

Priscilla Nuernberg Rossa

**Influência da enzima transglutaminase microbiana nas propriedades
funcionais de sorvetes com diferentes teores de gordura**

Florianópolis-SC

2010

Priscilla Nuernberg Rossa

**Influência da enzima transglutaminase microbiana nas propriedades
funcionais de sorvetes com diferentes teores de gordura**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos da
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito final à obtenção do título de Mestre
em Ciências dos Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Marilde T. Bordignon-Luiz

Florianópolis-SC

2010

**Influência da enzima transglutaminase microbiana nas propriedades
funcionais de sorvetes com diferentes teores de gordura**

Por

Priscilla Nuernberg Rossa

Dissertação aprovada como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos pela comissão formada por:

Presidente:

Profª. Dra. Marilde T. Bordignon-Luiz (UFSC)

Membro

Profª. Dra. Elisa Helena Siegel Moecke (UNISUL)

Membro

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto (UFSC)

Membro

Profª. Dra. Roseane Fett (UFSC)

Coordenadora:

Profª. Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni (UFSC)

Florianópolis, 10 de maio de 2010

Agradecimentos

Aos meus pais Nerci e Rita e minha irmã Karen por todo apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim, dando-me sustentação e força para realização de meus sonhos. Minha eterna gratidão!

Ao Diogo, pelo amor, carinho, dedicação e paciência.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marilde T. Bordignon-Luiz pelos conhecimentos cedidos, pela compreensão, apoio, amizade e orientação prestada durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pela amizade, e em especial à Estela e Vívian, pela ajuda na parte prática do projeto.

Aos professores do Curso de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina por dividir seus conhecimentos e experiências.

À banca, por aceitar o convite de participação e pelas contribuições fornecidas.

À empresa AJINOMOTO® por fornecer a enzima transglutaminase para a realização deste estudo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Resumo

ROSSA, Priscilla Nuernberg. **Influência da enzima transglutaminase microbiana nas propriedades funcionais de sorvetes com diferentes teores de gordura.** 2010. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC.

A enzima transglutaminase microbiana (*Streptoverticillium mobaraense*) (TG) apresenta capacidade de modificar as propriedades das proteínas, principalmente através de reações de ligações cruzadas. Estas reações podem modificar as propriedades de solubilidade, capacidade de retenção de água, estabilidade ao aquecimento, bem como as propriedades de gelificantes, emulsificantes e reológicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a faixa de atividade máxima da TG microbiana em sorvetes através do delineamento central composto e avaliar os efeitos desta enzima nas propriedades funcionais (incorporação de ar, coalescência da gordura, comportamento de derretimento, reológico, textura e cor) de sorvetes com diferentes concentrações de gordura. O índice de consistência, parâmetro reológico correlacionado com a viscosidade de um produto, foi escolhido para o monitoramento da reação enzimática, e os fatores concentração, tempo e temperatura de incubação foram avaliados. O maior índice de consistência ($0,69 \text{ Pa s}^n$) foi obtido em concentração de TG de 4 U g^{-1} de proteína, com temperatura de $56,8 \text{ }^\circ\text{C}$ e tempo de reação de 90 minutos. A polimerização das proteínas lácteas foi confirmada com auxílio da eletroforese em gel de poliacrilamida, que demonstrou que a κ -caseína foi mais susceptível ao ataque da TG em comparação às demais caseínas e às proteínas do soro. Com base nestes resultados, sorvetes com 4, 6 e 8 % de gordura foram elaborados com e sem TG. Os resultados mostraram que a TG proporcionou maior capacidade de incorporação de ar, maior coalescência da gordura, resistência ao derretimento e menor firmeza em comparação às amostras sem a enzima, em todas as amostras estudadas, resultado da polimerização das proteínas lácteas pela ação da TG e formação de uma rede proteica mais coesa. Em relação aos parâmetros reológicos, verificou-se que a TG promoveu o aumento da viscosidade e das propriedades pseudoplásticas das amostras. O tratamento enzimático nos sorvetes com 4 e 6 % de gordura resultou em um produto com propriedades semelhantes ao sorvete com 8 % de gordura, demonstrando que a TG pode ser empregada em sorvetes com teor reduzido de gordura.

Palavras-chave: sorvete, redução de gordura, transglutaminase, proteínas lácteas.

Abstract

ROSSA, Priscilla Nuernberg. **Influence of the microbial transglutaminase enzyme on functional properties of ice cream with different fat content.** 2010. 123p. Dissertation (Master in Food Science). Federal University of Santa Catarina. Florianópolis – SC.

Microbial transglutaminase (*Streptovorticillium mobaraense*) (TG) is able to modify the properties of proteins, principally through cross-linking reactions. These reactions may modify the solubility properties, water retention capacity, stability on heating, and the gelling, emulsifying and rheological properties. The aim of this study was to evaluate the range of maximum activity of microbial TG in ice cream using the central composite design and to investigate the effects of TG on the functional properties (overrun, fat destabilization, melting rate, rheology, texture and color) of ice cream with different fat concentrations. The consistency index, a rheological parameter correlated with the viscosity of a product, was chosen to monitor the enzymatic reaction, and the factors concentration, incubation time and temperature were evaluated. The highest consistency index (Pa s^n 0.69) was obtained for a TG concentration of 4 U g^{-1} protein, at a temperature of 56.8°C and with a reaction time of 90 minutes. The polymerization of milk protein was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis, which demonstrated that κ -casein was more susceptible to attack by TG than the other caseins and whey proteins. Based on these results, ice cream samples with 4, 6 and 8 % fat were prepared with and without TG. The results showed that the TG provided a greater capacity to overrun, greater fat destabilization, resistance to melting and a lower hardness compared to samples without the enzyme for all samples studied, due to the polymerization of the proteins by the action of TG and formation of a more cohesive protein network. Regarding the rheological parameters, it was found that TG caused an increase in the viscosity and pseudoplastic properties of the samples. The enzymatic treatment of ice cream with 4 and 6 % fat resulted in a product with properties similar to ice cream with 8 % fat, demonstrating that TG can be used to produce ice cream with a reduced fat content.

Key-words: ice cream, fat reduced, transglutaminase, milk proteins.

Lista de Abreviaturas

A - tensão inicial requerida

a - componente de cor vermelho - verde

ACP - análise de componentes principais

B - coeficiente de ruptura tixotrópico

b - componente de cor amarelo - azul

Ca^{2+} - íon cálcio

EC - classe enzimática

F - força

g - grama

GRAS – *Generally Reconized as Safe*

K - índice de consistência

K_0 - limite de escoamento de Casson

K_c - viscosidade plástica de Casson

Kda kilodalton

Kg - kilograma

L - luminosidade

mm - milímetros

MSR - metodologia de superfície de resposta

n - índice de comportamento de fluxo

nm - nanômetro

Pa - Pascal

R^2 - coeficiente de determinação

rpm – rotações por minuto

S - área

s - segundos

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

t - tempo

TG - transglutaminase

U g^{-1} - unidade de atividade enzimática por grama

α - alfa

β - beta

γ - taxa de deformação ou cisalhamento

ε - épsilon

η - viscosidade

η_{pl} - viscosidade plástica

κ - kapa

Δv - diferença de velocidade

Δy - distância entre duas camadas de fluidos adjacentes

σ - tensão de cisalhamento

σ_0 - limite de escoamento

μm - micrômetro

Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1.1** Estrutura primária da α_{s1} -caseína (variante genética B) com destaque para a sequência reativa e os resíduos de glutaminas reativos na reação com transglutaminase. 18
- Figura 1.2** Estrutura primária da α_{s2} -caseína (variante genética A) com destaque para a sequência reativa e os resíduos de glutaminas reativos na reação com transglutaminase. 19
- Figura 1.3** Estrutura primária da β -caseína (variante genética A2) com destaque para a sequência reativa e os resíduos de glutaminas reativos na reação com transglutaminase. 20
- Figura 1.4** Estrutura primária da κ -caseína (variante genética B) com destaque para a sequência reativa e os resíduos de glutaminas reativos na reação com transglutaminase. 21
- Figura 1.5** Estrutura primária da β -lactoglobulina (variante genética A) com destaque para os resíduos de glutaminas (\circ) e lisinas (\square) reativos na reação com transglutaminase. 22
- Figura 1.6** Estrutura primária da α -lactoalbumina (variante genética B) com destaque para os resíduos de glutaminas (\circ) e lisinas (\square) reativos na reação com transglutaminase. 23
- Figura 1.7** Estrutura da gordura em sorvetes. 28
- Figura 1.8** Ilustração da adsorção dos glóbulos de gordura parcialmente coalescidos e suas membranas proteicas associadas à superfície das bolhas de ar. 29
- Figura 1.9** Interfaces gordura/água e água/ar presentes em sorvete. 32
- Figura 1.10** Estrutura tri-dimensional da transglutaminase microbiana. 35
- Figura 1.11** Reações catalisadas pela transglutaminase. A) reação de incorporação de amina; B) reação de ligação cruzada; C) desaminação. 36
- Figura 1.12** Reograma dos fluidos independentes do tempo (A) e dos fluidos 42

dependentes do tempo (B).

Capítulo 2

- Figura 2.1** Fluxograma do preparo dos sorvetes com transglutaminase. 56
- Figura 2.2** Gráfico de contornos (A) e de superfície resposta (B) do índice de consistência em relação à concentração da transglutaminase (U g^{-1}) e tempo de reação (min), com temperatura fixada em $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. 62
- Figura 2.3** Valores observados *versus* resíduos (A) e resíduos padronizados *versus* valores preditos (B) para o índice de consistência dos sorvetes com transglutaminase. 64
- Figura 2.4** Comportamento reológico das amostras submetidas ao tratamento com transglutaminase (4 U g^{-1} , $56,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 90 min). 66
- Figura 2.5** Perfil de SDS-PAGE das amostras de sorvetes. Linha 1: marcador de massa molar; linha 2: amostra controle (sem TG); e linha 3: amostra de sorvete com TG e com pré-tratamento térmico do leite; linha 4: amostra com TG sem pré-tratamento térmico do leite (4 U g^{-1} proteína, 90 minutos de reação a 40°C). 68

Capítulo 3

- Figura 3.1** Comportamento de derretimento das diferentes formulações de sorvetes. 82
- Figura 3.2** Ilustração do comportamento de derretimento após 0, 30 e 60 minutos de exposição das amostras de sorvete a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). 83
- Figura 3.3** Efeito da taxa de deformação na viscosidade aparente das amostras de sorvetes. 86
- Figura 3.4** Curvas de histerese para as amostras de sorvetes (A – viscosidade aparente *versus* taxa de deformação; B - tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação). 89
- Figura 3.5** Firmeza dos sorvetes obtida através da análise de textura experimental expressos em força (g). 91
- Figura 3.6** Análise de componentes principais obtidos das amostras de sorvetes. 93

Lista de Tabelas

Capítulo 2

- Tabela 2.1** Variáveis independentes e seus níveis de variação estabelecidos pelo planejamento experimental. 57
- Tabela 2.2** Delineamento central composto com as variáveis independentes e suas respostas experimentais e previstas. 60
- Tabela 2.3** Resultados dos coeficientes de regressão e da análise de variância do índice de consistência dos sorvetes submetidos ao tratamento com transglutaminase. 61
- Tabela 2.4** Parâmetros reológicos obtidos pelo modelo de Lei de Potência das amostras submetidas ao tratamento com transglutaminase (4 U g⁻¹, 56,8 °C e 90 min). 65

Capítulo 3

- Tabela 3.1** Caracterização físico-química das amostras de sorvetes. 77
- Tabela 3.2** Efeito da adição da transglutaminase nos parâmetros de incorporação de ar e na desestabilização da gordura das amostras de sorvetes. 79
- Tabela 3.3** Parâmetros reológicos das curvas ascendentes (aumento da taxa de deformação) e descendentes (diminuição da taxa de deformação) obtidos pelo modelo Lei de Potência das amostras de sorvetes. 85
- Tabela 3.4** Histerese (tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação) das amostras de sorvetes. 88
- Tabela 3.5** Parâmetros tixotrópicos obtidos através do Modelo de Weltman para as amostras de sorvetes. 90
- Tabela 3.6** Intensidade de cor das amostras de sorvete. 92

Sumário

Introdução	13
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica	15
1. Proteínas do leite bovino	16
1.1. Caseínas	16
1.2. Proteínas do soro	21
2. Sorvete	23
2.1. História	23
2.2. Definição	25
2.3. Processamento do sorvete	25
2.4. Estrutura e qualidade do sorvete	26
3. Transglutaminase	34
3.1. Aplicação da transglutaminase em produtos lácteos	37
4. Reologia	39
4.1. Modelos reológicos	43
4.2. Reologia aplicada em sorvetes	46
5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	47
Capítulo 2 - Otimização da atividade da transglutaminase microbiana em sorvetes aplicando metodologia de superfície de resposta	51
Capítulo 3 - Caracterização de sorvetes com diferentes teores de gordura e com transglutaminase microbiana	69
Conclusões Gerais	96
Referências	97
Anexo	116

Introdução

As proteínas do leite bovino possuem grande importância nutricional, tecnológica e funcional. Correspondem à base estrutural de vários produtos alimentícios, e sua modificação pode possibilitar o aumento das funcionalidades físicas desses produtos (BABIKER, 2000). A enzima transglutaminase microbiana é capaz de introduzir ligações covalentes nas proteínas modificando propriedades como: solubilidade, habilidade de hidratação, capacidade emulsificante e espumante, viscosidade, elasticidade e geleificação das proteínas para o consumo humano (LORENZEN et al., 2002; JAROS et al., 2006).

A transglutaminase a partir da origem microbiana está disponível comercialmente, é afirmada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo órgão *Food and Drug Administration* (FDA, 2010) e possui afinidade com as proteínas lácteas, especialmente as caseínas.

Os sorvetes são definidos como produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gordura e proteína; ou de uma mistura de água e açúcar (BRASIL, 2005b). No Brasil, o consumo total de sorvetes, entre 2002 e 2009, cresceu 39,5 %, passando de 713 milhões de litros para 995 milhões de litros consumidos por ano. O consumo individual cresceu 28,71 % no mesmo período, sendo que cada brasileiro toma, em média, 5,20 litros por ano (ABIS, 2010). Além do aumento da produção dos sorvetes, observa-se ainda um interesse crescente no desenvolvimento de produtos com baixa ou ausência de gordura em resposta à demanda dos consumidores, principalmente por apresentarem elevada concentração de gordura, aproximadamente 10 %. Contudo, quando o conteúdo de gordura é reduzido em sua formulação, alterações em suas propriedades físicas e sensoriais são observadas (METWALLY, 2007). O fortalecimento da rede proteica através da polimerização das proteínas lácteas pela transglutaminase pode ser capaz de minimizar os efeitos causados pela redução da gordura nas formulações de sorvetes.

Estudos envolvendo a substituição da gordura pela enzima transglutaminase em sorvetes são praticamente inexistentes. O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de atividade da transglutaminase em sorvetes e avaliar o efeito da polimerização proteica nas propriedades físicas e funcionais de sorvetes com diferentes concentrações de gordura.

