

JANAÍNA TELES DE FARIA

**CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E ESTRUTURAL DE GÉIS ÁCIDOS
DAS PROTEÍNAS α -LACTALBUMINA, β -LACTOGLOBULINA E
GLICOMACROPEPTÍDEO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de Magister
Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F224c
2011

Faria, Janaína Teles de, 1986-

Caracterização reológica e estrutural de géis ácidos das
proteínas α -lactalbumina, β -lactoglobulina e glicomacro-
peptídeo / Janaína Teles de Faria. – Viçosa, MG, 2011.
xx, 132f. : il. ; 29cm.

Orientador: Luis Antonio Minim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 115-132.

1. Soro de leite. 2. Leite - Proteínas. 3. Reologia.
4. Microscopia. 5. Colóides. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 641.371

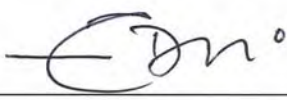
JANAÍNA TELES DE FARIA

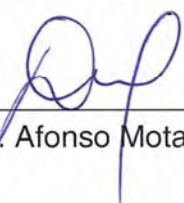
**CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E ESTRUTURAL DE GÉIS ÁCIDOS
DAS PROTEÍNAS α -LACTALBUMINA, β -LACTOGLOBULINA E
GLICOMACROPEPTÍDEO**

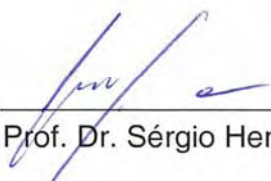
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de Magister
Scientiae.

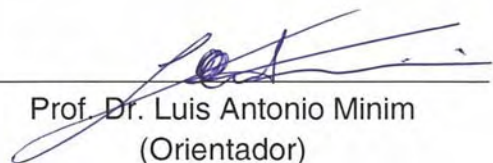
APROVADA: 18 de Fevereiro de 2011.



Prof. Dr. Valéria Paula Rodrigues
Minim
(Co-Orientadora)

Prof. Dr. Eduardo Basílio de Oliveira

Prof. Dr. Afonso Mota Ramos

Prof. Dr. Sérgio Henriques Saraiva

Prof. Dr. Luis Antonio Minim
(Orientador)

Aos que sempre me amam, acreditam e acima de tudo confiam em mim: meus amados pais, Antônio Ângelo e Janua Coeli, modelo e referência de vida, por todo amor, doação, carinho, apoio e orações. Vocês também são “responsáveis” por mais essa nossa conquista.

Dedico

“A satisfação reside no esforço, não no resultado obtido. O esforço total é a plena vitória.”

Mohandas Gandhi

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre iluminar minhas decisões e guiar meus passos. Pelos obstáculos vencidos e por todas as conquistas alcançadas.

Um agradecimento muito especial aos meus pais, Antônio Ângelo e Janua Coeli, por todo amor e dedicação, por terem possibilitado a conquista de mais este sonho, meu muito obrigada! Obrigada por mesmo distante estarem sempre tão presentes na minha vida, por fazerem da distância algo quase imperceptível, por acompanharem de perto cada passo neste caminho que escolhi. Se consegui chegar até aqui hoje, é graças a vocês. Obrigada, papai e mamãe! À minha irmã, Isabella, pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Minim, pela dedicada orientação. Obrigada pela confiança em mim depositada desde o tempo da iniciação científica, pelo apoio e acompanhamento científico durante a realização de todo o trabalho. Agradeço por despertar-me o gosto pela pesquisa. Registro minha admiração profissional e respeito por você, professor.

Ao Prof. Dr. Luis Henrique Mendes da Silva, pelas ideias e sugestões, pela atenção, colaboração, gentileza e disponibilidade.

À Profa. Dra. Valéria Paula Rodrigues Minim, pela gentileza, pela simpatia e valiosas contribuições para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Eduardo Basílio de Oliveira, Prof. Dr. Sergio Henriques Saraiva e Prof. Dr. Afonso Mota Ramos, que gentilmente aceitaram o convite de participar como membros da banca que avaliou este trabalho. Obrigada pela atenção, preciosas correções,

ensinamentos e sugestões valiosas que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sukarno Olavo Ferreira, pela preciosa ajuda nas análises de microscopia, por toda gentileza, boa vontade e paciência.

Ao querido amigo Prof. Dr. Fábio Coelho Sampaio, que me ensinou esse caminho, pela amizade sincera, por todos os ensinamentos partilhados, pelo apoio e incentivo constante, pelas palavras sábias. Aqui registro minha gratidão.

À minha madrinha Mariângela, pelo seu amor, carinho e amizade, pelas orações e torcida pela minha realização. Aos meus avós, por compreenderem minha ausência, pelas orações e preocupações, por todo carinho e amor. A toda minha família, em especial ao tio Zezé e à tia Zarife, obrigada pelo carinho, zelo e incentivo.

Ao meu grande e querido amigo Moysés. Sem palavras para agradecer tudo o que fez por mim: por toda amizade e companheirismo, por sempre me ajudar nas horas mais difíceis, pelos momentos de trabalho no laboratório, pelos conselhos, consolo e longas conversas. Obrigada pelo incondicional apoio e carinho, por estar sempre ao meu lado. Muito obrigada! Serei eternamente grata a você, meu amigo!

Ao Dinho querido, Yaro, pelo companheirismo e carinho, pela amizade, incentivo, otimismo e paciência quase inesgotável nos meus momentos de nervosismo e ansiedade. Obrigada por me buscar no laboratório tarde da noite, por escutar inúmeras vezes as narrações detalhistas dos meus problemas, por sempre acreditar em mim, “trabalhar meu psicológico” e constantemente me dizer que tudo daria certo. Muito obrigada, Dinho!

Ao casal de amigos queridos, Ivan e Simone, pela amizade sincera, companheirismo e ombro amigo, pelos incentivos e otimismo, por estarem sempre dispostos a me ajudar. Obrigada, meus queridos baianos!

Aos meus amigos tão especiais de BH, Bernardo (Ventura) e Bruno (Papa), pela amizade, carinho e por todas diversões e bons momentos em minhas idas para casa. Obrigada, meninos!

À Jussara, minha grande amiga, por dividir comigo todas as alegrias e angustias durante o mestrado. Obrigada pela amizade, carinho, companheirismo e valiosas ajudas em todas as horas que precisei.

Às amigas de longa data, Pricilla (Priul) e Thaís, que sempre estiveram comigo em coração, pela amizade e torcida, pelo incentivo e apoio. Obrigada!

Às minhas amigas de república, Rafinha e Paulinha, pela amizade, carinho, consideração e compreensão, pelos bons momentos, conversas e risadas. Obrigada, meninas!

Aos meus amigos do Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos, especialmente Ana Paula, Cecília, Rafael, Isabella, Vanelle, Priscila, Keko, Maycon, Vanessa, Lizzy, Léo, Roney, Rafael Fontam, Renata e Marcinha (que é praticamente do lab), pelo aprendizado constante, pela boa convivência, companhia e risadas, pelos auxílios constantes e amizade.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e seus funcionários, pela paciência e dedicação, muito obrigada!

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

Aos meus amigos da pós, pelos estudos, risadas e bons momentos que vivemos juntos.

E a todas as pessoas que sempre estiveram presentes em minha vida, que direta ou indiretamente, tornaram possível o cumprimento de mais esta etapa.

MUITO OBRIGADA!

Janaína

BIOGRAFIA

Janaína Teles de Faria, filha de Antônio Ângelo de Faria e Janua Coeli Terezinha Teles de Faria, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, no dia 29 do mês de janeiro de 1986.

Em março de 2004, iniciou o curso de graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, colando grau em janeiro de 2009. Em março do mesmo ano, ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa.

Em fevereiro de 2011, submeteu-se à defesa de dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xvi
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. GÉIS	4
3.1.1. GÉIS DE PROTEÍNAS.....	6
3.2. GELIFICAÇÃO	11
3.2.1. GELIFICAÇÃO FISICAMENTE INDUZIDA.....	11
3.2.2. GELIFICAÇÃO QUIMICAMENTE INDUZIDA	15
3.3. PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO.....	18
3.3.1. α -LACTALBUMINA (α -La)	21
3.3.2. β -LACTOGLOBULINA (β -Lg).....	23
3.3.3. GLICOMACROPEPTÍDEO	25
3.4. REOLOGIA.....	27
3.4.1. COMPORTAMENTO REOLÓGICO.....	27
3.4.2. PRINCIPAIS TESTES REOLÓGICOS.....	33
3.4.2.1. TESTES OSCILATÓRIOS	34
3.4.2.2. FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO (CREEP-RECOVERY)	39
3.4.2.3. TESTE DE RELAXAÇÃO DE TENSÃO	42
3.4.3. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DAS PROTEÍNAS DO SORO.....	43
3.5. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	45
3.6. DELINEAMENTO DE MISTURA.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1. MATERIAIS	51
4.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES PROTEICAS	51

4.3. CINÉTICA DE GELIFICAÇÃO	52
4.4. REOLOGIA.....	53
4.4.1. TESTE DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO.....	53
4.4.2. TESTES DE RELAXAÇÃO DE TENSÃO	54
4.5. MICROESTRUTURA.....	55
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1. CINÉTICA DE ACIDIFICAÇÃO	60
5.2. CINÉTICA DE GELIFICAÇÃO	62
5.3. ENSAIOS DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO	76
5.4. ENSAIOS DE RELAXAÇÃO DE TENSÃO	94
5.5. CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA... ..	99
6. CONCLUSÃO	115
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenvolvimento de géis particulados (a) e filamentosos (b). Fonte: adaptado de Bryant e McClements (1998).	13
Figura 2: Relação entre aparência do gel de proteína e modulação da repulsão eletrostática. Fonte: adaptado de Alting (2003).	14
Figura 3: Esquema do processo de gelificação a frio induzido por acidificação. Fonte: Cavallieri (2007).	16
Figura 4: Hidrólise do GDL a ácido glucônico. Fonte: Cavallieri (2007).	17
Figura 5: Representação esquemática da estrutura terciária da α -La. Fonte: Troullier, Reinstadler <i>et al.</i> (2000).	21
Figura 6: Representação esquemática da estrutura terciária de β -Lg. Fonte: Brownlow, Cabral <i>et al.</i> (1997).	24
Figura 7: Classificação do comportamento reológico de líquidos.	29
Figura 8: Representação do comportamento segundo o comportamento de Maxwell. Fonte: Monteiro (2004). Fonte: Monteiro (2004).	31
Figura 9: Representação do comportamento segundo o comportamento de Kelvin-Voigt. Fonte: Monteiro (2004).	32
Figura 10: Representação do comportamento segundo o comportamento de Burgers. Fonte: Monteiro (2004).	33
Figura 11: Representação esquemática de um experimento oscilatório em um sólido elástico Hookeano. τ = tensão de cisalhamento, γ = deformação e $\dot{\gamma}$ = taxa de deformação. Fonte: Silva (2006).	35
Figura 12: Representação esquemática de um experimento oscilatório em um líquido Newtoniano. τ = tensão de cisalhamento, γ = deformação e $\dot{\gamma}$ = taxa de deformação. Fonte: Silva (2006).	35
Figura 13: Teste oscilatório no modo de varredura de frequência.	38
Figura 14: Teste oscilatório no modo de varredura de frequência tempo.	39

Figura 15: Exemplo de curvas de fluência e recuperação para (a) um sólido elástico, (b) um líquido newtoniano e (c) um material viscoelástico. Fonte: Silva (2006).	40
Figura 16: Curva de fluência (<i>creep</i>) para um líquido viscoelástico. Fonte: Monteiro (2004).	41
Figura 17: Curvas de relaxação de tensão para um sólido elástico, um líquido viscoso, um líquido viscoelástico e um sólido viscoelástico. Fonte: adaptado de Steffe (1996).	43
Figura 18: Ilustração do princípio de funcionamento do MFA. Fonte: Herrmann <i>et al.</i> (1997).	47
Figura 19: Representação esquemática dos modos de operação: contato (a), não contato (b) e intermitente (c). Fonte: Ferreira e Yamanaka (2006).	48
Figura 20: Curva de decaimento de pH promovido pela adição de GDL (razão GDL/proteínas de 0,1) às soluções de proteínas desnaturadas correspondentes aos géis 1 [●]; 2 [○]; 3 [▼]; 4 [◇]; 5 [△]; 6 [■]; 7 [□] incubados a 25 °C.	61
Figura 21: Curva de cura isotérmica [G' — , G''] para o gel 1 (8% m/v β -Lg) incubado a 25°C.	63
Figura 22: Curvas de contorno do modelo referente à G'_∞	68
Figura 23: Curvas de contorno dos modelos referentes ao t_g (A) e pH_g (B).	74
Figura 24: Curvas de fluência e recuperação para os géis ácidos de proteína do soro: gel 1 (A); gel 2 (B); gel 3 (C); gel 4 (D); gel 5 (E); gel 6 (F); e gel 7 (G) incubados a 25°C por 4 h.	78
Figura 25: Curvas de contorno do modelo referentes a G_1	85
Figura 26: Curvas de contorno do modelo referentes a G_2	86
Figura 27: Curvas de contorno do modelo referentes a λ	86
Figura 28: Curvas de contorno do modelo referentes a μ_3	87
Figura 29: Curvas de contorno dos modelos referentes a γ_1 (A) e γ_2 (B).	93
Figura 30: Curvas de relaxação de tensão para os géis ácidos de proteína armazenados a 5°C por 3 dias: gel 1 (A), gel 4 (B), gel 5 (C) e gel 7 (D). .	95

- Figura 31:** Imagem de MFA para o gel 1. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). ...100
- Figura 32:** Imagem de MFA para o gel 2. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). ...102
- Figura 33:** Imagem de MFA para o gel 3. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). ...104
- Figura 34:** Imagem de MFA para o gel 4. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). ...106
- Figura 35:** Imagem de MFA para o gel 5. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). ...108
- Figura 36:** Imagem de MFA para o gel 6. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). ...110
- Figura 37:** Imagem de MFA para o gel 7. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). ...112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da composição aproximada do leite bovino e do soro.....	19
Tabela 2: Planejamento estatístico de mistura para as misturas compostas por β -Lg, α -La e GMP.	57
Tabela 3: Parâmetros de ajuste do modelo de cinética de acidificação obtidos para os diferentes géis.	62
Tabela 4: Parâmetros estimados pelo ajuste da equação 25 e valores de G' e G'' finais experimentais para os diferentes géis avaliados.	66
Tabela 5: ANOVA e coeficiente de determinação do ajuste do modelo para G'_{∞}	67
Tabela 6: Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p).	68
Tabela 7: Tempo de gelificação e pH de gelificação estimado pela equação 24 para os diferentes géis avaliados.	71
Tabela 8: ANOVA e coeficiente de determinação do ajuste dos modelos para t_g e pH_g	72
Tabela 9: Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para os modelos de t_g e pH_g	73
Tabela 10: Parâmetros do ajuste do modelo de Burgers simplificado $\left(\frac{\gamma}{\tau} = \frac{\gamma_1}{\tau} + \frac{\gamma_2}{\tau} + \frac{\gamma_3}{\tau} = \frac{1}{G_1} + \frac{t}{G_2(\lambda + t)} + \frac{1}{\mu_3} t \right)$ aos dados de fluência e recuperação.....	81
Tabela 11: ANOVA e coeficiente de determinação do ajuste dos modelos para G_1 , G_2 , λ e μ_3	83

Tabela 12: Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para os modelos de G_1 , G_2 , λ e μ_3	84
Tabela 13: Contribuições do perfil de deformação dos géis em teste de fluência e recuperação.	89
Tabela14: ANOVA e coeficiente de determinação do ajuste dos modelos para γ_1 e γ_2	91
Tabela 15: Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para os modelos de γ_1 e γ_2	92
Tabela 16: Parâmetros do modelo de Peleg ($\tau_0 \cdot t_0 - \tau t = k_1 + k_2 \cdot t$) para géis ácidos de proteínas de soro.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α -La	α -lactalbumina
β -Lg	β -lactoglobulina
R ²	coeficiente de determinação
cos	cosseno
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DQO	demanda química de oxigênio
FAO	Food and Agriculture Organization
GDL	glucona- δ -lactona
GMP	glicomacropéptido
GRAS	Generally Recognized As Safe
h	hora
m/m	massa/massa
m/v	massa/volume
μ m	micrometro
mm	milímetro
min	minuto
ppm	partícula por milhão
Pa	Pascal
pH _g	pH de gelificação
pI	ponto isoelétrico
kg	quilograma
s	segundo
sen	seno
tan	tangente
t _g	tempo (ou ponto) de gelificação
F	força

(N)

k	constante de força do material da lei de Newton	(kg.s ⁻²)
x	comprimento da deformação da lei de Newton	(m)
τ	tensão de cisalhamento	(Pa)
η	viscosidade	(Pa.s)
$\dot{\gamma}$	taxa de deformação	(s ⁻¹)
E_1	mola em série do modelo de Burgers	
E_2	mola em paralelo do modelo de Burgers	
V_2	amortecedor em paralelo do modelo de Burgers	
V_3	amortecedor em serie do modelo de Burgers	
f	frequência	(Hz)
ω	frequência angular	(rad.s ⁻¹)
G	módulo de cisalhamento	(Pa)
γ	deformação	
δ	ângulo de fase	(°)
G'	módulo elástico	(Pa)
G''	módulo viscoso	(Pa)
γ_1	deformação elástica instantânea	
γ_2	deformação elástica retardada	
γ_3	deformação viscosa	
γ_e	deformação elástica	
γ_v	deformação viscosa	
G_1	módulo de cisalhamento referente à mola E_1 (ou módulo elástico instantâneo) no modelo de Burgers	(Pa)
G_2	módulo de cisalhamento referente à mola E_2 (ou módulo elástico retardado) no modelo de Burgers	(Pa)
η_0	viscosidade de cisalhamento zero correspondente ao amortecedor V_3 no modelo de Burgers	(Pa.s)
λ	tempo de retardo do modelo de Burgers	(s)
η_2	viscosidade correspondente ao amortecedor V_2 no modelo de Burgers	(Pa.s)
μ_3	módulo viscoso do modelo de Burgers	(Pa.s)

x_i^*	pseudocomponente	
x_i	componente original	
L_i	limite do componente original	
k_1	constante do modelo de Peleg	(s)
k_2	constante do modelo de Peleg	
T_0	tensão máxima do modelo de Peleg	(Pa)
pH_0	pH no estado estacionário	
t	tempo do modelo de cinética de pH	(h)
k	taxa do processo de acidificação	(h ⁻¹)
C	constante de ajuste do modelo de cinética de acidificação	
t	tempo do modelo de cinética de gelificação	(s)
B	parâmetro empírico do modelo de cinética de gelificação	(s)
G'_∞	valor de G' no tempo infinito	(Pa)
x_1	proporções em pseudocomponentes de β -Lg	
x_2	proporções em pseudocomponentes de α -La	
x_3	proporções em pseudocomponentes de GMP	

RESUMO

FARIA, Janaína Teles de, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Caracterização reológica e estrutural de géis ácidos das proteínas α -lactalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropeptídeo.** Orientador: Luis Antonio Minim. Co-Orientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Valéria Paula Rodrigues Minim.

As características reológicas e morfológicas de géis de proteínas do soro acidificados com glucona- δ -lactona foram estudadas. Foi avaliado o efeito da composição proteica (concentrações de β -Lactoglobulina, α -Lactalbumina e Glicomacropeptídeo) nas propriedades de gelificação e reológicas utilizando o planejamento experimental de modelagem de mistura. Essas análises foram complementadas pela análise da morfologia das superfícies dos géis com microscopia de força atômica. Todas as misturas avaliadas gelificaram e, com exceção da mistura com maior proporção de GMP, formaram géis autossustentáveis. Géis compostos com menor proporção de β -Lg apresentaram menor módulo elástico. Maior proporção de α -La aumentou o tempo de gelificação da mistura e consequentemente diminuiu o pH de gelificação, enquanto maior proporção de GMP apresentou efeito contrário. Na análise do ensaio de fluência e recuperação, observou-se diminuição dos parâmetros do modelo simplificado de Burgers com o aumento da proporção de α -La e/ou GMP na mistura. A deformação total foi composta principalmente pela deformação elástica retardada e a deformação recuperável foi superior à irreversível. Verificou-se que o processo de relaxação de tensão foi mais pronunciado nas misturas com menor proporção de β -Lg. Misturas com maior proporção de GMP formaram géis com superfícies mais rugosas e com poros maiores, enquanto maior proporção de α -La resultou em efeito contrário. Com exceção dos géis constituídos puramente por β -Lg e da mistura binária β -

Lg/ α -La com maior proporção de α -La, foi observada a formação de géis particulados. Géis mistos foram estruturalmente mais frágeis, sendo a β -Lg a principal componente responsável pela estruturação e força da rede.

ABSTRACT

FARIA, Janaína Teles de, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Rheological and structure characterization of α -lactalbumin, β -lactoglobulin and glycomacropeptide acid gels.** Advisor: Luis Antonio Minim. Co-Advisors: Luis Henrique Mendes da Silva and Valéria Paula Rodrigues Minim.

The rheological and morphological characteristics of whey protein gels acidified with glucono- δ -lactone were studied. The effect of protein composition (β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin and glycomacropeptide concentration) on gelation and rheological properties, using a mixture experimental design, was evaluated. These analyses were complemented by surface morphology analysis of the gels by atomic force microscopy. All mixtures evaluated gelled and, except the highest GMP concentration gel, self supported gels were obtained. Gels made with low proportion of β -Lg presented lower elastic modulus. A higher proportion of α -La increased the gelling time of the mixture and consequently reduced the pH of gelation, while a higher proportion of GMP presented the opposite effect. In the creep-recovery test, there was a decrease of the modified Burgers model parameters with the increased of proportion of α -La and/or GMP in the mixture. The main strain was caused by the retarded elastic deformation. The reversible deformation was higher than irreversible deformation. It was also found that the process of stress relaxation was more pronounced in mixtures with lower proportion of β -Lg. Mixtures with higher proportion of GMP formed gels with rougher surfaces and larger pores, while a higher proportion of α -La resulted in opposite characteristics. With the exception of gels formed by β -

Lg and β -Lg/ α -La binary mixture with a higher proportion of α -La, micrographs of gels showed particulate networks. Mixed gels were structurally more fragile, and the β -Lg was the main component responsible for the structure and strength of the network.

1. INTRODUÇÃO

Soro de queijo é um co-produto muito abundante das indústrias de queijo e caseína. Verifica-se atualmente que o aumento da produção de leite tem sido canalizado, em sua maioria, para a produção de queijos, caseína e caseinatos e outros produtos de laticínios, resultando em um aumento concomitante do volume de soro produzido. As principais frações proteicas do soro são a β -lactoglobulina (β -Lg) com aproximadamente 50% do total das proteínas, a α -lactalbumina (α -La) com cerca de 20% e o glicomacropeptídeo (GMP) com aproximadamente 15%.

As proteínas do soro vêm sendo adicionadas a diversos alimentos, devido ao seu elevado valor nutritivo, seu *status* GRAS (Generally Recognized as Safe) e às suas importantes propriedades técnico-funcionais (espessantes, gelificantes, espumantes e emulsificantes). Dentre essas, a capacidade de formar géis tem sido muito estudada.

O estudo da propriedade gelificante das proteínas é importante para diversos segmentos industriais, em particular o setor alimentício. Neste, o entendimento do processo de gelificação possibilita o desenvolvimento de novos produtos e também a melhoria da textura e de outras características sensoriais de alimentos tradicionais.

Dos métodos de gelificação, a indução a quente é um dos métodos mais estudados em ciência de alimentos, principalmente por ser responsável pela estrutura presente na maioria dos alimentos do dia a dia. Porém, alternativamente, a gelificação de proteínas globulares a baixas temperaturas tem sido desenvolvida.

O processo de gelificação a frio tem algumas vantagens sobre os géis produzidos a quente, como a necessidade de concentrações menores dos biopolímeros empregados e a possibilidade de ser induzida no último estágio

de produção de um produto, ou mesmo no produto embalado/envasado. Diversas aplicações são encontradas para a utilização do método de gelificação a frio, dentre elas o encapsulamento de compostos sensíveis ao calor ou para mascarar sabor, o uso como agente espessante, a adição de ingredientes termolábeis, por exemplo, vitaminas; e o aumento da eficiência da absorção de ferro. Desta forma, ingredientes gelificantes a frio têm um potencial bastante significativo para novas aplicações, uma vez que não necessariamente necessitam de tratamento térmico para se tornarem funcionais.

Não há registro na literatura de nenhum estudo anterior que descreva o efeito da proporção das principais proteínas do soro de leite (β -Lg, α -La e GMP) sobre as características reológicas e estruturais de géis induzidos por acidificação pela adição de glucona- δ -lactona (GDL). Neste sentido, o propósito deste trabalho foi estudar as características reológicas e estruturais de géis obtidos pela acidificação a frio utilizando GDL, de misturas aquosas de β -Lg, α -La e GMP, contendo proporções variadas de cada uma destas três proteínas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar, por meio de análises reológicas e microscópicas, as características estruturais de géis obtidos por acidificação a frio de misturas compostas das principais proteínas (β -Lg, α -La e GMP) do soro de queijo doce, com diferentes proporções relativas destas três proteínas.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Estudar a cinética de gelificação das diferentes misturas proteicas usando ensaio reológico oscilatório, por meio de varredura de tempo à temperatura constante (cura isotérmica);
- ❖ Estudar as propriedades viscoelásticas dos diferentes géis por meio de testes reológicos de fluência e recuperação (*creep-recovery*);
- ❖ Estudar as propriedades viscoelásticas dos diferentes géis por meio de ensaios de relaxação de tensão (*stress relaxation*);
- ❖ Avaliar as características morfológicas dos géis por meio de microscopia de força atômica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A gelificação de proteínas é um processo importante para a obtenção de alimentos com propriedades sensoriais diferenciadas, especialmente a textura. É um fenômeno que exige energia suficiente para romper a estrutura nativa das proteínas, seguido por um processo de agregação com certo grau de ordenamento formado pela associação das proteínas desnaturadas. A gelificação de proteínas tem sido tradicionalmente realizada por aquecimento, mas outros processos físicos (alta pressão) ou químicos (acidificação, adição de sais ou uréia, e aplicação de enzimas) permitem produzir géis, de maneira análoga ao aquecimento. As características de cada tipo de gel são diferentes e dependem de fatores como concentração e composição proteica, grau de desnaturação causada pelo pH, temperatura, força iônica e/ou pressão (ALTING, 2003; RABIEY e BRITTEN, 2009).

3.1. GÉIS

Muitas definições de “gel” têm sido apresentadas na literatura. Historicamente o termo gel vem do latim *gelatus*, que quer dizer “congelado/imóvel” (KASAPIS e NORTON, 2009). Cerca de 50 anos atrás a definição dada a gel era de um sistema coloidal com características sólidas, cuja estrutura é formada por partículas coloidais com uma fase líquida nas regiões intersticiais (NEVES, 2008). Já no final do século XX, gel passou a ser descrito como um sólido viscoelástico, isto é, um sistema que se comporta como um líquido viscoso ou como um sólido elástico, dependendo das circunstâncias (HORNE, 2003). Segundo Ziegler e Foegeding (1990), gel é

definido como “uma rede contínua de dimensões macroscópica imersa em um meio líquido e que não exhibe escoamento em estado estacionário”, e de acordo com Wong (1989), como “a gelificação de moléculas desnaturadas com certo grau de ordem que resulta na formação de uma rede contínua”.

Em termos de constituintes químicos, os géis são compostos por duas substâncias: uma que na forma pura é líquida e apresenta, comparativamente, massa molecular pequena, e a outra, de massa molecular muito maior, presente em quantidade muito menor e que parte se encontra agrupada em uma rede tridimensional. É esse segundo componente o responsável pelas características elásticas dos géis (NEVES, 2008).

Em 1974, Flory classificou os géis em quatro categorias com base em critérios estruturais:

- (i) estruturas lamelares bem ordenadas;
- (ii) redes poliméricas covalentes completamente desordenadas;
- (iii) redes poliméricas formadas por meio de agregação física, predominantemente desordenadas, mas com algumas regiões ordenadas;
- (iv) géis particulados, com estruturas desordenadas (KASAPIS e NORTON, 2009).

Géis lácteos induzidos termicamente podem ser classificados nas categorias (ii) ou (iii), a depender dos tipos de ligações formadas, se covalente e/ou não covalente. Por outro lado, géis lácteos acidificados são formados por agrupamentos de partículas agregadas e, portanto, classificados no tipo (iv) (NEVES, 2008).

3.1.1. GÉIS DE PROTEÍNAS

Muitas proteínas globulares têm a habilidade de formar gel. É bem sabido que, sob condições apropriadas, proteínas nativas podem sofrer mudanças conformacionais associadas com o desdobramento parcial ou desnaturação que podem levar à agregação (EUSTON, UR-REHMAN *et al.*, 2007) e, acima da concentração crítica, à gelificação (BRYANT e MCCLEMENTS, 1998; ZIEGLER e FOEGEDING, 1990).

A gelificação das proteínas pode ser induzida por vários fatores físicos e químicos desde que, após uma alteração da sua estrutura nativa (desnaturação), se estabeleçam interações proteína-proteína que originem uma rede tridimensional. O aparecimento dessa rede é um acontecimento momentâneo e ocorre quando o número de interações proteína-proteína atinge um valor crítico. No momento da gelificação apenas alguns agregados proteicos estão incorporados na incipiente rede inicial. À medida que a gelificação prossegue, a fração não agregada diminui, aumentando o caráter sólido do gel, num processo denominado “cura” (CLARK, 1992).

A gelificação de proteínas tem grande importância na obtenção de propriedades de estruturas desejáveis. Uma rede proteica, assim como a estrutura terciária de polipeptídeos individuais, é geralmente formada por ligações cruzadas não covalentes tais como as interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas. Menos frequentemente, interações covalentes tais como ligações dissulfídicas são formadas. A contribuição relativa de cada tipo de interação para a formação da rede de um gel varia com as propriedades da proteína e com as condições do ambiente em que ela se encontra (SMITH, 1994).

A integridade física de um gel é mantida pelo balanço entre as forças de atração e repulsão entre as moléculas de proteínas. O mecanismo de gelificação é determinado por este balanço e pelas interações entre a proteína

e o solvente (MATSUMURA, CHANYONGVORAKUL *et al.*, 1996; ZAYAS, 1997; ZIEGLER e FOEGEDING, 1990).

As interações proteína-proteína e proteína-solvente são influenciadas por fatores que afetam a gelificação de proteínas, bem como o tipo e as propriedades dos géis formados. Estes fatores podem ser classificados como fatores intrínsecos (hidrofobicidade, interações eletrostáticas, ligações dissulfídicas, massa molar e composição aminoacídica) e extrínsecos (concentração da proteína, pH, temperatura, força iônica e tipo de íon, e pressão) (PHILLIPS, WHITEHEAD *et al.*, 1994).

1. Interações eletrostáticas. A carga elétrica residual das proteínas é responsável pelo aparecimento de forças atrativas e repulsivas, afetando as interações proteína-proteína e proteína-solvente (PHILLIPS, WHITEHEAD *et al.*, 1994). Estas interações eletrostáticas são promovidas por variações na concentração iônica e pH.

2. Ligações dissulfídicas. As ligações covalentes dissulfídicas entre cadeias de polipeptídios envolvidos na gelificação de proteínas aumenta a cadeia aparente do polipeptídio, ao invés de atuar como uma forma de estabilização inicial da rede (CLARK e LEE-TUFNELL, 1986). As ligações dissulfídicas não são essenciais para a formação do gel, mas sua função está relacionada com a habilidade de aumentar o tamanho médio e consequentemente, o comprimento da cadeia polipeptídica (WANG e DAMODARAN, 1990).

3. Massa molar. As variações na formação de uma rede que se autossustenta, ou seja, variação da força do gel pode estar relacionada com a massa molar média e o raio hidrodinâmico dos polipeptídios no gel. A massa molar crítica do polipeptídio para a formação do gel é cerca de 23.000 Da (WANG e DAMODARAN, 1990).

4. Composição aminoacídica. Segundo Shimada e Matsushita (1980), proteínas que contém menos de 31,5% de resíduos hidrofóbicos, tais como

valina, leucina, isoleucina, fenilalanina e triptofano formam géis tipo coágulos, enquanto que proteínas com conteúdo acima de 31,5% de resíduos hidrofóbicos formam géis transparentes.

5. Hidrofobicidade. Aminoácidos não polares são agrupados formando um núcleo hidrofóbico na cadeia polipeptídica, delimitado por uma camada de resíduos polares que interagem com a água, tendo um papel fundamental na organização da proteína (MEIROVITCH e SCHERAGA, 1980). Uma vez que resíduos de aminoácidos não polares têm a propensão de se posicionarem no interior da molécula proteica quando em solução, consequentemente evitando o contato com a água, somente uma parte deles deveria ser considerada como sendo efetiva na hidrofobicidade da molécula (KESHAVARZ e NAKAI, 1979).

Fatores extrínsecos que afetam as interações proteicas são aqueles relacionados com as condições do meio que as circunda, podendo ser relativamente controlados, de formas variadas, na tentativa de se obter uma boa formação do gel:

1. Concentração das proteínas. Interações cruzadas entre as macromoléculas, necessárias para a formação de gel, são proporcionais à concentração das proteínas. É necessário também que exista uma concentração mínima da própria proteína, abaixo da qual a estrutura tridimensional contínua não será formada. A força do gel e sua deformabilidade são altamente dependentes da concentração da proteína (HONGSPRABHAS e BARBUT, 1997a; b; SAMEJIMA, OKA *et al.*, 1986).

2. pH. A carga elétrica líquida da proteína em seu ponto isoelétrico (pI) é zero. Por outro lado, quanto mais distante as condições do meio forem de seu pI, mais carregada a proteína se torna e, consequentemente, maior será a repulsão eletrostática entre as moléculas, prevenindo que as interações requeridas para formação da matriz do gel sejam formadas (ZAYAS, 1997). Segundo Schmidt, Illingworth *et al.* (1978), a desnaturação de proteínas é altamente dependente do pH e a velocidade de desdobramento pode ser influenciada pelo pH de aquecimento. O ajuste de pH permite encontrar um

balanço entre as velocidades de desnaturação e de agregação, bem como entre forças de atração e de repulsão entre as proteínas (MANGINO, 1984).

3. Temperatura. A temperatura é um dos fatores mais importantes, uma vez que este parâmetro é responsável pela desnaturação proteica. Quando a temperatura de gelificação é alta, a primeira etapa de gelificação (desnaturação) ocorre mais rapidamente que a segunda etapa (agregação). Para uma dada taxa de desnaturação, a taxa de agregação é lenta se as forças atrativas entre as cadeias da proteína desnaturada forem pequenas, resultando em uma rede fina e um gel transparente. Consequentemente, o aumento da temperatura levará à formação de uma rede fina, uma vez que durante o resfriamento os peptídeos irão agregar de forma lenta e organizada para formar a rede do gel (POMERANZ, 1991).

4. Força iônica. A força iônica tem um grande efeito na absorção de água, inchamento e solubilidade das proteínas (BORDERÍAS e MONTERO, 1988). A força iônica, assim como o pH, pode alterar a distribuição das cargas elétricas entre as cadeias laterais das proteínas, causando aumento ou diminuição das interações proteína-proteína. Segundo Vojdani (1996), para proteínas globulares e algumas albuminas, a adição de sais neutros em concentração de 0,1 a 1 M, ou seja, condição de baixa força iônica, diminui as interações eletrostáticas entre as moléculas de proteínas, causando maior solvatação da proteína e aumento da solubilidade (efeito *salting-in*). Já em concentrações superiores a 1 M, ou seja, maior força iônica, tem-se um decréscimo da solubilidade proteica (efeito *salting-out*) devido ao aumento das interações hidrofóbicas e também pela competição entre a proteína e os íons salinos pela água. Na gelificação térmica conduzida sob baixa força iônica (ou valores de pH distante do ponto isoelétrico da proteína) a repulsão eletrostática impede a formação de agregados proteicos desordenados, favorecendo assim a formação de agregados ordenados, permitindo a passagem de luz pelo sistema e consequentemente os géis são mais transparentes. Ao contrário, quando o sistema é aquecido em alta força iônica (ou valor de pH correspondente ao pI da proteína), os agregados são formados

desordenadamente por interações físicas do tipo hidrofóbicas e de van der Waals, resultando na formação de géis particulados de aparência turva (CAVALLIERI, 2007).

