

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE ÍONS Ca^{++} E Mg^{++} NA DUREZA DE GÉIS DE CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE BOVINO¹

Márcia de Mello LUVIELMO², Aloísio José ANTUNES^{2,*}

RESUMO

Inúmeros estudos vêm sendo realizados com o objetivo de compreender o comportamento das proteínas do Concentrado Protéico de Soro (CPS). A capacidade destas proteínas em formar géis estáveis a temperaturas entre 70°C e 90°C, é uma propriedade funcional importante para a confecção de vários produtos alimentícios, tais como: produtos de padaria, cárneos, texturizados e lácteos. A concentração protéica, pH, composição iônica e temperatura podem ser controladas para obter um gel com as características desejadas. Neste trabalho foi investigado o efeito dos íons metálicos bivalentes Ca^{++} e Mg^{++} , na propriedade de dureza de géis de CPS induzidos termicamente. Dispersões protéicas a 6; 7 e 8% de proteína do CPS a pH 6,3 com 0; 7,5; 15; 30 e 75mm de CaCl_2 ou MgCl_2 foram aquecidas a 75°C por 45 min, resfriadas a 4°C por 12 horas, e os géis avaliados em um texturômetro TA-XT2. Os géis formados com maiores concentrações do sal adicionado obtiveram maiores valores de dureza na faixa estudada. Nas concentrações de 15 a 75mM os valores de dureza dos géis com a adição de CaCl_2 foram significativamente maiores ($p < 0,05$) do que com adição de MgCl_2 . Na concentração de 8% de proteínas do CPS ambos os tratamentos atingem o maior valor de dureza ($p < 0,05$) a 30mM do sal adicionado. O cálcio iônico mostrou ter um importante papel na formação do gel de proteínas do soro.

Palavras-chave: soro; gel; cálcio; magnésio; propriedades funcionais; texturômetro TA-XT2.

SUMMARY

INFLUENCE OF THE ADDITION OF Ca^{++} AND Mg^{++} IONS ON THE HARDNESS OF WHEY PROTEIN CONCENTRATE GELS. Several studies have been carried out to understand the behaviour of whey protein concentrates (WPC). One of the most important properties of this functional ingredient is the capacity to form stable gels in the temperature range from 70 to 90°C, which makes it a convenient component of many foods such as bakery, meat, texturized and milk products. Protein concentration, pH, ionic composition and temperature must be kept under control in order to form products with desirable characteristics. The aim of this work was to investigate the influence of metallic divalent ions, Ca^{++} and Mg^{++} , on the hardness of thermally induced WPC gels. Dispersions of WPC at 6, 7 and 8% protein, at pH 6.3 containing 0, 7, 15, 30 and 75mM CaCl_2 or MgCl_2 were heated at 75°C for 45 min, followed by cooling at 4°C for 12 hours. The gels were evaluated in a texturometer TA-XT2. Gels with higher ionic concentration showed higher hardness values.

Keywords: whey; gel; calcium; magnesium; functional properties; texturometer TA-XT2.

1 - INTRODUÇÃO

Um aumento na propriedade de dureza geralmente tem sido atribuída a um ótimo balanço entre interações proteína-proteína e proteína-solvente. De acordo TANG, MCCARTHY, MUNRO [20], quando utilizados na mesma concentração de sais, os cátions bivalentes e trivalentes tem um maior efeito nas propriedades do gel que cátions monovalentes.

SCHMIDT *et al.* [16] trabalharam com dispersões de CPS a 10% (pH 7,0), exaustivamente dialisadas contra água deionizada e aquecidas a 100°C/15min. Investigando o papel do cálcio e da cisteína sobre a propriedade de gelatinização induzida pelo calor, concluíram que a máxima dureza do gel foi obtida a uma concentração de 11mM de cálcio e esta dureza diminui com o aumento da concentração de CaCl_2 . Eles sugerem que a diminuição da força do gel em altas concentrações de CaCl_2 poderia indicar ligações de cálcio intramoleculares. Relatam que a elasticidade de géis de CPS diminui ligeiramente com a adição de CaCl_2 acima de 10mM.

