



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Engenharia de Alimentos

**INFLUÊNCIA DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA E DO PH SOBRE
AS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE PROTEÍNAS DO SORO E
SUA COMPATIBILIDADE TERMODINÂMICA COM A XANTANA.**

ÂNGELO LUIZ FAZANI CAVALLIERI

Engenheiro de Alimentos, 2000 (IBILCE – UNESP)

PROF^A. DR^A. 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

C314i Cavallieri, Ângelo Luiz Fazani
Influência da desnaturação térmica e do pH sobre as propriedades reológicas de proteínas do soro e sua compatibilidade termodinâmica com a xantana / Ângelo Luiz Fazani Cavallieri. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

1.Proteínas. 2.Goma xantana. 3.Diagrama de fases.
4.Reologia. 5.Biopolímeros. I.Cunha, Rosiane Lopes da.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosiane Lopes da Cunha
(ORIENTADORA) – DEA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Grosso
(MEMBRO) – DEPAN/FEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Freitas Moraes

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral
(MEMBRO) DEA/FEA/UNICAMP

Dedico este trabalho a minha MãE, Dona Ana...

v

Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai – vos de que as grandes proezas foram conquistas do que parecia impossível.

Charlie Chaplin

The interactions between components are more significant for the functionality of a multicomponent physical system than the composition of the components. In a soccer game, the ball can be kicked by the feet or by the head, however, for an effective soccer team, this is not of so great importance as the interactions between the players.

Vladimir Tolstoguzov

O coração, a cada chamado da vida, deve estar pronto para a partida e um novo início. E corajosamente e sem tristeza entregar-se a outros novos compromissos. Em todo o recomeço existe um encanto que protege e ajuda a viver.

Hermann Hesse

Meu muito obrigado,

A DEUS em primeiro lugar...

A você Rosi, por ter acreditado e ter visto em mim um potencial,
Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Freitas Moraes, ao Prof. Dr. Carlos Grosso e ao Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral; gostaria de agradecer pelas valiosas sugestões que contribuíram muito para a melhoria deste trabalho.

Aos professores e funcionários do DEA/UNICAMP, em especial a Prof^a. Fernanda pela a oportunidade do PED e a Prof^a. Florência, por quem sempre tive grande admiração e respeito.

Ao professor Adilson Leite por ter possibilitado o uso da ultracentrifuga, e ao professor Marcelo Menossi pelas valiosas orientações,

A Arla Foods Ingredients pelo fornecimento do material, isolado protéico de soro de leite.

Aos meus pais, que me deram todas as possibilidades e o apoio para ser a pessoa e o profissional que eu sou hoje,

A você Paulino, por todo seu apoio e incentivo, sem você as eletroforeses teriam sido praticamente impossíveis,

A todo o pessoal do CBMEG, Carol, Jú, Jorge, Geraldo, Edina, Sandra...

Ana Carolina, você foi a primeira pessoa que me incentivou e apoiou nessa caminhada, obrigado pela amizade nesses últimos dois anos,

A você Katchu, por sua presença e ajuda de todos os momentos, e a você Ana Braga, por todo o seu apoio, foi muito bom trabalhar e aprender com vocês,

Roberta, Jú Rabelo, Paty Neusa, pelo incentivo e amizade,

Alline, foi bom ter você pra conversar durante esse tempo todo, obrigado pela amizade e incentivo,

Aos amigos mais próximos: A minha grande amiga Aldrey, por todo incentivo, compreensão, apoio e paciência comigo. A você Renato, por seu companheirismo, por me acalmar, incentivar e estar sempre presente nos momentos mais difíceis...

Foram tantas as pessoas que ajudaram, que peço desculpa aos que eu tenha esquecido de mencionar aqui, mas todos tiveram o seu papel e foram muito importantes.

Valeu...

Gostaria também de agradecer a CAPES pela bolsa e a FAPESP pelo apoio financeiro.

Posso dizer que o melhor de tudo foi ter encontrado bons amigos!!!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	xvii
GENERAL ABSTRACT	xix
CAPÍTULO 01. Introdução geral	1
CAPÍTULO 02. Revisão bibliográfica geral	7
2.1. Proteínas do leite	9
2.2. O soro do leite	9
2.2.1 β -Lactoglobulina (β -La)	11
2.2.2 α -Lactoalbumina (α -La)	11
2.2.3 Albumina sérica (BSA)	12
2.2.4 Imunoglobulinas	12
2.3. Xantana	13
2.4. Glucona-δ-lactona (GDL)	14
2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida	15
2.6. Viscosidade extensional	17
2.6.1 Fundamento teórico da técnica "Imperfect Squeezing Flow"	20
2.7. Misturas de biopolímeros	27
2.8. Diagramas de fases	28
2.9 Compatibilidade e separação de fases segregativa entre proteínas do IPS e xantana.	32
2.10 Efeito termodinâmicos relacionados ao volume excluído das moléculas	33
2.11. Referências bibliográficas	35
CAPÍTULO 03. Relação entre a agregação das proteínas do soro e sua incompatibilidade termodinâmica com a xantana a 10°C.	41
RESUMO	43
3.1. Introdução	43
3.2. Materiais e métodos	46
3.2.1 Materiais	46
3.2.2 Soluções estoque	47
3.2.3 Preparo das amostras e tempo de equilíbrio	47
3.2.4 Determinação do diagrama de fases	48
3.2.5 Ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida	49

3.3. Resultados e discussão	50
3.3.1 Determinação do ponto de equilíbrio termodinâmico	50
3.3.2 Diagrama de fases e dados de equilíbrio	53
3.3.3 Dificuldades na construção do diagrama de fases	57
3.3.4 Agregação das proteínas do soro após o tratamento térmico	58
3.4 Considerações termodinâmicas	63
3.5. Conclusões	66
3.6. Referências bibliográficas	67

CAPÍTULO 04. Viscosidade extensional de géis ácidos de proteínas de soro 73

RESUMO	75
4.1. Introdução	75
4.2. Considerações teóricas sobre a técnica de CBIL	78
4.3. Materiais e métodos	80
4.3.1 Materiais	80
4.3.2 Tratamento térmico das proteínas do soro	81
4.3.3 Acidificação e formação dos géis de proteínas do soro	81
4.3.4 Ensaio reológico	82
4.3.5 Tratamento dos resultados	82
4.4. Resultados e discussões	83
4.4.1 Resultados	83
4.4.2 Discussão de resultados	90
4.4.2.1 Caracterização dos géis e estimativa dos índices de comportamento e consistência por CBIL	90
4.4.2.2 Viscosidade extensional e consistência dos géis de IPS	92
4.4.2.3 Agregação das proteínas do soro – Interações induzidas pelo pré - tratamento térmico e redução do pH.	93
4.5. Conclusão	98
4.6. Referências bibliográficas	99

CAPÍTULO 05. Conclusões gerais 105

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição do soro do leite e algumas propriedades dos componentes	10
Tabela 3.1: Valores de composição das fases e ponto central obtidos após centrifugação das amostras.	55
Tabela 3.2: Massa das amostras referentes aos pares de tubo da ultracentrífuga e valores de fração mássica das fases inferior (ϕ_1) e superior (ϕ_2).	56
Tabela 4.1: Parâmetros reológicos de géis ácidos de IPS determinados por CBIL.	86
Tabela 4.2: Tensões residuais (kPa) de géis ácidos de IPS após relaxação da força de compressão aplicada no sistema à velocidade de compressão 0,2mm/s.	87
Tabela 4.3: Tensões aparentes (kPa) de géis ácidos de IPS para velocidade de compressão de 0,2mm/s.	88
Tabela 4.4: Viscosidade extensional aparente (kPa*s) de géis ácidos de IPS para velocidade de compressão 0,2mm/s.	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura molecular da xantana	14
Figura 2.2: Hidrólise do GDL a ácido glucônico	15
Figura 2.3 Configuração dos testes de viscosimetria de compressão biaxial com geometria e placa de compressão paralelos	19
Figura 2.4: Esquema de uma geometria imperfeita onde a placa de fundo é substituída por um recipiente largo.	21
Figura 2.5 Vista esquemática do perfil dos possíveis fluxos extensionais (a) Escoamento com atrito, (b) Escoamento sob lubrificação	24
Figura 2.6. Diagrama de fases isotérmico de sistema água-gelatina-goma jataí.	29
Figura 2.7 Representação esquemática do volume excluído para moléculas esféricas e rígidas de proteínas globulares e polissacarídeo rígido de elevado peso molecular.	34
Figura 3.1. Curva-padrão para determinação de xantana pelo método fenol-sulfúrico.	49
Figura 3.2: Linhas de amarração obtidas nos ensaios preliminares para a determinação do ponto de equilíbrio.	51
Figura 3.3: Variação de IPS na fase superior (A) e inferior (B) nos tempos de 72, 96 e 120 horas.	52
Figura 3.4: Variação de xantana na fase superior (A) e inferior (B) nos tempos de 72, 96 e 120 horas	52
Figura 3.5: Diagrama de fases para o sistema IPS desnaturado termicamente (80°C / 30 minutos) e xantana	53
Figura 3.6 Eletroforeses em gel de poliacrilamida de soluções de IPS nativo e termicamente desnaturado	59
Figura 3.7: Desenvolvimento de uma estrutura filamentosa de maior massa molecular, através do aquecimento das proteínas do soro.	62

Figura 4.1: Relação entre a Força de compressão (N) a altura momentânea de amostra (m) durante ensaio de CBIL para géis ácidos de IPS obtidos em diferentes pHs	84
Figura 4.2: Relação entre a viscosidade extensional (kPa*s) e a taxa de deformação (s^{-1}) dos géis ácidos de IPS.	84
Figura 4.3: Correlação entre os valores de índice de consistência (k) e a viscosidade extensional determinada a 50% de deformação da altura de amostra para os géis ácidos de IPS.	93
Figura 4.4: Representação esquemática do processo de gelificação a frio de proteínas do soro.	98

TESE DE MESTRADO

AUTOR: Ângelo Luiz Fazani Cavallieri

Título: Influência da desnaturação térmica e do pH sobre as propriedades reológicas de proteínas do soro e sua compatibilidade termodinâmica com a xantana

ORIENTADORA: ROSIANE LOPES DA CUNHA

Depto. Engenharia de Alimentos – FEA – UNICAMP

RESUMO GERAL

Proteínas e polissacarídeos correspondem a biopolímeros muito utilizados pela indústria de alimentos devido às suas características funcionais, porém apresentam uma incompatibilidade natural quando em soluções. Sistemas compostos por proteínas do soro e xantana foram avaliados neste trabalho em diferentes condições de pH, com as proteínas nativas e desnaturadas termicamente. Análises de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizadas para verificar o efeito do tratamento térmico nas proteínas do soro, mostrando que o aquecimento de soluções de proteínas do soro a 80°C por trinta minutos causou a formação de grandes agregados protéicos estabilizados principalmente por interações dissulfídicas. Estes agregados tiveram influência marcante no comportamento de fases destas proteínas com a xantana. Soluções nativas de isolado protéico de soro 5% (p/p) e xantana entre 0,01% a 1% se revelaram compatíveis, porém quando as proteínas foram termicamente desnaturadas, estes sistemas se mostraram termodinamicamente incompatíveis, separando em duas fases. Um diagrama de fases capaz de descrever a região de incompatibilidade termodinâmica desses sistemas foi determinado, porém limitações experimentais atribuídas principalmente à ineficiência da ultracentrifugação na separação das fases incompatíveis quando as soluções possuem elevada viscosidade impediu a determinação da binodal de equilíbrio. O principal mecanismo termodinâmico

envolvido na incompatibilidade termodinâmica seria a baixa entropia quando as proteínas do soro estão agregadas, porém efeitos de volume excluído entre os agregados e as grandes moléculas de xantana também poderiam estar envolvidos nesta incompatibilidade, principalmente quando as soluções são diluídas. A técnica reológica conhecida como compressão biaxial imperfeita com lubrificação foi adequada na determinação de diferenças de consistência de géis ácidos de isolado protéico de soro 7% (p/p). As soluções (48h armazenamento/10°C) apresentaram estabilização de pH entre 3,36 e 5,63 e os índices de comportamento do fluido em regime extensional variaram entre 0,19 e 0,43, enquanto que os índices de consistência extensional variaram entre 131 e 4127 kPa.sⁿ, indicando o caráter pseudoplástico destes géis. Os géis mais consistentes foram obtidos nos pHs 4,73 e 5,10. Interações dissulfídicas foram responsáveis pela estabilização dos agregados no tratamento térmico e podem estar envolvidas no processo de gelificação, enquanto que interações eletrostáticas seriam as principais envolvidas na agregação das proteínas durante a redução do pH.

Palavras chave: Proteínas do soro, xantana, glucona-delta-lactona, separação de fases, diagrama de fases, viscosidade extensional.

MASTER DEGREE THESIS

AUTHOR: Ângelo Luiz Fazani Cavallieri

Title: Influence of heat denaturation and the pH on rheological properties of whey protein and its thermodynamic compatibility with xanthan

SUPERVISOR: ROSIANE LOPES DA CUNHA

Depto. Engenharia de Alimentos – FEA – UNICAMP

GENERAL ABSTRACT

Proteins and polysaccharides are two biopolymers widely used in food industry for their functional characteristics, but these biopolymers show natural thermodynamic incompatibility in solution. Native and heat denatured whey proteins and xanthan systems were studied in this work in different pH conditions. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analysis was used to verify the effect of heat treatment on whey proteins showing that the experimental conditions (80°C for 30 minutes) caused protein aggregation in large aggregates stabilized mainly by disulfide interactions. The large protein aggregates had great influence on phase behavior between such proteins and xanthan. Native whey protein (5% w/w) and xanthan (0,01-1% w/w) solutions are soluble, but such solutions become not soluble and show thermodynamic incompatibility, when the proteins are heat denatured. A phase diagram was established and it was able to describe the concentration region of ingredients incompatibility. The binodal line was not drawn due to experimental limitations, probably associated to the inefficiency of the ultracentrifugation to separate the incompatible phases of high viscosity. Low mixture entropy due to protein aggregation is the main thermodynamic event leading to phase separation of this systems, but excluded volume effects between protein aggregates and great xanthan molecules could be involved in this incompatibility, mainly for diluted solutions. Imperfect lubricated squeezing flow viscosimetry analysis was able to distinguish consistency differences in acidified whey protein isolate (7% w/w) gels. The pH of whey protein solutions (48h

storage/10°C) was stabilized between 3,36 and 5,63 and the flow index values under extensional flow were between 0,19 and 0,43, while the consistency index values under extensional flow were between 131 and 4127 kPa.sⁿ, indicating the shear thinning behavior of such gels. The strongest gels were obtained in the pH range between 4,73 and 5,10. Disulphide interactions were responsible for protein aggregation caused by the heat treatment, while electrostatic interactions could be the mainly factor determining protein aggregation during pH reduction.

Key-words: Whey proteins, xanthan, glucone-delta-lactone, phase separation, phase diagram, extensional viscosity.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral e Objetivos

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

As proteínas do soro, que no passado foram reconhecidas como um subproduto da fabricação de queijos e caseína, atualmente são consideradas como produto principal de elevado valor agregado devido às suas características funcionais únicas e elevado valor nutricional. Estas proteínas podem ser encontradas em um grande número de produtos com diferentes conteúdos protéicos e perfis de funcionalidade, como os concentrados e isolados protéicos de soro, que tem uma intensa aplicação como ingredientes de produtos lácteos.

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

Proteínas e polissacarídeos também são chamados de biopolímeros, e um estudo qualitativo para a explicação de suas propriedades em sistemas aquosos é de extrema importância. Estes biopolímeros são complexos, com uma extensa faixa de interações moleculares, afetando sensivelmente as características reológicas e de equilíbrio de fases dos alimentos que os contém (Syrbe et al., 1998).

A determinação de diagramas de equilíbrio dos sistemas de proteínas do soro e xantana são importantes no conhecimento das fronteiras de separação de fases. Esta informação é importante no desenvolvimento de projetos de formulação de produtos, uma vez que produtos que apresentam fases separadas não são bem aceitos pelos consumidores, que associam separação de fases a um produto degradado e que perdeu qualidade.

As propriedades reológicas obtidas a altas deformações são relevantes no desenvolvimento de processos como, por exemplo, o bombeamento ou agitação de soluções. As altas taxas de deformações também estão relacionadas com a percepção sensorial dos alimentos durante a ingestão. Neste caso, a viscosidade obtida em fluxo extensional é um importante parâmetro que está associado à textura, mostrando uma boa correlação com a percepção da textura do alimento no ato de deglutir.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as interações entre os componentes dos sistemas-modelo de proteínas do soro e xantana, verificando o impacto da desnaturação térmica das proteínas no equilíbrio termodinâmico do sistema. Além disso foram determinadas as propriedades reológicas em escoamento extensional de soluções de proteínas do soro acidificadas com o éster glucona- δ -lactona.

Os objetivos específicos foram:

1. Estudar o efeito do tratamento térmico de 80°C por um tempo de 30 minutos nas proteínas do soro do leite através de análise de eletroforese em gel de poliacrilamida.
2. Estudar o equilíbrio termodinâmico de misturas de xantana e proteínas do soro, nativa e desnaturada termicamente, no pH 7,0. Avaliar as interações envolvidas nesse tipo de sistema e analisar a região de incompatibilidade termodinâmica. Verificar a eficácia de técnicas de ultracentrifugação na separação destes sistemas principalmente em condições de elevada viscosidade das soluções.

3. Determinar os parâmetros reológicos em escoamento extensional de géis obtidos a partir da acidificação de soluções de proteínas do soro com o éster glucona- δ -lactona, utilizando a técnica reológica conhecida como compressão biaxial imperfeita com lubrificação.

Organização do trabalho

A apresentação deste trabalho se encontra dividida em uma introdução (capítulo 1); uma revisão bibliográfica geral sobre as proteínas do soro do leite e a xantana, sobre a técnica de compressão biaxial imperfeita com lubrificação e alguns tópicos sobre equilíbrio termodinâmico entre proteínas e polissacarídeos (capítulo 2).

No capítulo 3 é realizada uma discussão sobre o efeito da agregação das proteínas do soro após um tratamento térmico de 80°C por 30 minutos no equilíbrio termodinâmico destas proteínas com a xantana. Foram realizadas análises de ultracentrifugação com o objetivo de separar as fases destes sistemas e em seguida foram determinadas as composições das fases separadas com o objetivo de construir um diagrama de fases que fosse representativo do equilíbrio deste sistema.

O capítulo 4 apresenta uma análise dos parâmetros reológicos obtidos em fluxo extensional de géis de proteínas do soro acidificados com glucona- δ -lactona, estabilizados em diferentes valores de pH após um período de armazenamento de 48 horas a 10°C. Na realização deste trabalho foi utilizada a técnica de compressão biaxial imperfeita com lubrificação.

No capítulo 5 são apresentadas algumas conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros.

Referências Bibliográficas

MORRIS, V. J. Bacterial polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.341-375.

SYRBE, A.; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, N. Polymer science concepts in dairy systems - an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, Oxford, v.8, n.3, p.179-193, 1998.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica Geral

2.1 - Proteínas do leite

As proteínas correspondem em média a 3,5% da composição do leite, sendo que as caseínas, as albuminas e as globulinas são de excelente valor nutricional. As caseínas estão presentes no leite na forma coloidal, correspondendo a cerca de 78% do total de proteínas, enquanto que as globulinas são cerca de 18% e as albuminas 4% (Usdec, 2002). A albumina está presente na película que se forma no leite logo após o seu cozimento, ou ainda, na espuma que se observa durante a fervura ou o desnatamento. A albumina e a globulina do leite também são conhecidas como lactoalbumina e lactoglobulina, são completamente solúveis em água e não se coagulam pela ação de coalho sendo, portanto encontradas no soro resultante da fabricação de queijos. Decorre daí a denominação de proteínas do soro, de onde podem ser extraídas por floculação em meio ácido com aquecimento, dando origem ao que se chama de ricota (Harris, 1990).

2.2 - O Soro do Leite

O soro é uma fonte significativa de proteínas funcionais para a indústria mundial de alimentos. Produzido principalmente através da fabricação de queijos e caseína, os concentrados e isolados protéicos de soro em pó são encontrados em um amplo perfil de concentrações de proteína que variam entre 25 e 95%. No preparo destes produtos são utilizadas técnicas diferentes – incluindo ultrafiltração, cristalização, precipitação, osmose reversa e outros métodos de separações físicas para criar produtos a base de soro de leite, de acordo com especificações fornecidas pelo usuário final (Usdec, 2002).

As proteínas do soro são utilizadas no desenvolvimento de novos produtos por possuírem vantagens intrínsecas tais como sabor suave e capacidade de formação de gel, que acaba por conferir textura atrativa aos produtos formulados. Em produtos como pudins e iogurte, o aumento da capacidade de retenção de água ajuda a produzir uma consistência mais viscosa e a controlar a separação de

fases. As proteínas do soro têm desempenho funcional semelhante aos emulsificantes tradicionais (gema de ovo) em molhos do tipo maionese, porém seu teor de colesterol é mais baixo. A estabilidade de sistemas com proteínas de soro pode ser aumentada com a adição de gomas ou por meio de aquecimento do sistema para criar o gel protéico (Bottomley et al., 1990).

As proteínas do soro são solúveis em uma ampla faixa de pH, exceto na faixa de pH correspondente ao ponto isoelétrico. A desnaturação e pequena perda de solubilidade ocorre quando as proteínas são submetidas a temperaturas superiores a 60° C e/ou modificação do pH da solução. As características das proteínas do soro do leite podem ser visualizadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composição do soro do leite e algumas propriedades dos componentes (Bottomley et al., 1990).

Proteínas	Massa molecular (Da)	Ponto Isoelétrico	Concentração aproximada no soro (g/l)	Quantidade aproximada do total de proteínas do soro (%)
β-lactoglobulina	18.363	5,35-5,49	3,0	50
α-lactoalbumina	14.175	4,2-4,5	0,7	12
Imunoglobulinas	(1,61 a 10)x10⁵	5,5-8,3	0,6	10
Albuminas séricas	66.267	5,13	0,3	5
Proteases-Peptonas e proteínas menores	4.100 a 40.800	3,3-3,7	1,4	23

2.2.1 - Beta Lactoglobulina (β -Lg)

A β -lactoglobulina é uma proteína globular, que possui duas pontes dissulfídicas e um grupo tiol livre incluso na estrutura da proteína, existindo principalmente como um dímero no pH neutro (Schokker et al., 2000). No seu estado natural, a β -lactoglobulina aparece como um complexo globular protéico enovelado em estruturas tridimensionais com o lado hidrofóbico da cadeia de aminoácidos voltados para o interior, enquanto o lado polar está exposto ao exterior. O aquecimento das soluções de β -lactoglobulina acima de uma certa temperatura causa uma abertura parcial destes complexos globulares, expondo os aminoácidos localizados no interior, e levando à agregação parcial ou completa da proteína desnaturada (Eleya & Turgeon, 2000). Esta fração é considerada como o principal agente gelificante do soro.

Em pHs entre 5,1 e 6,7 a β -lactoglobulina se apresenta como um dímero estável consistindo de duas unidades esféricas. Em pHs menores que 3,0 ou maiores que 8,0 os dímeros se dissociam em monômeros. Na faixa de pH entre 5,1 e 3,8 (abaixo do pI) a β -lactoglobulina tende a formar octâmeros, quando em baixa temperatura e elevadas concentrações de proteína. Da mesma forma que as demais proteínas do soro do leite, a β -lactoglobulina se desnatura termicamente quando aquecida por 30 minutos a temperaturas superiores a 60°C. A 95°C se verifica completa desnaturação, com extensa transformação conformacional e a exposição de áreas hidrofóbicas e grupos nucleofílicos (-SH: ϵ -NH⁺₃) altamente reativos (Sgarbieri, 1996).

2.2.2 - Alfa-Lactoalbumina (α -La)

O segundo maior componente das proteínas do soro é a α -lactoalbumina, uma pequena e compacta proteína globular que é estabilizada por quatro pontes dissulfídicas e que não contém grupo tiol livre (Schokker et al., 2000).