5. **Pressão.** A pressão afeta a transição sol-gel das proteínas na solução. O volume da proteína nativa é modificado sob altas pressões, o qual é composto de três contribuições: o volume dos átomos constituintes (volume composicional), o volume das cavidades internas e a contribuição devido à solvatação. A estrutura nativa, que governa as atividades biológicas da proteína, resulta de um balanço entre as interações estabilizantes e desestabilizantes dentro da cadeia polipeptídica e com o solvente (BALNY e MASSON, 1993; SMITH, GALAZKA *et al.*, 2000). Mudanças no volume causadas pela pressão irão afetar estes balanços (SMITH, GALAZKA *et al.*, 2000).

6. **Tipo de sal.** Sais em geral podem influenciar a estrutura das moléculas de proteínas, bem como a natureza das interações proteína-água. Os sais influenciam a solubilidade da proteína e sua velocidade de desnaturação térmica. De acordo com Schmidt *et al.* (1978), géis formados com a adição de sal apresentam uma aparência mais agregada e opaca que aqueles formados sem sua adição. Segundo Foegeding, Bowland *et al.* (1995), o tipo e a quantidade de sal presente em dispersões de proteínas do soro e de β -Lg determinam o tipo de matriz formada nos géis termicamente induzidos. Estes autores reportaram que o aumento da concentração de sal altera a estrutura do gel de uma rede tridimensional constituída por “fiadas finas” (*fine-stranded*) para estruturas particuladas. A concentração requerida do sal para alterar a microestrutura do gel depende da posição deste na série de Hofmeister.

O Ca^{2+} é o mais importante componente mineral envolvido na agregação de proteínas do soro de leite (SCHMIDT e MORRIS, 1984). Em baixas concentrações, o Ca^{2+} pode aumentar a dureza de géis de concentrado proteico de soro através do aumento de ligações cruzadas entre as proteínas.

Ca^{2+} e outros cátions divalentes maximizam interações entre moléculas proteicas negativamente carregadas em pH maior ou igual ao pI e também melhoram a estabilidade e firmeza do gel (SCHMIDT e MORRIS, 1984).

3.2. GELIFICAÇÃO

Uma definição para o fenômeno de gelificação pode ser dada como uma agregação ordenada de moléculas desnaturadas resultando na formação de uma rede tridimensional contínua sólida capaz de aprisionar a fase dispersa líquida. É um fenômeno de transição de fases de polímeros de um estado líquido, com monômeros em um “sistema descontínuo”, para um *estado* gel, ou seja, um *estado* constituído por uma rede bem conectada (RAO, 2007). A transição sol-gel envolve a ligação das unidades estruturais básicas via ligações físicas e/ou químicas, resultando em uma rede contínua, levando à formação de uma estrutura com propriedades de sólidos. A gelificação é basicamente um processo realizado em dois estágios: desnaturação e subsequente agregação (MATSUMURA, CHANYONGVORAKUL *et al.*, 1996). Existem vários processos físicos e químicos pelos quais se pode induzir a gelificação. Estes processos são brevemente descritos nas seções a seguir.

3.2.1. GELIFICAÇÃO FISICAMENTE INDUZIDA

Gelificação induzida pelo calor: Este é o método de gelificação mais comumente estudado em ciência de alimentos, principalmente por ser responsável pela formação da estrutura em alimentos preparados sob altas temperaturas. A gelificação térmica é comumente vista como um processo de três etapas, que podem ser interligadas:

- (i) em primeiro lugar a proteína nativa se desdobra devido à aplicação de calor, expondo os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, favorecendo desta forma a construção de pré-agregados moleculares através de ligações dissulfídicas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e/ou ligações de van der Waals;
- (ii) a agregação tem prosseguimento com a associação dos pré-agregados de proteínas; e
- (iii) finalmente, quando a concentração é suficientemente alta, tem-se a formação de uma rede tridimensional capaz de aprisionar a água (LEFÈVRE e SUBIRADE, 2000).

Segundo este modelo, as proteínas passam progressivamente de um estado nativo para um estado de transição desnaturado e então para um estado agregado na forma de rede, formando um *estado sol*, que eventualmente pode atingir um estado rígido na forma de gel. É importante que a velocidade de ocorrência da segunda etapa seja mais lenta do que a primeira, para que a agregação das moléculas proteicas seja suficientemente ordenada para permitir a formação do gel (AGUILERA, 1995).

Durante o aquecimento, um aumento evidente da hidrofobicidade efetiva é um indicativo da desnaturação proteica e, quando um grande número de resíduos hidrofóbicos é exposto, a interação entre estes resíduos ocorrerá, causando a agregação das moléculas (NAKAI, 1983). Durante o resfriamento, as proteínas desnaturadas podem readquirir parcialmente sua conformação inicial, o que levaria a uma diminuição no número de sítios disponíveis para interações, impedindo a formação de uma rede autossustentável (DAMODARAN, 1988). Dependendo do valor de pH e da força iônica do meio, diferentes tipos de géis têm sido obtidos, variando de gel particulado turvo a gel transparente filamentosos. Estes tipos de géis são apresentados na Figura 1. Quando o valor de pH está distante do pI da proteína, esta fica carregada e, conseqüentemente, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteínas próximas previne a agregação. Nesse caso, as ligações intermoleculares devem ser formadas principalmente via interações hidrofóbicas atrativas,

levando à formação de agregados ordenados do tipo “colar de pérolas” ou estruturas filamentosas (BRYANT e MCCLEMENTS, 1998). Contrariamente, quando o pH está próximo do pI da proteína ou a repulsão eletrostática entre as proteínas carregadas está totalmente blindada, tem-se a formação de agregados, principalmente esféricos, que levam à formação de géis particulados (LEFÈVRE e SUBIRADE, 2000).

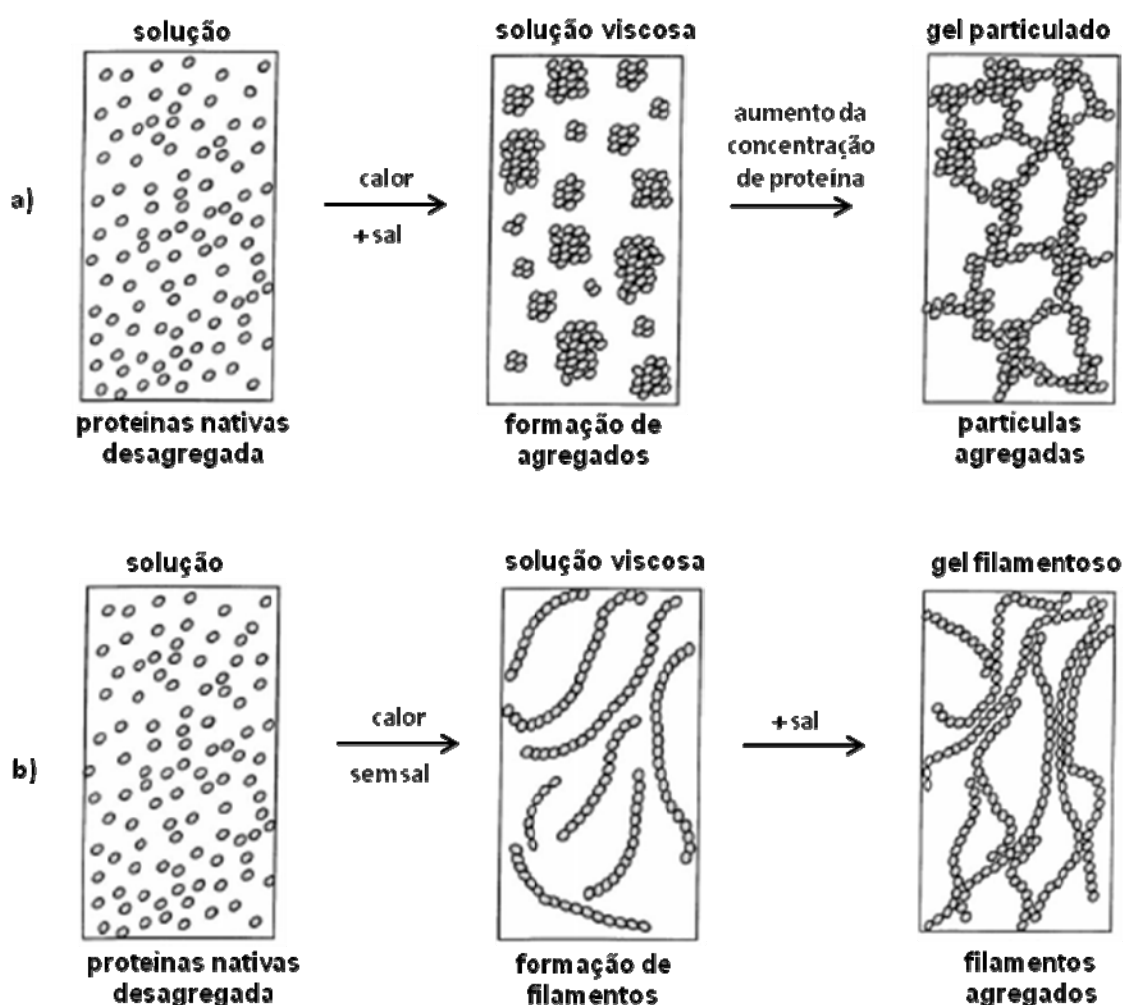


Figura 1: Desenvolvimento de géis particulados (a) e filamentosos (b). Fonte: adaptado de Bryant e McClements (1998).

A dependência da aparência do gel e a modulação da repulsão eletrostática a partir do valor de pH e força iônica são mostradas na Figura 2.

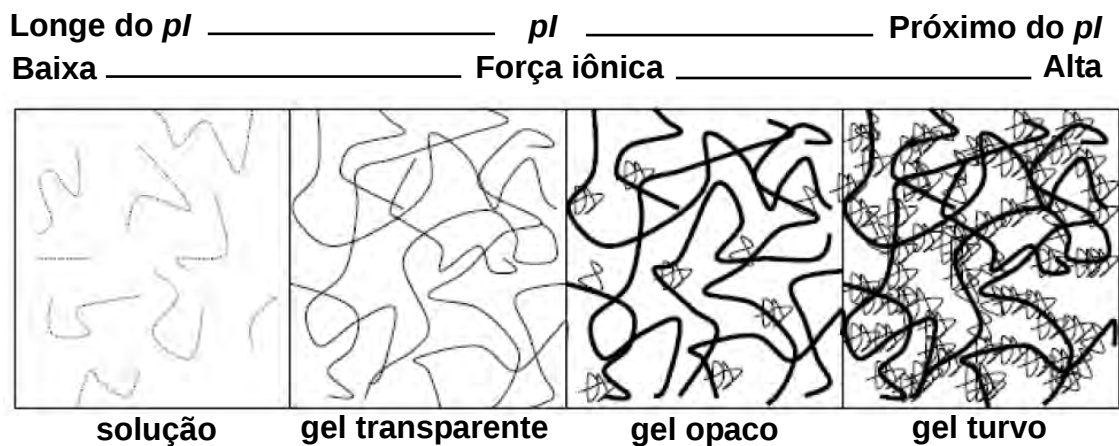


Figura 2: Relação entre aparência do gel de proteína e modulação da repulsão eletrostática. Fonte: adaptado de Alting (2003).

Uma ampla faixa de propriedades de textura também pode ser obtida em função do processo de gelificação e, em geral, géis produzidos sob aquecimento tendem a ser mais firmes e mais elásticos do que géis induzidos sob baixas temperaturas.

Gelificação induzida por alta pressão: Alta pressão causa mudanças conformacionais em proteínas levando à desnaturação e agregação, produzindo géis muito diferentes daqueles produzidos sob aquecimento (BALNY e MASSON, 1993; DUMOULIN, OZAWA *et al.*, 1998; SMITH, GALAZKA *et al.*, 2000). As estruturas formadas por este método envolvem principalmente ligações de hidrogênio, embora ligações dissulfídicas possam ocorrer (ANGSUPANICH, EDDE *et al.*, 1998). A gelificação induzida por alta pressão, assim como a indução por aquecimento, ocorre em uma única etapa, ou seja, sob as condições aplicadas, o processo de desnaturação da molécula de proteína e subsequente agregação para formação da rede ocorrem simultaneamente (ALTING, 2003). Géis formados sob condições de alta pressão são mais maleáveis e ao mesmo tempo resistentes à fratura, oferecendo meios para alteração da textura de alimentos (HOOVER, 1993).

3.2.2. GELIFICAÇÃO QUIMICAMENTE INDUZIDA

Gelificação induzida por adição de íons: A adição de íons na solução proteica aumenta a força iônica, diminuindo as forças repulsivas eletrostáticas de forma a ocorrer associações entre as proteínas, formando um gel autossustentável (MULVIHILL e KINSELLA, 1988).

Proteínas de soro de leite formam géis sem a etapa de aquecimento, apenas com a adição de cloreto de cálcio ou sódio, sendo que vários estudos têm sido conduzidos com estes sistemas na identificação dos efeitos do pré-aquecimento e concentração de sal, dentre outros (HONGSPRABHAS e BARBUT, 1997a; b; c; JU e KILARA, 1998a; b; ROFF e FOEGEDING, 1996).

Uma vez que a repulsão eletrostática impede as interações proteína-proteína, prevenindo a formação do gel, a adição de sal após a solução de proteínas termicamente desnaturadas ser resfriada bloqueia as cargas eletrostáticas, ocorrendo assim a formação do gel (MCCLEMENTS e KEOGH, 1995).

Gelificação induzida por acidificação: A gelificação induzida por acidificação é comum em alguns produtos. O abaixamento do pH leva à formação dos géis pela interação eletrostática entre os agregados formados no tratamento térmico, com consequente aumento nas propriedades de dureza do gel (CAVALLIERI, 2007), conforme pode ser visualizado na Figura 3.

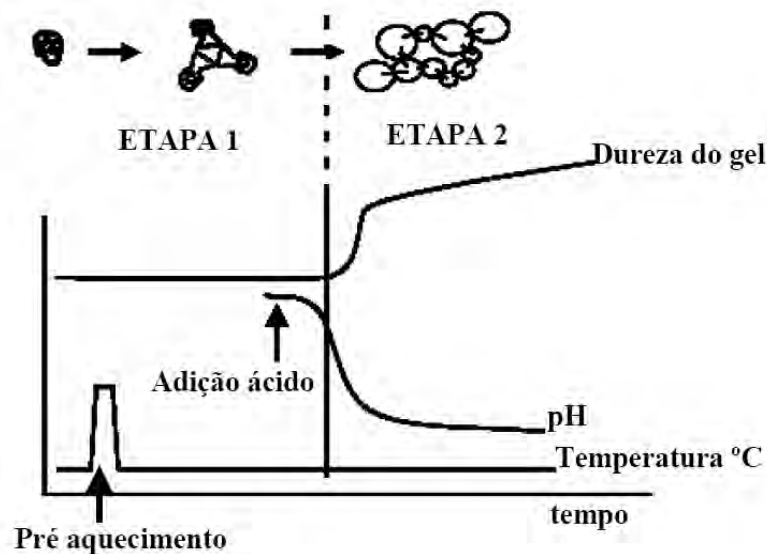


Figura 3: Esquema do processo de gelificação a frio induzido por acidificação. Fonte: Cavallieri (2007).

O pH final do sistema modula as propriedades mecânicas dos géis de proteínas de soro de leite obtidos pela gelificação a frio (ALTING, VAN DER MEULENA *et al.*, 2004). Géis acidificados até valores de pH próximos ao pI das proteínas do soro são mais rígidos (JU e KILARA, 1998a). A diminuição do pH faz com que as interações eletrostáticas entre os agregados proteicos predominem entre as interações moleculares associadas à manutenção da rede de géis de proteína do soro, porém as ligações dissulfídicas estão diretamente associadas à força da rede (ALTING, HAMER *et al.*, 2000).

O abaixamento do pH pode ser obtido através do uso de ácidos orgânicos, tais como acético, láctico, tartárico ou cítrico, ou de ácidos inorgânicos, como o clorídrico. O uso de acidulantes como a glucona- δ -lactona (GDL) é muito comum na produção de géis alimentícios, uma vez que esse cristal branco solúvel em água e levemente doce não é tóxico e é completamente metabolizado no organismo humano (DE KRUIF, 1997). Em meio aquoso a GDL se hidrolisa a ácido glucônico, reduzindo o pH (Figura 4).

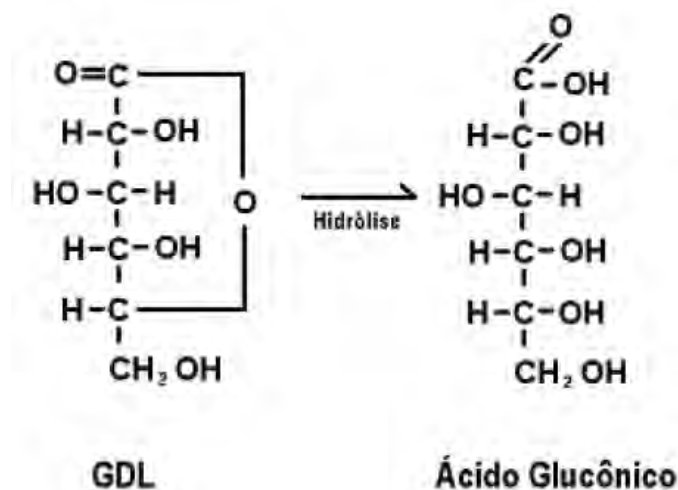


Figura 4: Hidrólise do GDL a ácido glucônico. Fonte: Cavallieri (2007).

Através do uso de GDL é possível realizar o controle do processo de agregação por meio do controle da taxa de acidificação do sistema, que é dependente da concentração de GDL e da temperatura. A taxa de acidificação determina as características de textura dos géis proteicos. Géis acidificados lentamente são mais estruturados e mais resistentes à compressão, ao passo que em condições intensas de acidificação, os géis são fracos e débeis (BRAGA, MENOSSI *et al.*, 2006).

Gelificação induzida por reação enzimática: Dois mecanismos bem conhecidos de gelificação de proteínas do leite induzida enzimaticamente são:

(i) a hidrólise catalisada por enzimas proteolíticas, como a gelificação de isolado proteico por proteases produzidas por *Bacillus licheniformis* (JU, OTTE *et al.*, 1997; OTTE, JU *et al.*, 1996);

(ii) a formação de ligações cruzadas entre as cadeias de proteínas frequentemente catalisada pela transglutaminase, enzima capaz de catalisar a reação de transferência acil, introduzindo ligações covalentes entre as proteínas (NIO, MOTOKI *et al.*, 1986; NONAKA, 1989).

Quando os ϵ -amino grupos dos resíduos de lisina atuam como receptores acil, são formadas ligações intra e intermoleculares do tipo $\epsilon(\gamma$ -glutamina)-lisina (FOLK e FINLAYSON, 1977). Assim, a transglutaminase catalisa a polimerização e gelificação de proteínas solúveis através da formação de ligações cruzadas covalentes intermoleculares (NIO, MOTOKI *et al.*, 1986). Para aplicações alimentícias, géis induzidos fisicamente por aquecimento ou alta pressão e quimicamente por reação enzimática têm sido preferidos, devido ao menor risco de formação de subprodutos tóxicos.

3.3. PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO

O soro de queijo é um coproduto abundante das indústrias de queijo e caseína. Em média, o volume mundial de soro está crescendo na mesma taxa do crescimento da produção de leite, ou seja, mais de 2% ao ano (FOOD_OUTLOOK, 2006). O aumento da produção de leite está sendo canalizado, em sua maioria, para a produção de queijos, caseína, caseinatos e outros produtos de laticínios, resultando em um aumento concomitante do volume de soro. Cerca de 9 a 11 kg de soro são produzidos por cada kg de queijo fabricado (MCINTOSH, ROYLE *et al.*, 1998).

Uma comparação da composição aproximada do leite bovino e do soro é apresentada na Tabela 1. Esta análise revela que 50% dos sólidos do leite estão presentes no soro, sendo essencialmente 100% da lactose e aproximadamente 20% das proteínas. A lactose se apresenta numa proporção aproximada de 75% do total de sólidos do soro e contribui em grande parte para o alto potencial poluidor do soro (DBO > 35.000 ppm; DQO > 60.000 ppm), considerado um dos maiores poluentes gerados pela indústria alimentícia (BULLERMAN e BERRY, 1966; SISO, 1996). Enquanto que o potencial poluidor do soro é bem conhecido, ele representa uma excelente fonte de proteínas e peptídeos funcionais, lipídios, vitaminas, minerais e

lactose. As proteínas e os peptídeos, e suas propriedades funcionais e nutricionais, têm ajudado a transformar o soro de um material frequentemente rejeitado em um efluente contendo uma multiplicidade de componentes disponíveis para utilização na agroindústria, biotecnologia, medicina e mercados relacionados (SMITHERS, 2008).

Tabela 1: Comparação da composição aproximada do leite bovino e do soro.

Componentes	Conteúdo (% m/m)	
	Leite	Soro
Caseína	2,8	<0,1
Proteína do soro	0,7	0,7
α -La (20%)		
β -Lg (50%)		
GMP (15%)		
Outras (15%)		
Gorduras	3,7	0,1
Cinzas	0,7	0,5
Lactose	4,9	4,9
Sólidos totais	12,8	6,3

Fonte: Zadow (1996), Smithers (2008).

Restrições ambientais em relação à disposição do soro têm incentivado estudos mais aprofundados sobre o conhecimento das propriedades dos componentes do soro, notadamente suas proteínas e peptídeos. Enquanto a qualidade nutricional (fonte de energia e perfil de aminoácido), as propriedades funcionais (gelificação, formação de espuma, capacidade de retenção de água, etc.) e as funcionalidades fisiológicas das proteínas do soro têm sido

reconhecidas já há algum tempo, vários fatores têm limitado o uso mais difundido de suas proteínas como ingredientes. Dentre estes fatores incluem:

- (i) conhecimento limitado das propriedades tecnológicas dos componentes do soro;
- (ii) base restrita de aplicações, dado que o soro e suas proteínas têm sido vistas somente como ingredientes de baixo valor;
- (iii) desempenho imprevisível e inconsistente em sistemas alimentícios, principalmente na área de funcionalidades tecnológicas; e (iv) falta de tecnologias industriais viáveis de baixo custo para isolamento e purificação (SMITHERS, 2008).

As proteínas do soro têm, no seu conjunto, um perfil de aminoácidos próximo ao padrão de necessidade recomendado pela FAO e apresentam boa digestibilidade, o que faz com seu valor biológico seja alto quando comparadas a outras proteínas alimentares (EGGUM, 1991). De todas as proteínas alimentares, as do soro apresentam a maior concentração em aminoácidos de cadeia ramificada, considerados importantes para indivíduos ativos e atletas, uma vez que esses aminoácidos são importantes constituintes das proteínas musculares. A alta biodisponibilidade de seus aminoácidos faz das proteínas do soro uma opção preferível como ingrediente em alimentos (MUDGAL, 2009; TORRES, 2005).

Num período mais recente, as proteínas de soro de leite têm sido utilizadas não só como ingredientes em alimentos, devido às suas propriedades funcionais, mas também para o encapsulamento e proteção de materiais sensíveis, para a produção de hidrogéis pH-sensíveis para liberação controlada de drogas biologicamente ativas, etc (GUNASEKARAN, KO *et al.*, 2007; GUNASEKARAN, XIAO *et al.*, 2006).

3.3.1. α -LACTALBUMINA (α -La)

A α -La é uma proteína cujo percentual corresponde a aproximadamente 15 a 25% em massa da quantidade de proteínas presentes no soro de leite bovino (aproximadamente 3,5% do total de proteínas do leite). É a principal proteína do leite humano e biologicamente desenvolve um importante papel na biossíntese da lactose. É uma proteína globular pequena e compacta, cuja massa molar é de $14.176 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e tem seu pI no pH 4,2 (FOX e MCSWEENEY, 1998; MORR e HA, 1993). A α -La possui, em sua estrutura primária, 123 resíduos de aminoácidos, sendo o triptofano o mais abundante, aproximadamente 6%. Possui quatro pontes dissulfídicas e nenhum grupo tiol livre em sua estrutura (SCHOKKER, SINGH *et al.*, 2000). Sua estrutura secundária altamente ordenada é composta por 26% de α -hélice, 14% de β -folha e 60% de estrutura casualizada. Sua estrutura terciária esférica é estabilizada por ligações dissulfídicas (LOURENÇO, 2000) (Figura 5).

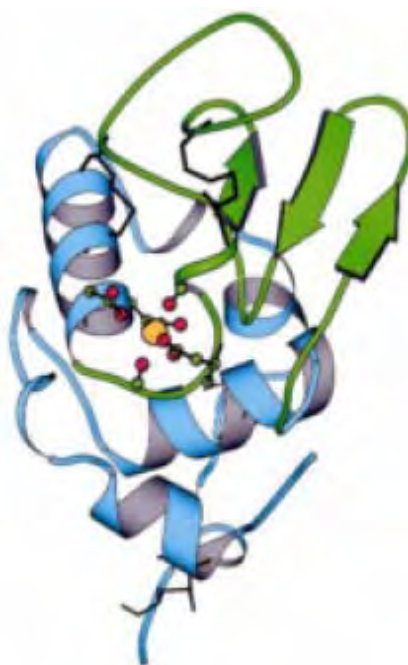


Figura 5: Representação esquemática da estrutura terciária da α -La. Fonte: Troullier, Reinstadler *et al.* (2000).

A partir da α -La são obtidos peptídeos que contêm triptofano, precursores da serotonina, uma substância que regula a vigília e o sono (ZADOW, 1996). É apropriada para a preparação e fortificação nutricional de alimentos (SISO, 1996).

No pH natural do leite (pH 6,6), e acima deste valor, a α -La aparece na forma de monômero. Em pH abaixo de seu pI, a proteína tende a formar associações (SGARBIERI, 1996). Evidências indicam que a α -La é susceptível à desnaturação térmica quando submetida a temperaturas a partir de 65°C em pH 6,7, sofrendo renaturação de 80 a 90% após o resfriamento (MORR e HA, 1993). À temperatura ambiente e na ausência de cálcio, a estrutura terciária da α -La está parcialmente desdobrada e os grupos hidrofóbicos do interior da proteína se tornam acessíveis ao meio externo. É uma proteína com forte afinidade com Ca^{2+} e outros cátions que, em maior ou menor grau, modulam sua estrutura, estabilidade e função. Quando na presença de cálcio, a proteína recupera seu estado nativo e seu interior hidrofóbico se torna inacessível ao meio externo (NOPPE, HAEZEBROUCK *et al.*, 1999).

Markus, Olivier *et al.* (2002) demonstraram que uma dieta contendo proteínas do soro enriquecidas em α -La como fonte proteica alterou a razão plasmática de (triptofano)/(outros aminoácidos neutros), que modula a atividade serotoninérgica cerebral. Esta ação promove a melhoria do humor e o aumento das capacidades cognitivas em humanos vulneráveis ao stress. Além disto, a α -La é considerada um suplemento valioso em formulações infantis, devido à sua alta concentração de aminoácidos essenciais, considerados um fator crítico na nutrição de recém-nascido. Seu alto teor de cisteína também é importante para estimulação do sistema imune e promoção da cicatrização de feridas (HEINE, KLEIN *et al.*, 1991). Na forma de monômero, a proteína apresenta atividades bactericida e antitumoral (SVENSSON, HÅKANSSON *et al.*, 2000).

3.3.2. β -LACTOGLOBULINA (β -Lg)

β -Lg pertence à família das Lipocalinas (proteínas com função de transporte), cuja principal característica, devido sua estrutura, é sua habilidade de se ligar a pequenas moléculas lipofílicas em sua cavidade central hidrofóbica para minimizar seu contato com o solvente (FLOWER, 1996). Embora a função biológica da β -Lg permaneça indefinida, essa proteína é conhecida por sua capacidade de se ligar a moléculas como retinol e várias moléculas hidrofóbicas incluindo ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis e colesterol (FLOWER, NORTH *et al.*, 2000; KONTOPIDIS, HOLT *et al.*, 2002; SAWYER e KONTOPIDIS, 2000). Foi sugerido que uma das funções da β -Lg é se ligar a moléculas não polares para protegê-las e transportá-las, através do ambiente ácido do estômago para o ambiente básico do intestino (PÉREZ e CALVO, 1995).

Sua estrutura secundária é composta por 15% de α -hélice, 50% de β -folhas antiparalelas, 20% de estruturas em curvas (*reverse turns*) e 15% de estruturas casualizadas (VETRI e MILITELLO, 2005). Essa estrutura ocorre na forma de 8 β -folhas, indicadas de A a H na Figura 6, as quais se arranjam na conformação espacial (estrutura terciária) formando uma espécie de cálice ou barril achatado capaz de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas no seu interior (BROWNLOW, CABRAL *et al.*, 1997; WONG, CAMIRAND *et al.*, 1996).

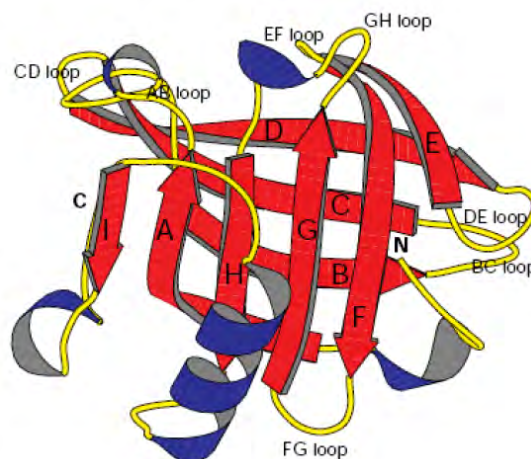


Figura 6: Representação esquemática da estrutura terciária de β -Lg. Fonte: Brownlow, Cabral *et al.* (1997).

A β -Lg está presente em maior quantidade no soro de leite, representando cerca de 45 a 57% em massa do total das proteínas do soro e até 12% em massa das proteínas presentes no leite. Por ser a maior fração proteica do soro, suas características tendem a dominar as propriedades dos produtos elaborados com soro de leite. Possui massa molar de $18.283 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, contendo 162 resíduos de aminoácidos, principalmente os sulfurados, o que a confere um elevado valor biológico. Sua conformação globular é consequência da distribuição uniforme de resíduos não polar, polar e iônico, o que torna possível o arranjo dos resíduos hidrofóbicos no interior da proteína (CHEFTEL, CUQ *et al.*, 1985). As ligações dissulfeto junto com as ligações de hidrogênio estabilizam a estrutura terciária da proteína (BRYANT e MCCLEMENTS, 1998) e, em condições experimentais apropriadas, dirige seu processo de agregação (GRIFFIN, GRIFFIN *et al.*, 1993; HOFFMANN e VAN MIL, 1999; ROEFS e DE KRUIF, 1994; VETRI e MILITELLO, 2005). Seu pI é 5,2, é termolábil e apresenta mudanças conformacionais reversíveis a 70°C (SMITHERS, 2008). A β -Lg contém duas pontes dissulfídicas e um grupo tiol livre muito reativo incluso em sua estrutura, que possibilita um intercâmbio entre as ligações dissulfídicas durante mudanças conformacionais associadas com o tratamento térmico e alterações de pH (BOTTOMLEY, EVANS *et al.*, 1990). Em seu complexo globular proteico, a parte hidrofóbica da cadeia de aminoácidos fica

voltada para o interior, enquanto a parte polar fica exposta para o exterior. Quando aquecidas a certa temperatura, tem-se a abertura parcial desses complexos globulares, expondo os aminoácidos localizados no interior e levando então à agregação parcial ou completa da proteína desnaturada (ELEYA e TURGEON, 2000).

A desnaturação térmica pode ser observada quando a β -Lg é aquecida por 30 minutos a temperaturas superiores a 60°C. A completa desnaturação, com extensa modificação conformacional e exposição de regiões hidrofóbicas e grupos nucleofílicos altamente reativos, pode ser observada a 95°C (SGARBIERI, 1996). É considerada a principal agente gelificante do soro. Em valores de pH menores que 3,0 ou maiores que 8,0, a β -Lg apresenta-se na forma de monômeros. Em valores de pH entre 5,1 e 6,7, os monômeros se associam em dímeros e entre pH 3,8 e 5,1, em octâmeros, quando em baixa temperatura e elevadas concentrações (SGARBIERI, 1996).

Em produtos como sorvetes, *flans*, pudins e demais tipos de sobremesas lácteas, a adição de soro em pó enriquecido de β -Lg confere propriedades tecnológicas como formação de espumas e géis estáveis, e facilidade de aeração do produto. Em iogurtes, essa proteína contribui na melhoria da textura e consistência do produto, sendo que nos iogurtes *light* um dos benefícios mais significativos ao substituir parte do leite desnatado por concentrado proteico rico em β -Lg é a redução no efeito da sinerese durante o período de estocagem do produto.

3.3.3. GLICOMACROPEPTÍDEO

Glicomacropeptídeo (GMP) é produzido após a clivagem da κ -caseína pela enzima quimosina ou pepsina e é constituído por 64 aminoácidos resultantes da porção hidrofílica C-terminal da caseína. É um peptídeo solúvel

de aproximadamente $7.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, rico em isoleucina e valina, mas carente de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, triptofano e tirosina (DZIUBA e MINKIEWICZ; EL-SALAM, EL-SHIBINY *et al.*, 1996). Juntamente com a β -Lg e a α -La, o GMP é muito abundante no soro de queijo doce, sendo que sua concentração varia entre 15 a 20% (THOMÄ-WORRINGER, SØRENSEN *et al.*, 2006; WANG e LUCEY, 2003). O GMP tem sido objeto de várias pesquisas devido a suas propriedades biológicas e fisiológicas, incluindo as habilidades de se ligar a enterotoxinas da *Cólera* e *Escherichia coli*, de inibir a adesão bacteriana e virótica, modular a resposta do sistema imunológico, promover o crescimento de bactéria *bifidus*, suprimir secreções gástricas e regular a circulação sanguínea (EL-SALAM, EL-SHIBINY *et al.*, 1996; THOMÄ-WORRINGER, SØRENSEN *et al.*, 2006). Entretanto, sua presença e influência nas propriedades funcionais de produtos elaborados com soro de leite geralmente têm sido negligenciadas.

Estudos a respeito de suas propriedades funcionais são escassos e contraditórios (THOMÄ-WORRINGER, SØRENSEN *et al.*, 2006). A gelificação de GMP foi descrita por poucos autores. Burton e Skudder (1987) relataram a gelificação de solução de GMP 9,3% m/m a 20°C em pH 4,5. Entretanto, Wang (2007) relatou que o GMP foi capaz de formar gel somente em valores de pH inferiores a 4,0. Hiroshi e Kawasaki (2001) patentearam a aplicação de GMP como agente gelificante em concentrações entre 0,1 e 10% em pH inferior a 5, embora nenhuma informação detalhada esteja disponível sobre isso. Em um estudo recente, Martinez, Farías *et al.* (2010b) avaliaram a gelificação induzida pelo calor de diferentes misturas de GMP e β -Lg em pH 3,5 e 7,0 e observaram uma forte interação entre GMP e β -Lg em soluções nestes pH, com formação de estruturas associadas governadas por interações eletrostáticas. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que o efeito sinérgico entre GMP e β -Lg em certas condições pode ser explorado para o desenvolvimento de produtos alimentícios com textura desejada. Martinez, Farías *et al.* (2010) relataram que o GMP tem a capacidade de se autoagregar em temperatura ambiente e este processo é dependente do pH. Os autores concluíram que o

processo de gelificação é fortemente dependente da presença de cadeias laterais glicosídicas carregadas, principalmente as do ácido siálico.