Este trabalho será apresentado na forma de artigos científico divididos em capítulos.

O Capítulo 1 apresenta uma breve revisão bibliográfica abordando os principais temas envolvidos no presente trabalho: proteínas do leite bovino, sorvetes, enzima transglutaminase, reologia e eletroforese.

O Capítulo 2 refere-se à análise de otimização da atividade da enzima transglutaminase em sorvetes, a avaliação do comportamento reológico desses sorvetes e confirmação da reação enzimática através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

O Capítulo 3 é referente ao efeito da transglutaminase nas propriedades funcionais de sorvetes com diferentes concentrações de gordura. As propriedades avaliadas foram: incorporação de ar, desestabilização da gordura, comportamento de derretimento, cor, comportamento reológico e textura das amostras de sorvetes.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

Revisão Bibliográfica

1. Proteínas do leite bovino

As proteínas do leite bovino possuem grande importância nutricional, tecnológica e funcional. Suas propriedades nutritivas e tecnológicas derivam da composição em aminoácidos que atendem à maioria das exigências fisiológicas do ser humano (CHEFTEL CUQ; LORIENT, 1989). Dentre as propriedades funcionais de grande interesse tecnológico encontram-se a capacidade de absorção e retenção de água e gordura, solubilidade, capacidade emulsificante e espumante, geleificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis e melhoria nas propriedades sensoriais (SGARBIERI, 2005).

As proteínas do leite são divididas em insolúveis, denominadas caseínas, que representam 78 % do nitrogênio total do leite bovino; e solúveis, denominadas proteínas do soro, que correspondem em torno de 20 % (FOX, 2003; PEREDA et al., 2005). O conhecimento das diferenças estruturais e das propriedades físico-químicas entre as várias formas de caseínas e proteínas do soro é indispensável para a compreensão do comportamento tecnológico, funcional e nutritivo dessas proteínas como parte de um sistema alimentício (SGARBIERI, 2005).

1.1. Caseínas

As caseínas são fosfoproteínas sintetizadas na glândula mamária em resposta a hormônios lactogênicos e outros estímulos e secretada na forma de grandes agregados coloidais responsáveis por muitas das propriedades físicas de leite (GINGER; GRIGOR, 1999). Encontram-se na forma de grandes micelas coloidais esféricas juntamente com o fosfato de cálcio (CHRISTENSEN et al., 1996; FENNEMA, 1996; GINGER; GRIGOR, 1999; BOUGUYON et al., 2006; FARRELL JR et al., 2006), com um diâmetro variável de 30 a 300 nm. Tanto o cálcio quanto o fosfato possuem um papel importante na manutenção da integridade das micelas (FENNEMA, 1996). As micelas são compostas por duas frações distintas: uma que precipita na presença de cálcio, composta principalmente por α_{s1} , α_{s2} - e β -caseínas, e outra que não precipita na presença deste íon, representada pela κ -caseína. A κ -caseína é solúvel na presença de cálcio e interage com ele para estabilizar a micela e propiciar

a formação do estado coloidal estável (GINGER; GRIGOR, 1999; FARRELL JR et al., 2006; HORNE, 2006).

A micela de caseína é formada por submicelas com diâmetro de 10 - 20 nm apresentando regiões hidrofóbicas, orientadas em direção ao interior da micela, e regiões hidrofílicas, orientadas para a superfície da micela. Na superfície encontra-se a κ -caseína associada com outras κ -caseínas, e áreas ricas em carboidratos e fosfato interagindo com o cálcio para formar pontes de fosfato de cálcio (WONG, 1995).

As caseínas apresentam diferenças entre si devido a variações genéticas. Essas variantes genéticas são mutações que ocorrem na estrutura primária das caseínas em que um ou mais aminoácidos são substituídos por outros na seqüência primária da cadeia polipeptídica (SGARBIERI, 2005).

A α -caseína representam 50-55 % das caseínas no leite e constam de um componente majoritário (α_{s1} -caseína) e cinco minoritários (α_{s0} -caseína, α_{s2} -caseína, α_{s3} -caseína, α_{s4} -caseína e α_{s5} -caseína) de acordo com suas propriedades eletroforéticas.

A α_{s1} -caseína tem um peso molecular de 23,600 KDa e apresenta 199 resíduos de aminoácidos, com oito fosforilados situados entre os resíduos 43 e 79 (Figura 1.1). O grupamento fosfato fixa os íons cálcio fazendo com que precipite na presença deste cátion divalente. O restante da cadeia polipeptídica é hidrofóbica e exibe uma forte associação na formação das micelas (WONG, 1995). A localização das cargas e a irregularidade das cadeias laterais hidrofóbicas conferem à molécula um comportamento dipolar com um pólo globular muito hidrofóbico e outro pólo carregado (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989).

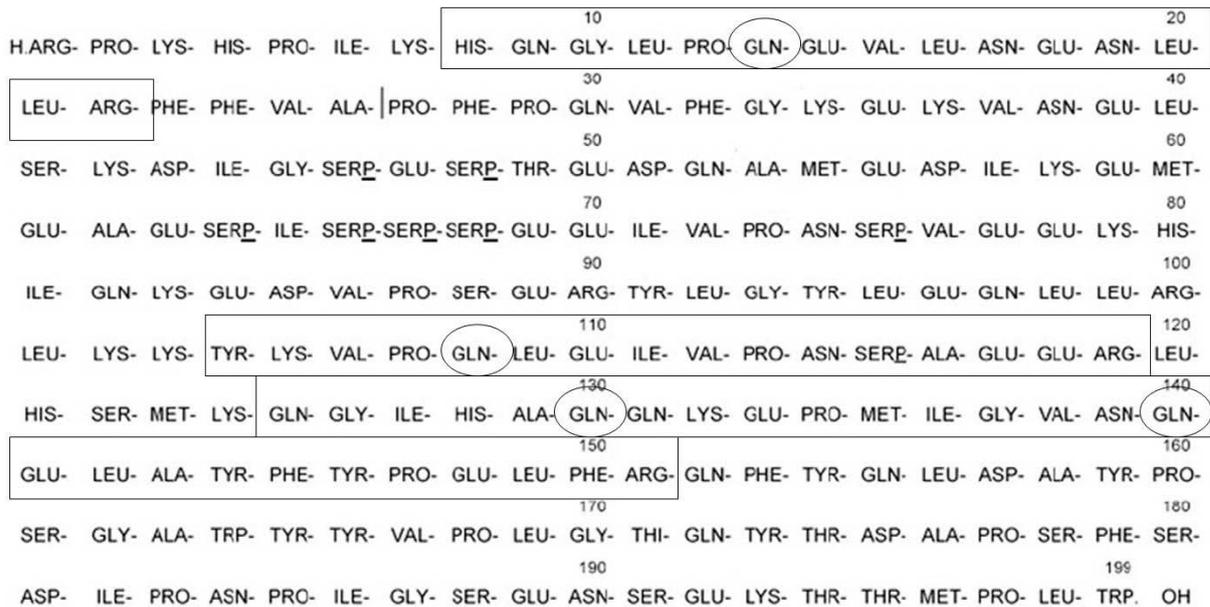


Figura 1.1. Estrutura primária da α_{s1} -caseína (variante genética B) com destaque para a sequência reativa e os resíduos de glutaminas reativos na reação com transglutaminase.

Fonte: Christensen et al., 1996; Sgarbieri, 2005.

A α_{s2} -caseína é a mais hidrofílica de todas as caseínas por ser mais fosforilada (10 a 13 resíduos) e mais rica em resíduos catiônicos. Apresenta peso molecular na faixa de 23,5 a 24 KDa e uma cadeia polipeptídica com 207 resíduos de aminoácidos (Figura 1.2). Os resíduos fosforesil estão agrupados em três pólos (resíduos 8 - 16, 56 - 61 e 129 - 133) enquanto que as partes hidrofóbicas se limitam às porções 160-207 (sequência C-terminal) e 90-120 (sequência central) (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989; FENNEMA, 1996). Esta estrutura sugere que as interações eletrostáticas são importantes e dependem do pH, resultando assim em uma grande sensibilidade aos íons Ca^{2+} (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989).

A α_{s0} -caseína é idêntica a α_{s1} -caseína, contudo apresenta um grupo fosfoseril a mais no resíduo 41. A α_{s3} -, α_{s4} - e α_{s5} -caseínas diferem da α_{s2} -caseína apenas quanto ao grau de fosforilação (WONG, 1995).

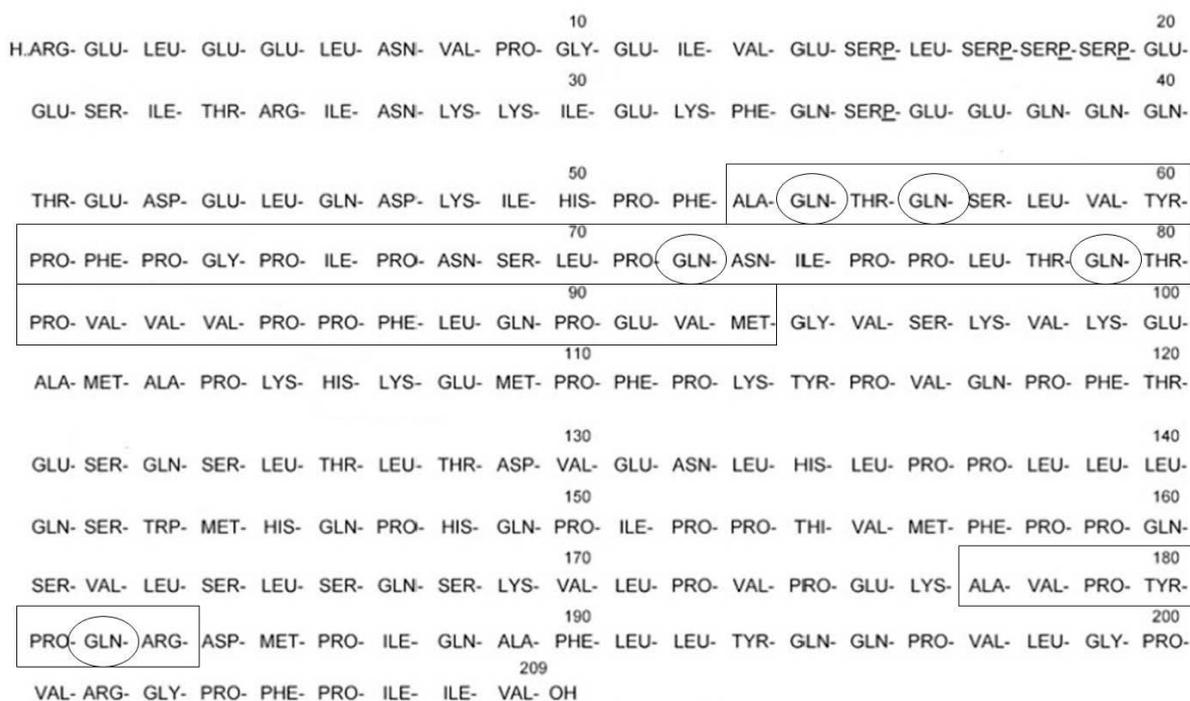


Figura 1.3. Estrutura primária da β -caseína (variante genética A²) com destaque para a sequência reativa e os resíduos de glutaminas reativos na reação com transglutaminase.

Fonte: Christensen et al., 1996; Sgarbieri, 2005.

Em razão da composição e da sequência de aminoácidos característicos, a α - e β -caseína apresentam estrutura flexível com baixo grau de estrutura secundária (α -hélice) e com menos de 10 % de estrutura em conformação folha- β . Essa característica estrutural, aberta e flexível, deve-se ao elevado teor de prolina (Pro), aproximadamente 8,5 %, uniformemente distribuída ao longo da cadeia polipeptídica. A prolina tem a propriedade de interromper a continuidade da estrutura secundária, particularmente a α -hélice, promovendo a estrutura randomizada e com baixo grau de estrutura secundária. Em contrapartida, as estruturas terciárias das moléculas de caseína ainda não foram suficientemente esclarecidas (FENNEMA, 1996; SGARBIERI, 2005).

A κ -caseína corresponde a 15 % do total de caseínas e é a única caseína majoritária que contém cisteína (RASMUSSEN et al., 1999). Seus monômeros possuem peso molecular de 19 KDa, mas no leite as moléculas encontram-se agregadas em polímeros de peso molecular de 60 e 600 KDa formados via ligações de dissulfeto (WONG, 1995; SGARBIERI, 2005). Localiza-se na superfície da micela e contém apenas um único resíduo fosforilado, o que resulta na pouca fixação de íons cálcio (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989;

BOUGUYON et al., 2006). A κ -caseína é essencial para a formação da estrutura da micela, uma vez que sendo menos sensível a precipitação pelo Ca^{+2} , exerce nas micelas um papel estabilizador frente a precipitação por este íon. Contêm 169 resíduos de aminoácidos com um segmento N-terminal (1-105) hidrofóbico e um segmento C-terminal (106-169) hidrofílico, conhecidos como para-k-caseína e glicomacropéptido, respectivamente (Figura 1.4) (FENNEMA, 1996). A região da seqüência primária da para- κ -caseína, por ser de natureza apolar, orienta-se para o interior das micelas e interage, por meio de grupos hidrofóbicos, com as α - e β -caseínas dispostas no núcleo da micela, ao passo que o glicomacropéptido, em virtude de sua polaridade, orienta-se para a fase do soro, interagindo com a água. Essas interações da seqüência primária da κ -caseína estabilizam as micelas no leite (SGARBIERI, 2005).



Figura 1.4. Estrutura primária da κ -caseína (variante genética B) com destaque para a seqüência reativa e os resíduos de glutaminas reativos na reação com transglutaminase.

Fonte: Christensen et al., 1996; Sgarbieri, 2005.

1.2. Proteínas do soro

O termo proteína do soro é utilizado para denominar o grupo de proteínas que permanecem solúveis no soro do leite após a precipitação da caseína a pH 4,6 e temperatura de 20 °C (FARRELL JR et al., 2004). As proteínas do soro mais abundantes são a β -lactoglobulina e α -lactoalbumina produzidas pela glândula mamária, e em menor quantidade

as imunoglobulinas e soroalbumina bovina derivadas do sangue bovino. A β -lactoglobulina e α -lactoalbumina possuem estrutura globular compacta com uma sequência primária contendo resíduos polares e hidrofóbicos e, como as caseínas, possuem cargas negativas no pH do leite (FENNEMA, 1996).

