre a desnaturação das proteínas, mas não há dissociação dos agregados de proteínas devido às ligações dissulfeto. Logo, permite a análise da influência das ligações dissulfeto na agregação das proteínas.

O método nativo-PAGE é realizado sob condições de tampão não-desnaturante. É projetado de forma a fracionar a mistura de proteínas, de modo que as interações das subunidades, a conformação nativa da proteína e atividade biológica sejam preservadas.

A separação das proteínas nativas é baseada tanto em termos de tamanho, quanto de carga total molecular (Hames, 1990; Copeland, 1994; Garfin, 1990).

Corredig e Dalgleish (1996) estudaram o efeito da temperatura e pH nas interações das proteínas do soro com as micelas de caseína em leite desnatado. Os autores utilizaram a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e relataram que sob aquecimento, tanto a β-lactoglobulina e α-lactoalbumina formaram complexos com as micelas de caseína, quando em concentrações normalmente encontradas no leite desnatado (isto é, a maioria das proteínas presentes na solução interage com as micelas). A presença de complexos de proteínas do soro antes da ligação às micelas poderia explicar o efeito catalítico da alta concentração de α-lactoalbumina na reação da β-lactoglobulina com as micelas. A fração molar de proteínas do soro/κ-caseína observada nos complexos formados foi cerca de 1,5; além disso, a polimerização do complexo ocorre entre α-lactoalbumina, β-lactoglobulina e κ-caseína. A α_{s2}-caseína parece também desempenhar um papel na formação do complexo, pois possui a cisteína.

Corredig e Dalgleish (1999) avaliando o mecanismo das interações induzidas pelo calor entre as proteínas do soro com as micelas de caseína, em uma faixa de tratamento térmico de 70 a 90ºC, em vários tempos de processo, observaram que os dois principais mecanismos de interações observadas são: (1) uma interação direta da β-lactoglobulina com as micelas de caseína, via ligação com a κ-caseína; (2) a reação entre a α-lactoalbumina e β-lactoglobulina com as micelas, através de um intermediário entre as duas proteínas do soro em solução. Os resultados experimentais de ambos os tratamentos, aquecimento do leite desnatado e resuspensão de micelas, mostraram que a quantidade de β-lactoglobulina que interage com as micelas foi limitada pelo número de sítios ligantes disponíveis. Por outro lado, a concentração de α-lactoalbumina é o único fator determinante no grau de sua associação ao agregado micelar.

2.7 Referências Bibliográficas

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. (1989) **An introduction to rheology**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 199 p.

BELTON, P. S.; CHILVERS, G. R.; MORRIS, V. J.; TANNER, S. F. (1984) Effects of group-I cations on the gelation of iota carrageenan. **International Journal of Biological Macromolecules**, **v. 6 (6)**, p. 303-308.

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.

BRAGA, A. L. M. (2002) **Caracterização das interações macromoleculares em géis ácidos de caseína-xantana-sacarose: análises reológicas e térmica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

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.

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

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. (1989) **Proteínas Alimentarias: Bioquímica, Propriedades Funcionales, Valor nutritivo, Modificaciones químicas**. Editorial Acribia, Zaragoza, p. 179-220.

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

CHIRALT, A.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; TALENS, P.; MORAGA, G.; AYALA, A.; FITO, P. (2001) Changens in mechanical properties throughout osmotic processes – Cryoprotectant effect. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 129-135.

COPELAND, R. A. (1994) Electrophoretic and Chromatographic methods for assessing protein purity. In: COPELAND, R. A. (Ed.) **Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols**. New York: Chapman & Hall, Chapter 4, p. 59-84.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D. G. (1996) Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. **Food Research International**, **v. 29 (1)**, p. 49-55.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D. G. (1999) The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. **International Dairy Journal**, **v. 9**, p. 233-236.

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

FALSHAW, R.; BIXLER, H.J.; JOHNDRO, K. (2001) Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts I. Structure analysis. **Food Hydrocolloids**, **v. 15**, p. 441-452.

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 (12)**, p. 3592-3601.

FERRY, J.D. (1980) **Viscoelastic properties of polymers**. 3rd. Ed. New York. John Wiley & Sons, 641 p.

GARFIN, D. E. (1990) One-dimensional gel electrophoresis. In: Deustcher, M. P. (Ed.) **Methods in enzymology**. California, Academic Press, Inc. Chapter 33, p.425-441 (vol. 182 – Guide to protein purification).

GIBOREAU, A.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B. (1994) Rheological behaviour of three biopolymer/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. **Journal of Textures Studies**, **v. 25**, p.119-137.

GOFF, H.D. (1999) Dairy Science and Technology Education Series. Disponível em: <http://www.foodsci.uogueph.ca/dairyedu/home.html>. Acesso em 15/01/1999.

GRAESSLEY, W. W. (1974) The entanglement concepts in polymer rheology. In: DUSEK, K. (Ed.) **Advances in Polymers Sciences**, v. 16. Springer, Berlin, p. 72-99.

GRAESSLEY, W. W. (1984) Viscoelastic and flow in polymers melts and concentrated solutions. In: MARK, J. E.; EINSEBERG, A.; GRAESSLEY, W. W.; MADELKERN, L.; KOENING, J. L. (Eds.) **Physical properties of polymers**. Washington, D. C.: American Chemical Society, p. 97-153.

GRINDROD, J.; NICKERSON, T. A. (1968) Effect of various gums on skim milk and purified milk proteins. **Journal of Dairy Science**, **v. 51**, p. 834-841.

GRINGBERG, V. Y. A.; TOLSTOGUZOV, V.B. (1997) Themodynamic incompatibility of protein and polysaccharide in solution. **Food Hydrocolloids**, **v. 11**, p. 145-158.

HAMES, E. D. (1990) One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, B. D. & RICKWOOD, D. (Eds.) **Gel electrophoresis of proteins** – a practical approach. 2nd Ed. England: Oxford University Press, Chapter 1, p. 1-148.

HATAKEYAMA, T.; NAKAMURA, K.; HATAKEYAMA, H. (1988) Determination of bound water-content in polymers by DTA, DSC and TG. **Thermochimica Acta**, **v. 123**, p. 153-161.

HATAKEYAMA T.; NAKAMURA K.; YOSHIDA H., HATAKEYAMA H. (1985) Phase–transition on the water-sodium poly(styrenesulfonate) system. **Thermochimica Acta**, **v. 88 (1)**, p.223-228.

HEERTJE, I. (1993) Structure and function of food products: a review. **Food Structure**, **v. 12**, p. 343-364.

HERCEG, Z., HEGEDUSIC, V.; RIMAC, S. (2000) Influence of hydrocolloids addition on the rheological properties of whey model solutions. **Acta Alimentaria**, **v. 29 (2)**, p. 89-103.

HOLT, C.; SAWYER, L. (1988) Primary and predicted secondary structures of the casein in relation to their biological functions. **Protein Engineering**, **v. 2**, p. 241-259.

JU, Z.Y.; KILARA, A. (1998) Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **v. 46**, p. 1830-1835.

KATZBAUER, B. (1998) Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, **v. 59**, p. 81-84.

LAPASIN, R.; PRICL, S. (1995) Rheology. In: **Rheology of industrial polysaccharides –** Theory and Applications. Blackie Academic & Professional, p. 163-249.

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

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-delta-lactone. **Food Research International**, **v. 31,** p. 147-155.

LUNDIN, L.; HERMANSSON, A.M. (1998) Multivariate analysis of the influences of locust bean gum, α_s-casein, κ-casein on viscoelastic properties of Na-κ-carrageenan gels. **Carbohydrate Polymers**, **v. 12**, p.175-187.

LYSTER, R. L. J. (1972) Reviews of progress of dairy science. Part – C. Chemistry of Milk proteins. **Journal of Dairy Research**, **v. 39 (2)**, p.279-318.

MICHAILOVA, V.; TITEVA, St.; KOTSILKOVA, R.; KRUSTEVA, E.; MINKOV, E. (2000) Water uptake and relaxation processes in mixed unlimited swelling hydrogels. **International Journal of Pharmaceutics**, **v. 209 (1-2)**, p. 45-56.

MLEKO, S.; LI-CHAN, E.C.Y.; PIKUS, S. (1997) Interactions of κ-carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. **Food Research International**, **v. 30**, p. 427-433.

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

NGUYEN, T. Q. (1986) Interactions of humam hemoglobin with high-molecular weight dextran sulphate and diethylaminoethyl dextran. **Makromolekulare Chemie**, **v. 187**, p. 2567-2578.

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.

OLDFIELD, D. J.; SINGH, H.; TAYLOR, M. W.; PEARCE, K. N. (1998a) Kinetics of denaturation and aggregation of whey proteins in skim milk heated in an ultra-high temperature (UHT) pilot plant. **International Dairy Journal**, **v. 8**, p. 311-318.

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

PARK, J. M.; MUHOBERAC, B. B.; DUBIN, P. L.; XIA, J. (1992) Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. **Macromolecules**, **v. 25**, p. 290-295.

PARNELL-CLUNIES, E.; KAKUDA, Y.; IRVINE, D.; MULLEN, K. (1988) Heat-induced protein changes in milk processed by vat and continuous heating systems. **Journal of Dairy Science**, **v. 71**, p. 1472-1483.

PICULLEL, L.; LINDMANN, B. (1992) Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant, and surfactant/surfactant mixtures. Similarities and differences. **Advances in Colloid and Interface Science**, **v. 41**, p. 149-178.

RAO, M. A. (1992) Classification, description and measurement of viscoelastic properties of solid food. In: RAO, M. .A; STEFFE, J. F. (Eds.). **Viscoelastic properties of food.** (p. 3-47). London, Elsevier.

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

ROSS-MURPHY, S. (1998) Reversible and irreversible biopolymer gels-structure and mechanical properties. **Berichte der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics**, **v. 102**, p. 1534-1539.

SCHORSCH, C.; JONES, M.G.; NORTON, I.T. (1999) Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. **Food Hydrocolloids**, **v. 13**, p. 89-99.

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

SGARBIERI, V.C. (1998) Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, **v. 32 (1)**, p. 105-126.

SNOEREN, Th. H. M.; PAYENS, T. A. J.; JEUNINK, J.; BOTH, P. (1975) Electrostatic interaction between κ-carrageenan and κ-casein. **Milchwissenschaft**, **v. 30**, p. 393-396.

STAINSBY, G. (1980) Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. **Food Chemistry**, **v. 6**, p. 3-14.

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

STEPHEN, A. M.; CHURMS, S. C. (1995) **Food polysaccharides and their applications**. Marcel Dekker Inc., New York., p. 61-15.

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.

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

TIMASHEF, S. N.; MESCANTI, L.; BASCH, J. J.; TOWNEND, R. (1966) Conformational transitions of bovine β-lactoglobulins A, B and C. **Journal of Biological Chemistry**, **v.241 (11)**, p. 2496-&.

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

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

TOWNEND, R.; HERSKOVI, T. T.; TIMASHEF, S. N. (1969) State of amino acid residues in β-lactoglobulin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **v. 129 (2)**, p. 567-&.

TZIBOULA, A.; HORNE, D. S. (1999) Influence of milk proteins on κ-carrageenan gelation. **International Dairy Journal**,**v. 9**, p. 359-364.

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.

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

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

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

WIUM, H.; QVIST, K. B. (1997) Rheological properties of UF-Feta cheese determined by uniaxial compression and dynamic testing. **Journal of Texture Studies**, **v. 28 (4)**, p. 435-454.

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

WUNDERLICH, B. (2000) Temperature-modulated calorimetry in the 21st century. **Thermochimica Acta**, **v. 355,** p. 43-57.

YOSHIDA, H.; HATAKEYAMA T.; HATAKEYAMA, H. (1990) Phase–transitions of the water xanthan systems. **Polymer**, **v. 31 (4)**, p. 693-698.

YOSHIDA, H.; HATAKEYAMA, T.; HATAKEYAMA, H. (1992) Characterization of water in polysaccharide hydrogels by DSC. **Journal of Thermal Analysis**, **v. 40**, p. 483-489.

Capítulo 3

Propriedades reológicas a altas e baixas deformações de sistemas proteínas do leite-carragena-sacarose

Índice

Resumo 51

3.1 Introdução 52

3.2 Material e Métodos 55

3.2.1 Material 55

3.2.2 Formulações dos sistemas-modelo: Planejamento Experimental 56

3.2.3 Preparo das formulações 58

3.2.3.1 Ensaios reológicos a baixas deformações 59

3.2.3.2 Ensaios reológicos a altas deformações 60

3.3 Resultados e Discussão 62

3.3.1 Propriedades reológicas a baixas deformações 62

3.3.1.1 Efeitos dos componentes do sistema na temperatura de transição conformacional da κ-carragena 63

3.3.1.2 Varredura de tempo 70

3.3.1.3 Espectro mecânico 72

3.3.1.4 Análise do efeito dos componentes das formulações sobre tan (δ) 75

3.3.1.5 Modelo generalizado de Maxwell 80

3.3.2 Propriedades reológicas a altas deformações 93

3.4 Conclusões 99

3.5 Agradecimentos 100

3.6 Referências Bibliográficas 100

Resumo

As propriedades reológicas a altas e baixas deformações de sistemas proteínas do leite-carragena-sacarose foram avaliadas em compressão uniaxial e cisalhamento oscilatório, respectivamente. A metodologia de planejamento experimental foi utilizada para avaliar o efeito da composição dos sistemas sobre o comportamento reológico. O modelo generalizado de Maxwell foi ajustado aos espectros mecânicos possibilitando a avaliação do tempo de relaxação das diferentes formulações. A carragena contribuiu para favorecer a característica elástica dos sistemas analisados em baixas deformações, assim como o isolado protéico de soro (IPS). O caseinato de sódio pareceu influenciar de maneira oposta, provavelmente devido à interação com a carragena, levando à diminuição da rigidez da rede tridimensional do gel. A influência da sacarose pareceu estar relacionada ao favorecimento das interações do IPS com a carragena, fortalecendo a rede do gel. Já os parâmetros reológicos em altas deformações mostraram que tanto a carragena quanto o caseinato de sódio e IPS atuaram, aumentando a resistência dos sistemas à ruptura. No entanto, em ensaios a altas deformações, o caseinato contribuiu negativamente para a elasticidade dos sistemas enquanto que a carragena e IPS contribuíram positivamente, de maneira similar ao que ocorreu a baixas deformações.

Palavras chave: Reologia, Propriedades mecânicas, Modelo generalizado de Maxwell, κ-carragena, caseinato, isolado protéico de soro, sacarose.

3.1 Introdução

Misturas de proteínas e polissacarídeos são freqüentemente encontradas em sistemas alimentares, sendo que ambos os biopolímeros contribuem para a textura e a vida-de-prateleira do produto. As proteínas podem exercer várias funções nos alimentos, como espessante de soluções, agente gelificante, espumante ou emulsificante, além do aspecto nutricional (Sgarbieri, 1998). Os polissacarídeos são adicionados a produtos alimentícios, para atuar como espessantes e estabilizantes, podendo até formar géis (Syrbe *et al.*, 1998). Estes hidrocolóides são geralmente utilizados em produtos com redução total ou parcial de gordura, de forma a minimizar as alterações da textura do produto e evitar a separação de fases em emulsões (Katzbauer, 1998).

A influência dos hidrocolóides na textura do produto pode depender das interações entre os mesmos e também entre outros biopolímeros e/ou outros componentes do alimento. Conseqüentemente, é importante identificar as condições ótimas nas quais o polissacarídeo pode ser mais efetivo para as propriedades desejadas no produto. Dentre os inúmeros polissacarídeos utilizados em alimentos, a carragena vem sendo largamente usada na indústria de alimentos, principalmente em produtos lácteos.

A carragena é um polissacarídeo aniônico de origem marinha (*Rhodophyta*) que forma géis termorreversíves (Schorsch *et al.*, 2000). Os diferentes tipos de carragenas variam no número e posição dos grupos sulfatos na galactose. A κ-carragena é especialmente utilizada em produtos lácteos, pois apresenta forte interação eletrostática com a κ-caseína. A estrutura da carragena é composta de unidades de D-galactose-4-sulfato, unidas em α-(1→3) e 3,6-anidro-D-galactose ligadas em β(1→4), que se alternam na cadeia principal, e apresenta uma transição conformacional de estrutura ordenada para desordenada dependendo da força iônica e da temperatura (Schorsch *et*

al., 2000). Sob resfriamento, o sistema apresenta um rápido aumento na viscosidade aparente quando o ponto de gelificação é alcançado, o que é promovido pela presença de íons, principalmente K^+ ou Ca^{2+}.

As propriedades viscoelásticas de géis mistos e puros de biopolímeros diferem consideravelmente por causa das interações intermoleculares entre os diferentes componentes da mistura e possível formação de uma rede tridimensional interpenetrante. Ensaios dinâmicos aplicados sob condições de pequena deformação, em baixas freqüências, são convenientes para o estudo do grau de organização estrutural de sistemas poliméricos e das ligações inter e intramolecular em redes entrelaçadas, de géis fortes e físicos fracos (Ross-Murphy, 1995). Os dados obtidos a partir de varreduras de freqüências podem ser usados para caracterizar ou classificar uma dispersão. As quatro classificações mais comuns são: solução diluída, sistema de redes entrelaçadas (ou solução concentrada), gel fraco e gel forte. Uma solução diluída apresenta G" (módulo viscoso ou de dissipação) sempre maior que G' (módulo elástico ou de armazenamento) em todo o intervalo de freqüência, com aproximação dos módulos em freqüências mais altas. Sistemas de redes entrelaçadas apresentam intersecção entre as curvas G' e G" durante o intervalo de freqüências, indicando uma tendência clara de comportamento como sólido a freqüências mais elevadas. Géis fracos ou físicos são dependentes da freqüência, mas não apresentam o cruzamento de G' e G" e G' é sempre maior que G". Em géis fortes ou covalentes, os módulos dinâmicos são independentes da freqüência (Chamberlain & Rao, 2000; Steffe, 1996) e a razão G'/G" é superior a 10. No gel verdadeiro ou forte, existem ligações cruzadas de alta energia de ligação e em géis físicos, as características elásticas são decorrentes da formação de emaranhados de natureza topológica entre as suas moléculas.

Sistemas com mais de um biopolímero exibem comportamentos mais complexos que misturas de polímeros sintéticos. Isto se deve ao fato de que os biopolímeros possuem um equilíbrio relacionado ao estado de ordem – desordem de conformação, além de apresentar transições e separações de fase em determinadas situações (Cèsaro *et al.*, 1999). O comportamento de uma solução com dois biopolímeros é controlado pelo balanço entre os efeitos entálpicos e a entropia do sistema (Syrbe *et al.,* 1998).

Em sistemas formados por proteínas do leite-carragena, com altas concentrações do polissacarídeo (> 0,02%), a gelificação é predominantemente resultado da auto-associação helicoidal da carragena e em menor escala, da interação proteínas do leite-polissacarídeo. Assim, o mecanismo de gelificação e as propriedades mecânicas dos géis são influenciados principalmente pela concentração do polissacarídeo, força iônica e pH do meio. Por outro lado, em baixas concentrações (< 0,02%) de carragena, as proteínas do leite interferem na formação do gel, devido ao predomínio das interações proteína-carragena, reduzindo a disponibilidade da carragena para se auto-associar (Drohan *et al.*, 1997).

Oakenfull *et al.* (1999) estudaram as propriedades térmicas e reológicas de um sistema contendo κ-carragena e caseinato de sódio e propuseram um mecanismo de duas etapas para explicar a formação de géis nesse sistema. Em altas temperaturas, quando a carragena está na forma desordenada e em altas concentrações de caseinato, os dois biopolímeros formam agregados. Durante o resfriamento, a carragena vai se reordenando e começa a gelificar devido à formação de hélices, promovendo uma rede contínua com altos valores de módulo de armazenamento.

A textura e estabilidade de produtos lácteos gelificados são importantes fatores relacionados à sua qualidade, justificando a necessidade de identificar as interações entre os ingredientes presentes nestes produtos. Os ensaios reológicos a altas

deformações, em compressão uniaxial, fornecem informações sobre as propriedades mecânicas do material e apresentam boa correlação com propriedades de textura sensorial (Benedito *et al.*, 2000). Há vários fatores que afetam as propriedades de ruptura de géis, tais como o número de ligações por área de seção transversal da rede e a força de cada ligação (van Vliet *et al.*, 1991), assim como a tortuosidade da rede tridimensional do gel.

O estudo de sistemas-modelo tem grande importância para elucidar as alterações micro e macroscópicas pelas quais os ingredientes passam quando são alteradas as condições de processo (pH, temperatura, força iônica, etc.). No caso de sistemas lácteos, o estudo utilizando leite tornaria difícil a compreensão dos resultados, pois este ingrediente pode ser considerado uma emulsão coloidal de partículas de caseína, associadas em uma forma micelar. Portanto, muitos estudos em sistemas-modelo lácteos são realizados com caseinato de sódio, que além de apresentar, predominantemente, submicelas agregadas (Chu *et al.*, 1995) vêm sendo muito utilizados em produtos lácteos análogos, por exemplo, queijos.

Assim, a interações entre a carragena, caseinato de sódio, isolado protéico de soro (IPS) e sacarose foram analisados utilizando a metodologia de Planejamento Experimental, de forma a entender como a concentração destes componentes influencia os parâmetros reológicos a baixas deformações em cisalhamento oscilatório e as propriedades mecânicas em compressão uniaxial.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material

Os ingredientes utilizados neste estudo para a produção dos diversos sistemas foram: caseína, carragena, isolado protéico de soro (IPS) e sacarose. A caseína

([9000-71-9], Lot 100K0223) e a κ-carragena (C-1013, [9000-07-1], Lot 29H0715) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Corporation (St Louis - USA). O IPS (PSD-826) foi gentilmente cedido pela Arla Food Ingredients (Dinamarca). A sacarose utilizada foi adquirida da Synth (São Paulo, Brasil). A composição dos ingredientes do sistema em estudo é apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição dos ingredientes do sistema proteínas do leite-carragena-sacarose.

	Umidade (%	**Na^+ (%)**	**Ca^{2+}**	**K^+**
Caseína	7,22	0,16	0,14	0,08
Carragena	8,40	0,40	1,60	10,78
IPS	1,33	0,63	0,05	0,65
Sacarose	0,30	-	-	-

3.2.2 Formulações dos sistemas-modelo: Planejamento Experimental

Um planejamento experimental fatorial completo 2^4 com pontos axiais ($\alpha=(2^n)^{1/4}$) foi utilizado para a avaliação das propriedades reológicas a altas e baixas deformações de sistemas-modelo caseinato de sódio-IPS-carragena-sacarose. Os níveis de concentração estudados estão apresentados na Tabela 3.2. As combinações das concentrações para cada formulação do Planejamento experimental analisada estão mostradas na Tabela 3.3.

Os extremos de concentração foram escolhidos com base na formulação de produtos lácteos geralmente adicionados de polissacarídeos, tais como sorvetes, sobremesas congeladas, flans e recheio de tortas.

Os resultados obtidos no planejamento experimental foram analisados utilizando-se o programa Statistica (Statsoft v. 5.0). Assim, os efeitos significativos foram determinados e a análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a validade do modelo obtido.