3.4. REOLOGIA

Reologia é o ramo da mecânica que se dedica ao estudo da deformação e do escoamento dos materiais, ou de forma mais simples, a reologia estuda a resposta dos materiais quando submetidos a uma perturbação mecânica. O nome reologia se originou do grego *rheos*, que significa fluxo ou fluir, e foi introduzido por Bingham em 1929. Como ramo independente da ciência, a reologia é relativamente nova, tendo sua primeira sociedade fundada apenas em 1929 nos Estados Unidos (BARNES, HUTTON *et al.*, 1991).

O estudo do comportamento dos materiais sob tensão pode trazer importantes informações a respeito de sua estrutura e organização molecular. A determinação das propriedades reológicas de alimentos é de suma importância para o controle de qualidade, o desenvolvimento de novos produtos, a correlação com a textura do produto e o projeto de tubulações e equipamentos (STEFFE, 1996).

3.4.1. COMPORTAMENTO REOLÓGICO

O comportamento reológico dos materiais se divide em dois perfis extremos: o de sólidos elásticos e o de líquidos viscosos (MONTEIRO, 2004). Os sólidos ditos elásticos se deformam elasticamente, isto é, obedecendo à Lei de Hooke (equação 1) quando submetidos a uma perturbação mecânica:

$$F = -k \cdot x \quad (\text{eq. 1})$$

onde F é a força (N), k é a constante de força do material (kg.s^{-2}) e x é o comprimento da deformação (m). Neste caso, a energia empregada na deformação é armazenada e subsequentemente recuperada pelo sistema ao cessar a perturbação, e o material retorna a seu formato original.

Já no caso dos líquidos viscosos, quando submetidos a uma tensão de cisalhamento estes escoam. Nos casos mais simples, a tensão de cisalhamento (τ) apresenta uma relação de proporção direta com a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) aplicada (equação 2):

$$\tau \propto \dot{\gamma} \quad (\text{eq. 2})$$

A constante de proporcionalidade é denominada viscosidade (η). E (eq. 3) assim, pode-se escrever: $\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$

onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa), η é a viscosidade (Pa.s) e $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s^{-1}). Os líquidos para os quais esta relação se aplica são denominados líquidos Newtonianos; a relação matemática, modelo de Newton.

Todavia, diversos tipos de líquidos não possuem viscosidade constante. Entre estes, distinguem-se aqueles cujo comportamento reológico é independente do tempo e aqueles que são dependentes do tempo. Líquidos com comportamento reológico independente do tempo, sob condições de temperatura e composição constantes, apresentam viscosidade aparente dependente somente da taxa de deformação ou da tensão de cisalhamento. Para o caso de líquidos com comportamento dependente do tempo, a viscosidade aparente também depende da duração dessa taxa de deformação (RAO, 2007). A Figura 7 apresenta uma classificação geral do comportamento reológico de líquidos:

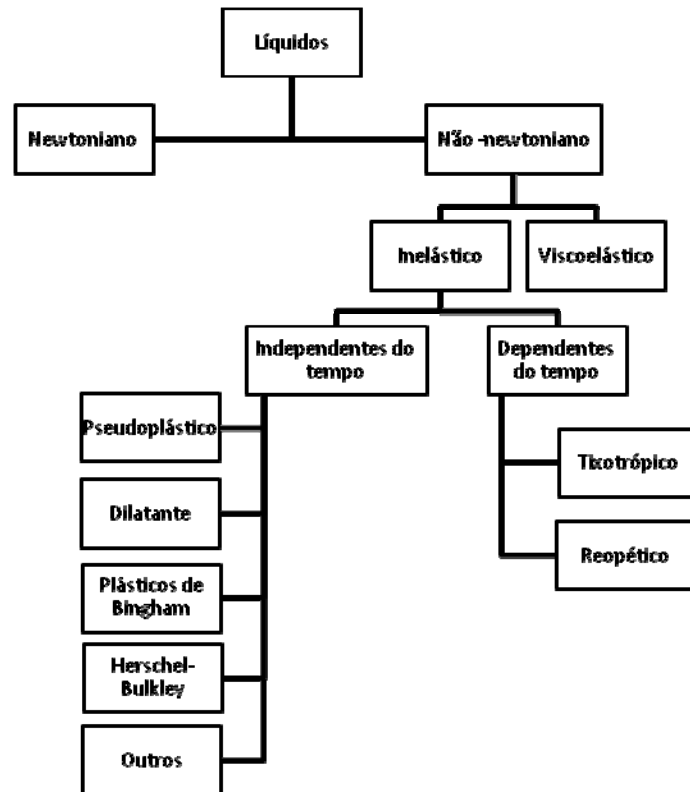


Figura 7: Classificação do comportamento reológico de líquidos.

Nesses materiais (líquidos viscosos) a energia empregada na deformação é dissipada pelo sistema e ao cessar a perturbação o material mantém a configuração após a perturbação. Diz-se então que os líquidos viscosos escoam, ao passo que os sólidos elásticos se deformam. Esses extremos de comportamento se referem a sistemas ideais, enquanto na maioria das vezes os materiais apresentam comportamento intermediário a esses extremos, sendo caracterizados como viscoelásticos.

Os materiais viscoelásticos são aqueles que apresentam o comportamento de sólido elástico e de líquido viscoso simultaneamente. Todos os materiais apresentam, em alguma extensão, comportamento viscoelástico dependendo da intensidade da tensão e da duração da tensão aplicada, mas para fins de classificação considera-se um material viscoelástico aquele que apresenta características de sólido elástico e de líquido viscoso ao mesmo tempo em uma janela temporal laboratorial (SILVA, 2006).

A resposta de um material viscoelástico à perturbação pode ser analisada como a combinação das respostas elástica e viscosa. Para estudar essas respostas, alguns modelos mecânicos são adotados. Os modelos de Kelvin-Voigt e de Maxwell se valem da combinação dessas propriedades representadas na forma de um amortecedor (correspondente à contribuição viscosa) e de uma mola (correspondente à contribuição elástica) para descrever o comportamento reológico viscoelástico. A mola assume assim um comportamento ideal, de acordo com a Lei de Hooke, com toda energia empregada na deformação sendo devolvida ao sistema na forma de recuperação de sua conformação original, após cessada a aplicação da força. O amortecedor, por sua vez, assume um comportamento viscoso e dissipa toda energia mecânica empregada para fazer o material fluir, sem haver o restabelecimento de sua forma original ao cessar a perturbação mecânica (SILVA, 2006).

O modelo de Maxwell, proposto em 1866 por Maxwell, faz uso das aproximações de mola/amortecedor para descrever o comportamento viscoelástico líquido. Nesse modelo os componentes são arranjados em série, como indicado na Figura 8. Durante a aplicação de uma dada tensão, o componente elástico (mola) se deforma imediatamente e atinge um valor limite constante, não sofrendo mais alterações, enquanto o componente viscoso (amortecedor), de resposta mais lenta, continua se deformando (fluindo) por algum tempo. Ao cessar a tensão, a mola retorna à configuração inicial instantaneamente, enquanto o amortecedor permanece deformado. Esse modelo é também conhecido como o modelo de um líquido viscoelástico, devido ao fato do sistema não se recuperar totalmente da deformação, após cessada a perturbação mecânica (MONTEIRO, 2004; SILVA, 2006).

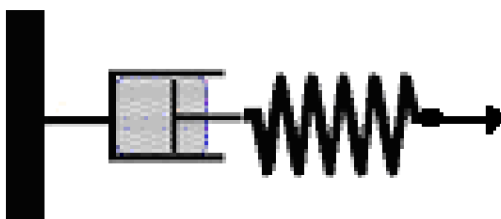


Figura 8: Representação do comportamento segundo o comportamento de Maxwell.
Fonte: Monteiro (2004). Fonte: Monteiro (2004).

O modelo de Kelvin-Voigt apresenta um sistema que emprega os mesmos componentes do modelo de Maxwell, porém em uma montagem em paralelo, como indicado na Figura 9. Esse modelo foi proposto em 1890 por Kelvin e Voigt para explicar o comportamento viscoelástico sólido. Quando aplicada uma tensão constante, ela se divide entre os dois elementos, sendo o esforço em cada componente do sistema menor do que se a tensão fosse aplicada nos dois componentes montados em série. Ao aplicar a tensão, o componente elástico (mola) não se deforma imediatamente, pois o componente viscoso (amortecedor) oferece uma resistência à deformação. O sistema se deforma até o limite de deformação da mola. Após cessada a tensão, o sistema tende a retornar completamente à condição inicial. A mola retorna totalmente à condição original, forçando o amortecedor também a fazê-lo, mas com um retardo na resposta. Esse modelo é conhecido por alguns autores como modelo de um sólido viscoelástico, uma vez que o sistema apresenta um comportamento de sólido elástico, retornando à configuração inicial após o fim da perturbação mecânica, porém com um retardo (MONTEIRO, 2004; SILVA, 2006).

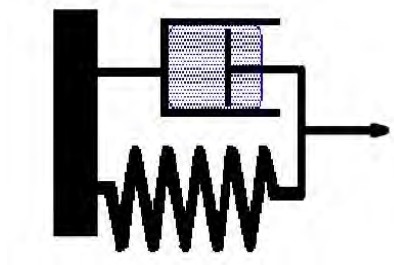


Figura 9: Representação do comportamento segundo o comportamento de Kelvin-Voigt. Fonte: Monteiro (2004).

Muitos alimentos apresentam comportamentos viscoelásticos mais complexos, que podem ser explicados por modelos que combinam elementos viscosos e elásticos em arranjos mais complexos que os modelos de Maxwell e de Kelvin-Voigt. Outro modelo mecânico também muito utilizado, e mais complexo que os anteriores, é o modelo de Burgers (Figura 10). Esse modelo, proposto em 1935 por Burgers, combina os modelos de Maxwell e de Kelvin-Voigt resultando num sistema de três blocos: (1) puramente elástico representado pela mola em série E_1 , que é a componente hookeana; (2) viscoelástico sólido, representado pela mola E_2 e pelo amortecedor V_2 em paralelo; e (3) puramente viscoso, representado pelo amortecedor em série V_3 , que é a componente newtoniana (STEFFE, 1996). Com a aplicação da tensão os componentes do modelo se deformam segundo suas características viscosa e elástica, necessariamente limitados pela associação mútua entre eles. Quando cessada a aplicação da tensão, o sistema tende a retornar à sua condição inicial, mas neste retorno o componente V_3 continuará deformado por constituir um componente totalmente viscoso, permanecendo então o sistema com uma deformação residual, que caracteriza o líquido viscoelástico (MONTEIRO, 2004).

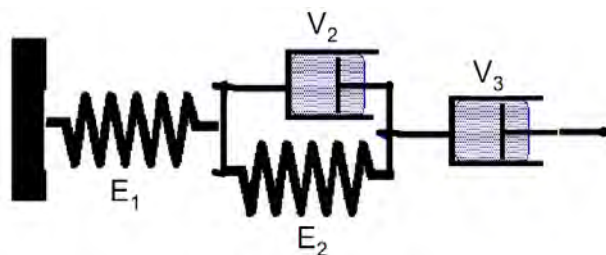


Figura 10: Representação do comportamento segundo o comportamento de Burgers. Fonte: Monteiro (2004).

3.4.2. PRINCIPAIS TESTES REOLÓGICOS

As propriedades viscoelásticas dos materiais são dependentes do tempo e da tensão ou deformação aplicadas, podendo ser linear a relação entre estas duas últimas variáveis. Neste caso, tem-se o intervalo ou faixa de viscoelasticidade linear, no qual a magnitude da deformação ou tensão aplicada é pequena e as propriedades reológicas independem da deformação ou tensão aplicadas, sendo somente dependentes do tempo e um reflexo da estrutura do material em estudo.

Os testes mais utilizados na determinação do comportamento viscoelástico de alimentos são os ensaios no modo oscilatório e os testes transientes como fluência e recuperação (*creep-recovery*) e relaxação de tensão (*stress relaxation*) (STEFFE, 1996). Tanto o teste dinâmico (ensaio oscilatório) quanto os transientes (fluência e recuperação, e relaxação de tensão) são realizados aplicando-se deformações ou tensões pequenas, assegurando que as medidas sejam feitas dentro da faixa de viscoelasticidade linear.

3.4.2.1. TESTES OSCILATÓRIOS

Uma abordagem bastante recorrente em estudos reológicos é a aplicação de testes oscilatórios. Este é o método mais comum para estudo do comportamento viscoelástico de alimentos (STEFFE, 1996). Seus resultados são muito sensíveis à composição química e à estrutura física do material avaliado, o que torna estes testes particularmente úteis para a caracterização da conformação macromolecular e interações intermoleculares de soluções poliméricas, além de ser útil na determinação de temperaturas e tempos de gelificação (RAO, 2007; STEFFE, 1996).

Os testes oscilatórios consistem na aplicação de uma perturbação mecânica senoidal, de amplitude e frequência controláveis, ao sistema e na análise da onda de resposta. A realização do ensaio consiste em submeter a amostra a uma tensão de cisalhamento ou deformação oscilatória, a uma dada amplitude senoidal, a uma frequência f (Hz) ou frequência angular ω (rad.s⁻¹), que pode ser fixa ou variável, e em observar o comportamento da resposta da amostra (MONTEIRO, 2004).

As figuras a seguir ilustram o princípio de aplicação de perturbação oscilatória nos dois sistemas modelo: o sólido elástico (Figura 11) e o líquido viscoso (Figura 12).

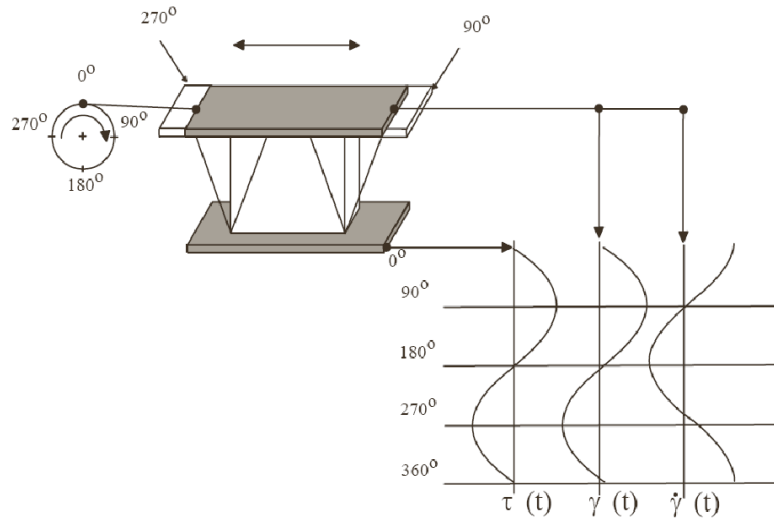


Figura 11: Representação esquemática de um experimento oscilatório em um sólido elástico Hookeano. $\tau(t)$ = tensão de cisalhamento, $\gamma(t)$ = deformação e $\dot{\gamma}(t)$ = taxa de deformação. Fonte: Silva (2006).

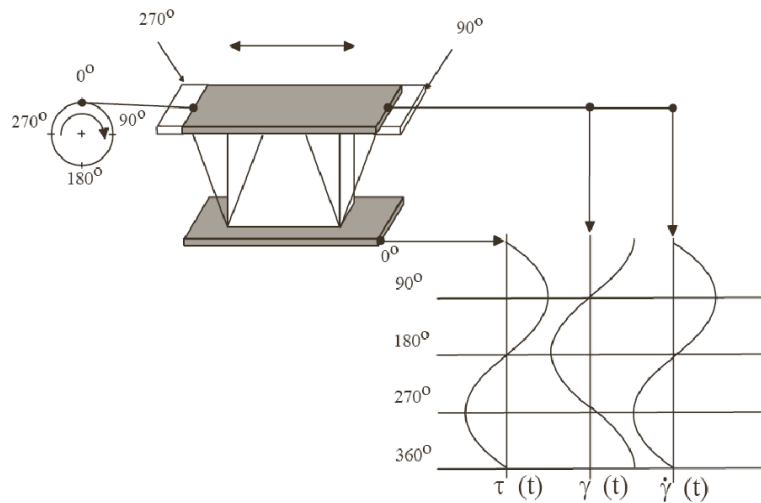


Figura 12: Representação esquemática de um experimento oscilatório em um líquido Newtoniano. $\tau(t)$ = tensão de cisalhamento, $\gamma(t)$ = deformação e $\dot{\gamma}(t)$ = taxa de deformação. Fonte: Silva (2006).

No caso de um comportamento puramente elástico (Figura 11), a deformação acompanha imediatamente o esforço da tensão, de modo que

tensão e deformação estão em fase e a taxa de deformação apresenta-se 90° defasada:

$$\tau(t) = G \cdot \gamma(t) \quad (\text{eq. 4})$$

quando no modo de deformação controlada, ou quando no modo de tensão controlada:

$$\gamma(t) = \frac{1}{G} \cdot \tau(t) \quad (\text{eq. 5})$$

quando no modo de tensão controlada. Sendo G o módulo de cisalhamento (Pa).

Já no caso de um comportamento puramente viscoso (Figura 12), tensão e deformação estão defasadas em 90°, enquanto tensão e taxa de deformação apresentam-se em fase:

$$\tau(t) = \eta \cdot \dot{\gamma}(t) \quad (\text{eq. 6})$$

quando no modo de taxa ou deformação controlada, ou

$$\dot{\gamma}(t) = \frac{1}{\eta} \cdot \tau(t) \quad (\text{eq. 7})$$

quando no modo de tensão controlada. Sendo η a viscosidade (Pa.s).

E para o caso de um comportamento viscoelástico, tensão e deformação apresentam uma diferença de fase δ entre 0 e 90°. Neste caso, aplica-se:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (\text{eq. 8})$$

ou o equivalente

$$\dot{\gamma}(t) = \gamma_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) = \dot{\gamma} \cdot \cos(\omega t) \quad (\text{eq. 9})$$

quando no modo de deformação controlada; ou

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (\text{eq.109})$$

quando no modo de tensão controlada. Sendo γ_0 a amplitude de deformação, τ_0 a amplitude de tensão (Pa), ω a frequência angular (rad.s^{-1}) ou $\omega = 2\pi f$ com a frequência f em Hz, e t o tempo (s) (MONTEIRO, 2004).

Dessas curvas podem ser obtidos alguns parâmetros, como:

- ❖ *Módulo elástico*, também conhecido como módulo de armazenamento ou de estocagem, representa o comportamento elástico da amostra:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \cos \delta \quad (\text{eq. 11})$$

- ❖ *Módulo viscoso*, também conhecido como módulo de perda ou de dissipação, caracteriza o comportamento viscoso da amostra:

$$G'' = \tau_0 / \gamma_0 \cdot \sin \delta \quad (\text{eq. 12})$$

- ❖ *Ângulo de perda*, também conhecido como fator de amortecimento, indica a razão entre a energia perdida e a energia armazenada ou a proporção entre a componente viscosa e a componente elástica da amostra:

$$\tan \delta = G'' / G' \quad (\text{eq. 13})$$

Dentre os testes oscilatórios, três tipos podem ser conduzidos para obter propriedades úteis de materiais viscoelástico, como géis, e do processo de gelificação e derretimento (*melting*). São eles:

Varredura de frequência: é provavelmente o teste oscilatório mais comum, pois mostra como o comportamento elástico e viscoso do material muda com a taxa de aplicação da deformação ou tensão. É um teste bastante útil para a comparação de produtos alimentícios diferentes ou em comparar os efeitos de vários ingredientes e métodos de processamento sobre a viscoelasticidade do produto. Neste teste, a frequência varia enquanto a

amplitude e a temperatura são mantidas constantes (Figura 13), logo G' e G'' são determinados em função da frequência (STEFFE, 1996). Com base nos dados obtidos neste teste é possível classificar os géis como verdadeiros ou fracos. Géis verdadeiros são aqueles cujas redes apresentam rearranjo molecular muito reduzido na escala de tempo analisada, tal que G' é maior que G'' ao longo da faixa de frequência varrida e esses módulos são quase independentes da frequência. Géis fracos, por sua vez, apresentam pequena diferença entre os módulos dinâmicos, que exibem uma alta dependência da frequência, sugerindo a existência de processos de relaxação em curta escala de tempo (RAO, 2007).

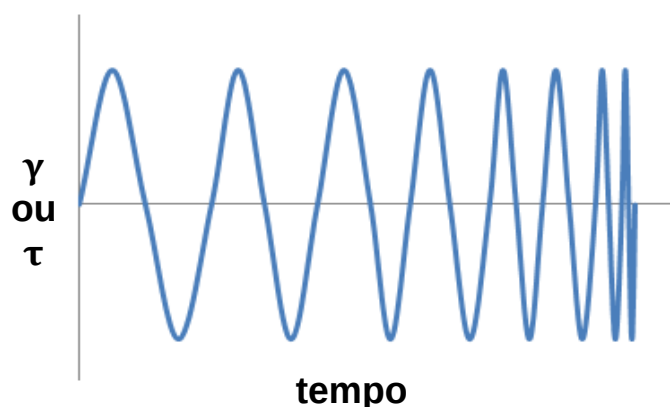


Figura 13: Teste oscilatório no modo de varredura de frequência.

Varredura de tempo: neste ensaio amplitude de tensão (ou deformação), temperatura e frequência são mantidas constantes (Figura 14), enquanto G' e G'' são determinados em função do tempo. A varredura de tempo, frequentemente chamada de experimento de cura, pode indicar mudanças estruturais dependentes do tempo, sendo útil para o estudo do desenvolvimento da estrutura de géis (RAO, 2007; STEFFE, 1996).

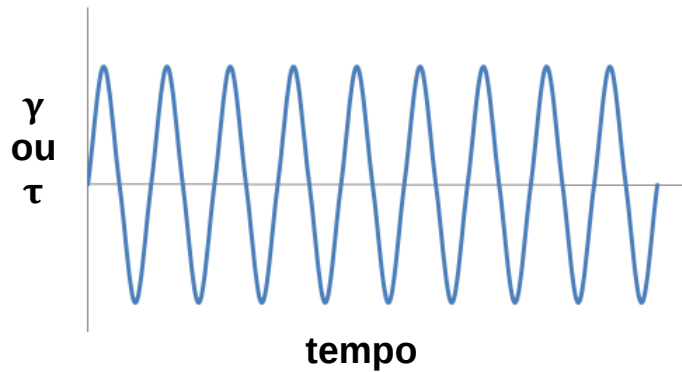


Figura 14: Teste oscilatório no modo de varredura de frequência tempo.

Varredura de temperatura: este modo assemelha-se à varredura de tempo, porém a temperatura não é mantida constante. Os módulos dinâmicos são então obtidos em função da temperatura. Tal teste é bastante útil no estudo de situações que envolvem mudanças no comportamento reológico induzidas por temperatura, como os estudos de formação de gel durante o resfriamento de dispersões aquecidas, a gelatinização de dispersão de amido durante aquecimento e a formação de géis de proteínas (RAO, 2007; STEFFE, 1996).

3.4.2.2. FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO (CREEP-RECOVERY)

O teste de fluência e recuperação consiste da aplicação de uma tensão de cisalhamento constante por um tempo suficiente para que se atinja a condição estacionária de escoamento, seguida da remoção da tensão. A deformação é monitorada continuamente ao longo do tempo (STEFFE, 1996). Durante a primeira etapa, a fluência, a deformação observada é composta de duas contribuições: uma parte advém da deformação da componente elástica presente e outra parte é devida ao escoamento da componente viscosa do material. O valor da deformação da componente elástica é constante e

independente do tempo, enquanto a contribuição viscosa é dependente do tempo de aplicação da tensão. Na segunda e última etapa do teste, a recuperação, a tensão é removida e observa-se a recuperação da deformação da componente elástica (SILVA, 2006). No caso do material que se comporta como um sólido viscoelástico (modelo de Kelvin-Voigt), a recuperação será total após um dado tempo, ao passo que para um líquido viscoelástico (modelo de Maxwell ou de Burgers) a curva de deformação atingirá um patamar correspondente à parcela da deformação advinda do escoamento do componente viscoso (Figura 15) (SILVA, 2006).

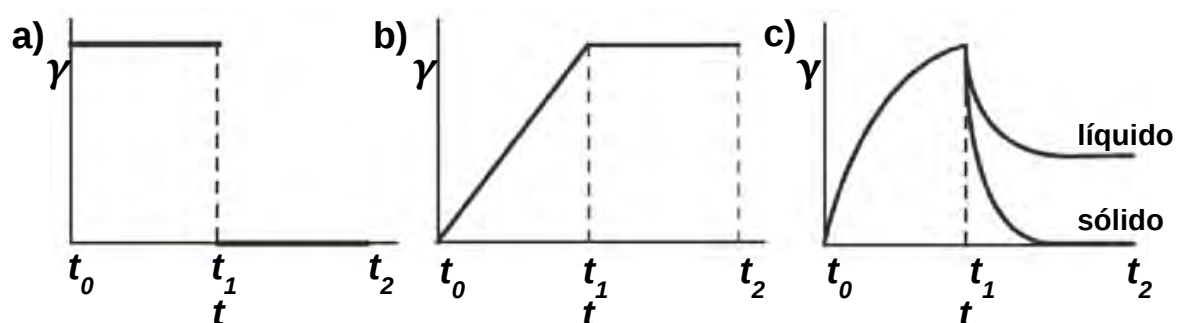


Figura 15: Exemplo de curvas de fluência e recuperação para (a) um sólido elástico, (b) um líquido newtoniano e (c) um material viscoelástico. Fonte: Silva (2006).

O modelo que melhor explica o comportamento na fluência (*creep*) para o líquido viscoelástico é o de Burgers. Nos instantes iniciais em que a tensão é aplicada atua a deformação elástica pura (mola E_1 , Figura 10 e γ_1 , Figura 16). Em um segundo momento a deformação γ_2 corresponderá à deformação viscoelástica do segundo bloco (mola E_2 e amortecedor V_2 , Figura 10). E por fim a deformação da componente viscosa pura (amortecedor V_3 , Figura 10) é representada por γ_3 (Figura 16). A viscosidade da substância deformada é representada por β . A deformação total é dada pela soma das três etapas. Neste ponto termina a curva de deformação e começa a curva de recuperação (*recovery*), com a remoção da tensão (MONTEIRO, 2004).

Durante o retorno do sistema, a primeira etapa do decaimento da curva corresponde à retração γ_e das molas E_1 e E_2 (Figura 10). A dimensão γ_v representa a parcela viscosa que não retrai, correspondente ao amortecedor V_3 (Figura 10). Esse é o comportamento do líquido viscoelástico. No caso de um sólido viscoelástico não há a parcela de γ_v e, portanto, o retorno alcançaria o eixo dos x (MONTEIRO, 2004).

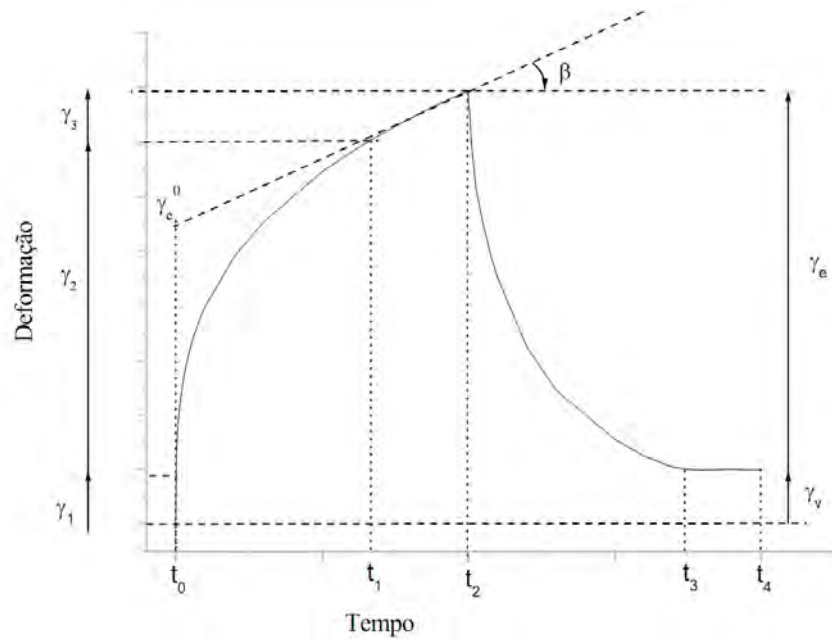


Figura 16: Curva de fluência (*creep*) para um líquido viscoelástico. Fonte: Monteiro (2004).

Uma vez determinados os valores de γ_e e γ_v tem-se definido com quanto participa os componentes viscoso e elástico no sistema. Assim:

$$\gamma_{total} = \gamma_1 + \gamma_2 + \gamma_3 = \gamma_v + \gamma_e \quad (\text{eq. 14})$$

Da equação 14 podemos associar:

$$\gamma(t) = \text{mola } (E_1) + \text{modelo Kelvin - Voigt } (E_2 + V_2) + \text{amortecedor } (V_3) = \gamma_1 + \gamma_2(t) + \gamma_3(t) \quad (6)$$

ou

$$\gamma(t) = \frac{\tau_0}{G_1} + \frac{\tau_0}{G_2} \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\lambda}}\right) + \frac{\tau_0 \cdot t}{\eta_0} \quad (\text{eq. 16})$$

sendo G_1 (Pa) é o módulo de cisalhamento referente à mola E_1 , η_0 (Pa.s) é a viscosidade de cisalhamento zero correspondente ao amortecedor V_3 e λ (s) é o tempo de retardo, dado por:

$$\lambda = \frac{\eta_2}{G_2} \quad (\text{eq. 17})$$

onde G_2 (Pa) o módulo de cisalhamento da mola E_2 e η_2 (Pa.s) a viscosidade correspondente ao amortecedor V_2 (MONTEIRO, 2004).

3.4.2.3. TESTE DE RELAXAÇÃO DE TENSÃO

O teste de relaxação de tensão consiste da aplicação de uma dada deformação instantânea (dentro da região viscoelástica linear) ao sistema, mantendo-a constante ao longo do tempo, ao mesmo tempo em que a tensão necessária para mantê-la constante ao longo do tempo é monitorada. Esse teste pode ser conduzido sob cisalhamento, tensão uniaxial ou compressão uniaxial (STEFFE, 1996).

Dependendo do comportamento reológico do material observam-se perfis de curvas diferentes. Sólidos elásticos não apresentam relaxação: a tensão interna do sistema permanece constante ao longo de tempo em que a deformação é mantida constante. Líquidos viscosos por sua vez apresentam uma relaxação instantânea, isto é, após a deformação ser atingida, a tensão interna cai instantaneamente e permanece em zero. A combinação desses dois

resultados é observada no comportamento viscoelástico, onde há um decaimento exponencial da tensão interna com o tempo até um valor de equilíbrio, o qual é função da estrutura do material viscoelástico avaliado. Sólidos viscoelásticos exibem tensão de equilíbrio maior que zero, enquanto para líquidos viscoelásticos esta é zero (Figura 17) (MONTEIRO, 2004; STEFFE, 1996).

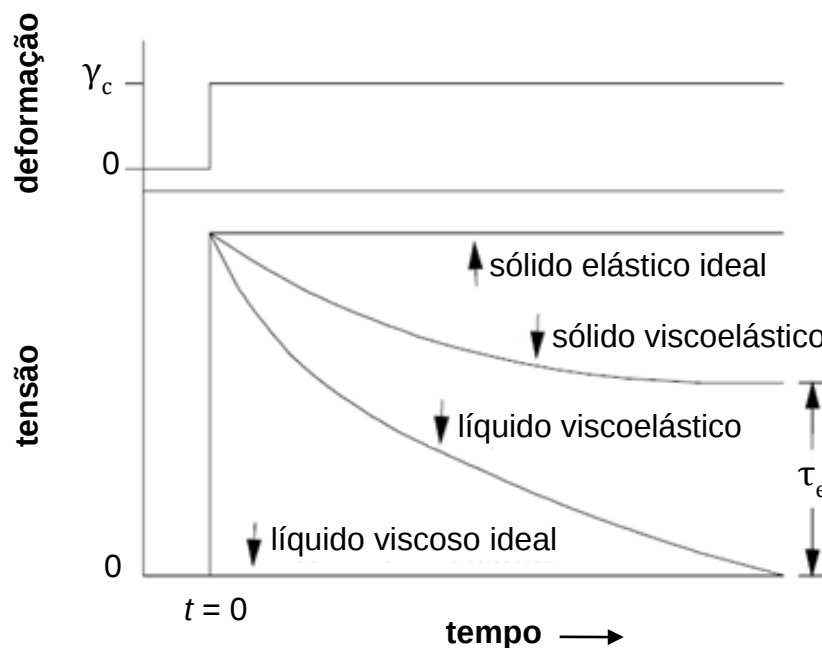


Figura 17: Curvas de relaxação de tensão para um sólido elástico, um líquido viscoso, um líquido viscoelástico e um sólido viscoelástico. Fonte: adaptado de Steffe (1996).

3.4.3. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DAS PROTEÍNAS DO SORO

As proteínas do soro possuem propriedades nutricionais e funcionais únicas. Seu uso tem se intensificado em muitos produtos alimentícios, devido sua habilidade de formar e manter emulsões estáveis durante um certo período de tempo, espumas e géis. O tratamento térmico de soluções proteicas de soro induz a formação de géis cujas características dependem das condições físico-químicas das soluções, como força iônica, pH e concentração de proteína,

assim como das condições de aquecimento. A gelificação a quente tem sido muito estudada por vários autores (AKO, DURAND *et al.*, 2009; GEZIMATI, CREAMER *et al.*, 1997; HAVEA, SINGH *et al.*, 2001; HAVEA, WATKINSON *et al.*, 2009; MARTINEZ, FARÍAS *et al.*, 2010b; PAULSSON, HEGG *et al.*, 1986). A gelificação sob temperatura ambiente também tem sido objeto de vários outros estudos, uma vez que os géis obtidos por esta técnica possuem características de microestrutura e reológicas muito interessantes, como a formação de géis mais transparentes que os géis termicamente induzidos (BARBUT e FOEGEDING, 1993; JU, OTTE *et al.*, 1997). Além disto, a gelificação a frio é importante na preparação de produtos alimentícios sensíveis ao calor, uma vez que possibilita a incorporação de substâncias termossensíveis.

As propriedades reológicas e de textura dos géis formados com proteínas do soro de queijo são muito dependentes das proteínas contidas neste ingrediente, principalmente daquelas presentes em maior proporção, como a β -Lg e α -La (50% e 20%, respectivamente).

A β -Lg é uma proteína globular e seu monômero contém duas ligações dissulfídicas e uma cisteína livre, que se torna disponível quando exposta a altas temperaturas. Por outro lado, a α -La é uma proteína globular menor e possui quatro ligações dissulfídicas, porém nenhuma cisteína livre (RELKIN e MULVIHILL, 1996). De acordo com Hines e Foegeding (1993) e Paulsson, Hegg *et al.* (1986), o aquecimento de soluções contendo apenas α -La a 75°C não produz agregados. Entretanto, o aquecimento de misturas de α -La na presença de β -Lg em condições de baixa força iônica induz a formação de polímeros mistos resultantes de interações hidrofóbicas e formação de ligações dissulfídicas (DALGLEISH, SENARATNE *et al.*, 1997; HAVEA, SINGH *et al.*, 2001).