A β -lactoglobulina representa 50 % das proteínas do soro e apresenta 162 aminoácidos em sua estrutura primária com peso molecular de 18 KDa (Figura 1.5). Contém 5 resíduos de cisteína, formando duas pontes de dissulfeto (106 - 119 e 66 - 160) que contribuem para sua forma globular (KONTOPIDIS; HOLT; SAWYER, 2004; SGARBIERI, 2005). A β -lactoglobulina é uma proteína termossensível e vários efeitos são produzidos por ação da temperatura, como a perda de solubilidade e a exposição de regiões da molécula devido à mudança conformacional, o que possibilita a interação com outros componentes (FENNEMA, 1996; IAMETTI et al., 1996; VASBINDER; de KRUIF, 2003). Mudanças conformacionais reversíveis ocorrem em temperaturas menores que 70 °C. Temperaturas acima de 70 °C pode provocar sua desnaturação e polimerização irreversível, onde os dímeros se dissociam em monômeros e se desdobram parcialmente. Essas alterações levam à exposição de grupamentos hidrofóbicos e de grupamentos sulfidril livres, resultando em um monômero reativo com propriedades geleificantes e emulsificantes (TANG; MA, 2007).

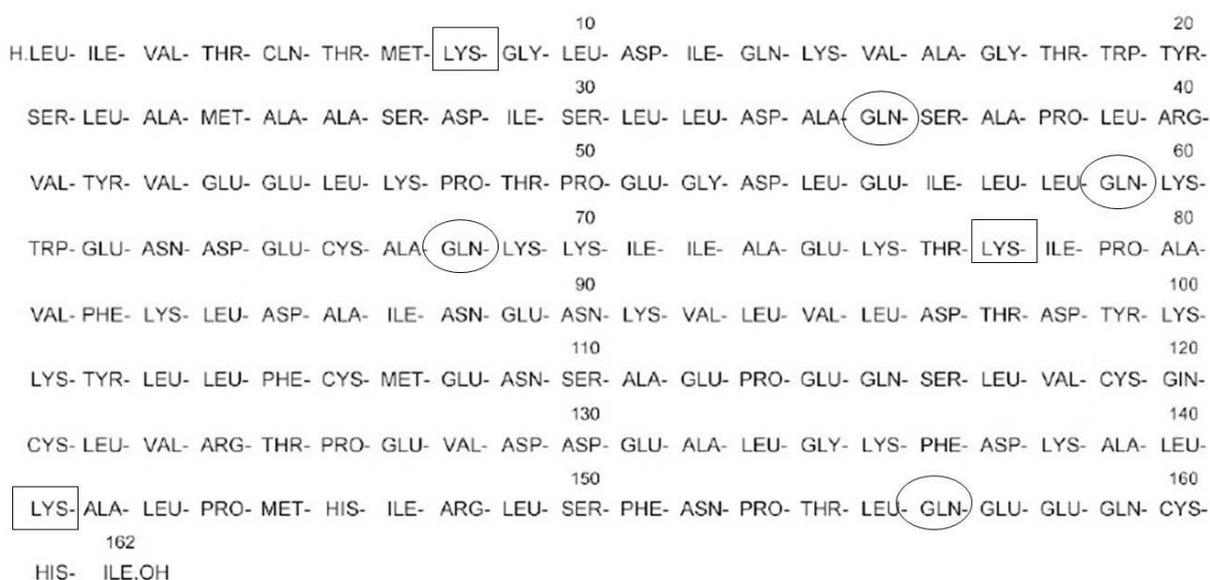


Figura 1.5. Estrutura primária da β -lactoglobulina (variante genética A) com destaque para os resíduos de glutaminas (○) e lisinas (□) reativos na reação com transglutaminase.

Fonte: Nieuwenhuizen et al., 2004; Sgarbieri, 2005.

A α -lactoalbumina representa 20 - 25 % das proteínas do soro, apresenta 123 aminoácidos e peso molecular de 14,18 KDa. A estrutura nativa da α -lactoalbumina consiste de dois domínios (um domínio de cadeia α -hélice e outro de cadeia folha- β) conectados por um *loop* ligante de cálcio. A estrutura é modulada e estabilizada por quatro ligações dissulfeto nas posições 6 - 120, 61 - 77, 73 - 91 e 28 - 111 (Figura 1.6) (FENNEMA, 1996; ANDERSON; BROOKS; BERLINER, 1997; NIEUWENHUIZEN et al., 2003; SGARBIERI, 2005). O íon cálcio na α -lactoalbumina tem um papel estrutural, sendo requerido para o desdobramento e formação da ligação dissulfeto nativa da proteína desnaturada (CHRYSINA; BREW; ACHARYA, 2000). Após a remoção do Ca^{2+} , a estrutura terciária torna-se menos rígida, contudo a estrutura secundária da proteína permanece intacta (NIEUWENHUIZEN et al., 2003).

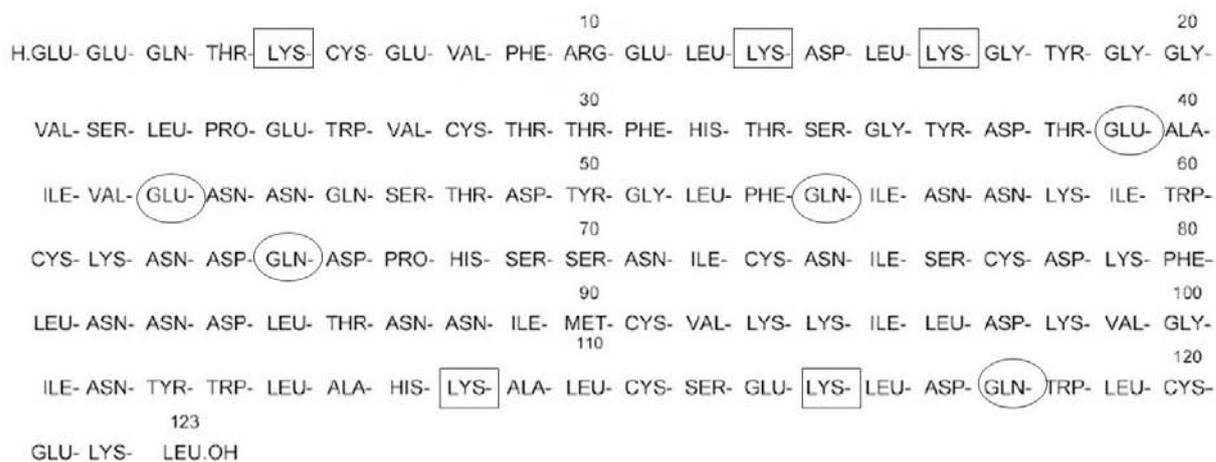


Figura 1.6. Estrutura primária da α -lactoalbumina (variante genética B) com destaque para os resíduos de glutaminas (\circ) e lisinas (\square) reativos na reação com transglutaminase.

Fonte: Nieuwenhuizen et al., 2003; Sgarbieri, 2005.

2. Sorvete

2.1. História

Os indícios mais antigos sobre o sorvete datam de mais de três mil anos atrás com origem no Oriente. O primeiro relato refere-se aos chineses, que misturavam neve com frutas fazendo uma espécie de sorvete. Esta técnica foi passada aos árabes, que logo começaram a

fazer caldas geladas chamadas de sharbet, e que mais tarde se transformaram nos famosos sorvetes franceses sem leite, o sorbet. Nos banquetes de Alexandre, o Grande, na Grécia, e nas famosas festas gastronômicas do imperador Nero, em Roma, os convidados já degustavam frutas e saladas geladas com neve. O Imperador mandava seus escravos buscarem neve nas montanhas para misturar com mel, polpa ou suco de frutas e estocava o gelo em profundos poços construídos pelo povo. Porém, a grande revolução no mundo dos sorvetes aconteceu com Marco Polo, que trouxe do Oriente para a Itália, em 1292, o segredo do preparo de sorvetes usando técnicas especiais, produzindo sorvetes de água, muito parecidos com os atuais. Assim o preparo dos sorvetes espalhou-se por toda a Itália, e quando Catarina de Medici casou-se na França com o futuro Henrique II, entre as novidades trazidas da Itália para o banquete de casamento, estavam as sobremesas geladas, que encantaram toda a corte. Contudo, o povo francês só teve acesso a estas especialidades um século depois quando Francesco Procópio del Cotelli abriu um café, em Paris, que servia bebidas geladas e sorvete tipo sorbet. Os sorvetes se espalharam por toda a Europa e logo chegaram também aos Estados Unidos. Foi nos Estados Unidos em 1851, a primeira produção de sorvete em escala industrial na cidade de Baltimore, Maryland, por Jacob Fussell (ARBUCKLE, 1986; MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003; ABIS, 2009).

No Brasil, o sorvete ficou conhecido em 1834, quando um navio americano aportou no Rio de Janeiro com toneladas de gelo. Dois comerciantes cariocas compraram 217 toneladas deste gelo e começaram a fabricar sorvetes com frutas brasileiras. Na época, não havia como conservar o sorvete gelado e, por isso, tinha que ser consumido logo após o seu preparo. Um anúncio avisava a hora exata da fabricação. O primeiro anúncio apareceu em São Paulo, no dia 4 de janeiro de 1878, contendo a seguinte mensagem: "SORVETES - Todos os dias às 15 horas, na Rua Direita, nº 44". Evoluindo a passos curtos, o sorvete só teve distribuição no país em escala industrial em 1941, quando foi fundada na cidade do Rio de Janeiro a U.S. Harkson do Brasil. Desde então, a população foi se tornando cada vez mais adepta a este produto; dados recentes apontam que no país, em 2009, foi consumido cerca de 995 milhões de litros de sorvete (ABIS, 2009).

2.2. Definição

Os sorvetes são emulsões óleo em água, onde a fase oleosa normalmente consiste de gordura láctea (BAZMI et al., 2008). São sistemas coloidais complexos, contendo na fase congelada: cristais de gelo; bolhas de ar; glóbulos e agregados de gorduras parcialmente coalescidos; todos em fases descontínuas envolvidas por uma matriz contínua não congelada de açúcares, proteínas, sais, polissacarídeos e água (KOXHOLT; EISENMANN; HINRICHS, 2001; GOFF, 2002; METWALLY, 2007).

De acordo com a Resolução RDC nº 266 de 22/09/05, os sorvetes são designados como gelados comestíveis e são definidos como produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gordura e proteína; ou de uma mistura de água e açúcar. Podem ser adicionados de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto (BRASIL, 2005b). Basicamente, consistem de cerca de 50 % de ar incorporado por volume, 10-15 % de gordura, 10 % de sólidos lácteos, 15 % de açúcares e 60 - 65 % de água por peso (STANLEY; GOFF; SMITH, 1996).

2.3. Processamento do sorvete

O processamento do sorvete envolve a mistura de todos os ingredientes, seguida da pasteurização, homogeneização, maturação, congelamento e armazenamento (GOFF, 1997b; ALDAZABAL et al., 2006).

Primeiramente, os ingredientes líquidos são adicionados à tina de mistura (ou no próprio pasteurizador), e a agitação mecânica e o aquecimento são iniciados. Durante a agitação, são adicionados os ingredientes em pó, antes de atingir 50 °C (GOFF, 1997b; ALDAZABAL et al., 2006).

Em seguida ocorre a pasteurização, que além de destruir bactérias patogênicas e reduzir a quantidade bacteriana para no máximo 100.000 por grama, auxilia na hidratação de alguns componentes do sorvete, como proteínas e estabilizantes (ALDAZABAL et al., 2006).

Devido à pasteurização, grandes glóbulos de gordura são formados. Caso o sorvete seja produzido com esta mistura, poderá ocorrer uma distribuição inadequada da gordura e das bolhas de ar. Assim, a homogeneização é utilizada em escala industrial para reduzir o tamanho dos glóbulos de gordura, tornando-os uniformes e com tamanho aproximado de 1

µm (ALDAZABAL et al., 2006). Este processo proporciona maior estabilidade da gordura durante a maturação, maior habilidade de batimento (GOFF, 1997b), aumento da estabilidade das bolhas de ar, maior resistência ao derretimento e formação de um produto final mais suave e cremoso (GOFF, 2009).

Após a homogeneização do sorvete ocorre a etapa de maturação, onde a calda do sorvete é mantida em baixas temperaturas, geralmente 2 a 4 °C. Nesta etapa é realizada a adição dos ingredientes sensíveis ao tratamento térmico, como suco de frutas, polpas, essências, etc. Durante esse processo ocorre a cristalização da gordura e completa hidratação das proteínas e estabilizantes, ocasionando o aumento da viscosidade devido à absorção da água livre (GOFF, 1997b; ALDAZABAL et al., 2006; BAZMI et al., 2008). O tempo de maturação favorece a interação entre as proteínas e o emulsificante, onde este irá deslocar as proteínas da superfície dos glóbulos de gordura reduzindo a estabilização destes glóbulos e aumentando a coalescência parcial da gordura (BAZMI et al., 2008).

O processo de congelamento é dinâmico, onde o ar é adicionado e os cristais de gelo são formados para criar sorvetes com textura adequada (SEGALL; GOFF, 2002). O congelamento ocasiona várias mudanças físicas incluindo: a ação das proteínas e surfactantes na formação e estabilização da espuma; coalescência parcial da gordura causando a absorção da gordura na interface ar e formação dos glóbulos de gordura aglomerados que estabilizam a lâmina que envolve as bolhas de ar; e a remoção da água da solução na forma de gelo (GOFF, 2002). Após o congelamento inicial, o sorvete é embalado e armazenado utilizando temperaturas de - 20 a - 30 °C (DREWETT; HARTEL, 2007).

2.4. Estrutura e qualidade do sorvete

A qualidade do sorvete, levando em consideração a textura suave ou a sensação de frescor percebida pelos consumidores, está diretamente relacionada com a formulação, estrutura da gordura e da espuma, tamanho e morfologia das bolhas de ar e dos cristais de gelo incorporados ao produto (CHANG; HARTEL, 2002).

A textura depende de muitos fatores como: estado de agregação dos glóbulos de gordura; da quantidade de ar; da viscosidade da fase aquosa e do tamanho e estado de agregação dos cristais de gelo. A viscosidade é afetada principalmente pela gordura e estabilizantes; tipo e qualidade dos ingredientes, processamento e manipulação da mistura; e

concentração do conteúdo de sólidos totais. Com o aumento da viscosidade, a resistência ao derretimento e a maciez do corpo também aumentam (KUŞ; ALTAN; KAYA, 2005).

Gordura

A gordura do leite é o componente de maior importância na formulação dos sorvetes (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003). Várias etapas do processamento contribuem para o desenvolvimento de sua estrutura. Durante a homogeneização, o tamanho dos glóbulos é reduzido e uma nova interface ou membrana é formada dependendo da natureza, estrutura e concentração da fase aquosa (GOFF, 1997b; SEGALL; GOFF, 2002). A natureza desta interface irá afetar a estabilidade da emulsão e as propriedades de agregação dos glóbulos de gordura. A etapa de maturação a 4 °C permite a estabilização da membrana e o tempo para a cristalização da gordura, necessários para os estágios de incorporação de ar e congelamento (HERRERA et al., 1999; SEGALL; GOFF, 2002).