KUHN e FOEGEDING [12] concluíram que o efeito da adição de baixas concentrações de NaCl (< 75mM) e CaCl_2 (< 20mM), foi muito similar nos valores de firmeza do gel de IPS (Isolados Protéicos de Soro), diferindo muito nos valores de deformidade, indicando que a deformidade é

muito dependente da carga do cátion do sal adicionado.

O objetivo de BARBUT e FOEGEDING [2] foi determinar se o tratamento de pré-aquecimento poderia formar um gel de IPS (Isolado Protéico de Soro) a temperatura ambiente após adição de CaCl_2 . O resultado deste trabalho mostrou que suspensões de IPS contendo CaCl_2 começam a formar géis a 66°C, enquanto que o IPS aquecido sem CaCl_2 (isto é, o CaCl_2 é adicionado após aquecer) não forma géis em temperaturas abaixo de 72°C. Assim uma alta temperatura (ou um tempo maior) foi requerida para completar a sensibilidade conferida pelo CaCl_2 no pré-aquecimento das proteínas.

BOTTOMLEY, EVANS, PARKINSON [4] mostraram que quando sais são adicionados para força iônica elevada e o pH é ajustado para quase 7,0, dependendo do tipo de sal, pode ocorrer a formação de um gel muito rígido tipo-gelatina. Este tipo de gel é, de qualquer maneira muito susceptível a fratura e precisa de controle cuidadoso do balanço iônico para produzir as propriedades requeridas.

HARWALKAR, KALAB [8,9,10] e SCHMIDT, PACKARD, MORRIS [18] sugerem que sem a adição de sais, forças eletrostáticas repulsivas, acentuadas pelo pH elevado, previnem a gelatinização, mas essas forças foram diminuídas sob aumento da força iônica.

Os resultados dos trabalhos de MULVIHILL e

¹ Recebido para publicação em 11/10/01. Aceito para publicação em 04/02/02.

² Laboratório de Funcionalidade de Proteínas - Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP - Caixa Postal 6017 - CEP 13083 970 - Campinas - SP

* A quem a correspondência deve ser enviada.

KINSELLA [15] e KUHN e FOEGEDING [13] mostram que o efeito do CaCl₂ difere do NaCl, refletindo um diferença funcional entre os íons cálcio e sódio. Sendo o cálcio um cátion bivalente, é capaz de formar uma ponte iônica entre 2 grupos carboxílicos adjacentes de diferentes cadeias peptídicas, enquanto o sódio não. XIONG [22] sugere que a conformação das proteínas do soro foi menos desestabilizada com o aumento da concentração de cálcio.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de íons Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ na dureza de géis de Concentrado Protéico de Soro.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Concentrado protéico de soro

O Concentrado Protéico de Soro de Leite Bovino (CPS) empregado foi o produto comercial CALPRO 80, produzido da CALPRO Ingredients Corona, CA. As amostras foram armazenadas em local seco e arejado.

2.2 - Composição do CPS

Proteína, umidade, gordura e cinzas foram determinados pela AOAC [1] de acordo com os métodos 16193, 16192, 16199 e 16196, respectivamente.

2.3 - Preparação dos géis

Foram testadas 3 concentrações de CPS (6; 7 e 8% de proteínas), em 4 concentrações de íons cálcio na forma de cloreto de cálcio (7,5; 15; 30 e 75mM) e em 4 concentrações de íons magnésio na forma de cloreto de magnésio (7,5; 15; 30 e 75mM).

Foram preparadas dispersões protéicas a 6; 7 e 8% de CPS e 0; 7,5; 15; 30 e 75mM de CaCl₂ em água deionizada. Após a mistura e agitação das soluções por 3min com bastão de vidro, o pH foi ajustado para 6,30-6,35 com NaOH 3N e/ou HCl 3N. O volume foi completado para 25mL em balão volumétrico. As soluções então foram transferidas para novos béqueres de 25mL, onde foi colocado um volume correspondente a altura de 15mL do volume do béquer.

Este mesmo procedimento foi realizado para a preparação das dispersões protéicas a 6; 7 e 8% de CPS em água deionizada e 0; 7,5; 15; 30 e 75mM de MgCl₂.