A propriedade característica da α -lactoalbumina é a tendência de formar associações em pHs abaixo de seu ponto isoelétrico. No pH natural do leite (pH

6,6), e acima deste valor, a α -lactoalbumina aparece como um monômero (Sgarbieri, 1996).

A α -lactoalbumina possui peso molecular em torno de 14 kDa e está presente no soro em torno de 1 a 1,5 g/L, e representa 20% do total de proteínas do leite. Apresenta forma esférica e possui estrutura globular compacta com quatro pontes dissulfídicas. Por muito tempo foi considerada a proteína do soro mais estável à temperatura, mas evidências indicam que é susceptível à desnaturação térmica, em temperaturas a partir de 65°C em pH 6,7, com 80 a 90% da desnaturação sendo reversível após o resfriamento. Esta elevada capacidade de renaturação tem sido atribuída a sua aparente resistência térmica (Morr & Ha, 1993).

2.2.3 - Albumina Sérica (BSA)

A albumina sérica está presente no leite de vaca com concentração em torno de 0,4 g/L sendo idêntica a forma isolada do soro sangüíneo, possuindo peso molecular em torno de 69 kDa. Esta proteína possui 17 pontes dissulfídicas intermoleculares e um grupo tiol livre. É mais conhecida por sua função de transporte de ácidos graxos no sistema circulatório sendo solúvel em água em níveis acima de 35%, passando por extensa precipitação na faixa de temperatura de 40 a 45°C. A maior parte de seus resíduos hidrofóbicos é exposto e sujeito a interações intermoleculares em temperaturas superiores a 40°C (Morr & Ha, 1993).

2.2.4 - Imunoglobulinas

O termo Imunoglobulinas é aplicado para uma família de proteínas presentes no soro, de elevado peso molecular, com propriedades físicas, químicas e imunológicas semelhantes. Possuem peso molecular variando de 15 a 1000kDa. Estas proteínas exibem temperatura de desnaturação mais elevada que a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina, porém na presença destas proteínas do soro,

as imunoglobulinas são extremamente termolábeis, sendo a interação entre elas realizada via pontes dissulfídicas (Morr & Ha, 1993).

2.3 - Xantana

A goma xantana é a primeira de uma nova geração de polissacarídeos produzidos a partir de biotecnologia. A goma produzida pelo microorganismo *Xanthomonas campestris* apresenta propriedades que lhe possibilita competir com as gomas de origem natural (Chaplin, 2002).

A estrutura fundamental ou primária da molécula de xantana é composta de uma cadeia central de 1,4- β -D-glucose (como a celulose) com substituições laterais contendo duas manoses e um ácido glucurônico. Verifica-se que metade dos terminais de unidades de manose apresenta uma ligação com ácido pirúvico. Este lado da cadeia representa uma grande fração da molécula (em torno de 60%) e confere à goma xantana muitas de suas propriedades características, como a fácil hidratação, inclusive a baixas temperaturas. A xantana possui elevado peso molecular na ordem de 2.500.000 Da e uma polidispersão baixa (Urlacher & Noble, 1997).

A estrutura molecular da xantana pode ser visualizada na Figura 2.1.

As estruturas secundárias e terciárias da xantana não são tão bem caracterizadas como a primária. Na conformação da molécula, é possível que sua estrutura seja estabilizada por pontes de hidrogênio favorecendo que estas se organizem na forma de hélices duplas ou triplas. Estudos de microscopia são necessários para a melhor compreensão dessa estrutura bem como de sua conformação em solução (Morris, 1995).

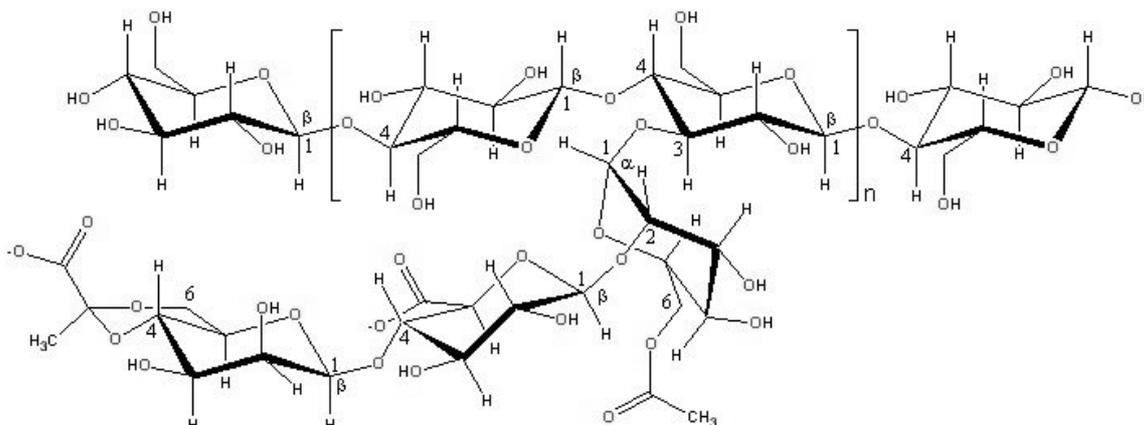


Figura 2.1: Estrutura molecular da xantana (Chaplin, 2002).

Em solução, a xantana passa por uma transição conformacional que é influenciada pela temperatura. Isto indica que a goma xantana passa de um estado rígido e organizado para um estado mais flexível e desordenado. Neste caso, a xantana pode possuir duas conformações, uma nativa e uma de renaturação. No estado renaturado, a xantana possui o mesmo peso molecular que em seu estado nativo, porém nas mesmas condições de solução, o estado renaturado apresenta maior viscosidade. A temperatura que leva à modificação da molécula entre estes estados depende de diferentes fatores como a concentração de xantana na solução e a força iônica do meio, variando ainda com o teor de ácido pirúvico e acético na macromolécula de xantana. Na presença de pequenas quantidades de sais, nos níveis geralmente observados em alimentos, a transição entre os diferentes estados da xantana ocorre a temperatura mais elevadas, geralmente acima de 90°C (Urlacher & Noble, 1997).

2.4 - Glucona- δ -lactona (GDL)

O leite pode ser acidificado pela ação de culturas bacterianas através da fermentação da lactose em ácido láctico, pela adição de ácidos inorgânicos como HCl (acidificação direta), ou ainda pelo uso de GDL, cuja hidrólise em ácido glucônico (Figura 2.2), resulta na redução lenta do pH. Muitos estudos sobre a formação de géis ácidos têm sido realizados com GDL, pois a lenta diminuição do pH é similar ao que ocorre com culturas lácticas. No entanto, a taxa de

acidificação é diferente entre o leite acidificado com GDL e por culturas lácticas; pois o GDL é rapidamente hidrolisado em ácido glucônico (especialmente em temperaturas mais elevadas), enquanto que com o uso de bactérias lácticas o pH não muda muito nos primeiros instantes. O pH final em géis induzidos por GDL é função da quantidade inicial deste composto adicionado ao leite, enquanto que no caso de bactérias o pH continua caindo até valores muito baixos (< 4,0) até que o crescimento bacteriano seja inibido pelos baixos valores de pH. Alguns estudos indicam que propriedades físicas e reológicas de géis lácteos induzidos por GDL diferem dos induzidos por culturas bacterianas, em especial a temperaturas elevadas. (Lucey & Singh, 1997).

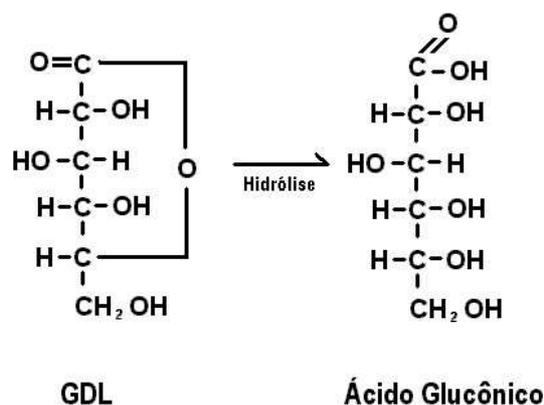


Figura 2.2: Hidrólise do GDL a ácido glucônico (IUPAC, 2002).

2.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

Métodos de eletroforese são intensamente usados na ciência de proteínas para determinar a pureza de amostras, peso molecular e o ponto isoelétrico. Géis nativos e desnaturados são utilizados para esse fim, em condições que podem permitir ou não a dissociação das proteínas em subunidades menores (Copeland, 1990). A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) corresponde a um dos métodos mais utilizados (Smith, 1994).

A base do PAGE corresponde ao fato de que moléculas carregadas irão migrar em um campo elétrico a uma velocidade que é determinada pela carga e tamanho das partículas. Este campo elétrico é aplicado através de um ambiente

constituído por um polímero, poliacrilamida, que age como uma barreira à movimentação molecular.

No caso de géis não nativos, antes de serem expostas ao campo elétrico, as proteínas são desnaturadas por exposição a condições drásticas, como por exemplo, calor, agentes desnaturantes, detergentes, redutores dissulfídicos e algumas vezes a uréia, sendo em seguida aglomerados em detergentes como o dodecil sulfato de sódio (SDS) (Garfin, 1990). O agente redutor empregado no solvente das amostras reduz as ligações dissulfídicas intermoleculares e assim destrói a estrutura quaternária da proteína e separa as subunidades, podendo ainda destruir pontes dissulfídicas intramoleculares. No estado desnaturado, muitas proteínas ligam-se ao SDS a uma razão constante em massa, terminando assim por possuir densidades de cargas similares. Sob estas condições, a taxa de migração destas proteínas no campo elétrico é dependente da carga inerente das moléculas, mas preferencialmente condicionadas ao tamanho da base molecular. Sendo assim proteínas maiores serão severamente retardadas na migração pela base do gel polimérico ao passo que proteínas menores migrarão com maior facilidade (Smith, 1994).

Existem casos em que se deseja avaliar a pureza e a massa molecular de proteínas em condições em que estas não sejam desnaturadas, ou seja, estejam em seu estado nativo. Neste caso, a ausência de SDS na base do gel de poliacrilamida promoverá a dependência de migração não somente devido a massa molecular das moléculas, mas também de suas cargas específicas. Observa-se assim o potencial das análises de eletroforese na determinação qualitativa e quantitativa de proteínas, sendo ainda uma ferramenta valiosa na determinação dos mecanismos de interação entre as moléculas protéicas possibilitando o estudo dos meios de agregação molecular sob diferentes condições indutoras, como pH e tratamento térmico (Garfin, 1990).

Vardhanabhuti e Foegeding (1999) estudaram padrões eletroforéticos de soluções de isolado protéico de soro em diferentes concentrações e sob diferentes condições de tratamento térmico a diferentes tempos. Para isso, usaram géis

nativos, SDS-PAGE e com 2-mercaptoetanol. Os resultados para gel nativo revelaram que os polímeros de proteínas formados sob tratamento térmico formavam agregados que poderiam possuir massas moleculares da ordem de 1×10^6 Da. No entanto, os resultados de SDS-PAGE indicaram o papel fundamental das pontes dissulfídicas na estabilização dos agregados de proteínas do soro após o tratamento térmico. Em outro estudo, Lupano e colaboradores (1996) verificaram a gelificação de concentrados protéicos de soro (CPS) em condições ácidas e mostraram que as ligações não-covalentes são as responsáveis pela estrutura de géis de CPS em valores de pH entre 3,5 e 4,0.

2.6 - Viscosidade Extensional

A faixa de deformação aplicada durante os estudos reológicos é um parâmetro muito importante, pois se a deformação ou taxa de deformação é pequena, as respostas obtidas refletem a estrutura molecular, como por exemplo, os arranjos envolvidos nos processo de gelificação.

No entanto, quando as deformações são altas, os parâmetros obtidos são relevantes no desenvolvimento de processos ou na avaliação sensorial. A viscosidade obtida em cisalhamento ou em fluxo extensional são importantes parâmetros que estão associados à textura, porém o último mostra uma melhor correlação com o ato de deglutir.

Além disso, a orientação molecular causada pelo estiramento devido ao escoamento extensional, juntamente com o cisalhamento, podem produzir comportamento e produtos únicos (Baroni et al., 1999). Assim, a viscosidade extensional pode estar relacionada com a natureza polimérica dos constituintes alimentícios e este parâmetro pode ser aplicado no desenvolvimento de novas formulações, controle de qualidade e desenvolvimento e modelagem de processos (Padmanabhan, 1995).

A determinação da viscosidade extensional (η_b) de semi-sólidos e alguns sólidos está bem estabelecida e pode-se encontrar na literatura dados de vários alimentos como queijos, géis e manteiga (Steffe, 1996). No caso de produtos

fluidos há uma escassez de dados de viscosidade extensional, devido à dificuldade de se produzir fluxos extensionais bem controlados. Várias técnicas vem sendo utilizadas na obtenção destes dados, como: alongação de fibras (“fiber wind up”), jatos opostos (“opposed jets”) e perda de carga na entrada de orifícios (“Orifice die”) (Padmanabhan, 1995), porém a técnica mais amplamente empregada em alimentos é a denominada compressão biaxial imperfeita com lubrificação (“Imperfect Lubricated Squeezing Flow”) (Lee & Peleg, 1992).

A consistência dos alimentos pode variar de um “estado” líquido (bebidas), a sólido (pães, queijos), podendo ainda se mostrar como um semilíquido, ou mesmo um semi-sólido (manteigas, iogurtes, sorvete). A consistência dos alimentos pode ser verificada através de diversas técnicas, sendo que a grande maioria destas, bem como os modelos matemáticos utilizados para a representação dos resultados obtidos foram inicialmente formulados para a descrição de comportamento de produtos não alimentícios como tintas e polímeros sintéticos. A aplicação destes modelos e técnicas para alimentos possui algumas limitações que devem ser consideradas, uma vez que estes são formados por estruturas frágeis como as redes de proteínas.

Em trabalho recente, Campanella e Peleg (2002), apresentam um importante levantamento teórico e de aplicação da técnica reológica conhecida como “Squeezing flow viscosimetry” que permite a obtenção da viscosidade extensional, descrevendo as suas vantagens em relação às técnicas tradicionais no estudo reológico de alimentos.

O método consiste na compressão de uma fina camada de amostra entre placas lubrificadas, produzindo-se intencionalmente um fluxo governado pelo escorregamento. Uma vez que a amostra é colocada na geometria de compressão quando as placas estão afastadas, consegue-se evitar ou diminuir sensivelmente o efeito de ruptura inicial, podendo ainda ser a amostra formada na placa de medida. Considerando-se ainda que a lubrificação das placas de medidas é intencional, o escorregamento é produzido intencionalmente, e uma vez que esta

é uma condição do método, o escorregamento deixa de ser um artefato residual de medida (Campanella & Peleg, 2002).

Os procedimentos de “squeezing flow viscometry” podem ser realizados de diversas formas; (Figura 2.3) utilizando-se geometrias perfeitas ou imperfeitas, em condições de volume ou área de compressão constante, aplicação de força de deslocamento ou taxas de deslocamentos constantes no monitoramento da relação força momentânea de compressão e altura de amostra em análise (Campanella & Peleg, 2002).

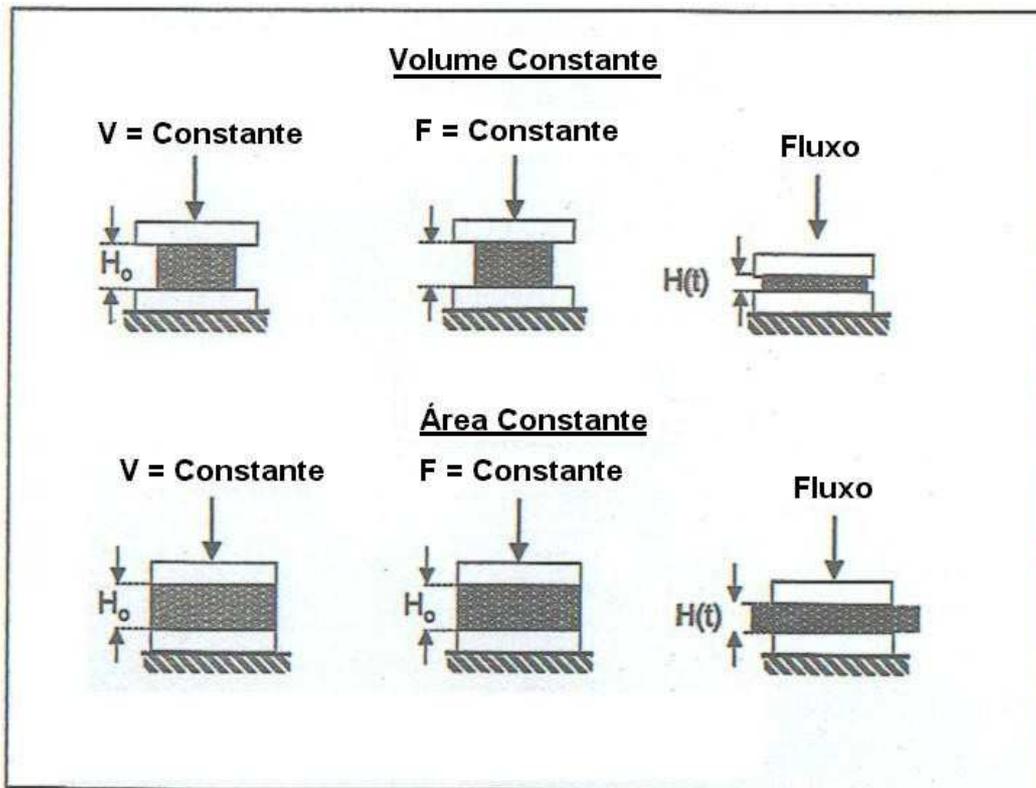


Figura 2.3 Configuração dos testes de viscosimetria de compressão biaxial com geometria e placa de compressão paralelos (Campanella & Peleg, 2002)

O denominado “efeito de escorregamento” é observado quando a amostra é submetida a tensões de cisalhamento ocorrendo uma migração de partículas para o centro da região de escoamento e a camada de líquido em contato com a

geometria do sensor passa a se comportar como uma camada de lubrificante. Este fenômeno leva à formação de um fluxo empistonado e não um perfil de escoamento perfeitamente desenvolvido, afetando consideravelmente as medidas realizadas.

Os autores também consideram que nos procedimentos reológicos usuais, a manipulação da amostra para ser levada ao reômetro promove uma ruptura parcial da estrutura do alimento o que modifica suas propriedades reológicas. Como não é possível quantificar o grau de destruição no manuseio das amostras, existe sempre um elemento de incerteza nas medidas realizadas no que se refere à completa caracterização do comportamento reológico do produto. Este problema é agravado quando este rompimento estrutural é irreversível como no caso do iogurte, e uma solução seria a formação da amostra na própria geometria de medida, o que em muitos casos é uma limitação prática.

2.6.1 - Fundamento teórico da técnica “Imperfect Squeezing Flow”:

O “Imperfect Lubricated Squeezing Flow” (Compressão Biaxial Imperfeita com Lubrificação) está baseado na compressão de um produto entre duas placas que devem estar lubrificadas com o objetivo de diminuir ao máximo o cisalhamento no produto, que neste caso é a superfície do alimento. Sem lubrificação, este experimento resulta no conhecido escoamento de Stefan, que é uma combinação de cisalhamento e compressão (Bird et al., 1987).

No caso de alimentos sólidos ou semi-sólidos, a mesma área ou volume de produto durante o teste pode ser mantida (Figura 2.3). Porém, no caso de semi-líquidos deve-se fazer uma adaptação da geometria, visto que durante a compressão existe o escoamento do mesmo pelas bordas (Figura 2.4). Esta adaptação foi apresentada por Lee e Peleg (1992), e otimizada por Damrau e Peleg (1997).

Na compressão imperfeita, a amostra é colocada em recipientes de grande diâmetro como, por exemplo, uma placa de Petri. Uma grande vantagem desse método é que o material a ser testado poderia ser introduzido na placa

diretamente da linha de produção sem passar por condições que possam perturbar a estrutura da amostra. Com o intuito de evitar os efeitos de borda é necessário o uso de sondas de diâmetro superior a 10 vezes a altura da amostra na placa (Damrau & Peleg, 1997).

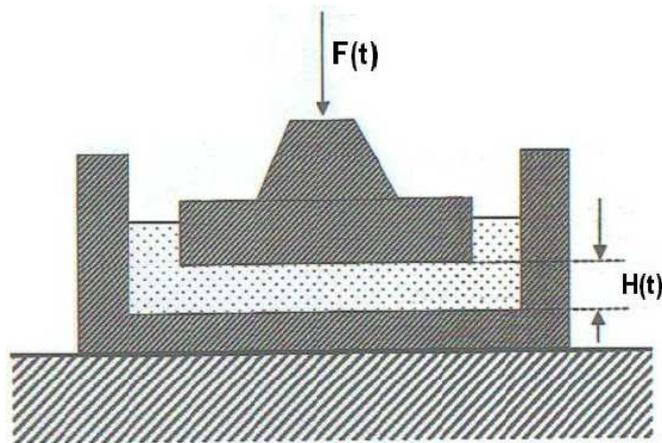


Figura 2.4: Esquema de uma geometria Imperfeita onde a placa de fundo é substituída por um recipiente largo. (Campanella & Peleg, 2002)

A força resultante do escoamento realizado sob compressão biaxial com lubrificação de um fluido Newtoniano pode ser descrito pela equação 2.1 (Campanella & Peleg, 1987a):

$$F(t) = \frac{3\pi R^2 \mu}{H(t)} \left(\frac{dH(t)}{dt} \right) \quad (2.1)$$

onde μ é a viscosidade newtoniana, R é o raio da geometria de compressão e $H(t)$ é a altura da amostra em função do tempo. No caso de um fluido que segue a lei de potência, tem-se a equação 2.2:

$$F(t) = 3 \frac{n_b + 1}{2} k_b \pi R^2 \left(-\frac{dH(t)}{H(t) dt} \right)^{n_b} \quad (2.2)$$

onde n_b é o índice de comportamento do fluido em escoamento extensional, sendo 1 para fluidos newtonianos e menor que 1 quando o fluido possui comportamento pseudoplástico. O índice de consistência extensional é denominado de k_b .

Os experimentos em equipamentos tipo Universal Testing Machine são realizados a uma velocidade $-\frac{dH}{dt} = \text{constante} = V$, e portanto:

$$F(t) = \frac{3^{\frac{n_b+1}{2}} k_b \pi R^2 V^{n_b}}{H(t)^{n_b}} \quad (2.3)$$

Linearizando a equação 2.3:

$$\log F(t) = C - n_b \log H(t) \quad (2.4)$$

onde:

$$k_b = \frac{C}{\pi R^2 3^{\frac{n_b+1}{2}} V^{n_b}} \quad (2.5)$$

A deformação utilizada nos cálculos do escoamento extensional considera a variação na altura da amostra com o tempo (deformação de Hencky). Assumindo-se deformação homogênea e material incompressível pode-se definir esta deformação na direção vertical como:

$$\varepsilon_H = -\ln \frac{H(t)}{H_0} \quad (2.6)$$

em que H_0 é a altura inicial da amostra. Então, neste caso a taxa de deformação é:

$$\dot{\varepsilon}_H = \frac{d\varepsilon_H}{dt} = -\frac{1}{H(t)} \frac{dH(t)}{dt} \quad (2.7)$$

Os componentes de velocidade durante o escoamento extensional são dados por:

$$V_z = \dot{\varepsilon}_H H(t) \quad \text{direção axial} \quad (2.8)$$

$$V_r = \dot{\varepsilon}_H \frac{r}{2} \quad \text{direção radial} \quad (2.9)$$

$$V_\theta = 0 \quad \text{direção angular} \quad (2.10)$$

Como nestes ensaios a velocidade V_z é constante, a taxa de deformação de Hencky é calculada como:

$$\dot{\varepsilon}_H = \frac{d\varepsilon_H}{dt} = -\frac{1}{H(t)} \frac{dH(t)}{dt} = \frac{V_z}{H(t)} \quad (2.11)$$

No caso de compressão biaxial imperfeita com lubrificação, a equação para o cálculo da taxa de deformação biaxial de Hencky fica:

$$\dot{\varepsilon}_b = \frac{d\varepsilon_b}{dt} = \frac{\dot{\varepsilon}_H}{2} = \frac{V_z}{2H(t)} \quad (2.12)$$

Idealmente quando as placas estão completamente lubrificadas, o escoamento pode ser considerado empistonado na direção radial e o escoamento biaxial é governado pela viscosidade extensional (η_b) (Campanella & Peleg, 1987a), (Lorenzo et al., 1997).

$$\eta_b = \frac{\text{tensão}}{\text{taxa de deformação}} = \frac{F(t) / \pi R^2}{\dot{\varepsilon}_b} \quad (2.13)$$

Considerando-se um escoamento no qual existam componentes de atrito, que é o que ocorre quando as placas utilizadas no experimento não estão suficientemente lubrificadas, a relação entre a força e a altura da amostra é dada pela equação (2.14) de Scott que é descrita por Avila e Binding (1982).

$$F(t) = \left[\frac{2\pi k_b R^{(n_b+3)}}{(n_b+3)} \right] \left[\frac{(2n_b+1)}{n_b} \right]^{n_b} \frac{V^{n_b}}{H(t)^{2n_b+1}} \quad (2.14)$$

Quando os dados de força e altura de amostra são avaliados em coordenadas logarítmicas, o resultado obtido é uma reta com coeficiente angular $-n_b$ se o escoamento ocorre em condições de lubrificação (equação 2.4). No entanto, quando o escoamento não ocorre em condições de lubrificação, os dados de força e altura em coordenadas logarítmicas correspondem a uma reta de coeficiente angular $-(2n_b+1)$, de acordo com a equação de Scott (Suwonsichon & Peleg, 1999b).