As características dos agregados induzidos por aquecimento, assim como as propriedades reológicas dos géis, dependem da proporção das proteínas α -La e β -Lg (GEZIMATI, CREAMER *et al.*, 1997). Paulsson, Hegg *et*

al. (1986) não detectaram a formação de gel para solução de α -La a 20% m/v quando aquecida numa faixa de temperatura entre 30 e 95°C. Entretanto, quando as proteínas albumina de soro bovino (BSA) (MATSUDOMI, OSHITA *et al.*, 1993; PAULSSON, HEGG *et al.*, 1986) ou β -Lg (CALVO, LEAVER *et al.*, 1993; HINES e FOEGEDING, 1993; LEGOWO, IMADE *et al.*, 1993; MATSUDOMI, OSHITA *et al.*, 1992) foram adicionadas à esta solução, foi verificada a formação de gel.

A relação existente entre a composição proteica do soro e a reologia dos géis com ele obtidos é um fenômeno pouco entendido (RABIEY e BRITTEN, 2009). Poucos são os trabalhos encontrados relacionando a composição proteica e a reologia de géis produzidos à temperatura ambiente.

3.5. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Por muitos anos os pesquisadores tentaram conciliar a alta resolução das microscopias eletrônica de varredura e de transmissão com a capacidade de se obter imagens em meio aquoso, própria dos microscópios ópticos (FERREIRA e YAMANAKA, 2006).

Segundo Zhao (2003), a microscopia de força atômica (MFA) foi desenvolvida em 1986 por Binning, Quate e Gerber, partindo das técnicas desenvolvidas e utilizadas na microscopia de tunelamento de elétrons (MTS). A MTS possibilita medir a topografia de superfícies de forma excelente, entretanto a técnica só se aplica a sistemas cuja superfície conduz elétrons. A limitação de uso da MTS foi então superada com o surgimento da MFA. Em 1989 o primeiro equipamento foi produzido comercialmente. A MFA permite a caracterização de superfícies em escala atômica, com resolução na ordem de grandeza da unidade de Angstrom (ZHAO, 2003). Dentre as principais vantagens da MFA, destacam-se:

- (i) dispensa tratamentos prévios à análise, como secagem, desidratação ou deposição de outros materiais a fim de tornar a superfície condutora, como no caso da microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- (ii) dispensa uso de vácuo;
- (iii) maior resolução;
- (iv) gera imagens em 3 dimensões;
- (v) permite a quantificação direta da rugosidade e altura da amostra;
- (vi) permite a medida da espessura de filmes ultrafinos sobre suportes;
- (vii) menor custo que outros microscópios eletrônicos, entre outros (HERRMANN, SILVA *et al.*, 1997; ZHAO, 2003).

Embora não haja necessidade de formação de vácuo no ambiente de utilização do equipamento, este deve ser protegido contra interferências de ruídos elétricos bem como vibrações mecânicas.

De acordo com Ferreira e Yamanaka (2006), a MFA não utiliza lentes para obtenção das imagens e nem necessita de uma fonte de luz ou feixe de elétrons. Esta técnica baseia-se na varredura da superfície da amostra por meio de sondas de dimensões muito reduzidas a distâncias muito pequenas da superfície, proporcionando uma alta resolução espacial, tanto vertical como lateral, na visualização da superfície em nível atômico.

Ainda segundo Ferreira e Yamanaka (2006), o princípio de funcionamento da MFA baseia-se na varredura da superfície por uma ponta piramidal (ponteira) de algumas micras de comprimento (100 a 200 μm) e geralmente menos de 20 nm de diâmetro, integrada em um cantilever flexível. O conjunto de ponteira e cantilever (sonda) é o componente básico do equipamento e, para alcançar resolução atômica, a ponta deve terminar em um conjunto de átomos. A aproximação ou afastamento do cantilever é promovido

pela força entre a ponta e a superfície, sendo essa deflexão proporcional à força de interação. Na parte superior da haste encontra-se um espelho cuja função é refletir a luz de um feixe de laser que após refletido passa por uma lente e incide sobre um fotodetector de 4 quadrantes, que quantifica as variações de posição e de intensidade da luz produzida pelas deflexões do cantilever (Figura 18). Conforme a ponta varre a superfície da amostra ou esta é deslocada sob a ponta, diferentes tipos de “acidentes geográficos” encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. Essas variações das interações provocam diferentes deflexões. Essas diferenças são então captadas no detector e em seguida armazenadas e processadas em um computador que as transformam em imagens topográficas bi e tridimensionais. Geralmente a força associada com a MFA na deflexão do cantilever é a de van der Waals.

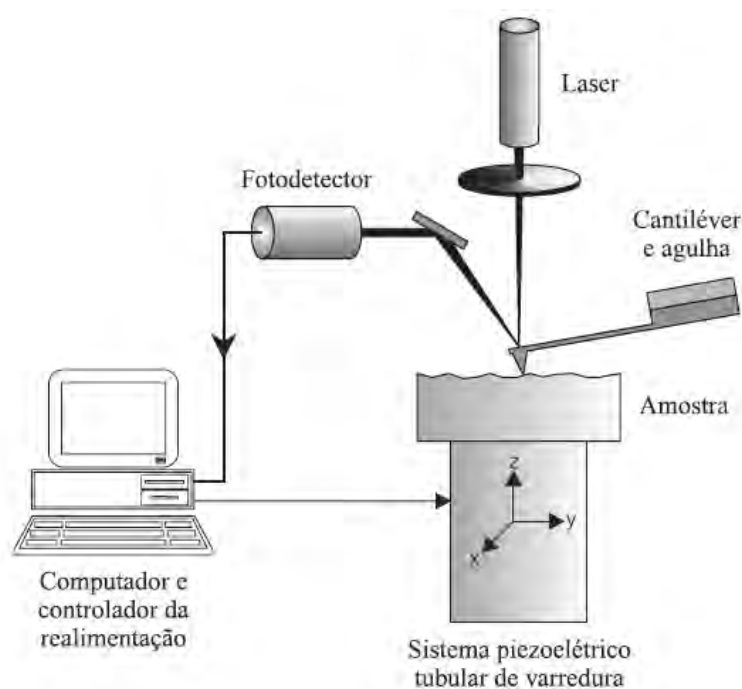


Figura 18: Ilustração do princípio de funcionamento do MFA. Fonte: Herrmann *et al.* (1997).

Existem três modos diferentes de operação para a MFA: contato, não contato e contato intermitente (*tapping*), conforme Figura 19.

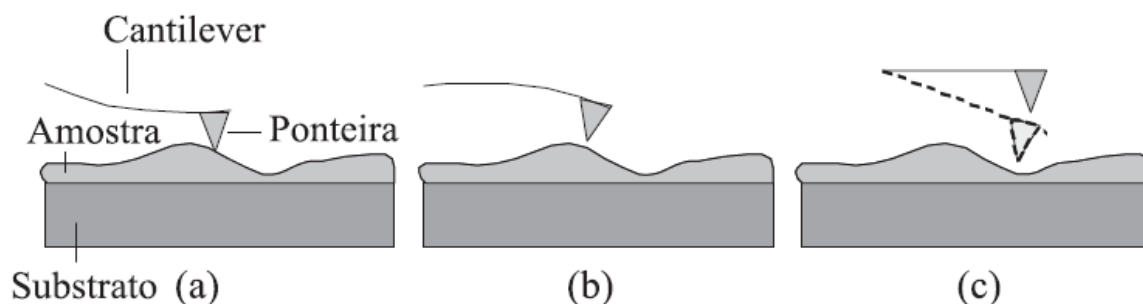


Figura 19: Representação esquemática dos modos de operação: contato (a), não contato (b) e intermitente (c). Fonte: Ferreira e Yamanaka (2006).

No modo contato, o cantilever posiciona-se a poucos angstroms da superfície e a força interatômica entre ponta e superfície é repulsiva. A ponta faz um leve “contato físico” com a superfície, produzindo imagens com alta resolução, entretanto a compressão e as forças geradas podem causar danos à amostra, o que é prejudicial a materiais biológicos sensíveis e que não estão fortemente aderidos ao suporte. Já no modo não contato o cantilever é mantido a dezenas de centenas de angstroms da superfície e a força interatômica envolvida é atrativa. A ponta é posta a oscilar em alta frequência, a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre superfície e ponta é muito pequena. A oscilação aumenta a sensibilidade do equipamento, o que faz com que forças de van der Waals e eletrostáticas possam ser detectadas. E por fim, o modo intermitente é similar ao não contato, exceto pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, mantendo um contato intermitente. Esse modo é utilizado para contornar limitações impostas pelo modo contato (FERREIRA e YAMANAKA, 2006; HERRMANN, SILVA *et al.*, 1997).

Apesar da versatilidade das técnicas de MFA, deve-se salientar que a informação obtida é a respeito da superfície da amostra em estudo, não podendo, até o momento, ser obtidas informações acerca de camadas internas do material.

A utilização da técnica de MFA tem sido empregada com sucesso em diversos estudos, como na investigação da morfologia de agregados de isolado proteico de soro e de β -Lg induzidos termicamente (IKEDA e MORRIS, 2002), na avaliação da distribuição espacial de células probióticas imobilizadas em matrizes (géis) de isolado proteico de soro (DOHERTY, GEE *et al.*, 2010), no processo de agregação de β -Lg a 80°C em pH 2 (OBOROCEANU, WANG *et al.*, 2010), no estudo de filmes comestíveis produzidos a partir de proteínas do soro (LENT, VANASUPA *et al.*, 1998), entre outros.

3.6. DELINEAMENTO DE MISTURA

Mistura é uma classe especial de experimento do tipo “superfície de resposta” no qual o produto sob investigação é composto por vários componentes ou ingredientes. São experimentos úteis porque diversos projetos e desenvolvimentos na área industrial envolvem formulações ou misturas. Neste caso, a resposta é uma função das proporções dos diferentes componentes da mistura.

As propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus componentes, que não são independentes. Em experimentos com misturas não é possível variar um componente enquanto se mantém todos os demais constantes. Assim que a proporção de um componente é alterada, isto ocorre também com os outros componentes, uma vez que a soma de todos os componentes é sempre igual à unidade ou 100% (MONTGOMERY e VOTH, 1994).

Em experimentos de mistura, as proporções de cada componente estão restritas a uma região denominada região simplex, não sendo admissível que um ponto experimental ultrapasse essa região simplex.

Uma dificuldade encontrada em muitos experimentos para misturas é que alguns componentes estão sujeitos a limite superior e/ou inferior. O limite inferior deve estar presente quando o componente é indispensável à mistura e o limite superior deve estar presente sempre que a mistura não puder conter mais do que a proporção indicada para o componente. Esses limites podem produzir regiões do delineamento com formas diferenciadas para as quais é impossível utilizar alguns delineamentos.

Quando se deseja explorar somente uma região limitada do delineamento, uma abordagem alternativa é transformar esses coeficientes linearmente dependentes em pseudocomponentes, que como o próprio nome indica, são falsos componentes definidos como combinações dos componentes originais. Os pseudocomponentes redimensionam a área restrita de dados de forma que a quantidade mínima permitida para o componente seja igual a zero (CORNELL, 2002).

Para transformar os componentes em pseudocomponentes, pode-se utilizar a seguinte fórmula (equação 18):

$$x_i^p = \frac{x_i - L_i}{1 - \sum_{i=1}^n L_i} \quad (\text{eq. 18})$$

onde x_i é o componente original, L_i é o limite do componente x_i e n é o número de componentes da mistura.

A principal razão para a utilização dos pseudocomponentes é que o planejamento e o ajuste dos modelos são bem mais fáceis do que num sistema de componentes originais (CORNELL, 2002).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

β -lactoglobulina (90% de pureza), α -lactalbumina (90% de pureza) e glicomacropéptido (85% de pureza) foram obtidos da Davisco Foods International Inc. (La Sueur, MN, USA). Glucono- δ -lactona (GDL), NaOH e Na₃N foram obtidos da Sigma Aldrich Inc (St. Louis, MO, USA).

4.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES PROTEICAS

As soluções de proteínas β -Lg, α -La e GMP foram preparadas separadamente pela dispersão em água ultrapura (Milli Q gradiente, Millipore, USA) a uma concentração de 8,5% (m/v) sob agitação magnética suave, para evitar a formação de espuma, por 30 minutos à temperatura ambiente. Uma vez preparadas, as soluções tiveram seu pH ajustado para 7,5 com NaOH (1 e 0,1 N). As soluções proteicas foram deixadas em repouso durante a noite a 4°C para sua completa reidratação e em seguida foram centrifugadas (5804R, Eppendorf, Alemanha) a 4900 *g* por 30 min. Após isto, as soluções foram aquecidas separadamente até 80°C e mantidas nesta temperatura por 20 min (RABIEY e BRITTEN, 2009). Após o tratamento térmico, as soluções proteicas foram rapidamente resfriadas em banho de água até a temperatura ambiente. As soluções de proteínas desnaturadas foram misturadas de acordo com as

concentrações definidas pelo delineamento experimental (Tabela 2, seção 4.6) e adicionadas de quantidade apropriada de solução aquosa de GDL (13,61% m/v), preparada instantes antes de iniciar cada teste, de modo a obter a concentração final constante de 8% m/v de proteínas. A mistura das soluções de GDL e de proteínas previamente desnaturadas foi realizada rapidamente sob agitação manual por 1 min para evitar uma agregação prévia das proteínas e permitir uma rápida dissolução homogênea. A quantidade de GDL presente na mistura do gel foi calculada utilizando-se uma razão GDL/proteínas correspondente a 0,1, de modo que as misturas alcançassem o pH final em torno de 5,20 após 12 horas de incubação a 25°C.

Azida de sódio (0,02% m/v concentração final) foi adicionada a todas as soluções para prevenir o crescimento de micro-organismos (ALTING, 2003).

4.3. CINÉTICA DE GELIFICAÇÃO

A cinética de formação do gel foi monitorada pela medida dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') das soluções proteicas acidificadas com GDL a 25°C. As medidas reológicas foram realizadas em um reômetro MARS (HAAKE MARS, Thermo Electron Corp., Alemanha) equipado com banho termostático (Phoenix 2C30P, Thermo Electron Corp., Alemanha) e com sensor tipo cilindro concêntrico de 20 mm de diâmetro (Z 20 DIN) e *gap* anular de 0,85 mm.

Um volume de 482 μ L de solução aquosa de GDL (13,61% m/v) foi adicionado à solução de proteína previamente desnaturada (8,5% m/v), totalizando um volume de 8,2 mL. A mistura foi imediatamente introduzida no cilindro e coberta com uma fina camada de parafina para prevenir a evaporação e o ressecamento da amostra durante a análise. A varredura de tempo foi realizada sob deformação de 1% e frequência de 1 Hz, e a formação do gel foi monitorada no período de 12 h, de modo que o sistema alcançasse o

equilíbrio das propriedades reológicas (G' e G''). A deformação empregada não excedeu a região de viscoelasticidade linear, uma vez que as equações utilizadas neste trabalho limitam-se às condições lineares de viscoelasticidade.

O início da gelificação foi definido como o tempo quando G' foi maior que 1 Pa (VAN MARLE e ZOON, 1995). A diminuição do pH dos sistemas proteicos devido à hidrólise da GDL foi monitorada utilizando-se um pHmetro (HI 223, Hanna instruments, Brasil) durante todo o processo. Para estas medidas, alíquotas de 3 mL das amostras foram colocadas em tubos falcon e mantidas a 25°C. No início da cinética de acidificação, os valores de pH foram medidos a cada 30 minutos durante as 2 primeiras horas e depois a cada 1 hora por 10 horas, quando se alcançou o estado estacionário, ou seja, quando o valor de pH não se alterou significativamente com o passar do tempo.

4.4. REOLOGIA

4.4.1. TESTE DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO

Teste de fluência e recuperação (*creep-recovery*) foi conduzido a 25°C usando um reômetro MARS (HAAKE MARS, Thermo Electron Corp., Alemanha) equipado com sensor de placas paralelas de 35 mm de diâmetro e *gap* de 1 mm. A mistura gelificante foi preparada conforme descrito na seção 4.2 e a formação do gel ocorreu no próprio reômetro. O sensor foi coberto com um dispositivo plástico apropriado para evitar a evaporação da amostra durante a gelificação, que ocorreu por um período de 4 h. Após esse período, o teste de fluência e recuperação foi realizado pela aplicação de uma tensão de cisalhamento constante de 15 Pa por 30 minutos. Em seguida, após a remoção da tensão, a etapa de recuperação da amostra foi conduzida por 20 min. Os dados de deformação com o tempo foram analisados usando um modelo

mecânico análogo à composição mola/amortecedor. O modelo simplificado de Burgers (equação 19) foi aplicado (CHUANG e YEH, 2006):

$$\frac{\gamma}{\tau} = \frac{\gamma_1}{\tau} + \frac{\gamma_2}{\tau} + \frac{\gamma_3}{\tau} = \frac{1}{G_1} + \frac{t}{G_2(\lambda + t)} + \frac{1}{\mu_3} t \quad (\text{eq. 19})$$

onde γ é a deformação total no tempo t (s), a qual consiste de γ_1 (deformação elástica instantânea, que reflete a dureza do material), γ_2 (deformação elástica de atraso, que reflete o curso gradual da extensão das cadeias macromoleculares), e γ_3 (deformação viscosa, que reflete o deslocamento relativo das macromoléculas). τ (Pa) é a tensão de cisalhamento constante aplicada, G_1 (Pa) é o módulo elástico instantâneo, G_2 (Pa) é o módulo elástico de atraso, μ_3 (Pa.s) é o módulo viscoso e λ (s) é o tempo de atraso, o qual é definido como o tempo requerido para levar a deformação a 63,2% do total esperado no modelo de Kelvin.

4.4.2. TESTES DE RELAXAÇÃO DE TENSÃO

Géis em formato cilíndrico (20 mm de diâmetro por 20 mm de altura) foram confeccionados, conforme descrito anteriormente (seção 4.2), em tubos de PVC, cujas extremidades foram vedadas. A parede interna dos tubos foi recoberta com uma fina camada de parafina, a fim de evitar que os géis fossem arranhados ao serem retirados dos moldes. O teste de relaxação de tensão foi realizado à temperatura ambiente, após incubação dos géis por 24 h a 25°C e posterior acondicionamento a 5°C por 3 dias. Antes das análises, os géis foram condicionados à temperatura ambiente por 30 min.

O teste foi realizado usando um reômetro MARS (HAAKE MARS, Thermo Electron Corp., Alemanha) equipado com sensor de placas paralelas

de 20 mm de diâmetro. As amostras foram comprimidas utilizando-se uma velocidade de compressão constante de 0,48 mm/min até atingir a deformação final de 10% (2 mm) da altura do gel. A força requerida para manter a deformação de 10% foi registrada a cada 0,25 min durante 25 min.

As curvas de relaxação de tensão foram inicialmente normalizadas e linearizadas (equação 20), de acordo com o método de Peleg (1979):

$$\frac{\sigma_0 - \sigma(t)}{\sigma_0 - \sigma_\infty} = k_1 + k_2 \cdot t \quad (\text{eq. 20})$$

onde σ_0 (Pa) é o valor máximo de tensão medido no início do ensaio, $\sigma(t)$ (Pa) é a tensão após t segundos, k_1 (s) e k_2 são constantes da equação e t é o tempo (s). O recíproco de k_1 descreve a taxa de decaimento inicial da tensão e o recíproco de k_2 representa o valor hipotético da assíntota da tensão normalizada (STEFFE, 1996).

4.5. MICROESTRUTURA

Os géis foram confeccionados sobre lâminas finas e incubados a 25°C por 24 h para a análise de microscopia de força atômica, que foi realizada no Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da UFV. Pequenos pedaços dos géis foram fixados com fita adesiva no porta-amostra e observados em um microscópio de força atômica (Universal SPM System Ntegra Prima/NT-MDT). As medidas foram realizadas utilizando o modo denominado de semi-contato (intermitente), no qual a ponta fica em contato intermitente com a superfície. Para cada gel observado foram formadas imagens de uma área de varredura de (10 x 10) μm .

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Delineamento experimental: Para este trabalho foi utilizado um planejamento experimental de modelagem de misturas com 3 componentes. O delineamento simplex-centróide para a mistura de α -La, β -Lg e GMP foi gerado considerando a restrição mínima de 1,6% (m/v) de β -Lg em cada formulação. As proporções dos componentes das misturas geradas estatisticamente (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) estão representadas na Tabela 2 em termos dos componentes originais e em pseudocomponentes.

O delineamento consistiu de 6 combinações de níveis dos fatores mais 4 pontos centrais (simplex-centróide), que constituem as repetições e permitiram a determinação do erro experimental.

Tabela 2: Planejamento estatístico de mistura para as misturas compostas por β -Lg, α -La e GMP.

Gel	Composição (% m/v)			Pseudocomponente **		
	β -Lg (x_1)	α -La (x_2)	GMP (x_3)	β -Lg (x_1)	α -La (x_2)	GMP (x_3)
1	8,00	0,00	0,00	1	0	0
2	1,60	6,40	0,00	0	1	0
3	1,60	0,00	6,40	0	0	1
4	4,80	3,20	0,00	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
5	4,80	0,00	3,20	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
6	1,60	3,20	2,30	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
7*	3,73	2,13	2,13	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$

* Mistura correspondente ao ponto central.

** Os pseudocomponentes foram calculados a partir das equações:

$$x_1 = \frac{[\beta - Lg] - 1,6}{6,4} ; \quad x_2 = \frac{[\alpha - La]}{6,4} \quad \text{e} \quad x_3 = \frac{[GMP]}{6,4} .$$

Estimativas dos parâmetros reológicos: As funções respostas de interesse foram os parâmetros reológicos. Para realização da modelagem estatística foi empregado o pacote estatístico SAS, versão 9.0. O modelo simplificado de Burgers (eq. 18) foi ajustado aos dados reológicos de fluência e recuperação e os parâmetros G_1 , G_2 , μ_3 e λ foram estimados para cada tratamento utilizando o procedimento PROC NLIN do SAS. Da mesma forma, o método de Peleg (eq. 19) foi ajustado aos dados de relaxação de tensão e os parâmetros k_1 e k_2 foram estimados para cada tratamento utilizando o procedimento PROC GLM do SAS.

A partir dos dados obtidos, foram calculados modelos empíricos para os parâmetros estudados (de gelificação e reológicos) em função da composição

da mistura. Na representação do ajuste dos valores desses parâmetros utilizaram-se os seguintes modelos (equações 21, 22 e 23) em termos de pseudocomponentes:

$$\hat{Y} = b'_1 x'_1 + b'_2 x'_2 + b'_3 x'_3 \quad (\text{eq. 21})$$

$$\hat{Y} = b'_1 x'_1 + b'_2 x'_2 + b'_3 x'_3 + b'_{12} x'_1 x'_2 + b'_{13} x'_1 x'_3 + b'_{23} x'_2 x'_3 \quad (\text{eq. 22})$$

$$\hat{Y} = b'_1 x'_1 + b'_2 x'_2 + b'_3 x'_3 + b'_{12} x'_1 x'_2 + b'_{13} x'_1 x'_3 + b'_{23} x'_2 x'_3 + b'_{123} x'_1 x'_2 x'_3$$

onde $\hat{Y}$ é a estimativa do parâmetro estudado, b' são os coeficientes das equações (determinados conforme Cornell, 2002) e x' é a proporção dos pseudocomponentes.

Os modelos obtidos foram avaliados em termos de sua significância estatística ($p < 0,05$), falta de ajuste e coeficiente de determinação (R^2) ao nível de 5% de probabilidade. A significância dos coeficientes do modelo foi avaliada pelo teste t de STUDENT ($p < 0,05$). As curvas de contorno obtidas dos modelos ajustados foram utilizadas para analisar o comportamento de cada resposta estudada em função das proporções entre as diferentes proteínas

utilizadas. A análise desses dados e a obtenção dessas figuras foram realizadas na interface ADX do SAS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da composição proteica nas propriedades de gelificação e reológicas, e na morfologia dos géis das principais proteínas do soro (β -Lactoglobulina, α -Lactalbumina e Glicomacropeptídeo) foi avaliado, de acordo com um planejamento experimental de modelagem de mistura, por meio de análises reológicas e de microscopia de força atômica.

5.1. CINÉTICA DE ACIDIFICAÇÃO

A variação no valor de pH em função do tempo de acidificação após a adição de GDL às soluções de proteínas termicamente desnaturadas pode ser observada na Figura 20. O ácido glucônico oriundo da hidrólise de GDL provocou uma rápida redução de pH durante as primeiras 5 horas, seguida de uma diminuição mais lenta até tender a alcançar um valor de equilíbrio. O monitoramento do pH foi realizado por 12 horas, pois este intervalo de tempo foi suficiente para que o pH tendesse a atingir o equilíbrio. O perfil de acidificação obtido para cada gel foi bastante semelhante, com valores finais de pH variando entre 5,08 e 5,49 após 12 horas de acidificação.

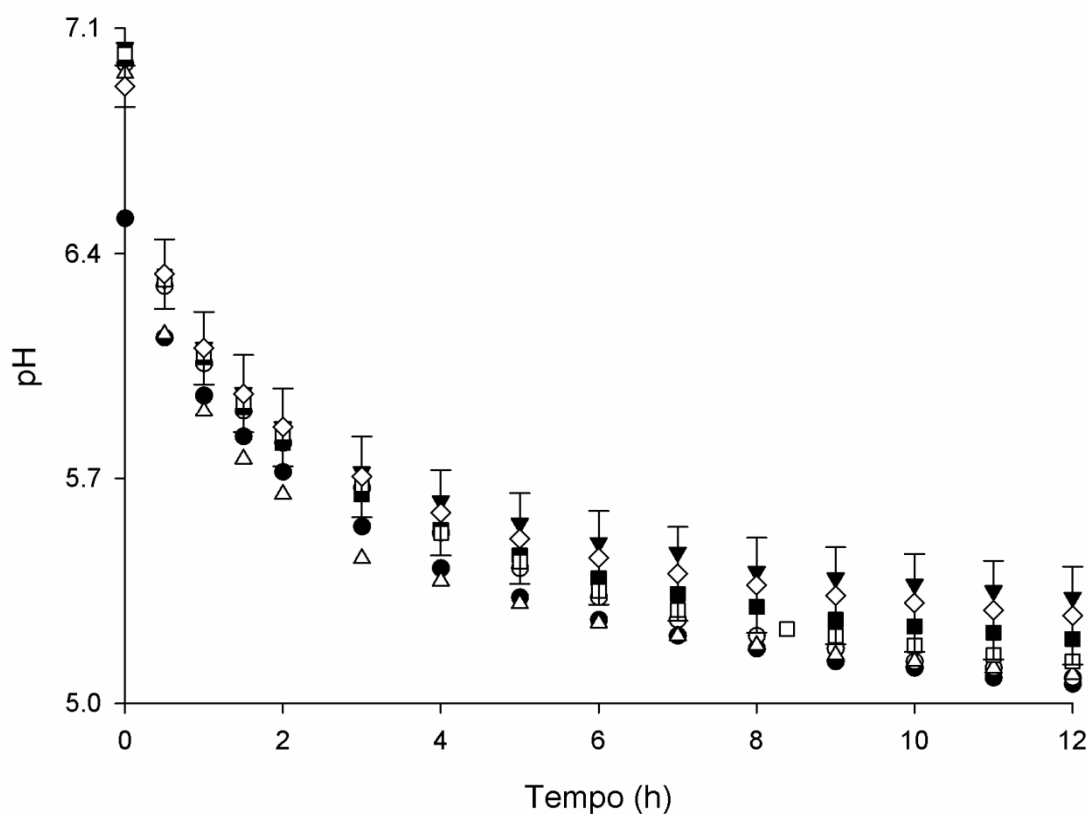


Figura 20: Curva de decaimento de pH promovido pela adição de GDL (razão GDL/proteínas de 0,1) às soluções de proteínas desnaturadas correspondentes aos géis 1 [●]; 2 [○]; 3 [▼]; 4 [◇]; 5 [△]; 6 [■]; 7 [□] incubados a 25 °C.

A equação de cinética de primeira ordem (equação 24) foi ajustada aos dados da curva de acidificação:

$$pH(t) = pH_0 + C \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (\text{eq. 24})$$

onde pH_0 é o valor de pH no estado estacionário, t é o tempo (h) após a adição de GDL, k é a taxa do processo de acidificação (h^{-1}) e C é uma constante de ajuste.

Os parâmetros obtidos pelo ajuste por meio de análise de regressão não linear encontram-se disponíveis na Tabela 3. Os coeficientes de determinação dos ajustes foram satisfatórios ($R^2 > 96,10\%$).

Tabela 3: Parâmetros de ajuste do modelo de cinética de acidificação obtidos para os diferentes géis.

Gel	Pseudo- componentes			Composição (% m/v)			Parâmetros			R ² (%)
	β -Lg	α -La	GMP	β -Lg	α -La	GM P	pH_0^*	C	k (h ⁻¹)	
1	1	0	0	8,00	0,00	0,00	5,08 ^A	1,34	0,37	99,12
2	0	1	0	1,60	6,40	0,00	5,16 ^A	1,63	0,46	96,10
3	0	0	1	1,60	0,00	6,40	5,42 ^A	1,48	0,65	96,13
4	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	4,80	3,20	0,00	5,21 ^A	1,63	0,49	96,53
5	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	4,80	0,00	3,20	5,18 ^A	1,65	0,71	96,65
6	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1,60	3,20	2,30	5,28 ^A	1,58	0,57	96,98
7	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	3,73	2,13	2,13	5,34 ^A	1,45	0,53	97,83

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

Embora os valores de pH de equilíbrio (pH_0) tenham variado entre 5,08 e 5,42, não foi observada diferença significativa entre esses de acordo com teste de Duncan ($p > 0,05$).

5.2. CINÉTICA DE GELIFICAÇÃO

O estudo da cinética de gelificação das soluções de proteínas do soro durante a acidificação com GDL foi realizado através da varredura de tempo

isotérmica, na qual os módulos elástico (G') e viscoso (G'') foram monitorados ao longo do período de acidificação (12 h).

O desenvolvimento dos módulos oscilatórios (G' e G'') ao longo do tempo apresentou um padrão comum para todas as misturas proteicas avaliadas, diferindo basicamente no tempo de gelificação e na magnitude desses módulos quando o equilíbrio foi atingido. Desta forma na Figura 21 é apresentada a curva de cura isotérmica apenas para o gel 1, constituído puramente por β -Lg (8% m/v).

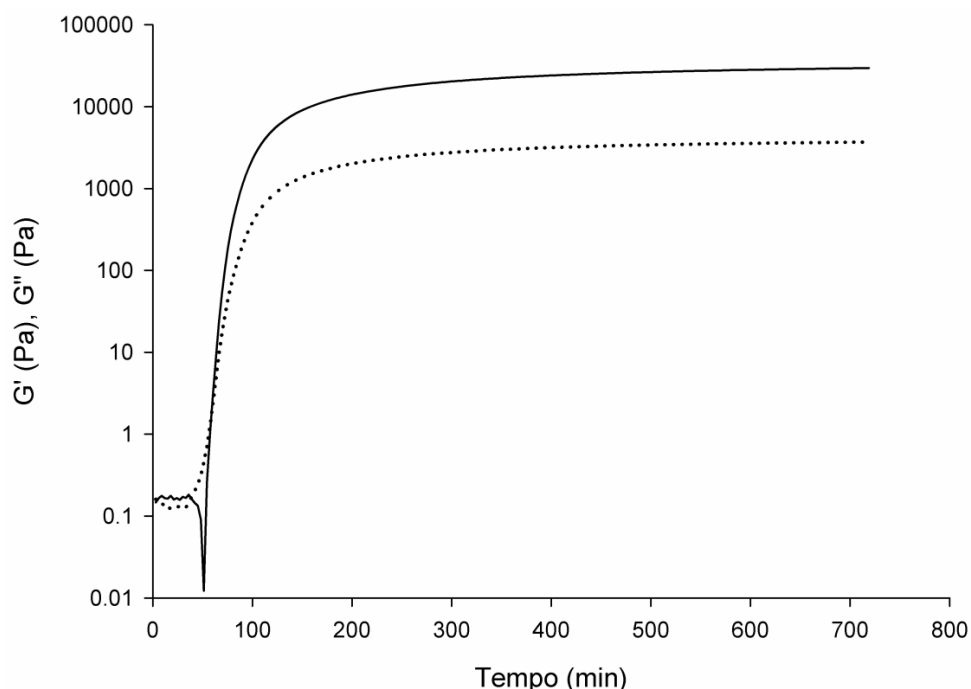


Figura 21: Curva de cura isotérmica [G' — , G'' ] para o gel 1 (8% m/v β -Lg) incubado a 25°C.

Para todas as misturas de proteínas avaliadas G' foi maior que G'' , mesmo no início do teste, ao contrário do que seria de se esperar para um líquido, revelando um comportamento mais elástico do sistema mesmo antes da gelificação ocorrer. Outros estudos sobre gelificação de proteínas globulares também apresentaram predomínio de G' sobre G'' antes da formação do gel

(GOSAL, CLARK *et al.*, 2004; TOBITANI e ROSS-MURPHY, 1997). Esse predomínio do comportamento elástico sobre o viscoso antes da gelificação sugere que as soluções já se encontravam bem estruturadas antes do ponto de gelificação, de modo análogo a um sistema coloidal carregado (TOBITANI e ROSS-MURPHY, 1997).

Além do predomínio de G' sobre G'' , a evolução desses módulos ao longo do tempo (Figura 21) apresentou grandes desvios nos minutos iniciais do teste, em virtude da leitura do torque inicial ter estado bem abaixo do limite mínimo do equipamento ($0,05 \mu\text{Nm}$), estando então fora da faixa de operação. Situação semelhante também ocorreu em outros estudos de gelificação (TOBITANI e ROSS-MURPHY, 1997). Somente instantes antes do início da gelificação o torque se tornou corretamente mensurável e o sinal de saída, correto. Observou-se então um rápido crescimento exponencial dos módulos, o que reflete a rápida agregação inicial das moléculas de proteínas para formar a rede tridimensional que dá origem ao gel, seguido por um aumento lento/retardado dos mesmos, que representa a posterior inclusão de moléculas ainda não agregadas à estrutura tridimensional. Após decorrido determinado tempo, os módulos tenderam a um equilíbrio, e assim a um *plateau*.

Segundo Kavanagh, Clark *et al.* (2000) e Kasapis e Norton (2009), em geral o módulo G' continua a aumentar com o tempo e é dependente da frequência utilizada, embora em menor medida. Ao se trabalhar com sistemas diluídos, o tempo necessário para se atingir o *plateau* é muito longo. Para contornar as dificuldades impostas por longos períodos de medição, como evaporação da amostra e tempo e custo de operação do equipamento, o procedimento de ajuste de um modelo à curva de G' em função do tempo é muito empregado para determinar quando o módulo elástico de equilíbrio é alcançado e quantificá-lo.

Os valores de G' de equilíbrio foram obtidos neste trabalho pela utilização da equação empírica a seguir, conforme sugerido por Kavanagh, Clark *et al.* (2000):

$$G'(t) = G'_{\infty} \exp\left(-\frac{B}{t}\right) \quad (\text{eq. 25})$$

onde t é o tempo (s), B é um parâmetro empírico (s) e G'_{∞} é o valor de G' no tempo infinito (ou seja, G' de equilíbrio). Este modelo reproduz satisfatoriamente o limite assintótico quando $t \rightarrow \infty$.

Os parâmetros e os coeficientes de determinação (R^2) obtidos pelo ajuste da equação 25 aos dados de G' em função do tempo, assim como os valores finais experimentais dos módulos elástico e viscoso, são dados na Tabela 4 para os diferentes géis avaliados.