A desestabilização da gordura é necessária para a formação da estrutura dos sorvetes e refere-se ao processo de coalescência parcial dos glóbulos de gordura que proporciona o desenvolvimento de uma rede interna contínua. A coalescência parcial corresponde à aglomeração/agregação irreversível dos glóbulos formados pela combinação de gordura cristalina e líquida (LUCAS et al., 2005; GOH; YE; DALE, 2006), e ocorre devido às forças de tensão e cristalização do gelo durante o congelamento, que danificam mecanicamente os glóbulos de gordura (Figura 1.7). A gordura líquida age como “cimento” para unir a gordura cristalina uma na outra (KOXHOLT; EISENMANN; HINRICHS, 2001; MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003). A gordura do leite, composta principalmente de triglicerídeos, possui uma ampla faixa de fusão, 40 a - 40 °C (GOFF, 1997b; HERRERA; GATTI; HARTEL, 1999), conseqüentemente há sempre uma combinação de gordura líquida e cristalina no interior do glóbulo, sendo que a alteração na proporção sólido:líquido pode afetar a quantidade de gordura desestabilizada formada. Portanto, fontes de gordura não lácteas devem ser cuidadosamente escolhidas para fornecer um conteúdo adequado de gordura sólida (GOFF, 1997b).

A gordura na forma parcialmente coalescida influencia na cremosidade (KOXHOLT; EISENMANN; HINRICHS, 2001); no aumento da qualidade do *flavor*, servindo como carreador e sinergista para componentes flavorizantes; produz textura suave por lubrificar o

paladar; proporciona corpo (ADAPA et al., 2000; MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003; GOFF, 2006); cor e sabor aos sorvetes (LI et al., 1997; GONZÁLEZ-TOMÁS et al., 2008).

Além disso, contribui na estabilização da estrutura do sorvete, bem como na estrutura das bolhas de ar e da espuma (KOXHOLT; EISENMANN; HINRICHS, 2001; GRANGER et al., 2005; ZHANG; GOFF, 2005; METWALLY, 2007). Parte dos glóbulos de gordura que envolve as bolhas de ar estabiliza a fase gasosa, sendo que o aumento dos níveis da agregação da gordura melhora a resistência do sorvete ao derretimento (GRANGER et al., 2005). Entretanto, se um excesso de gordura desestabilizar muito cedo no processo de congelamento, antes de certa viscosidade ser atingida, as células de ar poderão ser rompidas, ocasionando maior dificuldade de alcançar uma incorporação de ar desejada (GOFF; JORDAN, 1989). Além disso, a presença de grandes cristais de gelo é crítica para o desenvolvimento da estrutura da gordura (TONG; JORDAN; HOUGHTON, 1984; SEGALL; GOFF, 2002).

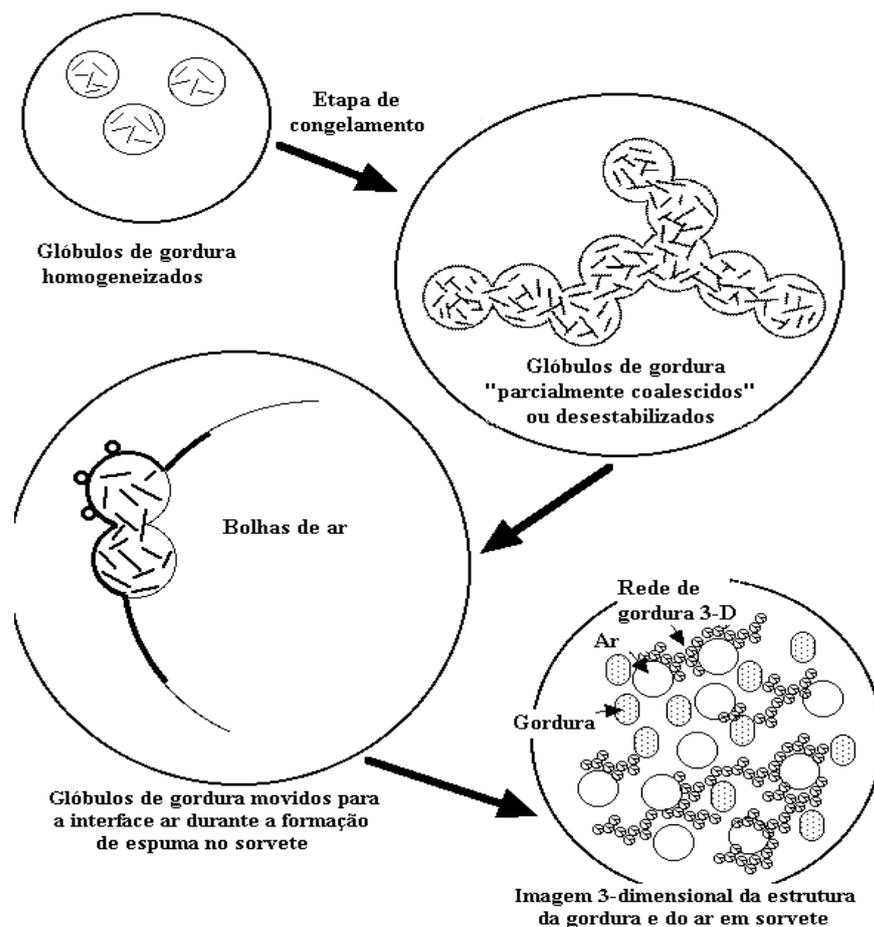


Figura 1.7. Estrutura da gordura em sorvetes.

Fonte: Eisner, Wildmoser e Windhab, 2005.

Portanto, o conteúdo da gordura é um indicador da qualidade e do valor do sorvete (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003). A determinação da gordura parcialmente coalescida pode ser realizada através de ensaios turbidimétricos da concentração de uma emulsão diluída antes e após centrifugação, onde ocorre a separação dos glóbulos de gordura coalescidos (PALANUECH et al., 2003), que poderão ser avaliados em espectrofotômetro a 540 nm (GOFF; VERESPEJ; SMITH, 1999).

Bolhas de ar

Bolhas de ar são componentes estruturais dos sorvetes sendo normalmente recobertas por gorduras, que por sua vez são recobertas por uma camada de proteínas e emulsificantes (Figura 1.8) (AKHTAR et al., 2009). Esse ar é distribuído na forma de pequenas bolhas com tamanho médio de 20 - 50 μm (GOFF, 2002) e contribuem com a textura e aparência adequada dos sorvetes (MURRAY; DICKINSON; WANG, 2009).

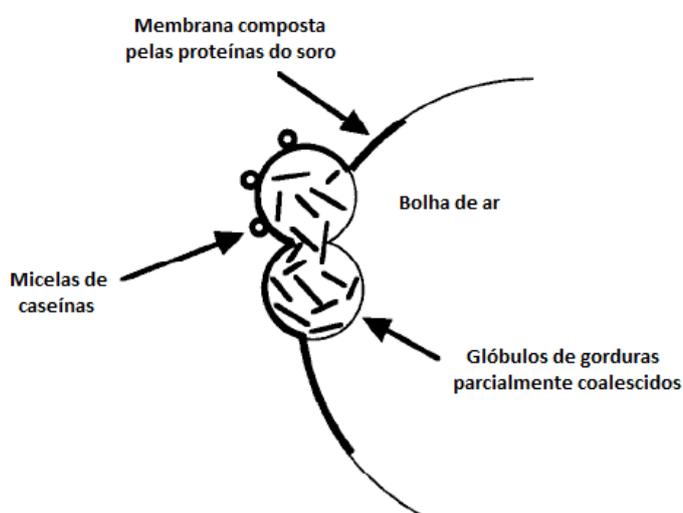


Figura 1.8. Ilustração da adsorção dos glóbulos de gordura parcialmente coalescidos e suas membranas proteicas associadas à superfície das bolhas de ar.

Fonte: Goff, 1997b.

A incorporação de ar nos sorvetes ocorre durante o processo de batimento, o que resulta em um aumento do volume da calda inicial. O volume da fase gasosa varia bastante entre os fabricantes, contudo, a incorporação de 50 % de ar é considerada a melhor proporção

(GOFF, 2002). Segunda a legislação em vigor no Brasil, os sorvetes podem conter no máximo 110 % de ar incorporado, ou seja, para a fabricação de gelados comestíveis a densidade aparente mínima é de 475 g L^{-1} (BRASIL, 2005b).

Variações de ingredientes, como emulsificantes, e de variáveis, como temperatura, podem afetar o desenvolvimento da incorporação de ar nos sorvetes. Os mesmos fatores que afetam o desenvolvimento da incorporação de ar também afetam a desestabilização dos glóbulos de gordura durante o congelamento (TONG; JORDAN; HOUGHTON, 1984). Conseqüentemente, a desestabilização da gordura pode representar uma parte crítica no desenvolvimento da estrutura das bolhas de ar em sorvetes (SEGALL; GOFF, 2002).

Cristais de gelo

O tamanho do cristal de gelo é um parâmetro muito importante na determinação da qualidade do sorvete, onde os menores cristais proporcionam melhor aceitação do produto pelos consumidores (DREWETT; HARTEL, 2007; FERNÁNDEZ et al., 2008).

A formação do gelo ocorre em duas etapas no processo de fabricação dos sorvetes: no congelamento e no endurecimento. O congelamento é realizado em um freezer e a superfície das pás da haste rotacional remove constantemente o material congelado da parede do freezer e mantém grandes taxas de transferência de calor. Sob estas condições, uma diminuição da temperatura se desenvolve dentro do produto, causando nucleação e a formação de muitos núcleos de cristais de gelo (RUSSEL; CHENEY; WANTLIND, 1999). O número de núcleos formados é diretamente proporcional à diminuição da temperatura abaixo do ponto de equilíbrio de congelamento antes da nucleação (FERNÁNDEZ et al., 2008). Já a etapa de endurecimento, por outro lado, ocorre dentro de um freezer com corrente de ar onde este atua como agente refrigerante. Este é um processo quiescente e a transferência de calor é limitada pela condução no produto. A média da transferência de calor é menor que no freezer e não são formados novos cristais durante o endurecimento, sendo que o aumento no volume da fase de gelo se realiza através do crescimento do núcleo pré-existente (RUSSEL; CHENEY; WANTLIND, 1999).

Durante o processo, a formação do núcleo deve ser promovida e o crescimento do cristal de gelo minimizado para criar vários pequenos cristais (DREWETT; HARTEL, 2007). Um tamanho médio de cristais, entre 20 a 50 μm , é o desejado para proporcionar a sensação de cremosidade (GOFF, 1997b). Quando os cristais de gelo são maiores que 50 μm , estes

podem ser detectados na boca pelos consumidores e o excesso destes grandes cristais pode resultar em um produto arenoso (DREWETT; HARTEL, 2007).

Durante a armazenagem, pequenos cristais de gelo podem sofrer rapidamente o fenômeno de recristalização na presença de flutuações de temperatura (STANLEY; GOFF; SMITH, 1996; GOFF, 2002), ocasionando um aumento do tamanho médio dos cristais (FERNÁNDEZ et al., 2008; SOUKOULIS; LEBESI; TZIA, 2009). As elevações de temperatura fundem os pequenos cristais e posterior diminuição da temperatura acarreta no crescimento de grandes cristais (FERNÁNDEZ et al., 2008). Este fenômeno proporciona a perda da qualidade do produto final, mas pode ser controlado mantendo a temperatura baixa e constante e com a presença de agentes estabilizantes. Além disso, a coalescência parcial da gordura e a diminuição do tamanho das bolhas de ar fornece um aumento da proteção contra a recristalização do gelo (GOFF, 2002).

Estabilizantes e emulsificantes

Os estabilizantes geralmente empregados nas formulações de sorvetes são, na maioria, misturas de carboidratos complexos denominados de hidrocolóides ou gomas (STANLEY; GOFF; SMITH, 1996). Como exemplos podem ser citados: goma locusta (HOMAYOUNI et al., 2008), goma guar (INNOCENTE; COMPARIN; CORRADINE, 2002), carboximetilcelulose (HWANG; SHYU; HSU, 2009), goma xantana (SOUKOULIS; CHANDRINOS; TZIA, 2008) e carragena (GONZÁLES-TOMÁS et al., 2008).

Os estabilizantes são substâncias hidrofílicas que se dispersam em solução como colóides. Em solução, aumentam a viscosidade e formam géis devido a sua capacidade de retenção de grande quantidade de água, resultante da atividade mútua destes compostos de formarem pontes de hidrogênio entre si. Além disso, diminuem a mobilidade da água na fase líquida envolvendo os cristais de gelo, prevenindo sua migração e recristalização com os cristais pré-existentes (STANLEY; GOFF; SMITH, 1996; KUŞ; ALTAN; KAYA, 2005; LAL; O'CONNOR; EYRES, 2006) e previnem ainda o crescimento de cristais de lactose (GOFF, 1997b). O aumento da viscosidade da calda e da fase líquida do sorvete resulta em muitos benefícios funcionais, como no aumento da vida de prateleira, por limitar a recristalização do gelo durante a armazenagem. Sem estabilizantes, o sorvete se tornaria arenoso e congelaria muito rápido devido à migração da água livre e o crescimento dos cristais de gelo pré-existentes (GOFF, 2009).

Os emulsificantes auxiliam ainda no desenvolvimento da estrutura da gordura e da distribuição de ar. Controlam a desestabilização da gordura (STANLEY; GOFF; SMITH, 1996; LAL; O'CONNOR; EYRES, 2006; AKHTAR et al., 2009) aumentam a resistência ao derretimento e a textura, reduzem o tempo de batimento (GOFF, 1997b; SEGALL; GOFF, 2002; KUŞ; ALTAN; KAYA, 2005; ZHANG; GOFF, 2005; LAL; O'CONNOR; EYRES, 2006; METWALLY, 2007) e promovem corpo desejável aos sorvetes. O uso de emulsificantes resulta em bolhas de ar menores e mais uniformemente distribuídas por toda estrutura interna do sorvete (INNOCENTE; COMPARIN; CORRADINI, 2002), promovendo uma espuma mais estável (STANLEY; GOFF; SMITH, 1996).

A estrutura do sorvete é estabilizada por duas interfaces: gordura/água e ar/água (Figura 1.9). Mono e diglicerídeos, emulsificantes geralmente utilizados no sorvete, competem com as proteínas lácteas tanto pela interface gordura/água quanto pela interface água/ar durante a homogeneização da gordura, por possuírem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Como resultado, eles agem reduzindo a tensão interfacial ou a força que existe entre as duas fases da emulsão. Durante o processo de maturação, os emulsificantes deslocam as proteínas para fora da interface gordura/água, o que enfraquece a membrana e promove a desestabilização parcial da gordura. Os glóbulos aglomerados de gordura, formados devido à desestabilização, auxiliam na estabilização da interface ar/água, conduzindo a formação de um produto mais suave e com boas propriedades de derretimento (GOFF, 1997a; SEGALL; GOFF, 2002; LAL; O'CONNOR; EYRES, 2006; AKHTAR et al., 2009).