No caso de um fluido pseudoplástico cujo índice de comportamento n_b , varia entre 0 e 1, o valor da relação $\log(F(H))$ versus $\log(H)$ em um escoamento com atrito deve ser maior que 1. Assim, um coeficiente angular observado nesta relação com valor menor que 1 é uma evidência muito forte de que o escoamento ocorre na ausência de atrito (Suwonsichon & Peleg, 1999b). Segundo Campanella e Peleg (2002), este efeito é observado experimentalmente pela forma do fluido deformado durante a realização de um experimento em condições de geometria perfeita (Figura 2.5):

A forma retangular do escoamento desenvolvido sob lubrificação é uma característica de um fluxo empistonado o que se observa em condições de escorregamento (Figura 2.5-b). No entanto, quando este escoamento é dominado por forças de atrito observa-se um perfil parabólico, característico do perfil de velocidade no escoamento em tubos (Figura 2.5-a).

No caso de fluidos não newtonianos, um coeficiente angular na relação logarítmica $F(t)$ versus $H(t)$ na ordem de -1 pode indicar um elevado grau de plasticidade ou que as equações descritas anteriormente não são adequadas na descrição do material podendo este fato ser atribuído a uma elevada tensão residual do fluido em estudo (Suwonsichon & Peleg, 1999b).

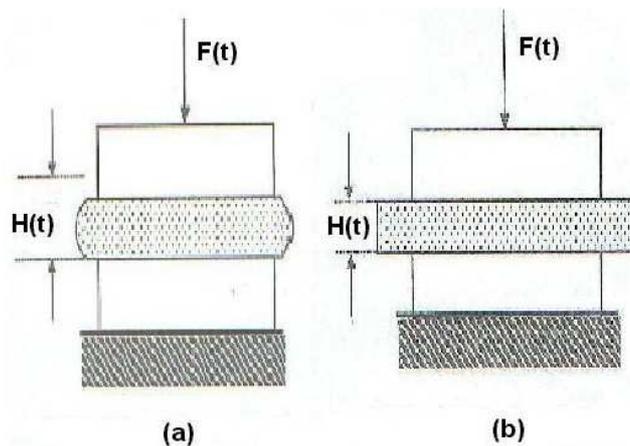


Figura 2.5 – Vista esquemática do perfil dos possíveis fluxos extensionais (a) Escoamento com atrito, (b) Escoamento sob lubrificação (Campanella & Peleg, 2002).

No caso da técnica de compressão biaxial imperfeita, os resultados de força momentânea obtida podem ser fortemente influenciados pelas forças de empuxo durante a entrada da geometria de compressão na amostra, pelo escoamento anular entre a geometria de compressão e a placa de acondicionamento da amostra e efeitos de entrada e saída da geometria. No entanto, se a placa de compressão for suficientemente grande, apresentando um diâmetro de pelo menos 10 vezes a altura inicial de amostra, estes efeitos são minimizados e podem ser desconsiderados (Damrau & Peleg, 1997). Além disso estes efeitos também podem ser minimizados com o aumento do diâmetro do sensor de compressão. Considera-se que a utilização de geometrias de compressão na ordem de 100 mm e um anulo entre a geometria e a placa de acondicionamento na ordem de 10 mm, uma condição adequada de experimento (Hoffner et al., 1997).

No caso das equações anteriormente apresentadas serem inválidas na descrição do comportamento reológico dos fluidos estudados, Suwonsichon e Peleg (1999b) sugerem avaliar a consistência das amostras, podendo ainda estabelecer uma comparação em termos de tensão aparente em uma altura ou deformação específica de amostra .

$$\sigma_{@0,5ou2mm} = \frac{F_{@0,5ou2mm}}{\pi R^2} \quad (2.15)$$

A desvantagem na realização deste procedimento está no fato de que a magnitude da tensão aparente verificada depende da velocidade de compressão em que o teste é realizado e da deformação máxima estipulada.

A tensão residual de alimentos semi-liquidos dificilmente é determinada em análises de “squeezing flow” realizadas em taxas de deslocamento constantes. (Campanella & Peleg, 1987b). No entanto, uma estimativa da tensão residual pode ser obtida se são realizados ensaios em que é permitido que a amostra relaxe até uma força constante (Suwonsichon & Peleg, 1999b).

$$\sigma_{ap} = \frac{F_{\text{constante}}}{\pi R^2} \quad (2.16)$$

Na técnica de compressão biaxial imperfeita com lubrificação, a força exercida por fluidos sem tensão residual decai ao valor da força de empuxo quase que instantaneamente. Quanto maior a tensão residual presente no fluido e quanto maior o caráter sólido da estrutura, maior será a magnitude da tensão residual.

A técnica de compressão biaxial imperfeita com lubrificação (CBIL) foi utilizada na caracterização de iogurte (Suwonsichon & Peleg, 1999a) e mostarda (Suwonsichon & Peleg, 1999b), utilizando Teflon como material para manufatura do recipiente para acondicionamento da amostra e geometria de compressão. Esta técnica foi utilizada para as amostras de iogurte com o objetivo de avaliar a modificação de textura decorrente da agitação manual ou com um agitador mecânico. No caso da mostarda, a finalidade era avaliar a consistência das amostras por uma análise reológica em que os efeitos indesejáveis de escorregamento fossem minimizados. Em estudos semelhantes, Campanella e Peleg (1987a) determinaram características reológicas de creme de amendoim e Lorenzo e colaboradores (1997) verificaram as propriedades reológicas de diferentes amostras de massa de tomate e catchup. A técnica se mostrou adequada uma vez que nestes produtos também é comum se verificar o efeito de escorregamento, quando são empregadas as técnicas de reologia em cisalhamento.

No estudo de requeijão cremoso comercial tradicional e com teor reduzido de gordura, Baroni e colaboradores (1999) realizaram um estudo de caracterização reológica determinando as viscosidades extensional e em cisalhamento utilizando CBIL e reometria rotacional convencional, respectivamente. Os resultados indicaram que o requeijão apresenta comportamento pseudoplástico nos dois regimes de escoamento e uma estimativa do grau de espalhabilidade foi apresentada e correlacionada com a viscosidade extensional das amostras.

2.7 - Misturas de Biopolímeros

Uma crescente atenção tem sido dada à gelificação de misturas aquosas de proteínas e polissacarídeos durante as últimas décadas. Esta tendência reflete (i) o papel chave dos hidrocolóides na formação de estruturas em alimentos, (ii) um aumento no uso de polissacarídeos e proteínas como aditivos e (iii) ao desenvolvimento de novos métodos de processamento. No entanto, apesar da ampla praticidade do uso de hidrocolóides como aditivos alimentícios, muitos dos aspectos fundamentais da relação estrutura-propriedade destas misturas formadoras de géis são desconhecidas (Zasytkin et al., 1997).

Em princípio existem três possibilidades de equilíbrio nestes sistemas (Syrbe et al., 1998):

- (i) **Incompatibilidade:** interações são repulsivas, ocorrendo a segregação entre os biopolímeros e formando fases aquosas imiscíveis concentradas com somente um dos biopolímeros envolvidos.
- (ii) **Coacervação complexa:** atração entre as moléculas dos biopolímeros causando a formação de complexos. Neste caso também ocorre a formação de duas fases distintas, sendo que uma delas está concentrada com os biopolímeros enquanto a outra fase contém somente o solvente.
- (iii) **Miscibilidade ou coacervação simples:** o sistema é homogêneo e os biopolímeros estão distribuídos no solvente.

A compatibilidade termodinâmica entre os hidrocolóides de estrutura semelhante, sob certas condições (valores de pH e força iônica), inibe atrações entre biopolímeros não idênticos levando à separação destes componentes da mistura. Geralmente, a separação de fases ocorre quando a concentração total dos componentes macromoleculares excede um certo valor crítico (Tolstoguzov, 2000). Desta maneira, o comportamento de fases destes sistemas é de importância chave para a formulação de produtos alimentícios e o conhecimento

sobre o desenvolvimento de processos convencionais (Grinberg & Tolstoguzov, 1997).

2.8 - Diagramas de fases

O comportamento de fases de misturas de biopolímeros em soluções é quantitativamente caracterizado por um diagrama descrevendo as condições de fronteira da separação de fases e de partição dos componentes (entre água e os biopolímeros). Diagramas de fases também são usados para apresentar graficamente os efeitos de temperatura, pH, concentração de sais, e outras variáveis no comportamento de fases da mistura de biopolímeros (Tolstoguzov, 2000).

A Figura 2.6 mostra um diagrama de fases para um caso típico de incompatibilidade termodinâmica de sistema proteína-polissacarídeo, gelatina/goma jataí (Alves et al., 1999a). A linha em negrito é a binodal ou curva de equilíbrio. Quando as concentrações de proteína/polissacarídeo do sistema se apresentam abaixo desta linha, o sistema permanece monofásico. Todavia, se for preparada uma solução na qual as concentrações de proteína e polissacarídeo estejam acima desta binodal (por exemplo, na mistura de soluções concentradas destes dois polímeros), a mistura final irá espontaneamente separar em duas fases líquidas, uma enriquecida em proteína e esgotada em polissacarídeo, e a outra enriquecida em polissacarídeo e esgotada em proteína.

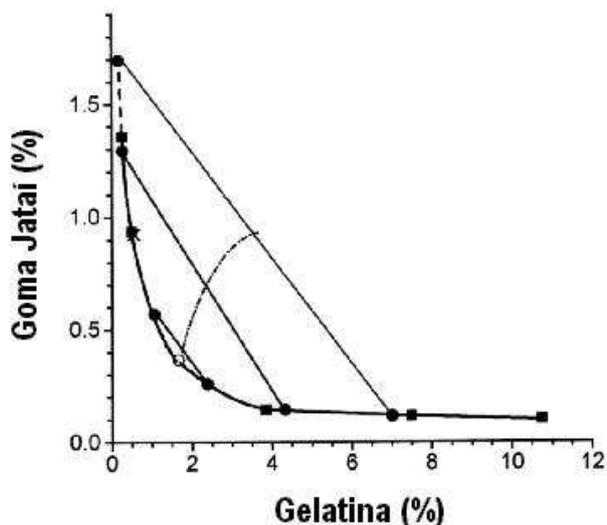


Figura 2.6. Diagrama de fases isotérmico de sistema água-gelatina-goma jataí. pH=5; T=313 K. — binodal; – linhas de amarração; ● - composição das fases coexistentes; ■ - outros pontos no diagrama de fases; ○ - ponto crítico (Alves et al., 1999a).

Os pontos que descrevem a composição de cada fase situam-se sobre a binodal, e as linhas de amarração entre estes pontos também passam pelo ponto que descreve a composição inicial da mistura (isto é, as concentrações globais de proteína e polissacarídeo). Todas as misturas cujas composições iniciais permaneçam sobre a mesma linha de amarração irão separar em fases com a mesma composição, porém os volumes relativos das duas fases irão variar. Em cada sistema, o comportamento de separação de fases pode ser definido por uma família de linhas de amarração (experimentalmente determinadas) que, com o decréscimo da concentração, finalmente convergirão a um único ponto crítico.

A fração volumétrica (ϕ) em cada fase é inversamente proporcional ao grau de enriquecimento do polímero dominante (Morris, 1990). Quantitativamente, denotando a fração volumétrica, concentração de polissacarídeo e proteína na fase enriquecida em proteína (fase 1) como ϕ_1 , A_1 e C_1 , respectivamente, e os parâmetros correspondentes na fase enriquecida em polissacarídeo como ϕ_2 , A_2 e C_2 , então,

$$\phi_1 A_1 + \phi_2 A_2 = A_0 \quad (2.17)$$

$$\phi_1 C_1 + \phi_2 C_2 = C_0 \quad (2.18)$$

onde, A_0 e C_0 são as concentrações globais do sistema de polissacarídeo e proteína, respectivamente. Desde que $\phi_1 + \phi_2 = 1$, pode-se demonstrar que (Morris, 1990):

$$\phi_1 = \frac{(A_2 - A_0)}{(A_2 - A_1)} = \frac{(C_0 - C_2)}{(C_1 - C_2)} \quad (2.19)$$

$$\phi_2 = \frac{(A_0 - A_1)}{(A_2 - A_1)} = \frac{(C_1 - C_0)}{(C_1 - C_2)} \quad (2.20)$$

e

$$\frac{\phi_1}{\phi_2} = \frac{(A_2 - A_0)}{(A_0 - A_1)} = \frac{(C_0 - C_2)}{(C_1 - C_0)} \quad (2.21)$$

Uma forma equivalente, e talvez mais simples, de expressar estas relações é dizer que o comprimento da linha de junção entre a composição global do sistema e cada uma das fases é diretamente proporcional à fração volumétrica da outra fase (Morris, 1990).

Alves e colaboradores (2000) sugerem que as propriedades mecânicas de sistemas proteínas/polissacarídeo podem ser preditas através do conhecimento de seu diagrama de fases. Neste trabalho foi investigada a possibilidade de diagramas de fases determinados para água-gelatina-goma jataí serem um modelo apropriado para avaliar a composição de fases em géis formados com estes componentes. Através de análises reológicas concluiu-se que nos géis em questão as propriedades mecânicas são influenciadas pela concentração de polissacarídeo e pela concentração de gelatina, e a medida que se aumenta a concentração de polissacarídeo ocorre a diminuição da densidade da rede do gel levando à separação dos componentes.

Em outro trabalho, Alves e colaboradores (1999b) investigaram a compatibilidade termodinâmica de sistemas jataí e gelatinas ácida ou alcalina, que possuem diferentes pontos isoelétricos. O efeito da degradação das moléculas de gelatina na compatibilidade termodinâmica foi investigado e verificou-se que a medida que esta degradação aumenta, a assimetria dos diagramas de fases também aumenta.

No estudo do equilíbrio de fases de sistemas água-gelatina-pectina-dextrana, na ausência de sais e em valores de pH maiores que o do ponto iso-iônico foi observado que este sistema quaternário é bifásico, contrariamente ao comportamento monofásico dos sistemas água-gelatina-pectina e água-gelatina-dextrana, sob as mesmas condições (Alves et al., 2000). A elevada compatibilidade termodinâmica entre a gelatina e os dois polissacarídeos, em separado, foi atribuída à formação de ligações intermoleculares fracas. No entanto, a incompatibilidade termodinâmica verificada entre a gelatina e os dois polissacarídeos em conjunto deve-se ao rearranjo dos grupos reativos da gelatina, em consequência de interações competitivas na presença de dextrana.

Schorsch e colaboradores (1999) verificaram o equilíbrio de fases entre proteínas do leite/jataí/sacarose, e constataram que na temperatura de 5°C (empregada no armazenamento refrigerado de produtos lácteos), pH de 6,8 e força iônica de 0,08 M, estas misturas tendem a separar fases, devido a uma elevada incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros.

Alguns aspectos interessantes da incompatibilidade termodinâmica entre polímeros, como a força de gel ou diminuição do tempo de gelificação, têm sido observados em faixas de concentração nos quais polímeros coexistem em uma única fase, e a ocorrência da separação de fases tem sido associada com a reversão destes efeitos desejados. Todavia, a separação destes sistemas em duas fases líquidas pode ser considerada em algumas aplicações, por prover formação de produtos com textura mista (Morris, 1990).

2.9 - Compatibilidade e separação de fases segregativa entre proteínas do IPS e xantana.

De acordo com o segundo princípio da termodinâmica, a mistura de um ou mais componentes com um solvente é possível, se o resultado na energia livre de mistura, ΔG_{mix} é negativo (Schmitt et al., 1998).

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M \quad (2.22)$$

$$\Delta G_{\text{mix}} < 0$$

onde ΔH_M e ΔS_M são a entalpia e a entropia de mistura respectivamente, T é a temperatura absoluta em (K).

A estabilidade de sistemas poliméricos em solução é governada por três efeitos termodinâmicos: entropia de mistura, interações moleculares que são originadas de diferentes maneiras nas macromoléculas e os efeitos de volume excluído (Schmitt et al., 1998).

Para soluções diluídas de proteínas e polissacarídeos o sistema é estável quando a entropia de mistura é elevada, pois a energia livre de mistura é negativamente favorecida conforme a equação (2.22). Com o aumento da concentração dos biopolímeros ou agregação de um deles, o sistema se torna instável, dependendo do tipo de interação entre os polímeros, pois as moléculas tendem a um estado mais organizado em solução, influenciando negativamente no termo de entropia de mistura e levando a valores positivos de energia livre de mistura.

A interação ou calor de mistura ΔH_M está baseado na existência de interações repulsivas (hidratação, repulsão estérica) ou atrativas (eletrostáticas, hidrofóbicas, Van der Waals, London) que se distribuem pelos segmentos das moléculas envolvidas. Portanto, a ΔH_M pode ser positiva e não favorável à mistura das dispersões moleculares ou negativa e favorável à mistura por interações específicas (Schmitt et al., 1998).

A coacervação é um exemplo de mistura em que o termo de entalpia de mistura é significativo no processo de separação de fase. Neste tipo de processo, os polímeros possuem uma maior interação entre si e menor com o solvente, sendo que a separação de fases se dá com os biopolímeros se concentrando em uma das fases enquanto que o solvente, com uma reduzida quantidade de polímeros é segregado na outra fase. Este processo ocorre quando em uma mistura, as proteínas e polissacarídeos possuem cargas opostas. A coacervação seria possível com a redução do pH a valores próximos ou inferiores ao pI das proteínas, ou ainda pelo aumento da força iônica do sistema através da adição de sais. Nestas condições as interações moleculares entre estes biopolímeros seriam favorecidas e, portanto o processo seria governado pela contribuição entálpica na energia livre de mistura (De Kruif & Tuinier, 2001).

2.10 - Efeitos termodinâmicos relacionados ao Volume excluído das moléculas.

Efeitos de volume de exclusão são baseados na limitação espacial entre as moléculas, pois as macromoléculas e seus segmentos não podem ocupar o mesmo espaço. Deste fato, resultam pequenas forças repulsivas intermoleculares, impossibilitando interações específicas entre segmentos das moléculas. Em soluções diluídas de biopolímeros, interações do tipo volume de exclusão impedem a interpenetração e a sobreposição das macromoléculas (Tolstoguzov, 1997). Uma molécula presente em solução repele uma segunda em uma razão de volume denotada por V_e , conforme pode ser observado na Figura 2.7.

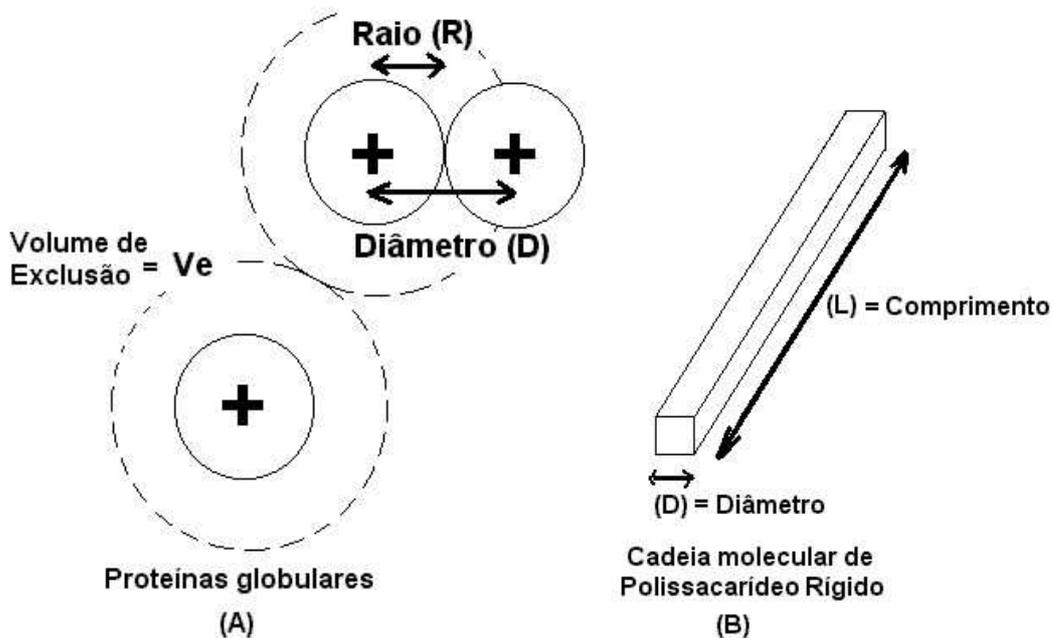


Figura 2.7: Representação esquemática, (A) do volume excluído para moléculas esféricas e rígidas de proteínas globulares, (B) polissacarídeo rígido de elevado peso molecular.

A Figura 2.7 (A) exemplifica o volume excluído para o caso mais simples de proteínas globulares e a Figura 2.7 (B) o caso de polissacarídeos rígidos. Cada molécula ocupa um lugar na solução que não pode ser ocupada pela outra. Isso significa que à volta de cada molécula esférica existe um volume esférico (V_e) de onde o centro de qualquer outra molécula esférica é expelido.

2.11 - Referências Bibliográficas.

ALVES, M. M.; ANTONOV, Y. A.; GONÇALVES, M. P. Phase equilibria and mechanical properties of gel-like water–gelatin–locust bean gum systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.27, p.41–47, 2000.

ALVES, M. M.; ANTONOV, Y. A.; GONÇALVES, M. P. On the incompatibility of alkaline gelatin and locust bean gum in aqueous solution. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.13, p.77-80, 1999a.

ALVES, M. M.; ANTONOV, Y. A.; GONÇALVES, M. P. The effect of structural features of gelatin on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.13, p.157–166, 1999b.

AVILA, F.; BINDING, D. M. Normal and reverse squeezing flow. **Journal of Non-newtonian Fluid Mechanics**, Amsterdam, v.11, p.111-126, 1982.

BARONI, A. F.; CUNHA, R. L.; FREITAS, I. C.; HUBINGER, M. D.; MENEGALLI, F. C. Caracterização reológica de requeijão cremoso tradicional e com teor reduzido de gordura: Viscosidade extensional e em cisalhamento. **Brazilian Journal of Food Thechnology**, Campinas, v.2, n.1, p.21-29, 1999.

BIRD, R. B.; ARMSTRONG, R.C.; HASSAGER, O. **Dynamics of polymeric liquids fluid mechanics**. 2 ed., New York: Wiley & Sons, 1987. v. 1, 649p.

BOTTOMLEY, R. C.; EVANS, M. T. A.; PARKINSON, C. J. Whey proteins. In: HARRIS, P. **Food gels**. London: Elsevier Science, 1990. p.435-466.

CAMPANELLA, O. H.; PELEG, M. Squeezing flow viscometry for nonelastic semiliquid foods - theory and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.42, n.3, p.241-264, 2002.

CAMPANELLA, O. H.; PELEG, M. Squeezing flow viscosimetry of peanut butter. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.1, p.180-184, 1987a.