Tabela 4: Parâmetros estimados pelo ajuste da equação 25 e valores de G' e G'' finais experimentais para os diferentes géis avaliados.

Gel	Pseudocomponentes			Composição (% m/v)			Parâmetros estimados			Valores finais experimentais	
	β -Lg	α -La	GMP	β -Lg	α -La	GMP	G'_{∞} (Pa)	B (s)	R ² (%)	G' (Pa)	G'' (Pa)
1	1	0	0	8,00	0,00	0,00	41250,9	13358,8	99,28	29580,0	3688,0
2	0	1	0	1,60	6,40	0,00	20795,6	30439,3	98,19	9884,0	2143,0
3	0	0	1	1,60	0,00	6,40	276,7	14800,2	99,62	201,8	26,5
4	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	4,80	3,20	0,00	31334,6	25581,9	98,71	16790,0	2696,0
5	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	4,80	0,00	3,20	10903,4	13832,7	99,97	7980,0	1048,0
6	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1,60	3,20	2,30	2811,8	17104,0	99,90	1897,0	357,4
7	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{8}$	3,73	2,13	2,13	11923,4	18125,3	99,76	7785,5 ± 231,9	1216,5 ± 28,4

Como pode ser visto na Tabela 4, excelentes ajustes foram obtidos entre os dados experimentais e preditos ($R^2 > 98,19\%$).

A influência da composição da mistura proteica sobre o G'_{∞} foi descrita pelo seguinte modelo polinomial (equação 26):

$$G'_{\infty} = 41354,68 x_1 + 20899,38 x_2 + 276,7 x_3 - 39649,17 x_1 x_2 - 31104,97 x_2 x_3 - 28515,87 x_1 x_3$$

no qual x_1 , x_2 e x_3 correspondem às proporções em pseudocomponentes de β -Lg, α -La e GMP, respectivamente. A Tabela 5 apresenta a análise de variância (ANOVA) deste modelo.

Tabela 5: ANOVA e coeficiente de determinação do ajuste do modelo para G'_{∞} .

Fontes de variação	GL	QM	Pr > F	R ² (%)
Regressão	5	2,81E+08	0,0001	99,97
Erro	4	102738,3		
Falta de ajuste	1	64625,88	0,5087	
Erro puro	3	115442,5		
Total	9			

Sendo: GL = grau de liberdade e QM = quadrado médio.

A ANOVA demonstrou que o modelo foi significativo ($p < 0,05$) e não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$). O coeficiente de determinação de 99,97% indicou um bom ajuste do modelo proposto aos dados experimentais.

A Tabela 6 apresenta os efeitos estimados, seus erros padrões e p-valor.

Tabela 6: Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p).

Fatores	Efeito estimado	Erro padrão	Pr > t
x_1	41354,68	292,60	0,0001
x_2	20899,38	292,60	0,0001
x_3	276,70	320,53	0,4368
$x_1 x_2$	-39649,20	1548,30	0,0001
$x_2 x_3$	-31105,00	1548,30	0,0001
$x_1 x_2 x_3$	-28515,90	7104,24	0,0159

O efeito de x_3 , embora não tenha sido significativo, foi mantido no modelo de modo a se manter a hierarquia do mesmo e por ser um efeito principal.

A representação das curvas de contorno (Figura 22) geradas a partir do modelo estimado para G'_∞ permite uma melhor visualização dos efeitos dos componentes da mistura proteica sobre G'_∞ .

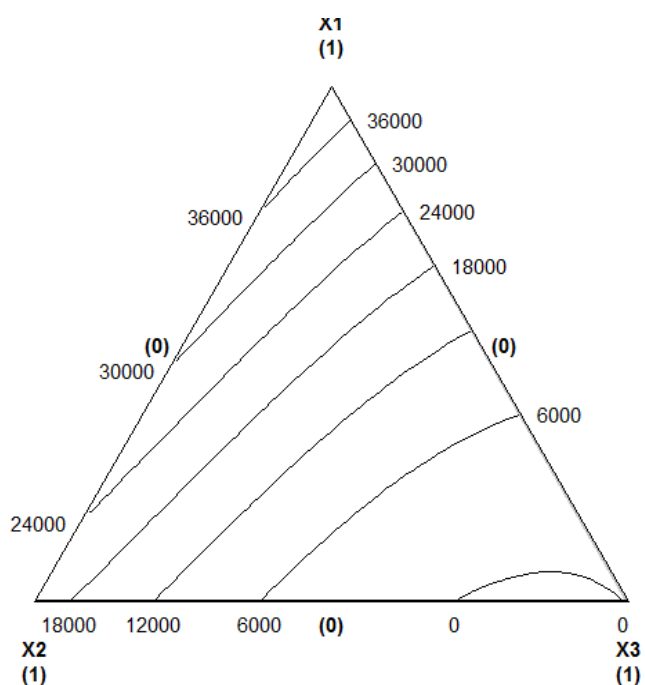


Figura 22: Curvas de contorno do modelo referente à G'_∞ .

Na Figura 22, os componentes X1, X2 e X3 representam as proporções (em pseudocomponentes) de β -Lg, α -La e GMP, respectivamente.

De acordo com a Tabela 6 e a Figura 22, tem-se que a proporção de β -Lg foi a componente que mais contribuiu para o aumento de G'_{∞} , seguida pela proporção de α -La. Sendo assim, maiores valores de G'_{∞} foram alcançados quando β -Lg estava presente em maior proporção. Por outro lado, menores valores deste mesmo parâmetro foram obtidos para misturas com maior proporção de GMP.

O maior valor de G'_{∞} associado a maiores proporções de β -Lg pode indicar que as interações entre as moléculas dessa proteína foram mais intensas que as interações entre as demais moléculas de proteínas, resultando na formação de uma rede mais elástica, o que explicaria o maior valor do módulo elástico. Essa maior intensidade das interações entre moléculas de β -Lg possivelmente está relacionada à formação de ligações dissulfídicas, uma vez que suas moléculas dispõem de um grupo tiol livre e de 2 ligações dissulfídicas, o que permitiria a formação de novas ligações intermoleculares (através de reações de troca tiol/dissulfeto (S-S/S-H) e/ou da reação de oxidação dos grupos tiol livres), aumentando a força da rede tridimensional do gel. Como a quantidade de ligações dissulfídicas depende da quantidade de grupos tiol disponíveis, provavelmente géis formados com maior proporção de β -Lg apresentaram maior módulo elástico devido à maior concentração de grupos tiol livres, uma vez que α -La e GMP não apresentam grupos tiol livres em suas estruturas.

Estudos realizados por Alting, Hamer *et al.* (2000) comprovaram a formação de ligações dissulfídicas durante a gelificação a frio de proteínas do soro e atribuíram sua formação à proximidade entre grupos tiol e ligações dissulfídicas, promovida por interações não covalentes presentes. Os autores concluíram com esses estudos que a formação de ligações dissulfídicas, além de aumentar a massa molecular dos agregados proteicos formados durante a gelificação ácida, está envolvida na estabilização da rede e no aumento da força do gel.

Rabiey e Britten (2009) também vincularam a formação de ligações covalentes dissulfídicas à estabilidade da rede do gel de proteínas do soro. Segundo esses autores, apesar do baixo pH, a formação de ligações covalentes dissulfídicas, principalmente resultante de reações de troca tiol/dissulfeto (S-S/S-H), induziu a reticulação e a estabilização da rede de proteína desenvolvida. Os autores atribuíram a menor estabilidade e a maior susceptibilidade a rearranjos dos géis elaborados com maior proporção α -La/ β -Lg à menor concentração de grupos tiol reativos.

Além das ligações dissulfídicas, outra interação que provavelmente pode estar relacionada à intensidade das interações que mantém a rede do gel é a interação eletrostática. O valor de pH final (Tabela 3) próximo ao pI da β -Lg (5,2) pode ter favorecido a formação de interações hidrofóbicas entre suas moléculas, o que pode ter reforçado a rede tridimensional do gel e, assim, ter contribuído também (junto às ligações dissulfídicas) para o maior aumento do módulo elástico nos géis com maior proporção desta proteína. Efeito contrário provavelmente pode ter ocorrido com os géis com maior proporção de GMP. Como o pI deste componente de mistura é o menor (3,15), o pH final do meio mais distante de seu pI pode ter propiciado a formação de interações eletrostáticas repulsivas entre suas moléculas, as quais podem ter contribuído de forma negativa para a formação de uma rede elástica. O que, juntamente com a menor quantidade de ligações dissulfídicas, devido à menor proporção de β -Lg presente, explicaria o menor valor do módulo elástico apresentado pelos géis com maior proporção de GMP.

Além de informações sobre o caráter elástico/força dos géis avaliados, o estudo da cinética de gelificação possibilitou também a determinação do ponto de gel, ou seja, o tempo no qual o sistema gelifica.

O ponto de gel ocorre quando o sistema atinge um número crítico de ligações e a estrutura se expande por todo espaço/volume da amostra, passando então a apresentar um comportamento predominantemente sólido (YAMAMOTO, 2002). O ponto de gel pode ser facilmente definido considerando-se as propriedades reológicas do gel. Neste sentido, as medidas

oscilatórias têm a vantagem de permitir a medida da evolução contínua das propriedades viscoelásticas até que a solução polimérica passe pelo ponto de gel (RAO, 2007).

Sendo assim, a partir da avaliação da G' em função do tempo (curva de cura) foi possível determinar o ponto de gelificação de todas as soluções de proteínas avaliadas. Para alcançar uma melhor estimativa do tempo de gelificação, os valores de G' foram medidos em intervalos de 3 minutos durante as 12 horas da análise. Os tempos de gelificação (t_g) e os valores de pH de gelificação (pH_g), obtidos através da aplicação do t_g à equação de cinética de pH (equação 24), são dados na Tabela 7.

Tabela 7: Tempo de gelificação e pH de gelificação estimado pela equação 24 para os diferentes géis avaliados.

Gel	Pseudocomponentes			Composição (% m/v)			Parâmetros	
	β -Lg	α -La	GMP	β -Lg	α -La	GMP	t_g (min)	pH_g
1	1	0	0	8,00	0,00	0,00	57,6	6,02
2	0	1	0	1,60	6,40	0,00	158,2	5,64
3	0	0	1	1,60	0,00	6,40	46,4	6,32
4	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	4,80	3,20	0,00	126,1	5,79
5	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	4,80	0,00	3,20	42,3	6,18
6	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1,60	3,20	2,30	71,8	6,08
7	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	3,73	2,13	2,13	74,8 $\pm 1,7$	6,09 $\pm 0,12$

Como pode ser observado na Tabela 7, o tempo e o pH de gelificação variaram entre 42,3 e 158,2 min e entre 5,64 e 6,32, respectivamente, de acordo com a composição da mistura proteica.

A influência dos componentes da mistura sobre o ponto de gel e o pH de gelificação foi testada e descrita pelos seguintes modelos polinomiais (equações 27 e 28, respectivamente):

$$t_g = 57,95649 x_1 + 158,5565 x_2 + 46,75649 x_3 + 65,67018 x_1 x_2 - 45,92982 x_1 x_3 - 129,1298 x_2 x_3$$

$$pH_g = 6,036 x_1 + 5,692 x_2 + 6,392 x_3 \quad (\text{eq. 28})$$

nos quais x_1 , x_2 e x_3 correspondem às proporções em pseudocomponentes de β -Lg, α -La e GMP, respectivamente. A Tabela 8 apresenta a análise de variância (ANOVA) para esses modelos.

Tabela 8: ANOVA e coeficiente de determinação do ajuste dos modelos para t_g e pH_g .

	Fontes de variação	GL	QM	Pr > F	R ² (%)
t_g	Regressão	5	2291,71	0,0001	99,85
	Erro	4	4,443719		
	Falta de ajuste	1	9,054877	0,1757	
	Erro puro	3	2,906667		
	Total	9			
pH_g	Regressão	2	0,15314	0,0030	81,07
	Erro	7	0,010217		
	Falta de ajuste	4	0,006811	0,7654	
	Erro puro	3	0,014758		
	Total	9			

Sendo: GL = grau de liberdade e QM = quadrado médio.

A ANOVA demonstrou que todos os modelos foram significativos ($p < 0,05$) e não apresentaram falta de ajuste ($p > 0,05$). Os coeficientes de determinação obtidos ($R^2 = 99,85\%$ para t_g e $R^2 = 81,07\%$ para pH_g) indicaram bom ajuste dos modelos.

A Tabela 9 apresenta os efeitos estimados, seus erros padrões e p-valor para os modelos de t_g e pH_g .

Tabela 9: Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para os modelos de t_g e pH_g .

	Fatores	Efeito estimado	Erro padrão	Pr > t
t_g	x_1	57,95649	2,09317	0,0001
	x_2	158,5565	2,09317	0,0001
	x_3	46,75649	2,09317	0,0001
	$x_1 x_2$	65,67018	9,03892	0,0019
	$x_1 x_3$	-45,92980	9,03892	0,0071
	$x_2 x_3$	-129,13000	9,03892	0,0001
pH_g	x_1	6,036	0,080	0,0001
	x_2	5,692	0,080	0,0001
	x_3	6,392	0,080	0,0001

De acordo com a Tabela 9, observa-se a ausência de interação significativa entre os componentes da mistura para o modelo de pH_g .

As representações das curvas de contorno (Figura 23) geradas a partir dos modelos estimados permitem uma melhor visualização dos efeitos dos componentes da mistura proteica sobre t_g e pH_g .

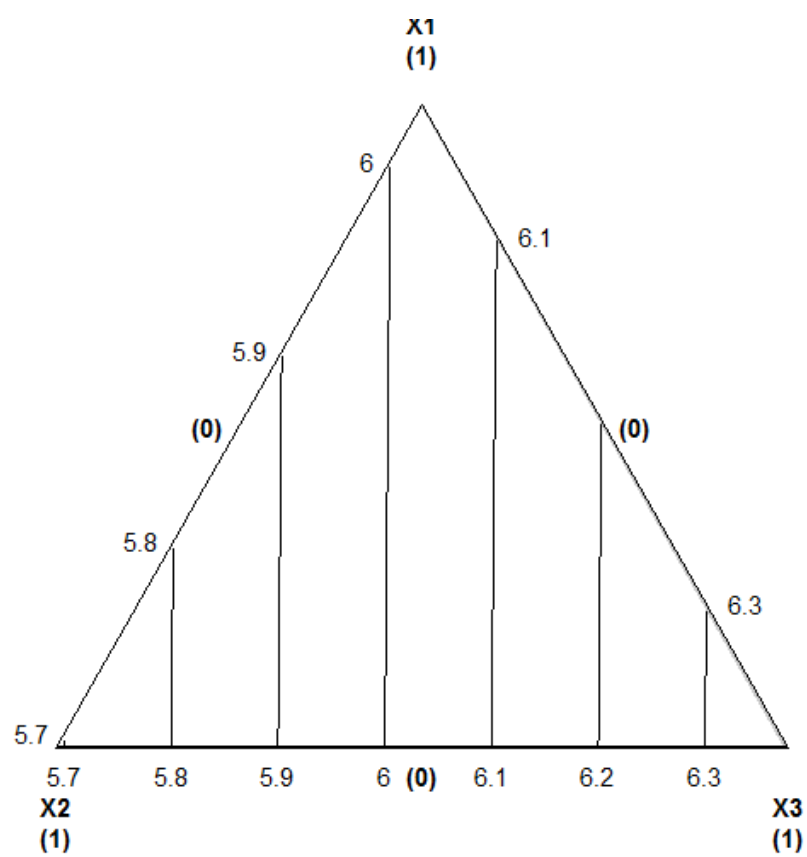
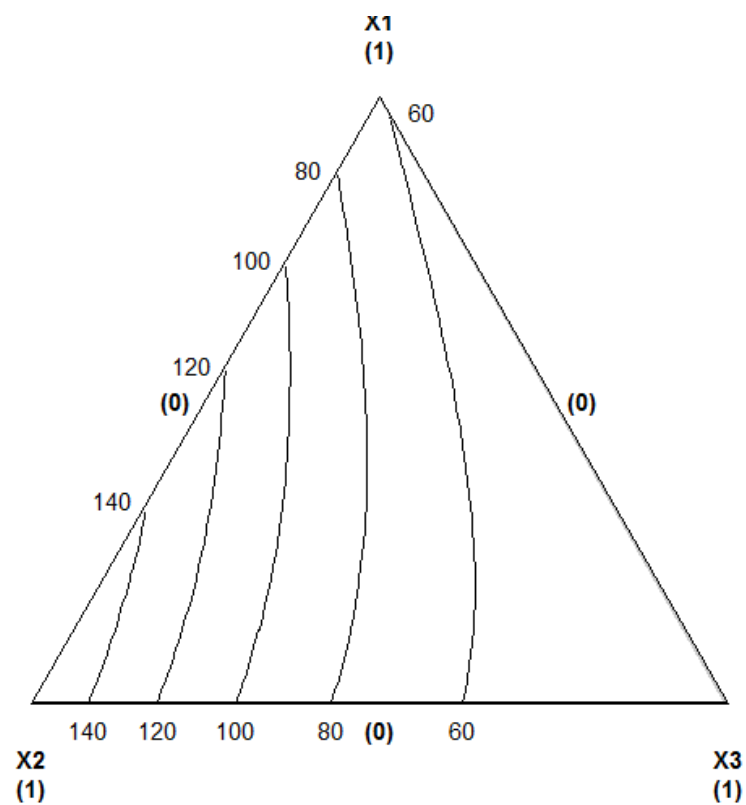


Figura 23: Curvas de contorno dos modelos referentes ao t_g (A) e pH_g (B).

Na Figura 23, os componentes X1, X2 e X3 representam as proporções (em pseudocomponentes) de β -Lg, α -La e GMP, respectivamente.

De acordo com a Tabela 9 e a Figura 23, observa-se que a proporção de α -La foi a componente que mais contribuiu para o aumento do t_g e que β -Lg e GMP apresentaram uma contribuição bem menor e semelhante entre si. Já em relação ao pH_g , observa-se que a contribuição de cada uma das proteínas envolvidas foi praticamente igual, sendo a contribuição de GMP para o aumento de pH_g ligeiramente maior que as demais.

Conforme os dados apresentados, verificou-se que de modo geral quanto menor a proporção de β -Lg e maior a proporção de α -La na mistura, maior foi o tempo de gelificação do sistema. Esse resultado está de acordo com o reportado por Kavanagh, Clark *et al.* (2000) e Rabiey e Britten (2009). Ao estudarem a gelificação termicamente induzida de misturas de β -Lg e α -La em pH 3 e 7, estes autores reportaram que na prática os géis sempre demoraram mais para se formarem quando a concentração de α -La era aumentada, sendo esse tempo significativamente aumentado quando a concentração de α -La era maior que a de β -Lg. Rabiey e Britten (2009), por meio de medidas de potencial zeta e de tamanho da partícula, também observaram uma agregação mais lenta quando a razão α -La/ β -Lg era aumentada.

Por outro lado, quanto maior a proporção de GMP na mistura proteica, menor foi o t_g da mesma. Alguns trabalhos encontrados na literatura também reportaram a diminuição do tempo de gelificação com o aumento da concentração de GMP. Farías, Martinez *et al.* (2010) ao estudarem a gelificação de soluções de caseína-macropeptídeo (CMP) em valores de pH inferiores a 4,5 observaram que o t_g das soluções diminuiu com o aumento da concentração de CMP e com a redução do pH. Martinez, Farías *et al.* (2010b) avaliaram a dinâmica de gelificação termicamente induzida de misturas de GMP e β -Lg e constataram que em pH 7, o aumento da proporção de GMP diminuiu a temperatura de gelificação, e consequentemente o tempo de gelificação. Outro estudo de Martinez, Farías *et al.* (2010a) sobre

autoassociação e gelificação sob aquecimento de CMP revelou que a redução do pH reduziu o t_g de soluções de CMP 12% m/m.

O pH em que se dá o ponto de gel é um reflexo da taxa de reação do sistema. Desse modo, amostras que apresentam valores de pH_g mais elevados possuem maior taxa de reação de gelificação e, conseqüentemente, menor t_g . Assim, é possível verificar através dos dados apresentados na Tabela 7 e na Figura 23 que as misturas contendo maior proporção de GMP gelificaram em valores de pH mais elevados e em menor tempo.

De acordo com a Tabela 7, observa-se que nas misturas binárias de α -La/ β -Lg, o aumento da proporção de α -La levou à diminuição do pH_g . Resultado semelhante foi observado por Rabiey e Britten (2009), que ao estudarem o efeito da composição proteica sobre as propriedades reológicas de gel ácido de proteínas do soro, constataram que o aumento da razão α -La/ β -Lg deslocou o pH de gelificação para valores ligeiramente inferiores e atribuíram a associação dos polímeros à redução da repulsão eletrostática.

5.3. ENSAIOS DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO

Estudos de fluência e recuperação (creep-recovery) permitem a diferenciação entre as respostas elástica e viscosa da amostra, determinando o comportamento da elasticidade e da viscosidade em uma dada tensão (STEFFE, 1996).

A Figura 24 apresenta as curvas de fluência e recuperação dos géis avaliados. Observa-se que todos os géis exibiram curvas típicas de líquido viscoelástico, uma vez que a existência de uma deformação irreversível se fez presente ao final do teste. De acordo com Lefebvre, Renard *et al.* (1998), a existência de uma deformação irreversível não implica necessariamente que

seja um resultado do escoamento, mas a existência de um caráter viscoso nos géis. O comportamento viscoso nos géis significa que as conexões entre os elementos estruturais da rede não são permanentes ao longo da escala de tempo do experimento.

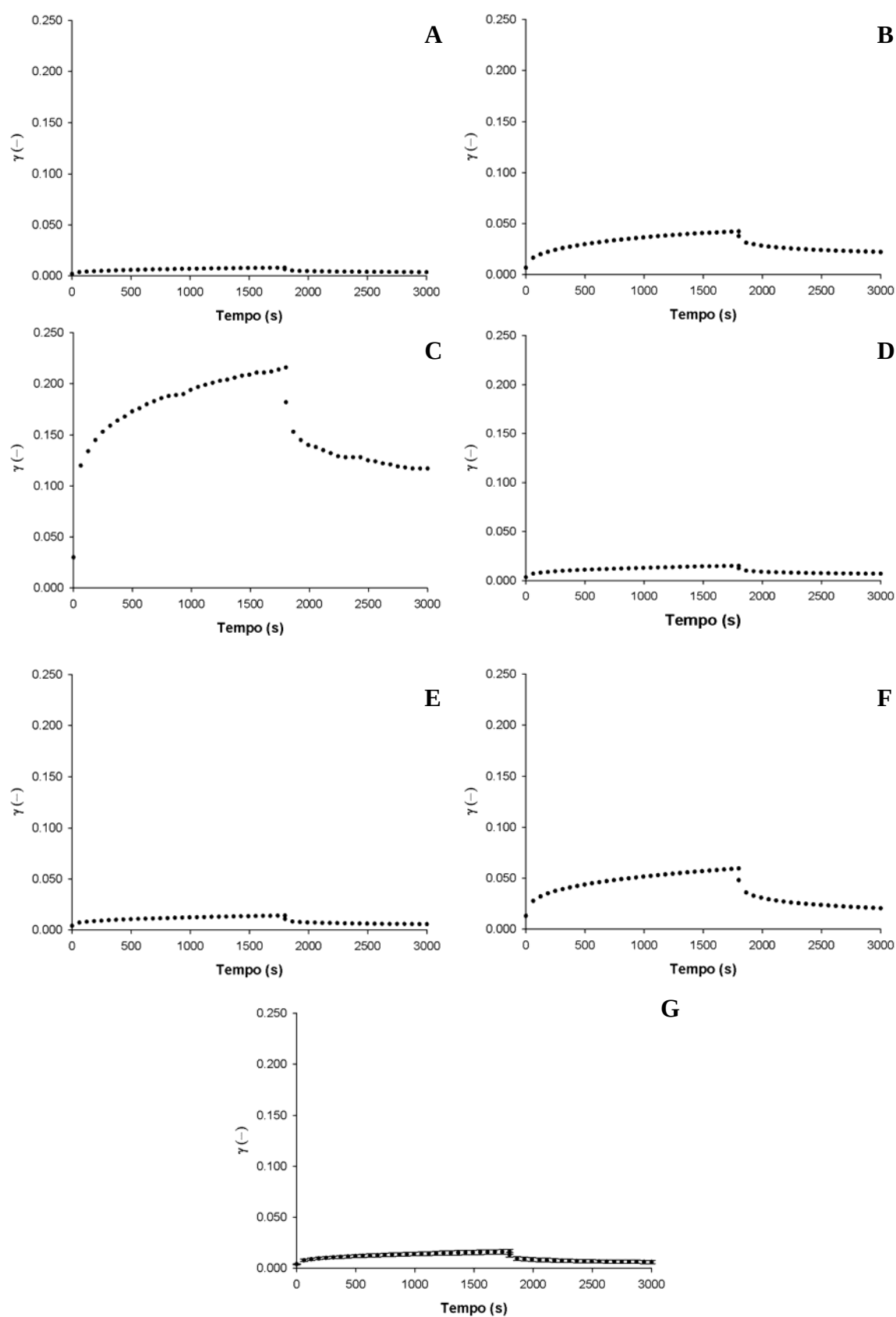


Figura 24: Curvas de fluência e recuperação para os géis ácidos de proteína do soro: gel 1 (A); gel 2 (B); gel 3 (C); gel 4 (D); gel 5 (E); gel 6 (F); e gel 7 (G) incubados a

25°C por 4 h.

O modelo de Burgers simplificado (equação 19) foi ajustado aos dados das curvas de fluência e recuperação e os parâmetros foram obtidos por análise de regressão não linear. Todas as equações da regressão não linear foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Os parâmetros e os respectivos coeficientes de determinação (R^2) obtidos pela regressão são dados na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros do ajuste do modelo de Burgers simplificado $\left(\frac{\gamma}{\tau} = \frac{\gamma_1}{\tau} + \frac{\gamma_2}{\tau} + \frac{\gamma_3}{\tau} = \frac{1}{G_1} + \frac{t}{G_2(\lambda + t)} + \frac{1}{\mu_3} t \right)$ aos dados de fluência e recuperação.

Gel	Pseudocomponentes			Composição (% m/v)			Parâmetros da equação de Burgers				
	β -Lg	α -La	GMP	β -Lg	α -La	GMP	G_1 (Pa)	G_2 (Pa)	λ (s)	μ_3 (Pa.s)	R ² (%)
1	1	0	0	8,00	0,00	0,00	7691,1	3750,8	118,1	$\frac{1125212}{7}$	99,69
2	0	1	0	1,60	6,40	0,00	2060,7	591,3	152,2	2183289	99,70
3	0	0	1	1,60	0,00	6,40	488,8	107,5	44,6	522953	99,61
4	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	4,80	3,20	0,00	4460,7	2020,2	87,5	5679946	99,81
5	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	4,80	0,00	3,20	3703,5	2356,4	89,5	6425275	99,66
6	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1,60	3,20	2,30	1124,7	492,2	91,9	1508363	99,80
7	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{8}$	3,73	2,13	2,13	3684,5	1994,5	85,5	5216304	99,75

Excelentes ajustes foram obtidos entre os dados experimentais e preditos ($R^2 > 99,61\%$), sendo o modelo simplificado de Burgers adequado para explicar o comportamento dos dados de fluência e recuperação dos géis avaliados.

Vale notar que as misturas correspondentes aos géis 4, 5 e 7 apresentaram valores dos parâmetros do modelo simplificado de Burgers (Tabela 10) próximos, o que sugere que suas estruturas internas sejam parecidas. Resultado semelhante também foi observado no ensaio oscilatório (curva isotérmica de cura), no qual os géis 5 e 7 apresentaram curvas praticamente idênticas (dado não mostrado), embora um pouco deslocadas em relação ao tempo, uma vez que apresentaram tempos de gelificação distintos.

As misturas correspondentes aos géis 3 e 1 apresentaram respectivamente os menores e os maiores valores para os parâmetros do modelo de Burgers, indicando que esses géis se deformaram mais e menos facilmente (respectivamente) quando submetidos à uma mesma tensão de cisalhamento, o que indica que suas estruturas internas foram mais frágil e mais forte, nesta ordem. Esses resultados também estão condizentes com os resultados obtidos no ensaio oscilatório, uma vez que o gel 3 apresentou menor módulo elástico de equilíbrio (G'_∞) (276,7 Pa), sendo caracterizado como o gel mais fraco, enquanto o gel 1 apresentou maior G'_∞ (41250,9 Pa), sendo por sua vez o gel mais forte, de maior caráter elástico.

A influência dos componentes da mistura sobre os parâmetros G_1 , G_2 , λ e μ_3 estimados pelo modelo simplificado de Burgers foi testada e descrita pelos seguintes modelos polinomiais (equações 29, 30, 31e 32, respectivamente):

$$G_1 = 7648,203 x_1 + 2112,363 x_2 + 551,9633 x_3 \quad (\text{eq. 29})$$

$$G_2 = 4003,063 x_1 + 729,7833 x_2 + 477,2233 x_3 \quad (\text{eq. 30})$$

$$\lambda = 102,97 x_1 + 131,21 x_2 + 45,93 x_3 \quad (\text{eq. 31})$$

$$\mu_3 = 11409821 x_1 + 2187986 x_2 + 1157849 x_3 \quad (\text{eq. 32})$$

nos quais x_1 , x_2 e x_3 correspondem às proporções em pseudocomponentes de β -Lg, α -La e GMP, respectivamente. A Tabela 11 apresenta a análise de variância (ANOVA) para esses modelos.

Tabela 11: ANOVA e coeficiente de determinação do ajuste dos modelos para G_1 , G_2 , λ e μ_3 .

	Fontes de variação	GL	QM	Pr > F	R ² (%)
G_1	Regressão	2	17382707	0,0001	96,99
	Erro	7	154379,4		
	Falta de ajuste	4	171232,8	0,4323	
	Erro puro	3	131908,3		
	Total	9			
G_2	Regressão	2	4835353	0,0001	91,96
	Erro	7	120773,4		
	Falta de ajuste	4	167185,5	0,2089	
	Erro puro	3	58890,48		
	Total	9			
λ	Regressão	2	2359,112	0,0233	65,83
	Erro	7	349,8339		
	Falta de ajuste	4	480,8574	0,2165	
	Erro puro	3	175,1358		
	Total	9			
μ_3	Regressão	2	3,98E+13	0,0001	92,80
	Erro	7	8,83E+11		
	Falta de ajuste	4	6,67E+11	0,7059	
	Erro puro	3	1,17E+12		
	Total	9			

Sendo: GL = grau de liberdade e QM = quadrado médio.

A ANOVA demonstrou que todos os modelos foram significativos ($p < 0,05$) e apresentaram falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$). Os coeficientes de determinação foram superiores a 90%, indicando um bom ajuste dos modelos, com exceção do modelo estimado para λ , que apresentou R^2 de 65,83%. Embora tenha apresentado um R^2 não satisfatório, ainda assim procedeu-se a análise do modelo, visto que este foi significativo e não apresentou falta de ajuste significativa.

A Tabela 12 apresenta os efeitos estimados, seus erros padrões e p-valor para os modelos de G_1 , G_2 , λ e μ_3 .

Tabela 12: Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para os modelos de G_1 , G_2 , λ e μ_3 .

	Fatores	Efeito estimado	Erro padrão	Pr > t
G_1	X_1	7648,203	312,688	0,0001
	X_2	2112,363	312,688	0,0003
	X_3	551,9633	312,688	0,1209
G_2	X_1	4003,063	276,568	0,0001
	X_2	729,7833	276,568	0,0335
	X_3	477,2233	276,568	0,1281
λ	X_1	102,97	14,885	0,0002
	X_2	131,21	14,885	0,0001
	X_3	45,93	14,885	0,0177
μ_3	X_1	11409821	747767	0,0001
	X_2	2187986	747767	0,0221
	X_3	1157849	747767	0,1655

De acordo com a Tabela 12 não foi observada nenhuma interação significativa entre os componentes da mistura para nem um dos modelos avaliados. Observa-se também que embora o efeito X_3 não tenha sido significativo para G_1 , G_2 e μ_3 , o mesmo foi mantido nos modelos por se tratar de um efeito principal.

As representações das curvas de contorno geradas a partir dos modelos estimados para G_1 , G_2 , λ e μ_3 estão representadas nas Figuras 25, 26, 27 e 28,

respectivamente, nas quais os componentes X_1 , X_2 e X_3 representam as proporções (em pseudocomponentes) de β -Lg, α -La e GMP, respectivamente.

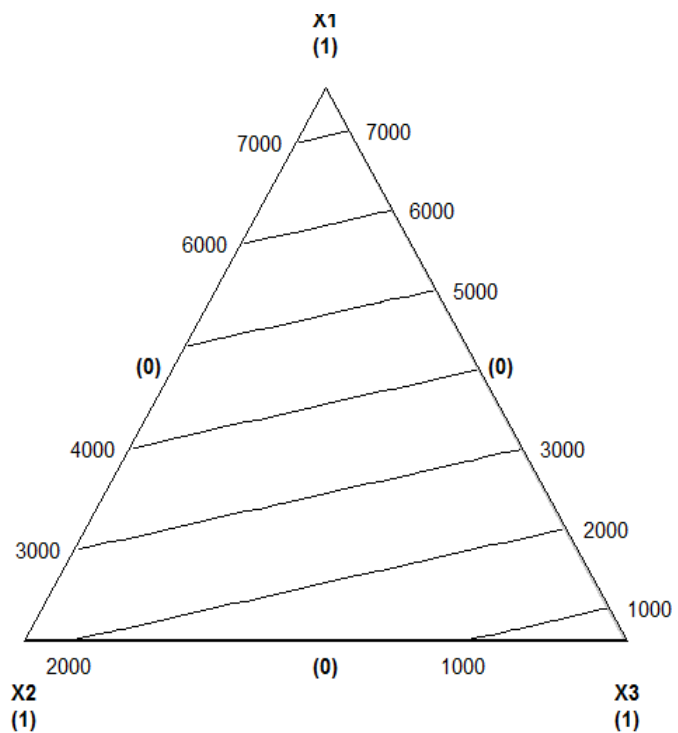


Figura 25: Curvas de contorno do modelo referentes a G_1 .

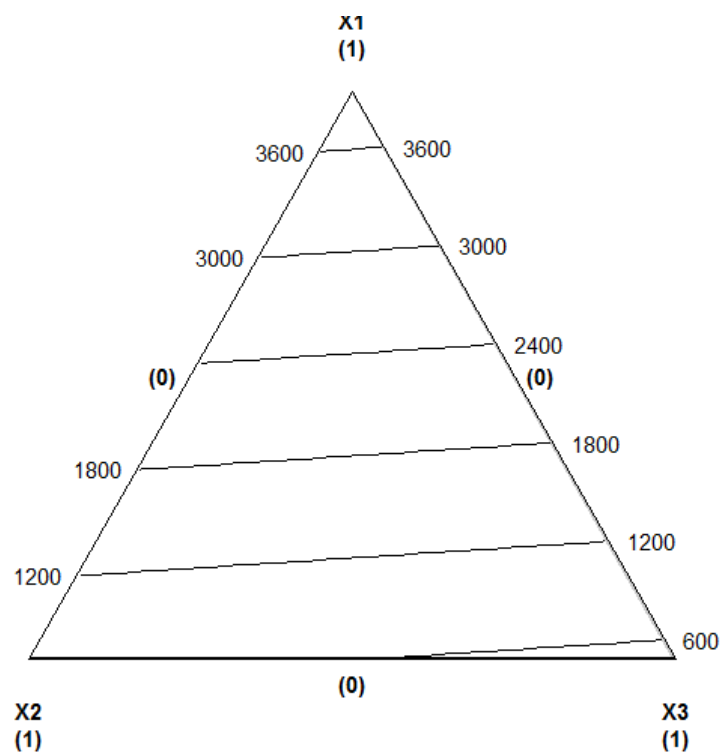


Figura 26: Curvas de contorno do modelo referentes a G_2 .