Os géis foram obtidos por aquecimento das dispersões protéicas, em banho a 75°C/45min, seguido de resfriamento a 4°C e mantidos em repouso por 12 horas. Após este período os géis foram deixados por 30min em temperatura ambiente (local do texturômetro) e então medidas suas propriedades reológicas, de acordo com o método de BEUSCHEL, PARTRIDGE, SMITH [3].

2.4 - Avaliação dos géis

Um texturômetro TA-XT2 foi utilizado para medir a propriedade de dureza dos géis de CPS. A medida foi realizada dentro do próprio béquer onde se formou o gel.

A amostra dentro do béquer apresentou as seguintes dimensões: 3,2cm de diâmetro e 1,8cm de altura. O experimento foi feito em triplicatas.

As condições utilizadas para o teste foram: probe cilíndrico de acrílico com diâmetro de 20mm, velocidade do teste de 3mm/s, cada segmento foi comprimido a 50% da altura original com uma força de 20g (0,2N), usando duas compressões.

O perfil de textura foi registrado em um gráfico de força (g) vs. tempo (seg.). O conceito de dureza foi definido por BOURNE [5].

2.5 - Diálise

Foram preparados 300mL de solução a 8% de proteínas do CPS80, exatamente como na preparação dos géis (em água deionizada). Esta suspensão foi dializada em membrana de celulose para diálise, peso molecular 6000-8000 Da, contra água deionizada com um volume correspondente a 6 vezes o volume da amostra. O sistema foi mantido a 4°C, com agitação constante por 25 horas.

2.6- Medida de íons cálcio

Foi utilizado um Eletrodo de íons cálcio Modelo 93-20, onde foi obtido um resultado em mV correspondente a concentração de íons cálcio.

Amostras testadas: 100mL da solução 8% de proteínas de CPS sem diálisar; - 100mL da solução 8% de proteínas de CPS após diálisar; - 100mL da água de diálise; - 100mL da solução contendo as cinzas do CPS.

A amostra de cinzas do CPS 80 foi obtida pelo método 16196 da A.O.A.C. [1]; as cinzas foram dissolvidas em ácido clorídrico (1:1); adicionadas 2 gotas de ácido nítrico e 20mL de água, seguindo-se filtração e coleta em balão volumétrico de 100mL. Foram feitas triplicatas.

2.7- Análise estatística

Os resultados de dureza encontrados para os géis com 6, 7 e 8% de CPS80 com 0; 7,5; 15; 30 e 75mM de CaCl₂ e com 0; 7,5; 15; 30 e 75mM de MgCl₂ foram avaliados juntos estatisticamente pela média dos tratamentos, análise de variância e teste de Tukey a um nível de significância de 5% (p<0,05), através do programa estatístico Statistical Analysis System - SAS.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se através das Figuras 1 e 2, que a adição de CaCl₂ e MgCl₂ modifica a dureza dos géis. DE WIT [7] e SCHMIDT *et al.* [16] citam que o efeito de mudar a força iônica ou proporção relativa de espécies iônicas, antes ou após aquecimento, pode induzir profundas interações proteína-proteína.

A composição química aproximada do CPS 80 está ilustrada na Tabela 1.

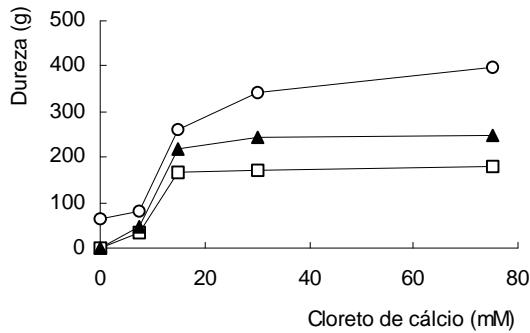


FIGURA 1. Soluções de (□) 6, (π) 7 e (O) 8% de proteína do CPS com 0; 7,5;15; 30 e 75mM de CaCl₂ foram aquecidas a 75°C por 45min, resfriadas a 4°C por 12h, e os géis comprimidos a 20g no texturômetro TA-XT2. Dados são médias de triplicatas.