Tabela 3.2: Variáveis independentes e seus níveis referentes aos ensaios reológicos em altas e baixas deformações dos sistemas-modelo de proteínas do leite-carragena-sacarose.

Níveis	Carragena (% p/v)	Caseína (% p/v)	IPS (% p/v)	Sacarose (% p/v)
-2	0,10	2	0,5	5
-1	0,20	3	0,75	7,5
0	0,30	4	1	10
+1	0,40	5	1,25	12,5
+2	0,50	6	1,5	15

Tabela 3.3: Formulações do Planejamento Experimental 2^4, com pontos axiais e pontos centrais, utilizados para a avaliação de propriedades reológicas a altas e baixas deformações de sistemas-modelo de proteínas do leite-carragena-sacarose.

Formulações	Carragena	Caseína	IPS	Sacarose
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1

12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0

3.2.3 Preparo das formulações

A caseína e o isolado protéico de soro (IPS) em pó foram hidratados separadamente, antes da adição da carragena e sacarose para a posterior realização do tratamento térmico.

A dissolução da caseína em água deionizada foi realizada sob agitação magnética, a uma temperatura inferior a 50ºC. O pH da solução foi constantemente ajustado para 6,7 com adição de solução de NaOH 10 M, até a completa hidratação da caseína e formação do caseinato de sódio.

A hidratação do IPS em água deionizada foi realizada sob agitação magnética por 30 min em temperatura ambiente (25ºC). O pH da solução foi de 6,7 e não foi necessário adicionar NaOH.

As soluções de caseinato de sódio e IPS foram misturadas e aquecidas a 40ºC, sendo então adicionada a sacarose e a carragena, em diferentes concentrações conforme a Tabela do Planejamento Fatorial (Tabela 3.3), sob agitação mecânica, à temperatura de 40ºC por 15 min para a dispersão da carragena (Ribeiro *et al.*, 2003). Um tanque encamisado em sistema-fechado com circulação forçada para um banho termostático foi utilizado para este fim. A agitação mecânica foi realizada com um impulsor tipo hélice marítima.

Após a dissolução da carragena, a solução foi submetida a um tratamento térmico durante 30 minutos, a 70ºC (Schmidt *et al.*, 1984; Morr & Ha, 1993). O resfriamento da solução foi feito em banho de gelo, até alcançar a temperatura de 10ºC. Uma parte desta solução foi imediatamente levada ao reômetro para a realização dos ensaios dinâmicos, enquanto que outra parte foi acondicionada em moldes cilíndricos com diâmetro e altura de 30 mm, por 24 h na temperatura de 5±1ºC.

3.2.3.1 Ensaios reológicos a baixas deformações

As propriedades reológicas a baixas deformações foram determinadas em um reômetro de tensão controlada, com temperatura controlada por sistema Peltier (Carri-Med CSL^2 500, TA Instruments, New Castle, USA). As análises reológicas foram realizadas utilizando uma geometria cone e placa de acrílico com 6 cm de diâmetro e um ângulo de 2º.

As formulações, após o tratamento térmico e resfriamento em banho de gelo, foram colocadas na placa inferior do reômetro, o qual encontrava-se em 30ºC. A amostra em análise foi protegida da perda de umidade e ressecamento da superfície, pois foi utilizado o sistema “solvent-trap”, que permite o equilíbrio do micro-ambiente.

Para a determinação do intervalo de viscoelasticidade linear das formulações, inicialmente foi realizada uma varredura de temperatura, em resfriamento, de 30 a 5ºC, numa taxa de 1ºC/min, em uma freqüência e tensão fixas, de 0,1 Hz e 0,1 Pa, respectivamente. Estes parâmetros foram escolhidos de forma que não ocorresse dano irreversível da estrutura da rede do gel formado durante o resfriamento. Após a gelificação, foi realizada uma varredura de tensão de 0,05 a 5 Pa para determinar o intervalo de viscoelasticidade linear dos sistemas, mantendo a freqüência de 0,1 Hz e a temperatura de 5ºC. Assim, foi escolhido um valor de tensão dentro do intervalo de viscoelasticidade linear para a realização das varreduras efetivas de temperatura, tempo e freqüência.

Nos sistemas-modelo, a varredura de temperatura foi realizada a partir de uma nova amostra a 30 até 5ºC, e taxa de resfriamento de 1ºC/min. Em seguida, realizou-se uma varredura de tempo, na temperatura de 5ºC por 30 min, para analisar se o sistema encontrava-se em equilíbrio, ou seja, não havia variação nos parâmetros reológicos. As varreduras de temperatura e tempo foram realizadas na freqüência constante de 0,1 Hz e tensão escolhida dentro do intervalo de viscoelasticidade linear das formulações. Posteriormente, realizou-se a varredura de freqüência, também dentro do intervalo de viscoelasticidade linear, entre 0,01 e 10 Hz na temperatura de 5ºC, para a determinação do espectro mecânico (G', G" versus freqüência).

3.2.3.2 Ensaios reológicos a altas deformações

As propriedades mecânicas das formulações foram determinadas por ensaios em compressão uniaxial realizados em um texturômetro TA-XT2i Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, Inglaterra). As medidas foram feitas utilizando uma geometria do tipo placa cilíndrica de acrílico com 35 mm de diâmetro, que foi

lubrificada com óleo de silicone de baixa viscosidade de forma a evitar o atrito com a mostra (Rao, 1992; Lau *et al.*, 2000).

Os ensaios de ruptura foram realizados a uma velocidade de compressão de 1 mm/s até 80% de deformação, na temperatura de 5ºC.

As propriedades mecânicas do gel foram determinadas através da curva de tensão-deformação de Hencky, sendo o ponto de ruptura o valor máximo desta curva. Neste ponto, pôde-se determinar as propriedades que fornecem informações sobre as características do material e correlacioná-las com a textura do produto. Estas são a tensão na ruptura (σ_R), apresentada pela equação (3.1) e a deformação na ruptura (ε_R), pela equação (3.2). Um outro parâmetro característico do material e de grande importância na caracterização da textura é o módulo de elasticidade (E) que é mostrado na equação (3.3) (Walkenström & Hermansson, 1994) e é determinado a partir da tangente da região linear inicial da curva tensão-deformação (Rosenthal, 1999; Steffe, 1996).

$$\sigma_H = F(t)\left[\frac{H(t)}{H_0 A_0}\right] \tag{3.1}$$

$$\varepsilon_H = -\ln\left[\frac{H(t)}{H_0}\right] \tag{3.2}$$

$$E = \frac{d\sigma_H}{d\varepsilon_H}\Big|_{\varepsilon \approx 0} \tag{3.3}$$

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.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Propriedades reológicas a baixas deformações

A varredura de temperatura permitiu observar o comportamento da transição conformacional da carragena presente nos sistemas e a influência dos demais componentes nesse processo. Este comportamento pode ser observado através da análise da variação de G* em função da temperatura. Assim, a temperatura de início de transição conformacional da carragena ou a temperatura de início de gelificação dos sistemas, na qual há um rápido aumento de dG*/dT, pode ser determinada para cada formulação.

A varredura de freqüência possibilitou a discussão sobre os diferentes comportamentos das formulações e permitiu o ajuste do Modelo generalizado de Maxwell, assim, uma melhor caracterização dos sistemas foi realizada e os parâmetros obtidos (tempo de relaxação, viscosidade de Maxwell e tempo médio de relaxação) foram analisados através da metodologia de Planejamento Experimental.

3.3.1.1 Efeitos dos componentes do sistema na temperatura de transição conformacional da κ-carragena

O comportamento reológico a baixas deformações durante a gelificação das formulações foi avaliado sob varredura de temperatura em resfriamento, a partir de 30ºC, na qual as formulações encontravam-se no estado sol, até 5ºC, quando as formulações gelificaram. Na temperatura de 30ºC, a κ-carragena deve encontrar-se no estado enovelado, dispersa pela solução. A carragena passa por uma transição conformacional do estado desordenado para o estado ordenado em uma determinada temperatura inferior a 30ºC, que é função do pH, força iônica e quantidade e tipo de partículas carregadas, por exemplo K^+ e Ca^{2+}. A passagem do estado desordenado para o estado ordenado conduziu à gelificação.

A varredura de temperatura de 30ºC a 5ºC em uma taxa de 1ºC/min possibilitou a obtenção da temperatura do início de transição conformacional, através do gráfico de G^* (Pa) versus temperatura (ºC), quando ocorre um brusco aumento de G^*, confirmado pela mudança na variação de dG^*/dT. Esta temperatura foi considerada o início da transição do sistema, metodologia utilizada por Tziboula & Horne (1999), na avaliação da influência das proteínas do leite na gelificação da κ-carragena. Na Figura 3.1 pode ser observada a metodologia de obtenção da temperatura de início de transição conformacional da carragena, a qual consiste na extrapolação dos segmentos e determinação do ponto de cruzamento.

Os gráficos de G*(Pa) versus temperatura (ºC) em algumas formulações mostraram que o processo de formação da rede tridimensional do gel, provavelmente aconteceu em duas etapas (Figura 3.1 – Ensaio 03). Nesse caso, observou-se um aumento brusco em dG*/dT, mantendo-se constante até uma dada temperatura em que novamente esta taxa se modificou, o que levou a admitir uma segunda etapa de

agregação mais lenta que a primeira. No entanto, para a maioria das formulações, observou-se que a formação da rede tridimensional do gel ocorreu em uma única etapa (Figura 3.1 – Ensaios 01, 17 e 27). Este comportamento também foi observado por Tziboula & Horne (1999) em sistemas contendo κ-carragena, em concentração acima de 170 ppm, dispersa em leite desnatado. Em sistemas contendo κ-carragena dispersa em soluções de proteínas do soro, livre de caseínas e com força iônica igual ao do leite desnatado, esses autores observaram que houve a formação de agregados em temperaturas próximas à temperatura de transição conformacional (em torno de 38ºC). Sob contínuo resfriamento das amostras, a gelificação da κ-carragena ocorreu mais rápido que a agregação do complexo proteínas do soro-carragena, assim houve uma recuperação da formação da estrutura do gel, notado pelo contínuo aumento de G*. A formação do complexo κ-carragena – proteínas do soro teve um efeito negativo na estrutura formada, no entanto a gelificação da carragena pareceu se sobrepor a esses agregados e ocorreu a formação do gel. Drohan *et al.* (1997) observaram que na presença de proteínas do leite, a gelificação ocorreu em concentrações relativamente menores e em temperaturas abaixo da temperatura de transição conformacional (desorder(coil)-to-order(helix)) da carragena.

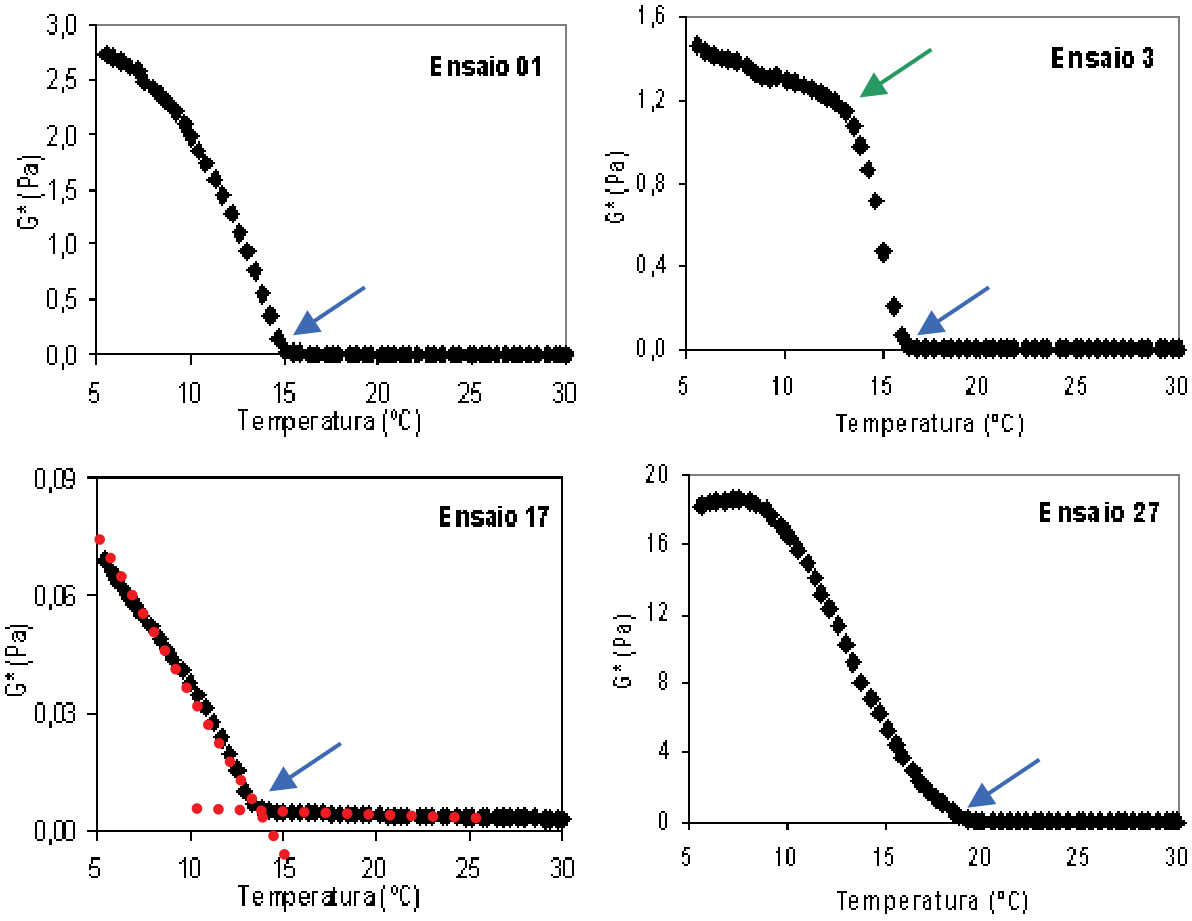
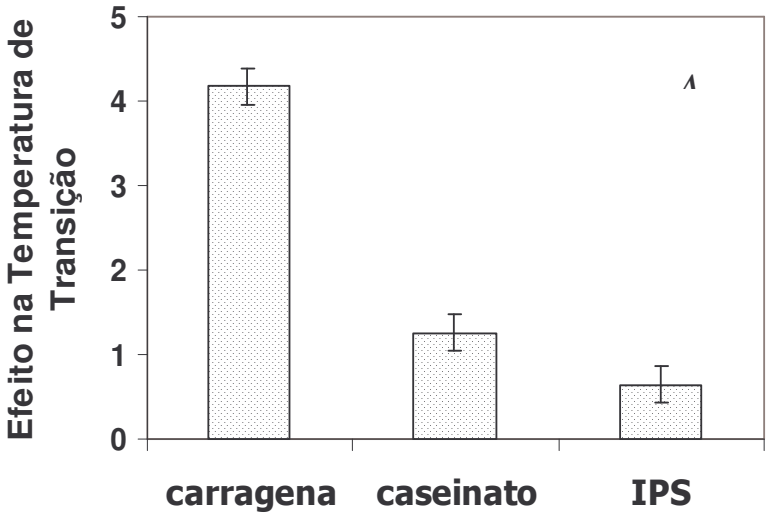


Figura 3.1: Comportamento do módulo complexo (G*(Pa)) durante a varredura de temperatura, para as formulações 01, 03, 17 e 27 (Tabela 3.3).

A avaliação do efeito dos componentes do sistema sobre a temperatura de transição conformacional mostrou que a maior contribuição para o aumento desse fator foi atribuído à carragena, seguida pelo caseinato de sódio e IPS (Figura 3.2A). O fato da carragena ter apresentado a maior contribuição para a obtenção dos maiores valores de

temperatura de transição está relacionado ao fato de que a formação de duplas hélices de carragena é o principal responsável pela gelificação do sistema. A análise de efeitos mostrou que o efeito da sacarose nos sistemas não foi estatisticamente significativo ($p<0,05$), com o qual, esta não deve estar participando do processo inicial da formação do gel .



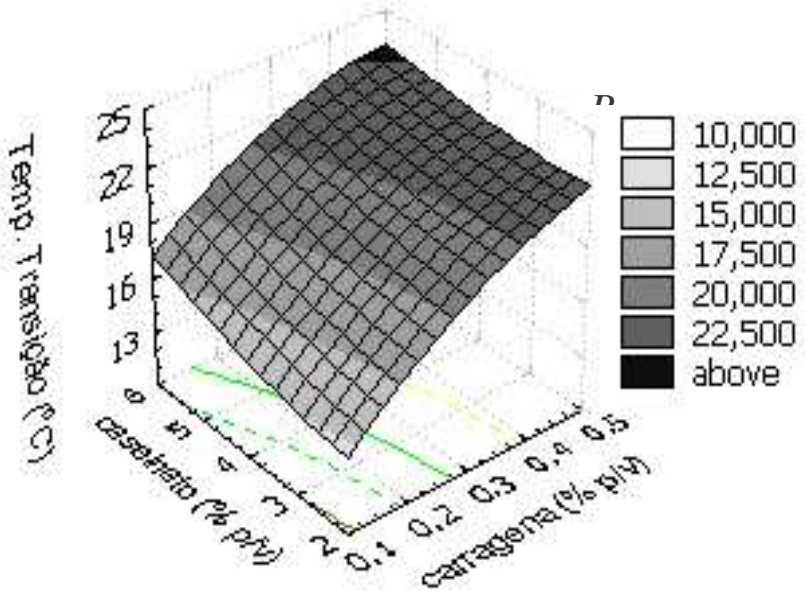


Figura 3.2: (A) Efeito ($p<0,05$) da carragena, caseinato de sódio e IPS na Temperatura de transição conformacional. (B) Variação da temperatura de transição em relação à composição de carragena e caseinato, com a concentração de IPS e sacarose fixas, em 1% (p/v) e 10% (p/v), respectivamente.

A superfície de resposta (Figura 3.2 B) mostrou que as maiores temperaturas de transição foram obtidas em máximas concentrações de caseinato e carragena. Isso mostrou que a interação da κ-carragena com o caseinato e IPS promoveu um aumento da temperatura (de transição) na qual o sistema passa do estado desordenado para o estado ordenado. Provavelmente, isto está relacionado ao fato de que no estado ordenado as proteínas do leite interagiram com a κ-carragena formando agregados mais facilmente em altas concentrações de proteínas. Estes agregados, provavelmente favoreceram a formação de duplas hélices de carragena (estado ordenado), em temperaturas mais altas que em baixas concentrações de proteínas. Os resultados obtidos por Tziboula & Horne (1999) mostraram que a κ-carragena foi capaz de formar complexos tanto com as micelas de caseína como com as proteínas do soro. Em relação às micelas de caseína há uma forte interação eletrostática que é primeiramente satisfeita, reduzindo a disponibilidade da carragena para a gelificação. Em altas concentrações do polissacarídeo, os efeitos de gelificação da carragena dominam o sistema aprisionando ("entrapping") as micelas de caseína e os complexos micela de caseína-carragena. Em relação às proteínas do soro, os resultados mostraram que, possivelmente, também ocorre a formação de agregados destas proteínas com a carragena. Além disso, em altas concentrações do polímero, o processo de gelificação da κ-carragena, quando as hélices desta se associam para formar a estrutura tridimensional, se sobrepõe à sua agregação com as proteínas do soro, aprisionando os agregados na rede de carragena no estado gel. Tziboula & Horne (1999) observaram que os géis formados com as proteínas do soro foram mais fortes que os formados com leite desnatado ultrafiltrado (peso molecular de corte de 10 kDa) e leite desnatado, sendo que a análise utilizando o leite desnatado

ultrafiltrado foi realizada para estudar a influência da força iônica (igual ao de leite desnatado e da solução de proteínas do soro) no processo de gelificação da κ-carragena.

O modelo matemático codificado, obtido a partir do planejamento experimental, que descreve o comportamento da temperatura de transição conformacional é apresentado pela equação 3.4. Este modelo é estatisticamente válido ao nível de confiança de 95%, pois a relação de F_{cal} =13,98 $F_{tab(0,95;\ 6;\ 21)}$ é elevada. A falta de ajuste do modelo não é estatisticamente significativa, pois $F_{falta\ de\ ajuste}$ = 0,29 F_{tab}. O coeficiente de correlação foi 0,86.

$$T_{TR} = 18{,}84 + 2{,}09.CAR - 0{,}32.(CAR)^2 + 0{,}63.CAS + 0{,}32.IPS - 0{,}32.(IPS)^2 \qquad (3.4)$$

onde a T_{TR} é a temperatura de início de transição conformacional, CAR é a carragena, CAS é o caseinato e IPS é o isolado de proteínas do soro.

3.3.1.2 Varredura de tempo

Os gráficos de alguns ensaios de varredura de tempo estão apresentados na Figura 3.3, mostrando o comportamento geral dos sistemas. Este ensaio foi realizado de forma a se verificar o comportamento dos sistemas em cisalhamento por 30 minutos a 5ºC, dentro do intervalo de viscoelasticidade linear. Os sistemas gelificaram em um tempo relativamente curto, durante o resfriamento e a varredura de tempo (no máximo 55 min), mostrando que os valores dos parâmetros reológicos estavam em equilíbrio. Nesse caso, espera-se que não haja mais alteração dos módulos dinâmicos e essa situação foi praticamente alcançada na maioria dos casos, com exceção das formulações que possuíam elevado teor de carragena, provavelmente pelo fato que a formação da rede tridimensional promovida pela transição da conformação da κ-carragena de um estado desordenado para o estado ordenado seja um processo dinâmico e dependente da taxa de resfriamento do sistema (Drohan *et al.,* 1997). O processo de gelificação da κ-

carragena tem sido atribuído à formação de hélices (estado ordenado) que se associam em pares e formam rígidos segmentos que se unem formando extensas associações em nível supermolecular, no qual dois ou mais conjuntos são alinhados em paralelo ou agrupados de forma compacta (Hermansson, 1989; Sugiyama *et al.,* 1994; Borgström *et al.,* 1996).