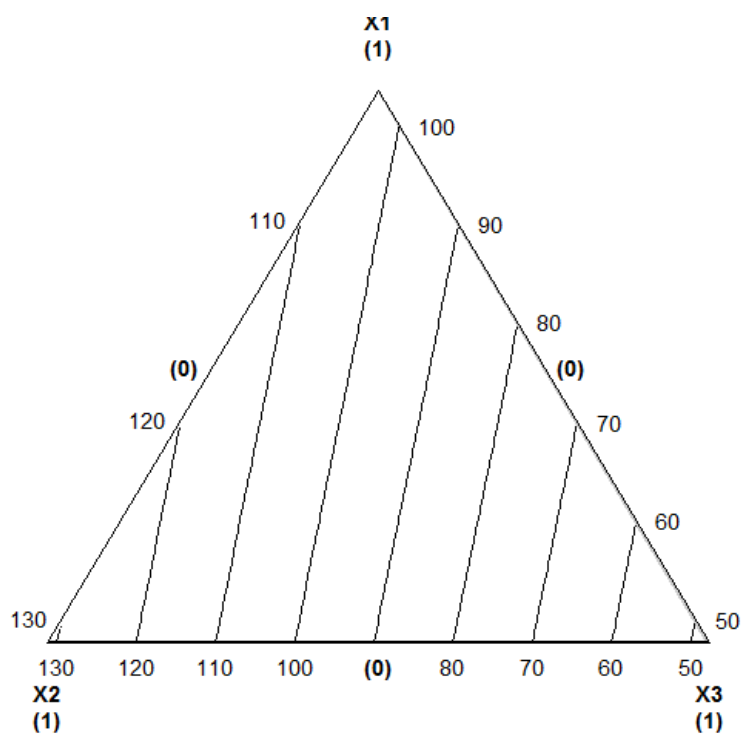


Figura 27: Curvas de contorno do modelo referentes a λ .

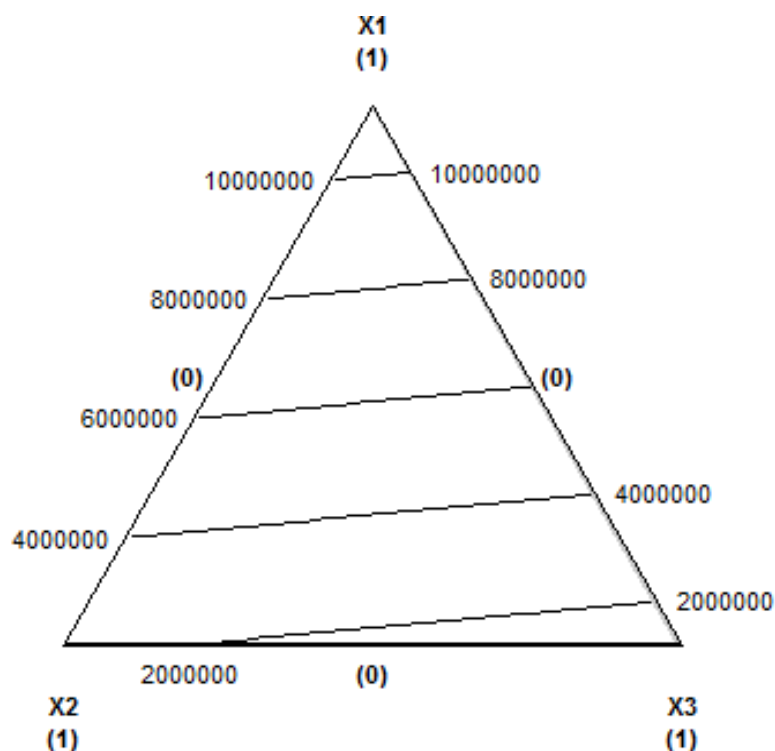


Figura 28: Curvas de contorno do modelo referentes a μ_3 .

De modo geral, observa-se que o aumento da proporção de α -La (X2) e/ou GMP (X3) e consequente redução de β -Lg (X1) resultaram na diminuição dos parâmetros do modelo simplificado de Burgers, o que indica que os géis mistos apresentaram estruturas tridimensionais mais frágeis/fracas que a apresentada pelo gel constituído majoritariamente por β -Lg. Esse resultado pode também ser visualizado na Figura 24, na qual é possível observar que o aumento da proporção de α -La e/ou GMP concomitante diminuição de β -Lg resultou no aumento da deformação total durante a fase de fluência, indicando menor resistência à tensão aplicada. Provavelmente, esse resultado pode estar relacionado à redução da quantidade de ligações dissulfídicas formadas nos géis mistos, devido à diminuição da concentração de β -Lg, uma vez que a formação adicional dessas ligações durante a gelificação a frio de isolado proteico de soro está relacionada à estabilização da rede, que resulta em géis mais fortes (ALTING, 2003).

De acordo com as Figuras 25, 26 e 28, observa-se que β -Lg foi o componente da mistura que mais contribuiu para o aumento de G_1 , G_2 e μ_3 . Já α -La apresentou a maior contribuição para o aumento de λ (Figura 27).

Os parâmetros G_1 e G_2 representam a rigidez e a força coesiva do gel, respectivamente. Sendo assim pode-se dizer que β -Lg é o componente da mistura que conferiu maior rigidez e força coesiva ao gel. α -La apresentou uma contribuição bem menor e a presença de GMP não influenciou esses parâmetros, uma vez que seu efeito foi não significativo (Tabela 12). A maior influência de β -Lg sobre o aumento da rigidez e da força coesiva do gel pode estar relacionada às possíveis ligações dissulfídicas estabelecidas por esta proteína ao formar a rede do gel.

O tempo de retardo λ corresponde ao tempo necessário para esticar/deformar a mola (ligada em paralelo) do modelo mecânico de Burgers (Figura 10) por algum comprimento enquanto esta é retardada pelo amortecedor (ligado em paralelo) (QIU-LIANG, SHEN *et al.*, 2009). Como pode ser observado na Tabela 12, todas as proteínas envolvidas nas misturas estudadas apresentaram efeito significativo. O GMP foi o componente que apresentou a menor contribuição para o aumento de λ . Deste modo, tem-se que quanto maior a proporção de GMP na mistura, menor o λ e, assim, mais rápida a transição entre os regimes elástico e viscoso durante a aplicação de uma tensão cisalhante.

O parâmetro μ_3 , por sua vez, reflete a viscosidade do gel, ou seja, a resistência interna das moléculas ao escoamento. Logo quanto menor o μ_3 , menor é a resistência ao escoamento. Conforme apresentado pela Tabela 12, os únicos componentes capazes de influenciar significativamente μ_3 foram a β -Lg e a α -La, sendo a contribuição da β -Lg para o aumento deste parâmetro cerca de 5 vezes maior que a da α -La. Desta forma observou-se uma pronunciada diminuição de μ_3 com a diminuição da proporção de β -Lg na mistura, indicando uma menor resistência ao escoamento.

Além dos parâmetros G_1 , G_2 , λ e μ_3 , o modelo simplificado de Burgers também permite descrever o comportamento viscoelástico em função das três

etapas que constituem a deformação total. Essas três etapas que compõem o perfil de deformação são: a deformação elástica instantânea (γ_1), a deformação elástica retardada (γ_2) e a deformação viscosa (γ_3). Os valores de γ_1 , γ_2 e γ_3 , calculados a partir dos valores de G_1 , G_2 , λ e μ_3 (Tabela 10) de acordo com a equação 19, são dados na Tabela 13.

Tabela 13: Contribuições do perfil de deformação dos géis em teste de fluência e recuperação.

GEL	Pseudo- componentes			Composição (% m/v)			Perfil de deformação (%)		
	β -Lg	α -La	GMP	β -Lg	α -La	GMP	γ_1	γ_2	γ_3
1	1	0	0	8,00	0,00	0,00	24,07	46,32	29,61
2	0	1	0	1,60	6,40	0,00	16,91	54,35	28,74
3	0	0	1	1,60	0,00	6,40	14,05	62,32	23,63
4	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	4,80	3,20	0,00	22,13	46,59	31,28
5	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	4,80	0,00	3,20	28,29	42,36	29,35
6	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1,60	3,20	2,30	22,14	48,14	29,72
7	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	3,73	2,13	2,13	24,78	43,71	31,51

De acordo com os dados da Tabela 13, praticamente metade da deformação total correspondeu à deformação elástica retardada, cujos valores variaram na faixa de 42,36 a 62,32%. Consequentemente, a outra metade correspondeu à deformação elástica instantânea e deformação viscosa, que apresentaram valores bastante próximos, sendo esta última um pouco maior que a primeira.

No modelo de Burgers, as deformações γ_1 e γ_2 são reversíveis, sendo as recuperações da deformação γ_1 imediata e da deformação γ_2 retardada, como determinada pelo tempo de atraso (λ). A recuperação da deformação ocorre

após cessada a tensão aplicada. Entretanto, a deformação viscosa, γ_3 , é irreversível. Consequentemente, quanto maiores os valores de γ_1 e γ_2 , maior a recuperação da deformação total quando a tensão sobre gel é removida. Desta forma, observou-se, de acordo com a Tabela 13, que os géis avaliados apresentaram predomínio da deformação reversível, que variou entre 68,49 e 76,37%, sobre a irreversível. Resultado similar foi encontrado no estudo com gel de arroz, no qual os autores constataram que a deformação total foi constituída principalmente por uma grande deformação elástica retardada e que a deformação reversível foi superior à irreversível (QIU-LIANG, SHEN *et al.*, 2009).

Novamente a influência da composição da mistura sobre as variáveis respostas foi testada e os seguintes modelos polinomiais foram ajustados de modo a descrever o comportamento de γ_1 e γ_2 (equações 33 e 34, respectivamente) em função da composição da mistura:

$$\gamma_1 = 24,56931 x_1 + 17,36931 x_2 + 14,19603 x_3 + 34,13282 x_1 x_3 + 23,73282 x_2 x_3 \quad (\text{eq. 33})$$

$$\gamma_2 = 45,01305 x_1 + 53,11305 x_2 + 62,35542 x_3 - 46,02366 x_1 x_3 - 39,42366 x_2 x_3 \quad (\text{eq. 34})$$

nos quais x_1 , x_2 e x_3 correspondem às proporções em pseudocomponentes de β -Lg, α -La e GMP, respectivamente.

Por meio do tratamento estatístico dado aos dados experimentais, não foi encontrado nenhum modelo significativo para explicar o efeito da composição proteica da mistura sobre γ_3 . A Tabela 14 apresenta a análise de variância (ANOVA) para os modelos ajustados de γ_1 e γ_2 .

Tabela14: ANOVA e coeficiente de determinação do ajuste dos modelos para γ_1 e γ_2 .

Fontes de variação		GL	QM	Pr > F	R ² (%)
γ_1	Regressão	4	39,80587	0,0020	94,84
	Erro	5	1,731505		
	Falta de ajuste	2	1,105013	0,6427	
	Erro puro	3	2,149167		
	Total	9			
γ_2	Regressão	4	84,56346	0,0015	95,47
	Erro	5	3,210029		
	Falta de ajuste	2	4,771323	0,2582	
	Erro puro	3	2,169167		
	Total	9			

Sendo: GL = grau de liberdade e QM = quadrado médio.

As análises de variância demonstraram que os modelos estimados para γ_1 e γ_2 foram significativos ($p < 0,05$) e apresentaram falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$). Os coeficientes de determinação superiores a 90% indicaram que os modelos foram bem ajustados aos dados experimentais.

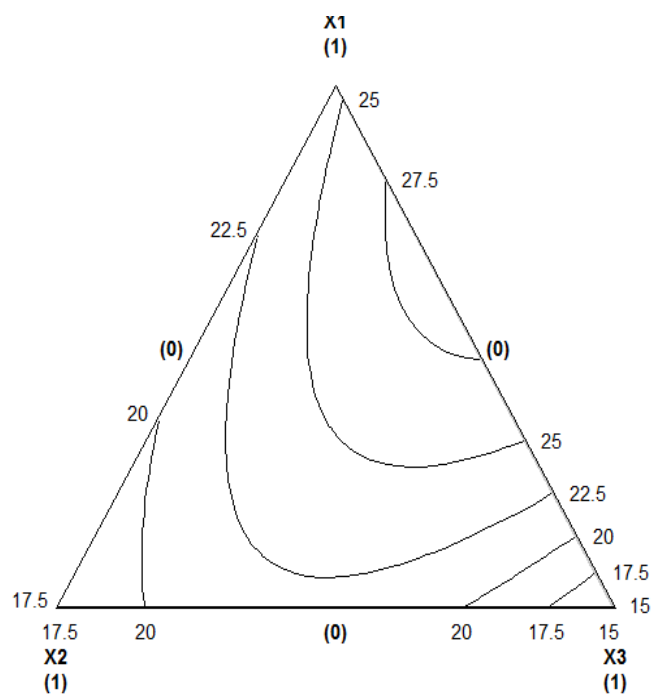
A Tabela 15 apresenta os efeitos estimados, seus erros padrões e p-valor para os modelos de γ_1 e γ_2 .

Tabela 15: Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para os modelos de γ_1 e γ_2 .

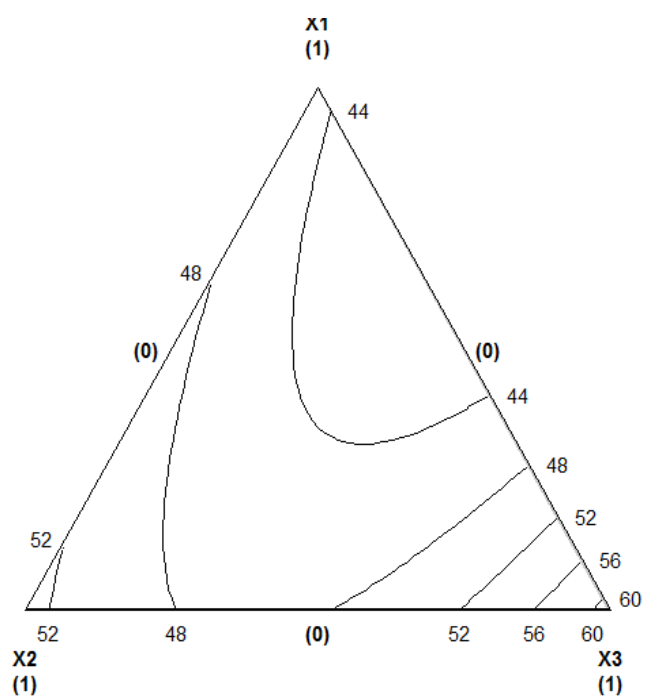
	Fatores	Efeito estimado	Erro padrão	Pr > t
γ_1	X_1	24,56931	1,19533	0,0001
	X_2	17,36931	1,19533	0,0001
	X_3	14,19603	1,30376	0,0001
	X_1X_3	34,13282	5,62050	0,0017
	X_2X_3	23,73282	5,62050	0,0083
γ_2	X_1	45,01305	1,62754	0,0001
	X_2	53,11305	1,62754	0,0001
	X_3	62,35542	1,77517	0,0001
	X_1X_3	-46,02370	7,65275	0,0018
	X_2X_3	-39,42370	7,65275	0,0036

De acordo com a Tabela 15, observa-se a presença das interações significativas X_1X_3 e X_2X_3 nos dois modelos analisados. Todos os termos presentes nos modelos foram significativos.

A partir dos modelos estimados, as seguintes curvas de contorno (Figura 29) foram geradas, permitindo uma melhor visualização dos efeitos dos componentes da mistura sobre γ_1 e γ_2 .



A



B

Figura 29: Curvas de contorno dos modelos referentes a γ_1 (A) e γ_2 (B).

Na Figura 29 os componentes X1, X2 e X3 representam as proporções (em pseudocomponentes) de β -Lg, α -La e GMP, respectivamente.

De acordo com a Figura 29 A, observa-se que misturas compostas principalmente por β -Lg (X1) apresentaram maiores valores de γ_1 , ao passo que menores valores para este parâmetro foram observados para misturas com composição próxima aos vértices X2 e X3, ou seja, compostas majoritariamente por α -La e GMP. Isto indica, então, que a maior proporção de β -Lg conferiu ao gel um perfil de deformação elástica instantânea maior.

Quanto a γ_2 (Figura 29 B), tem-se que as misturas com composição próxima aos vértices X2 e X3 apresentaram maior γ_2 , o que indica que maiores proporções de α -La e GMP resultaram em maior deformação elástica retardada.

Rabiey e Britten (2009), ao avaliar géis ácidos de α -La e β -Lg, reportaram que o aumento da proporção de α -La na mistura α -La/ β -Lg promoveu a redução da deformação elástica instantânea (γ_1) e o aumento da deformação elástica retardada (γ_2), como observado no presente trabalho.

5.4. ENSAIOS DE RELAXAÇÃO DE TENSÃO

Na análise de relaxação de tensão, a amostra relaxa após ser submetida a uma deformação instantânea, sendo então medida a variação da força ao longo do tempo. Durante o curso do experimento, a força total gerada na amostra, devido à compressão feita, é reduzida pela ruptura de ligações de elevado conteúdo energético, seguida pela concomitante formação de ligações com menor conteúdo energético (PELEG, 1987).

A realização da análise de relaxação de tensão não foi possível para os géis 2, 3 e 6, uma vez que o gel 3, embora tenha gelificado, não formou um gel autossustentável e os demais (géis 2 e 6) sofreram intensa sinerese durante a execução da análise, comprometendo os dados obtidos.

As curvas de relaxação de tensão, representadas pela tensão em função do tempo, obtidas pelo teste estão representadas na Figura 30.

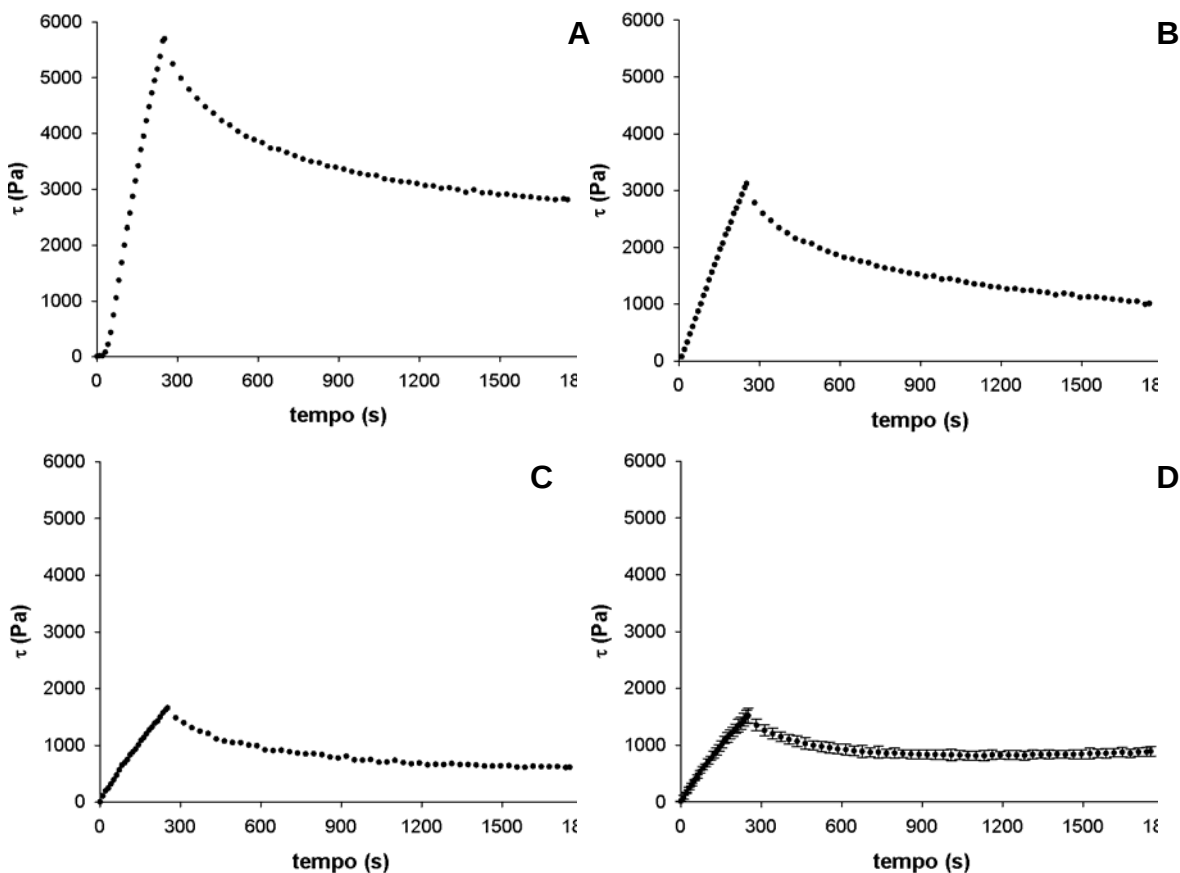


Figura 30: Curvas de relaxação de tensão para os géis ácidos de proteína armazenados a 5°C por 3 dias: gel 1 (A), gel 4 (B), gel 5 (C) e gel 7 (D).

De acordo com a Figura 30, todos os géis avaliados exibiram padrão típico de sólido viscoelástico, no entanto, para a obtenção de uma análise mais detalhada, o modelo de Peleg (eq. 19) foi ajustado aos dados obtidos para determinação das propriedades viscoelásticas.

A capacidade desse modelo em descrever dados de relaxação de tensão em termos de duas propriedades (k_1 e k_2) tem sido reconhecida como um meio simples de descrever e comparar informações de relaxação de tensão em livro-texto de reologia de alimentos (STEFFE, 1996) e, consequentemente,

tem sido aplicada para modelar o comportamento reológico de diversos tipos de alimentos e sistemas biológicos, incluindo espaguete (SOZER, KAYA *et al.*, 2008), gel de gelatina (TANG, TUNG *et al.*, 1998), salsichas (ANDRÁS, ZARITZKY *et al.*, 2008), dentre outros.

Os parâmetros do modelo de Peleg e os respectivos coeficientes de determinação (R^2) obtidos pela regressão são dados na Tabela 16.

Tabela 16: Parâmetros do modelo de Peleg $\left(\frac{V_0 - V}{V_0 - V_1} = k_1 + k_2 \cdot t \right)$ para géis ácidos de proteínas de soro.

Gel	Pseudocomponentes			Composição (% m/v)			Parâmetros após 3 dias de armazenamento			
	β -Lg	α -La	GMP	β -Lg	α -La	GMP	τ_0 (Pa)	k_1 (s)	k_2	R ² (%)
1	1	0	0	8,00	0,00	0,00	5700,917	469,31	1,68	99,78
2	0	1	0	1,60	6,40	0,00	-	-	-	-
3	0	0	1	1,60	0,00	6,40	-	-	-	-
4	1/2	1/2	0	4,80	3,20	0,00	3122,613	392,84	1,27	99,23
5	1/2	0	1/2	4,80	0,00	3,20	1661,574	325,68	1,36	99,73
6	0	1/2	1/2	1,60	3,20	2,30	-	-	-	-
7	1/3	1/3	1/3	3,73	2,13	2,13	1491,278	202,02	2,25	98,06

Excelentes ajustes foram obtidos entre os dados experimentais e preditos ($R^2 > 98,06\%$), sendo o modelo de Peleg adequado para explicar o comportamento dos dados de relaxação de tensão dos géis avaliados.

De acordo com a Tabela 16, a redução da proporção de β -Lg com consequente aumento da proporção de α -La e/ou GMP na mistura resultou na diminuição do valor máximo de tensão medido no início do ensaio (τ_0), indicando assim maior fragilidade e menor estruturação da rede do gel. Este resultado provavelmente pode estar relacionado à diminuição da concentração de grupos tiol reativo na mistura, que é proporcional à concentração de β -Lg. A redução desse grupo reduziria a quantidade de ligações dissulfídicas na rede do gel, que refletiria então na maior fragilidade e menor estruturação da rede.

Rabiey e Britten (2009) ao avaliarem a substituição de β -Lg por α -La em géis induzidos por acidificação também constataram a redução de τ_0 com o aumento da proporção de α -La na mistura. Segundo os autores, o aumento do grau de substituição de β -Lg por α -La reduziu a concentração de grupos tiol reativo, o que causou a redução da reação de reticulação (*crosslinking*) durante a gelificação das dispersões de polímeros, resultando assim na diminuição da dureza do gel.

O inverso do parâmetro k_1 representa a taxa com que a tensão diminui e mede o quão facilmente um material se deforma. Menores taxas de decaimento da tensão sugerem um material mais duro, que dissipa menos energia, e assim exige força maior para ser comprimido (RODRÍGUEZ-SANDOVAL, FERNÁNDEZ-QUINTERO *et al.*, 2009). De acordo com a Tabela 16, observa-se a redução dos valores de k_1 , e consequente aumento da taxa de decaimento da tensão, com a diminuição da proporção de β -Lg na mistura. Este resultado indica que o processo de relaxação de tensão foi claramente mais pronunciado nos géis mistos do que no gel de β -Lg, presumidamente devido à presença de ligações/interações intermoleculares mais fracas nos géis mistos. As reduções nos valores do módulo elástico de equilíbrio (G'_∞) (Tabela 4) e nos parâmetros do modelo simplificado de Burgers (G_1 , G_2 , λ e μ_3) (Tabela 10) quando da

diminuição da proporção de β -Lg estão de acordo com a rápida relaxação de tensão apresentada por esses géis.

O parâmetro k_2 , por sua vez, está relacionado ao comportamento viscoso do material. Seu inverso representa o nível assintótico ao qual a tensão normalizada decai quando o tempo da fase de relaxação tende o infinito. O valor de $1/k_2$ varia entre 0, para sólido puramente elástico (0% de relaxação), e 1, para líquido puramente viscoso (100% de relaxação). Da Tabela 16, observa-se que os géis de misturas binárias (géis 4 e 5) apresentaram os menores valores de k_2 , e consequentemente os maiores valores de $1/k_2$, indicando um comportamento mais viscoso, quando comparado ao gel constituído apenas por β -Lg (gel 1). Já o gel constituído pelas 3 proteínas (gel 7) surpreendentemente apresentou valor de k_2 maior que o gel de β -Lg (gel 1), indicando um comportamento menos viscoso que este (gel 1) após o período de armazenamento. Este resultado provavelmente se deve a formação, ao longo do período de armazenamento, de novas interações/ligações intermoleculares no gel de mistura tripla, as quais seriam responsáveis pela redução do comportamento viscoso neste gel.

Por meio do tratamento estatístico dado aos dados experimentais, não foi encontrado nenhum modelo significativo ($p > 0,05$) para explicar o efeito da composição proteica da mistura sobre os parâmetros k_1 e k_2 .

5.5. CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A técnica de microscopia de força atômica (MFA) foi realizada, conforme descrito na seção 4.5, para investigar a morfologia dos géis de mistura de proteínas do soro. As micrografias disponíveis nas Figuras 31-37 mostram algumas diferenças na morfologia do gel em função da composição proteica. Áreas mais claras representam as proeminências das regiões mais elevadas, enquanto áreas mais escuras (preto) correspondem aos poros contidos na superfície do gel.

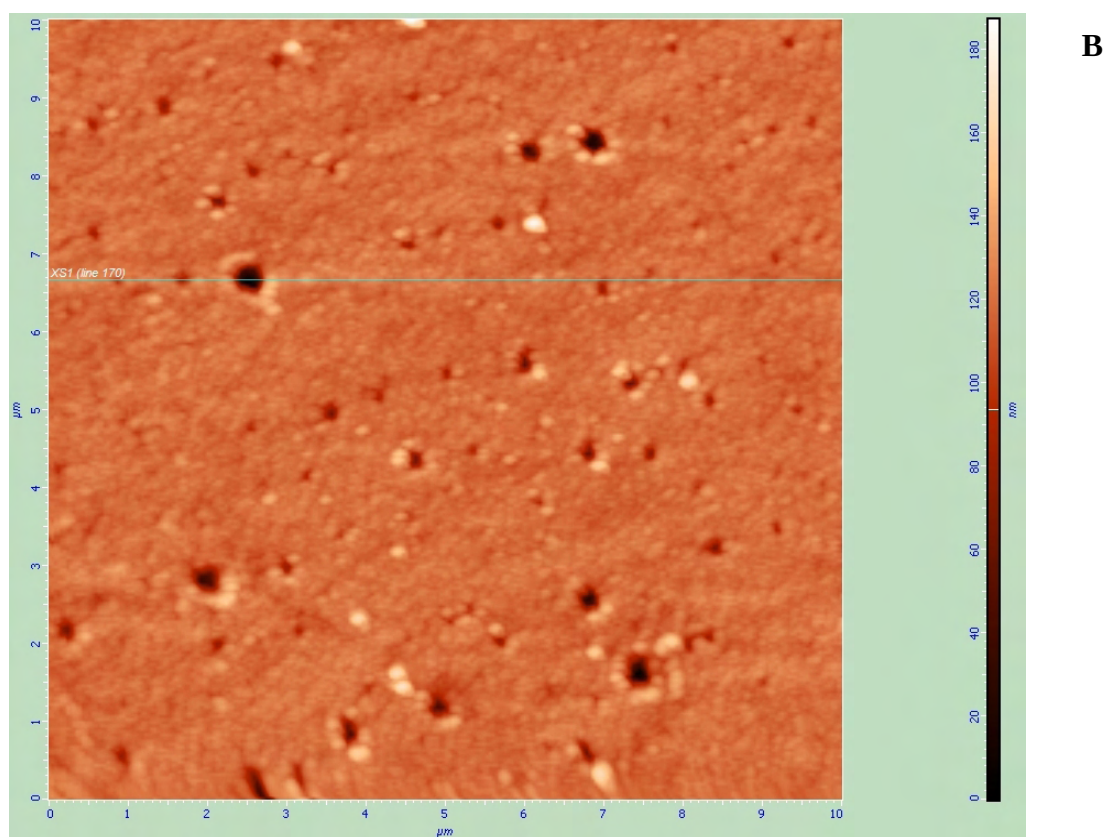
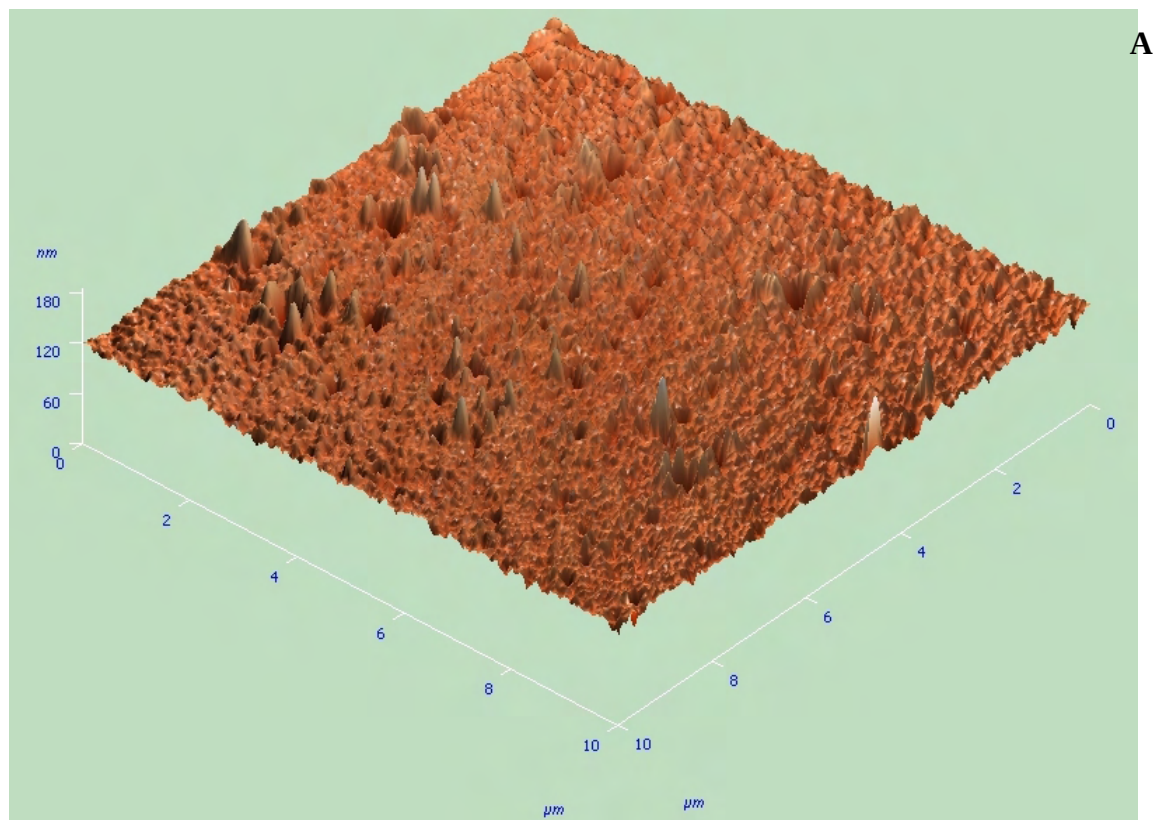


Figura 31: Imagem de MFA para o gel 1. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha

traçada na vista superficial (B).



Figura 31: Imagem de MFA para o gel 1. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). CONTINUAÇÃO.