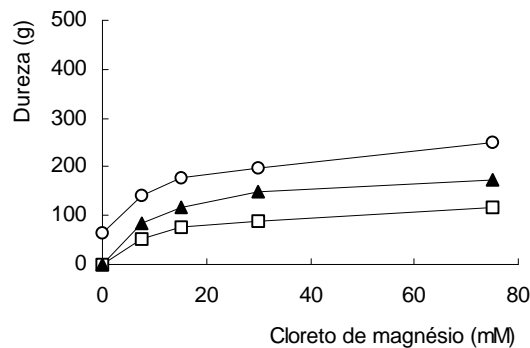


FIGURA 2. Soluções de 6, 7 e 8% de proteína do CPS: (□) 6%CPS, (π) 7%CPS e (O) 8%CPS (pH 6,3) com 0; 7,5; 15; 30; e 75mM de MgCl₂ foram aquecidas a 75°C por 45min, resfriadas a 4°C por 12h, e os géis comprimidos a 20g no texturômetro TA-XT2. Dados são médias de triplicatas.

TABELA 1. Composição química aproximada do CPS.

Composição	%(p/p) ^a
Proteína	75,76±0,50
Gordura	7,04±0,16
Umidade	5,86±0,10
Cinzas	2,50±0,06
Lactose	8,84 ^b

^a valores representam média±desvio padrão; x=3
^b valor obtido por diferença

Verificou-se que o comportamento é bastante semelhante. Nos dois tratamentos quanto maior a concentração do sal adicionado (CaCl₂ ou MgCl₂), maior a dureza dos géis obtidos. Os mais elevados valores de dureza para cada uma das respectivas concentrações do sal adicionado, foram obtidos com a maior concentração de proteína de CPS (8%).

Segundo SHIMADA e CHEFTEL [19], BRANDENBERG, MORR, WELLER [6] e MORR e HA [14] a dureza do gel aumenta com a concentração de proteínas; isto ocorre devido aos altos níveis de ligações protéicas intermoleculares que são formadas. As ligações cruzadas

irreversíveis entre cadeias de proteína na rede gel, tem sido atribuídas às ligações dissulfídicas e hidrofóbicas.

Foi observado que sem a adição de CaCl₂ ou de MgCl₂, não há diferença significativa a um nível de 5% (p<0,05) entre os valores de dureza obtidos, para as 3 concentrações de proteínas de CPS.

Observou-se que os géis com adição de CaCl₂ atingiram valores de dureza significativamente (p<0,05) maiores comparado aos géis com adição de MgCl₂. Isto foi verificado nas concentrações de 15; 30 e 75mM do sal adicionado, para as 3 concentrações de proteína do CPS testadas. Na concentração de 7,5mM de sal ocorreu o contrário, o valor da dureza do gel com MgCl₂ foi significativamente maior (p<0,05) que o valor de dureza do gel com CaCl₂.

Segundo VARUNSATIAN *et al.* [21] a presença de Ca⁺⁺ ou Mg⁺⁺ claramente promove a desnaturação do CPS. Entretanto, a entalpia do CPS quando CaCl₂ foi adicionado foi muito menor, do que com a adição de MgCl₂ ou NaCl, assim o papel do Ca⁺⁺ na desnaturação térmica de CPS pode diferir no mínimo um pouco do efeito dos outros sais. Mas, como afirmaram KUHN e FOEGEDING [13], o nível ótimo de cálcio para a formação do gel, é dependente do sistema.

No tratamento com CaCl₂ (Figura 1) verificou-se que para as concentrações de proteínas de 6 e 7% de CPS, o maior valor de dureza foi obtido em 15mM de CaCl₂ não diferindo significativamente (p<0,05) das concentrações de 30 e 75mM de CaCl₂. Para a concentração de 8% de CPS o maior valor de dureza é obtido em 30mM de CaCl₂ não diferindo significativamente (p<0,05) do valor obtido em 75mM de CaCl₂. As soluções protéicas com maiores concentrações apresentam mais sítios ligantes de cátions, possibilitando a ocorrência de mais ligações, influenciando na formação da rede gel e consequentemente na dureza do gel obtido. A Tabela 2 mostra os dados obtidos pelas medições através do pHmetro de íons cálcio.

TABELA 2. Resultados obtidos através do pHmetro de íons cálcio.