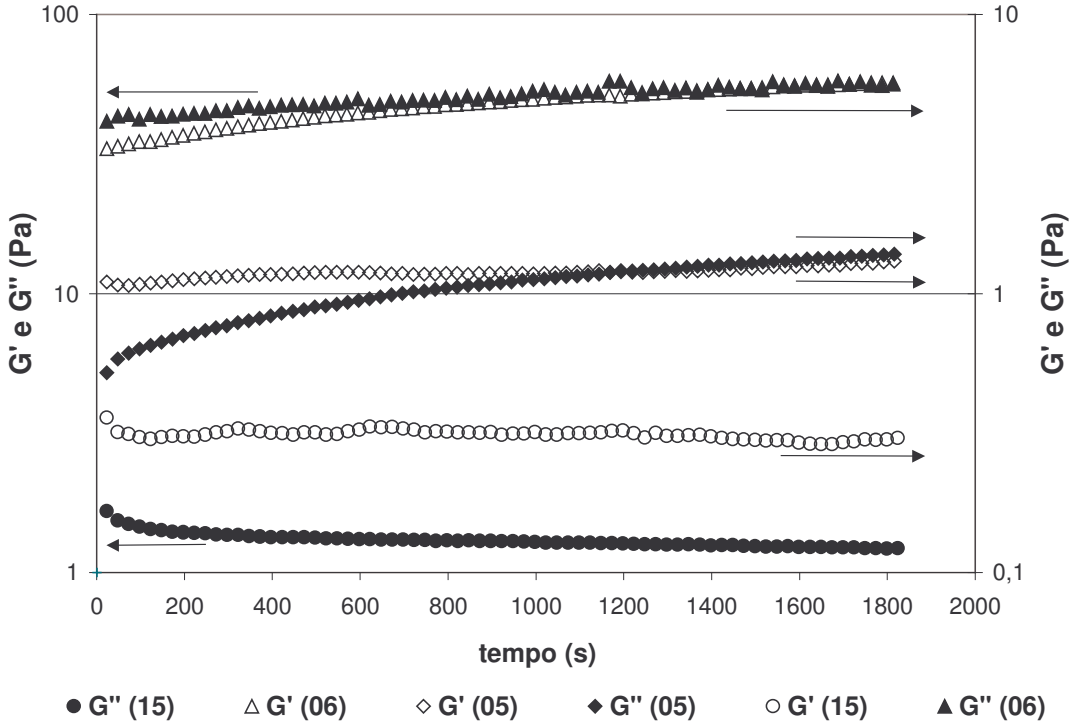


Figura 3.3: Variação dos módulos dinâmicos G' (símbolos abertos) e G'' (símbolos fechados) durante a varredura de tempo realizada dentro do intervalo de viscoelasticidade linear dos sistemas. Na Figura foram apresentadas as formulações 05, 06 e 15.

3.3.1.3 Espectro mecânico

Os espectros mecânicos para algumas formulações estão apresentados na Figura 3.4, na qual observou-se a ocorrência da característica de solução diluída para a formulação 28, a qual apresentou G”>G’ durante todo intervalo de freqüência analisado e os módulos se aproximaram em altas freqüências. A formulação 06 apresentou características próximas a de um gel forte, no qual os módulos apresentaram pouca dependência com a freqüência e G’/G” é próximo a 10. A formulação 08 apresentou comportamento típico de sistemas de redes entrelaçadas, apresentando o cruzamento dos módulos durante o intervalo de freqüências.

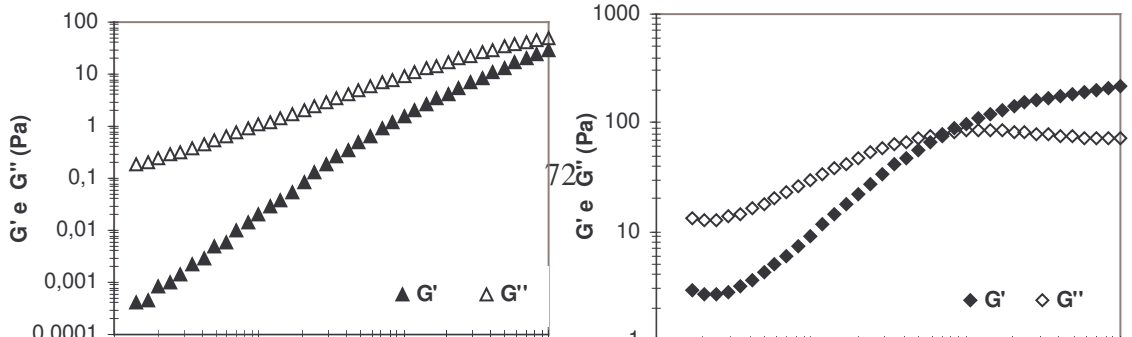


Figura 3.4: Espectro mecânico das formulações 06, 08 e 28 (Tabela 3.3). Os símbolos fechados representam os módulos elásticos e os abertos representam os módulos viscosos.

As demais formulações do planejamento experimental (Tabela 3.3) apresentaram comportamentos que variaram entre a solução diluída e gel forte. Em menores concentrações de carragena, houve a tendência de comportamento de solução diluída, o que foi confirmado pelos resultados de tan(δ).

Tabela 3.4: Valores de tan(δ) nas frequências de oscilação de 0,1, 1 e 5 Hz das formulações de sistemas-modelo proteínas do leite-carragena-sacarose (Tabela 3.3).

	tan(δ)		
Formulações	**0,1 Hz**	**1 Hz**	**5 Hz**
1	14,82	2,11	1,20
2	0,08	0,12	0,17
3	41,51	6,68	2,11

4	2,67	2,03	1,45
5	1,57	0,44	0,54
6	0,09	0,11	0,14
7	49,55	6,37	2,39
8	3,16	0,86	0,40
9	10,29	2,67	1,34
10	0,28	0,35	0,24
11	51,25	2,78	1,11
12	6,61	2,10	0,88
13	3,18	0,61	0,53
14	0,09	0,12	0,14
15	4,90	1,76	1,14
16	0,07	0,28	0,34
17	88,22	9,87	3,76
18	0,37	0,95	0,83
19	0,16	0,23	0,34
20	31,04	2,88	1,04
21	34,09	2,91	1,01
22	18,37	3,36	1,20
23	72,02	4,56	1,39
24	14,47	3,26	1,15
25	39,01	6,36	2,27
26	26,87	4,50	2,30
27	51,95	7,02	2,80
28	36,89	6,06	2,49

Langendorff *et al.* (2000) estudaram os efeitos do tipo de carragena no comportamento de misturas de carragena e leite e relataram que a dependência do módulo elástico em relação à concentração de micelas de caseínas sugere que estas participam ativamente na rede tridimensional. Entretanto, esses autores observaram que o comportamento reológico dominante permanece similar ao da κ-carragena sozinha.

Schorsch *et al.* (2000) estudaram sistemas de caseína micelar e κ-carragena e sugeriram que para sistemas com alta fração volumétrica de micelas dispersas, uma baixa concentração de carragena foi suficiente para formar pontes entre os grupos restantes das micelas e gelificar. No entanto, observou-se que na maior parte dos sistemas estudados, a rede formada foi fraca e o comportamento se assemelhou a dispersões diluídas e concentradas, ocorrendo em menor proporção a formação de géis

fracos (G'/G"<10) e fortes (G'/G">10). A carragena, provavelmente, atuou formando uma rede tridimensional que conferiu uma maior característica elástica ao sistema, com o aumento da concentração.

A interação da carragena com as proteínas (caseinato de sódio e proteínas do soro) pode ter afetado o comportamento dos sistemas estudados, visto que os agregados formados podem ser envolvidos pela rede tridimensional do gel e influenciar o comportamento de resposta de rede formada ao estímulo, podendo contribuir para uma característica mais elástica ou viscosa.

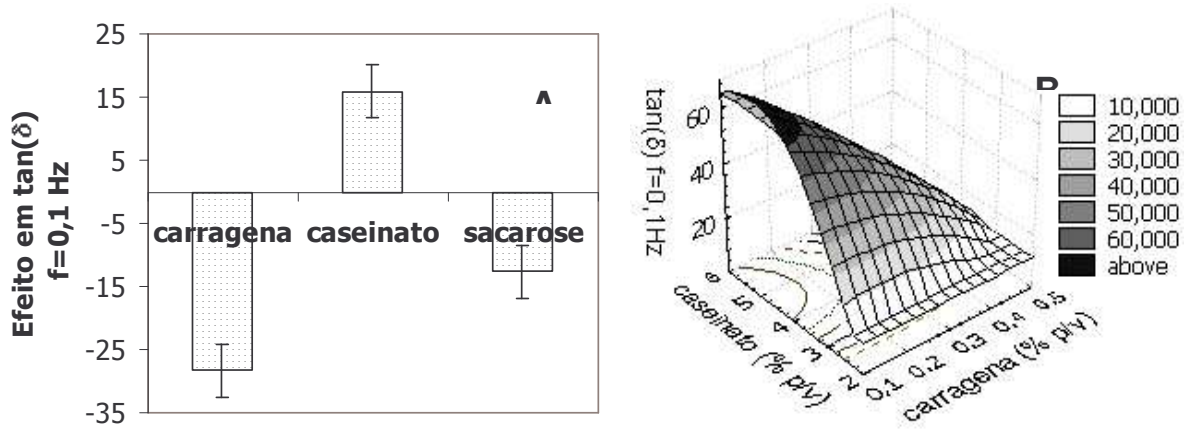
3.3.1.4 Análise do efeito dos componentes das formulações sobre tan (δ)

A análise dos comportamentos de tan(δ) nas frequências de 0,1, 1 e 5 Hz mostrou que em freqüências mais baixas, quando o sistema possui um maior tempo de resposta ao estímulo (relaxação de tensões), o valor de tan(δ) foi maior que os valores observados quando houve um aumento da frequência, ou seja, o valor de G" foi maior que G'. Em frequências altas, o sistema não possui tempo suficiente para relaxar ao estímulo, apresentando comportamento semelhante a um sólido elástico. Isso mostra que o sistema apresentou uma diminuição do comportamento viscoso e consequentemente um aumento do comportamento elástico com o aumento da freqüência. Assim, foi possível assumir (Bryant & McClements, 2000) que os arranjos microestruturais foram capazes de relaxar dentro do intervalo de tempo da tensão aplicada em baixas freqüências, fazendo com que o sistema parecesse menos rígido. Em altas freqüências, não houve tempo suficiente para o processo de relaxação acontecer, assim o sistema mostrou ser mais rígido.

Na maior parte das formulações estudadas, o valor de tan(δ) foi maior que um, mostrando que a característica destes sistemas é predominantemente de um líquido. No

entanto, a partir das superfícies de respostas mostradas nas Figuras 3.5 B, D e F, notou-se que em baixas concentrações de caseinato de sódio, o valor de tan(δ) esteve entre 0 e 1, o que significa que G”<G’ e o sistema apresentou uma resposta como sólido elástico (ângulo δ<45º), além de ser praticamente independente da concentração de carragena.

Através dos gráficos de efeito (Figura 3.5 A, C e E), observou-se que o aumento da concentração do caseinato contribuiu para maiores valores de tan(δ), enquanto que o aumento das concentrações de carragena e sacarose promoveram uma diminuição dos valores de tan(δ). O caseinato, após o equilíbrio do gel, provavelmente provocou a ruptura da uniformidade da rede do gel formado pela carragena, devido ao fato de ter contribuído para a característica viscosa destes. Além disso, pôde-se observar que a carragena mostrou uma influência mais acentuada que a sacarose.



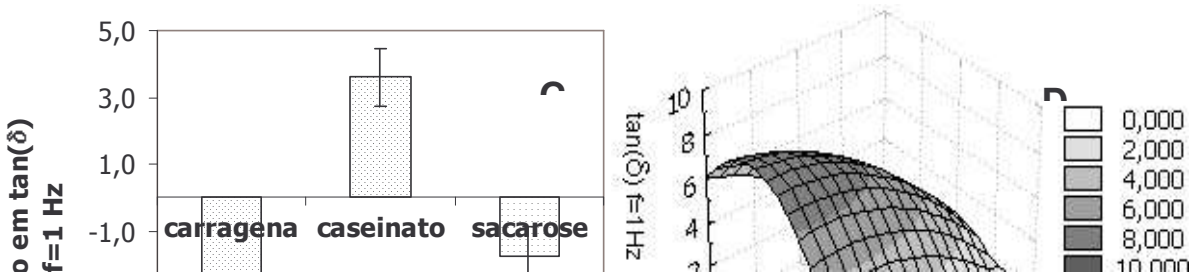


Figura 3.5: (A), (C) e (E) Efeito ($p<0,10$) da carragena, caseinato de sódio, IPS e sacarose nos valores de tan(δ) nas freqüências 0,1; 1 e 5 Hz. (B), (D) e (F) Variação dos valores de tan(δ) em relação a concentração de caseinato de sódio e carragena. Os valores das concentrações de IPS e sacarose foram fixados em 1% e 10 % (p/v), respectivamente.

Os modelos matemáticos codificados de tan(δ) nas freqüências de 0,1, 1 e 5 Hz em função dos componentes (caseinato de sódio, IPS, carragena e sacarose) dos sistemas foram obtidos a partir do planejamento experimental. A validade estatística dos modelos foram obtidas pela Análise de Variância, em um nível de confiança de 90%, as relações de F_{cal}/F_{tab}, F_{FA}/F_{calc} e os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Parâmetros dos modelos matemáticos codificados para tan(δ) nas freqüências 0,1, 1 e 5 Hz. O nível de confiança desses modelos foi de 90%.

	tan(δ)		
	0,1 Hz	**1 Hz**	**5 Hz**
Média	33,55	5,35	2,46
CAS	7,96	0,90	0,29
CAR	-14,15	-1,47	-0,52
SAC	-6,33	-	-0,13
$(CAR)^2$	-	-	-0,12
$(CAS)^2$	-8,32	-1,28	-0,52
$(IPS)^2$	-5,67	-0,89	-0,42
$(SAC)^2$	-	-0,69	-0,37
CAR.CAS	-6,58	-	-
CAS.SAC	-	-0,62	-0,19
F_{cal}/F_{tab}	2,41	5,75	5,97
F_{FA}/T_{tab}	0,44	0,29	0,67
R^2	0,64	0,72	0,85

Onde tan(δ)=G”/G’, CAR é a carragena, CAS é o caseinato, IPS é o isolado de proteínas do soro e SAC é a sacarose.

O comportamento de tan(δ) nas várias freqüências foi consequência das interações entre as proteínas do leite e κ-carragena, que são mais favoráveis a valores de pH superiores a 5, e este efeito sinergístico é maior quando a proteína passa por tratamento térmico, conforme observado por Mleko *et al.* (1997). Tal atração é particularmente forte e acontece ainda quando a proteína e o polissacarídeo sulfatado estão carregados negativamente (Gringberg & Tolstoguzov, 1997).

Tziboula & Horne (1999) relataram que a κ-carragena também formou agregados com as proteínas do soro, inclusive levando à formação de géis mais fortes do que os formados com o leite em condições semelhantes. Na presença de proteínas do

soro, a gelificação aconteceu em uma única etapa, correspondendo à transição conformacional da carragena e conseqüente gelificação. Na mistura de carragena com proteínas do leite dois eventos independentes e antagônicos podem ocorrer: (1) a formação de um complexo entre a κ-carragena e as proteínas do leite que interfere na formação do gel e a (2) formação da rede elástica de carragena e a gelificação. O complexo proteínas do leite-carragena é aprisionado na rede tridimensional formada pela carragena. As características reológicas dessas misturas são governadas por fatores que influenciam ambos os eventos citados (Tziboula & Horne, 1999).

Nos sistemas estudados, não foi observada a influência do IPS, provavelmente porque este se encontrava em concentrações muito menores que o caseinato, que contribuiu positivamente para o aumento do valor de tan(δ) em todas as freqüências analisadas. Este efeito do caseinato em favorecer a característica viscosa do sistema, provavelmente está relacionado aos agregados de carragena-caseinato aprisionados na rede de carragena levando à diminuição da rigidez desta rede.

A forte interação eletrostática entre os grupos sulfato negativos da carragena e as cargas positivas da κ-caseína, no intervalo de pH entre 6 e 7 (Heertje, 1993; Tziboula & Horne, 1999; Schorsch *et al.*, 2000), levou a um aumento do valor de G' no início da gelificação, mas com o tempo houve uma acomodação estrutural que resultou na diminuição do valor do módulo de armazenamento, o que pode ter sido induzida pela sinerese (Lundin & Hermansson, 1998). Nos sistemas estudados não foi notada a sinerese e isso pode ser atribuída à presença de outros componentes, em especial a sacarose, que podem estar se ligando fortemente à água, portanto tal acomodação estrutural pode ter acontecido.

O efeito negativo da sacarose sobre a tan(δ), provavelmente devido ao fato de que a sacarose agiu favorecendo as interações proteína-proteína, o que foi anteriormente observado em sistemas compostos por moléculas de proteínas do leite e sacarose (Kulmyrzaev *et al.*, 2000 a,b). Mora-Gutierrez *et al.*, (1997) observaram que a adição de açúcares favoreceu interações eletrostáticas atrativas mais fortes entre proteína-proteína e Antipova *et al.* (1999) também notaram o fortalecimento das interações atrativas proteína-proteína em caseinato. Phillips *et al.* (1994) atribuíram aos açúcares o efeito principal na promoção das interações hidrofóbicas através da modificação da estrutura da água nas imediações das proteínas. Dickinson & Merino (2002) observaram que em emulsões estabilizadas por caseinato, a presença de açúcares provavelmente aumentou o número efetivo e a força das interações entre as partículas, assim levando a um maior grau de interconectividade da microestrutura do gel.

Possivelmente, a contribuição da sacarose em favorecer a característica elástica dos sistemas analisados pode estar relacionada ao fato desta influenciar fortemente as interações entre as proteínas. Assim, o IPS, mesmo não sendo estatisticamente significativo ($p<0,10$) em influenciar o valor de tan(δ) poderia estar fortalecendo a rede do gel, através de interações proteína-proteína levando a um maior grau de interconectividade da microestrutura da rede tridimensional.

3.3.1.5 Modelo generalizado de Maxwell

Os espectros mecânicos foram ajustados de acordo com as equações do modelo generalizado de Maxwell (Equações 2.20 e 2.21 do Capítulo 2). Os seguintes parâmetros foram obtidos: G_i (módulos do espectro de relaxação), λ_i (tempos de relaxação de Maxwell), as viscosidades de cada elemento (amortecedor) de Maxwell ($\eta_i = \lambda_i \cdot G_i$) e tempo médio de relaxação de Maxwell (θ) calculado pela equação 2.19 do

Capítulo 2. Os valores de G_i, λ_i, θ e η_i obtidos para cada formulação são apresentados na Tabela 3.6. Foram necessários de dois a seis elementos de Maxwell para descrever satisfatoriamente o comportamento viscoelástico das formulações. Isto implica que os sistemas formados podem ser representados por um conjunto de elementos que possuem vários tempos de relaxação (Shchipunov *et al.*, 2001).

Tabela 3.6. Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo generalizado de Maxwell os espectros mecânicos das formulações de sistemas-modelo proteínas do leite-carragena-sacarose.

Elementos	Formulação 01				Formulação 02			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	5,69	0,83	4,73	0,90	96,00	1125	107974	112479
i = 2	29,96	0,07	2,14		18,51	12,88	238,41	
i = 3					26,51	0,56	14,96	
i = 4					139,09	0,02	2,65	

Elementos	Formulação 03				Formulação 04			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	12,30	0,20	2,49	0,22	39,32	0,76	29,84	0,82
i = 2	102,05	0,02	1,71		302,04	0,06	17,70	

Continuação da Tabela 3.6.

Elementos	Formulação 05				Formulação 06			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	4,22	4,35	18,34	4,35	54,96	51706	2842012	51745
i = 2	9,96	1 E-03	0,01		10,21	35,78	365,45	
i = 3	591,43	7 E-04	0,43		7,79	3,39	26,41	
i = 4					10,83	0,46	4,99	
i = 5					30,19	0,06	1,74	

Elementos	Formulação 07				Formulação 08			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	16,63	0,18	3,02	0,18	134,58	1,70	228,34	1,87
i = 2	591,58	3 E-03	1,90		123,90	0,18	22,05	

Elementos	Formulação 09				Formulação 10			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	12,59	0,29	3,65	0,29	48,74	398,27	19410	405
i = 2	197,21	5 E-03	0,94		23,51	5,59	131,33	
i = 3					50,95	0,75	38,03	
i = 4								

Continuação da Tabela 3.6.

Elementos	Formulação 11				Formulação 12			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	12,28	0,36	4,39	0,36	109,93	0,54	58,83	0,62
i = 2	592,04	1 E-03	0,88		204,74	0,08	16,68	

Elementos	Formulação 13				Formulação 14			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	5,83	3,77	21,97	4,32	78,87	2433	191888	2456
i = 2	4,89	0,55	2,70		19,11	22,49	429,88	
i = 3	117373	5 E-06	0,64		24,92	1,13	28,09	
i = 4					49,59	0,05	2,46	

Elementos	Formulação 15				Formulação 16			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	8,28	0,66	5,45	0,70	116,34	1109	129050	1112
i = 2	36,02	0,05	1,63		30,68	3,20	98,28	
i = 3					86,04	0,24	21,05	
i = 4					1412,41	3 E-03	4,50	

Continuação da Tabela 3.6.

Elementos	Formulação 17				Formulação 18			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	0,31	0,34	0,10	0,39	37,13	207,91	7720	208
i = 2	6,57	0,04	0,30		251,94	0,17	43,82	

Elementos	Formulação 19				Formulação 20			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	7,48	368,88	2758	379	66,58	0,41	27,38	0,47
i = 2	3,08	8,99	27,64		152,12	0,06	8,77	
i = 3	4,32	0,63	2,74					
i = 4	53,87	0,01	0,67					

Elementos	Formulação 21				Formulação 22			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	44,60	0,31	13,66	0,31	64,50	0,23	15,15	0,24
i = 2	473,26	4 E-03	1,88		495,78	5 E-03	2,33	

Continuação da Tabela 3.6.

Elementos	Formulação 23				Formulação 24			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	54,68	0,21	11,44	0,21	60,80	0,25	14,94	0,25
i = 2	493,70	5 E-03	2,38		503,44	4 E-03	2,22	

Elementos	Formulação 25				Formulação 26			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	43,90	0,15	6,72	0,16	7,67	0,42	3,23	0,47
i = 2	539,88	0,01	3,22		99,63	0,05	4,66	

Elementos	Formulação 27				Formulação 28			
de Maxwell	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**	**G_i (Pa)**	**λ_i (s)**	**η_i (Pa.s)**	**θ (s)**
i = 1	20,37	0,18	3,63	0,20	14,40	0,27	3,94	0,31
i = 2	169,41	0,02	3,76		153,39	0,04	5,42	

Em baixas concentrações de carragena, o tempo de relaxação de Maxwell apresentou os menores valores, sendo mais notável em uma faixa de baixa concentração de caseinato de sódio. Assim, soluções com menor concentração desses componentes exibiram tempos de relaxação semelhantes a um líquido viscoso. Entretanto, os maiores valores foram observados em altas concentrações de carragena e baixas concentrações de caseinato de sódio.

Na análise das formulações utilizando a metodologia de Planejamento Experimental, o maior tempo de relaxação (λ_M) e o maior valor de viscosidade de Maxwell (η_M) foram considerados por representarem os elementos de Maxwell mais importantes dos sistemas analisados. Na Figura 3.6 A, C e E podem ser observados os efeitos positivos da carragena e IPS e o efeito negativo do caseinato sobre o λ_M, θ e η_M. As redes tridimensionais tornaram-se mais fortes com o aumento da concentração de carragena e o sistema passou a ter um tempo de relaxação maior. Por outro lado, o aumento da concentração de caseinato levou a uma diminuição do tempo de relaxação, ou seja, promoveu uma diminuição do comportamento sólido do sistema. Provavelmente, as moléculas ou agregados de caseinato de sódio aprisionadas na rede formada pelas hélices de carragena no estado ordenado promoveram a diminuição da rigidez da estrutura tornando-a mais flexível, diminuindo assim, a característica elástica do sistema. O isolado protéico de soro (IPS) também favoreceu o aumento do tempo de relaxação quando a sua concentração foi aumentada, provavelmente pela interação e formação de rede com as outras macromoléculas presentes no sistema. O tempo médio de relaxação e a viscosidade apresentaram o mesmo comportamento. A sacarose, mesmo

não possuindo efeito estatisticamente significativo ($p<0,05$) poderia favorecer as interações entre as proteínas do soro, que mesmo em pequenas concentrações contribuiu positivamente para um aumento no valor do tempo de relaxação.