CAMPANELLA, O. H.; PELEG, M. Determination of the yield stress of semiliquid foods from squeezing flow data. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.1, p.214-217, 1987b.

CHAPLIN, M. **Water, Introduction to Polysaccharides, Hydrocolloids**. Disponível em:<<http://www.sbu.ac.uk/water>>. Acesso em: 27 Jan. 2002.

COPELAND, R. A. Eletrophoretic and chromatographic methods for assessing protein purity. In: COPELAND R. A. **Methods for protein analysis: A practical guide to laboratory protocols**. New York: Chapman & Hall, 1990. p.59-91.

DAMRAU, E.; PELEG, M. Imperfect squeezing flow viscosimetry of newtonian liquids - theoretical and practical considerations. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v.28, n.2, p.187-204, 1997.

DE KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.15, n.4/6, p.555-563, 2001.

ELEYA, M. M. O.; TURGEON, S. L. The effects of pH on the rheology of β -lactoglobulin/ κ -carrageenan mixed gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.14, n.3, p.245-251, 2000.

GARFIN, D. E. One dimensional gels electrophoresis. In: DEUSTSCHER, M. P. **Guide to protein purification**. Methods in Enzymology. San Diego: Academic Press, 1990. v 1, p.425-441.

GRINBERG, V. Y.; TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.11, n.2, p.145-158, 1997.

HARRIS, P. **Food gels**. London: Elsevier Science, 1990. 510p.

HOFFNER, B.; GERHARDS, C.; PELEG, M. Imperfect lubricated squeezing flow viscometry for foods. **Rheologica Acta**, New York, v.36, n.6, p.686-693, 1997.

IUPAC:<<http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/2carb/2C2gif/201C.GIF>>.

LEE, S. J.; PELEG, M. Imperfect squeezing flow viscosimetry with a wide plate and a shallow container. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v.23, n.3, p.267-278, 1992.

LORENZO, M. A.; GERHARDS, C.; PELEG, M. Imperfect squeezing flow viscosimetry of selected tomato products. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v.28, n.5, p.543-567, 1997.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: A review. **Food Research International**, Amsterdam, v.30, n.7, p.529-542, 1997.

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

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

MORRIS, E. R. Mixed polymer gels: Phase separation. In: HARRIS, P. **Food gels**. London: Elsevier Science, 1990. p.305-308.

MORRIS, V. J. Bacterial polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.341-375.

PADMANABHAN, R. Measurement of extensional viscosity of viscoelastic liquid foods. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.25, n.3, p.311-327, 1995.

SCHIMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.38, n.8, p.689-753, 1998.

SCHOKKER, E. P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. **International Dairy Journal**, Oxford, v.10, n.12, p.843-853, 2000.

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

SGARBIERI, V. C. Fontes de proteínas na alimentação. In: SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades - Degradações - Modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. p.149-155.

SMITH, B. J. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: WALKER, J. M. **Basic protein and peptide protocols**: Methods in molecular biology. Hatfield: Humana Press, 1994. v. 32, p.23-34.

STEFFE, J. F. Extensional flow. In: STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. East Lansing: Freeman Press, 1996. p.255-293.

SUWONSICHON, T.; PELEG, M. Rheological characterisation of almost intact and stirred yogurt by imperfect squeezing flow viscometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, W Sussex, v.79, n.6, p.911-921, 1999a.

SUWONSICHON, T.; PELEG, M. Imperfect squeezing flow viscometry of mustards with suspend particulates. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.39, p.217-226, 1999b.

SYRBE, A.; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, N. Polymer science concepts in dairy systems - an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, Oxford, v.8, n.3, p.179-193, 1998.

TOLSTOGUZOV, V. Compositions and phase diagrams for aqueous systems based on proteins and polysaccharides: **International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology**, San Diego v. 192. v. 192, p.3-31, 2000. .

TOLSTOGUZOV, V. Thermodynamics aspects of dough formation and functionality. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.11, n.2, p.181-193, 1997.

URLACHER, B.; NOBLE, O. Xanthan gum. In: IMESON, V. **Thickening and gelling agents for foods**. London: Blackie Academic and Professional, 1997. p.285-311.

USDEC **Whey proteins**. Disponível em:<www.uesdec.org>. Acesso em: 15 jan. 2002.

VARDHANABHUTI, B.; FOEGEDING, E. A. Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, p.3649-3655, 1999.

ZASYPKIN, D. V.; BRAUDO, E. E.; TOLSTOGUZOV, V. B. Multicomponent biopolymer gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.11, n.2, p.159-170, 1997.

CAPÍTULO 3

Relação entre a agregação das proteínas do soro e sua incompatibilidade termodinâmica com a xantana a 10°C

RESUMO

Soluções de proteínas e polissacarídeos apresentam uma incompatibilidade natural quando em soluções. Soluções de IPS 5% e xantana entre 0,01% a 1% se mostram compatíveis nas condições experimentais estudadas enquanto que soluções com as mesmas concentrações de xantana e de IPS 5% termicamente desnaturada na temperatura de 80°C por 30 minutos são termodinamicamente incompatíveis. Foi determinado um diagrama de fases capaz de descrever as condições de incompatibilidade termodinâmica de sistemas constituídos por proteínas do soro termicamente desnaturadas e xantana. Observa-se uma baixa correlação entre os dados que descrevem as composições das fases de equilíbrio e, portanto, não foi traçada uma binodal que claramente delineasse a fronteira de separação. Esta falta de ajuste de dados estaria correlacionada a limitações experimentais como a dificuldade de separação de sistemas viscosos, ainda em altas velocidades de centrifugação. O principal mecanismo termodinâmico envolvido nesta incompatibilidade termodinâmica seria a baixa entropia do sistema quando as proteínas do soro estão agregadas, porém efeitos de volume de exclusão entre os agregados e as grandes moléculas de xantana também poderiam estar envolvidos nesta incompatibilidade, principalmente quando as soluções são diluídas.

3.1 - Introdução

Proteínas e polissacarídeos são os biopolímeros mais utilizados na indústria de alimentos por suas propriedades funcionais de modificar textura e estabilizar soluções (Dickinson, 1998).

As proteínas do soro do leite possuem excelente valor nutricional e são utilizadas como ingredientes funcionais devido as suas mais diversas habilidades, destacando entre outras a de aumentar a viscosidade de soluções e formar géis (Sgarbieri, 1998). Tradicionalmente, as soluções de proteínas do soro gelificam quando submetidas a aquecimento a temperaturas maiores que 60°C, quando estas proteínas se desnaturam parcialmente e, em seguida, se agregam para formar uma estrutura tridimensional que é capaz de reter água (Morr & Ha, 1993).

Recentemente muita atenção tem sido direcionada para o estudo de produtos capazes de gelificar em condições de menor temperatura através de um aquecimento prévio ao processamento (Ju & Kilara, 1998a) ou por adição de sais (Hongsprabhas & Barbut, 1996) nas soluções de proteínas do soro. Estas proteínas, uma vez modificadas termicamente, poderiam ser adicionadas na formulação de alimentos levando à formação de géis em condições de menor temperatura, produzindo o que se chama de gelificação a frio ou, em inglês, “cold set gelation” (Bryant & McClements, 1998). A aplicação de tratamento térmico em sistemas alimentícios que contém proteínas é uma condição de processo bastante comum, que afeta sensivelmente as características da proteína e sua interação com outros compostos, inclusive os polissacarídeos (Syrbe et al., 1998).

A xantana é um polissacarídeo muito utilizado em alimentos pela sua capacidade de conferir aumento de viscosidade das soluções, modificando as características reológicas de textura e estabilidade (Morris, 1995).

A incompatibilidade entre proteínas e polissacarídeos é um fenômeno natural (Grinberg & Tolstoguzov, 1997), e em princípio existem três possibilidades de equilíbrio nos sistemas: (a) incompatibilidade, em que as interações mais repulsivas promovem a segregação entre os biopolímeros formando fases aquosas imiscíveis concentradas com somente um dos biopolímeros envolvidos; (b) coacervação complexa, em que a atração entre as moléculas dos biopolímeros

causam a formação de complexos imiscíveis e finalmente uma condição de (c) miscibilidade em que o sistema é homogêneo e os biopolímeros estão distribuídos no solvente (Syrbe et al., 1998).

O comportamento de fases de misturas de biopolímeros em soluções é quantitativamente caracterizado por um diagrama descrevendo as condições de fronteira da separação de fases e de partição dos componentes (entre água e os biopolímeros). Diagramas de fases também são usados para apresentar os efeitos de temperatura, pH, concentração de sais, e outras variáveis no comportamento de fases da mistura de biopolímeros (Tolstoguzov, 2000). Em condições de excesso de solvente se torna mais prática a construção de diagramas em coordenadas retangulares do que em coordenadas triangulares, o que simplifica a análise do efeito isolado dos biopolímeros envolvidos. Normalmente, as concentrações dos biopolímeros são apresentadas em porcentagem de massa nos eixos e o restante é assumido como solvente (Tolstoguzov, 2000).

Apesar da relativa simplicidade em se determinar a composição destes sistemas através de análises específicas para proteínas e polissacarídeos, muitas limitações experimentais estão envolvidas como a dificuldade de separação entre as fases incompatíveis quando a viscosidade é elevada, sendo essa separação possível apenas através do uso de técnicas de ultracentrifugação. Alguns diagramas de fases determinados para sistemas proteína-polissacarídeo são encontrados na literatura, utilizando técnicas de ultracentrifugação na coleta das fases separadas, como sistemas gelatina-jataí (Alves et al., 1999a e b), proteínas do leite e jataí em presença de sacarose (Schorsch et al., 1999a e b) e caseinato e alginato (Capron et al., 2001).

O tratamento térmico empregado sobre as proteínas do soro tem efeito marcante na compatibilidade destas proteínas com a xantana. O tratamento causaria uma modificação no equilíbrio dos sistemas soro/xantana, levando a uma separação de fases, que não é observada quando as proteínas estão em seu estado nativo (Bryant & McClements 2000). Apesar da separação de fases ter sido correlacionada com as propriedades reológicas do sistema, Bryant &

McClements (2000) não realizaram análises posteriores de composição para a determinação de diagramas de fases que descrevessem a região de incompatibilidade destas soluções.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um diagrama de fases para determinar a região de compatibilidade entre a xantana e as proteínas do soro nativas e termicamente desnaturadas a 80°C durante trinta minutos. Técnicas de separação por ultracentrifugação foram utilizadas conforme apresentado no trabalho de Antonov et al. (1977), e condições da metodologia e sua eficácia na construção dos diagramas também foram verificadas. O efeito do tratamento térmico nas proteínas do soro foi avaliado através de análise de eletroforese em gel de poliacrilamida para correlacionar qualitativamente a agregação protéica com o equilíbrio termodinâmico do sistema.

3.2 - Materiais e Métodos

3.2.1 - Materiais

Isolado protéico de soro (IPS LACTOPRODAN DI-9224) foi gentilmente cedido pela Arla Foods Ingredients (Dinamarca). O teor de proteína determinado pelo método de Kjeldhal (AOAC, 1996) foi de 81,64±1,33% e o teor de sólidos determinado após o aquecimento da amostra a 102°C por 6 horas correspondeu a 98,67% (teor de umidade de 1,33% em base úmida). O teor de cátions determinado por espectrofotometria de absorção atômica foi de Na 0,63 %, Ca 0,05% e K 0,65%. Esta análise foi realizada pelo Instituto de Química da UNICAMP. A amostra continha 0,08±0,01% de lactose determinada pelo método de Fenol-Sulfúrico (Hodge & Hofreiter, 1962).

A xantana foi adquirida da Sigma Aldrich-Corporation (St Louis-USA) Lot59H0718. A amostra continha 11,3% de umidade e o teor de cátions determinado por espectrofotometria de absorção atômica (Instituto de Química da UNICAMP), foi de Na 2,60 %, Ca 0,40% e K 4,00%.

Foram utilizados como marcador de peso molecular comercial BenchMark™ Prestained Protein Ladder da Invitrogen-USA (Cat 10748-010 Lot 1125588) e

frações puras de β -Lactoglobulina (L2506), α -Lactoalbumina (L6010), α -caseína (C6780), β -caseína (C6905) e κ -caseína (C0406) todas adquiridas da Sigma Aldrich Co. (St Louis-USA).

2.2 Soluções Estoque

Soluções-estoque com 10% de IPS (peso soluto/peso solvente) foram preparadas. Essa solução usada diretamente foi chamada de nativa (N) e a submetida a tratamento foi denominada de termicamente desnaturada (TD). O pó de IPS foi dissolvido em água deionizada a temperatura ambiente sob moderada agitação magnética, para evitar a formação de grumos e espuma durante um período de 1 a 2 horas. O pH da solução manteve-se entre 6,5 e 7,0.

A solução estoque-TD foi preparada pelo aquecimento da solução de IPS a 80°C por 30 minutos em tanque encamisado de aço inoxidável com circulação de água quente, com a solução também submetida a suave agitação mecânica. Após o aquecimento, a solução foi imediatamente resfriada a 10°C em um banho de gelo, permanecendo armazenada nesta temperatura até a utilização no preparo das amostras (Schmidt et al., 1984; Morr & Ha, 1993).

A solução-estoque de xantana 2% (peso soluto/peso solvente) foi preparada, na temperatura de 20°C, pela dissolução do pó de xantana em água deionizada com o auxílio de uma bomba de vácuo para aspergir o pó sobre a água, o que evitou a formação de grumos e promoveu uma dissolução uniforme. Após a completa dissolução, a amostra permaneceu sob agitação suave por trinta minutos, sendo imediatamente resfriada a 10°C em um banho de gelo.

3.2.3 - Preparo das amostras e tempo de equilíbrio

As amostras preparadas correspondiam a misturas de IPS-N e xantana, e misturas de IPS-TD e xantana. Essas misturas continham a mesma concentração de IPS, (5% p/p), porém as concentrações de xantana variaram entre 0,01 e 1,00%.

As misturas foram preparadas adicionando-se diferentes quantidades da solução-estoque de xantana 2% e água deionizada na solução-estoque de IPS

nativa ou termicamente desnaturada. Estas amostras foram então misturadas em agitador mecânico e, posteriormente colocadas em tubos de policarbonato para ultracentrífuga, previamente tarados. Os tubos foram então armazenados a 10°C, primeiramente por um tempo entre 72 e 120 horas, para a realização de testes prévios de ultracentrifugação onde foi determinada a condição de equilíbrio termodinâmico.

Como as amostras nativas não apresentaram separação de fases, somente as amostras de IPS-TD foram utilizadas para a determinação do tempo de equilíbrio e do diagrama de fases.

Uma vez que o tempo de equilíbrio determinado nos ensaios preliminares de equilíbrio foi de 72 horas, as amostras de IPS-TD e xantana foram armazenadas a 10°C durante esse período. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas em uma L8-80M BECKMAN ULTRACENTRIFUGE-USA a 45.000 rpm (150.000 g) durante uma hora. As amostras foram separadas em duas fases distintas que foram analisadas para a composição dos diagramas de fases.

A elevada velocidade de centrifugação está relacionada à dificuldade de separação de sistemas viscosos, pois uma centrifugação em baixa velocidade pode não ser suficiente para a separação efetiva de sistemas com elevadas concentrações de proteínas e polissacarídeos (Antonov et al., 1977).

3.2.4 - Determinação do diagrama de fases

As duas fases separadas após a ultracentrifugação foram coletadas e pesadas. Em seguida, os teores de proteína pelo método de Kjeldhal (AOAC, 1996) e o de polissacarídeo pelo método fenol-sulfúrico (Hodge & Hofreiter, 1962) foram determinados. A leitura do método fenol sulfúrico foi realizada em um espectrofotômetro Du-70 BECKMAN-USA. Ensaios de varredura de comprimento de onda mostraram que o pico de absorbância ocorreu em 486 nm, sendo este o valor utilizado na leitura. Verificou-se ainda a necessidade de correção da interferência de turbidez de amostra em 550 nm. A curva-padrão utilizada na determinação de xantana é apresentada na Figura 3.1.

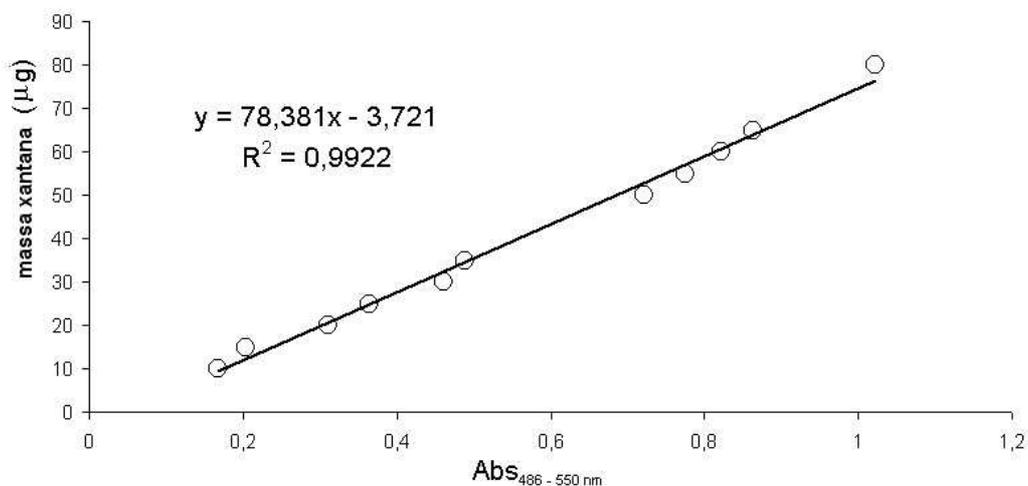


Figura 3.1. Curva-padrão para determinação de xantana pelo método fenol-sulfúrico.

As concentrações de xantana e de proteínas do soro na solução original (ponto central), assim como as concentrações de proteína e polissacarídeo em ambas as fases coletadas após centrifugação (ponto de equilíbrio) foram analisadas e usadas para estabelecer o diagrama de fases. As análises foram conferidas a partir do balanço de massa do sistema.

3.2.5 - Ensaios de Eletroforese em gel de poliacrilamida

A caracterização da amostra de isolado protéico de soro e da agregação das proteínas frente ao tratamento térmico empregado foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Para a construção do gel foram utilizadas lâminas verticais de vidro do sistema (Bio-Rad, Hercules-CA), em que a poliacrilamida ainda não polimerizada é adicionada. Após a polimerização, o gel é formado nas dimensões de 16x15 cm e 0,1mm de espessura.

As soluções de proteína nativa e desnaturada termicamente foram diluídas em água deionizada e foram aplicados 15 µg de amostra nos compartimentos formados no topo do sobregel de poliacrilamida. A amostra foi diluída na razão de 1:2 em um tampão de amostra pH 8,0 que contém 0,01 M de Tris-HCl, 1% de SDS, 30% de glicerol(v/v) e 0,001M de β-mercaptoetanol para as análises de

SDS-PAGE_R (desnaturante e redutor). Nas análises em condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE_{NR}) foi utilizado o mesmo tampão descrito para o SDS-PAGE_R, exceto pela exclusão do β -mercaptoetanol. Nas análises em condições de gel nativo, as amostras de proteína foram diluídas em 1:2 com tampão de amostra nativo que consiste no mesmo tampão descrito anteriormente, exceto pela exclusão do SDS e do β -mercaptoetanol.

Todos os ensaios foram realizados em gel de poliacrilamida com concentrações de 15% para o gel de resolução e de 5% para o gel de empacotamento. O gel de resolução para SDS-PAGE_R e SDS-PAGE_{NR} era composto por 0,375 M de tampão Tris-HCl pH 8,8 e 0,1% de SDS. O tampão de corrida utilizado continha 0,025 M de tampão Tris-HCl, 0,192 M de glicina e 0,1% de SDS em pH 8,3. O gel de resolução nativo foi feito da mesma forma que descrito acima, exceto pela exclusão do SDS no tampão de corrida e no gel de resolução.

Após as corridas, todos os géis foram corados com 0,25% (p/v) Comassie Brilliant Blue em 40% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial e para o contraste estes foram descorados em solução de metanol-ácido acético. A intensidade relativa das bandas coradas foram determinadas e quantificadas por densitometria empregando o sistema de vídeo Eagle Eye (Stratagene, USA). Nessa quantificação foram utilizados o marcador de peso molecular comercial Invitrogen (USA) e frações puras de β -Lactoglobulina, α -Lactoalbumina, α - e β - e κ -caseínas adquiridas da Sigma Aldrich Co. (St Louis-USA).

3.3 - Resultados e discussão

3.3.1 - Determinação do ponto de equilíbrio termodinâmico

Vários ensaios de centrifugação a 150.000 g, cujas amostras foram submetidas a armazenamento a 10°C, foram realizados para verificar o tempo necessário para atingir a completa separação de fases do sistema. As amostras possuíam a mesma concentração inicial (ponto central) de 5% de IPS-TD e 0,5% de xantana.

Nestes ensaios preliminares foi utilizado IPS–TD, pois trabalhos anteriores sugeriam que soluções nativas de IPS e xantana não apresentavam separação de fases (Bryant & McClements, 2000), e a concentração de xantana de 0,5% foi utilizada, pois as soluções de xantana concentradas acima deste nível apresentaram maior dificuldade de separação devido à elevada viscosidade (Alves et al., 1999a).

As amostras foram ultracentrifugadas após um período de 72, 96 e 120 horas de armazenamento a 10°C. Os testes iniciaram-se em 72 horas, pois um trabalho prévio verificou o equilíbrio após esse intervalo de tempo (Bryant & McClements, 2000). As fases coletadas após a ultracentrifugação foram analisadas quanto à composição de IPS e xantana. Em seguida os dados obtidos foram conferidos em termos de um balanço de massa e analisados com relação às linhas de amarração obtidas (Figura 3.2). As linhas de amarração correspondem ao melhor ajuste linear entre os três pontos.

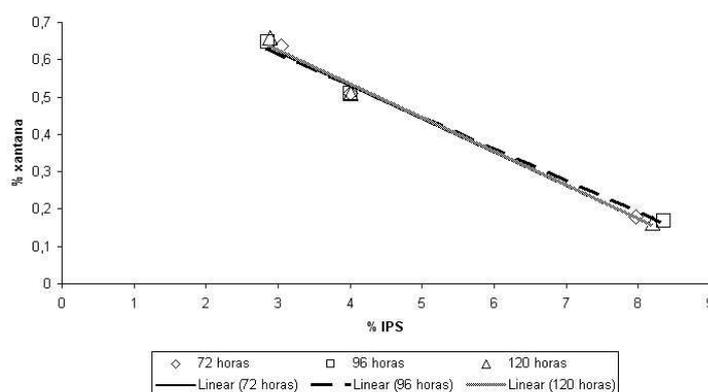


Figura 3.2: Linhas de amarração obtidas nos ensaios preliminares para a determinação do ponto de equilíbrio.

Observa-se a similaridade entre as linhas de amarração nos tempos de equilíbrio de 72, 96, e 120 horas, pois o coeficiente angular do ajuste linear para as três linhas estava em torno de $-0,09$. As variações de composição de IPS nas fases para os tempos de armazenamento estudados são apresentadas na Figura 3.3, considerando a variação entre triplicatas. Verifica-se a tendência do aumento da concentração de IPS na fase inferior e a redução de IPS na fase superior. Esta

tendência se inverte quando se avalia a concentração de xantana nas fases superior e inferior (Figura 3.4). Observa-se uma diminuição da concentração de xantana na fase inferior e um aumento desta na fase superior. Considerando-se o desvio entre as amostras, observa-se que estas variações não são significativas estatisticamente, a partir da análise das médias das concentrações das fases usando o teste de Tukey para a determinação de diferenças significativas ao nível de confiança de 95%. A partir desses resultados e do ajuste linear das linhas de amarração, as análises subseqüentes foram realizadas após 72 horas de armazenamento a 10°C.