Amostra	[CaCl ₂ .2H ₂ O] (M)	g/100g CPS
Solução de 8% proteína do CPS80 dialisado	0,0016	-
Solução de 8% proteína do CPS80 não dialisado	0,0026	0,093±0,02
Água de diálise	0,00000534	-
Solução de cinzas totais do CPS80	0,0087	0,31±0,01

Cálcio Iônico do CPS80: 0,093% Cálcio Total do CPS80: 0,31% Cálcio Ligado do CPS80:0,271%

Através dos resultados anteriores pudemos verificar que a solução com 8% de proteína do CPS sem a adição de CaCl₂ formou gel. Na Figura 3 observa-se que, após dialisar uma solução com 8% de proteína do CPS não ocorreu formação de gel. O processo de diálise realizado removeu 65% do cálcio iônico da amostra de CPS. Com adição de CaCl₂ na solução dialisada verificou-se que a dureza é recuperada, ficando próxima à dureza dos géis de CPS não dialisados, o que mostra que o cálcio livre ou iônico presente no CPS é importante na formação de gel.

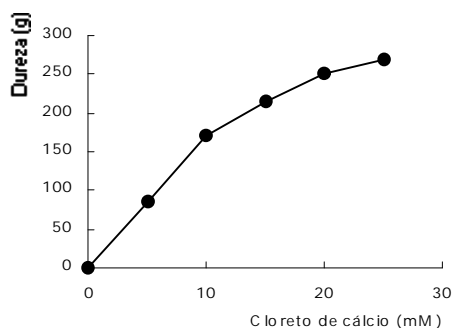


FIGURA 3. Soluções com 8% de proteína do CPS (pH 6,3) com 0, 5, 10, 15, 20 e 25mM de CaCl₂ foram aquecidas a 75°C por 45 min, resfriadas a 4°C por 12h, e os géis comprimidos a 20g no texturômetro TA-XT2. Dados são médias de triplicatas.

KUHN e FOEGEDING [13] também investigaram o papel de íons dialisáveis nas propriedades gelatinizantes de solução de CPS comercial. Empregaram diálise convencional para remover de 10 a 60% do Ca⁺⁺ e percentuais desconhecidos dos outros íons e lactose. Observaram géis mais fortes com maiores valores de firmeza, contrariando os dados referidos por BRANDENBERG, MORR, WELLER [6]; a reposição de 0,8 a 13,4mM de Ca⁺⁺ que foi removido por diálise, acentuou as propriedades gelatinizantes de duas das 4 soluções. Diálise contra um tampão contendo EDTA para remover 73% a 85% do Ca⁺⁺ enfraquece as propriedades gelatinizantes das soluções de CPS, resultando em géis com valores mais baixos de firmeza comparados aos que foram obtidos para solução de CPS dialisados convencionalmente.

O efeito das concentrações de Ca⁺⁺ e outros íons na gelatinização de soluções de CPS tem sido investigado [2, 3, 17, 20]. Adições de 100mM de íons de Ca⁺⁺, Na⁺, K⁺ e PO₄⁻³ acentuam as propriedades gelatinizantes de soluções de CPS desmineralizadas e deslactosadas preparadas em água destilada. A concentração ótima de íons adicionados, é inferior a 200mM [17].

Resultados encontrados por JOST [11] sugerem que uma quantidade específica de Ca⁺⁺ foi necessária para otimizar a dureza de géis. Este efeito foi independente da concentração total de cálcio. Existe uma forte hipótese de que o cálcio iônico influencia as ligações cruzadas eletrostáticas entre moléculas protéicas e, subsequentemente, a força iônica. Em concentrações de Ca⁺⁺ abaixo do ideal, ligações cruzadas eletrostáticas são insuficientes, resultando em géis fracos, ao passo que se excessiva concentração de Ca⁺⁺ estiver presente, atrações entre moléculas protéicas forçam a rede do gel a entrar em colapso.

4 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que:

- na faixa de 0-75mM de concentração salina os géis de concentrado protéico de soro de leite com maiores concentrações de íons Ca⁺⁺ e Mg⁺ mostra-

ram-se com mais elevados valores de dureza, como medido no texturômetro TA-XT2;

- a dureza dos géis com adição de íons Ca⁺⁺ apresentaram maior dureza do que os géis aos quais se adicionou íons Mg⁺⁺;
- na concentração de 8% de proteína do soro, os géis com os íons Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ atingiram o maior grau de dureza na concentração de 30mM;
- o cálcio iônico mostrou ter importância preponderante na formação do gel de proteínas do soro.