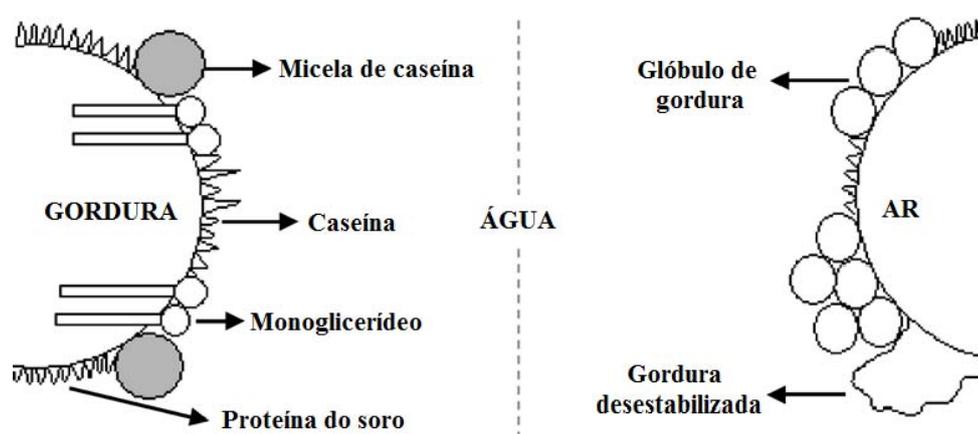


Figura 1.9. Interfaces gordura/água e água/ar presentes em sorvete.

Fonte: Lal, O'Connor e Eyres, 2006.

Proteínas do leite

As proteínas do leite estão presentes nas formulações de sorvetes como parte dos componentes sólidos não gordurosos (GOFF, 2008). Contribuem para as funções mais importantes no desenvolvimento do sorvete. Emulsionam a gordura durante a etapa de homogeneização e, através da interação com o emulsificante na interface oleosa, contribuem para a coalescência parcial e formação da estrutura da gordura.

Quando o leite é resfriado, a β -caseína se dissocia e o hidroxifosfato de cálcio se desprende da estrutura micelar, dissolvendo-se devido ao enfraquecimento das interações hidrofóbicas quando a temperatura diminui. Essa β -caseína dissociada da micela, e em menor grau, as proteínas do soro, são adsorvidas na interface ar da estrutura dos sorvetes, conduzindo ao aumento da aeração e da estabilidade da espuma. As proteínas que não estão presentes nessas interfaces contribuem para o aumento da viscosidade e resistência ao derretimento devido à capacidade de absorver água, contribuem para a inibição da cristalização do gelo, aumento da estrutura e textura dos sorvetes (STANLEY; GOFF; SMITH, 1996; GOFF, 1997b; VEGA; GOFF, 2005). Além disso, devido ao processo de batimento, as moléculas de proteínas se desdobram proporcionando um aumento das características espumantes (STANLEY; GOFF; SMITH, 1996).

3. Transglutaminase

A transglutaminase (TG) foi identificada por Heinrich Waelsch a mais de 40 anos como uma enzima com função de incorporar aminas em proteínas no fígado (ÖZRENK, 2006). Largamente distribuída em vários organismos vivos, possui muitas funções fisiológicas (GRIFFIN; CASADIO; BERGAMINI, 2002), incluindo reparação tecidual, coagulação sanguínea e transdução de sinal (HEMUNG; LI-CHAN; YONGSAWATDIGUL, 2009). Pode ser encontrada em tecidos animais e fluidos corporais (FOLK, 1980), peixe (YASUEDA et al., 1995), plantas (FALCONE et al., 1993; SIEPAIO; MEUNIER, 1995; LILLEY et al., 1998) e microorganismos (ANDO et al., 1989).

Desde a década de 80, estudos com a TG são realizados com o intuito de modificar as propriedades funcionais das proteínas. Nos primeiros estudos, a enzima era extraída de fígado

de porco-da-índia ou do plasma de bovinos, contudo, o suprimento limitado, a não aceitabilidade pelos consumidores do uso de fígado de porco-da-índia em alimentos, bem como as regulamentações alimentícias, limitaram a sua comercialização (MOTOKI; SEGURO, 1998). Além disso, a TG de origem animal requer Ca^{2+} para a sua ativação, o que leva à precipitação de proteínas em alguns sistemas alimentares contendo caseína, globulina de soja ou miosina (TRESPALACIOS; PLA, 2007). O Fator XIII, uma TG isolada do sangue, também é raramente utilizado na indústria de alimentos devido à sua pigmentação vermelha e da exigência de trombina, uma protease específica, para sua ativação (MOTOKI; KUMAZAWA, 2000; YOKOYAMA; NIU; KIKUCHI, 2004).

Em 1989, após a triagem de aproximadamente 5.000 cepas do solo, o isolamento de TG de *Streptovercillium* S-8112 foi relatado por Ando et al. (1989). A TG microbiana mostrou ser Ca^{2+} independente (ANDO et al., 1989) e apresentou uma especificidade menor com o substrato em comparação com a TG de fígado de porco-da-índia, do Fator XIII e de hemácias (JONG; KOPPELMAN, 2002; SHIMBA et al., 2002). Devido a estas vantagens e a possibilidade da produção em massa com baixo custo pela fermentação tradicional, a TG microbiana está, atualmente, amplamente difundida como uma enzima funcional nos diversos ramos da indústria alimentar (MOTOKI; SEGURO, 1998; JONG; KOPPELMAN, 2002; FARNSWORTH et al., 2006). A TG é utilizada na preparação de produtos a base de peixe, carne, leite, soja, entre outros, para modificar certas propriedades funcionais desses alimentos, como solubilidade, emulsificação, formação de espumas e gelatinização (JONG; KOPPELMAN, 2002; KÜTEMEYER et al., 2005).

A legislação brasileira permite a utilização da TG de origem microbiana (EC 2.3.2.13) (*Streptovercillium mobaraense* ou *Streptomyces mobaraense*) para o uso em alimentos destinados ao consumo humano em concentração suficiente para o efeito desejado, sem especificação para o limite máximo permitido (BRASIL, 2003; BRASIL, 2005a). Além disso, é afirmada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo órgão governamental dos Estados Unidos *Food and Drug Administration* (FDA, 2009).

A TG catalisa uma reação de transferência entre os grupos acil e γ -carboxiamida dos peptídeos ligados aos resíduos de glutamina (doador de acila) e os grupos aminos primários em uma variedade de componentes amino (receptor de acila), incluindo os peptídeos ligados aos grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina (MOTOKI; SEGURO, 1998; SHARMA; ZAKORA; QVIST, 2002; AKTAS; KILIÇ, 2005; TRESPALACIOS; PLA, 2007).

A TG microbiana é uma enzima monomérica com 331 aminoácidos em uma cadeia polipeptídica simples. A estrutura secundária desta enzima consiste de oito folhas- β envolvidas por 11 α -hélices, e se encontra na forma de “disco” com uma fenda profunda na lateral contendo um resíduo de cisteína (posição 64) (Figura 1.10). Este resíduo de cisteína com um grupo tiol livre é essencial para a atividade catalítica (KANAJI et al., 1993; JAROS et al., 2006). A especificidade da TG perante várias proteínas é determinada principalmente pela acessibilidade de resíduos de glutaminas e lisinas (LORENZEN, 2007).

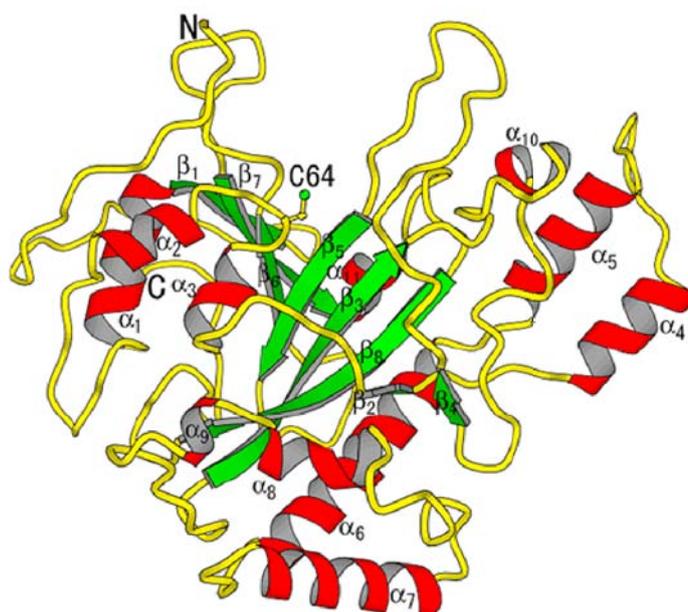


Figura 1.10. Estrutura tri-dimensional da transglutaminase microbiana.

Fonte: Yokoyama, Nio e Kikuchi, 2004.

A TG apresenta massa molar de aproximadamente 40 KDa (ANDO et al., 1989; MOTOKI; SEGURO, 1998; HEMUNG; LI-CHAN; YONGSAWATDIGUK, 2009) e ponto isoelétrico em torno de 8,9. O pH ótimo de atividade encontra-se na faixa de 6 a 7, entretanto, a um pH de 5 ou 8 a TG ainda expressa alguma atividade enzimática. A temperatura ótima de atividade enzimática é de 50 °C, e em temperaturas acima de 70 °C sua atividade é diminuída em poucos minutos. Contudo, a TG ainda expressa atividade a 10 °C e retém alguma atividade a temperaturas logo acima do ponto de congelamento (MOTOKI; SEGURO, 1998; JAROS et al., 2006). Pode modificar as proteínas através da incorporação de aminas, ligações cruzadas e desaminação (Figura 1.11) (LORENZEN, 2007).

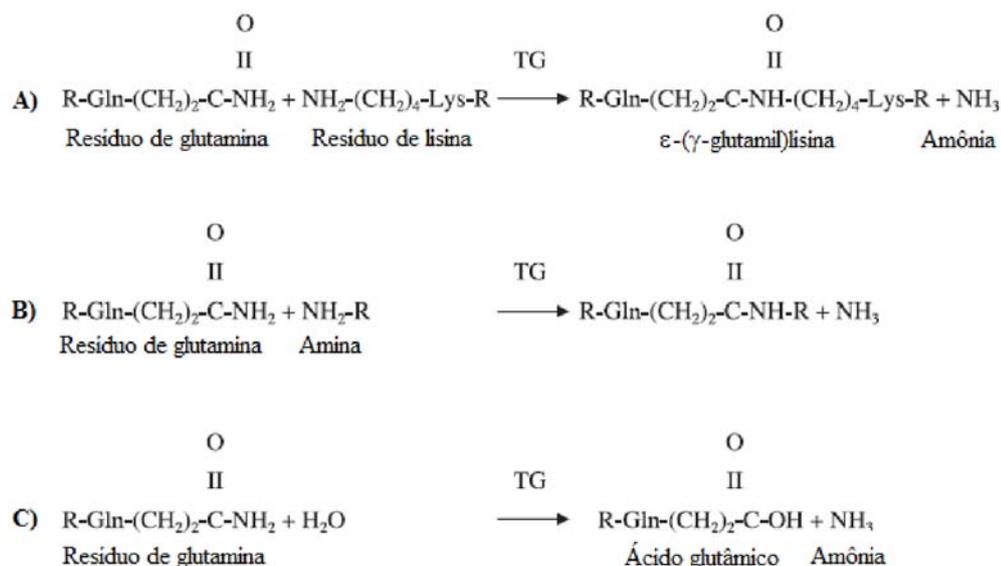


Figura 1.11. Reações catalisadas pela transglutaminase. A) reação de ligação cruzada; B) reação de incorporação de amina; C) desaminação.

Fonte: Özrenk, 2006.

A reação de ligação cruzada das proteínas resultante da ação da TG mostra ser a reação dominante e ocorre entre resíduos de glutamina e lisina, resultando na formação de ligações isopeptídicas ε -(γ -glutamil)lisina tanto intra como intermolecular e na formação de polímeros de alto massa molar (10^6 a 10^7 g mol⁻¹) (ÖZRENK, 2006; MARCOA; ROSELL, 2008; HILLER; LORENZEN, 2009). Estas ligações resultam na formação de dímeros, trímeros e grandes polímeros. Sem qualquer interferência, estas ligações irão ocorrer até o momento onde não houver mais glutaminas ou lisinas disponíveis para a enzima (JONG; KOPPELMAN, 2002).

Na presença de aminas primárias, a TG pode incorporá-las nos resíduos de glutaminas de uma proteína. A reação de incorporação de aminas pode ser utilizada para introduzir aminoácidos ou peptídeos nas proteínas com a finalidade de aumentar o conteúdo de metionina e lisina de caseínas ou proteínas de soja através da ligação enzimática de lisilpeptídeos e lisilmetioninas (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004; JAROS et al., 2006). Devido aos aminoácidos incorporados procederem como aminoácidos na proteína nativa, a TG representa uma poderosa ferramenta para aumentar o valor nutricional dos alimentos (MOTOKI; KUMAZAWA, 2000).

Na ausência de resíduos de lisina ou de outras aminas primárias, a água irá reagir como nucleofílica e a TG irá hidrolisar o grupo γ -carboxiamida da glutamina, resultando na

desaminação de glutaminas com formação de ácido glutâmico e amônia (JAROS et al., 2006; ÖZRENK, 2006; MARCOA; ROSELL, 2008). A desaminação pode ser induzida por processos enzimáticos, físicos ou químicos. A desaminação química freqüentemente causa a decomposição das ligações peptídicas, enquanto que a enzimática demonstra ter mínimos efeitos neste aspecto. Quando a TG é utilizada para catalisar a desaminação de resíduos de glutaminas das proteínas, geralmente as ligações cruzadas irão ocorrer em menor intensidade neste processo (JONG; KOPPELMAN, 2002).

A regulação do grau de ligações cruzadas formadas é crucial quando se pesquisa a funcionalidade ótima proteica, pois freqüentemente somente poucas ligações são necessárias para alcançar ótimos resultados. Além disso, a formação de polímeros de alto peso molecular pode causar problemas no processamento do produto (JONG; KOPPELMAN, 2002).

A inativação é uma das formas de controlar o grau de ligações formadas. A inativação térmica é a forma mais simples de inativação, porém, não pode ser aplicada nos casos em que altas temperaturas podem afetar a estrutura e a funcionalidade das proteínas. A mudança do pH também é uma alternativa para parar a reação enzimática, entretanto, pode ter grandes efeitos nas proteínas modificadas e pode acarretar na precipitação das mesmas. O uso de inibidores, como N-etilmaleimida, iodoacetamida e ácido para-mercúrio benzóico, é utilizado para bloquear a atividade da TG sem induzir qualquer alteração física ou química nas proteínas inter-cruzadas (JONG; KOPPELMAN, 2002). Outra alternativa para interromper a reação é utilizar a reação de incorporação de aminas para competir com as reações de ligações cruzadas (HA; IUCHI, 2002); ou imobilizar a TG para regular sua atividade. Contudo, este último método pode ser somente utilizado para modificar proteínas em solução. No geral, a imobilização da TG pode induzir a mudanças de suas propriedades cinéticas e interação com seus vários substratos (JONG; KOPPELMAN, 2002).