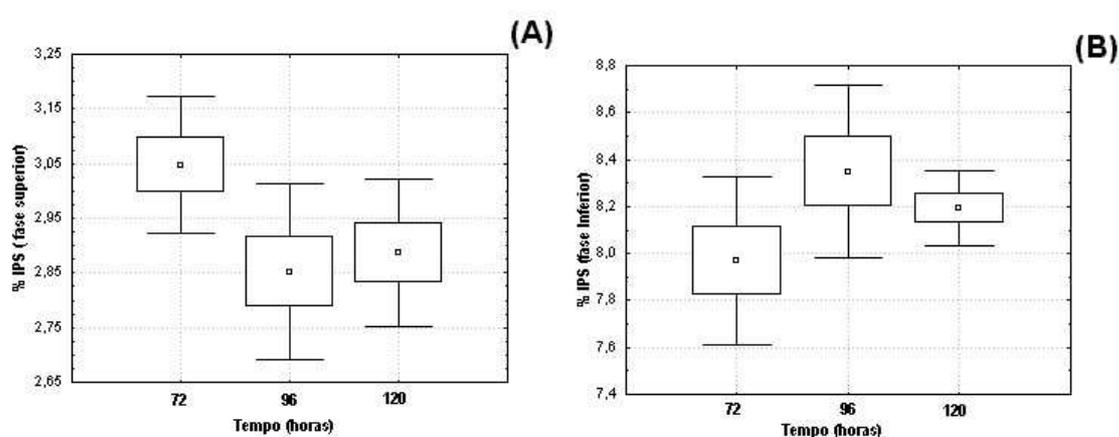


Figura 3.3: Variação de IPS na fase superior (A) e inferior (B) nos tempos de 72, 96 e 120 horas. \perp \pm desvio padrão, \square \pm erro padrão, \square \pm média

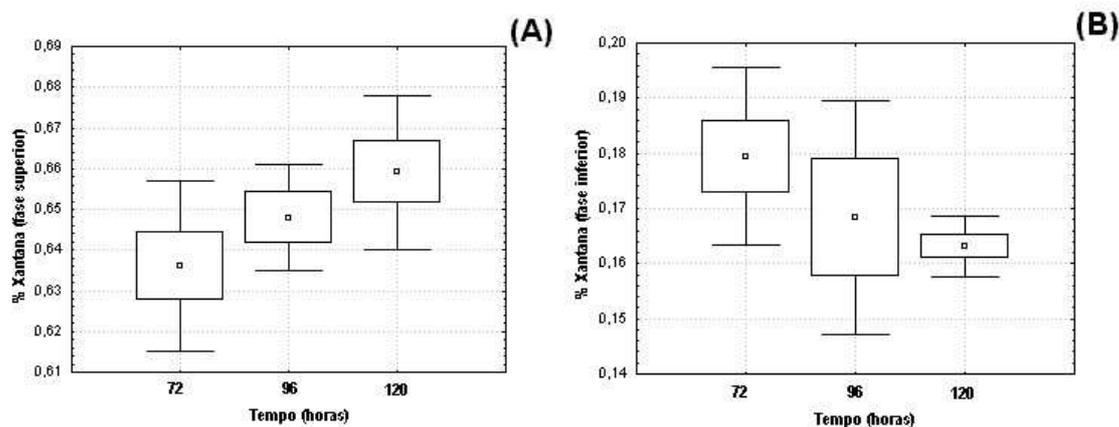


Figura 3.4: Variação de xantana na fase superior (A) e inferior (B) nos tempos de 72, 96 e 120 horas.. \perp \pm desvio padrão, \square \pm erro padrão, \square \pm média

3.3.2 - Diagrama de Fases e dados de equilíbrio

Uma vez que soluções de IPS nativo não apresentaram separação de fases com a xantana mesmo após a ultracentrifugação, apenas as amostras de IPS-TD e xantana foram avaliadas quanto à separação de fases. A Figura 3.5 apresenta o diagrama de fases obtido nessas condições. Na abscissa se apresentam as concentrações de IPS termicamente desnaturado (IPS-TD) a 80°C por 30 minutos e na ordenada se mostram as concentrações de xantana.

Os dados de composição das amostras iniciais e das fases separadas após a ultracentrifugação são apresentados na Tabela 3.1. As soluções iniciais foram analisadas na composição de proteína e xantana e estes dados foram utilizados na composição do diagrama para evitar a interferência de eventuais erros de preparação das soluções.

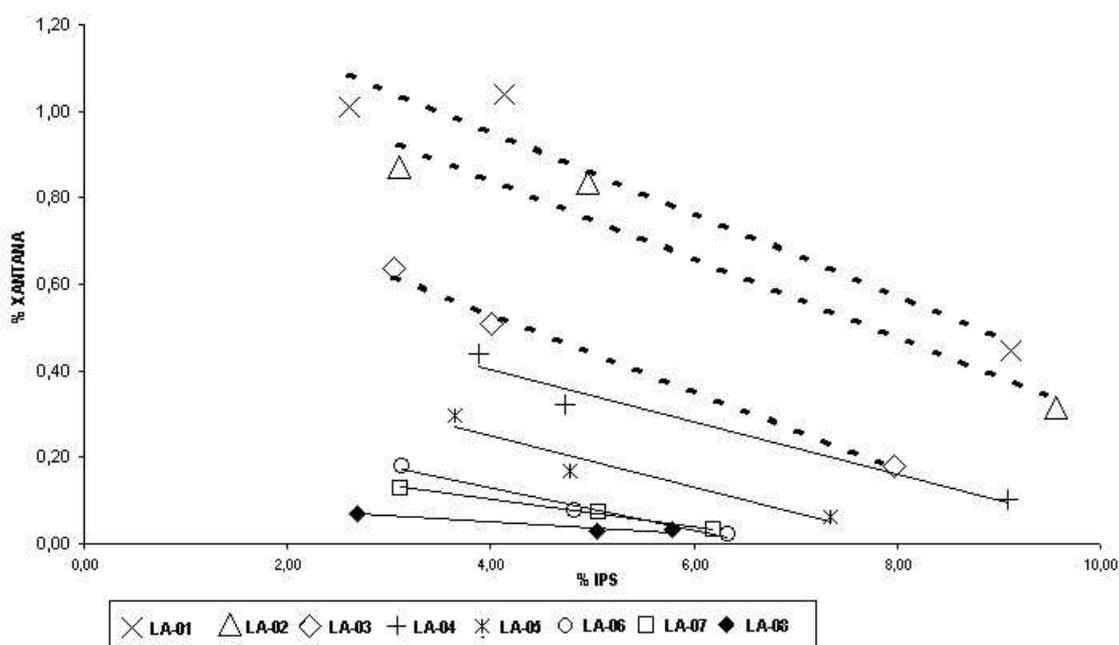


Figura 3.5: Diagrama de fases para o sistema IPS termicamente desnaturado (IPS-TD) (80°C / 30 minutos) e xantana: - - - - linhas de amarração para soluções concentradas (com separação após ultracentrifugação), ——— linhas de amarração para soluções diluídas (com separação espontânea).

Cada linha do diagrama corresponde a uma linha de amarração (LA) e estas foram divididas em dois grupos correspondentes às soluções que apresentaram separação espontânea (linha contínua) e aquelas que apresentaram separação somente após a ultracentrifugação (linha pontilhada). Os sistemas representados pelas linhas contínuas, também foram ultracentrifugados, mas apresentaram separação de fases espontânea a partir de 6 horas de armazenamento. O fato da separação ser espontânea ou não espontânea dependeu da concentração de xantana na amostra. A separação de fases foi espontânea em concentrações de xantana inferiores a 0,3% e sendo assim, dois grupos de amostras foram identificados: soluções com concentração de xantana inferior a 0,3% e superior a 0,3%, que foram denominadas diluídas e concentradas respectivamente. Esta denominação foi utilizada para diferenciar os dois grupos de soluções observados e melhorar a compreensão do texto.

A Tabela 3.2 apresenta os valores de massa obtidos na pesagem da amostra inicial e das fases coletadas. A partir destes dados foram calculados os valores apresentados de frações mássicas das fases superior e inferior.

Os dados de frações mássicas de fase demonstram um maior peso na fase superior, portanto ocorreu uma maior migração de água para esta fase. Além disso, na fase superior se observa uma maior concentração de xantana e isso demonstra a maior afinidade do polissacarídeo com a água.

Tabela 3.1: Valores de composição das fases e ponto central obtidos após centrifugação das amostras. Xt = xantana

Linha de amarração	Fase Superior		Ponto Central		Fase Inferior		Coeficiente Angular	R ²
	% IPS	% Xt	% IPS	% Xt	% IPS	% Xt		
LA – 01	2,61±0,08	1,01±0,02	4,14±0,06	1,04±0,02	9,12±0,27	0,45±0,12	-0,095	0,92
LA – 02	3,09±0,29	0,87±0,06	4,96±0,03	0,84±0,02	9,57±0,53	0,31±0,01	-0,091	0,94
LA – 03	3,05±0,12	0,63±0,02	4,00±0,10	0,54±0,00	7,97±0,36	0,17±0,01	-0,090	0,99
LA – 04	3,88±0,07	0,44±0,04	4,73±0,08	0,32±0,02	9,08±0,19	0,10±0,02	-0,060	0,96
LA – 05	3,65±0,27	0,29±0,01	4,79±0,06	0,17±0,02	7,34±0,11	0,06±0,01	-0,059	0,93
LA – 06	3,14±0,16	0,16±0,01	4,83±0,09	0,08±0,02	6,44±0,41	0,03±0,02	-0,049	0,98
LA – 07	3,11±0,13	0,13±0,01	5,06±0,08	0,07±0,01	6,19±0,15	0,03±0,01	-0,031	0,99
LA – 08	2,69±0,06	0,07±0,00	5,04±0,07	0,03±0,01	5,78±0,09	0,03±0,00	-0,013	0,91

Tabela 3.2: Massa das amostras referentes aos pares de tubos da ultracentrífuga e valores de fração mássica das fases inferior (ϕ_1) e superior (ϕ_2).

L. A	Tubo	Massa Amostra (g)	M1. (g) Fase SUP	M2. (g) Fase INF	ERRO (%)	ϕ_1 (INF)	ϕ_2 (SUP)
L. A.- 01	A	25,70	18,64	6,14	3,57	0,25	0,75
	B	25,75	18,81	6,08	3,28	0,24	0,75
L. A.- 02	A	25,51	17,30	7,37	3,26	0,29	0,70
	B	25,50	17,44	7,30	2,89	0,29	0,70
L. A.- 03	A	25,73	20,13	4,70	3,48	0,18	0,81
	B	25,76	19,88	5,10	3,01	0,20	0,79
L. A.- 04	A	25,33	20,73	3,80	3,13	0,15	0,84
	B	25,29	21,32	3,26	2,80	0,13	0,86
L. A.- 05	A	25,41	18,53	6,35	2,03	0,25	0,74
	B	25,60	16,56	8,55	1,89	0,34	0,65
L. A.- 06	A	25,52	12,15	12,99	1,47	0,51	0,48
	B	25,47	11,40	13,67	1,59	0,54	0,454
L. A.- 07	A	26,05	7,70	17,80	2,09	0,70	0,30
	B	26,00	8,34	17,11	2,09	0,67	0,32
L. A.- 08	A	25,91	5,20	20,31	1,54	0,79	0,20
	B	25,90	5,07	20,43	1,46	0,80	0,19

3.3.3 - Dificuldades na construção do diagrama de fases

No diagrama apresentado na Figura 3.5 é possível verificar alguns problemas, provavelmente associados às dificuldades experimentais de obtenção de diagramas de fases proteína-polissacarídeos (Alves et al., 1999a, Clark, 2000).

O mais evidente é a falta de correlação entre os dados de equilíbrio. Na avaliação dos pontos correspondentes ao equilíbrio das fases superiores verifica-se uma tendência de igual concentração de proteína apenas para as soluções concentradas (pontos superiores das linhas de amarração pontilhadas) e as mais diluídas. Quando observada as famílias de linhas de amarração referentes às misturas em que a concentração de xantana é menor, (linhas cheias) fica mais difícil estabelecer uma correlação entre os pontos da fase superior (a concentração de proteína não se mantém constante), porém a concentração de xantana tende a se manter constante na fase inferior. No entanto, o diagrama obtido demonstra que a incompatibilidade entre as proteínas do soro, quando termicamente desnaturadas, e a xantana, se dá em uma grande região de concentrações, sendo que pequenas quantidades de xantana são suficientes para promover a separação.

Os problemas observados poderiam ser atribuídos à alta viscosidade das amostras, especialmente das soluções concentradas, que impossibilitaria uma separação completa do sistema, mesmo nas condições de centrifugação drásticas empregadas nos experimentos. No estudo de sistemas compostos por gelatina e goma jataí Alves et al. (1999a), também obtiveram incompleta separação de fases das amostras, apesar de terem usado condições ainda mais drásticas de centrifugação (380.000g) que as utilizadas no presente trabalho (150.000g).

Em soluções de elevada viscosidade, o aumento da aceleração centrífuga poderia levar a uma separação mais eficiente das fases de equilíbrio, no entanto a eficiência desta operação ainda estaria condicionada à concentração dos polímeros do sistema, não sendo possível uma separação completa. Sistemas com polissacarídeos de conformação molecular com elevada rigidez e alto peso

molecular (como a xantana a 10°C), muito cuidado deve ser dispensado na avaliação experimental, devido às discrepâncias observadas com a teoria do comportamento de fases. Tais discrepâncias normalmente estão relacionadas a uma incompleta separação entre os biopolímeros, que é atribuída à elevada viscosidade do sistema (Clark, 2000). A esse problema também se soma a dificuldade da medição de volume nas soluções concentradas de xantana.

A falta de ajuste dos pontos referentes a soluções diluídas poderia ser atribuída à lactose presente no IPS (interferência na análise de polissacarídeo) ou a uma ineficiente correção de turbidez de amostra na leitura de absorbância durante a análise do polissacarídeo. Uma vez que a análise de fenol sulfúrico é um método colorimétrico e sensível, que mede açúcares totais, quaisquer interferências seriam mais importantes nas soluções que correspondiam a amostras diluídas de xantana. Sendo assim, os erros embutidos nas análises levariam a problemas de ajuste dos dados.

Nesse caso seriam necessárias várias repetições de ensaios para a composição das linhas de amarração, porém devido ao elevado volume de análises químicas necessárias para a composição do diagrama e a grande demanda de tempo principalmente na determinação de proteínas, não foi possível essa verificação neste trabalho.

A determinação qualitativa da binodal de equilíbrio pode ser feita por algumas técnicas como a análise de turbidimetria (Antonov et al., 1977), ou pelo método conhecido como razão de volume de fases (Schorsch et al., 1999a). Esse último método também mostra dificuldades experimentais, pois a determinação exata dos volumes das fases em sistemas de alta viscosidade é bastante difícil.

3.3.4 - Agregação das proteínas do soro após o tratamento térmico

A caracterização dos polímeros de uma solução 5 % IPS formados após tratamento térmico de 80°C por 30 minutos foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 3.6).

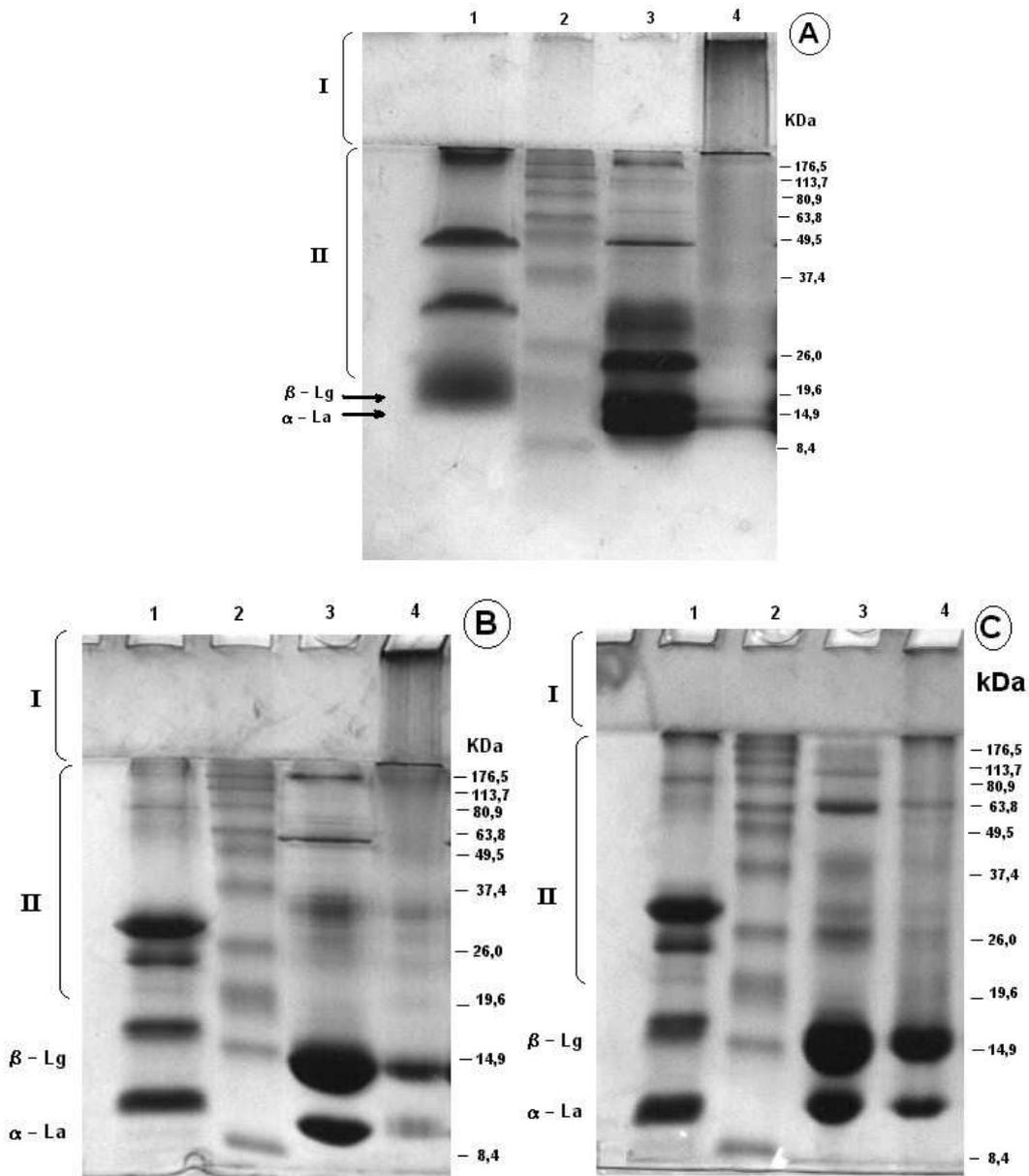


Figura 3.6: **(A)** Nativo PAGE, **(B)** Não redutor SDS-PAGE, **(C)** Redutor SDS-PAGE,. Coluna (1) mistura de frações puras de proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular. Coluna (2) marcador de peso molecular comercial, Coluna (3) solução de IPS 5% nativa. Coluna (4) solução de IPS 5% termicamente desnaturada em 80°C por 30 minutos.

Na Figura 3.6 a região demarcada com (I) corresponde ao gel de empacotamento e a inferior (II), ao gel de resolução.

Na análise do gel nativo-PAGE (Figura 3.6 **A**) observa-se que o tratamento térmico empregado levou à formação de um grande aglomerado protéico que não penetrou no gel 4% de poliacrilamida (região I, coluna 4), o que não ocorreu com a solução de IPS nativo (região I, coluna 3). A magnitude de peso molecular que é possível difundir em um gel de eletroforese depende do tamanho de poros formados pelo gel de acrilamida polimerizada, que é função da concentração de acrilamida usada na preparação. Sendo assim, para um gel de resolução com 4% de acrilamida, os agregados que não penetraram no gel nativo devem possuir um peso molecular superior a 200 kDa (Copeland, 1990).

Duas bandas de intensidade forte são observadas apenas para a solução nativa e que quase não aparecem na coluna correspondente à solução TD, na região em que o peso molecular está entre 8,4 e 19,6 kDa. Estas bandas corresponderiam à β -Lg e α -La, pois esta faixa de peso molecular inclui os valores de peso molecular de 18 kDa para β -Lg e 14 kDa para α -La.

Na região demarcada entre os pesos moleculares de 26,0 a 176,5 kDa (região II) observa-se um grande número de bandas na coluna de solução nativa de IPS, podendo corresponder a aglomerados de menor peso molecular das frações protéicas de IPS formados durante o processo de isolamento, podendo ainda ser outras frações protéicas do IPS e caseínas remanescentes no soro. Nessa mesma região II, nada se observa na coluna 4 indicando que grande parte das proteínas presentes no IPS estariam envolvidas na formação dos grandes aglomerados observados para a solução TD. Sendo assim, a solução crua ou nativa de IPS apresenta as proteínas e agregados individuais com pesos moleculares muito menores e possivelmente melhor distribuídos em solução do que os agregados formados pelo tratamento térmico, o que facilitaria sua interação com a xantana.

Em condições desnaturantes (SDS) e não redutoras (Figura 3.6 **B**), observa-se que apenas pequenas bandas referentes à β -Lg e α -La aparecem na amostra termicamente desnaturada (coluna 4). No topo do gel, observa-se uma grande banda de elevada intensidade para esta amostra e isso sugere que somente o SDS não foi suficiente para desestabilizar totalmente os agregados de IPS em unidades de menor tamanho, permanecendo ainda grande parte destes com peso molecular superior a 200 kDa como descrito no gel nativo.

Quando analisado sob condições desnaturantes (SDS) e redutoras (β -mercaptoetanol) ainda se observa uma pequena quantidade de agregados que não penetraram no gel sendo ainda visualizadas bandas de menor intensidade no limite entre o gel de empacotamento e o de resolução (Figura 3.6 **C**). Nesse caso, a quantidade de agente redutor utilizado no tampão poderia não ter sido suficiente para reduzir totalmente estes grandes agregados em unidade de menor tamanho.

No entanto, pode-se dizer que nessas condições mais drásticas, as bandas das soluções de IPS nativo e termicamente desnaturado são mais parecidas. A análise comparativa entre os géis nativo, não redutor e redutor, possibilitou avaliar o papel das interações moleculares na formação e estabilização dos agregados de IPS formados pelo tratamento térmico, mostrando o importante papel das pontes dissulfídicas, sendo esse aspecto discutido no Capítulo 4. Os resultados obtidos nesse trabalho são semelhantes aos apresentados em outros estudos de desnaturação e agregação das proteínas do soro devido ao tratamento térmico empregado na solução (Vardhanabhuti & Foegeding, 1999, Shimada & Cheftel, 1989, Li-Chan, 1983, Zhu & Damodaran, 1994, Morr & Foegeding, 1990).

A Figura 3.7 mostra mais claramente como as proteínas do soro estariam agregadas após o tratamento térmico. As moléculas das proteínas do IPS se agregariam de maneira ordenada na forma de “colar de contas” (Bryant & McClements, 1998). Através de microscopia eletrônica, Ju & Kilara (1998a), verificaram esta estrutura fina e filamentosa de agregados de proteínas do soro formados termicamente. Nesse caso, os agregados das proteínas do soro teriam

um volume efetivo muito maior que o volume inicial das proteínas individuais do sistema. Uma rede espacial poderia se formar com o aumento da concentração de IPS em solução, devido a um aumento na razão axial dos agregados em forma de filamentos, o que aumenta a viscosidade da solução podendo até levar à formação de géis (Bryant & McClements, 1998, Ju & Kilara, 1998b).

No trabalho de Vardhanabhuti & Foegeding (1999), em paralelo às eletroforeses também foram realizados ensaios de viscosidade intrínseca para a avaliação do volume hidrodinâmico de soluções 8% de IPS, mostrando que a viscosidade intrínseca aumentou de $5,04 \pm 0,2$ mL/g para $54,7 \pm 3,00$ mL/g em função da polimerização das proteínas decorrente do aquecimento das soluções. Estes resultados indicam que a polimerização térmica das proteínas do soro produz sistemas moleculares maiores e com forma menos esférica. Por outro lado, as moléculas de xantana possuem volume hidrodinâmico em torno de 7534 mL/g, que é muito superior ao dos agregados de IPS (Vardhanabhuti & Foegeding, 1999).