Nas superfícies de respostas mostradas nas Figuras 3.6 B, D e F, notou-se que os menores valores de λ_M (maior tempo de relaxação), η_M (maior valor de viscosidade) e θ (tempo médio de relaxação) para as formulações analisadas, foram obtidas em concentrações mínimas de carragena e caseinato de sódio.

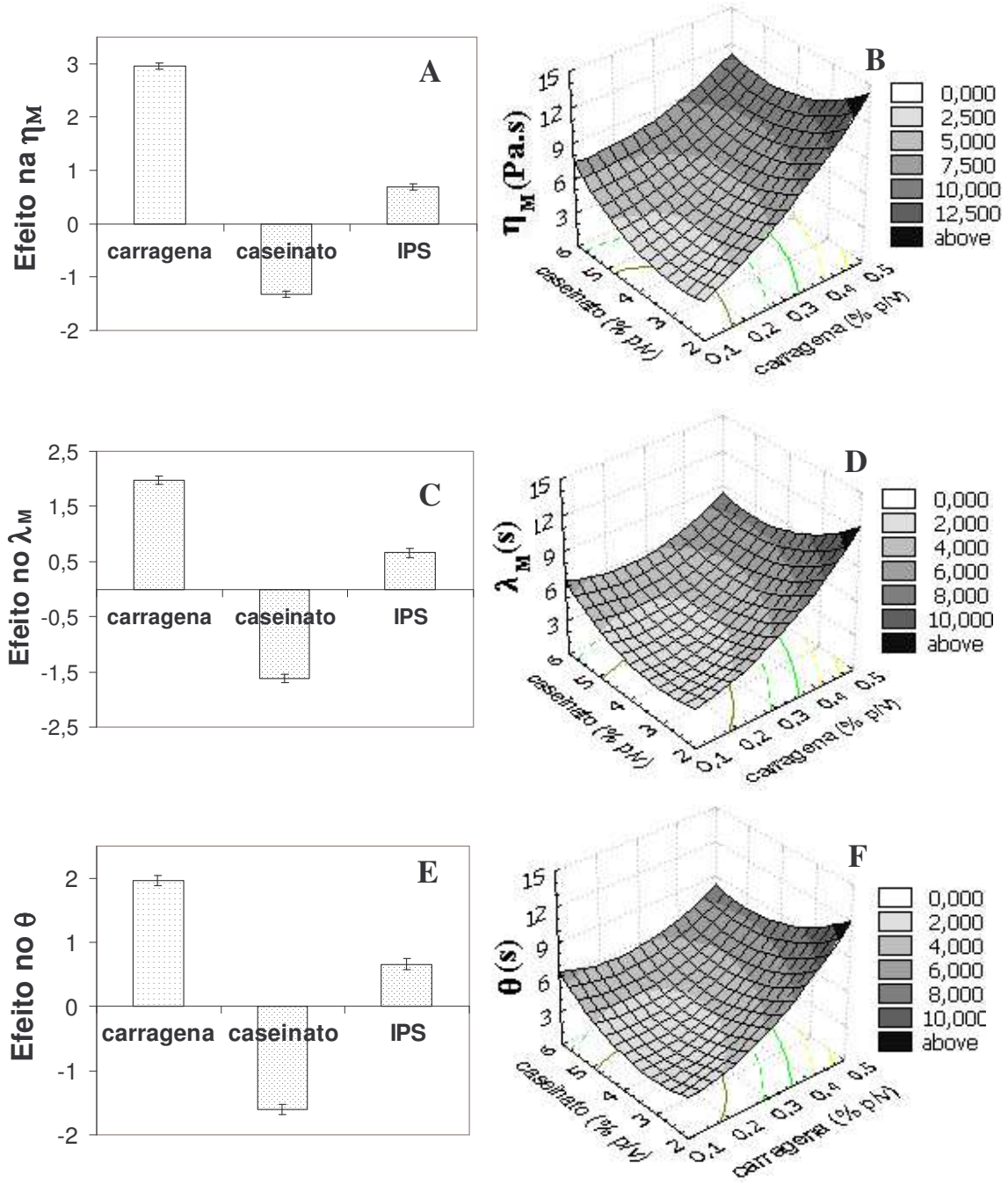


Figura 3.6: (A), (C) e (E) Efeito ($p<0,05$) da carragena, caseinato de sódio e IPS nos valores da viscosidade de Maxwell (η_M), tempo de relaxação de Maxwell (λ_M) e tempo médio de relaxação

(θ), respectivamente; (B), (D) e (F) Variação dos valores da viscosidade de Maxwell (η_M), tempo de relaxação de Maxwell (λ_M) e tempo médio de relaxação (θ) em relação à concentração de caseinato de sódio e carragena. Os valores das concentrações de IPS e sacarose foram fixados em 1,5% e 15% (p/v), respectivamente.

Os modelos matemáticos codificados foram obtidos a partir da metodologia do planejamento experimental. A validade estatística dos modelos foram obtidas pela Análise de Variância, em um nível de confiança de 95%, as relações de F_{cal}/F_{tab}, F_{FA}/F_{tab} e os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Parâmetros dos modelos matemáticos codificados para maior tempo de relaxação de Maxwell (λ_M), do tempo médio de relaxação de Maxwell (θ) e do maior valor de viscosidade de Maxwell (η_M). O nível de confiança desses modelos foi de 95%.

	Parâmetros de Maxwell		
	$\log(\lambda_M)$	**$\log(\eta_M)$**	**$\log(\theta)$**
Média	-0,32	0,62	-0,29
CAS	-0,81	-0,66	-0,80
CAR	0,99	1,48	0,98
IPS	0,33	0,34	0,33
SAC		0,26	
$(CAR)^2$	0,46	0,35	0,46
$(CAS)^2$	0,50	0,59	0,50
$(IPS)^2$	-	0,27	-
CAR.CAS	-0,51	-0,55	-0,50
CAR.IPS	0,25	0,32	0,25
CAS.SAC	0,36	0,34	0,36
IPS.SAC	0,18	0,14	0,18
F_{cal}/F_{tab}	5,29	4,01	5,28

$\mathbf{F_{FA}/F_{tab}}$	3,10	11,76	2,78
$\mathbf{R^2}$	0,86	0,90	0,86

O λ_M é o maior tempo de relaxação de Maxwell, η_M é a viscosidade calculada a partir dos parâmetros de Maxwell e θ é o tempo médio de relaxação de Maxwell. CAR é a carragena, CAS é o caseinato de sódio, IPS é o isolado de proteína do soro e SAC é a sacarose.

3.3.2 Propriedades reológicas a altas deformações

O uso da metodologia de planejamento experimental possibilitou a análise do efeito da concentração dos componentes no comportamento de ruptura dos géis em compressão uniaxial (Figura 3.7). O efeito na tensão de ruptura foi mostrado na Figura 3.7 A e a superfície de resposta na Figura 3.7 B. O efeito para a deformação de ruptura e a superfície de resposta foram apresentados nas figuras 3.7 C e D e para o módulo de elasticidade foram mostrados nas Figuras 3.7 E e F. A tensão na ruptura foi influenciada pelas concentrações de carragena, caseinato de sódio e IPS. O aumento da concentração de carragena levou a um grande aumento na tensão ou dureza dos géis, seguido pelo caseinato de sódio e pelo IPS. Este comportamento mostrou que houve uma interação entre estes componentes, promovendo um fortalecimento da rede do gel.

A maior contribuição para o aumento da deformação na ruptura foi devido ao aumento da concentração da carragena no sistema. O IPS também contribuiu para o aumento na deformação na ruptura, mas em menor intensidade. O aumento da concentração do caseinato de sódio no sistema colaborou com a diminuição da deformação ou elasticidade do sistema. Provavelmente pelo fato dos agregados de carragena-caseinato de sódio aprisionados na rede tridimensional, formada pela interação carragena-carragena, diminuir a flexibilidade da rede do gel por não contribuir

diretamente à rede elástica. Provavelmente, o efeito positivo do IPS na deformabilidade da rede está relacionada ao fato desta proteína formar ligações com a carragena de modo a fortalecer as interações formadas na rede principal e assim, permitir uma maior flexibilidade da rede do gel. O IPS ao contrário do caseinato de sódio, quando submetido ao aquecimento passa por mudanças conformacionais (desnaturação) e, em seguida, agregam-se de maneira irreversível via ligações covalentes e não-covalentes podendo formar um gel (Verheul & Roefs, 1998). As propriedades físicas e estruturais dos géis de proteínas globulares induzidas por calor podem variar muito e são dependentes das condições de aquecimento, da concentração de proteína, do pH, força iônica e tipo de íons. Géis de proteínas do soro formados sob a ação do calor são mais rígidos que os formados por acidificação, quando observados em ensaios de compressão (Ju & Kilara, 1998). Neste caso, a reticulação das proteínas do soro desnaturadas favorece o aumento da rigidez dos géis e, conseqüentemente, dos valores de G'. Esses géis, quando formados em pHs neutros e altos valores de força iônica, são menos rígidos, apresentam menores valores de tensão e deformação na ruptura.

O módulo de elasticidade foi influenciado pelo caseinato de sódio e pela interação entre o caseinato de sódio e a carragena (Tabela 3.8), ambos contribuindo para o aumento do módulo de elasticidade quando aumentadas as suas concentrações no sistema. O caseinato de sódio é o componente que mais influenciou no módulo de elasticidade, fato que provavelmente está relacionado à maior resistência a baixas deformações em compressão dos agregados formados entre a carragena-caseinato de sódio.

Turgeon & Beaulieu (2001) observaram que os géis de κ-carragena são mais resistentes à ruptura, mas são mais duros e frágeis que géis de proteínas (menores deformações na ruptura), resultado esse, um pouco diferente do obtido neste trabalho, mostrando que a mistura de proteínas, polissacarídeos e açúcares levaram a uma maior complexidade das interações.

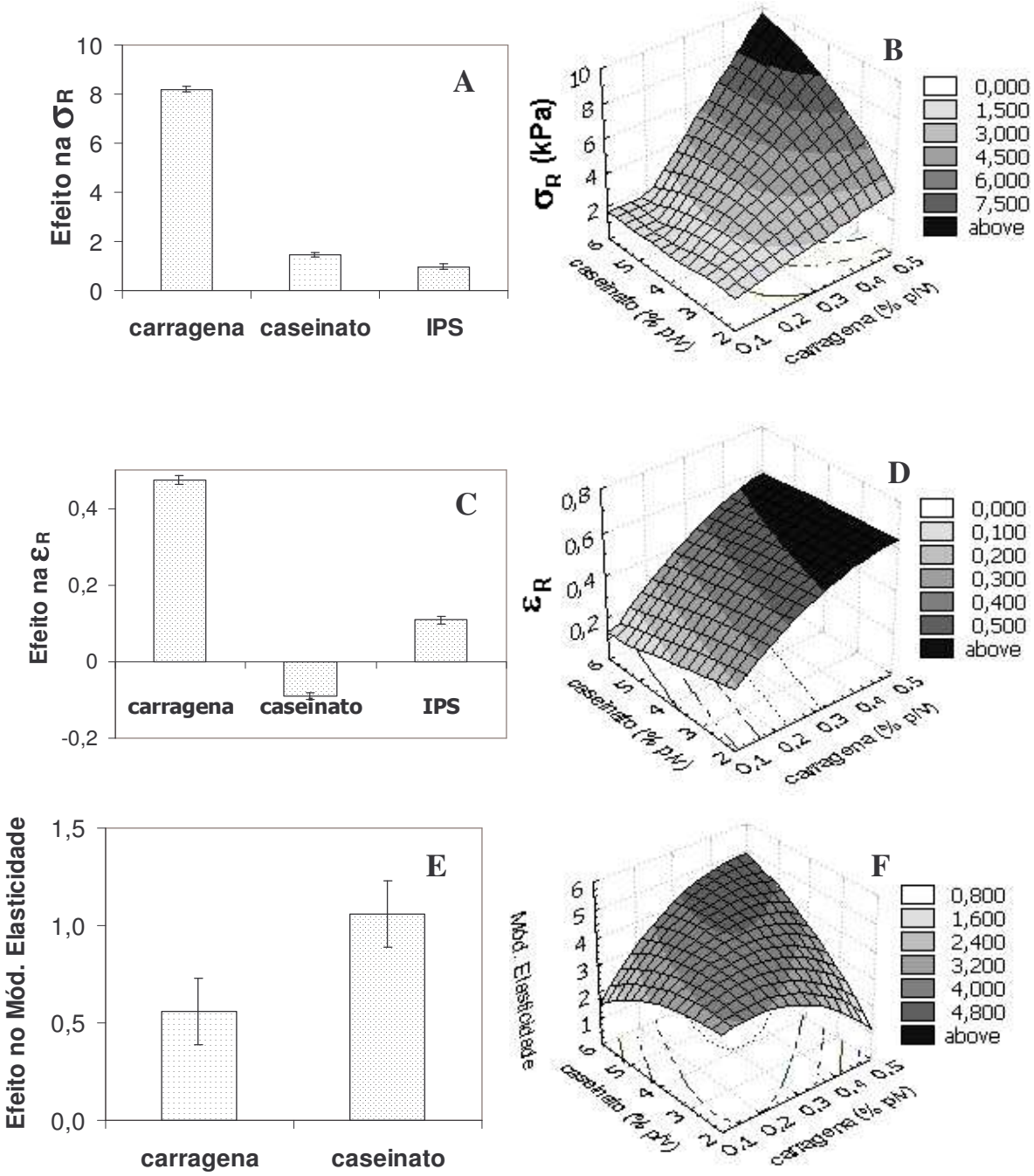


Figura 3.7: Efeito da concentração das variáveis independentes, carragena, caseinato de sódio e IPS nas respostas obtidas em ensaios reológicos em altas deformações: (A) tensão de ruptura, (C) deformação na ruptura e (E) módulo de elasticidade. Superfícies de respostas da (B) tensão na deformação, (D) deformação na ruptura e (E) módulo de elasticidade, em relação à variação de concentrações de carragena e caseinato. Em (A) e (B) os valores das concentrações de IPS e

sacarose foram fixadas em 1,25% e 12,5% (p/v), respectivamente, em (C) e (D) 1,5 % e 15% (p/v) e em (E) e (F) 1% e 10% (p/v).

Na Figura 3.7 B notou-se que a tensão na ruptura apresenta os mais altos valores em concentrações máximas de caseinato e carragena, nessas condições os sistemas formados apresentaram grande resistência à ruptura, sendo necessária uma maior tensão para romper as ligações formadas. A Figura 3.7 D mostrou o comportamento da deformação na ruptura em relação ao caseinato e carragena. Nessa figura, notou-se que os maiores valores de deformação foram obtidos em máximas concentrações de carragena, sendo que a concentração de caseinato não teve uma influência muito forte, pois a diminuição da concentração de caseinato levou a apenas um aumento na região de altos valores de deformação e não uma diminuição desses valores. Assim, o caseinato atuou diminuindo a elasticidade dos sistemas. Na Figura 3.7 F, notou-se que os maiores valores do módulo de elasticidade foram obtidos numa faixa de alta concentração de caseinato e carragena. Assim, estes componentes atuaram de modo a fortalecer a rede formada e asuportarem maiores valores de tensão em baixas deformações (ε_H<5%) sem sofrerem danos estruturais irreversíveis.

O modelo sugerido para explicar o comportamento dos componentes presentes nos sistemas, nas faixas de concentrações estudadas (Tabela 3.2) e pH neutro, supõe que a carragena interagiu com o caseinato, formando a rede do gel e a interação da carragena com as proteínas do soro, permitindo a expansão destas interações com outras macromoléculas de carragena. Assim a rede tridimensional do gel foi formada entre as carragenas e proteínas do leite. Em concentrações altas de carragena foi considerado que

esta participou mais efetivamente da formação da rede, levando a sistemas mais elásticos.

Os modelos matemáticos codificados foram obtidos a partir da metodologia do planejamento experimental e descrevem os comportamentos da tensão na ruptura (σ_R), da deformação na ruptura (ε) e do módulo de elasticidade (E). A validade estatística dos modelos foi verificada através da Análise de Variância, em um nível de confiança de 95%, as relações de F_{cal}/F_{tab}, F_{FA}/F_{tab} e os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8: Parâmetros dos modelos matemáticos codificados para a tensão na ruptura (σ_R), deformação na ruptura (ε_R) e módulo de elasticidade (E). O nível de confiança desses modelos foi de 95%.

	Propriedades mecânicas		
	σ_R (kPa)	**ε_R**	**E (kPa)**
Média	3,24	0,34	3,85
CAS	0,36	-0,02	0,26
CAR	2,03	0,13	0,14
IPS	0,24	0,03	
$(CAR)^2$		-0,02	-0,27
$(CAS)^2$	-0,31		-0,14
$(IPS)^2$	0,08		
$(SAC)^2$		0,01	
CAR.CAS	0,68	0,01	0,42
CAR.IPS	-0,10		
F_{cal}/F_{tab}	44,14	91,20	1,90

F_{FA}/F_{tab}	1,08	0,21	0,49
R^2	0,97	0,98	0,63

Onde σ_R é a tensão na ruptura, ε_R é a deformação na ruptura e E é o módulo de elasticidade. CAR é a carragena, CAS é o caseinato de sódio, IPS é o isolado de proteínas do soro e SAC é a sacarose.

3.4 Conclusões

Os sistemas-modelo formados por proteínas do leite-carragena-sacarose foram fortemente influenciados pela carragena, que atuou favorecendo a característica elástica e também mostrou interação com o caseinato e proteínas do soro. O IPS favoreceu o fortalecimento da rede formada pela carragena e atuou interagindo com este polissacarídeo. Além disso, a influência da sacarose no sistema pareceu favorecer a interação do IPS com a carragena, levando a uma rede tridimensional mais interconectada, portanto mais elástica e resistente à ruptura. A interação do caseinato de sódio com a carragena pareceu favorecer o comportamento viscoso dos sistemas, possivelmente pela diminuição da rigidez da rede tridimensional. Assim, o modelo proposto para a explicação do comportamento dos componentes do sistema, nas faixas de concentração utilizadas e em pH neutro supõe que a carragena interagiu com o caseinato, formando a rede do gel e a interação da carragena com as proteínas do soro permitindo a expansão destas interações com outras macromoléculas de carragena. Assim a rede tridimensional do gel foi formada entre as carragenas e proteínas do leite. Em concentrações altas de carragena foi considerado que esta participou mais efetivamente da formação da rede, levando a sistemas mais elásticos.

3.5 Agradecimentos

As autoras agradecem à FAPESP, Capes e CNPq.

3.6 Referências Bibliográficas

ANTIPOVA, A. S.; SEMENOVA, M. G.; BELYAKOVA, L. E. (1999) Effect of sucrose on the thermodynamic properties of albumin and sodium caseinate in bulk solution and at air-water interface. **Colloids and Surfaces B**, v. 12, p. 261-270.

BENEDITO, J.; GONZALEZ, R.; ROSSELLO, C.; MULLET, A. (2000) Instrumental and expert assessment of Mahon cheese texture. **Journal of Food Science**, **v. 65 (7)**, p. 1170-1174.

BORGSTRÖM, J.; PICULELL, L.; VIEBKE, C.; TALMON, Y. (1996) On the structure of aggregated κ-carrageenan helices. A study by cryo-TEM, optical rotation and viscometry. **International Journal of Biological Macromolecules**, **v. 18 (3)**, p. 223-229.

BRYANT, C. M.; McCLEMENTS, D. J. (2000) Influence of sucrose on NaCl-induced gelation of heat denatured whey protein solutions. **Food Research International**, **v. 33**, p. 649-653.

CÈSARO, A.; CUPPO, F.; FABRI, D.; SUSSICH, F. (1999) Thermodynamic behavior of mixed biopolymers in solution and in gel phase. **Thermochimica Acta**, **v. 388,** p. 143-153.

CHAMBERLAIN, E. K.; RAO, M. A. (2000) Effects of concentration on rheological properties of acid-hydrolyzed amylopectin solutions. **Food Hydrocolloids**, **v. 14,** p. 163-171.

CHU, B.; ZHOU, Z.; WU, G. W.; FARRELL, H. M. (1995) Laser-light scattering of model casein solutions – Effects of high-temperature. **Journal of Colloid and Interface Science**, **v. 170**, p. 102-112.

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

DROHAN, D. D.; TZIBOULA, A.; McNULTY, D.; HORNE, D. S. (1997) Milk protein-carrageenan interactions. **Food Hydrocolloids**, **v. 11 (1)**, p. 101-107.

GRINGBERG, V. Y. A.; TOLSTOGUZOV, V.B. (1997) Themodynamic incompatibility of protein and polysaccharide in solution. **Food Hydrocolloids**, **v. 11**, p. 145-158.

HEERTJE, I. (1993) Structure and function of food products: a review. **Food Structure**, **v. 12**, p. 343-364.

HERMANSSON, A. -M. (1989) Rheological and Microstructural evidence for transient states during gelation of κ-carragena in the presence of potassium. **Carbohydrate Polymers**, **v. 10**, p. 163-181.

JU, Z. Y.; KILARA, A.(1998) Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **v.46**, p. 1830-1835.

KATZBAUER, B. (1998) Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, **v. 59**, p. 81-84.

KULMYRZAEV, A.; BRYANT, C.; McCLEMENTS, D. J. (2000a) Influence of sucrose on thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **v. 48**, p. 1593-1597.

KULMYRZAEV, A.; CANCELLIERI, C.; McCLEMENTS, D. J. (2000b) Influence of sucrose on cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **v. 80**, p. 1314-1318.

LANGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; MICHON, C.; LAUNAY, B.; PARKER, A.; KRUIF, C. G. (2000) Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. **Food Hydrocolloids**, **v. 14**, p. 273-280.

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.

LUNDIN, L.; HERMANSSON, A. -M. (1998) Multivariate analysis of the influences of locust bean gum, α_s-casein, κ-casein on viscoelastic properties of Na-κ-carrageenan gels. **Carbohydrate Polymers**, **v. 12**, p.175-187.

MLEKO, S.; LI-CHAN, E.C.Y.; PIKUS, S. (1997) Interactions of κ-carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. **Food Research International**, **v. 30**, p. 427-433.

MORA-GUTIERREZ, A.; KUMOSINSKI, T. F.; FARELL Jr, H. M. (1997) Oxigen-17 nuclear magnetic resonance studies of bovine and caprine hydration and activity in deuterated sugar solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **v. 45**, p. 4545-4553.

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

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 (6)**, p. 525-533.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. (1994) **Structure-function properties of food proteins**, London: Academic Press.