3.1. Aplicação da transglutaminase em produtos lácteos

A polimerização de proteínas pela ação da TG pode servir como ferramenta para modificar as propriedades funcionais de produtos alimentícios, como geleificação, viscosidade, capacidade emulsificante e espumante, sendo que a susceptibilidade de uma proteína à TG dependerá da sua estrutura macromolecular (BABIKER, 2000; BÖNISCH et al., 2007; HINZ et al., 2007). Muitos alimentos protéicos são bons substratos para a TG

microbiana (MOTOKI e SEGURO, 1998). Dentre os produtos lácteos, as caseínas, são particularmente bons substratos para a TG devido ao baixo grau de sua estrutura terciária, bem como a flexibilidade, arranjo espiral e ausência de ligação dissulfeto na α_{s1} -caseína e na β -caseína, deixando os grupos reativos expostos para a enzima (ÖZRENK, 2006). A κ -caseína é a mais reativa por se localizar na região mais externa da micela de caseína, seguida pela β - e α_{s1} -caseína (SMIDDY et al., 2006). As proteínas do soro formam ligações cruzadas menos eficientemente que as caseínas, devido a sua estrutura globular compacta que dificulta a ação da enzima (ÖZRENK, 2006), por isso, necessitam, geralmente, de modificações estruturais para facilitar o ataque da TG (HINZ et al., 2007).

Faergemand e Qvist (1997) investigaram o efeito da ligação cruzada mediante a utilização da TG nas propriedades reológicas e estruturais de géis lácteos acidificados quimicamente com glucona-delta-lactona. Os pesquisadores observaram que o tratamento enzimático proporcionou a formação de géis mais fortes e diminuiu a permeabilidade desses géis quando comparados com a amostra controle (sem TG).

O tratamento enzimático com TG proporcionou um aumento da capacidade de retenção de água e da capacidade de gelatinização de amostras de caseinato de sódio em relação à amostra sem ser submetida ao tratamento enzimático, especialmente quando a incubação foi realizada por 4 horas a 40 °C. Quando a incubação foi realizada por 18 - 20 horas a 4 - 6 °C observou-se um aumento da viscosidade aparente (LORENZEN, 2007). Mounsey, O’Kennedy e Kelly (2005) também verificaram o aumento da viscosidade aparente em soluções de caseinato de sódio submetidas ao tratamento enzimático com TG.

A influência da TG microbiana nas propriedades físicas de iogurtes elaborados com leite e com substituição parcial do leite por soro de leite foi avaliada por Gauche et al. (2009). As ligações cruzadas das proteínas lácteas pela ação da TG mostraram ser efetivas nas propriedades físicas dos iogurtes com adição de soro, diminuindo a sinerese, aumentando a consistência e proporcionando boas propriedades reológicas e de textura, compensando as possíveis alterações causados pela adição do soro no iogurte.

Farnsworth, Hendricks e Guo (2006) relataram que o pré tratamento térmico do leite antes da incubação com TG microbiana (2 e 4 U g⁻¹) aumentou significativamente ($p < 0,05$) a viscosidade e diminuiu a sinerese de amostras de iogurtes produzidos com leite de cabra por aumentar a força do gel do iogurte. O efeito do tratamento com TG no aumento da viscosidade foi mais significante comparado ao método do aumento de conteúdo de sólidos

totais do leite. Quando foi utilizado TG na concentração de 2,5 U g⁻¹, a viscosidade aumentou 3,5 vezes quando comparadas ao iogurte controle (sem adição da enzima).

Estudos envolvendo sorvetes e TG são escassos. Metwally (2007) produziu sorvetes com baixo teor de gordura e com diferentes concentrações de estabilizantes, usando a TG como seus substitutos. Foi observado que as amostras de sorvetes com TG melhorou as propriedades funcionais, aumentando a viscosidade aparente, a desestabilização da gordura e a resistência ao derretimento.

4. Reologia

Reologia é a ciência que estuda o escoamento e a deformação da matéria quando submetida a uma determinada força ou pressão (MULLER, 1977; RAO, 1999; ALVES, 2003). Com a resposta de um produto submetido a essa força obtêm-se informações a respeito da viscosidade e elasticidade de um produto (MEZA; VERDINI; RUBIOLO, 2009).

A quantidade da força aplicada sobre uma determinada área do fluido é denominada de tensão de cisalhamento e origina uma deformação no mesmo, denominada de fluxo. A tensão de cisalhamento é expressa em unidades de força por unidade de área, sendo definida matematicamente através da Equação 1 (BRAUN; ROSEN, 2000; BOURNE, 2002).

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad (1)$$

Sendo σ : tensão de cisalhamento (Pa); F: força aplicada na direção do escoamento (N, dina); e S: área da superfície exposta ao cisalhamento (m², cm²).

Esta força quando aplicada sobre uma determinada área da superfície de um fluido em contato com um plano estacionário, formará um gradiente de velocidade dentro deste fluido, que variará conforme a viscosidade do mesmo (LEWIS, 1993). Este gradiente de velocidade de cisalhamento a uma determinada distância é denominado taxa de deformação ou taxa de cisalhamento, e pode ser definida matematicamente através da Equação 2 (RAO, 1999).

$$\gamma = \frac{\Delta V}{\Delta y} \quad (2)$$

Sendo Δv é a diferença de velocidade entre duas camadas de fluido adjacentes; e Δy a distância entre elas.

Uma propriedade dos fluidos é a viscosidade, que corresponde ao atrito interno de um fluido ou a tendência do mesmo em resistir ao escoamento (MULLER, 1977; RAO, 1999). Para aumentarmos o grau de deformação de certo fluido é necessário aumentarmos a força aplicada, que pode ser calculado conforme a Equação 3.

$$\sigma = \eta \times \gamma \quad (3)$$

Sendo σ corresponde a tensão de cisalhamento (Pa); η a viscosidade (Pa s); e γ a taxa de cisalhamento (s^{-1}).

Os fluidos viscosos podem ser classificados em função do seu comportamento de fluxo ou reológico, sendo denominados fluidos Newtonianos e não Newtonianos (RAO, 1999). O comportamento de fluxo pode ser representado graficamente e/ou numericamente. A representação gráfica, denominada de reogramas, são geralmente representados pela viscosidade aparente, tensão de cisalhamento e taxa de deformação. Os gráficos mais utilizados são: tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação e viscosidade aparente *versus* taxa de deformação (BRAUN; ROSEN, 2000). A representação numérica é avaliada através de modelos reológicos, descritos na seção 4.1.

Os fluidos Newtonianos são aqueles cuja viscosidade é igual, independente do tempo e da taxa de cisalhamento na qual é medida, numa dada temperatura (MULLER, 1977; LEWIS, 1993; RAO, 1999). O gráfico de tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação resulta em uma reta que passa pela origem (BRAUN; ROSEN, 2000). Geralmente os alimentos Newtonianos contêm componentes de baixo peso molecular (ex: açúcares) e não possuem grandes concentrações de polímeros dissolvidos (ex: pectinas, proteínas e amidos) (RAO, 1999). Em alguns sistemas, um material pode exibir comportamento Newtoniano até uma determinada taxa de deformação, onde começa a exibir comportamento não Newtoniano

após atingir a taxa de deformação limite. Um exemplo deste comportamento é o óleo de silicone, que a partir de uma determinada taxa deixa de ser Newtoniano e a viscosidade começa a diminuir com o aumento da taxa de deformação (BRAUN; ROSEN, 2000).

No entanto, a viscosidade, na maioria dos alimentos, não é constante a uma dada temperatura e pressão, e depende do tempo ou da taxa de deformação e das características inerentes aos sólidos (elásticas ou plásticas) quando presentes em fluidos viscosos. Este tipo de fluido é denominado de não Newtoniano ou material viscoelástico, e seu comportamento pode depender somente da taxa de deformação (tempo independentes) ou pode depender também da duração de cisalhamento (tempo dependentes) (MULLER, 1977; LEWIS, 1993; RAO, 1999). Nestes casos, a viscosidade deverá ser designada, para cada velocidade de deformação ou para cada tempo, por viscosidade aparente (η_{ap}) (ALVES, 2003).

Os fluidos independentes do tempo são denominados de pseudoplásticos, dilatantes ou plásticos (Figura 1.12A). Nos fluidos pseudoplásticos, também denominados de reofluidificante, há diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Tal comportamento ocorre quando um sistema possui “estrutura” que pode ser reversivelmente quebrada sob tensão (BRAUN; ROSEN, 2000). Já nos fluidos dilatantes (reoespesantes), há um aumento reversível da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo este comportamento mais raro que a pseudoplasticidade. O aumento da viscosidade pode ocorrer devido a concentração, forma, tamanho e densidade das partículas que ocasionam o aumento da interação entre elas. Em sistemas com altas concentrações de partículas, a aplicação da tensão produz um rearranjo dos sólidos causando a aglomeração dos mesmos. Partículas grandes ou densas possuem maior inércia, assim, quando uma tensão é aplicada elas momentaneamente desaceleram e em seguida voltam a acelerar. A energia necessária para isto resulta em uma resistência adicional ao fluxo e uma maior viscosidade aparente (BRAUN; ROSEN, 2000). Por fim, os fluidos plásticos ou de Bingham comportam-se, teoricamente, como sólidos em condições elásticas de repouso e após a aplicação de uma força, chamada de limite de escoamento ou tensão residual, começa a fluir (MULLER, 1977; LEWIS, 1993; RAO, 1999). Estes fluidos são frequentemente encontrados em alimentos, como catchup, chantilly, clara em neve e margarina (BOURNE, 2002).

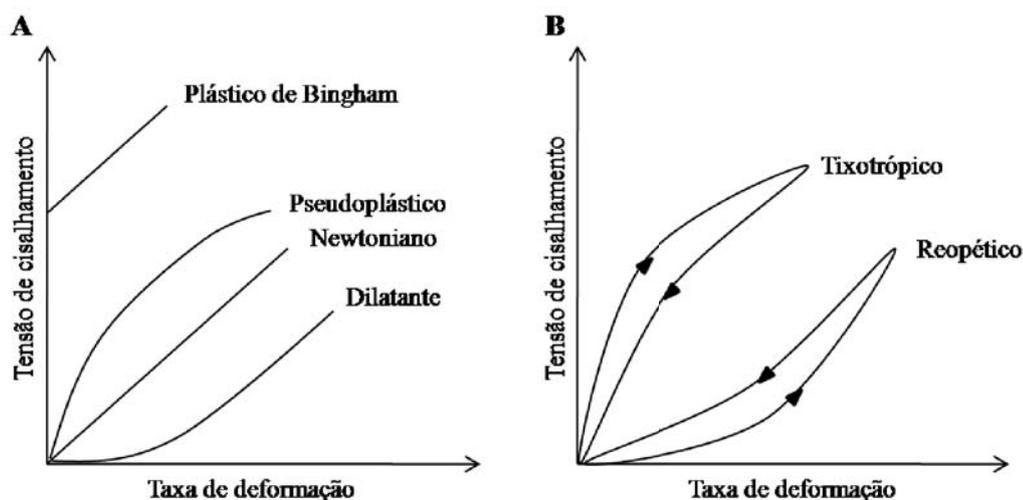


Figura 1.12. Reograma dos fluidos independentes do tempo (A) e dos fluidos dependentes do tempo (B).

Fonte: Lewis, 1993.

Os fluidos dependentes do tempo são divididos em tixotrópicos e reopéticos (Figura 1.12B). Os fluidos tixotrópicos, a uma taxa de cisalhamento constante, apresentam diminuição da viscosidade com o tempo (MULLER, 1977; LEWIS, 1993; RAO, 1999; ABU-JADAYIL, 2003). Este fenômeno é isotérmico e reversível, e ocorre devido a destruição gradual da estrutura construída pelas partículas na fase dispersa, devido as ligações intermoleculares não resistirem à ação do cisalhamento imposto. Se deixarmos em repouso durante algum tempo um sistema tixotrópico, a viscosidade aparente aumentará devido à formação de uma estrutura mais organizada das partículas em suspensão que “imobiliza” o líquido entre as partículas. Se, a seguir, submetermos o sistema a cisalhamento, a uma velocidade de agitação constante, a viscosidade aparente decrescerá com o tempo até atingirmos o equilíbrio entre quebra e reconstrução da estrutura (BRAUN; ROSEN, 2000). Exemplos de alimentos que manifestam este comportamento são produtos que contém polímeros, como iogurte concentrado e maionese (ABU-JADAYIL, 2003). Já os fluidos reopéticos manifestam comportamento oposto, ou seja, a viscosidade aumenta com o tempo, a uma taxa de deformação constante (MULLER, 1977; LEWIS, 1993; RAO, 1999; ABU-JADAYIL, 2003). Os fluidos reopéticos, ou anti-tixotrópicos, apresentam maior resistência ao fluxo com o passar do tempo devido a agregação ou associação das partículas quando uma tensão aplicada (BRAUN; ROSEN, 2000). Este comportamento é raro de ser encontrado em sistemas alimentícios (BOURNE, 2002).

4.1. Modelos reológicos

Modelos reológicos são utilizados para descrever o comportamento mecânico de vários materiais e geralmente são obtidos no diagrama tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação (RAO, 1999; ALVES, 2003). No entanto, apesar de apresentarem um domínio de validade limitado, os parâmetros neles envolvidos permitem comparar diferentes materiais, podendo tornarem-se muito úteis no controle de qualidade e otimização de processos (ALVES, 2003). Por conveniência, os modelos matemáticos podem ser divididos em tempo-independentes, que incluem o modelo de Bingham, Lei de Potência, Herschel-Bulkley e Casson; e tempo-dependentes do comportamento de fluxo, sendo o modelo de Weltman o mais utilizado (RAO, 1999).

Modelo de Bingham

O modelo de Bingham é utilizado para descrever os fluidos que requerem a aplicação de uma tensão mínima, denominada de limite de escoamento (σ_0), para que haja alguma deformação cisalhante. Quando submetidos a uma tensão menor do que σ_0 , estes fluidos, teoricamente, comportam-se como sólido. Estes fluidos apresentam uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, e os parâmetros reológicos obtidos são o limite de escoamento e a viscosidade plástica, calculados de acordo com a Equação 4 (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1993; BOURNE, 2002).

$$\sigma = \sigma_0 + \eta_{pl}\dot{\gamma} \quad (4)$$

Sendo σ_0 : limite de escoamento (Pa); η_{pl} : viscosidade plástica (Pa s); σ : tensão de cisalhamento (Pa); e $\dot{\gamma}$: taxa de deformação (s^{-1}).