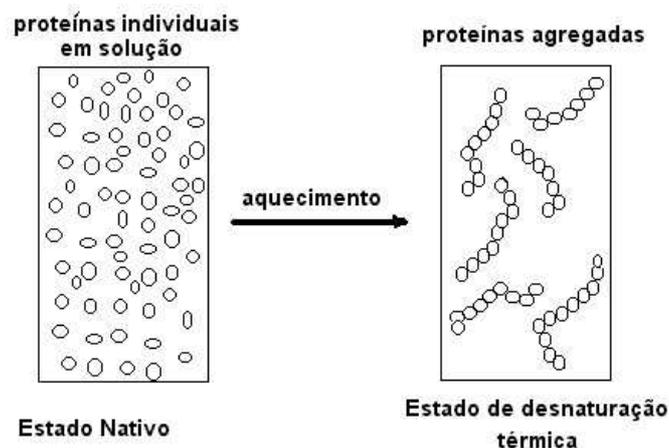


Figura 3.7: Desenvolvimento de uma estrutura filamentosa de maior peso molecular, através do aquecimento das proteínas do soro. Fonte (Bryant & McClements, 1998).

3.4 - Considerações termodinâmicas

A xantana e as proteínas do soro estão carregadas negativamente em pH 7,0 e sendo assim, deve haver uma apreciável repulsão eletrostática e baixa interação entre estas moléculas nestas condições (Bryant & McClements, 2000). Portanto, a energia livre de mistura entre o IPS e a xantana nas condições estudadas neste trabalho não estaria significativamente associada ao termo de contribuição entálpica.

O fato de não ter sido observada separação de fases entre misturas de IPS nativo e xantana, enquanto que uma separação de fases intensa se deu entre xantana e IPS-TD, sugere que a formação de agregados de IPS devido ao tratamento térmico, tem um impacto marcante na compatibilidade entre estes polímeros em solução. Assim, o mecanismo termodinâmico mais adequado para a descrição de uma mistura de IPS-TD e xantana no pH 7, seria um processo essencialmente entrópico definido como incompatibilidade termodinâmica ou segregação (Doublier et al., 2000).

As proteínas do soro no estado nativo possuem menor tamanho, conforme observado nos ensaios de eletroforese e, portanto, teriam maior mobilidade em solução, distribuindo-se ao acaso e elevando o estado de desordem do sistema. Dessa maneira, o termo de entropia de mistura das soluções de IPS nativo e xantana seria elevado, o que contribuiria negativamente na energia livre de mistura levando a um sistema compatível. A segregação entre polímeros muito grandes, como a xantana, e esferas coloidais relativamente pequenas, como as proteínas do soro, em seu estado nativo, seria possível com o aumento da concentração destes polímeros em solução. Nessas condições, o termo de entropia seria diminuído devido a uma maior organização molecular do sistema, resultado da organização das moléculas individuais nos espaços disponíveis em solução (De Kruif & Tuinier, 2001).

Os agregados de IPS, formados pelo tratamento térmico, possuem massa molecular e tamanho muito maiores levando a uma menor mobilidade destes

sistemas na solução que as proteínas nativas de IPS. Nesse caso, o termo de entropia de mistura fica sensivelmente reduzido devido a um aumento na organização molecular do sistema, levando à incompatibilidade entre IPS-TD e xantana. O aumento da concentração dos polímeros em solução também levaria a uma separação de fases, no entanto, a incompatibilidade entre os biopolímeros seria ainda maior quando as proteínas do soro estão desnaturadas e agregadas. No entanto, valores muito elevados de concentração de biopolímeros dificulta a separação de fases devido o aumento da viscosidade do sistema, ainda que sejam utilizadas altas velocidades de centrifugação a prolongados tempos.

As propriedades da xantana quando em solução também tem influência direta no comportamento de fases de misturas de xantana com proteínas. As propriedades da xantana em solução dependem de muitos fatores, como o lote de xantana utilizado, a concentração e a temperatura da solução.

Estudos físico-químicos demonstram a existência de uma transição “ordenada-desordenada” na estrutura da molécula de xantana em função da temperatura, força iônica e pH das soluções (Lee & Brant, 2002a, Lee & Brant, 2002b). Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de monitorar e compreender a conformação estrutural, tamanho e forma da xantana, e sua influência sobre a agregação com outros biopolímeros. De forma geral, a baixas temperaturas e reduzida concentração de sais, que é o caso deste trabalho, a xantana adotaria uma estrutura mais ordenada em forma de hélice, que levaria a molécula a um elevado estado de rigidez (Morris, 1995). Soluções de xantana também mostram uma transição isotrópica-anisotrópica dependendo da concentração, força iônica, peso molecular e temperatura da solução, mas de forma geral, apresentam uma distribuição molecular extremamente organizada.

Analisando um diagrama de fases que correlaciona a conformação da xantana com a temperatura e concentração em solução, verifica-se que a 10°C e em concentrações inferiores a 1%, a xantana apresenta uma conformação isotrópica (Lee & Brant, 2002c). Sendo assim, a distribuição da molécula de

xantana tende a ser extremamente ordenada e organizada uniformemente em solução. Desta forma, a elevada organização da xantana nas condições estudadas levaria a uma diminuição da entropia do sistema, contribuindo também para a separação de fases.

Estudos de propriedades reológicas demonstram que efeitos sinérgicos em géis de IPS e xantana são observados em baixas concentrações de xantana, enquanto o antagonismo é predominante a elevadas concentrações (Bryant & McClements, 2000, Sanchez, 1997). Nestes estudos, tais efeitos estariam relacionados com o tamanho das partículas formadas na interação entre moléculas de IPS e xantana, que levariam a uma separação de fases no sistema.

O tratamento térmico e a desnaturação das proteínas globulares, além da incompatibilidade termodinâmica com as gigantescas moléculas de xantana, também pode influenciar na natureza das interações proteína - proteína e proteína - xantana (Syrbe et al., 1998), porém estudos mais aprofundados seriam necessários para esclarecer esta hipótese.

Uma vez que no pH 7,0 as interações entre IPS e xantana seriam mais repulsivas, não havendo significativas interações eletrostáticas entre as moléculas, existe um efeito da competição por espaço em solução entre os agregados de IPS e as grandes moléculas de xantana relacionado com o volume de exclusão das moléculas.

O volume de exclusão tende a ser muito maior para moléculas grandes e não esféricas, como é o caso de polissacarídeos lineares e rígidos (Tolstoguzov, 2002). Deste modo pode-se dizer que a molécula de xantana possui um elevado volume de exclusão, considerando-se a sua forma rígida quando em solução a 10°C. A medida que a concentração dos biopolímeros aumenta, o volume de exclusão das moléculas tende ao seu volume real, levando a uma sobreposição do volumes de exclusão das moléculas individuais (Tolstoguzov, 1997).

Algumas características observadas no diagrama de fases apresentado na Figura 3.5 podem ser correlacionadas aos efeitos de volume de exclusão

(Tolstoguzov, 2000). Nessa figura pode ser observada uma grande região de incompatibilidade pra o IPS-TD e a xantana, e que as concentrações de polímeros que levam à separação de fases são muito menores para a xantana do que para o IPS-TD. Fica claro que tivesse sido possível traçar uma binodal no diagrama apresentado na Figura 3.5, esta estaria mais próxima do eixo de IPS. Segundo Tolstoguzov (2000), a binodal fica mais próxima do polímero de menor volume de exclusão, assim como o ponto crítico possui maior concentração deste polímero menor. No sistema estudado este polímero é o IPS-TD. A diferença entre os volumes de exclusão também determina a distribuição de água no sistema, sendo que o polímero de maior volume de exclusão possui maior afinidade com a água (Tolstoguzov, 1997). Isso confirma os resultados obtidos nas Tabelas 3.1 e 3.2.

3.5 - Conclusões

O tratamento térmico levou a uma agregação das proteínas do soro formando agregados de elevado peso molecular, o que foi determinante no comportamento de fases de soluções de IPS e xantana. As soluções de IPS-TD e xantana mostraram uma elevada incompatibilidade termodinâmica, cujo principal mecanismo seria a baixa entropia do sistema, devido à tendência de estado mais organizado quando as proteínas do soro são desnaturadas.

O tempo necessário para a separação de fases nos sistema xantana IPS-TD se deu em 6 horas para soluções diluídas de xantana e de 72 horas para as soluções concentradas.

O diagrama de fases mostrou a grande região de incompatibilidade entre o IPS-TD e xantana, sendo que pequenas quantidades do polissacarídeo promovem a separação de fases. No entanto, a falta de ajuste observada nos pontos que descrevem as fases de equilíbrio, estariam mais correlacionados a limitações experimentais na determinação de equilíbrio de fases para soluções altamente viscosas. Algumas propriedades do diagrama como a sua assimetria e a elevada afinidade da xantana com a água estariam correlacionados à diferença de volume

de exclusão entre as moléculas, sendo estes efeitos mais acentuados para as soluções diluídas.

Um estudo mais aprofundado seria necessário para determinar a influência do tamanho dos agregados na interação com a xantana através de ensaios de microscopia. Ensaios de “light scattering” ou de viscosidade intrínseca esclareceriam a conformação das moléculas no sistema principalmente com relação à xantana nas condições estudadas.

3.6 - Referências Bibliográficas:

ALVES, M. M.; ANTONOV, Y. A.; GONÇALVES, M. P. On the incompatibility of alkaline gelatin and locust bean gum in aqueous solution. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.13, p.77-80, 1999a.

ALVES, M. M.; ANTONOV, Y. A.; GONÇALVES, M. P. The effect of structural features of gelatin on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.13, p.157–166, 1999b.

ANTONOV, Y. A.; GRINBERG, V. Y.; TOLSTOGUZOV, V. B. Phase-equilibria in water-protein polysaccharide systems. Water-casein-neutral polysaccharide systems. **Colloid and Polymer Science**, Berlin, v.255, n.10, p.937-947, 1977.

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

BRYANT, C. M.; McCLEMENTS, D. J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.14, n.4, p.383-390, 2000.

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

CAPRON, I.; COSTEUX, S.; DJABOUROV, M. Water in emulsions: Phase separation and rheology of biopolymer solutions. **Rheologica Acta**, New York v.40, p.441-456, 2001.

CLARK, A. H. Direct analysis of experimental tie line data (two polymer-one solvent systems) using flory-huggins theory. **Carbohydrate Polymers**, Oxford v.42, n. 4, p.337-351, 2000.

COPELAND, R. A. Eletrophoretic and chromatographic methods for assessing protein purity. In: COPELAND R. A. **Methods for protein analysis: A practical guide to laboratory protocols**. New York: Chapman & Hall, 1990. p.59-91.

DE KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.15, n.4/6, p.555-563, 2001.

DICKINSON, E. Stability and reological implications of eletrostatic milk protein-polysaccharides interactions. **Food Science and Technology International**, Frederick, v.9, p.347-354, 1998.

DOUBLIER, J. L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, London, v.5, p.202-214, 2000.

GRINBERG, V. Y.; TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.11, n.2, p.145-158, 1997.

HODGE, J. R.; HOFREITER, B. T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WISTLER, R. L.; WOLFMOM, M. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press, 1962. v. 1, p.380-394.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Ca²⁺-induced gelation of whey protein isolate: Effects of pre-heating. **Food Research International**, Amsterdam, v.29, n.2, p.135-139, 1996.

JU, Z. Y.; KILARA, A. Effects of preheating on properties of aggregates and cold - set gels of whey protein isolate. **Jounal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, p.3604-3608, 1998a.

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

LEE, H. C.; BRANT, D. A. Rheology of concentrated isotropic and anisotropic xanthan solutions.1 - a rodlike low molecular weight sample. **Macromolecules**, Washington, v.35 n.6, p.2212-2222, 2002a.

LEE, H. C.; BRANT, D. A. Rheology of concentrated isotropic and anisotropic xanthan solutions. 2 - a semiflexible wormlike intermediate molecular weight sample. **Macromolecules**, Washington, v.35 n.6, p.2223-2234, 2002b.

LEE, H. C.; BRANT, D. A. Rheology of concentrated isotropic and anisotropic xanthan solutions. 3 - temperature dependence. **Biomacromolecules**, Washington, v.3 n.4, p.742-753, 2002c.

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

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

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

MORRIS, V. J. Bacterial polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.341-375.

SANCHEZ, C.; SCHMITT. C.; BABAK. V. G.; HARDY. J. Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration. **Nahrung-Food**, Berlin, v.41, n.6, 1997.

SCHIMIDT, R. H.; PACKARD, V. P.; MORRIS, H. D. Effect of processing on whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 67, p.2723-2733, 1984.

SCHORSCH, C.; CLARK, A. H.; JONES, M. G.; NORTON, I. T. Behavior of milk protein/polysaccharide systems in high sucrose. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Oxford v.12, p.317-329, 1999a.

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

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

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

SYRBE, A.; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, N. Polymer science concepts in dairy systems - an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, Oxford, v.8, n.3, p.179-193, 1998.

TOLSTOGUZOV, V. Some thermodynamics considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, Oxford, 2002, in press.

TOLSTOGUZOV, V. Compositions and phase diagrams for aqueous systems based on proteins and polysaccharides. **International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology**, San Diego, v. 192, p.3-31, 2000.

TOLSTOGUZOV, V. Thermodynamics aspects of dough formation and functionality. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.11, n.2, p.181-193, 1997.

VARDHANABHUTI, B.; FOEGEDING, E. A. Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, p.3649-3655, 1999.

ZHU, H.; DAMODARAN, S. Heat induced conformation changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.42, p.846-855, 1994.

CAPÍTULO 4

Viscosidade Extensional de Géis Ácidos de Isolado Protéico de Soro

RESUMO

O processo de gelificação a frio de soluções de Isolado Protéico de Soro 7% (peso soluto/ peso solvente) foi estudado pela técnica reológica conhecida como “Compressão Biaxial Imperfeita com Lubrificação” permitindo o cálculo dos parâmetros reológicos em regime de escoamento extensional. Os resultados mostraram que a técnica foi adequada na determinação de diferenças de consistência entre os géis estudados. Géis foram formados pelo aquecimento prévio das soluções a 80°C por 30 minutos sendo as soluções acidificadas pela adição de GDL em diferentes razões a 10°C. As soluções apresentaram estabilização de pH entre 3,36 e 5,63 a 48 horas de armazenamento a 10°C e os índices de comportamento em regime extensional variaram entre 0,19 e 0,43 enquanto que os índices de consistência extensional variaram entre 4127 e 131, indicando o carácter pseudoplástico destes géis. Os géis mais consistentes foram obtidos nos pHs 4,73 e 5,10. Interações dissulfídicas são responsáveis pela estabilização dos agregados no tratamento térmico e podem estar envolvidas no processo de gelificação, no entanto interações eletrostáticas seriam as principais envolvidas na interação entre os agregados protéicos durante a redução do pH.

4.1 - Introdução:

Tradicionalmente considerado como um subproduto da fabricação de queijos, o soro do leite tem se tornado extremamente atrativo como fonte de proteínas de excelentes qualidades funcionais e nutricionais para a indústria de alimentos. Devido a este elevado valor agregado, o soro atualmente é considerado o produto de interesse principal, com produtos com uma ampla faixa de

aplicações, o que é o caso dos isolados e concentrados protéicos (Bottomley et al., 1990).

As proteínas exercem papel fundamental na textura de muitos produtos alimentícios. O desempenho funcional das proteínas irá depender de suas características conformacionais, que podem ser alteradas com as condições de processo, como tratamento térmico empregado, pH do meio e alterações no ambiente iônico entre outros. Por outro lado, fatores intrínsecos também podem afetar as propriedades destes compostos como a composição de proteínas específicas, seqüência de aminoácidos, estruturas conformacionais nativas (secundárias e terciárias), caráter superficial das moléculas representado pelas interações hidrofílicas ou hidrofóbicas e distribuição de cargas (Sgarbieri, 1998).

As proteínas do soro formam géis quando submetidas a tratamento térmico e/ou modificações do pH em solução e inúmeros estudos tem sido realizados com o objetivo de avaliar as propriedades reológicas destes sistemas.(Verheul & Roefs, 1998, Vahdhanahuti & Foegeding, 1999, Puyol et al., 2001, Sagis et al., 2002).

As principais frações das proteínas do soro correspondem à α -Lactoalbumina e à β -Lactoglobulina sendo que a interação entre estas proteínas tem sido bastante estudada. Um efeito sinérgico entre estas duas proteínas sobre a consistência de géis de proteínas do soro foi observado quando estes foram induzidos por tratamento térmico em diferentes condições de força iônica e pH (3,0 a 7,5) (Rojas et al., 1997). As interações destas proteínas com alguns polissacarídeos utilizados em sistemas lácteos também têm recebido grande atenção (Eleya & Turgeon, 2000a, Eleya & Turgeon 2000b).

A acidificação de sistemas lácteos tem sido objeto de muitos estudos, sendo que vários trabalhos recentes tem feito uso do éster glucona- δ -lactona (GDL) cuja hidrólise em ácido glucônico resulta na redução lenta do pH (Lucey et al., 1997a; Lucey et al., 1997b) e nestas condições, o processo de acidificação é similar ao que ocorre com a utilização de culturas lácticas (Lucey & Singh, 1997).

O conhecimento da viscosidade extensional é essencial para o entendimento de algumas características de qualidade de produtos alimentícios (Steffe, 1996), como o grau de espalhabilidade e a percepção de textura na boca. Muitas operações unitárias da indústria de alimentos envolvem deformação extensional como, por exemplo, a saída de enchedeiras, agitação de produtos altamente viscoelásticos e extrusão. Além disso, a orientação molecular causada pelo estiramento devido ao escoamento extensional, juntamente com o cisalhamento, podem produzir comportamento e produtos únicos (Baroni et al., 1999). Assim, a viscosidade extensional deve estar relacionada com a natureza polimérica dos constituintes alimentícios e este parâmetro pode ser aplicado no desenvolvimento de novas formulações, controle de qualidade e desenvolvimento e modelagem de processos (Padmanabhan, 1995).

A técnica reológica de compressão biaxial imperfeita com lubrificação (CBIL), ou “imperfect lubricated squeezing flow” permite a análise de amostras de alimentos praticamente intactas por permitir a formação da amostra em um recipiente largo ou coletar a amostra diretamente da linha de produção no recipiente de análise (Campanella & Peleg, 2002). Esta técnica tem sido aplicada na análise dos mais diferentes produtos alimentícios de caráter semilíquido como ketchup e pasta de tomate (Lorenzo et al., 1997), maionese e mostardas (Hoffner et al., 1997), e ainda tem sido utilizada para o estudo de produtos com consistência tendendo à de um sólido como queijos fundidos (Campanella et al., 1987), doce de leite (Corradini & Peleg, 2000), e ricota (Suwonsichon & Peleg, 1999d).

A técnica reológica de compressão biaxial imperfeita com lubrificação também foi utilizada com o objetivo de identificar diferenças de textura entre amostras de maionese, pasta de tomate, iogurte e geléia de morango (Corradini et al., 2001). Neste trabalho foi verificada a correlação entre os resultados obtidos pela avaliação experimental e por análise sensorial, sendo que as diferenças detectadas na avaliação reológica, nem sempre foram detectadas pela análise humana.

A análise de produtos industrializados pela técnica de CBIL é relativamente vasta na literatura, porém não foram encontrados estudos que utilizam esta técnica para verificar as propriedades reológicas de sistemas modelo de proteínas, bem como a avaliação de suas interações específicas frente a tratamentos que levam a formação de estruturas complexas, como a desnaturação térmica e por pH. Em particular, sistemas modelo constituídos por proteínas do soro tem sido amplamente estudados por técnicas reológicas a baixas deformações em cisalhamento (Sagis et al., 2002, Puyol et al., 2001, Bryant & McClements, 2000, Verheul & Roefs, 1998).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento reológico de géis de isolado protéico de soro de leite, formados através da ação de tratamento térmico aplicado na solução anteriormente à acidificação induzida por GDL, utilizando a técnica de CBIL como ferramenta de análise.

4.2 - Considerações Teóricas sobre a técnica de CBIL

O comportamento reológico da maior parte dos fluidos alimentícios pode ser descrito por uma equação do tipo lei da potência:

$$\sigma = k \dot{\varepsilon}^n \quad \text{ou} \quad \eta = k \dot{\varepsilon}^{n-1} \quad (4.1)$$

onde σ é a tensão normal ou de cisalhamento, η é a viscosidade aparente, $\dot{\varepsilon}$ é a taxa de deformação, n é o índice de comportamento do fluido e k é o índice de consistência.

A força exercida por um fluido do tipo lei de potência comprimido entre placas paralelas de mesmo diâmetro e a uma taxa constante de deslocamento é dada por (Campanella & Peleg, 1987):

$$F(H) = \pi \left[R^2 k 3^{(n+1)/2} \right] (V/H)^n \quad (4.2)$$

onde F é a força temporal de compressão, H é a altura temporal de amostra, R é o raio da placa, V é a velocidade de deslocamento da placa na direção longitudinal e

n e k são as constantes reológicas do fluido lei da potência conforme definição para a equação (4.1). Assim, quando a relação entre a força e a altura de amostra é analisada em coordenadas logarítmicas, o resultado esperado é uma reta com inclinação $-n$. Uma vez determinado n , o valor de k pode ser calculado pela equação (4.2) (Suwonsichon & Peleg, 1999a, Suwonsichon & Peleg, 1999b, Suwonsichon & Peleg, 1999c).

Neste caso, quando o escoamento é do tipo lubrificado e o componente da força é apenas normal o cálculo da viscosidade extensional biaxial, η , é dado pela equação (4.3) como uma função da taxa de deformação (equação 4.4) (Suwonsichon & Peleg, 1999a).

$$\eta = 2F(H)H / \pi R^2 V \quad (4.3)$$

$$\dot{\varepsilon} = V / (2H) \quad (4.4)$$

Em um fluxo onde existe atrito, o que ocorre quando as placas utilizadas na compressão do fluido não são lubrificadas, a relação entre força e altura da amostra é dada pela equação de Scott sendo esta descrita pela equação (4.5) (Avila & Binding, 1982).

$$F(H) = \left[\frac{2\pi k R^{(n+3)}}{(n+3)} \right] \left[\frac{(2n+1)}{n} \right]^n \frac{V^n}{H^{2n+1}} \quad (4.5)$$

Assim, esta relação força altura representada em coordenadas logarítmicas terá como resultado uma reta com coeficiente angular $-(2n+1)$.

Quando não é possível estabelecer o comportamento reológico de uma amostra, a CBIL permite analisar a consistência do sistema em estudo estabelecendo-se uma comparação em termos de tensão aparente em uma deformação específica de 25, 50 ou 75% da altura inicial da amostra (equação 4.6).

$$\sigma_{@ 25\%,50\% \text{ ou } 75\%} = \frac{F_{@ 25\%,50\% \text{ ou } 75\%}}{\pi R^2} \quad (4.6)$$

Além disso, uma estimativa relativa da tensão residual também pode ser realizada em ensaios de compressão a uma taxa de deslocamento constante. Neste experimento a amostra é submetida a uma determinada deformação instantânea e posteriormente permite-se que a amostra relaxe a força de compressão durante um tempo de experimento. Um indicativo da tensão residual é a tensão residual aparente após um tempo de decaimento da força de compressão.

$$\sigma_{ap @ 150ou300s} = \frac{F_{ap @ 150ou300s}}{\pi R^2} \quad (4.7)$$

Na técnica CBIL, a força exercida por fluidos sem tensão residual decai até o valor da força de empuxo quase que instantaneamente. Quanto maior a tensão residual presente no fluido e quanto maior o “caráter” de sólido da estrutura, maior será a magnitude da força residual, ou tensão residual aparente após o tempo de relaxação. Este dado seria um parâmetro do “grau de rigidez” da amostra e seria um indicativo da tensão residual existente (Suwonsichon & Peleg, 1999a, Suwonsichon & Peleg, 1999b, Suwonsichon & Peleg, 1999c).

4.3 - Materiais e Métodos

4.3.1 - Materiais

O Isolado Protéico de Soro (IPS-LACTOPRODAN DI-9224) foi gentilmente cedido pela Arla Foods Ingredients (Dinamarca). O teor de proteína da amostra foi quantificado pelo método de Kjeldhal (AOAC, 1996), correspondendo a 81,64%±1,33 da amostra e o teor de lactose era de 0,08%±0,01 que foi determinado pelo método Fenol Sulfúrico (Hodge & Hofreiter, 1962). O teor de sódio, cálcio e potássio do IPS foi obtido em Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma com Acoplamento Induzido (ICP-OES) no Instituto de Química da UNICAMP. Os níveis de cálcio, sódio e potássio na amostra correspondem respectivamente à 541±49 mg/kg, 6343±251 mg/kg e 6530±2758 mg/kg.