RAO, M. A. (1992) Classification, description and measurement of viscoelastic properties of solid food. In: Rao, M. A.; Steffe, J. F. (Eds.) **Viscoelastic properties of food.** London, Elsevier, p. 3-47.

RIBEIRO, K. O.; RODRIGUES, M. I.; SABADINI, E.; CUNHA, R. L. (2003) Mechanical properties of acidic casein-κ-carrageenan gels: effect of co-solute addition. **Food Hydrocolloids,** in press.

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

ROSS-MURPHY, S. B. (1995) Structure-properties relationships in food biopolymer gels and solutions. **Journal of Rheology**, **v. 39**, p. 1451-1463.

SCHMIDT, R. H.; PACKARD, V. S.; MORRIS, H. A. (1984) Effect of processing on whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, **v. 67**, p. 2723-2733.

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

SGARBIERI, V.C. (1998) Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, **v. 32 (1)**, p. 105-126.

SHCHIPUNOV, Y. A.; MEZZASALMA, S. A.; KOPER, G. J. M.; HOFFMANN (2001) Lecithin organogel with new rheological and scaling behavior. **Journal of Physical Chemistry B**, **v. 105**, p. 10484-10488.

STEFFE, J. F. (1996) **Rheological Methods in Food Process Engineering**. Freeman Press, East Lansing, p. 1-93.

SUGIYAMA, J.; ROCHAS, C.; TURQUOIS, T.; TARAVEL, F.; CHANZY, H. (1994) Direct imaging of polysaccharide aggregates in frozen aqueous dilute systems. **Carbohydrate Polymers**, **v. 23 (4)**, p. 261-264.

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

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

TZIBOULA, A.; HORNE, D. S. (1999) Influence of milk proteins on κ-carrageenan gelation. **International Dairy Journal**, **v. 9**, p. 359-364.

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 (6)**, p. 620-627.

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 (6)**, p. 589-607.

CAPÍTULO 4

EFEITO DAS INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS SOBRE AS LIGAÇÕES DA ÁGUA EM GÉIS DE PROTEÍNAS DO LEITE-CARRAGENA-SACAROSE.

Índice

Resumo 108

4.1 Introdução 109

4.2 Material e Métodos 111
4.2.1 Material 111
4.2.2 Composição das formulações: Planejamento Experimental 112
4.2.3 Preparo dos sistemas 113
4.2.3.1 Ensaios de calorimetria diferencial de varredura 113
4.2.3.2 Ensaios de Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 114
4.2.4 Ensaios de Calorimetria 114
4.2.5 Análises de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 116

4.3 Resultados e Discussão 119
4.3.1 Propriedades Térmicas 119
4.3.1.1 Avaliação dos efeitos dos componentes do sistema sobre a quantidade de água não-congelável (UFW) 119
4.3.1.2 Análise dos efeitos dos componentes sobre a Temperatura de início de fusão da água 127
4.3.2 Ensaios de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 129
Análise das frações de proteínas do leite livres em solução 133

4.4 Conclusões 148

4.5 Agradecimentos 148

4.6 Referências Bibliográficas 149

Resumo

Géis mistos formados por proteínas do leite e polissacarídeos adicionados de sacarose foram analisados por calorimetria diferencial de varredura e a quantidade de água não-congelável (UFW) e temperatura de início de fusão (T_{onset}) foram determinadas. Estas propriedades mostraram ser fortemente dependentes da concentração de sacarose no sistema, porém a UFW também é influenciada pela concentração de caseína. Provavelmente, a sacarose atuou na hidratação preferencial das proteínas de forma a tornarem-nas mais hidrofílicas, promovendo a formação de pontes de hidrogênio, o que torna parte da água do sistema fortemente ligada e não congela ainda em temperaturas abaixo de –40ºC. A análise das proteínas dos sistemas usando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida permitiu estudar as características de suas interações e o que as influenciam. Estes ensaios foram realizados em condições nativas, desnaturantes e não-redutoras e desnaturantes e redutoras. Os resultados mostraram que as frações da caseína e as proteínas do soro interagem, em todas as condições estudadas. No entanto, o aumento da concentração das proteínas do soro diminuiu a fração livre de caseína em solução. A mesma situação parece ocorrer com as frações de proteínas do soro, as quais apresentam diminuição da quantidade livre no sistema quando há um aumento da concentração de caseína. Isto leva a sugerir que existe uma forte interação entre as caseínas e as proteínas do soro, principalmente entre a κ-caseína e a β-lactoglobulina.

Palavras chave: Água não-congelável, DSC, Temperatura de início de fusão, Eletroforese em gel de poliacrilamida, interações proteína-proteína.

4.1 Introdução

Géis mistos de proteínas e polissacarídeos em alimentos possuem uma grande quantidade de água agregada que pode interferir na textura, sinerese e na estabilidade do sistema. Os polissacarídeos atuam como agentes espessantes, com alta capacidade de ligar a água livre do sistema (Hansen, 1982). Essas ligações ocorrem fisicamente ou por pontes de hidrogênio, a qual também acontece quando são adicionados dissacarídeos, como a sacarose (Evageliou *et al.*, 2000). No entanto, a adição de açúcares em sistemas com biopolímeros promove mudanças nas propriedades termodinâmicas, devido a alterações na estrutura da água e à interação co-soluto-biopolímero (Antipova *et al.,* 1999).

Antipova & Semenova (1995, 1997) observaram que no caso de misturas de polissacarídeos e proteínas há um aumento da co-solubilidade dos biopolímeros com o aumento da concentração de sacarose. Este aumento de solubilidade dos biopolímeros está associado a um aumento na solubilidade da proteína em meio aquoso com a adição de sacarose. Schorsch *et al.* (1999) relataram que em altas concentrações de sacarose (30 a 60 % p/p), o processo de agregação das frações micelares de caseína foi reduzido e em maiores concentrações foi completamente inibido, provavelmente pelo aumento da hidrofilicidade das proteínas promovido pela formação de uma camada hidrofílica ao redor da micela. Essa explicação também foi sugerida para outras proteínas por Jencks (1969), Garrett *et al.* (1988) e Chinachoti & Steinberg (1988).

A interação entre as proteínas é um bom indicativo do quão forte é a rede tridimensional formada, a qual influencia nas características finais do produto. Quando um polissacarídeo, como a carragena, é adicionado a sistemas contendo proteínas, as

interações entre estes biopolímeros são influenciadas pelas condições do sistema, tais como: pH, força iônica, temperatura e íons. Essas misturas de biopolímeros são muito importantes em sistemas alimentícios e isso justifica o estudo das interações formadas entre eles.

A capacidade de se ligar à água é uma característica tanto de componentes hidrofílicos de baixo, quanto de alto peso molecular, sendo que a água ligada passa a apresentar propriedades termodinâmicas diferentes da água pura.

A água presente em sistemas proteínas-polissacarídeos pode estar em três estados: água ligada não-congelável, água ligada congelável e água livre, sendo esta última observada principalmente em processos de sinerese (Higuchi & Iijima, 1985; Quinn *et al.*, 1988). A quantidade de água não-congelável (UFW) não cristaliza mesmo quando a temperatura do sistema é reduzida para –40ºC e é quantificada pela diferença entre o conteúdo de água total e as águas livre e ligada-congelável. Esta última cristaliza em temperaturas inferiores a 0ºC, enquanto que a água livre cristaliza a 0ºC (Ping *et al.,* 2001).

A análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições nativas, desnaturantes e não-redutoras e desnaturantes e redutoras, permite verificar a formação dos agregados entre as proteínas e discutir sobre as características das ligações da rede tridimensional dos géis formados, além de analisar as frações de proteínas livres e as interações possíveis quando a carragena é adicionada.

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos das concentrações de carragena, caseína, IPS e sacarose na quantidade de água não-congelável e na temperatura de início de fusão da água para avaliar as interações entre os componentes. Em relação às características de interação entre as proteínas do sistema, o tamanho dos agregados formados devido ao tratamento térmico das proteínas (caseinato de sódio e proteínas do soro), a 70ºC por 30 min e o tipo de interação responsável pela sua formação também foram analisados.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material

Os ingredientes utilizados nos sistemas foram a caseína ([9000-71-9], Lot 100K0223), a κ-carragena (C-1013, [9000-07-1], Lot 29H0715), ambas adquiridas da Sigma-Aldrich Corporation (St Louis - USA), o IPS (PSD-826), gentilmente cedido pela Arla Food Ingredients (Dinamarca) e a sacarose, adquirida da Synth (São Paulo, Brasil). A composição dos ingredientes utilizados nos sistemas estudados está apresentada na Tabela 4.1.

As frações puras de α_S-caseína (C 6780 – 23.614 Da), β-caseína (C 6905 – 23.982 Da), κ-caseína (C 0406 – 19.023 Da), β-lactoglobulina (L 2506 – 18.353 Da) e α-lactoalbumina (L 6010 – 14.175 Da), utilizadas como peso molecular padrão, foram adquiridas da Sigma-Aldrich Corporation (St Louis - USA). O peso molecular padrão (comercial), BenchMark™ Prestained Protein Ladder, utilizado foi adquirido da Invitrogen (USA) (Cat: 10748-010 Lot: 1125588), com a seguinte distribuição de pesos moleculares aparentes (kDa): 1-176,5; 2-113,7; 3- 80,9; 4-63,8; 5- 49,5; 6-37,4; 7- 26,0; 8- 19,6; 9- 14,9 e 10- 8,4.

Tabela 4.1. Composição dos ingredientes do sistema proteínas do leite-carragena-sacarose.

Ingredientes	Umidade (%	Na^+	Ca^{2+}	K^+
Caseína	7,22	0,16	0,14	0,08
Carragena	8,40	0,40	1,60	10,78
IPS	1,33	0,63	0,05	0,65
Sacarose	0,30	-	-	-

4.2.2 Composição das formulações: Planejamento Experimental

Os sistemas modelo foram preparados de acordo com um planejamento experimental 2^4 com pontos axiais ($\alpha=(2^n)^{1/4}$), para os ensaios de calorimetria, e os níveis de concentração estão apresentados na Tabela 4.2. As combinações das concentrações para cada formulação, em ensaios de calorimetria, estão apresentadas na Tabela 3.3 do Capítulo 3. Para os ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida, foi utilizado um planejamento experimental 2^2 com pontos axiais. Os níveis de concentração para a caseína e IPS estão apresentados na Tabela 4.3 e as combinações na Tabela 4.4.

Tabela 4.2: Variáveis independentes e seus níveis referentes aos ensaios de calorimetria diferencial de varredura.

Níveis	Carragena (%	Caseína (% p/v)	IPS (% p/v)	Sacarose (% p/v)
-2	0,1	2	0,5	5
-1	0,2	3	0,75	7,5
0	0,3	4	1	10
+1	0,4	5	1,25	12,5
+2	0,5	6	1,5	15

Tabela 4.3. Níveis de concentração de caseína e IPS utilizados nos ensaios de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.

Níveis	Caseína (% p/v)	IPS (% p/v)
-2	2	0,5
-1	3	0,75
0	4	1
+1	5	1,25
+2	6	1,5

Tabela 4.4. Combinação das concentrações de caseína e IPS utilizada nos ensaios de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.

Formulações	Caseína (% p/v)	IPS (% p/v)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-2	0
6	+2	0
7	0	-2
8	0	+2
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

O planejamento experimental foi analisado utilizando-se o software Statistica (Statsoft v. 5.0). Os efeitos significativos foram determinados e a análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a validade do modelo matemático obtido.

4.2.3 Preparo dos sistemas

4.2.3.1 Ensaios de calorimetria diferencial de varredura

As formulações dos sistemas modelo foram preparadas de acordo com a metodologia descrita na seção 3.2 – Preparo das formulações no Capítulo 3.

4.2.3.2 Ensaios de Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Nos ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foram analisados apenas sistemas contendo proteínas. As soluções de caseína e IPS foram preparadas nas concentrações apresentadas na Tabela 4.5 e foram submetidas a dois tratamentos térmicos: a 40ºC por 15 min e posteriormente a 70ºC por 30 min. Estes tratamentos foram os mesmos dos sistemas proteínas do leite-carragena-sacarose, de maneira a se manter as mesmas condições usadas nos sistemas preparados para as análises de calorimetria. Posteriormente, as soluções foram resfriadas em banho de gelo até a temperatura de 10ºC.

As quantidades de proteínas em cada formulação foram determinadas, em triplicata, pelo Método de Bradford (Bradford, 1976). Após a quantificação, estas amostras foram diluídas adequadamente em tampão de amostra nativo, desnaturante-redutor ou desnaturante-não redutor, conforme o tipo de gel empregado (Seção 4.2.5).

4.2.4 Ensaios de Calorimetria

A temperatura de início de fusão (T_{onset}) da água e a entalpia deste processo foram determinadas em um calorímetro diferencial de varredura (DSC 2920, TA Instuments, New Castle, USA) com uma unidade de resfriamento mecânico acoplada (Refrigerated Cooling Systems).

As formulações, após o tratamento térmico e resfriamento a 10ºC, foram colocadas em cápsulas herméticas de alumínio, com peso aproximado de 10 mg e mantidas por 24 h na temperatura de 5±1ºC em uma estufa BOD, de forma a estabilizar a rede formada e permitir a hidratação e interação com os biopolímeros, sendo que após esse período foi realizada a análise calorimétrica da amostra. As análises foram

realizadas em triplicatas, tanto para a temperatura de início de fusão (T_{onset}) como para a entalpia deste processo. A calibração do DSC foi realizada com água Milli-Q, sob as mesmas condições de taxa de aquecimento/resfriamento e limite de temperatura dos ensaios. Para a água, considerou-se a temperatura de início de fusão como 0ºC e a entalpia de fusão como 335 J/g. Utilizou-se também o índio para a calibração, o qual possui temperatura de início de fusão de 156,61ºC e entalpia de fusão de 28,42 J/g. A purga da célula foi realizada com hélio a 25 ml/min. O resfriamento foi realizado com gás hélio em uma vazão de 55 ml/min.

As cápsulas herméticas contendo as amostras foram colocadas no DSC e tiveram a temperatura rapidamente equilibrada à –40ºC. Após o equilíbrio da temperatura, foi realizado o resfriamento até –45ºC em uma taxa de 1ºC/min, sendo que a amostra permaneceu nesta temperatura por 60 min. Posteriormente, a temperatura foi aumentada a uma taxa de 2ºC/min até a temperatura final de 20ºC.

A entalpia de fusão foi calculada pela integração da curva de fluxo de calor no intervalo de temperatura entre –40 e 20ºC e a temperatura de início de fusão foi tomada como a T_{onset}, que é calculada a partir da máxima tangente da curva do fluxo de calor em função da temperatura durante a fusão.

A quantidade de água inicialmente presente na amostra foi calculada através da diferença das massas dos componentes presentes nos sistemas (a composição dos sistemas está apresentada na Tabela 3.3 do Capítulo 3), levando em consideração a umidade em base úmida destes. A partir do valor da entalpia de fusão da água livre-congelável, presente em cada formulação, foi possível o cálculo da quantidade de água não-congelável utilizando a equação (4.1):

$$UFW(\%) = \left[U_{bu} - \frac{\Delta H_{experimental}}{\Delta H_{teórico}} \right].100\% \quad (4.1)$$

onde UFW (% p/p) é a fração mássica de água não-congelável, U_{bu} é a umidade de cada formulação em base úmida e $\Delta H_{experimental}$ é a variação de entalpia de fusão da água livre-congelável e $\Delta H_{teórico}$ é a entalpia de fusão da água líquida, cujo valor foi considerado como 335 J/g.

4.2.5 Análises de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As análises de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizados em uma cuba de acrílico, com gel de dimensões de 14 cm (largura) x 12,5 cm (altura) x 1 mm (espessura). As corridas eletroforéticas foram realizadas com DDP de 40 V durante a noite (12 h).

Os géis de resolução para SDS-PAGE redutor e SDS-PAGE não-redutor foram preparados pela mistura de 4,6 mL de água MilliQ, 10 mL de uma solução estoque a 30 % de poliacrilamida e bis-acrilamida numa proporção (29:1), 5 mL de tampão de resolução (1,5 M de TRIS com o pH 8,8 ajustado com HCl) e 0,2 mL de uma solução 10% (p/v) de SDS, com pH de 8,8. Esta solução foi gentilmente homogeneizada e finalmente adicionou-se 200µL de uma solução de persulfato de amônio a 10 % (p/v) e 8µL de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina). Os géis de resolução do nativo-PAGE foram preparados conforme descrito para o SDS-PAGE redutor e SDS-PAGE não-redutor, exceto pela exclusão do SDS, sendo que no volume correspondente ao SDS foi adicionado igual volume de água.

Os géis de empacotamento possuíam concentração uniforme de T=4% (acrilamida) e C=2,7% (bis-acrilamida) e foram os mesmos para todos os tipos de géis, sendo preparados após a polimerização do gel de resolução. A preparação deste gel foi realizada pela adição de 6 mL de água MilliQ, 1,5 mL de uma solução estoque 30% de poliacrilamida e bis-acrilamida (29:1) e 2,55 mL de tampão de gel de empacotamento (0,5 M de TRIS ajustado o pH para 6,8 com HCl). Essa mistura foi agitada para promover a homogeneidade e, finalmente, foram adicionados 450 μL de uma solução de persulfato de amônio a 10% (p/v) e 15μL de TEMED.

Os tampões de corrida com SDS foram utilizados para os géis SDS-PAGE redutor e não-redutor e foram preparados de acordo com a seguinte composição: 0,025 M de TRIS, 0,192 M de glicina e 0,1% de SDS (pH 8,3). Este tampão estava concentrado, sendo que a diluição foi realizada tomando 1 parte de tampão e 4 partes de água, seguido de agitação. O tampão de corrida sem SDS utilizado no caso do Nativo-PAGE foi o mesmo descrito acima, exceto pela exclusão do SDS.

A amostra de proteína analisada no gel SDS-PAGE redutor foi preparada em uma concentração de cerca de 4 μg/μL, que posteriormente foi diluída em um tampão com 0,1M de TRIS-HCl, 0,2 M de 2-mercaptoetanol, 2% de SDS, 20% de glicerol (v/v) e 0,2% de corante bromofenol blue (pH 6,8). As amostras foram levadas a um banho em ebulição por 5 min. A amostra do gel desnaturante e não-redutor foi preparada conforme a de SDS-PAGE, com a exclusão do 2-mercaptoetanol. Neste caso, a amostra também foi aquecida em ebulição por 5 min, como no SDS-PAGE redutor. A amostra do gel Nativo-PAGE foi realizada como descrito para o SDS-PAGE redutor, porém a amostra não foi aquecida e no tampão foram excluídos o SDS e o 2-mercaptoetanol.

Todos os géis foram corados com uma solução de 0,25 g de Comassie Brilliant Blue em 90 mL de uma solução metanol-água (1:1 v/v) e 10 mL de ácido acético glacial. Os géis foram descorados em solução de 20% (v/v) de etanol comercial (cerca de 98º GL), 8% (v/v) de ácido acético anidro e 72% (v/v) de água destilada. Para possibilitar a identificação de cada fração de proteína presente no sistema, foram utilizados um padrão de peso molecular comercial (190 a 10 kDa) e um padrão de frações puras (α_S-caseína, β- caseína, κ-caseína, β-lactoglobulina e α-lactoalbumina).

A extensão da desnaturação das proteínas do soro (no sistema sem a presença da carragena e sacarose), devido ao tratamento térmico, e suas interações com as frações de caseína foram analisadas através da quantificação (Eagle Eye II, Stratagene) de β-lactoglobulina, α-lactalbumina e frações de caseína por eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras submetidas a tratamento térmico, comparadas com frações puras usadas como padrão que não foram aquecidas (Singh *et al.*, 1996).

Os géis foram quantificados por integração da intensidade de cada banda e para efeito de comparação, a intensidade de cada banda foi dividida pela intensidade média de todas as bandas do gel, sendo que a intensidade considerada é uma intensidade relativa. Este procedimento foi adotado para possibilitar a comparação entre os géis. A intensidade de uma banda é proporcional à quantidade de corante Comassie Blue que se ligou à proteína e esta quantidade ligada está associada à massa de proteína presente em cada banda analisada, assim quanto maior a intensidade relativa da banda, maior é a massa de proteína nesta banda. As medidas de intensidade relativa foram feitas em duplicata.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Propriedades Térmicas

4.3.1.1 Avaliação dos efeitos dos componentes do sistema sobre a quantidade de água não-congelável (UFW)

A quantidade de água não-congelável foi obtida a partir da análise dos termogramas, no qual o valor da entalpia de fusão da água congelável no sistema correspondeu à integração do pico endotérmico, entre –45 e 20ºC.

A Figura 4.1 mostra um termograma típico dos sistemas estudados, no qual observa-se o pico endotérmico e a tangente no ponto de máxima inclinação da curva fluxo de calor-temperatura. Nessa Figura observa-se que a temperatura de início de fusão foi menor que 0ºC, o que mostra a presença de água ligada congelável. Os solutos presentes nas formulações estudadas agiram modificando as propriedades coligativas dos sistemas e, consequentemente, diminuindo a temperatura de início de congelamento dos mesmos. Observa-se também que a entalpia do processo de fusão da água contida neste sistema foi menor que a da água pura (335 J/g), o que também é um indicativo da presença de água ligada congelável.

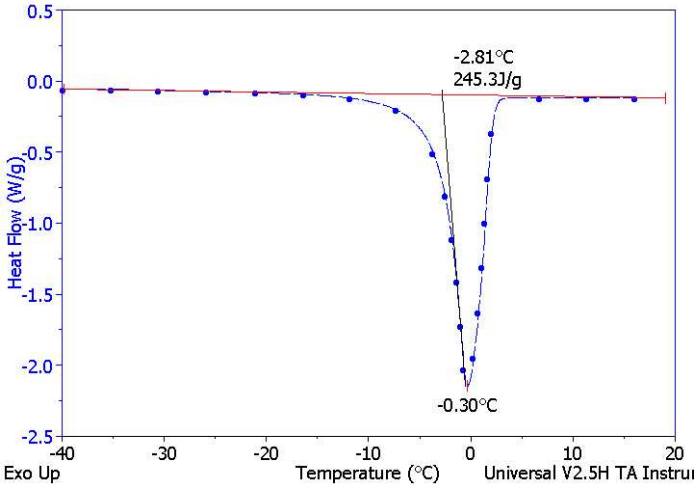


Figura 4.1. Fusão de cristais de água em gel de casinato, IPS, carragena e sacarose com taxa de aquecimento de 2ºC/min na faixa de temperatura de –45ºC a 20ºC.

A análise de efeitos ($p<0,10$) das concentrações de carragena, caseinato, IPS e sacarose mostra que apenas a sacarose e o caseinato influenciaram na fração de água não-congelável dos sistemas analisados (Figura 4.2). Observa-se que, com o aumento da concentração de ambos, houve um aumento da quantidade de água não-congelável, ou seja, a água estava mais fortemente ligada de forma que não se congelava ainda em temperaturas inferiores a –40ºC. A fração de água não-congelável aumentou com o número de grupos hidrofílicos dos solutos adicionados, visto que o processo de remoção das moléculas de água fortemente ligadas por pontes de hidrogênio requer uma grande força motriz, a qual não é conferida pelo meio durante o congelamento (Ping *et al.,* 2001).