Modelo Lei de Potência (Ostwald-de-Wael)

O comportamento Lei de Potência descreve um fluido não Newtoniano (pseudoplástico ou dilatante) e é caracterizado através do gráfico de tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação quando plotados em coordenadas logarítmicas (BARNES;

HUTTON; WALTERS, 1993; BOURNE, 2002). Os parâmetros reológicos obtidos pelo modelo lei de potência são o índice de consistência e o índice de comportamento ou de fluxo. O modelo de potência é definido pela Equação 5.

$$\sigma = k(\dot{\gamma})^n \quad (5)$$

Sendo σ : tensão de cisalhamento (Pa); $\dot{\gamma}$: taxa de deformação (s^{-1}); k: índice de consistência ($Pa s^n$); e n: índice de comportamento ou de fluxo (adimensional).

O índice de comportamento de fluxo está relacionado ao afastamento do fluido do modelo newtoniano. Se o seu valor for igual a 1, então o fluido é caracterizado como newtoniano; menor que 1 é pseudoplástico; e maior que 1 é denominado dilatante. O valor do índice de consistência indica o grau de resistência do fluido diante o escoamento. Quanto maior o valor de k, mais consistente será o fluido (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1993).

Modelo Herschel-Bulkley

O modelo Herschel-Bulkley é uma extensão do modelo Lei de Potência onde um novo parâmetro é adicionado, o limite de escoamento (BOURNE, 2002). O limite de escoamento geralmente é determinado através do ajuste dos dados experimentos utilizando o modelo de Casson (TÁRREGA; COSTELL, 2007). Fluidos que obedecem este modelo são caracterizados pelo gráfico linear em escalas logarítmicas da tensão de cisalhamento *versus* a taxa de deformação. Os parâmetros obtidos por este modelo, índice de consistência e índice de comportamento de fluxo, são obtidos através da Equação 6 (BOURNE, 2002).

$$\sigma = \sigma_0 + k(\dot{\gamma})^n \quad (6)$$

Sendo σ : tensão de cisalhamento (Pa); σ_0 : limite de escoamento (Pa); k: índice de consistência ($Pa s^n$); $\dot{\gamma}$: taxa de deformação (s^{-1}); n: índice de comportamento de fluxo (adimensional).

Modelo de Casson

O modelo de Casson foi desenvolvido inicialmente para análise de tintas de impressão por Casson em 1959, mas mostrou-se efetivo para análise de alimentos, particularmente chocolate (BOURNE, 2002). Para alimentos que seguem o modelo de Casson, uma linha reta resulta quando a raiz quadrada da taxa de deformação é plotada contra a raiz quadrada da tensão de cisalhamento (Equação 7) (RAO, 1999). O limite de escoamento de Casson corresponde ao quadrado do intercepto, $\sigma_{oc} = (K_{oc})^2$, e a viscosidade plástica de Casson ao quadrado da inclinação da reta, $\eta_c = (K_c)^2$.

$$\sigma^{0,5} = K_{0c} + K_c (\gamma)^{0,5} \quad (7)$$

Sendo σ : tensão de cisalhamento (Pa); K_0 : limite de escoamento de Casson (Pa); K_c : viscosidade plástica de Casson (Pa s); e γ : taxa de deformação (s^{-1}).

Modelo de Weltmann

O modelo de Weltmann é geralmente utilizado para caracterizar o comportamento tixotrópico dos alimentos (ABU-JDAYIL, 2003) e define os parâmetros a uma taxa de deformação constante, por um período de tempo, até atingir o equilíbrio (WELTMANN, 1943). Estes parâmetros são obtidos através da Equação 8.

$$\sigma = A - B \log t \quad (8)$$

Sendo σ : tensão de cisalhamento (Pa); t : tempo (s); A: tensão inicial requerida (Pa); e B: coeficiente de ruptura tixotrópica (Pa).

O gráfico da tensão de cisalhamento *versus* o tempo em escala logarítmica deve resultar em uma reta, onde a inclinação da reta representa a viscosidade plástica (BRAUN; ROSEN, 2000). O coeficiente de ruptura tixotrópica (B) é indicativo da quantidade de estrutura degradada durante o cisalhamento. O valor de B negativo demonstra que houve a diminuição da viscosidade plástica, ou seja, o fluido apresenta comportamento tixotrópico. Ao

contrário, quando seu valor for positivo, o fluido comporta-se como reopético (WELTMANN, 1943). O parâmetro A representa a tensão de cisalhamento necessária para que a estrutura comece a degradar.

4.2. Reologia aplicada em sorvetes

Os alimentos são geralmente submetidos a testes reológicos para entender a relação entre a estrutura e as propriedades reológicas (MEZA; VERDINI; RUBIOLO, 2009). O conhecimento das propriedades reológicas é importante no controle da qualidade, no processamento e seleção dos equipamentos apropriados (MULLER, 1977; KUŞ; ALTAN; KAYA, 2005; ELHWEG et al., 2009; GABRIELE et al., 2009; SOZER, 2009), na textura dos alimentos e na aceitabilidade do produto pelos consumidores (ABU-JADAYIL, 2003; AICHINGER et al., 2003; KUŞ; ALTAN; KAYA, 2005). A caracterização reológica tempo-dependente dos sistemas alimentícios é importante para estabelecer a relação entre a estrutura e o fluxo e para correlacionar os parâmetros físicos com a avaliação sensorial (ABU-JADAYIL, 2003; KUŞ; ALTAN; KAYA, 2005).

A maioria dos produtos alimentícios possui naturalmente propriedades reológicas complexas e suas viscosidades irão depender não somente da temperatura e da sua composição, mas também da taxa, tensão e tempo de cisalhamento. Esta dependência ocorre, pois muitos desses produtos estão dispersos de partículas coloidais, como sólidos e líquidos imiscíveis, e seus polímeros podem afetar a estabilidade e a reologia de uma suspensão como resultado de interações entre as partículas suspensas e os polímeros (ABU-JADAYIL, 2003). A reologia do sorvete é afetada principalmente pela presença de componentes e suas concentrações, como gordura e proteínas, fenômeno de hidratação, agregação proteica, cristalização do gelo e coalescência da gordura (SOUKOULIS; LEBESI; TZIA, 2009).

Muitos estudos utilizando a reologia são realizados em sorvetes com o intuito de avaliar o comportamento de deformação (viscosidade) e a qualidade desses produtos. Akalm, Karagözlü e Ünal (2008) observaram que a substituição da gordura de sorvetes por 4 % de proteína isolada do soro resultou em maior viscosidade aparente e maior índice de consistência em relação à amostra regular, contendo 10 % de gordura. Além disto, todas as amostras comportaram-se como fluidos pseudoplásticos.

Goh, Ye e Dale (2006) observaram que a incorporação do óleo de linhaça em sorvetes como substituto da gordura pode afetar as características funcionais desses produtos, dependendo da quantidade da gordura do leite a ser substituída. Os autores observaram que o comportamento de fluxo foi consistente com a extensão da floculação da gordura, sendo mais evidente nos sorvetes com maior teor de gordura láctea. Assim, os sorvetes contendo maiores concentrações de gordura do leite apresentaram maiores viscosidades e índice de pseudoplasticidade, sendo que a viscosidade mostrou estar correlacionada com as propriedades de derretimento dos sorvetes.

Sorvetes contendo salepo apresentaram fluxo tempo-dependente com comportamento tixotrópico, sendo que este efeito aumentou com o aumento do conteúdo de salepo devido às interações físicas entre seus constituintes com as proteínas do leite. O conteúdo de salepo também aumentou o índice de consistência das amostras e diminuiu o índice de comportamento de fluxo, ou seja, aumentou as características pseudoplásticas dos sorvetes (KUŞ; ALTAN; KAYA, 2005).

Soukoulis, Lebesi e Tzia (2009) estudaram os efeitos de quatro fibras alimentares (aveia, trigo, maçã e inulina) nas propriedades reológicas de sorvetes. Foi observado que a adição das fibras proporcionou um aumento da viscosidade e do índice de consistência e a diminuição do índice de comportamento de fluxo das amostras. O aumento da viscosidade mostrou ser causado tanto pelas fibras solúveis (maçã e inulina), contribuindo na composição da fase aquosa, quanto pelas fibras insolúveis (aveia e trigo) por aumentar o conteúdo de sólidos totais, afetando a conformação da rede tridimensional dos biopolímeros hidratados. O trabalho conclui que o enriquecimento de sorvetes com fibras alimentares é um modo efetivo para aumentar as propriedades nutricionais e funcionais do produto final por influenciar as propriedades reológicas dos mesmos.

5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Eletroforese é um método de separação de moléculas, geralmente proteínas e ácidos nucleicos, que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. Sua razão de migração através do campo elétrico depende da força do campo, da carga da rede, do tamanho e forma das moléculas, da força iônica,

viscosidade e temperatura do meio em que as moléculas estão se movendo (WISEMAN, 1991; PATEL, 1994). A eletroforese é uma técnica simples, rápida e sensível para estudar as propriedades das proteínas (PATEL, 1994; SHI; JACKOWSKI, 1998). Geralmente a corrida das amostras é realizada em uma matriz suporte de gel de agarose ou de acrilamida (PATEL, 1994). A agarose é utilizada principalmente para separar grandes moléculas, como ácidos nucleicos, enquanto que a poliacrilamida é largamente empregada para separar proteínas (SHI; JACKOWSKI, 1998).

Entre as diferentes técnicas, a eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS) descontínuo, originalmente descrito por LAEMMLI (1970), é o sistema mais utilizado onde as proteínas são fracionadas estritamente pelo seu peso molecular (SHI; JACKOWSKI, 1998). Além disso, possui bom poder de resolução, é relativamente insensível a sobrecarga de amostra e os minigéis requererem menos tempo de corrida e de descoloração (SHI e JACKOWSKI, 1998). O gel de poliacrilamida é formado pela copolimerização de acrilamida e bisacrilamida (N,N'-metileno-bis-acrilamida) na presença de TEMED (tetrametiletilenodiamina) e persulfato de amônia. O TEMED serve como catalizador da reação devido sua habilidade de carrear elétrons liberando o íon persulfato (SO_4^-), que inicia a polimerização (WALKER, 2002). Diferentes proporções de acrilamida e bisacrilamida permitem a criação de diferentes gradientes de separação, sendo estas proporções determinadas de acordo com o tamanho das proteínas que se desejam separar (SHI; JACKOWSKI, 1998).

As ligações cruzadas intra e intermoleculares de proteínas formadas pela ação da TG podem ser observadas com o auxílio da eletroforese em gel de poliacrilamida (JONG; KOPPELMAN, 2002). A TG transforma proteínas monoméricas em polímeros de elevada massa molar que podem ser distinguidos de acordo com suas massas molares (JONG; KOPPELMAN, 2002; PINTERITS; ARNTFIELD, 2008).

Partanen et al. (2008) utilizaram a eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio de acordo com a metodologia de Laemmli (1970), para avaliar a formação das ligações cruzadas formadas pela ação da TG em géis ácidos e neutros de caseinato de sódio. Em condições neutras, ao contrário do observado em condições ácidas, observou-se uma diminuição da intensidade nas bandas das caseínas com formação concomitante de polímeros de alto peso molecular, o que indicou a formação de ligações intermoleculares

induzidas pela TG e que a enzima diminuiu as forças de repulsão eletrostáticas nos agregados de caseínatos de sódio a pH 7.

A ação TG nas proteínas de iogurtes sem adição de gordura foi investigada com o auxílio da SDS-PAGE por Ozer et al. (2007). As bandas correspondentes às frações de caseínas tornaram-se menos intensas com o aumento da concentração da TG. O perfil eletroforético das amostras tratadas com quantidades maiores da enzima mostrou uma diminuição progressiva na intensidade tanto das bandas das caseínas quanto das proteínas do soro, com um aumento simultâneo dos polímeros de alto peso molecular. A diminuição da intensidade das bandas caseínas indica que estas frações proteicas são bons substratos para a TG.

Hinz et al. (2007) compararam a polimerização das proteínas lácteas pela ação da TG em leite integral e em leite desnatado, e observaram o mesmo comportamento quando avaliadas em SDS-PAGE. As κ - e β -caseínas foram polimerizadas primeiramente em relação à α_{s1} -caseína, contudo, não foi observada a polimerização das proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina) quando o leite foi incubado por 6 horas a 30 °C. Após 24 horas, houve a completa polimerização das caseínas, verificada através do desaparecimento de suas bandas, remanescendo apenas uma pequena fração de monômeros da α_{s1} -caseína. Resultados similares foram encontrados por Sharma, Lorenzen e Qvist (2001), Smiddy et al. (2006) e Moon et al. (2008), aonde verificaram que a κ - e β -caseína são inicialmente polimerizadas pela TG, devido suas localizações nas micelas de caseínas, e que as proteínas do soro do leite não pré-aquecido não são suscetíveis à ação da TG.

O efeito do pH na polimerização das proteínas lácteas com TG, também avaliado através da técnica de eletroforese (SDS-PAGE), foi estudado por Moon et al. (2008). A faixa de pH variou de 5,5 - 9,0, e as amostras de leite foram incubadas com TG até 24 horas a 30 °C. A diminuição das bandas de caseínas foi observada com concomitante formação de polímeros em todos os valores de pH testados, indicando alto nível de atividade da TG sob a faixa de pH estudada. Após 8 horas de incubação, os autores observaram a maior ocorrência de polimerização em pH 6 - 8. Quando o tempo de incubação aumentou para 24 horas, a β -caseína foi mais suscetível à polimerização em pH mais elevado (7,5 - 9,0), enquanto que a κ -caseína apresentou polimerização mais pronunciada em pH mais baixo (5,5 - 7,0). Estes resultados são importantes para a avaliação do impacto do pH sobre a estrutura das micelas, em termos de acessibilidade de diferentes proteínas, e sobre a dissociação das caseínas. Além disso, este resultado é importante para adequar o grau de ligação cruzada através do ajuste do

pH do leite antes da incubação com a TG. Em relação à temperatura de incubação, Myllärinen et al. (2007) observaram que entre 22 - 50 °C ocorreu maior polimerização das caseínas presentes em géis de caseinato de sódio acidificado do que em temperaturas inferiores (4 °C).

Capítulo 2

**Otimização da atividade da transglutaminase
microbiana em sorvetes aplicando metodologia de
superfície de resposta**

Otimização da atividade da transglutaminase microbiana em sorvetes aplicando metodologia de superfície de resposta

Resumo

Para conhecer a faixa de atividade máxima da transglutaminase (TG) em sorvetes, o delineamento central composto foi utilizado e a concentração, tempo e temperatura de incubação da TG foram avaliados. O comportamento reológico da condição que proporcionou a melhor resposta bem como a confirmação da polimerização através da eletroforese em gel SDS-PAGE foram avaliados. Ao analisar os efeitos e as interações das variáveis testadas, observou-se que a concentração da TG e o tempo de incubação foram significativos, o que ocasionou um aumento do índice de consistência, favorecendo o comportamento pseudoplástico dos sorvetes. A resposta máxima ($0,69 \text{ Pa s}^n$) foi atingida a uma concentração de TG de 4 U g^{-1} de proteína, a $56,8 \text{ °C}$ tempo de 90 minutos, sendo que a polimerização das proteínas, confirmada por eletroforese, mostrou que a κ -caseína foi mais susceptível ao ataque da TG em relação às proteínas do soro.