O éster glucona- δ -lactona (GDL) foi adquirido da Sigma Aldrich-Corporation (St Louis - USA) Lot 21K0108.

4.3.2 - Tratamento térmico das proteínas do soro

Soluções de IPS 7% (peso soluto/peso solvente) foram preparadas pela dissolução do pó em água deionizada sob lenta agitação magnética por um período de 90 minutos. Em seguida a solução foi transferida para um tanque encamisado de aço inoxidável com circulação de água, onde foi feito o tratamento térmico. A solução foi aquecida a 80°C e a temperatura mantida por 30 minutos, permanecendo a solução sob lenta agitação mecânica para evitar a formação de espuma. Imediatamente após o término do tratamento térmico a solução foi rapidamente resfriada a aproximadamente 10°C com o auxílio de um banho de gelo.

4.3.3 - Acidificação e formação dos géis de proteínas do soro

Após o tratamento térmico e resfriamento da solução de IPS a 10°C, o éster glucona- δ -lactona (GDL) foi dissolvido imediatamente no sistema com o auxílio de um agitador mecânico, pois a hidrólise do GDL é sensível à temperatura.

Após a adição do GDL, as soluções foram cuidadosamente transferidas para placas de Petri de diâmetros correspondendo a 140 mm. Os géis foram formados com espessuras (altura de amostra) em torno de $5 \pm 1,5$ mm em ambiente climatizado a 10°C em um período de 48 horas. As placas foram vedadas com filme plástico para evitar efeitos de evaporação da amostra.

Na acidificação foram utilizadas diferentes razões de GDL em função da concentração de IPS em solução, $[R_{GDL} = \%GDL / \%IPS]$, e as razões necessárias para alcançar diferentes valores de pH de equilíbrio foram determinadas em ensaios prévios, correspondendo a: 0,05; 0,053; 0,084; 0,135; 0,186; 0,22; 0,35; 0,115 e 0,764. Também foi estudada uma solução sem adição de GDL, sendo que o pH medido era igual a 6,7. As medidas de pH foram realizadas em pHmetro Sentron 2001, Sentron Inc. – EUA.

4.3.4 - Ensaio Reológicos

Os géis de IPS formados nas placas de Petri foram comprimidos por placas de acrílico com diâmetros de 100 mm e altura de 6 mm, lubrificadas com óleo de silicone de baixa viscosidade. Todas as medidas foram feitas em equipamento TA.XT2i Texture Analyser (Micro Stable Systems, UK) com célula de carga de 25 kg. As amostras foram analisadas a 10°C, sendo submetidas à velocidade de compressão de 0,2mm/s até 75% de sua altura inicial. Após a compressão ao nível de 75% de deformação da altura inicial, a sonda foi parada e o decaimento da força de compressão foi analisada por um período de 300 segundos antes da retirada da sonda da amostra. Todas as medidas experimentais foram feitas em triplicata e o tempo total de ensaio foi de aproximadamente de 320 segundos. Os dados de força momentânea, altura momentânea de amostra e tempo de compressão foram importados e analisados no software MICROSOFT EXCEL 2000.

4.3.5 - Tratamento dos resultados

Os dados de força e altura foram utilizados nos cálculos da taxa de deformação biaxial segundo a equação (4.4) e a viscosidade extensional de acordo com a equação (4.3).

A relação força momentânea e altura de amostra foram analisadas em coordenadas lineares e logarítmicas, assim como a relação entre a viscosidade extensional e a taxa de deformação biaxial. A parte linear da relação logarítmica de força e altura de amostra foi considerada como representativa da região de fluxo extensional lubrificado dominante (Lorenzo et al., 1997, Hoffner et al., 1997), e sua inclinação foi determinada por regressão linear. A parte inicial da curva correspondente à região não linear da relação força-altura e o aumento da viscosidade extensional em função da taxa de deformação foram considerados como artefatos residuais referente aos efeitos de entrada e saída da sonda e, portanto foram descartados (Lorenzo et al., 1997).

As tensões aparentes a uma altura de amostra correspondente às deformações de 25, 50 e 75% foram calculadas de acordo com a equação (4.6) e foram utilizadas como uma medida semi-empírica de consistência dos géis. Os dados de decaimento da força foram utilizados para calcular a tensão residual aparente utilizando a equação (4.7) nos tempos de 25, 50, 150 e 300 segundos.

4.4 - Resultados e discussão

4.4.1 - Resultados

Dez grupos de amostras de soluções 7% de IPS (p/p) termicamente desnaturadas e gelificadas pela adição de GDL foram analisadas por CBIL. A amostra em que não foi adicionado GDL apresentou pH no valor de 6,7, correspondendo ao pH natural da amostra. As outras amostras apresentaram variação de pH entre 3,36 a 5,63, e quanto maior a quantidade de GDL adicionado, menor foi o valor de pH de equilíbrio.

Os dados típicos da relação entre a força de compressão e altura de amostra obtidos por CBIL são apresentados na Figura 4.1 para todas as soluções estudadas. As relações foram bastante reprodutíveis considerando a variação entre as amostras da mesma triplicata. A partir destes dados foi possível o cálculo dos parâmetros reológicos e seus respectivos desvios, que estão apresentados na Tabela 4.1.

A Figura 4.2 apresenta os valores da viscosidade extensional em relação à taxa de deformação, quando analisados em escala logarítmica, para a mesma região de escoamento.

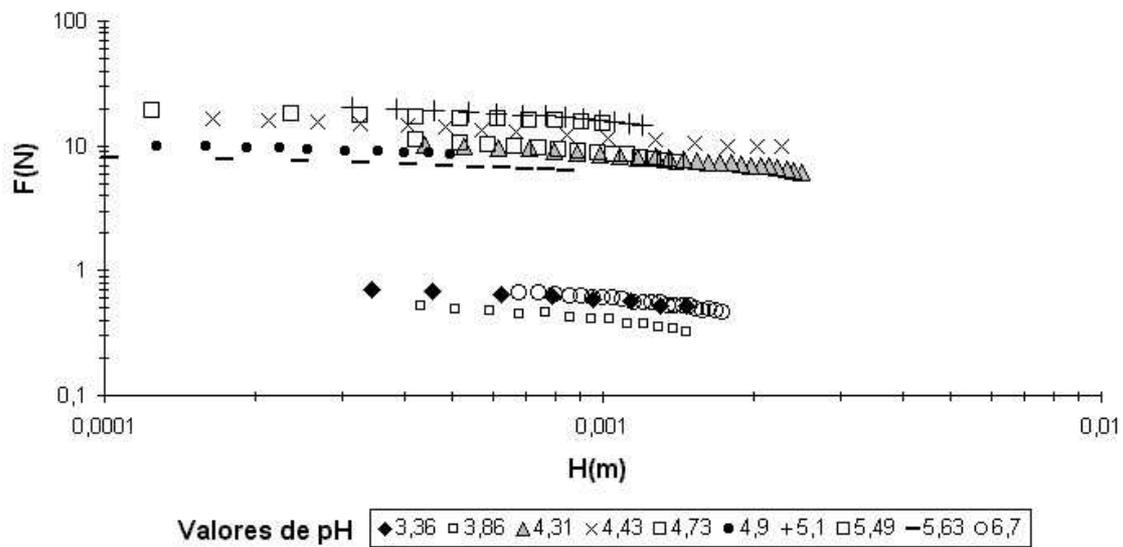


Figura 4.1: Relação entre a Força de compressão (N) a altura momentânea de amostra (m) durante ensaio de CBIL para géis ácidos de IPS obtidos em diferentes pHs.

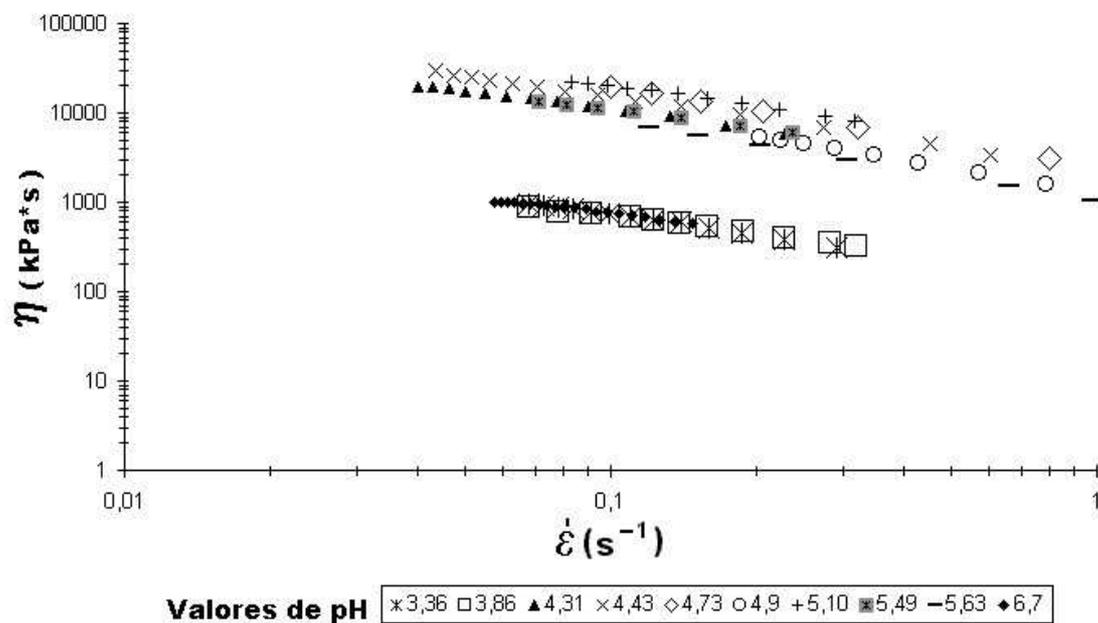


Figura 4.2: Relação entre a viscosidade extensional (kPa*s) e a taxa de deformação (s^{-1}) dos géis ácidos de IPS.

Nas Figuras 4.1 e 4.2 são visualizados dois grupos distintos de amostras, sendo que o primeiro grupo corresponde às amostras de pH 3,36, 3,86 e 6,7 com os menores valores de viscosidade extensional (entre 100 e 1000 kPa.s) e que, portanto, apresentam menor consistência. Isso pode ser atribuído à repulsão eletrostática entre as proteínas devido ao distanciamento do ponto isoelétrico. O outro grupo de amostras apresenta valores maiores de viscosidade extensional (entre 1000 e 30000 kPa.s) e correspondem às soluções com pHs entre 5,63 e 4,31. Estas amostras possuíam uma consistência firme semelhante a um gel, não se soltando do recipiente quando este era invertido. Na Tabela 4.1, estes dois grupos podem ser visualizados a partir do valor do índice de consistência, k . É interessante observar que, para todas as soluções, o aumento da taxa de deformação levou a uma diminuição nos valores de viscosidade extensional (valores de n inferiores a 1), o que é característico de comportamento pseudoplástico.

A Tabela 4.2 apresenta os valores de tensão residual calculados a partir da equação (4.7), após a compressão das amostras até a deformação de 75% da altura inicial. Pode ser observado que após 150 segundos de relaxação da força de compressão todas as amostras chegam a um equilíbrio na tensão residual, exceto para a amostra no pH 4,43 que ainda apresenta uma pequena diminuição de tensão no tempo de 300 segundos. Os valores de tensão residual foram bastante baixos em todos os casos, estando por volta de 0,1 kPa e não sendo influenciado pelo valor de pH.

A Tabela 4.3 apresenta os valores de tensão aparente instantânea para as amostras analisadas nas deformações de 25, 50 e 75% da altura inicial da amostra (equação 4.6). Em geral, o gel com maior tensão aparente foi o obtido a pH 4,73, sendo significativamente diferente dos demais sistemas estudados.

A viscosidade extensional dos géis estudados foi calculada pela equação (4.3) para as deformações de 25, 50 e 75% da altura inicial da amostra e estes dados são apresentados na Tabela 4.4, onde se observa os maiores valores de viscosidade para as amostras que tiveram consistência mais firme com a redução

do pH nos valores entre 5,63 e 4,31, enquanto que menores valores de viscosidade são observados para as amostras que não gelificaram, no pH 6,7 e abaixo de 4.

Tabela 4.1: Parâmetros reológicos de géis ácidos de IPS determinados por CBIL.

Amostra (R _{GDL})	PH	Coef. angular da Eq (2) ^{1*}	R ²	n ^{2*}	k ^{2*}	R ²
0,764	3,36	-0,23±0,01	0,91	0,23±0,01	134,72±10,95	0,99
0,35	3,89	-0,33±0,05	0,95	0,33±0,05	131,68±22,22	0,99
0,220	4,31	-0,30±0,01	0,98	0,33±0,06	2041,70±414,98	0,99
0,186	4,43	-0,33±0,11	0,96	0,33±0,11	4081,07±1877,08	0,99
0,135	4,73	-0,22±0,14	0,98	0,22±0,14	4127,24±1600,95	0,99
0,115	4,90	-0,19±0,07	0,98	0,19±0,07	1565,82±314,63	0,99
0,084	5,10	-0,27±0,11	0,97	0,27±0,11	4101,43±1708,49	0,99
0,053	5,49	-0,30±0,14	0,98	0,30±0,14	2390,33±276,06	0,99
0,05	5,63	-0,20±0,10	0,98	0,20±0,10	1259,49±240,65	0,99
0	6,70	-0,43±0,09	0,95	0,43±0,09	241,32±132,19	0,96

1* – Inclinação referente à parte linear da relação força de compressão (N) pela altura de amostra (m) em escala logarítmica (Figura 4.1). Estes dados correspondem aos valores de n obtidos a partir da equação (4.2).

2* - Os valores de n e k apresentados correspondem aos dados calculados a partir da equação (4.1).

Tabela 4.2: Tensões residuais (kPa) de géis ácidos de IPS após relaxação da força de compressão aplicada no sistema à velocidade de compressão 0,2mm/s.

Amostra (R_{GDL})	pH.	25 seg. (kPa)	50 seg. (kPa)	150 seg. (kPa)	300 seg. (kPa)
0,764	3,36	0,09±0,01	0,08±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00
0,35	3,89	0,08±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01
0,220	4,31	0,94±0,12	0,29±0,01	0,10±0,00	0,10±0,01
0,186	4,43	1,75±0,10	0,31±0,01	0,13±0,00	0,11±0,00
0,135	4,73	3,00±0,55	0,25±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01
0,115	4,90	0,20±0,00	0,07±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00
0,084	5,10	1,21±0,04	0,26±0,03	0,07±0,00	0,08±0,00
0,053	5,49	1,01±0,18	0,26±0,02	0,08±0,00	0,08±0,00
0,05	5,63	0,75±0,03	0,26±0,02	0,12±0,01	0,11±0,00
0	6,70	0,09±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00

Tabela 4.3: Tensões Aparentes (kPa) de géis ácidos de IPS para velocidade de compressão de 0,2mm/s.

Amostra (R _{GDL})	pH	Tensão Aparente 25% H ₀ (kPa)	Tensão Aparente 50 % H ₀ (kPa)	Tensão Aparente 75% H ₀ (kPa)
0,764	3,36	0,03±0,00 ^{a*}	0,06±0,00 ^a	0,10±0,00 ^a
0,35	3,89	0,03±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a	0,08±0,00 ^a
0,220	4,31	0,58±0,01 ^b	0,74±0,01 ^b	1,62±0,07 ^b
0,186	4,43	0,58±0,01 ^b	1,34±0,10 ^c	1,65±0,11 ^b
0,135	4,73	1,08±0,11 ^c	1,89±0,00 ^d	2,68±0,02 ^c
0,115	4,90	0,83±0,10 ^{bc}	0,92±0,03 ^b	1,26±0,12 ^d
0,084	5,10	1,26±0,19 ^{dc}	1,68±0,05 ^e	2,25±0,17 ^e
0,053	5,49	0,90±0,02 ^{bc}	0,87±0,08 ^{bf}	1,68±0,01 ^b
0,05	5,63	0,61±0,01 ^b	0,71±0,00 ^{bf}	1,06±0,00 ^d
0	6,70	0,03±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a	0,08±0,00 ^a

* - ANOVA - Teste de Tukey para diferenças significativas ao nível de 95% de confiança.

Tabela 4.4: Viscosidade Extensional Aparentes (kPa*s) de géis ácidos de IPS para velocidade de compressão 0,2mm/s.

Amostra (R _{GDL})	pH.	25% (H ₀) (kPa*s)	50 % (H ₀) (kPa*s)	75% (H ₀) (kPa*s)
0,764	3,36	1,15±0,14	1,02±0,20	0,005±0,00
0,35	3,89	0,90±0,02	0,78±0,05	0,006±0,00
0,220	4,31	24,64±0,56	14,32±1,33	0,06±0,01
0,186	4,43	21,80±5,21	26,48±0,09	0,07±0,01
0,135	4,73	34,39±0,73	32,17±0,39	0,13±0,00
0,115	4,90	14,60±1,94	10,57±1,04	0,12±0,01
0,084	5,10	30,03±4,46	24,44±1,36	0,05±0,01
0,053	5,49	30,17±0,28	14,56±1,84	0,08±0,00
0,05	5,63	23,33±1,80	12,30±0,67	0,08±0,00
0	6,70	0,93±0,19	0,80±0,14	0,008±0,00

A análise de consistência das amostras foi feita comparando-se os valores de tensão aparente em 25, 50 e 75% de deformação (Tabela 4.3). A diferença entre os valores obtidos foi verificada através do teste de Tukey aplicando-se uma análise de variância ANOVA, ao nível de confiança de 95%.

Na deformação de 25% da altura inicial de amostra verifica-se um grupo de géis semelhantes entre os pHs 4,73 e 5,49 com a consistência mais firme, seguido por um segundo grupo nos pHs estabilizados a 4,31, 4,43 e 5,63. Em seguida observa-se um terceiro grupo que correspondem às amostras líquidas nos pHs 3,36, 3,89 e 6,7.

A 50% de deformação visualiza-se uma maior distinção na consistência dos géis formados. A amostra mais firme correspondeu ao pH 4,73, seguido pelo pH 5,1 e logo após pelo pH 4,43. Em seguida observa-se um grupo de amostras com consistência similar correspondendo a 4,31, 4,9, 5,63 e 5,49 que é seguido pelas amostras líquidas (pH 3,36, 3,89 e 6,7).

A 75% de deformação, os géis nos pHs 4,73 e 5,1 são os mais firmes seguidos por 2 grupos distintos, sendo que o primeiro corresponde às amostras de pH 4,31, 4,43 e 5,63 e o segundo às amostras de pH 4,9 e 5,49. Posteriormente, como sistemas de menor consistência apresentam-se as amostras líquidas com o pH próximo ao neutro e abaixo de 4.

De maneira geral, fica evidente a semelhança de consistência entre as amostras de pH 3,36, 3,89 e 6,7 que não gelificaram. A semelhança entre elas também se demonstrou na Figura 2 e Tabela 4 conforme discutido anteriormente. Os géis mais fortes se formaram nos pH 4,73 e em seguida no pH 5,10.

4.4.2 - Discussão de resultados

4.4.2.1 - Caracterização dos géis e estimativa dos índices de comportamento e consistência por CBIL

Os dados apresentados na Figura 4.1 referem-se à região de escoamento em que se obteve o melhor ajuste linear e, portanto quando o escoamento é do tipo extensional. Esta região do escoamento corresponde aproximadamente às alturas de gel nas placas de Petri entre 0,4 e 0,1 mm para todas as amostras analisadas. Os dados descartados correspondem à região transiente em que se apresentam os efeitos de entrada e saída da sonda.

Os valores da inclinação das curvas apresentadas na Figura 4.1 são mostrados na Tabela 4.1 variando entre -0,43 e -0,19, sendo que os valores de R^2 relativos ao ajuste se apresentaram superiores a 0,91. Estes valores de coeficiente angular correspondem a índice de comportamento do fluido n entre 0,19 e 0,43 conforme equação (4.2), o que indica o caráter pseudoplástico dos fluidos analisados. Uma vez que o valor de n para um fluido pseudoplástico deve

ser menor que 1, ($0 < n < 1$), o coeficiente angular da relação $\log(F) \times \log(H)$ deve estar entre -1 e 0 para que o escoamento observado seja considerado do tipo lubrificado, o que se evidenciou nos resultados apresentados.

No entanto, se o valor de coeficiente angular obtido estivesse entre -3 e -1 , os valores de n indicados estariam entre 1 e 3 . Este fato poderia ser uma conseqüência de um possível atrito entre a superfície de compressão e a amostra e neste caso a equação (4.3) deveria ser utilizada para o cálculo de n . Em se tratando de um fluido certamente não Newtoniano, um coeficiente angular na relação $\log(F) \times \log(H)$ da ordem de -1 poderia ser o indício de um fluido com elevado grau de plasticidade ou que as equações (4.2) e (4.3) não seriam adequadas para o cálculo das propriedades reológicas devido a uma possível elevada tensão residual do sistema (Suwonsichon & Peleg, 1999b). Sendo assim, a análise da tensão residual aparente do sistema se tornaria muito importante antes de se traçar considerações finais sobre os parâmetros reológicos do sistema.

Os resultados das inclinações de reta na relação $\log(F) \times \log(H)$ para os géis de IPS não apresentaram a limitação descrita anteriormente, porém a validade do índice de consistência, k , se confirma com a análise dos valores de tensão residual do sistema.

Analisando os dados das tensões residuais obtidas para os diferentes géis a 300 segundos de relaxação da força de compressão (Tabela 4.2), verifica-se que o maior valor de tensão residual corresponde a $0,11$ kPa para os géis estabilizados nos pHs $4,43$ e $5,63$. Suwonsichon & Peleg (1999a) observaram para iogurte a 120 segundos de relaxação da força o equivalente a $2,09$ kPa de tensão residual. Nas mesmas condições de experimento foi verificada tensão residual aparente de $11,3$ kPa para creme de feijão (Suwonsichon & Peleg, 1999c), e $3,6$ kPa para ricota (Suwonsichon & Peleg, 1999d). Portanto a tensão residual para os géis estudados é muito baixa e pode ser desconsiderada no comportamento reológico desses sistemas. Isso indica a validade da utilização da

equação (4.2) na análise dos parâmetros reológicos e o cálculo do índice de consistência k , os quais se encontram apresentados na Tabela 4.1.

Os valores de n e k apresentados na Tabela 4.1 foram obtidos a partir da regressão linear dos dados de viscosidade extensional em relação à taxa de deformação em coordenadas logarítmicas, conforme apresentado na Figura 4.2 e ajustando os dados à relação de lei de potência da equação (4.1). Observa-se a concordância dos dados de n calculados desta maneira com a inclinação das retas apresentadas na Figura 4.1 e calculados pela equação (4.2).

4.4.2.2 - Viscosidade extensional e consistência dos géis de IPS

Em contraste ao índice de consistência k e índice de comportamento n , a viscosidade extensional ou elongacional é obtida diretamente da parte relevante da curva de escoamento experimental (Figura 4.1) sem a necessidade de ajuste de um modelo reológico constitutivo. Também deve ser ressaltado que a análise da viscosidade extensional é particularmente valiosa na avaliação da espalhabilidade de produtos de consistência intermediária como o requeijão (Baroni et al., 1999).

Além da viscosidade extensional, a Tabela 4.4 juntamente com os dados de tensão aparente da Tabela 4.3 também representam uma medida empírica da consistência dos diferentes géis analisados, sendo estes valores úteis na comparação entre as diferentes amostras.

Uma comparação entre os valores de viscosidade extensional a 50% de deformação e os valores do índice de consistência k , demonstram que estes parâmetros estão linearmente relacionados (Figura 4.3). A melhor correlação obtida se deu na deformação de 50% ($R^2 = 0,95$) visto que nesta faixa os valores obtidos foram calculados com os dados de força de compressão e altura de amostra dentro do intervalo no qual o escoamento extensional estava completamente desenvolvido (Figura 4.1).