Kulmyrzaev *et al.* (2000b) estudaram a influência da sacarose na gelificação de proteínas do soro e relataram que em altas concentrações de sacarose (10-30% p/p), esta diminuiu a taxa de gelificação das proteínas do soro. Este fato ocorreu, provavelmente, porque a sacarose aumentou a força das interações proteína-proteína em relação às interações proteína-solvente, promovendo a agregação das proteínas em solução. A sacarose compete pela água de hidratação, levando a um aumento da atração entre os segmentos hidrofóbicos das proteínas, facilitando a agregação e a formação do gel.

Minson *et al.* (1981) observaram uma maior estabilidade de caseínas armazenadas a baixas temperaturas em presença de açúcares como rafinose, glicose, sacarose e xilose. A eficácia crio-protetora destes açúcares foi relacionada a habilidade destes em abaixar a temperatura de início de congelamento e fazer muitas ligações por pontes de hidrogênio para a interação com as caseínas. A estabilização de proteínas em soluções aquosas não congeladas, no entanto, pareceu estar associada com o conceito termodinâmico de interações preferenciais, assim, as proteínas são preferencialmente hidratadas e os açúcares são preferencialmente excluídos do contato com a superfície da proteína.

Mora-Gutierrez & Farrell (2000) relataram que os açúcares adicionados em soluções de caseínas, promoveram a estabilização destas proteínas, principamente pelo mecanismo de hidratação preferencial e não pela ligação direta com a proteína. Assim, a camada de água que circunda a proteína foi favorecida em relação à interação açúcar-solvente (água) e, com o aumento da concentração de açúcar ocorreu um aumento da hidratação preferencial.

Observando-se o efeito das interações (Figura 4.2) entre os componentes do sistema, nota-se que a sacarose e o caseinato de sódio atuaram positivamente no aumento da quantidade de água não-congelável, ou seja, provavelmente a sacarose atuou favorecendo a hidratação preferencial do caseinato, provocando uma diminuição da quantidade de água livre congelável. Além disso, com o aumento de sólidos (sacarose) a fração de água livre foi influenciada pela alta capacidade de hidratação dos grupos hidroxilas equatoriais do dissacarídeo (Furuki, 2000), que se ligam à água por pontes de hidrogênio, colaborando para o aumento da quantidade de água não-congelável.

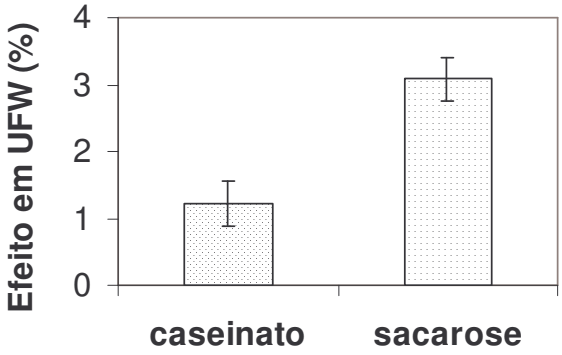


Figura 4.2. Efeito ($p<0,10$) das variáveis caseinato de sódio e sacarose na quantidade de água não-congelável (UFW).

As superficies de respostas (Figura 4.3) mostram que as interações caseinato-sacarose (Figura 4.3 A, B e C) e IPS-sacarose (Figura 4.3 D, E e F) influenciam a quantidade de água não-congelável, tal como observado na análise de efeitos. Isto evidencia o mecanismo de ação da sacarose no favorecimento das interações proteína-proteína, principalmente quando a sacarose está em elevada concentração no sistema. Assim, a rede formada acomoda as moléculas de água que possivelmente está fracamente ligada a ela, pois esta congela em temperaturas inferiores a 0ºC. Além disso,

as superfícies de resposta das Figuras 4.3 D, E e F mostram que o aumento da concentração das proteínas do soro também favoreceu o aumento da fração de água não-congelável; tal efeito também ocorreu com o caseinato de sódio, mas somente a baixas concentrações de sacarose. Na Figura 4.3 A, B e C, observa-se que em altas concentrações de sacarose, o caseinato pareceu não ter influência sobre a UFW. No entanto, com o aumento da concentração de IPS no sistema, este pareceu competir com a sacarose pela ligação da água, diminuindo a influência da sacarose no sistema.

Kulmyrzaev *et al.* (2000 a, b) também observaram que a sacarose aumentou a atração entre as moléculas de proteínas do soro desnaturadas. É interessante observar nas Figuras 4.3 A, B e C que com o aumento da concentração de IPS, o aumento da concentração de caseinato exerceu menor influência sobre UFW evidenciando o papel da sacarose no favorecimento das interações caseinato-caseinato, caseinato-IPS e IPS-IPS.

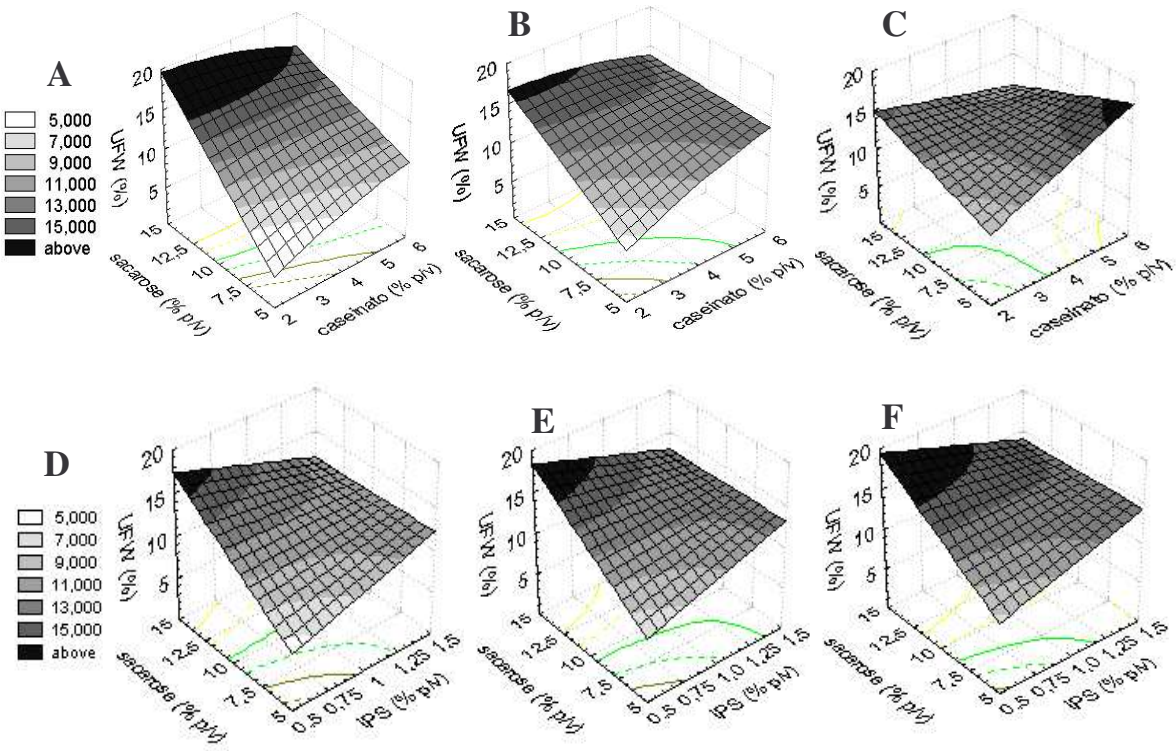


Figura 4.3. Superfícies de resposta mostrando a influência da variação da concentração de caseinato e sacarose (A, B e C), sendo que a concentração de IPS em (A) foi fixada em 0,5% (p/v), em (B) fixada em 1% (p/v) e em (C) fixada em 1,5% (p/v). As superfícies de resposta (D, E e F) mostram a influência da sacarose e IPS, sendo que a concentração de caseinato em (D) foi fixado em 2% (p/v), em (E) 4% (p/v) e em (F) 6% (p/v). A concentração de carragena, para todas as superfícies foi fixada em 0,3%.

A rede tridimensional formada nos sistemas observados possuia características de géis homogêneos e transparentes. Géis deste tipo são formados por agregados

filamentosos, que por sua vez são compostos por interações carragena-proteínas do leite, e são transparentes, por causa do pequeno comprimento dos filamentos que não provocam o espalhamento de luz. Géis com a estrutura formada por filamentos, geralmente possuem uma maior capacidade de ligar água que os géis contendo estruturas particuladas, pois possuem poros menores e mais homogêneos e assim, aprisionam as moléculas de água mais fortemente devido às forças de capilaridade (Barbut, 1995; Hongsprabhas & Barbut, 1997). Nos sistemas analisados a água livre, provavelmente, estava aprisionada nos poros da rede tridimensional, visto a ausência de sinerese (água livre). No entanto, esta água é considerada como a água associada à rede do gel, mas que congela a 0ºC e está livre para agir como solvente para pequenas moléculas. Esta água livre comporta-se como a água pura, mas, neste caso, é difícil removê-la da rede do gel (Mangino, 1984).

Braga (2002) estudou a quantidade de água não-congelável e sinerese em géis ácidos de caseinato-xantana-sacarose e observou a presença de grande quantidade de água livre, o que foi atribuído principalmente ao efeito da sacarose no sistema. A sacarose também influenciou positivamente na quantidade de água não-congelável e o gel formado apresentou as características de géis particulados. Isso evidencia a diferença nas interações entre os biopolímeros, quando as condições de pH e grupos ionizáveis dos polissacarídeos são diferentes.

O modelo matemático codificado (Equação 4.2), obtido a partir do planejamento experimental, descreve o comportamento da quantidade de água não-congelável (UFW) em relação às concentrações de caseinato, sacarose e IPS. A validade estatística do modelo foi obtida pela Análise de Variância, em um nível de confiança de 90%, onde a

relação F_{cal}=4,66 F_{tab} e F_{FA}=0,55 F_{tab} (a falta de ajuste do modelo não é estatisticamente significativa).O coeficiente de regressão foi 0,69.

$$UFW(\%) = 11{,}63 + 0{,}61.CAS + 1{,}54.SAC - 0{,}74.CAS.SAC - 0{,}83.IPS.SAC \quad (4.2)$$

onde CAS é o caseinato de sódio, IPS é o isolado de proteínas do soro e SAC é a sacarose.

4.3.1.2 Análise dos efeitos dos componentes sobre a Temperatura de início de fusão da água

As temperaturas de início de fusão (T_{onset}) dos sistemas foram menores que 0ºC (Figura 4.4 A), o que mostra a influência da sacarose atuando como co-soluto no sistema e alterando as propriedades coligativas dos sistemas, pela forte ligação por pontes de hidrogênio com a água.

As superfícies de resposta (Figura 4.4 B, C e D) mostram o comportamento da temperatura de início de fusão, em relação às concentrações de caseinato, IPS e sacarose. Nestas superfícies, nota-se que o aumento da sacarose de 5 (Figura 4.4 B) a 15% (p/v) (Figura 4.4 D) no sistema provocou um abaixamento da temperatura de início de fusão de cerca de –1,6ºC. Marshall & Arbuckle (1996) relataram que a adição de solutos como a sacarose, leva a um abaixamento da temperatura de congelamento de sorvetes. A cada aumento de 1% (p/p) de sacarose na mistura de sorvetes, ocorreu um abaixamento de 0,135ºC, o que foi um pouco inferior aos resultados obtidos.

As temperaturas mais baixas de início de fusão foram obtidas tanto em altas concentrações de caseinato e IPS quanto em baixas concentrações destas proteínas. Provavelmente, quando as concentrações das proteínas no sistema são baixas, a ação da sacarose em favorecer a interação proteína-proteína não é efetiva porque o sistema está

diluído. No entanto, em altas concentrações de proteínas, a formação da rede tridimensional de proteína é mais efetiva, inclusive com a carragena, sendo parte da água livre aprisionada nos poros desta rede. Assim, nos dois casos, a fração de água livre que não está associada às proteínas, é ligada por pontes de hidrogênio com a sacarose, o que leva a um abaixamento da temperatura de início de fusão.

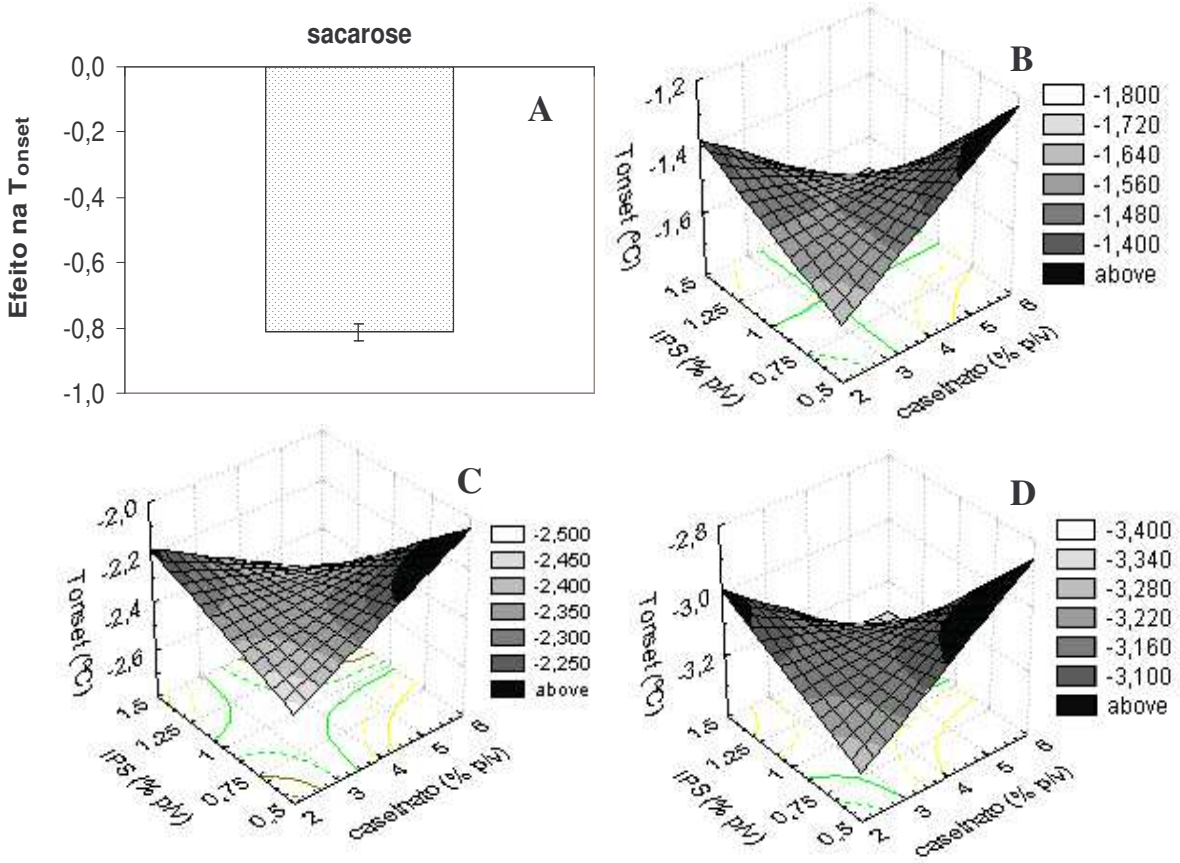


Figura 4.4. (A) Efeito ($p<0,05$) da concentração de sacarose e superfícies de resposta mostrando a influência do caseinato, IPS e sacarose na T_{onset}. Análise na concentração de carragena fixa em 0,3% (p/v) e concentrações de sacarose: (B) em 5% (p/v), (C) em 10% (p/v) e (D) em 15% (p/v).

O modelo matemático codificado (Equação 4.3), obtido a partir do planejamento experimental, descreve o comportamento da temperatura de início de fusão (T_{onset}) em relação às concentrações de caseinato, sacarose, carragena e IPS. A validade estatística do modelo foi obtida pela Análise de Variância, em um nível de confiança de 95%, onde a relação F_{cal}=26,90 F_{tab} e F_{FA}=0,76 F_{tab} (a falta de ajuste (FA) do modelo não é estatisticamente significativa).O coeficiente de regressão foi 0,94.

$$T_{onset} = -2{,}34 - 0{,}04.IPS - 0{,}41.SAC - 0{,}05.CAR.IPS - 0{,}06.CAS.IPS \quad (4.3)$$

onde CAR é a carragena, CAS é o caseinato de sódio, IPS é o isolado de proteínas do soro e SAC é a sacarose.

4.3.2 Ensaios de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A Figura 4.5 mostra um exemplo (Formulações 3, 4, 7, 8, 11 e 12 – Tabela 4.4) de gel de poliacrilamida analisado sob condições nativas, o qual mostra as bandas de proteínas com os maiores pesos moleculares, situadas na parte superior do gel, até as de menores pesos moleculares, localizadas na parte inferior do gel. Observa-se também que na parte superior do gel de poliacrilamida há bandas (proteínas) que não entraram na malha de poliacrilamida, provavelmente por possuírem peso molecular maior que 200 kDa (Walker, 1994) e que não puderam ser quantificadas.

A análise em condições nativas permitiu avaliar as interações entre as frações de caseína e as proteínas do soro, ocorridas após o tratamento térmico realizado neste trabalho. Os possíveis agregados formados foram separados na malha de poliacrilamida baseados tanto no volume hidrodinâmico, quanto na carga líquida total do polipeptídeo ou dos seus agregados. Estes agregados podem ser formados por interações não-covalentes (hidrofóbicas) e por ligações covalentes do tipo dissulfeto, sendo que a

análise sob condições nativas permite verificar a presença e tamanho destes agregados (Oldfield *et al,* 1998 a, b).

As frações de proteínas separadas por esta metodologia foram identificadas com o auxílio do marcador de peso molecular das frações puras e a intensidade relativa das bandas foi analisada utilizando um planejamento experimental de segunda ordem. Os resultados serão apresentados no Item 4.3.2.1.

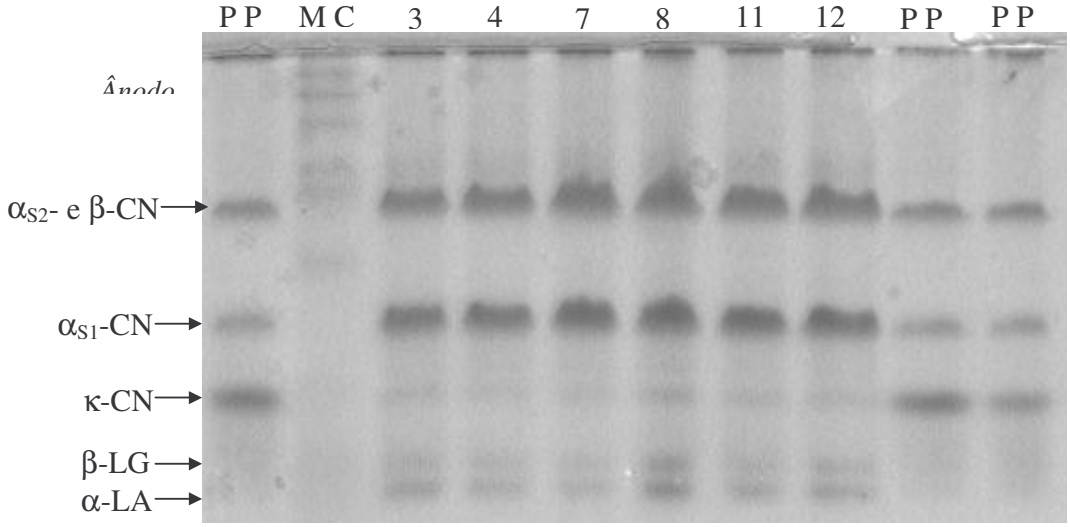


Figura 4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida analisado em condições nativas (Nativo - PAGE). PP são os pesos moleculares padrão, MC é o marcador de peso molecular comercial, CN é caseína, LG é lactoglobulina e LA é lactoalbumina. As formulações apresentadas na Figura são: 03, 04, 07, 08, 11 e 12 – Tabela 4.4.

A Figura 4.6 apresenta um exemplo eletroforese em gel de poliacrilamida analisado em condições desnaturantes e não-redutoras. A desnaturação das proteínas foi promovida pelo SDS (dodecil sulfato de sódio), que é um detergente aniônico que se liga às moléculas de proteínas. Nestas condições, os agregados de proteínas associados por

interações hidrofóbicas, eletrostáticas e outras foram dissociados pela ação do SDS. No entanto, este detergente aniônico não consegue romper as pontes dissulfeto, que são reduzidas pela ação do 2-mercaptoetanol, sendo as únicas interações que foram detectadas nesta análise (Oldfield *et al.*, 1998 a, b).

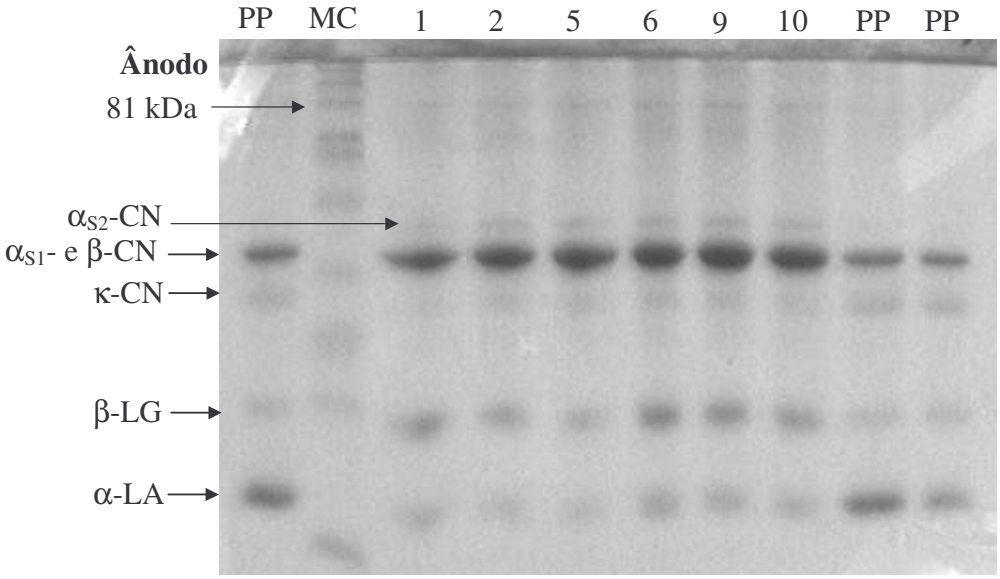


Figura 4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida analisado sob condição desnaturante e não-redutora (SDS-PAGE não-redutor).PP são os pesos moleculares padrão, MC é o marcador de peso molecular comercial, CN é caseína, LG é lactoglobulina e LA é lactoalbumina. As formulações apresentadas na Figura são: 01, 02, 05, 06, 09 e 10 – Tabela 4.4.