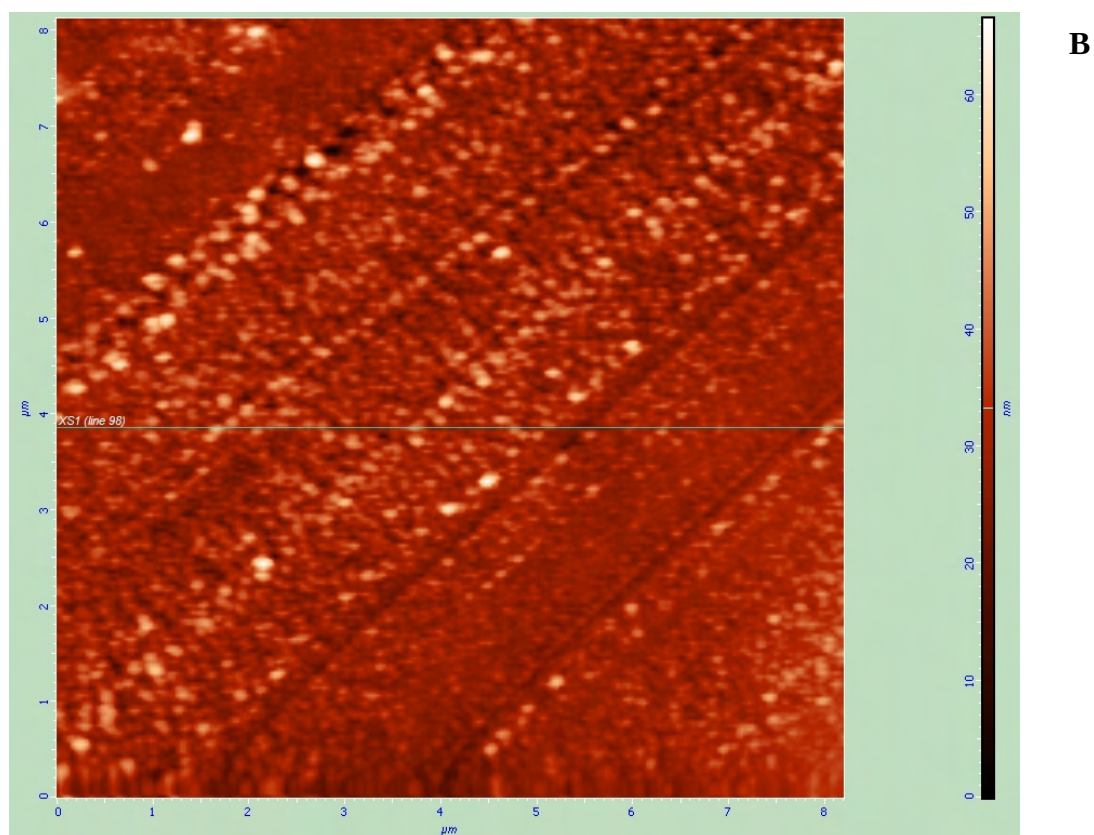
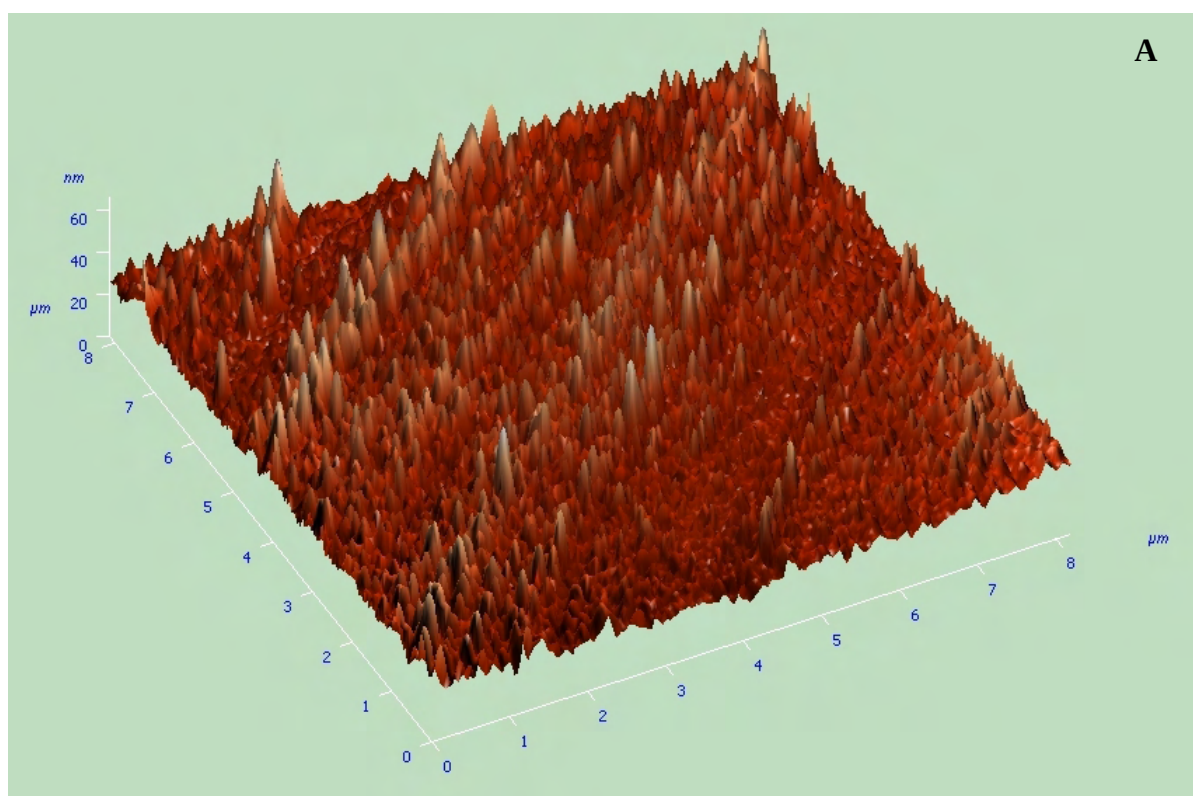


Figura 32: Imagem de MFA para o gel 2. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B).

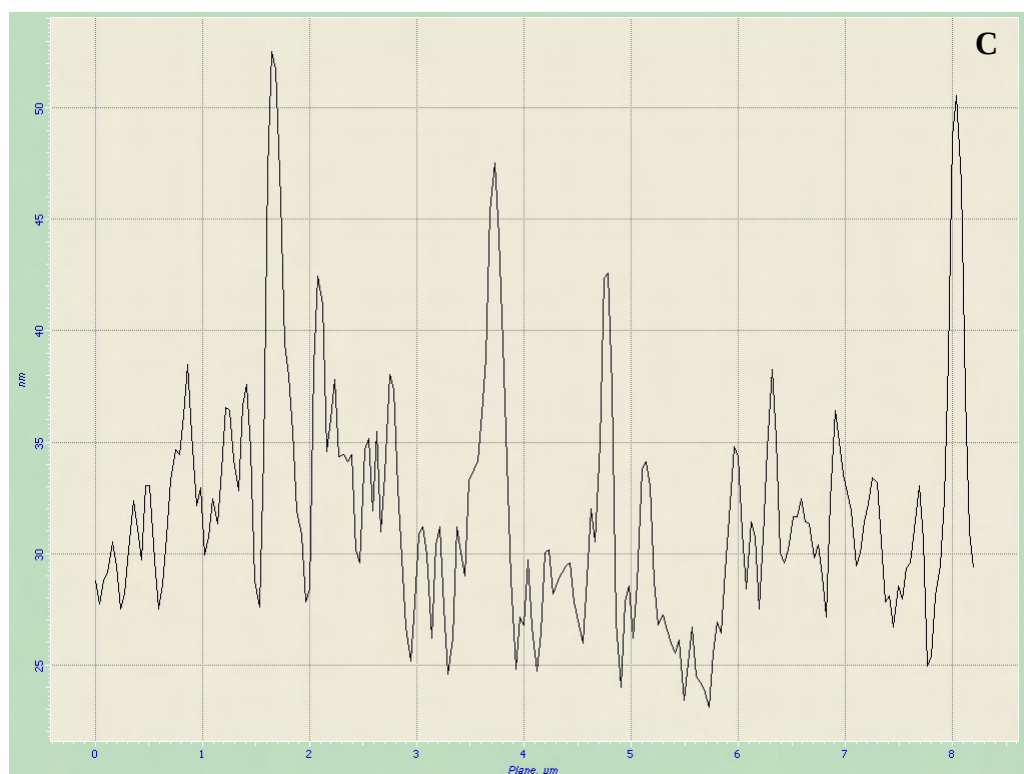


Figura 32: Imagem de MFA para o gel 2. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). CONTINUAÇÃO.

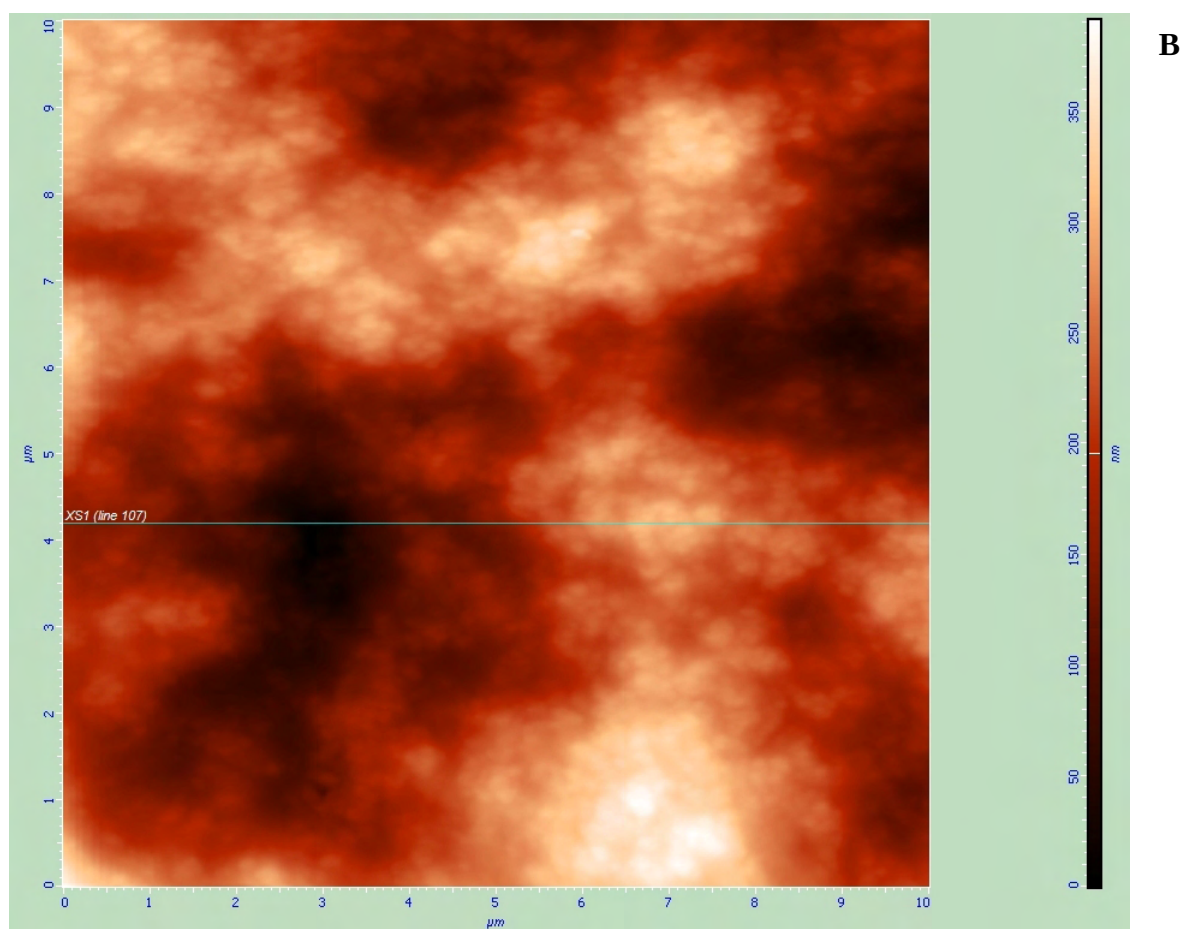
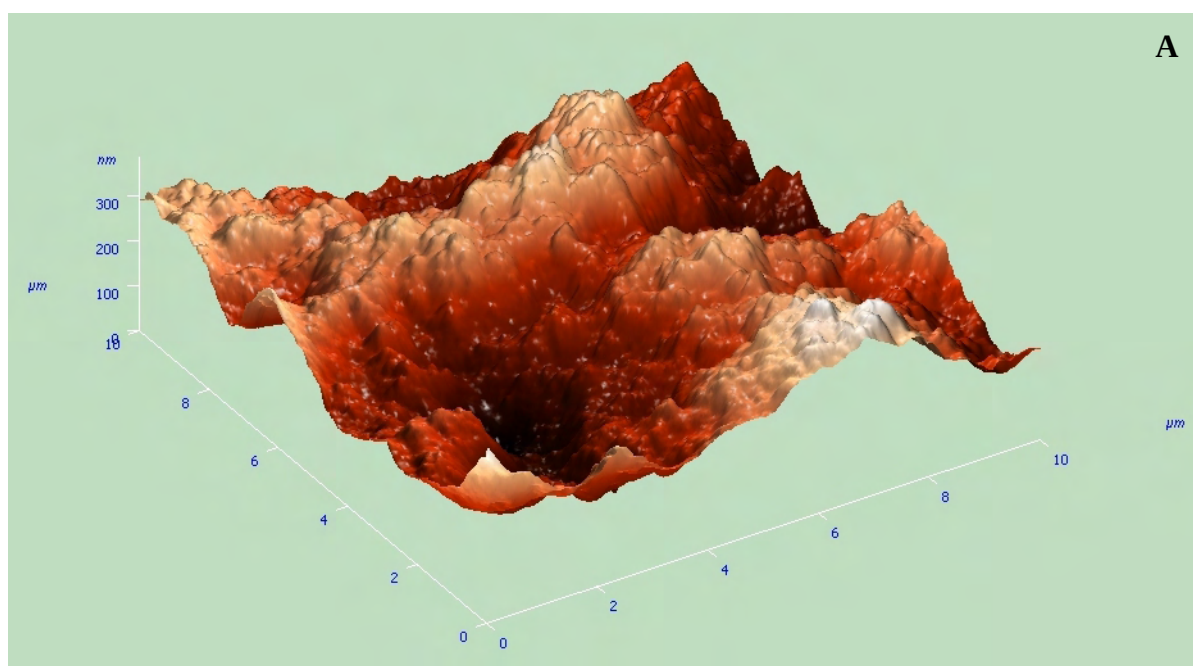


Figura 33: Imagem de MFA para o gel 3. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na

vista superficial (B).

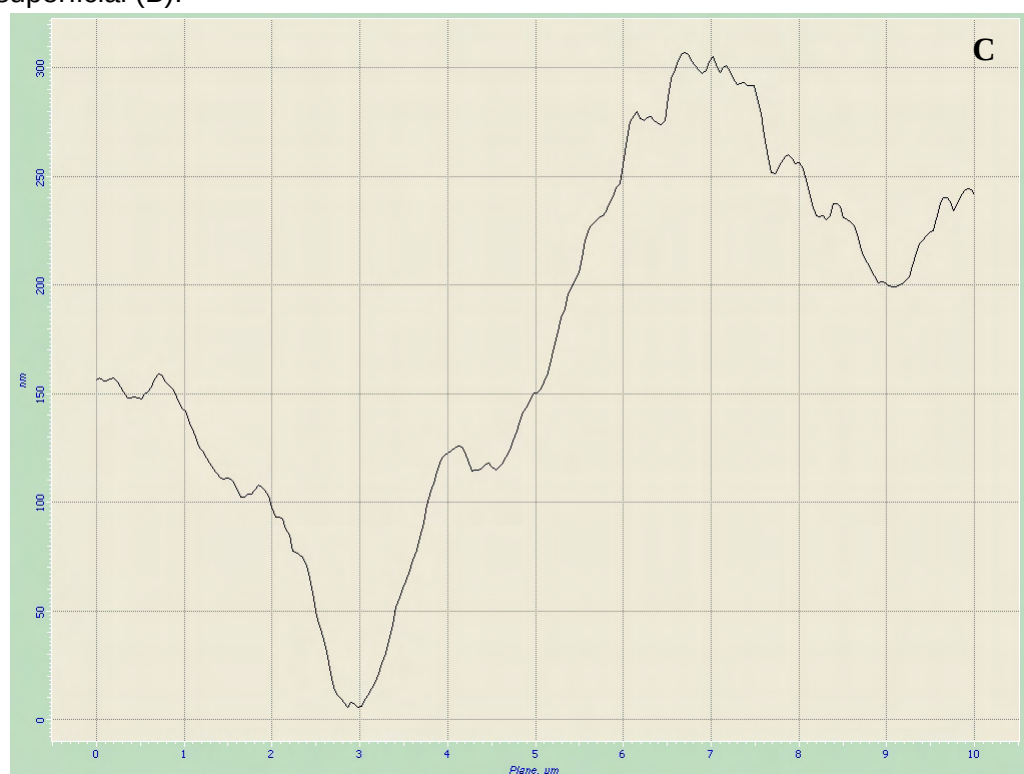


Figura 33: Imagem de MFA para o gel 3. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). CONTINUAÇÃO.

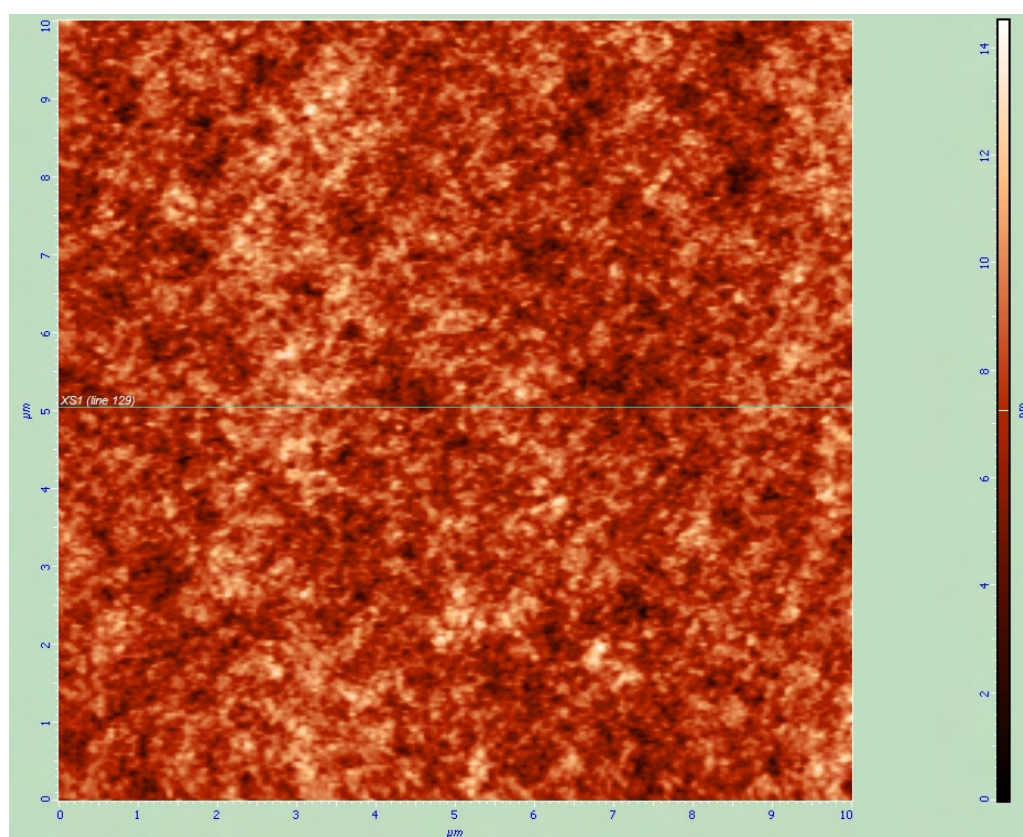
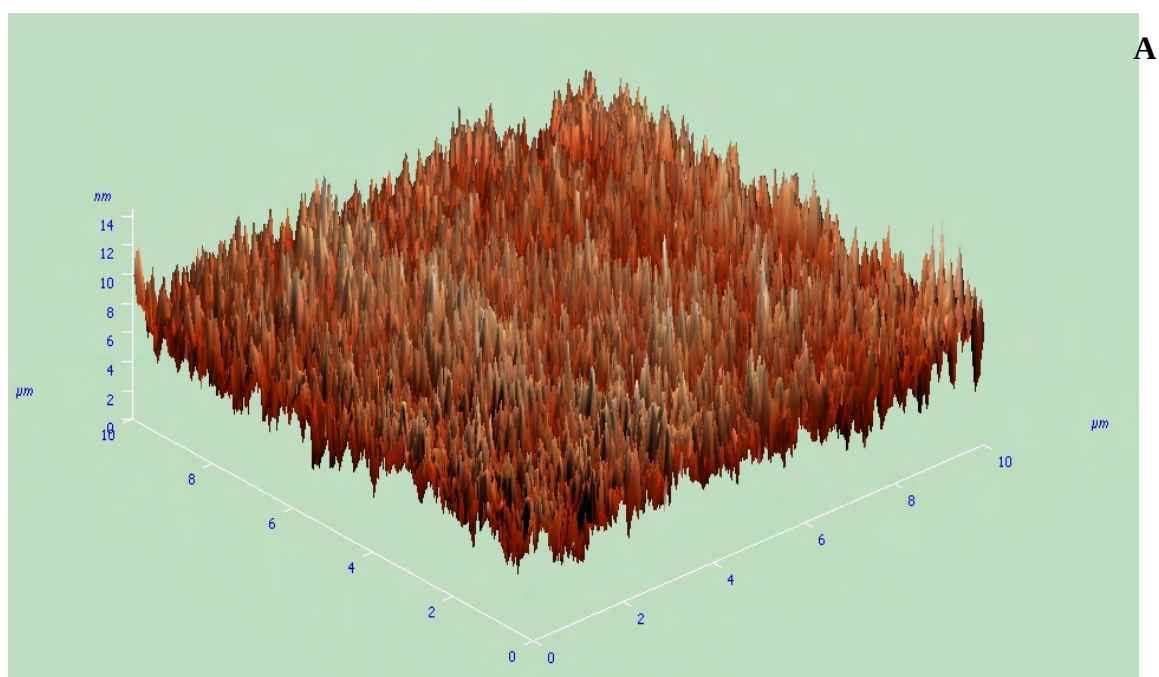


Figura 34: Imagem de MFA para o gel 4. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B).

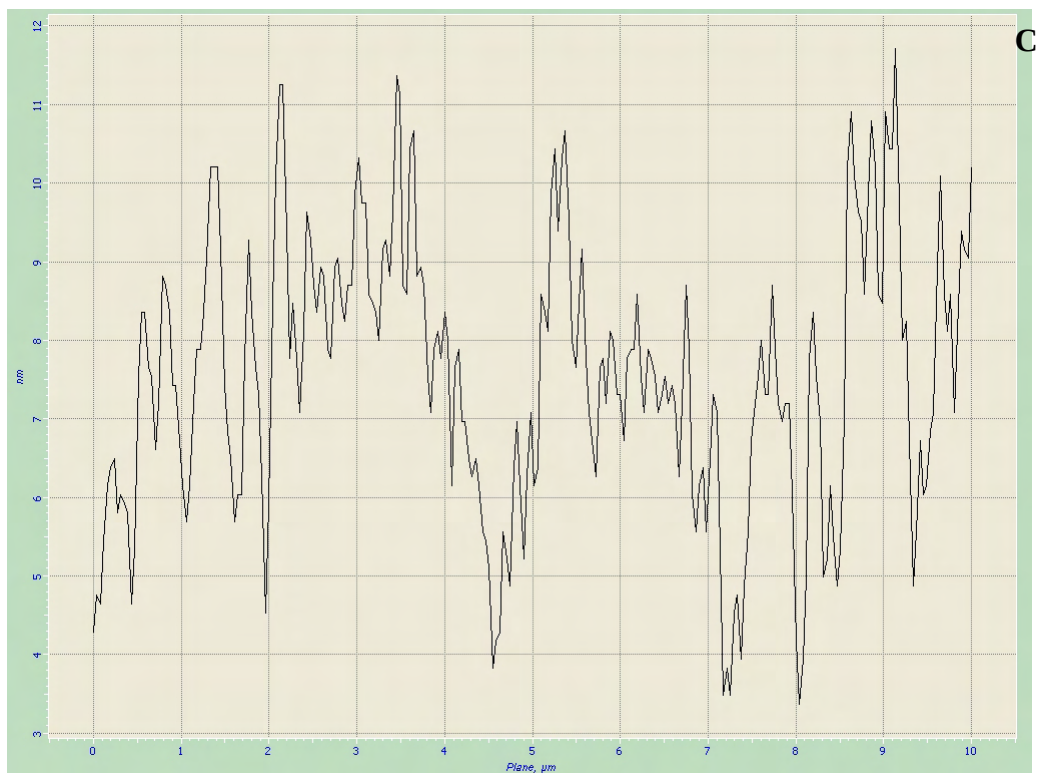


Figura 34: Imagem de MFA para o gel 4. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). CONTINUAÇÃO.

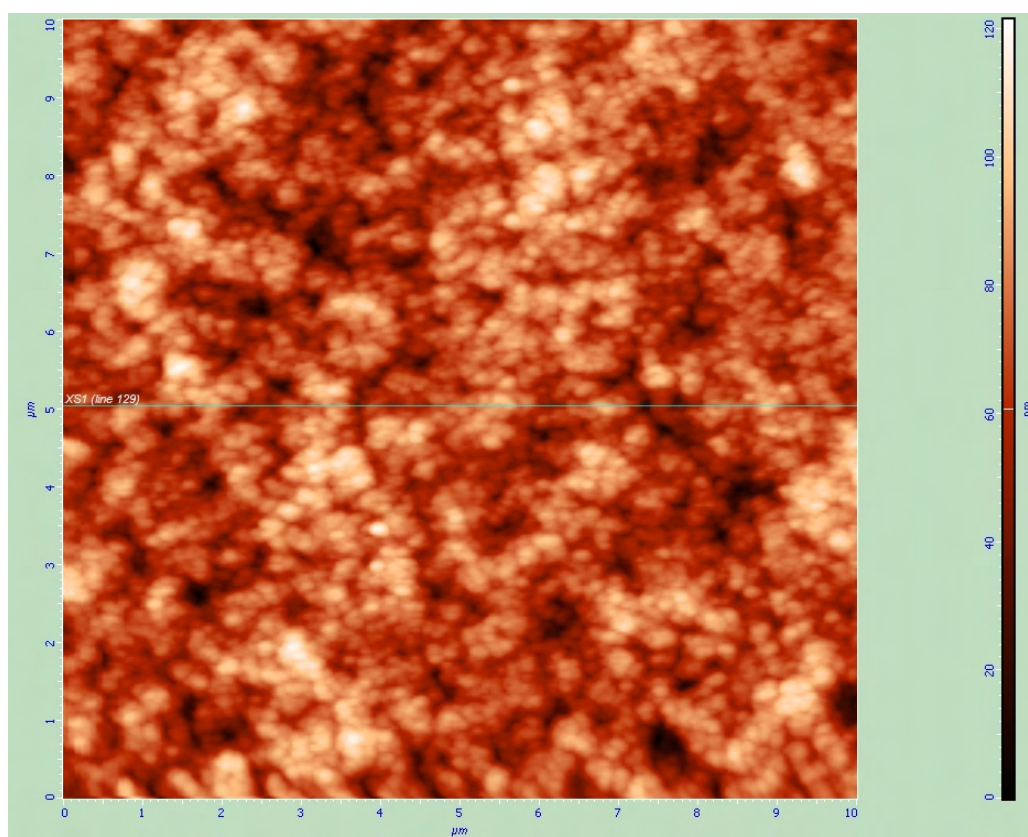
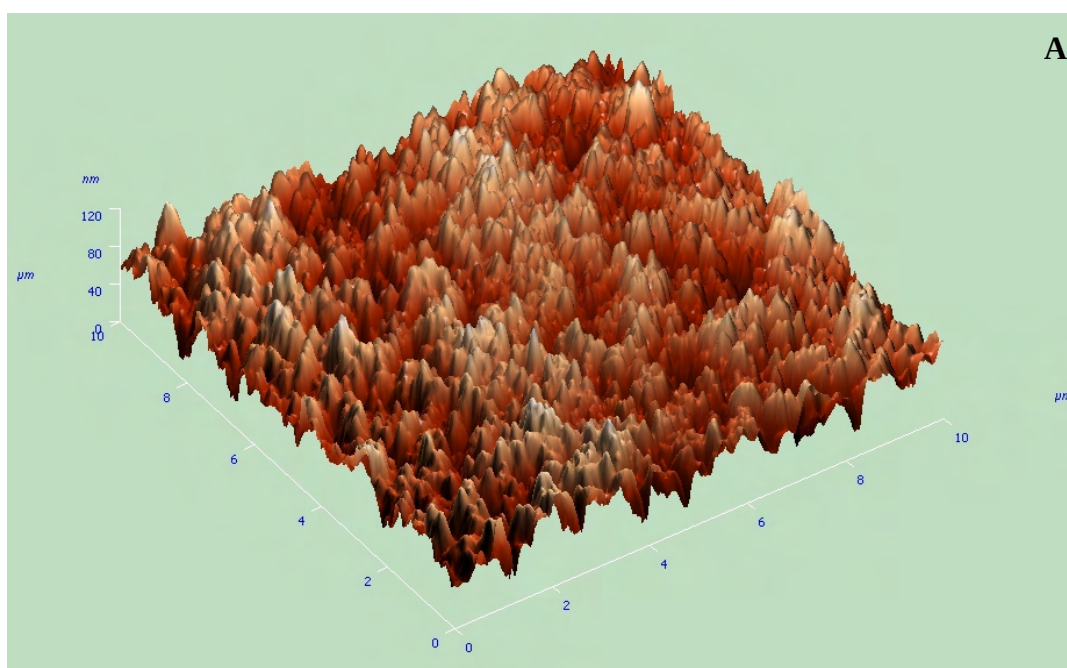


Figura 35: Imagem de MFA para o gel 5. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B).

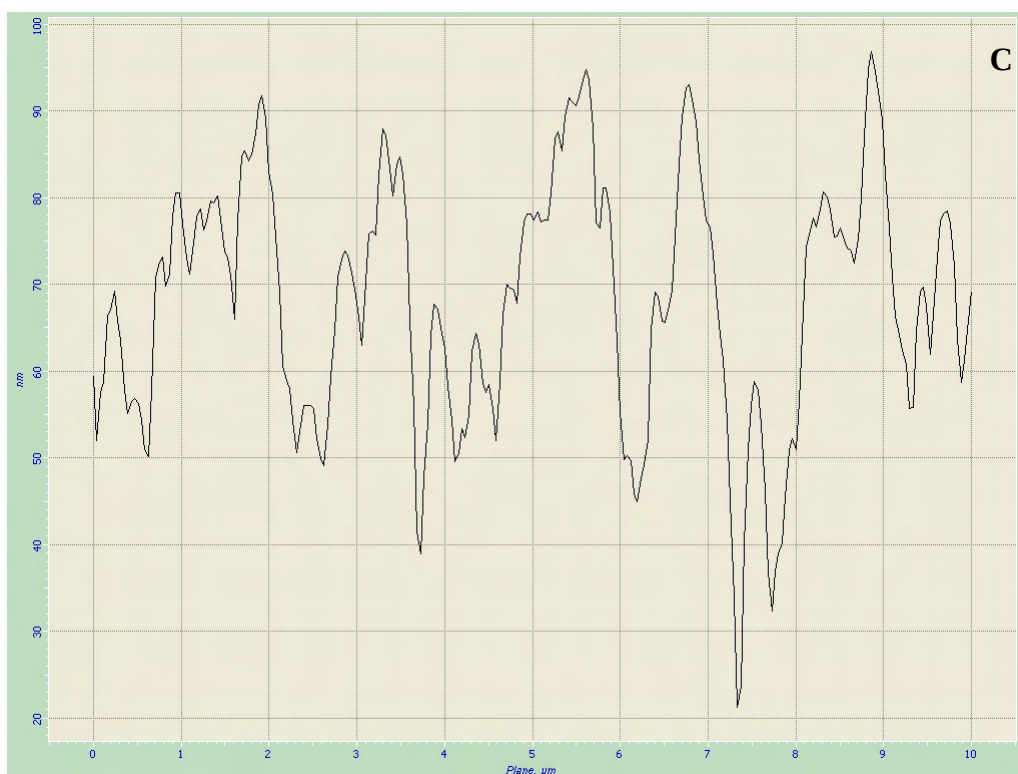


Figura 35: Imagem de MFA para o gel 5. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). CONTINUAÇÃO.

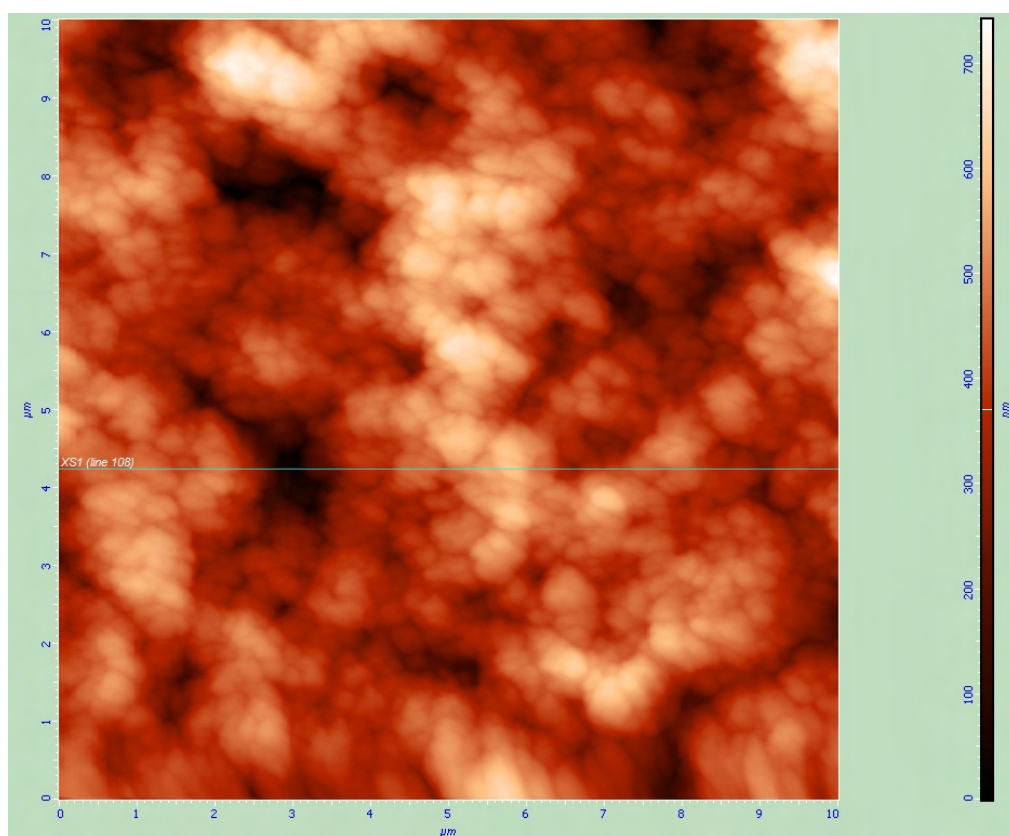
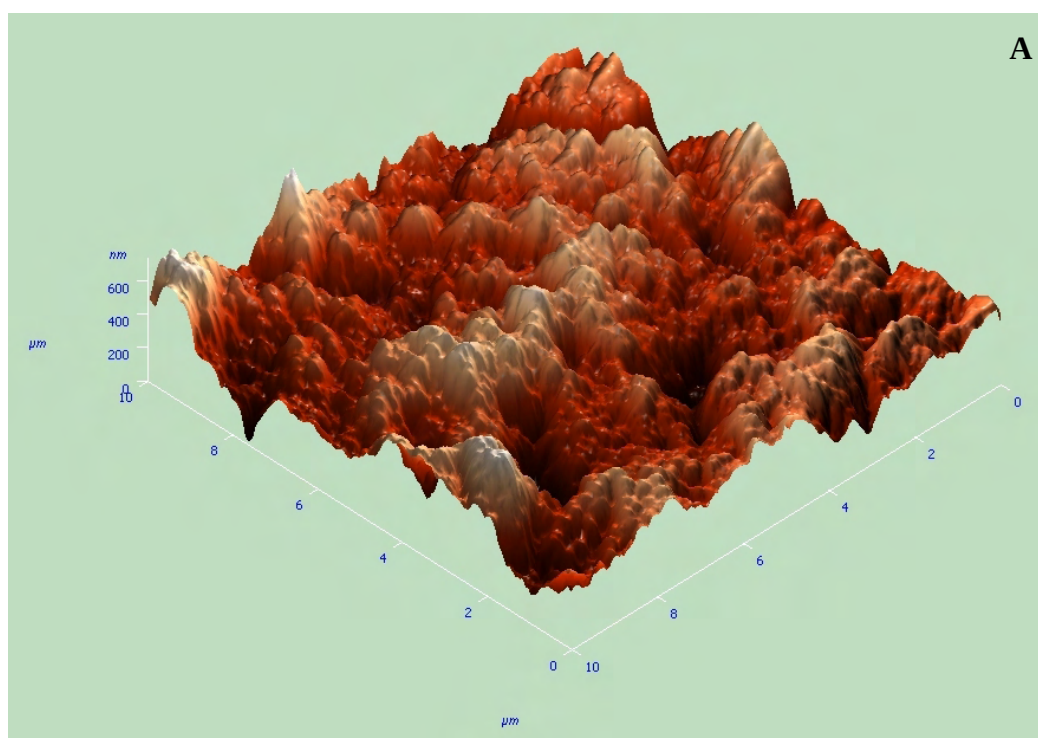


Figura 36: Imagem de MFA para o gel 6. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B).