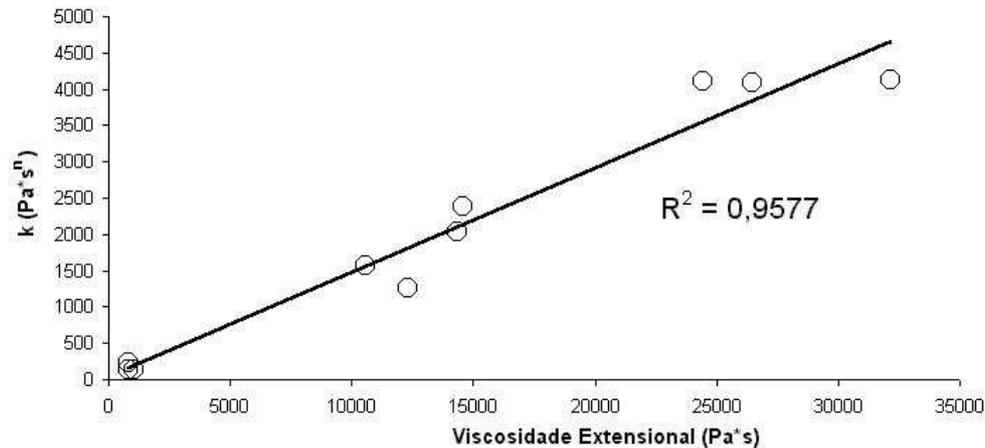


Figura 4.3: Correlação entre os valores de índice de consistência (k) e a viscosidade extensional determinada a 50% de deformação da altura de amostra para os géis ácidos de IPS.

Uma vez que o cálculo da viscosidade extensional, ao contrário do valor de k , não é baseado na validade de um modelo reológico, esta deve ser considerada como uma medida mais representativa da consistência das amostras a taxas de deformação específicas. No entanto, para garantir sua validade, as superfícies do sensor de medida foram adequadamente lubrificadas por um óleo de baixa viscosidade e a geometria de compressão era constituída por um material leve (acrílico) para garantir o escoamento do tipo lubrificado (Lorenzo et al., 1997).

4.4.2.3 - Agregação das proteínas do soro – Interações induzidas pelo pré-tratamento térmico e redução do pH.

As principais frações do soro, β -Lg e a α -La, são pequenas proteínas globulares, sendo as principais responsáveis pelas propriedades de soluções de IPS frente a diferentes tratamentos empregados nas soluções. Diversos estudos tem sido realizados para descrever os processos de interação envolvidos quando soluções isoladas destas proteínas, ou de isolados protéicos de soro são

aquecidas ou submetidas a processos de gelificação (Rojas et al., 1997, Vardhanabhuti, 1999).

O aquecimento rompe várias ligações intermoleculares que estabilizam a estrutura nativa destas proteínas. Acima de 60-65°C a β -Lg atravessa um processo de desnaturação, expondo seu grupo sulfidril (SH) livre que permanece incluso na estrutura globular da proteína, possibilitando interações dissulfídicas intermoleculares levando a processos de polimerização protéica (Prabakaran & Damodaram, 1997). O tamanho dos agregados formados por interações dissulfídicas de β -Lg frente ao tratamento térmico empregado, torna-se maior com o aumento da concentração desta proteína em solução quando aquecidas em pH neutro em temperaturas superiores a 65°C (Hoffmann & Van Mil, 1997), que foi o caso deste trabalho. Interações desta proteína com outros constituintes do soro tem sido constantemente investigadas e de maneira geral a α -La, apesar de se mostrar mais estável a tratamentos térmicos, tem papel fundamental na estabilização dos agregados formados (Gezimati et al., 1997, Havea et al., 2000).

Neste trabalho, após o resfriamento a 10°C da solução de IPS 7% (peso IPS/ peso água) não ocorreu a gelificação do sistema, e este permaneceu líquido mesmo em períodos superiores a 48 horas. O processo de gelificação ocorreu somente pela adição do GDL ao sistema. As interações entre as proteínas do soro e a caracterização dos polímeros frente ao tratamento térmico de 80°C por 30 minutos na solução de IPS na concentração de 7% foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida. A metodologia empregada nesta análise e as fotografias dos géis de eletroforese estão apresentadas na Figura 3.6 no capítulo 3.

Comparando o perfil de percolação das proteínas no gel nativo ou não dissociativo das soluções não aquecida com a aquecida, observa-se que as principais frações de proteína do soro (β -Lg, α -La e albumina sérica) praticamente desaparecem após o tratamento térmico e grandes agregados são visualizados no topo do gel (Figura 3.6 A). Isso indica que todas estas frações estão envolvidas na formação dos polímeros de IPS.

No gel SDS não-redutor (Figura 3.6B), em que as amostras são diluídas em tampão contendo SDS 10%, pequenas bandas de β -Lg e α -La entram no gel de resolução, mas agregados de elevado peso molecular ainda são visualizados no topo do gel. Este resultado indica que estes agregados seriam mantidos por interações hidrofóbicas.

Géis SDS-redutor (Figura 3.6 C) ou desnaturantes são preparados pela dissolução da amostras em tampão contendo SDS 10% e o agente redutor β -mercaptoetanol e sob estas condições é possível avaliar o papel das pontes dissulfídicas na estabilização dos agregados. Quando a amostra foi diluída neste tampão, o padrão de bandas para as soluções aquecidas e não aquecidas a 80°C por 30 minutos se tornou idêntico indicando que as pontes dissulfídicas foram quebradas pela ação do agente redutor. Estes resultados sugerem que as pontes dissulfídicas são as grandes responsáveis pela formação dos agregados de elevado peso molecular, devido ao tratamento térmico, e este resultado está de acordo ao estudo realizado por Vardhanabhuti & Foegeding (1999).

A concentração de proteínas do soro na solução pré-aquecida tem efeito direto na dureza e consistência dos géis formados pela posterior adição de GDL, assim como o tempo e a temperatura de aquecimento (Ju & Kilara, 1998a). Em soluções de IPS na concentração de 7%, pré-aquecidas a 80°C por 30 minutos, 90% das proteínas constituintes do IPS estariam envolvidas na formação dos agregados (Ju & Kilara, 1998a).

Sob condições lentas de acidificação, promovidas por pequenas quantidades de GDL e baixas temperaturas, pontes dissulfídicas entre os agregados poderiam estar sendo formadas por grupos SH ainda reativos na superfície dos agregados (Alting et al., 2000).

Em soluções de IPS contendo agregados protéicos formados termicamente, a formação de géis pode ocorrer pela adição de sais (Hongsprabhas & Barbut, 1996, Hongsprabhas & Barbut, 1997), ou pela acidificação do sistema posteriormente ao tratamento térmico. Neste caso, o processo é denominado de

“gelificação a frio” (Bryant & McClements, 1998). Os géis formados a frio possuem significativa diferença de textura quando comparados com os géis formados exclusivamente pelo tratamento térmico, mostrando textura do tipo homogênea e transparente. São mais fortes em valores de pH entre 4,0 e 6,0 e quebradiços em pHs mais baixos (Errington & Foegeding, 1998).

Os resultados deste trabalho mostraram que a aparência da solução de IPS após o tratamento térmico e resfriamento a 10°C correspondeu a uma solução amarelo escuro e transparente. Com a adição de GDL a redução do pH ocorreu pela hidrólise do GDL em ácido glucônico e a solução apresentou um aumento de turbidez à medida que maiores razões de GDL eram empregadas no sistema, correspondendo aos valores de pH entre 4,0 e 5,5. Visualmente os géis obtidos apresentaram-se opacos e amarelados na faixa de pH entre 6,7 a 5,5. Entre 5,5 e 4,5 mostraram-se opacos e esbranquiçados voltando a opacos e amarelados, retornando ao estado líquido no pH em torno de 3,5. Como descrito anteriormente, na faixa de pH entre 4,0 e 5,5, os géis apresentaram consistência firme, não se soltando do recipiente quando este era invertido.

O aumento de turbidez durante a acidificação de soluções de IPS está relacionado a uma maior agregação das proteínas no ponto isoelétrico da β -Lg, correspondendo ao pH 5,2 (Ju & Kilara, 1998b). A β -Lg corresponde a maior fração protéica do IPS e interações eletrostáticas entre as proteínas individuais ou agregados protéicos formados termicamente seriam mais fortes neste pH.

A avaliação dos resultados obtidos na análise dos géis ácidos de IPS por CBIL indica que os géis mais fortes, com maiores valores de tensão aparente, foram obtidos no pH de 4,73 e em seguida no pH de 5,1. No entanto um comportamento anômalo foi verificado no pH 4,9, onde ocorreu uma brusca redução na consistência do gel. Para uma maior compreensão deste fenômeno, estudos mais aprofundados seriam necessários utilizando outras técnicas.

Os géis de IPS formados pela ação de GDL e mais fortes no pH a 4,7 também foram observados por Ju & Kilara (1998b). Este resultado poderia ser

atribuído à proximidade do ponto isoelétrico da α -La no pH 4,73 gerando interações entre a α -La e os agregados formados no tratamento térmico, levando a formação de agregados mais fortes e estáveis. Maiores evidências deste resultado não foram encontradas em outros trabalhos científicos e, portanto, um estudo do perfil de solubilidade do IPS utilizado neste estudo em diferentes valores de pH seria necessário para uma maior compreensão deste fenômeno observado pelos resultados de CBIL.

Enquanto que o aumento da turbidez a partir do pH 5,5 reflete uma agregação contínua, a diminuição do pH a valores inferiores a 4,0 indicaria uma gradual desintegração dos agregados formados.

Alting et al., (2000) observaram um colapso nos géis de IPS quando altas quantidades de GDL são adicionados ao sistema. A medida que o pH era reduzido a valores menores que 4,0, o gel que havia se formado nos valores de pH entre 4,0 e 6,0 se solubilizava adquirindo o mesmo aspecto líquido anterior à acidificação. A resolubilização foi atribuída à repulsão entre os agregados protéicos de elevado peso molecular formados no tratamento térmico preliminar devido ao abaixamento do pH.

Ju & Kilara (1998b) e Alting et al. (2000) apresentam um esquema para explicar a gelificação a frio de IPS como um processo de duas etapas conforme apresentado na Figura 4.4. Primeiramente, o tratamento térmico levaria à formação de agregados de maior tamanho e massa do que as frações nativas de proteínas do soro. Estas frações seriam unidades reativas que poderiam reagir via interações eletrostáticas ou por pontes dissulfídicas formadas por grupos ainda reativos presentes na superfície dos agregados, levando a géis mais fortes (Alting et al., 2000).

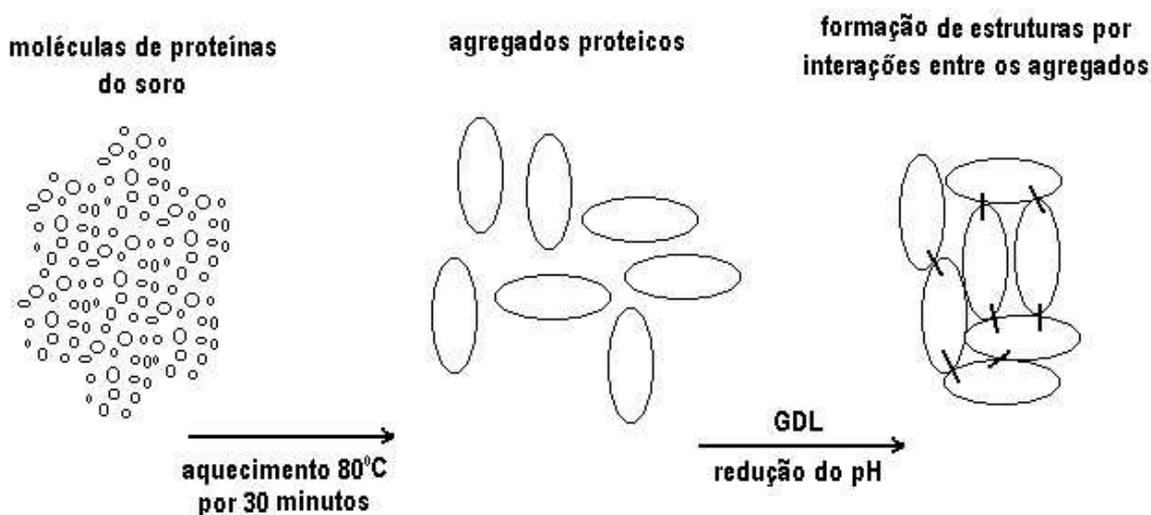


Figura 4.4: Representação esquemática do processo de gelificação a frio de proteínas do soro.

4.5 - Conclusão

A análise de compressão biaxial Imperfeita com lubrificação (CBIL) se mostrou adequada na determinação de diferenças de consistência entre os géis de isolado protéico de soro obtidos pelo tratamento térmico prévio de uma solução de IPS 7% (p/p) e subsequente adição de GDL. Os resultados obtidos demonstram que os géis estudados apresentam comportamento pseudoplástico quando submetidos a compressão uniaxial, sendo possível o cálculo de parâmetros reológicos extensionais. Também foi observado que a tensão residual mostrou valores praticamente desprezíveis.

A principal vantagem na utilização da técnica se refere principalmente à relativa simplicidade do experimento, à formação de um sistema intacto na própria geometria de análise, e devido a esta característica, as medidas experimentais podem ser mais representativas da consistência dos géis de IPS.

A lenta redução do pH, promovida por pequenas quantidades de GDL, poderia estar relacionada aos géis mais fortes e consistentes observados nos pHs de 4,7 e 5,1, onde interações específicas mais atrativas entre os agregados protéicos formados durante o tratamento térmico prévio levariam a formação de

uma estrutura mais forte. Interações dissulfídicas estariam envolvidas na estabilização destes agregados protéicos formados quando a solução de IPS 7% (p/p) foi aquecida a 80°C por 30 minutos (análise de eletroforese em gel de poliacrilamida - capítulo 3).

4.6 - Referências Bibliográficas:

ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, G. G.; VISSCHERS, R. W. Formation of disulfide bonds in acid-induced gels of preheated whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.10, p.5001-5007, 2000.

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

AVILA, F.; BINDING, D. M. Normal and reverse squeezing flow. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, Amsterdam, v.11, p.111-126, 1982.

BARONI, A. F.; CUNHA, R. L.; FREITAS, I. C.; HUBINGER, M. D.; MENEGALLI, F. C. Caracterização reológica de requeijão cremoso tradicional e com teor reduzido de gordura: Viscosidade extensional e em cisalhamento. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.1, p.21-29, 1999.

BOTTOMLEY, R. C.; EVANS, M. T. A.; PARKINSON, C. J. Whey proteins. In: HARRIS, P. **Food gels**. London: Elsevier Science, 1990. p.435-466.

BRYANT, C. M.; McCLEMENTS, D. J. Influence of NaCl and CaCl₂ on cold-set gelation of heat-denatured whey protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.5, p.801-804, 2000.

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

CAMPANELLA, O. H.; PELEG, M. Squeezing flow viscometry for nonelastic semiliquid foods - theory and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.42, n.3, p.241-264, 2002.

CAMPANELLA, O. H.; PELEG, M. Squeezing flow viscosimetry of peanut butter. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.1, p.180-184, 1987.

CAMPANELLA, O. H.; POPPLEWELL, L. M.; ROSENAU, J. R.; PELEG, M. Elongational viscosity measurements of melting american cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, p.1249-1251, 1987.

CORRADINI, M. G.; ENGEL, R.; PELEG, M. Sensory thresholds of consistency of semiliquid foods: Evaluation by squeezing flow viscometry. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v.32, n.2, p.143-154, 2001.

CORRADINI, M. G.; PELEG, M. Lubricated squeezing flow viscometry for dulce de leche (milk sweet). **Food Science and Technology International**, Gaithersburg, v.6, n.4, p.339-344, 2000.

ELEYA, M. M. O.; TURGEON, S. L. The effects of pH on the rheology of β -lactoglobulin/ κ -carrageenan mixed gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.14, n.3, p.245-251, 2000a.

ELEYA, M. M. O.; TURGEON, S. L. Rheology of κ -carrageenan and β -lactoglobulin mixed gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.14, n.1, p.29-40, 2000b.

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

GEZIMATI, J.; CREAMER, L. K.; SINGH, H. Heat-induced interactions and gelation of mixtures of β -lactoglobulin and α -lactoalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, p.1130-1136, 1997.

HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Formation of new proteins structures in heated mixtures of BSA and α -lactoalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, p.1548-1556, 2000.

HODGE, J. R.; HOFREITER, B. T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WISTLER, R. L.; WOLFMOM, M. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press, 1962. v. 1, p.380-394.

HOFFMANN, M. A. M.; VAN MIL, P. J. J. M. Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin: Role of the free thiol group and disulfide bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, p.2942-2948, 1997.

HOFFNER, B.; GERHARDS, C.; PELEG, M. Imperfect lubricated squeezing flow viscometry for foods. **Rheologica Acta**, New York, v.36, n.6, p.686-693, 1997.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Ca^{2+} -induced cold gelation of whey protein isolate: Effect of two-stage gelation. **Food Research International**, Amsterdam, v.30, n.7, p.523-527, 1997.

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

JU, Z. Y.; KILARA, A. Effects of pre-heating on properties of aggregates and cold-set gels of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, p.3604-3608, 1998a.

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

LORENZO, M. A.; GERHARDS, C.; PELEG, M. Imperfect squeezing flow viscosimetry of selected tomato products. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v.28, n.5, p.543-567, 1997.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: A review. **Food Research International**, Amsterdam, v.30, n.7, p.529-542, 1997.

LUCEY, J. A.; VAN VLIET, T.; GROLLE, K.; GEURTS, T.; WALSTRA, P. Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. **International Dairy Journal**, Oxford, v.7, n.6-7, p.389-397, 1997a.

LUCEY, J. A.; VAN VLIET, T.; GROLLE, K.; GEURTS, T.; WALSTRA, P. Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 1. Rheological properties. **International Dairy Journal**, Oxford, v.7, n.6-7, p.381-388, 1997b.

PADMANABHAN, R. Measurement of extensional viscosity of viscoelastic liquid foods. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.25, n.3, p.311-327, 1995.

PRABAKARAN, S.; DAMODARAM, S. Thermal unfolding of β -lactoglobulin: Characterization of initial unfolding events responsible for heat-induced aggregation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, p.4303-4308, 1997.

PUYOL, P.; PEREZ, M. D.; HORNE, D. S. Heat-induced gelation of whey protein isolates (WPI): Effect of NaCl and protein concentration. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.15, n.3, p.233-237, 2001.

ROJAS, S. A.; GOFF, H. D.; SENARATNE, V.; DALGLEISH, D. G.; FLORES, A. Gelation of commercial fractions of β -lactoglobulin and α -lactoalbumin. **International Dairy Journal**, Oxford, v.7, p.79-85, 1997.

SAGIS, L. M. C.; VEERMAN, C.; GANZEVLES, R.; RAMAEKERS, M.; BOLDER, S. G.; LINDEN, E. V. D. Mesoscopic structure and viscoelastic properties of β -lactoglobulin gels at low pH and low ionic strength. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.16, p.207-213, 2002.

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

STEFFE, J. F. Extensional flow. In: STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. East Lansing: Freeman Press, 1996. p.255-293.

SUWONSICHON, T.; PELEG, M. Rheological characterisation of almost intact and stirred yogurt by imperfect squeezing flow viscometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, W Sussex, v.79, n.6, p.911-921, 1999a.

SUWONSICHON, T.; PELEG, M. Imperfect squeezing flow viscometry of mustards with suspended particulates. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.39, p.217-226, 1999b.

SUWONSICHON, T.; PELEG, M. Imperfect squeezing flow viscosimetry for commercial refried beans. **Food Science and Technology International**, Frederick, v.5, n.2, p.159-166, 1999c.

SUWONSICHON, T.; PELEG, M. Rheological characterization of ricotta cheeses by imperfect squeezing flow viscometry. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v.30, n.1, p.89-103, 1999d.

VARDHANABHUTI, B.; FOEGEDING, E. A. Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, p.3649-3655, 1999.

VERHEUL, M.; ROEFS, S. Structure of particulate whey protein gels: Effect of NaCl concentration, pH, heating temperature, and protein composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n.12, p.4909-4916, 1998.

CAPÍTULO 5

Conclusões Gerais

Os resultados obtidos na análise de eletroforese demonstram que o aquecimento de soluções de isolado protéico de soro na temperatura de 80°C durante o tempo de 30 minutos levaram a uma desnaturação das proteínas com a agregação das unidades protéicas, produzindo polímeros com massa molecular muito superior à massa das unidades individuais quando a proteína se encontra em seu estado nativo. Estes polímeros possuiriam massa molecular maior que 200 kDa e interações dissulfídicas estão envolvidas na estabilização destes agregados protéicos.

Nossos resultados mostraram uma elevada incompatibilidade termodinâmica entre as soluções de proteínas do soro termicamente desnaturadas e a xantana com a separação ocorrendo após 72 horas, enquanto que soluções nativas de proteínas do soro e xantana são completamente compatíveis e homogêneas. Este fato leva a crer que o principal mecanismo envolvido nesta incompatibilidade seria a baixa entropia do sistema quando os agregados protéicos são produzidos pelo tratamento térmico e a conformação da xantana a baixas temperaturas.

O diagrama de fase obtido permitiu verificar a região de incompatibilidade, sendo necessárias pequenas quantidades de xantana para promover a separação de fases. Foi observada uma falta de correlação entre os dados de composição das fases de equilíbrio e sendo assim não foi possível determinar uma binodal que representasse a fronteira de separação destes sistemas, sendo este fato atribuído a limitações na técnica de ultracentrifugação para a separação das fases quando a viscosidade era muito elevada. Com relação às soluções diluídas, a falta de correlação entre os pontos de equilíbrio poderia ser atribuída a uma interferência da lactose na determinação de xantana ou a uma ineficiente correção de turbidez na leitura do espectrofotômetro.

A análise de compressão biaxial imperfeita com lubrificação (CBIL) se mostrou adequada na determinação de diferenças no comportamento reológico entre os géis de isolado protéico de soro obtidos pelo tratamento térmico prévio de uma solução de IPS 7% (p/p) e subsequente adição de glucona- δ -lactona (GDL).

Os géis de consistência mais firme foram obtidos nos sistemas em que os valores de pH se equilibraram em torno de 4,7 e 5,1 e isto poderia ser atribuído a interações específicas entre os agregados formados pelo tratamento térmico durante a redução lenta de pH. Neste intervalo de pH, estão os pontos isoelétricos da β -lactoglobulina e da α -lactoalbumina, as maiores frações protéicas do isolado protéico de soro do leite.

Sugestões para trabalhos futuros:

Para uma melhor compreensão dos processos discutidos neste trabalho, alguns aspectos devem ser considerados:

A) Capítulo 3:

- Análises em diferentes velocidades de rotação seriam adequadas para verificar a interferência da velocidade de centrifugação na separação de fases em sistemas de proteínas do soro e xantana, principalmente nas condições de elevada viscosidade das soluções.

- Uma vez que o tamanho dos agregados de proteínas do soro e o tamanho das moléculas de xantana têm fundamental importância nas características termodinâmicas destes sistemas, análises de viscosidade intrínseca e de conformação molecular por “light scattering” para a determinação do peso molecular da xantana e dos agregados de proteínas do soro seriam de fundamental importância na explicação dos resultados.

B) Capítulo 4:

- Análises mais detalhadas das características de solubilidade das proteínas do soro frente às modificações de pH, seriam necessárias para assim estabelecer uma correlação efetiva entre as propriedades reológicas medidas e a agregação destas proteínas.

- Análises reológicas em cisalhamento seriam interessantes para estabelecer um paralelo com as propriedades medidas em fluxo extensional.

- O efeito da taxa de acidificação nas propriedades dos géis formados poderia ser verificado com a utilização de outros agentes para promover uma acidificação mais rápida do sistema e assim estabelecer um paralelo com os resultados obtidos com a utilização de GDL.

- Estudos semelhantes com apenas frações isoladas dos constituintes do soro de leite poderiam ser realizados em paralelo, mantendo-se as mesmas condições experimentais, para melhor esclarecer a influência de cada constituinte no comportamento reológico das soluções de isolado protéico de soro.