A Figura 4.7 mostra um exemplo de gel de poliacrilamida analisado sob condição desnaturante e redutora. As proteínas analisadas sob estas condições foram separadas em unidades, pois todos os tipos de agregação foram desfeitos e as proteínas foram separadas em relação à massa da fração de proteína. O SDS, que é um detergente aniônico, ligou-se à molécula de proteína conferindo carga negativa, o que favoreceu a migração da proteína em direção ao cátodo (pólo positivo) da cuba de eletroforese. Esta

ação do SDS promove a desnaturação das proteínas. O agente redutor de pontes dissulfeto utilizado nestes ensaios foi o 2-mercaptoetanol, que promoveu a dissociação dos agregados formados por estas ligações permitindo separar todas as proteínas presentes no sistema em suas unidades primárias.

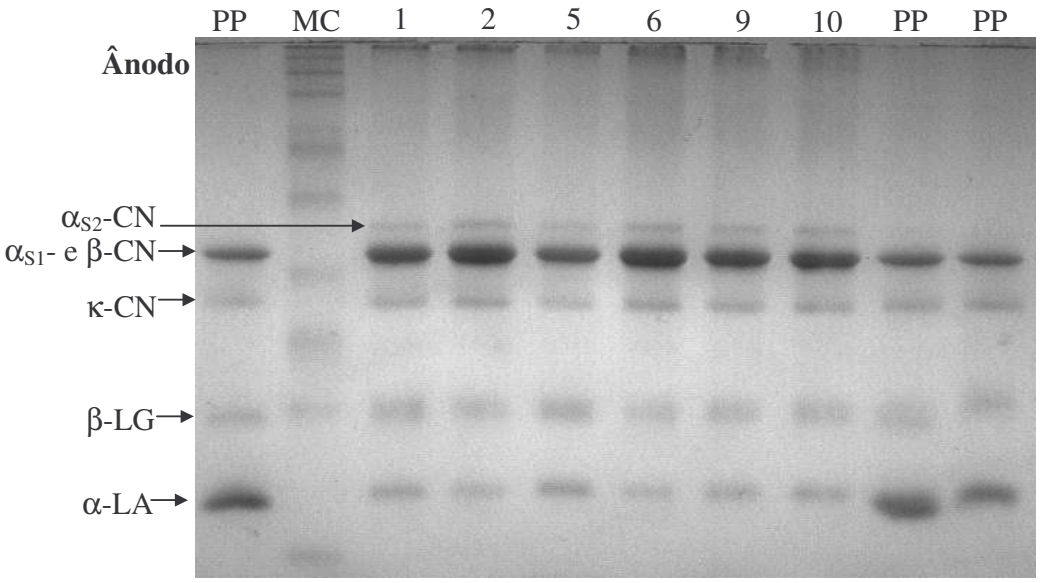


Figura 4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida analisado sob condição desnaturante e redutora (SDS-PAGE redutor). PP são os pesos moleculares padrão, MC é o marcador de peso molecular comercial, CN é caseína, LG é lactoglobulina e LA é lactoalbumina. As formulações apresentadas na Figura são: 01, 02, 05, 06, 09 e 10 – Tabela 4.4.

Análise das frações de proteínas do leite livres em solução

A – α_{S2}-caseína

A análise da intensidade relativa das bandas referentes à α_{S2}-caseína para cada formulação do planejamento experimental (Tabela 4.4) em análise, sob condições desnaturantes não-redutora e redutora, permitiu a obtenção do efeito dos componentes do sistema sobre a fração livre desta proteína (Figuras 4.8A e 4.8 C). O caseinato influenciou positivamente a quantidade de α_{S2}-caseína liberada, tanto em condições desnaturantes não-redutoras (Figura 4.8 C) quanto em condições desnaturantes e redutoras (Figura 4.8 A). Já o IPS influenciou positivamente a quantidade de α_{S2}-caseína em condição desnaturante e redutora. O fato de o aumento da concentração de caseinato levar a um aumento da quantidade desta proteína livre neste sistema é esperado, pois a α_{S2}-caseína faz parte da composição do caseinato. No entanto, um aumento da concentração de IPS promove uma diminuição da quantidade de α_{S2}-caseína livre no sistema. Esta influência do IPS, provavelmente se deve ao fato de que as proteínas do soro interagem com as α_{S2}-caseínas, pois estas proteínas possuem a capacidade de fazer ligações dissulfeto por conter resíduos de cisteína (Rasmussen *et al.*, 1999). Por outro lado, a Figura 4.8 C mostra a influência positiva do IPS, sendo que o mecanismo no qual o aumento da concentração de IPS leva a um aumento da quantidade de α_{S2}-caseína, parece contraditório. Uma explicação seria que com o aumento das proteínas do soro há uma maior tendência destas proteínas interagirem com a κ-caseína, promovendo de algum modo, o enfraquecimento dos arranjos das frações de caseína ("sub-micelas") e levando à liberação da α_{S2}-caseína.

As superficies de resposta (4.8 B e D), mostram uma relação não-linear de α_{S2}-caseína livre, em relação às concentrações de caseinato e IPS. Na Figura 4.8 D observa-se que as maiores quantidades de α_{S2}-caseínas livres ocorreram em concentrações máximas de IPS e em uma faixa de alta concentração de caseína (4-6% p/v). Já na Figura 4.8 B observa-se que as menores quantidades de α_{S2}-caseínas livres em solução foram obtidas em mínimas concentrações de caseinato e IPS.

Não foi possível analisar o comportamento da α_{S2}-caseína em condição nativa, pois, para esta proteína, que tem peso molecular e, possivelmente, carga líquida total molecular muito próxima à da β-caseína, as bandas não se separaram e a quantificação não foi possível.

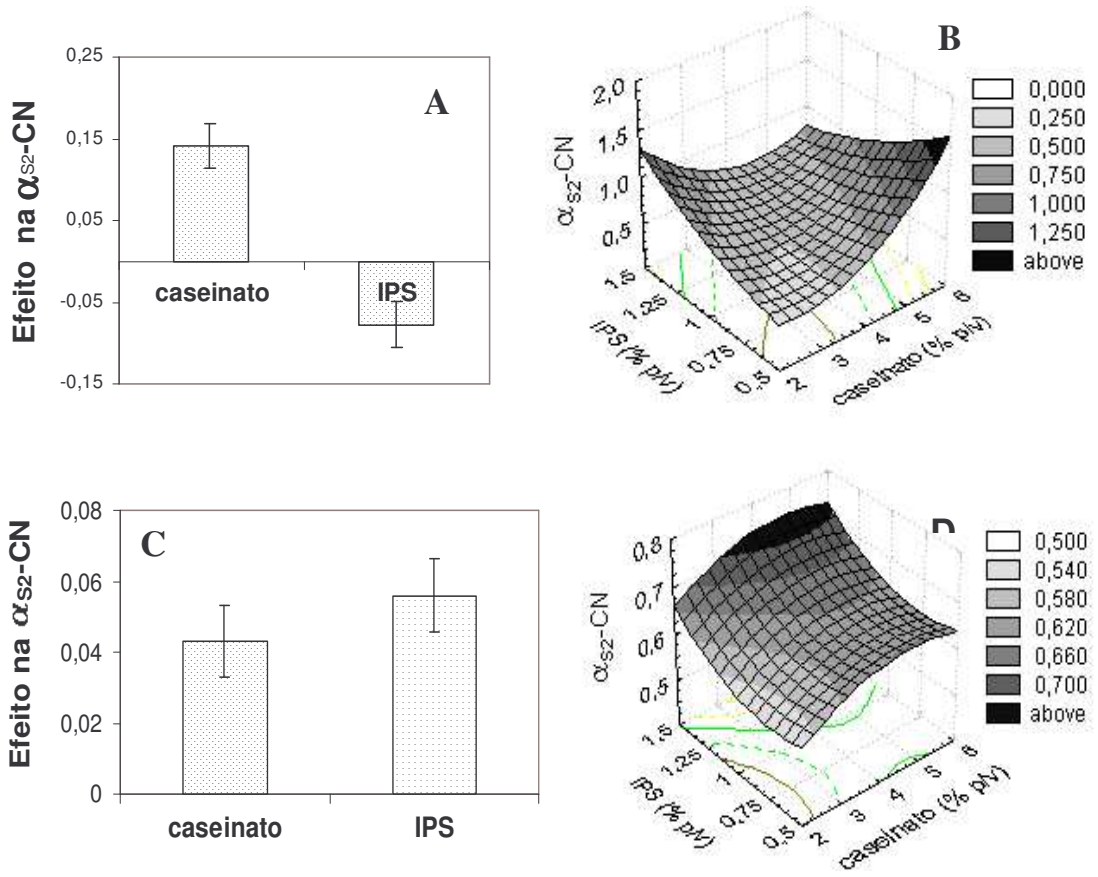


Figura 4.8. Efeito ($p<0,10$) das concentrações de caseinato e IPS nas quantidades de α_{S2}-caseínas livres em solução, analisadas em condições (A) desnaturantes e redutoras e (C) desnaturantes e não-redutoras. Superfícies de resposta da quantidade de α_{S2}-caseínas em relação à concentração de IPS e caseinato no sistema. (B): Análise sob condições desnaturantes e redutoras e (D) Análise sob condições desnaturantes e não-redutoras.

Os modelos matemáticos codificados, apresentados na Tabela 4.5, foram obtidos a partir do planejamento experimental e descreveram o comportamento da quantidade de α_{S2}-caseína em relação à concentração de caseinato e IPS analisado sob condições

desnaturante e não-redutora e desnaturante e redutora. A validade estatística dos modelos (nível de confiança de 90%) foi verificada pela Análise de Variância e os valores obtidos de F_{calc}/F_{tab}, F_{FA}/F_{tab}, assim como o coeficiente de correlação, estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos codificados da α_{S2}-caseína e parâmetros estatísticos desses modelos.

	SDS-PAGE	
	Não-redutor	**Redutor**
Média	0,62	0,28
CAS	0,02	0,09
$(CAS)^2$	-0,01	0,11
IPS	0,03	-
$(IPS)^2$	0,01	0,03
IPS.CAS	-	-0,12
F_{cal}/F_{tab}	3,58	5,06
F_{FA}/F_{tab}	0,21	0,73
R^2	0,89	0,90

B – α_{S1} -caseína

A análise da intensidade relativa das bandas da α_{S1}-caseína sob condição nativa, foi realizada utilizando um planejamento experimental de segunda ordem e permitiu a obtenção do efeito do caseinato e IPS sobre a quantidade de α_{S1}-caseína livre. A Figura 4.9 A, mostra que um aumento na concentração de caseinato leva a um aumento na quantidade de α_{S1}-caseína livre no sistema. Esse comportamento era esperado pois a α_{S1}-caseína faz parte da composição do caseinato. O IPS não mostrou influência ($p<0,10$) no comportamento da α_{S1}-caseína, o que é explicado pelas características das α_{S1}-caseínas, que não fazem pontes dissulfeto com as proteínas do soro. Estas proteínas

têm sido associadas à formação da parte central da caseína, juntamente com as β- e α_{S2}-caseínas, por possuírem características hidrofóbicas mais pronunciadas que a κ-caseína, que forma a parte externa das micelas de caseína (Kruif, 1999). Esta fração estaria associada às outras caseínas por interações hidrofóbicas para formar possíveis "sub-micelas". No entanto, na temperatura sob a qual os sistemas analisados foram mantidos (10ºC), as interações hidrofóbicas entre as proteínas são muito fracas (Dalgleish & Law, 1988), diminuindo o número de tais interações.

A Figura 4.9 B mostra que as maiores quantidades de α_{S1}-caseínas livres em solução ocorreram em máximas concentrações de caseinato e ampla faixa de concentração intermediária de IPS.

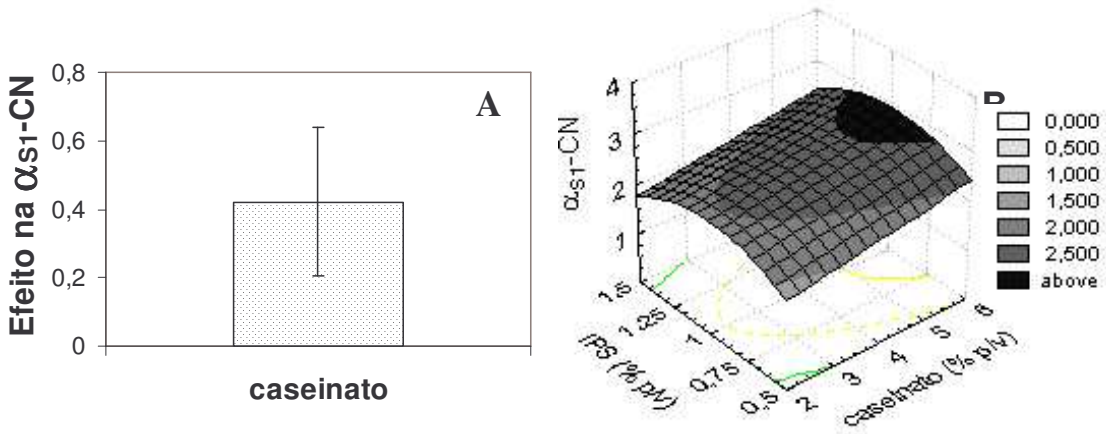


Figura 4.9. (A) Efeito (p<0,10) da concentração de caseinato na quantidade de α_{S1}-caseínas livres em solução. (B) Superfície de resposta das quantidades de α_{S1}-caseína em relação à variação de concentração de IPS e caseinato no sistema. Análise sob condição nativa.

O modelo matemático codificado, apresentado na Tabela 4.6, obtido a partir do planejamento experimental, descreve o comportamento da quantidade de α_{S1}-caseína livre em relação à concentração de caseinato e IPS (analisado sob condição nativa). A

validade estatística dos modelos (nível de confiança de 90%) foi verificada pela Análise de Variância e os valores obtidos de F_{calc}/F_{tab}, F_{FA}/F_{tab}, assim como o coeficiente de correlação, estão apresentados naTabela 4.6.

Tabela 4.6. Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos codificados da α_{S1}-caseína e parâmetros estatísticos desses modelos.

	Nativo-PAGE
Média	2,35
CAS	0,22
IPS^2	-0,16
IPS.CAS	0,27
F_{cal}/F_{tab}	3,34
F_{FA}/F_{tab}	1,14
R^2	0,80

C - κ-caseína

A quantidade de κ-caseína livre no sistema foi influenciada positivamente pela concentração de caseinato adicionada ao sistema, o que é apresentado pelas Figuras 4.10 A, C e E. No entanto, em análise sob condição desnaturante e redutora, a concentração de IPS influenciou negativamente a quantidade de κ-caseína livre em solução (Figura 4.10 E). A superfície de resposta (Figura 4.10 B) mostra que as maiores concentrações de κ-caseína foram obtidas tanto em concentrações máximas de IPS e mínimas de caseinato quanto em máximas concentrações de caseinato e mínimas de IPS, em análise sob condições nativas. Na Figura 4.10 D é mostrado o comportamento da quantidade de κ-caseína livre em solução em relação à concentração de caseinato e IPS e observa-se que a maior quantidade de κ-caseína ocorre em uma faixa de altas concentrações de caseinato (análise em condições desnaturantes e não-redutoras). Já na Figura 4.10 F, as maiores quantidades de κ-caseína, analisadas sob condição desnaturante e redutora,

foram obtidas em uma ampla faixa de concentração intermediária de caseinato e em mínimas concentrações de IPS.

As moléculas de κ-caseína livres no sistema poderiam interagir com as proteínas do soro, assim como formar complexos eletrostáticos com a κ-carragena, em um sistema onde ocorre a mistura destas proteínas e deste polissacarídeo em pH neutro, conforme relatado por Heertje (1993), Tziboula & Horne (1999) e Schorsch *et al.* (2000).

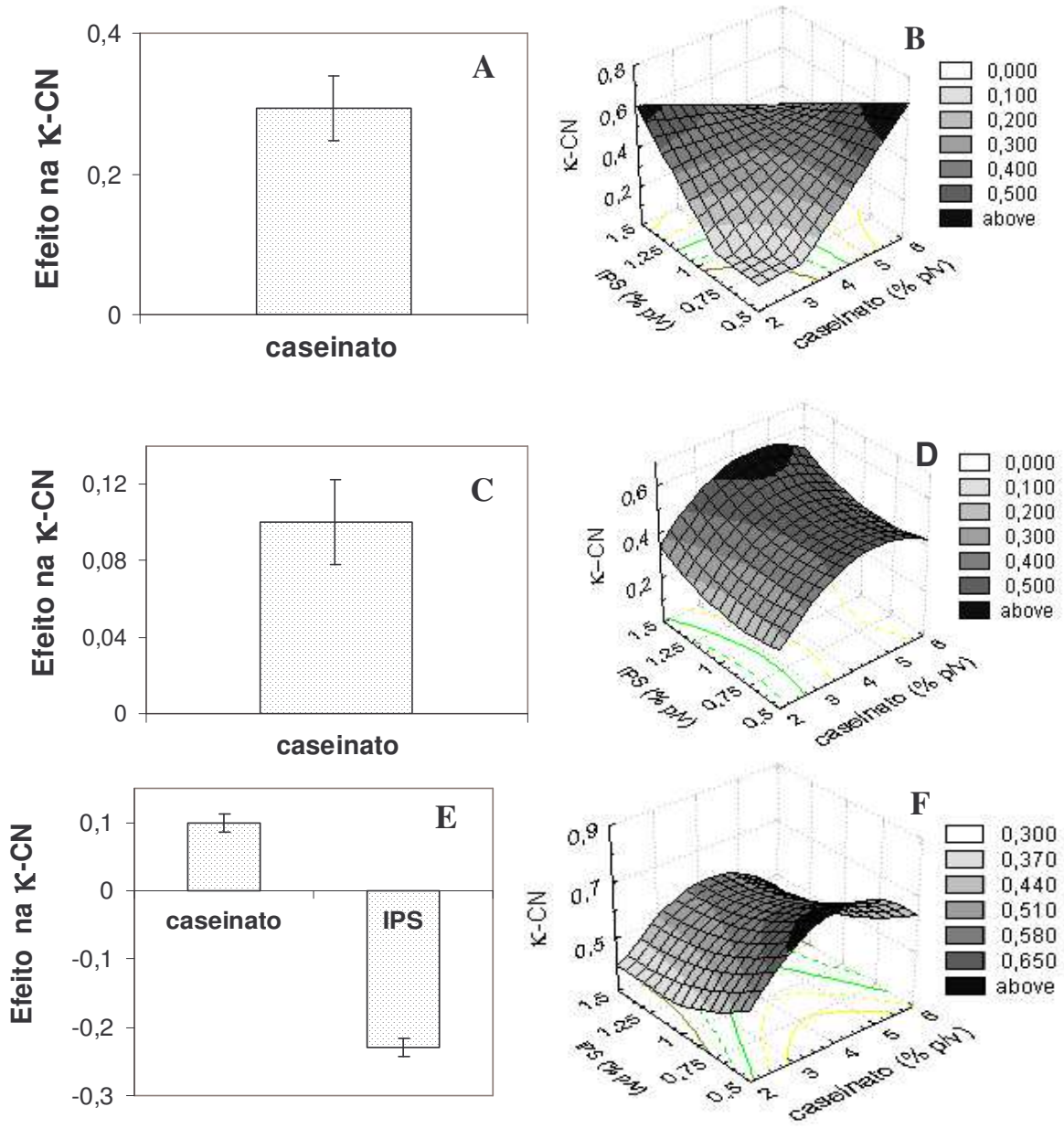


Figura 4.10. (A, C e E) Efeito ($p<0,10$) das concentrações de caseinato e IPS nas quantidades de κ-caseína livres em solução. (B, D e F) Superfícies de resposta das quantidades de κ-caseína em relação às concentrações de IPS e caseinato. (A) e (B) analisado sob condição nativa, (C) e (D) analisado em condição desnaturante e não-redutora e (E) e (F) analisado sob condição desnaturante e redutora.

Os modelos matemáticos codificados, apresentados na Tabela 4.7, foram obtidos a partir do planejamento experimental e descrevem o comportamento da quantidade de κ-caseína livre em relação à concentração de caseinato e IPS sob condições nativas, desnaturante e não-redutora e desnaturante e redutora. A validade estatística dos modelos (nível de confiança de 90%) foi verificada pela Análise de Variância e os valores obtidos de F_{calc}/F_{tab}, $F_{FA}/F_{tab,}$ assim como o coeficiente de correlação, estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos codificados da κ-caseína e parâmetros estatísticos desses modelos.

		SDS-PAGE	
	Nativo-PAGE	**Não-redutor**	**Redutor**
Média	0,29	0,42	0,57
CAS	-0,07	0,05	0,02
CAS^2	-	-0,05	-0,05
IPS	0,05	0,02	-0,06
IPS^2	-	0,02	0,02
IPS.CAS	-0,08	-	-
F_{cal}/F_{tab}	1,90	1,97	4,38
F_{FA}/F_{tab}	0,10	0,68	0,32
R^2	0,74	0,79	0,95

D - β-lactoglobulina

A análise da intensidade relativa das bandas referentes à β-lactoglobulina permitiu a obtenção dos efeitos ($p<0,10$) dos componentes do sistema sobre a fração livre desta proteína (Figura 4.11 A, C e E). Os gráficos de efeito (Figura 4.11 A, C e E) mostram que a quantidade de β-lactoglobulina livre aumentou com o aumento da concentração de IPS na formulação, pois a β-lactoglobulina está presente no isolado protéico de soro. O aumento da concentração de caseinato levou a uma diminuição da

quantidade de β-lactoglobulina, o que está provavelmente associado ao fato de que esta proteína interagiu com as frações de caseína. Assim, com aumento da concentração de caseinato, houve um aumento da quantidade de caseína disponível para a β-lactoglobulina interagir, ocorrendo a formação de agregados e promovendo a diminuição de β-lactoglobulina livre nos sistemas analisados. Singh & Fox (1987) relataram que a β-lactoglobulina complexou com as micelas de caseína em pHs inferiores a 6,9, provavelmente como resultado da interação com a κ-caseína via intercâmbio de grupos sulfidrilas livres e pontes dissulfeto, após tratamento térmico na temperatura de 90ºC por 10 min. A formação deste complexo pareceu prevenir a dissociação da κ-caseína da micela sob aquecimento. No entanto, em valores de pH acima de 6,9, os complexos β-lactoglobulina/κ-caseína dissociaram-se das micelas quando a solução sofreu aquecimento, aumentando a perda da κ-caseína micelar. Com base nesses relatos, provavelmente os agregados formados envolveram a ligação de moléculas de proteínas por pontes dissulfeto. A ocorrência desta interação em proteínas do leite aquecidas foi observada por Singh & Fox (1987), Mottar *et al.* (1989) e Parnell-Clunies *et al.* (1988).

As superfícies de respostas (Figura 4.11B, D e F) mostram que as maiores quantidades de β-lactoglobulina livres no sistema analisado foram obtidas nas concentrações máximas de IPS e mínimas de caseinato, para todas as condições analisadas.