5 - REFERÊNCIAS

- [1] A. O. A. C. Official Methods of Analysis, 14th ed. **Association Of Official Analytical Chemists**. Washington. D. C., 1980.
- [2] 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.
- [3] BEUSCHEL, B. C.; PARTRIDGE, J. A.; SMITH, D. M. Insolubilized whey protein concentrate and/or chicken salt-soluble protein gel properties. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 4, p. 852-855, 1992.
- [4] BOTTOMLEY, R. C.; EVANS, M. T. A.; PARKINSON, C. J. Whey Proteins. In: Food Gels. P. Harris (Ed.), p. 435. London and New York, **Elsevier Applied Food Science Series**, Cap.11, p. 435-465, 1990.
- [5] BOURNE, M. C. Texture profile analysis. **Food Technology**, v. 32, n. 7, p. 62-66, 1978.
- [6] BRANDENBERG, A. H.; MORR, C. V.; WELLER, C. L. Gelation of commercial whey protein concentrates: Effect of removal of low-molecular-weight components. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 2, p. 427-432, 1992.
- [7] DE WIT, J. N. Structure and functional behaviour of whey proteins. **Netherland Institute for Dairy Research**, v. 35, n. 1, p. 47-64, 1981.
- [8] HARWALKAR, V. R.; KALAB, M. Thermal denaturation and aggregation of β -lactoglobulin at pH 2.5. Effect of ionic strength and protein concentration. **Milchwissenschaft**, v. 40, n. 1, p. 31-34, 1985.
- [9] HARWALKAR, V. R.; KALAB, M. Thermal denaturation and aggregation of β -lactoglobulin in solution electron microscopic study. **Milchwissenschaft**, v. 40, n. 2, p. 65-68, 1985.
- [10] HARWALKAR, V. R.; KALAB, M. Microstructure of isoelectric precipitates from β -lactoglobulin solutions heated at various pH values. **Milchwissenschaft**, v. 40, n. 11, p. 665-668, 1985.
- [11] JOST, R. Functional characteristics of dairy proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, n. 9, p. 283-288, 1993.
- [12] KUHN, P. R.; FOEGEDING E. A. Mineral salt effects on whey protein gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 1013-1016, 1991.
- [13] KUHN, P. R.; FOEGEDING, E. A. Factors influencing whey protein gel rheology: Dialysis and calcium chelation. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 3, p. 789-791, 1991.
- [14] 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.
- [15] MULVIHILL, D.M.; KINSELLA, J.E. Gelation characteristics of whey proteins and beta-lactoglobulin. **Food Technology**, v. 41, n. 9, p. 102-111, 1987.

- [16] SCHMIDT, R. H.; ILLINGWORTH, B. L.; AHMED, E. M.; RICHTER, R. L. The effect of dialysis on heat-induced gelation of whey protein concentrates. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 2, n. 2, p. 111-121, 1978.
- [17] SCHMIDT, R. H.; ILLINGWORTH, B. L.; DENG, J. C.; CORNELL J. A. Multiple regression and response surface analysis of the effects of calcium chloride and cysteine on heat-induced whey protein gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 529-533, 1979.
- [18] SCHMIDT, R. H.; PACKARD, V. S.; MORRIS, H. A. Effects of processing on whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2723-2733, 1984.
- [19] SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 5, p. 1018-1025, 1988.
- [20] TANG, Q.; MCCARTHY O. J. MUNRO P. A. Oscillatory rheological comparison of the characteristics of egg white, whey protein concentrates, whey protein isolate, and β -Lactoglobulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 2126-2130, 1994.
- [21] VARUNSATIAN, S.; WATANABE, K.; HAYAKAWA, S.; NAKAMURA, R. Effects of Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ and Na⁺ on heat aggregation of whey protein concentrates. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 1, p. 42-46, 1983
- [22] XIONG, Y. L. Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 380-384, 1992.