Figura 36: Imagem de MFA para o gel 6. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). CONTINUAÇÃO.

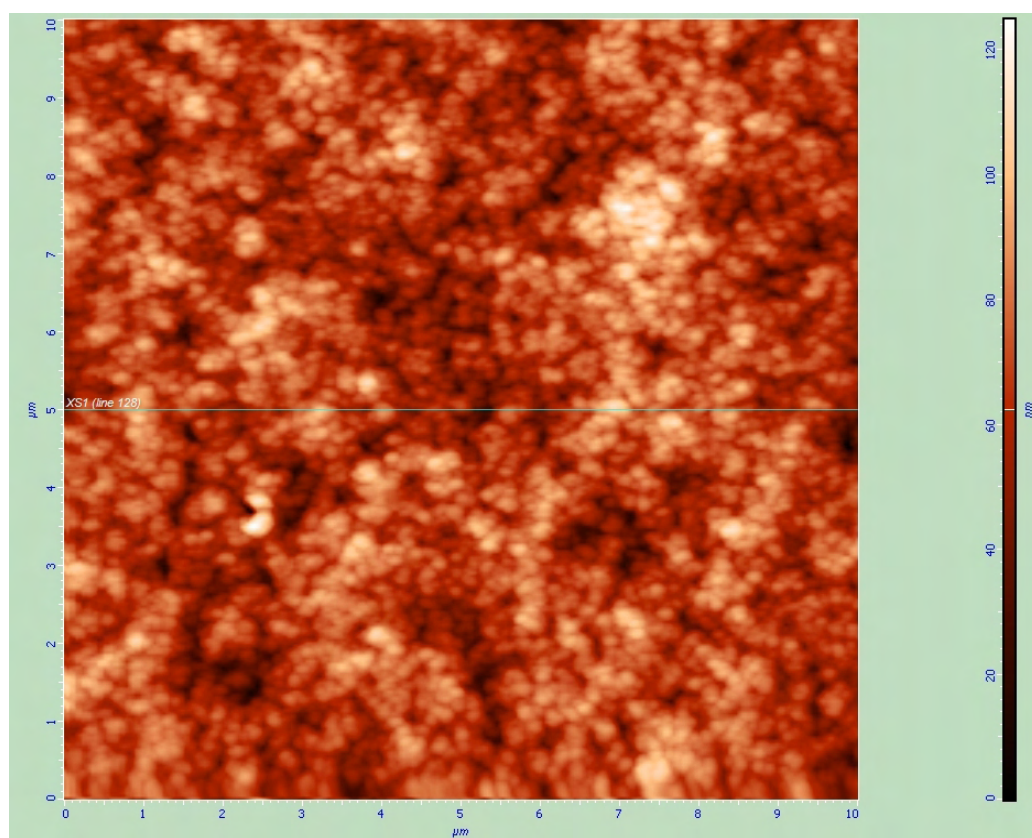
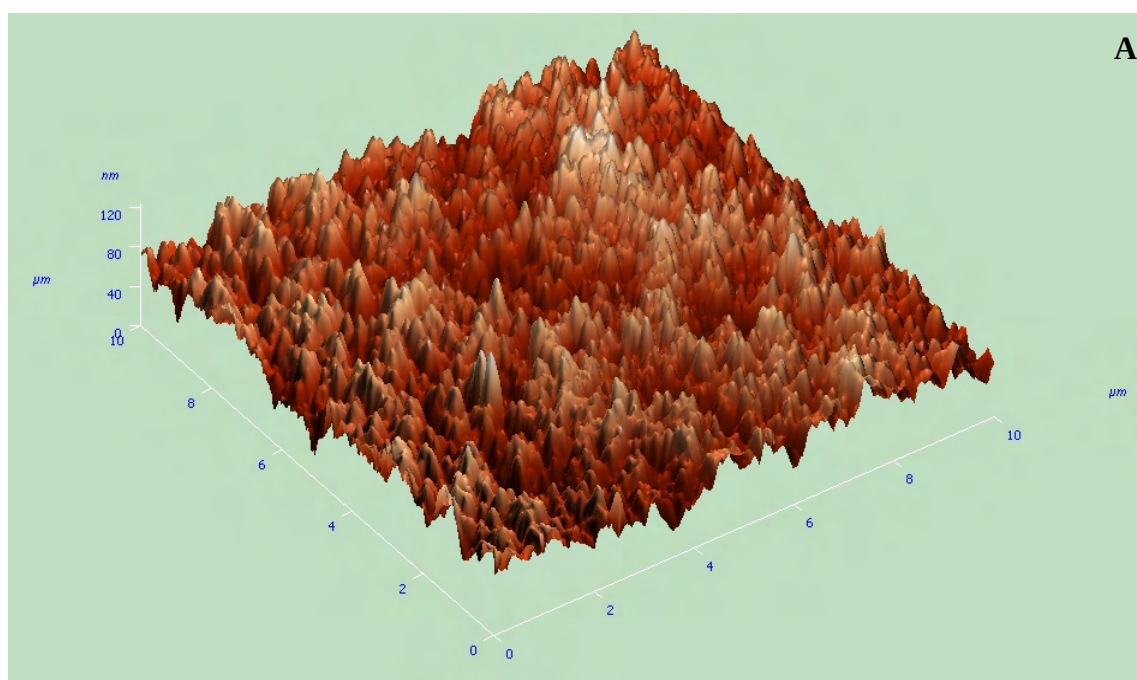


Figura 37: Imagem de MFA para o gel 7. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B).



Figura 37: Imagem de MFA para o gel 7. Vistas tridimensional (A) e superficial (B) de área de varredura de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$. Perfil de topografia (C) correspondente à linha traçada na vista superficial (B). CONTINUAÇÃO.

O gel constituído puramente por β -Lg (Figura 31) apresentou superfície levemente rugosa e com pequenos poros, cujo diâmetro máximo foi $0,5 \mu\text{m}$. O aumento da proporção de α -La com concomitante redução da proporção de β -Lg em géis de mistura β -Lg/ α -La (Figuras 32 e 34) resultou em superfícies menos rugosas e mais contínuas, o que aparentemente induziu o fechamento dos poros, que se tornaram menores. Resultado contrário foi reportado por Rabiey e Britten (2009), que observaram que o aumento da proporção de α -La resultou na formação de poros maiores. Entretanto, a estrutura obtida para o gel constituído apenas por β -Lg apresentou uma rede densa com partículas e poros pequenos, assim como o observado no presente trabalho.

Por outro lado, em géis constituídos por GMP e β -Lg (Figuras 33 e 35), observou-se que o aumento da proporção de GMP com simultânea diminuição da proporção de β -Lg resultou em superfícies mais rugosas e menos homogêneas, devido ao aumento do tamanho dos poros. Quando a proporção

de GMP foi 4 vezes maior que a de β -Lg (gel 3, Figura 33), a superfície apresentou poros com diâmetro aproximado de 5 μ m, 10 vezes maior que os poros apresentados pelo gel de β -Lg (Figura 31).

Já os géis constituídos pelas 3 proteínas (Figuras 36 e 37) apresentaram morfologia semelhante aos géis constituídos por β -Lg e GMP, de modo que o aumento da proporção de GMP (e consequentemente o aumento da proporção de α -La e a redução da proporção de β -lg) resultou em superfície mais rugosa e aberta, devido a presença de poros maiores, quando comparada à superfície do gel de β -Lg (gel 1, Figura 31).

A maior deformação sofrida no ensaio de fluência e recuperação (Figura 24), e os menores valores de G'_{∞} (Tabela 4) no ensaio oscilatório obtidos para os géis com poros maiores parecem sugerir que o aumento no tamanho dos poros das redes do gel está relacionado a um enfraquecimento da estrutura do gel.

As semelhanças apresentadas nos resultados do teste de fluência e recuperação para os géis 4, 5 e 7 (Figura 24 D, E e G), e no ensaio oscilatório para os géis 5 e 7 (curvas de cura não apresentadas) que sugeriam que suas estruturas internas fossem semelhantes pôde ser confirmada pela análise de suas micrografias. As microestruturas apresentadas por esses géis foram bastante semelhantes, como pode ser observado nas Figuras 34, 35 e 37 (correspondentes aos géis 4, 5 e 7, respectivamente), em especial no caso dos géis 5 e 7, que se assemelham até na altura dos perfis de rugosidade apresentados.

Com exceção dos géis 1 e 2 (Figuras 31 e 32), foi possível identificar a formação de estrutura de rede do tipo particulada nos géis avaliados. Este mesmo tipo de estrutura também foi encontrado por Rabiey e Britten (2009) em géis ácidos de β -Lg/ α -La.

6. CONCLUSÃO

As características reológicas e morfológicas de géis obtidos pela acidificação a frio utilizando GDL, de misturas aquosas de β -Lg, α -La e GMP, contendo proporções variadas de cada uma destas três proteínas, foram avaliadas por meio de ensaios reológicos e por microscopia de força atômica.

Verificou-se que a composição proteica influenciou as propriedades reológicas e morfológicas dos géis ácidos de proteínas do soro.

Todas as misturas avaliadas gelificaram e, com exceção da mistura com maior proporção de GMP, formaram géis autossustentáveis. A presença de maior proporção de α -La aumentou o tempo de gelificação da mistura, enquanto maior proporção de GMP diminuiu esse parâmetro. Consequentemente, o pH de gelificação de misturas com maior concentração de GMP foi superior aos demais. A diminuição da proporção de β -Lg concomitante ao aumento da proporção de α -La e/ou GMP resultou na diminuição do módulo elástico de equilíbrio, e consequentemente na força do gel.

O perfil de deformação apresentado no teste de fluência e recuperação foi composto principalmente pela deformação elástica retardada. O predomínio da deformação reversível sobre a permanente (irreversível) indicou que os géis apresentaram comportamento elástico mais pronunciado. O aumento da proporção de α -La e/ou GMP, com simultânea redução da proporção de β -Lg, implicou enfraquecimento da rede do gel, tendo em vista a diminuição causada nos parâmetros do modelo simplificado de Burgers.

De acordo com o teste de relaxação de tensão, os géis exibiram comportamento de sólido viscoelástico. O aumento da proporção de α -La e/ou GMP na mistura resultou na diminuição da tensão máxima medida no início da

fase de relaxação e no aumento da taxa de decaimento da tensão, indicando assim maior fragilidade e menor estruturação da rede desses géis. As misturas binárias de α -La/ β -Lg e GMP/ β -Lg apresentaram comportamento mais viscoso, enquanto surpreendentemente a mistura das 3 proteínas apresentou menor comportamento viscoso, após 3 dias de armazenamento a 5°C.

De acordo com os resultados, verificou-se que β -Lg foi a proteína que mais contribuiu para a formação de géis coesos.

A morfologia da superfície dos géis foi consideravelmente influenciada pela composição da mistura proteica. A presença de maior proporção de α -La tornou a superfície menos rugosa e mais contínua, com a diminuição do tamanho dos poros. Efeito contrário foi constatado para maior proporção de GMP, que levou à formação de superfícies mais rugosas e descontínuas, com poros maiores. Com exceção dos géis constituídos puramente por β -Lg e da mistura binária β -Lg/ α -La de maior proporção de α -La, foi observada a formação de estrutura do tipo particulada.

Sob o ponto de vista prático, com os modelos matemáticos estimados é possível prever e manipular as propriedades reológicas (G'_{∞} , G_1 , G_2 , λ , μ_3) e de gelificação (t_g , pH_g) dos géis de proteínas do soro, a partir da escolha e combinação adequada das concentrações destas proteínas, sob condições semelhantes às empregadas neste trabalho. Sendo então possível adaptar tais propriedades do gel para diversas aplicações em alimentos.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGUILERA, J. M. **Gelation of whey proteins : Chemical and rheological changes during phase transition in food.** Chicago: Institute of Food Technologists, 1995. 6

AKO, K. et al. Quantitative analysis of confocal laser scanning microscopy images of heat-set globular protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 4, p. 1111-1119, 2009. ISSN 0268-005X.

ALTING, A. C. **Cold gelation of globular proteins.** 2003. 115 (PhD thesis). Wageningen University

ALTING, A. C. et al. Formation of Disulfide Bonds in Acid-Induced Gels of Preheated Whey Protein Isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 5001-5007, 2000. ISSN 0021-8561.

_____. Control of texture of cold-set gels through programmed bacterial acidification. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 4, p. 323-329, 2004.

ANDRÁS, S. C.; ZARITZKY, N. E.; CALIFANO, A. N. Stress relaxation characteristics of low-fat chicken sausages made in Argentina. **Meat Science**, v. 79, n. 3, p. 589-594, 2008.

ANGSUPANICH, K.; EDDE, M.; LEDWARD, D. A. Effects of High Pressure on the Myofibrillar Proteins of Cod and Turkey Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 92-99, 1998. ISSN 0021-8561.

BALNY, C.; MASSON, P. Effects of high pressure on proteins. **Food Reviews International**, v. 9, n. 4, p. 611 - 628, 1993. ISSN 8755-9129.

BARBUT, S.; FOEGEDING, E. A. Ca²⁺-Induced Gelation of Pre-heated Whey Protein Isolate. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, p. 867-871, 1993. ISSN 1750-3841.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. Amsterdam [u.a.]: Elsevier, 1991. ISBN 0444871403 9780444871404 0444874690 9780444874696.

BORDERÍAS, A. J.; MONTERO, P. Fundamentos de La funcionalidad de las proteínas en alimentos **Revista de Agroquímica Y Tecnología de Alimentos**, v. 28, p. 159-169, 1988.

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

BRAGA, A. L. M.; MENOSSE, M.; CUNHA, R. L. The effect of the glucono-delta-lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 5, p. 389-398, 2006.

BROWNLOW, S. et al. Bovine [beta]-lactoglobulin at 1.8 Å resolution -- still an enigmatic lipocalin. **Structure**, v. 5, n. 4, p. 481-495, 1997. ISSN 0969-2126.

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 & Technology**, v. 9, n. 4, p. 143-151, 1998. ISSN 0924-2244.

BULLERMAN, L. B.; BERRY, E. C. Use of cheese whey for vitamin B12 production. 3. Growth studies and dry-weight activity. **Appl Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 358-60, May 1966. ISSN 0003-6919 (Print) 0003-6919 (Linking).

BURTON, J.; SKUDDER, P. J. **Whey proteins UK Patent Application GB 2188526 A1**. 1987.

CALVO, M. M.; LEAVER, J.; BANKS, J. M. Influence of other whey proteins on the heat-induced aggregation of [alpha]-lactalbumin. **International Dairy Journal**, v. 3, n. 8, p. 719-727, 1993. ISSN 0958-6946.

CAVALLIERI, Â. L. F. **Gelificação a frio de proteínas do soro do leite: efeito da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos**. 2007. 218 (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. Protéines Alimentaires. In: LAVOISIER, T. E. D. (Ed.). **Biochimie, Propriétés Fonctionnelles, Valeur Nutritionnelle, Modifications Chimiques**. Paris: Technique et Documentation Lavoisier, 1985. p.156-192.

CHUANG, G. C.-C.; YEH, A.-I. Rheological characteristics and texture attributes of glutinous rice cakes (mochi). **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 3, p. 314-323, 2006. ISSN 0260-8774.

CLARK, A. H. Gels and Gelling. In: SCHWARTZBERG HG, H. R. (Ed.). **Physical Chemistry of Foods**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992. p.263-305.

CLARK, A. H.; LEE-TUFNELL, C. D. Gelation of globular proteins. In: MITCHELL, J. R. e LEDWARD, D. A. (Ed.). **Functional Properties of Food Macromolecules**. London: Elsevier, 1986. p.203-272.

CORNELL, J. A. **Experiments with mixture-designs, models and the analysis of mixture data**. 3^a. New York: Jwiley, 2002. 432

DALGLEISH, D. G.; SENARATNE, V.; FRANCOIS, S. Interactions between a-Lactalbumin and b-Lactoglobulin in the Early Stages of Heat Denaturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3459-3464, 1997. ISSN 0021-8561.

DAMODARAN, S. Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 262-269, 1988. ISSN 0021-8561.

DE KRUIF, C. G. Skim Milk Acidification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 185, n. 1, p. 19-25, 1997. ISSN 0021-9797.

DOHERTY, S. B. et al. Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **J Microbiol Methods**, v. 80, n. 3, p. 231-41, 2010. ISSN 18728359.

DUMOULIN, M.; OZAWA, S.; HAYASHI, R. Textural Properties of Pressure-Induced Gels of Food Proteins Obtained under Different Temperatures including Subzero. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 1, p. 92-95, 1998. ISSN 1750-3841.

DZIUBA, J.; MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's k-casein. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 11-12, p. 1017-1044, ISSN 0958-6946.

EGGUM, B. Comments on Report of a joint FAO/WHO expert consultation on protein quality evaluation, Rome 1990. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v. 30, n. 2, p. 81-88, 1991. ISSN 0044-264X.

EL-SALAM, M. H. A.; EL-SHIBINY, S.; BUCHHEIM, W. Characteristics and Potential Uses of the Casein Macropeptide. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 327-341, 1996.

ELEYA, M. M. O.; TURGEON, S. L. The effects of pH on the rheology of b-lactoglobulin/k-carrageenan mixed gels. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 3, p. 245-251, 2000. ISSN 0268-005X.

EUSTON, S. R.; UR-REHMAN, S.; COSTELLO, G. Denaturation and aggregation of [beta]-lactoglobulin--a preliminary molecular dynamics study. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1081-1091, 2007. ISSN 0268-005X.

FARÍAS, M. E.; MARTINEZ, M. J.; PILOSOFF, A. M. R. Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 79-88, 2010.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaaios. **Química Nova**, v. 29, p. 137-142, 2006. ISSN 0100-4042.

FLOWER, D. R. The lipocalin protein family: structure and function. **Biochem. J.**, v. 318, n. 1, p. 1-14, Aug 15, 1996 1996.

FLOWER, D. R.; NORTH, A. C. T.; SANSOM, C. E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1482, n. 1-2, p. 9-24, 2000. ISSN 0167-4838.

FOEGEDING, E. A.; BOWLAND, E. L.; HARDIN, C. C. Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 9, n. 4, p. 237-249, 1995. ISSN 0268-005X.

FOLK, J. E.; FINLAYSON, J. S. The ϵ -(γ -glutamyl) lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminase. In: ANFINSEN, C. B.; EDSALL, J. T., *et al* (Ed.). **Advances in protein chemistry**. New York ; London: Academic Press, v.31, 1977. p.449. ISBN 0120342316 9780120342310.

FOOD_OUTLOOK. Global Market Analysis N° 2. MILK AND MILK PRODUCTS. 2006. Disponível em: <
<<<http://www.fao.org/docrep/009/j8126e/j8126e11.htm>>> >. Acesso em: 15 de julho de 2010.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998.

GEZIMATI, J.; CREAMER, L. K.; SINGH, H. Heat-Induced Interactions and Gelation of Mixtures of b-Lactoglobulin and a-Lactalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1130-1136, 1997. ISSN 0021-8561.

GOSAL, W. S.; CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Fibrillar b-Lactoglobulin Gels: Part 2. Dynamic Mechanical Characterization of Heat-Set Systems. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 6, p. 2420-2429, 2004. ISSN 1525-7797.

GRIFFIN, W. G. *et al*. Molecular basis of thermal aggregation of bovine [small beta]-lactoglobulin A. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 89, n. 18, p. 3395-3405, 1993. ISSN 0956-5000.

GUNASEKARAN, S.; KO, S.; XIAO, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. **Journal of Food Engineering**, v. 83, n. 1, p. 31-40, 2007. ISSN 0260-8774.

GUNASEKARAN, S.; XIAO, L.; OULD ELEYA, M. M. Whey protein concentrate hydrogels as bioactive carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 5, p. 2470-2476, 2006. ISSN 1097-4628.

HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Characterization of heat-induced aggregates of α -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 03, p. 483-497, 2001. ISSN 0022-0299.

HAVEA, P.; WATKINSON, P.; KUHN-SHERLOCK, B. Heat-Induced Whey Protein Gels: Protein-Protein Interactions and Functional Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1506-1512, 2009. ISSN 0021-8561.

HEINE, W. E.; KLEIN, P. D.; REEDS, P. J. The Importance of α -Lactalbumin in Infant Nutrition. **The Journal of Nutrition**, v. 121, n. 3, p. 277-283, March 1, 1991 1991.

HERRMANN, P. S. P. et al. Microscopia de varredura por forÃ§a: uma ferramenta poderosa no estudo de polÃ-meros. **PolÃ-meros**, v. 7, p. 51-61, 1997. ISSN 0104-1428.

HINES, M. E.; FOEGEDING, E. A. Interactions of α -lactalbumin and bovine serum albumin with β -lactoglobulin in thermally induced gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 341-346, 1993. ISSN 0021-8561.

HIROSHI, I.; KAWASAKI, I. **Gelling agent and gel-like food**. . JP 2001045987 2001.

HOFFMANN, M. A. M.; VAN MIL, P. J. J. M. Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin as a Function of pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 1898-1905, 1999. ISSN 0021-8561.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Ca^{2+} -Induced cold gelation of whey protein isolate: effect of two-stage gelation. **Food Research International**, v. 30, n. 7, p. 523-527, 1997a. ISSN 0963-9969.

_____. Effects of N-ethylmaleimide and CaCl_2 on cold gelation of whey protein isolate. **Food Research International**, v. 30, n. 6, p. 451-455, 1997b. ISSN 0963-9969.

_____. Structure-forming processes in Ca^{2+} -induced whey protein isolate cold gelation. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p. 827-834, 1997c. ISSN 0958-6946.

HOOVER, D. Pressure effects on biological systems. **Food Technology**, v. 47, p. 150-155, 1993.

HORNE, D. S. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 213, n. 2-3, p. 255-263, 2003. ISSN 0927-7757.

IKEDA, S.; MORRIS, V. J. Fine-Stranded and Particulate Aggregates of Heat-Denatured Whey Proteins Visualized by Atomic Force Microscopy. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 2, p. 382-389, 2002. ISSN 1525-7797.

JU, Z. Y.; KILARA, A. Effects of Preheating on Properties of Aggregates and of Cold-Set Gels of Whey Protein Isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3604-3608, 1998a. ISSN 0021-8561.

_____. Textural Properties of Cold-set Gels Induced from Heat-denatured Whey Protein Isolates. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 288-292, 1998b. ISSN 1750-3841.

JU, Z. Y. et al. Enzyme-induced gelation of whey proteins: Effect of protein denaturation. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 1, p. 71-78, 1997. ISSN 0958-6946.

KASAPIS, S.; NORTON, I. T. **Modern biopolymer science - Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application**. [Amsterdam etc.]: Elsevier, 2009. ISBN 0123741955 9780123741950.

KAVANAGH, G. M. et al. Heat-Induced Gelation of b-Lactoglobulin/a-Lactalbumin Blends at pH 3 and pH 7. **Macromolecules**, v. 33, n. 19, p. 7029-7037, 2000. ISSN 0024-9297.

KAVANAGH, G. M.; CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Heat-Induced Gelation of Globular Proteins: 4. Gelation Kinetics of Low pH b-Lactoglobulin Gels. **Langmuir**, v. 16, n. 24, p. 9584-9594, 2000. ISSN 0743-7463.

KESHAVERZ, E.; NAKAI, S. The relationship between hydrophobicity and interfacial tension of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**, v. 576, n. 2, p. 269-279, 1979. ISSN 0005-2795.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. The Ligand-binding Site of Bovine [beta]-Lactoglobulin: Evidence for a Function? **Journal of Molecular Biology**, v. 318, n. 4, p. 1043-1055, 2002. ISSN 0022-2836.

LEFEBVRE, J.; RENARD, D.; SANCHEZ-GIMENO, A. C. Structure and rheology of heat-set gels of globular proteins. **Rheologica Acta**, v. 37, n. 4, p. 345-357, 1998. ISSN 0035-4511.

LEFÈVRE, T.; SUBIRADE, M. Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate β -lactoglobulin gels. **Biopolymers**, v. 54, n. 7, p. 578-586, 2000. ISSN 1097-0282.

LEGOWO, A. M.; IMADE, T.; HAYAKAWA, S. Heat-induced gelation of the mixtures of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in the presence of glutathione. **Food Research International**, v. 26, n. 2, p. 103-108, 1993. ISSN 0963-9969.

LENT, L. E.; VANASUPA, L. S.; TONG, P. S. Whey Protein Edible Film Structures Determined by Atomic Force Microscope. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, p. 824-827, 1998. ISSN 1750-3841.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal, São Paulo: Edição Funep, 2000.

MANGINO, M. E. Physico-chemical basis of whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2711-2722, 1984.

MARKUS, C. R.; OLIVIER, B.; HAAN, E. H. F. Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, n. 6, p. 1051-1056, June 1, 2002 2002.

MARTINEZ, M. J.; FARÍAS, M. E.; PILOSOF, A. M. R. Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. **Food Hydrocolloids**, v. In Press, Corrected Proof, 2010a. ISSN 0268-005X.

_____. The dynamics of heat gelation of casein glycomacropeptide - β -lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase. . **International Dairy Journal**, v. 20, n. 9, p. 580-588, 2010b.

MATSUDOMI, N. et al. α -Lactalbumin enhances the gelation properties of bovine serum albumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1053-1057, 1993. ISSN 0021-8561.

_____. Enhanced heat-induced gelation of β -lactoglobulin by α -lactalbumin. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, p. 1697-1700, 1992.

MATSUMURA, Y. et al. Enhanced susceptibility to transglutaminase reaction of [alpha]-lactalbumin in the molten globule state. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1292, n. 1, p. 69-76, 1996. ISSN 0167-4838.

MCCLEMENTS, D. J.; KEOGH, M. K. Physical properties of cold-setting gels formed from heat-denatured whey protein isolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, n. 1, p. 7-14, 1995. ISSN 1097-0010.

MCINTOSH, G. H. et al. Whey Proteins as Functional Food Ingredients? **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 425-434, 1998. ISSN 0958-6946.

MEIROVITCH, H.; SCHERAGA, H. A. Empirical Studies of Hydrophobicity. 2. Distribution of the Hydrophobic, Hydrophilic, Neutral, and Ambivalent Amino Acids in the Interior and Exterior Layers of Native Proteins. **Macromolecules**, v. 13, n. 6, p. 1406-1414, 1980. ISSN 0024-9297.

MONTEIRO, A. M. F. **Proteínas com funcionalidade mecânica: um estudo físico-químico sobre a viscoelasticidade da gliadina, uma proteína de reserva do glúten do trigo**. 2004. 195 (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MONTGOMERY, D. C.; VOTH, S. R. Multicollinearity and leverage in mixture experiments. **Journal of Quality Technology**, v. 26, n. 2, p. 96-108, 1994.

MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 431 - 476, 1993. ISSN 1040-8398.

MUDGAL, P. **Aggregation Mechanisms of a Whey Protein Model System at Low PH**. 2009. 230 (Ph.D.). Food science, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.

MULVIHILL, D. M.; KINSELLA, J. E. Gelation of b-Lactoglobulin: Effects of Sodium Chloride and Calcium Chloride on the Rheological and Structural Properties of Gels. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 1, p. 231-236, 1988. ISSN 1750-3841.

NAKAI, S. Structure-function relationships of food proteins: with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 676-683, 1983. ISSN 0021-8561.

NEVES, E. S. **Efeito da adição de co-solutos na reologia de geis lacteos acidificados**. 2008. 161 (Tese (doutorado)). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NIO, N.; MOTOKI, M.; TAKINAMI, K. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 50, p. 851-855, 1986.

NONAKA, M. T., H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSUURA, A. Polymerization of several proteins by a Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganisms. **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 53, p. 2619-2623, 1989.

NOPPE, W. et al. A simplified purification procedure of α -lactalbumin from milk using Ca^{2+} -dependent adsorption in hydrophobic expanded bed chromatography. **Bioseparation**, v. 8, n. 1, p. 153-158, 1999.

OBOROCEANU, D. et al. Characterization of b-Lactoglobulin Fibrillar Assembly Using Atomic Force Microscopy, Polyacrylamide Gel Electrophoresis, and in Situ Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3667-3673, 2010. ISSN 0021-8561.

OTTE, J. et al. Protease-induced aggregation and gelation of whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 911-915, 1996.

PAULSSON, M.; HEGG, P. O.; CASTBERG, H. B. Heat-Induced Gelation of Individual Whey Proteins A Dynamic Rheological Study. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 1, p. 87-90, 1986. ISSN 1750-3841.

PELEG, M. The basics of solid foods rheology. In: MOSKOWITZ, P. (Ed.). **Food Texture**. New York: Marcel Dekker Inc., 1987. p.3-33.

PÉREZ, M. D.; CALVO, M. Interaction of [beta]-Lactoglobulin with Retinol and Fatty Acids and Its Role as a Possible Biological Function for This Protein: A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 5, p. 978-988, 1995. ISSN 0022-0302.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. **Structure-Function Properties of Food Proteins**. San Diego: Academic Press, 1994. 271

POMERANZ, Y. **Functional properties of food components**. San Diego: Academic Press, 1991.

QIU-LIANG, Z.; SHEN, Y.; SI-MING, Z. Study on Creep Model of Rice Gel. Computational Intelligence and Software Engineering, 2009. CiSE 2009. International Conference on, 2009. 11-13 Dec. 2009. p.1-5.

RABIEY, L.; BRITTEN, M. Effect of protein composition on the rheological properties of acid-induced whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 973-979, 2009. ISSN 0268-005X.

RAO, M. A. **Rheology of fluid and semisolid foods : principles and applications**. New York: Springer, 2007. ISBN 9780387709291 0387709290 9780387709307 0387709304.

RELKIN, P.; MULVIHILL, D. M. Thermal unfolding of b-lactoglobulin, a-lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. 6, p. 565 - 601, 1996. ISSN 1040-8398.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; FERNÁNDEZ-QUINTERO, A.; CUVELIER, G. Stress relaxation of reconstituted cassava dough. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 202-206, 2009. ISSN 0023-6438.

ROEFS, S. P. F. M.; DE KRUIF, K. G. A Model for the Denaturation and Aggregation of β -Lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, v. 226, n. 3, p. 883-889, 1994. ISSN 1432-1033.

ROFF, C. F.; FOEGEDING, E. A. Dicationic-induced gelation of pre-denatured whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 10, n. 2, p. 193-198, 1996. ISSN 0268-005X.

SAMEJIMA, K. et al. Effects of temperature, actin-myosin ratio, pH, and salt and protein concentration on heatinduced gelling of cardiac myosin and reconstituted actomyosin. **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 50, p. 2101-2110, 1986.

SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. The core lipocalin, bovine [β]-lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1482, n. 1-2, p. 136-148, 2000. ISSN 0167-4838.

SCHMIDT, R. H.; ILLINGWORTH, B. L.; AHMED, E. M. HEAT-INDUCED GELATION OF PEANUT PROTEIN/WHEY PROTEIN BLENDS. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 2, p. 613-621, 1978. ISSN 1750-3841.

SCHMIDT, R. H. et al. THE EFFECT OF DIALYSIS ON HEAT-INDUCED GELATION OF WHEY PROTEIN CONCENTRATE¹. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 2, n. 2, p. 111-120, 1978. ISSN 1745-4549.

SCHMIDT, R. H.; MORRIS, H. A. Gelation properties of milk proteins, soy proteins, and blended protein systems. **Food Technology**, v. 38, n. 5, p. 85-88, 1984.

SCHOKKER, E. P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Heat-induced aggregation of [beta]-lactoglobulin A and B with [alpha]-lactalbumin. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 12, p. 843-853, 2000. ISSN 0958-6946.

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

SHIMADA, K.; MATSUSHITA, S. Relationship between thermocoagulation of proteins and amino acid compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 413-417, 1980. ISSN 0021-8561.

SILVA, M. A. D. **Transição sol-gel em soluções orgânico-aquosas de lisozima e o efeito indutor do solvente: caracterização cinética e estrutural**. 2006. 164 (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996. ISSN 0960-8524.

SMITH, D. et al. High pressure unfolding of ovalbumin. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, p. 361-370, 2000.

SMITH, D. M. Protein interactions in gels: protein-protein interactions. In: (Ed.). **Protein Functionality in Food systems**. New York: Marcel Dekker, 1994. p.209-224.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins - 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008. ISSN 0958-6946.

SOZER, N.; KAYA, A.; DALGIC, A. C. THE EFFECT OF RESISTANT STARCH ADDITION ON VISCOELASTIC PROPERTIES OF COOKED SPAGHETTI. **Journal of Texture Studies**, v. 39, n. 1, p. 1-16, 2008. ISSN 1745-4603.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. East Lansing, MI: Freeman Press, 1996. ISBN 0963203614 9780963203618.

SVENSSON, M. et al. Conversion of β -lactalbumin to a protein inducing apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 4221-4226, April 11, 2000 2000.

TANG, J.; TUNG, M. A.; ZENG, Y. Characterization of gellan gels using stress relaxation. **Journal of Food Engineering**, v. 38, n. 3, p. 279-295, 1998.

THOMÄ-WORRINGER, C.; SØRENSEN, J.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1324-1333, 2006. ISSN 0958-6946.

TOBITANI, A.; ROSS-MURPHY, S. B. Heat-Induced Gelation of Globular Proteins. 1. Model for the Effects of Time and Temperature on the Gelation Time of BSA Gels. **Macromolecules**, v. 30, n. 17, p. 4845-4854, 1997. ISSN 0024-9297.

TORRES, D. P. M. **Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino - Comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos**. 2005. 100 (Mestrado). Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.

TROULLIER, A. et al. Transient non-native secondary structures during the refolding of [alpha]-lactalbumin detected by infrared spectroscopy. **Nat Struct Mol Biol**, v. 7, n. 1, p. 78-86, 2000. ISSN 1072-8368.

VAN MARLE, M. E.; ZOON, P. **Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim-milk gels**. Amsterdam, PAYS-BAS: Centen, 1995.

VETRI, V.; MILITELLO, V. Thermal induced conformational changes involved in the aggregation pathways of beta-lactoglobulin. **Biophysical Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 83-91, 2005. ISSN 0301-4622.

VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G. M. (Ed.). **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Blackie Academic and Professional, 1996. p.11-61.

WANG, C. H.; DAMODARAN, S. Thermal gelation of globular proteins: weight-average molecular weight dependence of gel strength. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 1157-1164, 1990. ISSN 0021-8561.

WANG, Q. **Application of low-intensity ultrasound to characterise the microestructure of model food systems**. 2007. (PhD Thesis). Technischen Universität München, Germany.

WANG, T.; LUCEY, J. A. Use of multi-angle laser light scattering and sizeexclusion chromatography to characterize the molecular weight and types of aggregates present in commercial whey proteins products. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3090-3110, 2003.

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

WONG, D. W. S. **Mechanism and theory in food chemistry**. New York [u.a.]: VanNostrand Reinhold, 1989. ISBN 0442207530 9780442207533.

YAMAMOTO, F. **REOLOGIA E MICROESTRUTURA DE GÉIS ÁCIDOS DE GELANA**. 2002. 126 (Mestrado). FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Campinas.

ZADOW, J. G. Utilization of milk components: Whey. In: CHAPMAN & HALL (Ed.). **Modern dairy technology, advances in milk processing**. 2nd. London, UK, v.1, 1996. p.313-373.

ZAYAS, J. F. **Functionality of proteins in food: with 21 tables**. Berlin: Springer, 1997. ISBN 0387602526 9780387602523 3540602526 9783540602521.

ZHAO, J. G. **Caracterização de amostras rugosas por microscopia de força atômica**. 2003. 120 Doutorado em Engenharia Elétrica (Doutorado). Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campina, Campinas.

ZIEGLER, G. R.; FOEGEDING, E. A. The Gelation Of Proteins. In: JOHN, E. K. (Ed.). **Advances in Food and Nutrition Research**: Academic Press, v.34, 1990. p.203-298. ISBN 1043-4526.