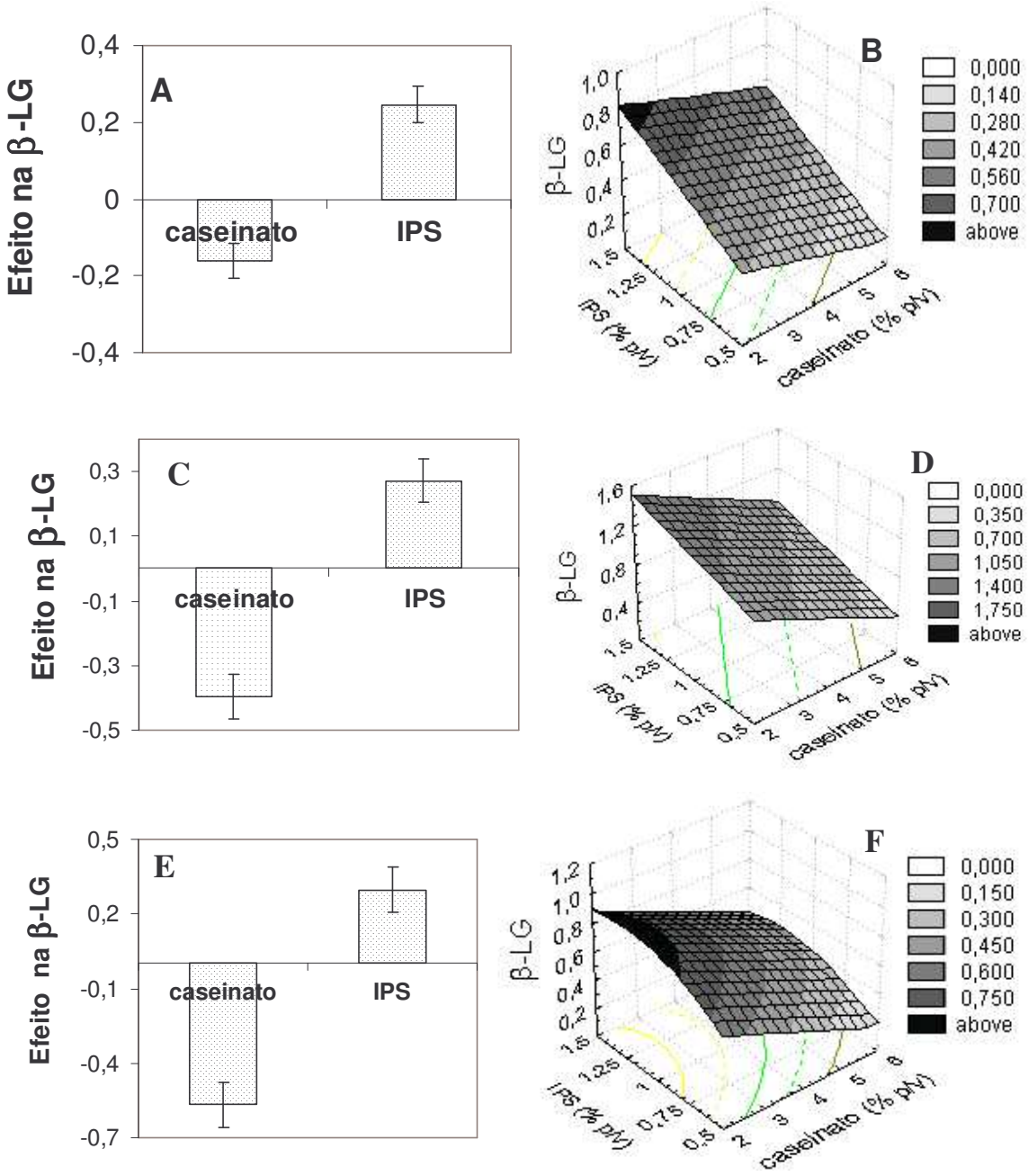


Figura 4.11. (A), (C) e (E) Intensidade de efeito ($p<0,10$) das concentrações de caseinato e IPS na quantidade de β-lactoglobulina livre em solução. (B), (D) e (F) Superfícies de resposta das quantidades de β-lactoglobulina em relação às concentrações de IPS e caseinato no sistema. (A) e (B) analisado sob condição nativa, (C) e (D) analisado sob condição desnaturante e não-redutora e (E) e (F) analisado sob condição desnaturante e redutora.

Os modelos matemáticos codificados, apresentados na Tabela 4.8, foram obtidos a partir do planejamento experimental e descrevem o comportamento da quantidade de β-lactoglobulina em relação a concentração de caseinato e IPS em análise sob condições nativas, desnaturante e não-redutora e desnaturante e redutora. A validade estatística dos modelos (nível de confiança de 90%) foi verificada pela Análise de Variância e os valores obtidos de F_{calc}/F_{tab}, F_{FA}/F_{tab}, assim como o coeficiente de correlação, estão apresentados naTabela 4.8.

Tabela 4.8. Coeficientes de regressão dos modelos matemáticos codificados da β-lactoglobulina e parâmetros estatísticos desses modelos.

		SDS-PAGE	
	Nativo-PAGE	**Não-redutor**	**Redutor**
Média	0,37	0,82	0,54
CAS	-0,08	-0,20	-0,14
CAS^2	-	-	-
IPS	0,12	0,14	0,07
IPS^2	-	-	-0,04
IPS.CAS	-	-	-
F_{cal}/F_{tab}	5,18	9,71	2,50
F_{FA}/F_{tab}	0,01	0,20	0,50
R^2	0,82	0,85	0,83

E - α-lactoalbumina

A Figura 4.12 A mostra que a quantidade de α-lactoalbumina foi influenciada ($p<0,10$) positivamente pela concentração de IPS e negativamente pela concentração de caseinato. O aumento de IPS levou a um aumento da concentração de α-lactoalbumina, pois a α-lactoalbumina faz parte da composição do isolado protéico de soro. A Figura 4.12B mostra que a concentração de caseinato pareceu influenciar levemente a

quantidade de α-lactoalbumina livre em solução, porém o efeito do IPS foi muito mais forte. Nessa Figura, observa-se que as maiores quantidades de α-lactoalbumina livres ocorreram em máximas concentrações de IPS e mínimas de caseinato.

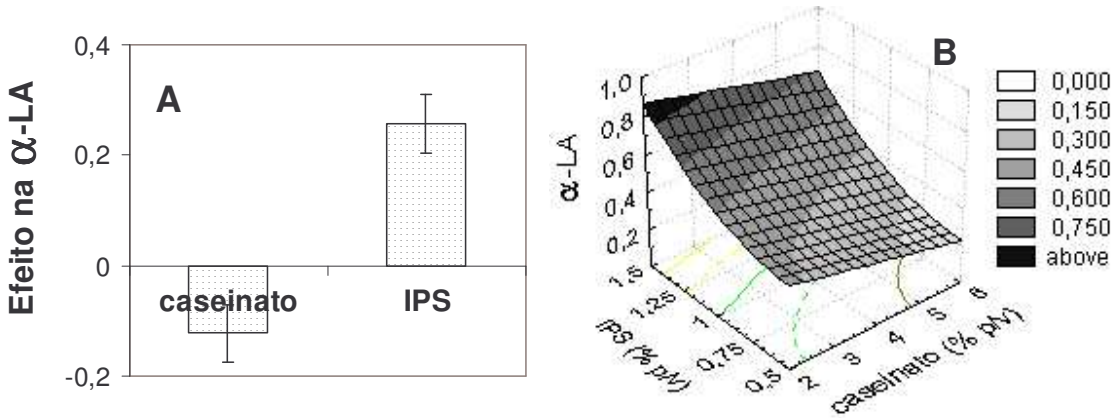


Figura 4.12. (A) Efeitos (p<0,10) da concentração de IPS e caseinato na quantidade de α-lactoalbumina livre em solução e (B) superfície de resposta das quantidades de α-lactoalbumina em relação à concentração de IPS e caseinato no sistema, analisados em condição nativa.

O modelo matemático codificado, apresentado na Tabela 4.9, foi obtido a partir do planejamento experimental e descreve o comportamento da quantidade de α-lactoalbumina em relação à concentração de caseinato e IPS em análise sob condições nativas. A validade estatística do modelo (nível de confiança de 90%) foi verificada pela Análise de Variância e o valor obtido de F_{calc}/F_{tab}, F_{FA}/F_{tab}, assim como o coeficiente de correlação, estão apresentados naTabela 4.9.

Nos demais sistemas (desnaturante redutor e não-redutor) não foi possível o ajuste dos modelos, pois estes não foram estatisticamente significativos.

Tabela 4.9. Coeficientes de regressão do modelo matemático codificado da α-lactoalbumina e parâmetros estatísticos desse modelo.

	Nativo-PAGE
Média	0,33
CAS	-0,06
CAS^2	-
IPS	0,13
IPS^2	0,03
IPS.CAS	-
F_{cal}/F_{tab}	3,74
F_{FA}/F_{tab}	0,10
R^2	0,85

F - Agregado de alto peso molecular (~ 81 kDa)

A formação dos agregados de alto peso molecular, cerca de 81 kDa, observados em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes e não-redutoras foi fortemente influenciada pela concentração de caseinato (Figura 4.13 A), de forma que o aumento da concentração desta proteína levou a um aumento da quantidade dos agregados formados (Figura 4.13 B), provavelmente por ligações do tipo ponte dissulfeto. Esta agregação não foi detectada na análise sob condições nativas, provavelmente porque sem a ação do SDS, o agregado formado não conseguiu entrar no gel, por possuir peso molecular muito alto (maior que 200 kDa) (Walker, 1994). Em análise sob condição desnaturante e redutora, a presença de 2-mercaptoetanol agiu reduzindo as ligações dissulfeto, responsáveis pela formação destes agregados. No entanto, observou-se a presença de traços de proteínas de alto peso molecular (região superior do gel de poliacrilamida) mostrada na Figura 4.7, mas pela falta de definição das bandas de proteínas, não foi possível quantificar.

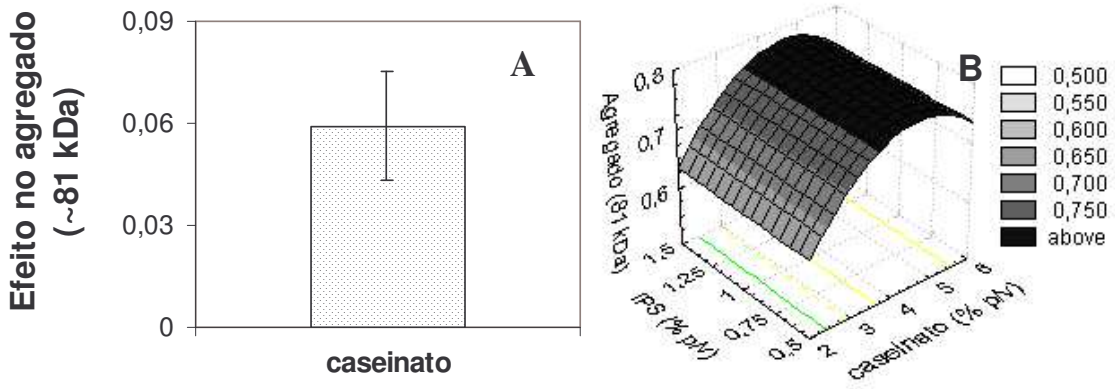


Figura 4.13. (A) Intensidade de efeito (p<0,10) da concentração de caseinato na quantidade de agregados de alto peso molecular (~81 kDa). (B) Superfície de resposta da quantidade destes agregados em relação à variação de concentração de IPS e caseinato no sistema, analisado sob condição desnaturante e não-redutora.

O modelo matemático codificado apresentado na Tabela 4.10, foi obtido a partir do planejamento experimental e descreve o comportamento da quantidade dos agregados de alto peso molecular (81 kDa) em relação à concentração de caseinato e IPS, em análise sob condição desnaturante e não-redutora. A validade estatística dos modelos (nível de confiança de 90%) foi verificada pela Análise de Variância e os valores obtidos de F_{cal}/F_{tab}, F_{FA}/F_{tab}, assim como o coeficiente de correlação, estão apresentados naTabela 4.10.

Tabela 4.10. Coeficientes de regressão do modelo matemático codificado do agregado de alto peso molecular e parâmetros estatísticos desse modelo.

	SDS não-redutor
Média	0,77
CAS	0,03
CAS^2	-
IPS	-0,02
IPS^2	-
IPS.CAS	-

F_{cal}/F_{tab}	1,06
F_{FA}/F_{tab}	0,86
R^2	0,60

4.4 Conclusões

A quantidade de água não-congelável (UFW) e a temperatura de início de fusão (T_{onset}) foram analisadas através da metodologia de Planejamento Experimental. A análise de efeitos permitiu verificar que a sacarose influencia fortemente estas propriedades do sistema, provavelmente pelo favorecimento de interações entre as proteínas e destas com a água. O caseinato de sódio contribuiu para o aumento da UFW, provavelmente pela influência da sacarose em favorecer a hidratação preferencial dessa proteína.

A análise das proteínas do sistema por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições nativa, desnaturante e não-redutora e desnaturante e redutora permitiu verificar que as concentrações das proteínas presentes no sistema influenciam na quantidade das unidades livres na solução, possibilitando a interação delas com outros componentes do sistema, como a água. Além disso, observou-se que o tratamento térmico realizado neste trabalho permitiu a interação das proteínas do soro, com as frações hidrofílicas da caseína, pois um aumento do caseinato no sistema levou à diminuição da quantidade de proteínas do soro livres nos sistema analisados.

4.5 Agradecimentos

As autoras agradecem a FAPESP, Capes e CNPq.

4.6 Referências Bibliográficas

ANTIPOVA, A. S; SEMENOVA, M. G.; BELYAKOVA, L. E. (1999) Effect of sucrose on thermodynamic properties of ovalbumin and sodium caseinate in bulk solution and at air-water interface. **Colloids and Surfaces B**, **v. 12 (3-6)**, p. 261-270.

ANTIPOVA, A. S; SEMENOVA, M. G. (1997) Effect of neutral carbohydrate structure in the set glucose/sucrose/maltodextrin/dextran on protein surface activity at the air/water interface. **Food Hydrocolloids**, **v. 11 (1)**, p. 71-77.

ANTIPOVA, A. S.; SEMENOVA, M. G. (1995) Effect of sucrose on the thermodynamic incompatibility of different biopolymers. **Carbohydrate Polymers**, **v. 28 (4)**, p. 359-365.

BARBUT, S. (1995) Effects of calcium level on the structure of preheated whey protein isolate gels. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, **v. 28**, p. 598-603.

BRADFORD, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **v. 72 (1-2)**, p. 248-254.

BRAGA, A. L. M. (2002) **Caracterização das interações macromoleculares em géis ácidos de caseína-xantana-sacarose: análises reológicas e térmica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CHINACHOTI, P.; STEINBERG, M. P. (1988) Interaction of sucrose with gelatin, egg-albumin and gluten in freeze-dried mixtures as shown by water sorption. **Journal of Food Science**, **v. 53 (3)**, p. 932.

DALGLEISH, D. G.; LAW, A. J. R. (1988) pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. **Journal of Dairy Research**, **v. 55**, p. 529-538.

EVAGELIOU, V.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. (2000) Effect of sucrose, glucose and fructose on gelation of oxidised starch. **Carbohydrate Polymer**, **v. 42 (3)**, p. 261-272.

FURUKI, T. (2000) Effect of stereochemistry on the anti-freeze characteristics of carbohydrate. A thermal study of aqueous monosaccharides at subzero temperatures. **Carbohydrate Research**, **v. 323 (1-4),** p. 185-191.

GARRETT, J. M.; STAIRS, R. A.; ANNETT, R. G. (1988) Thermal-denaturation and coagulation of whey proteins – effects of sugar. **Journal of Dairy Science**, **v. 71 (1),** p. 10-16.

HANSEN, P. M. T. (1982) Hydrocolloid-protein interactions – Relationship to stabilization of fluid milk-products – A review. **Progress in Food and Nutrition Science**, **v. 6 (1-6),** p.127-138

HEERTJE, I. (1993) Structure and function of food products: a review. **Food Structure**, **v. 12**, p. 343-364.

HIGUCHI, A.; IIJIMA, T. (1985) DSC investigation of the states of water in poly(vynil-alcohol) membranes. **Polymer**, **v. 26 (8)**, p. 1207-1211.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. (1997) Protein and salt effects on Ca^{2+} - induced cold gelation of whey protein isolate. **Journal of Food Science**, **v. 62**, p. 382-385.

JENCKS, W. P. (1969) In: **Catalysis and Chemistry and Enzimology**, McGraw-Hill, New York, p. 254.

KRUIF, C. G. (1999) Casein micelle interactions. **International Dairy Journal**, **v. 9**, p. 183-188.

KULMYRZAEV, A.; BRYANT, C.; McCLEMENTS, D. J. (2000a) Influence of sucrose on the thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **v. 48**, p. 1593-1597.

KULMYRZAEV, A.; CANCELLIERE, C.; McCLEMENTS, D. J. (2000b) Influence of sucrose on cold gelation of heat-denatured whey proteins isolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **v. 80**, p. 1314-1318.

MANGINO, M. E. (1984) Physicochemical aspects of whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, **v. 67**, p. 2711-2722.

MARSHALL, R. T.; ARBUCKLE, W. S. (1996) **Ice Cream**. 5th Edition, New York, Chapman & Hall, 349 p.

MINSON, E. I.; FENNEMA, O.; AMUNDSON, C. H. (1981) Efficacy of various carbohydrates as cryoprotectantes for casein in skim milk. **Journal of Food Science**, **v. 46**, p. 1597-1602.

MORA-GUTIERREZ, A.; FARRELL Jr., H. M. (2000) Sugar-Casein interaction in deuterated solutions of bovine and caprine casein as determined by oxygen-17 and carbon-13 nuclear magnetic resonance: A case of preferential interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; **v. 48 (8),** p. 3245-3255.

MOTTAR, J.; BASSIER, A.; JONIAU, M.; BAERT, J. (1989) Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yoghurt texture. **Journal of Dairy Science**, **v. 72,** p. 2247-2256.

OLDFIELD, D. J.; SINGH, H.; TAYLOR, M. W.; PEARCE, K. N. (1998a) Kinetics of denaturation and aggregation of whey proteins in skim milk heated in an ultra-high temperature (UHT) pilot plant. **International Dairy Journal**, **v. 8**, p. 311-318.

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

PARNELL-CLUNIES, E.; KAKUDA, Y.; IRVINE, D.; MULLEN, K. (1988) Heat-Induced protein changes in milk processed by Vat and Continuous heating systems. **Journal of Dairy Science**, **v. 71**, p. 1472-1483.

PING, Z. H.; NGUYEN, Q. T.; CHEN, S. M.; ZHOU, J. Q.; DING, Y. D. (2001) States of water in different hydrophilic polymers - DSC and FTIR studies. **Polymer**, **v. 42 (20),** p. 8461-8467.

QUINN, F. X.; KAMPFF, E.; SMYTH, G.; McBRYERT, V. J. (1988) Water in hydrogels. 1. A study of water in poly(N-vynil-2-pyrrolidone methyl-methacrylate). **Copolymer**, **v. 21 (11)**, p. 3191-3198.

RASMUSSEN, L. K.; JOHNSEN, L. B.; TSIORA, A.; SØRENSEN, E. S.; THOMSEN, J. K.; NIELSEN, N. C.; JAKOBSEN, H. J.; PETERSEN, T. E. (1999) Disulphide-linked caseins and casein micelles. **International Dairy Journal**, **v. 9 (3-6)**, p. 215-218.

SCHORSCH, C.; JONES, M. G.; NORTON, I. T. (1999) Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. **Food Hydrocolloids**, **v. 13**, p. 89-99.

SCHORSCH, C., JONES, M. G. NORTON, I. T. (2000) Phase behavior of pure micellar casein/κ-carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. **Food Hydrocolloids**, **v. 14**, p. 347-358.

SINGH, H.; ROBERTS, M. S.; MUNRO, P. A.; TEO, C. T. (1996) Acid-induced dissociation of casein micelles milk: effects of heat treatment. **Journal of Dairy Science**, **v.79**, p.1340-1346.

SINGH, H.; FOX, P. F. (1987) Heat stability of milk: role of β-lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar κ-casein. **Journal of Dairy Research**, **v. 54**, p. 509-521.

TZIBOULA, A.; HORNE, D. S. (1999) Influence of milk proteins on κ-carrageenan gelation. **International Dairy Journal**, **v. 9**, p. 359-364.

WALKER, J. M. (1994) Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: Walker, J. M. (Ed.) **Methods in Molecular Biology**, Totowa, NJ, Humana Press Inc. Chapter 4, p. 17-22. (Vol. 32: Basic Protein and Peptide protocols).

CAPÍTULO 5

Conclusões gerais

Os sistemas-modelo formados por caseinato, isolado protéico de soro (IPS), sacarose e carragena apresentaram características reológicas que foram fortemente influenciadas pela carragena, que favoreceu o caráter elástico e provavelmente interagiu com o caseinato e as proteínas do soro. A presença de sacarose no sistema pareceu favorecer a interação do IPS com a carragena, levando a uma rede tridimensional mais interconectada, portanto, mais elástica e resistente à ruptura. Os ensaios oscilatórios em cisalhamento mostraram que a interação do caseinato com a carragena contribuiu ao comportamento viscoso dos sistemas, possivelmente pela diminuição da rigidez da rede tridimensional do gel.

O modelo proposto para a explicação do comportamento dos componentes do sistema considerou que a carragena interagiu com o caseinato formando a rede do gel. As proteínas do soro se ligaram à rede nas moléculas de carragena permitindo a expansão destas interações. Assim, a rede tridimensional do gel seria formada entre as proteínas do leite e a carragena, sendo este polissacarídeo a ponte que conecta o caseinato e IPS. Em altas concentrações de carragena, esta participou mais efetivamente da formação da rede, levando a sistemas mais elásticos.

A quantidade de água não-congelável (UFW) e a temperatura de início de fusão (T_{onset}) foram fortemente influenciadas pela concentração de sacarose no sistema, o que foi explicado pelo papel da sacarose no favorecimento das interações entre as proteínas e destas com a água. Além disso, o caseinato de sódio contribuiu para o aumento da UFW, em baixas concentrações de sacarose. Já em altas concentrações deste componente, observou-se o efeito da hidratação preferencial, pois o caseinato não contribuiu para o aumento da UFW.

Nos sistemas estudados não foi observado a sinerese (água livre), pois provavelmente a água livre foi aprisionada, pelo efeito da capilaridade, nos poros da rede formada pela interação da carragena com as proteínas do leite. No entanto, esta água que está associada ao gel, congela a 0ºC e está livre para agir como solvente para pequenas moléculas.

A análise das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições nativas, desnaturante e não-redutora e desnaturante e redutora permitiu verificar que as concentrações das proteínas presentes no sistema influenciaram na quantidade das unidades livres em solução, possibilitando a interação delas com outros componentes do sistema, como a água. Além disso, observou-se que o tratamento térmico realizado neste trabalho (70ºC por 30 minutos) permitiu a interação das proteínas do soro com as frações hidrofílicas da caseína, pois um aumento do caseinato levou à diminuição da quantidade de proteínas do soro livres nos sistemas analisados.