Palavras-chave: transglutaminase; sorvete; metodologia de superfície de resposta; reologia.

1. Introdução

A enzima transglutaminase microbiana (TG; E.C 2.3.2.13) apresenta capacidade de modificar as propriedades das proteínas através da transferência do grupamento acil e γ -carboxiamida dos peptídeos ligados aos resíduos de glutamina (doador de acila) e de grupos aminos primários em uma variedade de componentes amino (receptor de acila), incluindo o grupo ϵ -amino dos peptídeos ligados ao resíduo de lisina (HINZ et al., 2007). A modificação proteica pode ocorrer através de reações de ligações cruzadas, desaminação e/ou incorporações de amins (JONG; KOPPELMAN, 2002). Segundo Hiller e Lorenzen (2009) a ligação cruzada mostra ser a reação dominante e resulta na formação de ligações isopeptídicas ϵ -(γ -glutamina)lisina tanto intra como intermoleculares e na formação de polímeros de alto massa molar (10^6 a 10^7 g mol⁻¹).

As ligações cruzadas entre as proteínas pela ação da TG podem modificar várias propriedades funcionais nos alimentos, como solubilidade, capacidade de retenção de água, estabilidade ao aquecimento, bem como as propriedades de gelificação, emulsificantes e reológicas (HINZ et al., 2007). As proteínas do leite presentes nas formulações dos sorvetes consistem de uma mistura de α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseínas e de proteínas do soro (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina). Tanto caseínas quanto proteínas do soro são bons substratos doadores e receptores de grupamentos acila para a TG (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006), contudo, as κ - e β -caseínas demonstram ter maior reatividade com a TG em relação às proteínas do soro e as demais caseínas (MYLLÄRINEN; BUCHERT; AUTIO, 2007). As proteínas do soro em sua estrutura globular nativa são menos propensas à reação de polimerização, principalmente devido a estabilização da conformação globular pelas ligações de dissulfeto que limitam a disponibilidade dos sítios ativos da TG (BÖNISCH et al., 2007). Em geral, o aumento progressivo da temperatura desorganiza o sistema proteína-água quebrando as ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura proteica. Isto acarreta no desdobramento protéico e provoca a interação proteína-proteína, consequentemente aproximando as proteínas do sítio ativo da TG e formação dos polímeros (NIEUWENHUIZEN et al., 2003; RODRIGUEZ-NOGALES, 2006).

As proteínas do leite estão presentes nas formulações de sorvetes como parte dos componentes sólidos não gordurosos e contribuem para as funções mais importantes no desenvolvimento deste produto. Contribuem para a coalescência parcial e formação da

estrutura da gordura e são adsorvidas na interface ar, conduzindo a um aumento da aeração e da estabilidade da espuma (VEGA; GOFF, 2005). Assim, a polimerização das proteínas lácteas pela ação da TG pode proporcionar a formação de um filme protéico mais resistente (PINTERITS; ARNTFIELD, 2008), melhorando as propriedades funcionais dos sorvetes.

Para determinar as condições ótimas de atividade da TG em diversos alimentos, vários autores têm utilizado a metodologia de superfície de resposta (MSR) (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006; GAUCHE et al., 2008; PINTERITS; ARNTFIELD, 2008). Esta metodologia corresponde a um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas empregadas para modelar e analisar os problemas aos quais a resposta de interesse é influenciada pelas diversas variáveis, com o objetivo de otimizar a resposta (ABDULLAH; SALAMATINIA; KAMARUDDIN, 2009). A principal vantagem é a redução do número de experimentos necessários para fornecer informações suficientes para resultados estatisticamente aceitáveis (ZHANG et al., 2009). A MSR, utilizando um delineamento central composto, envolve a pesquisa fatorial completa para examinar a variação simultânea, sistemática e eficiente dos componentes importantes, identificando as possíveis interações, efeitos de maior ordem e as condições ótimas operacionais (RORIZ et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição da enzima transglutaminase em sorvetes, otimizando as condições ótimas de atividade enzimática (concentração, temperatura e tempo de reação) através da MSR, assim como avaliar o comportamento reológico da condição que proporcionou a melhor resposta. A polimerização das proteínas do leite foi avaliada através do perfil eletroforético.

2. Material e métodos

2.1. Material

Para a fabricação dos sorvetes foram utilizados: leite bovino pasteurizado integral (67 %), sacarose (17 %), creme de leite (8 %), leite em pó (7 %), emulsificante Emustab[®] (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, SC, Brazil) (0,5 %) e estabilizante Super Liga Neutra[®] (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, SC, Brazil) (0,5 %). A enzima transglutaminase microbiana, contendo lactose e maltodextrina, foi gentilmente fornecida pela Ajinomoto no Brasil (Ajinomoto, São Paulo,

SP, Brasil). A transglutaminase apresentou atividade enzimática média de 100 U g⁻¹ (dado fornecido pela indústria) e foi utilizada na sua forma original, sem qualquer purificação.

Todos os reagentes utilizados para as análises foram de qualidade analítica p.a. Água ultra pura (Direct-Q water purification system, Millipore Corp, Molsheim, France) foi utilizada para o preparo das soluções de eletroforese.

2.2. Métodos

Polimerização enzimática e preparação dos sorvetes

O leite foi submetido ao tratamento térmico de 78 ± 1 °C por 15 minutos para a desnaturação das proteínas do soro de leite. Após o resfriamento (25 °C), a TG foi adicionada e sua concentração foi calculada considerando o teor de proteína do sorvete (3,90 %), quantificado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005). As condições ótimas de atividade enzimática utilizadas foram determinadas através do planejamento experimental utilizando delineamento central composto, descrito na seção *Planejamento experimental*. Após o período de incubação, a TG foi inativada utilizando tratamento térmico de 80 °C por 2 minutos, conforme descrito por Rodriguez-Nogales (2006).

Os ingredientes, com exceção do emulsificante, foram misturados e pasteurizados a 85 °C por 15 minutos com agitação constante, formando a calda do sorvete. Após a pasteurização, a calda foi resfriada rapidamente até 50 °C e homogeneizada por 3 minutos. Em seguida, foi estocada a 4 ± 1 °C por 24 horas para a maturação. O emulsificante foi adicionado e o batimento foi realizado (Bellagio, Britania, Curitiba, PR, Brasil) a 815 rpm, 4 °C durante 5 minutos. A seguir, a calda foi submetida ao congelamento em freezer vertical (CVU30, Consul, Whirlpool S.A., São Paulo, Brasil) a -20 ± 1 °C e estocada nesta condição até a realização das análises. A amostra controle foi preparada seguindo o mesmo procedimento, porém sem adição da TG. A Figura 2.1 descreve o fluxograma com as etapas do processamento do sorvete.

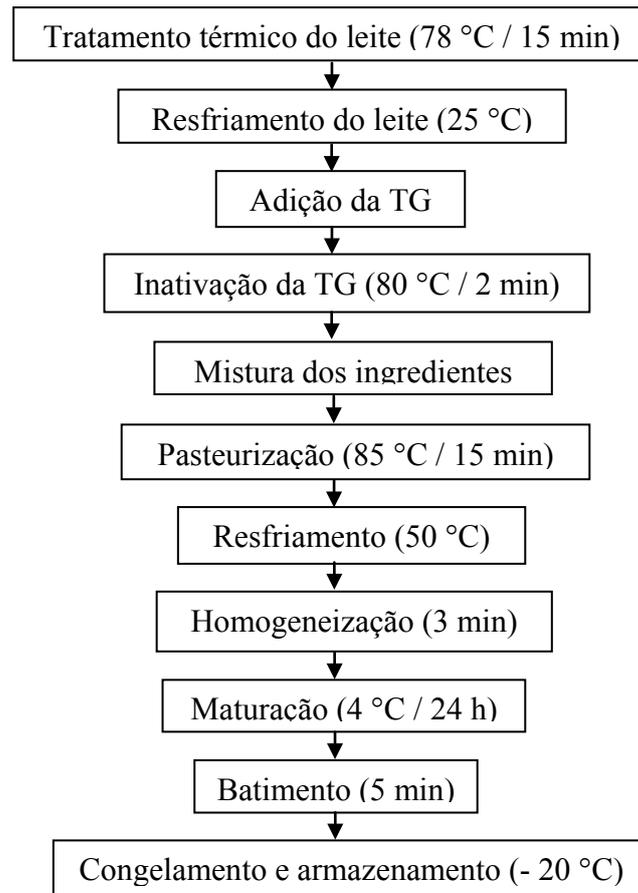


Figura 2.1. Fluxograma do preparo dos sorvetes com transglutaminase.

Planejamento experimental

Os parâmetros testados no planejamento experimental para determinar as condições ótimas de realização do experimento foram: concentração da transglutaminase, temperatura de incubação e tempo de reação enzimática. Para avaliar os efeitos e as interações dessas três variáveis, a metodologia de superfície de resposta foi utilizada através de um delineamento central composto. As variáveis independentes: concentração da TG (x_1), temperatura (x_2) e tempo de reação (x_3), tiveram seus níveis codificados como -1, 0 e 1. Este delineamento foi construído com base em um delineamento fatorial 3^3 (3 fatores e 3 níveis) com quatro repetições do ponto central para a estimativa do erro experimental, resultando num total de 18 experimentos, realizados aleatoriamente e em triplicata. A Tabela 2.1 mostra os fatores e os níveis das variáveis utilizados no delineamento.

Tabela 2.1. Variáveis independentes e seus níveis de variação estabelecidos pelo planejamento experimental.

Fatores	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Transglutaminase (U g ⁻¹ proteína)	0,64	2	4	6	7,36
Temperatura (°C)	23,2	30	40	50	56,8
Tempo (minutos)	39,6	60	90	120	140,4

A medida do índice de consistência (Pa sⁿ) dos sorvetes submetidos ao tratamento enzimático foi a resposta (Y) escolhida para avaliar este estudo. Para estimar esta resposta, um modelo empírico composto por um polinômio de segunda ordem foi construído conforme Equação 1.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

Sendo y: resposta estimada (variável dependente), β_0 : constante do modelo, β_i : coeficientes dos efeitos lineares, β_{ii} : coeficientes dos efeitos quadráticos, β_{ij} : coeficientes das interações entre os fatores, X_{ij} , X_j : variáveis correspondentes aos fatores (variáveis independentes), ε : erro, k: número de variáveis consideradas, i e j : fatores codificados do sistema.

Os coeficientes foram calculados por análise de regressão e a sua significância foi verificada pela análise de variância (ANOVA) com auxílio do *software* Statistic versão 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA, 2007).

Comportamento reológico

O comportamento reológico dos sorvetes foi avaliado em reômetro rotacional com cilindro concêntrico (Brookfield Engineering Laboratories model DV-III Ultra, Stoughton, MA, USA) e spindle ULA. Os dados foram coletados através do software Rheocalc[®] 32 (versão 2.5). O reômetro foi controlado termostaticamente por banho de água circulante (TE-184, TECNAL, Brasil) a $4,0 \pm 0,1$ °C, e as amostras permaneceram em repouso por 15 minutos antes das análises. O modelo reológico Lei de Potência foi utilizado para descrever o

comportamento de fluxo das amostras, e o índice de consistência como parâmetro de verificação da alteração da viscosidade dos sorvetes tratados enzimaticamente (Equação 2).

$$\sigma = K(\dot{\gamma})^n \quad (2)$$

Sendo σ : tensão de cisalhamento (Pa), K: índice de consistência (Pa sⁿ), $\dot{\gamma}$: taxa de deformação (s⁻¹), e n: índice de comportamento de fluxo (adimensional).

As medidas foram realizadas em triplicata e os dados foram avaliados pelo *software* Origin[®] versão 6.0 (Micronal Software Inc., Northampton, MA, USA, 2007). O teste de Tukey foi aplicado quando verificada diferença entre os valores ao nível de 5% de significância.

Perfil de eletroforese (SDS-PAGE)

Para a confirmação da polimerização das proteínas lácteas presentes nos sorvetes pela ação da TG, a eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada seguindo metodologia descrita por Laemmli (1970). Uma cuba vertical (Mini Protein System, Bio Rad Laboratories, Califórnia, USA) com espaçadores de 1 mm, e um sistema descontínuo composto por um gel de empacotamento (3,5 %) e um gel de separação (12 %) foram utilizados para a identificação das proteínas polimerizadas. As amostras de sorvetes foram diluídas 1:6 com solução tampão contendo Tris-HCl 0,015 M, glicerol 25 %, SDS 1 %, β -mercaptoetanol e azul de bromofenol 0,1%, pH 6,5. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida composto por glicina (72 g L⁻¹), Tris base (15 g L⁻¹) e SDS (5 g L⁻¹), pH 8,3. Após a corrida, o gel foi revelado com o corante *Comassie Brilliant Blue* a 1 % em uma mistura de metanol (45 %), ácido acético glacial (10 %) e água ultra pura (45 %). Para a descoloração do gel, foi preparada uma solução contendo metanol (50 %), ácido acético glacial (10 %) e água ultra pura (40 %) e, em seguida uma solução de ácido acético (7,5 %). As frações de proteínas foram identificadas com marcador de massas molares (Natural Unstained Standards-Broad Range, Bio-Rad), de 6,400 a 200,000 g mol⁻¹.

As amostras avaliadas foram: a) amostra controle; b) amostra que apresentou o maior índice de consistência de acordo com o delineamento experimental, com tratamento térmico

do leite antes da incubação com TG; c) amostra que apresentou o maior índice de consistência de acordo com o planejamento experimental, sem tratamento térmico do leite antes da incubação com TG. Esta última amostra foi utilizada para analisar a influência da desnaturação das proteínas do soro de leite na atividade da TG.

3. Resultados e discussão

3.1. Planejamento experimental

Um delineamento central composto, analisado pela metodologia de superfície de resposta, foi utilizado para avaliar os principais efeitos e interações dos fatores estudados: influência da concentração da TG, temperatura de incubação e tempo de reação enzimática em amostras de sorvetes. Na Tabela 2.2 encontram-se os valores dos fatores e das respostas experimentais e preditas do índice de consistência (K) obtidas pelo delineamento experimental. Os valores dos fatores foram determinados através de estudos preliminares (dados não apresentados). O índice de consistência foi utilizado como resposta deste estudo, pois aumenta com a polimerização das proteínas pela TG, devido aos polímeros de alta massa molar formados durante a reação que ocasionam mudanças nas propriedades funcionais dos produtos lácteos (HINZ et al., 2007). Além disso, está correlacionado com a viscosidade (WILCOX; SWAISGOOD, 2002), aumento da textura, resistência ao derretimento e maciez dos sorvetes (KUŞ; ALTAN; KAYA, 2005).

Os valores preditos do índice de consistência estão próximos dos valores experimentais (Tabela 2.2), indicando que o modelo foi aplicável. A resposta máxima encontrada ($K = 0,69 \text{ Pa s}^n$) foi obtida a uma concentração de TG de 4 U g^{-1} de proteína, temperatura de $56,8 \text{ }^\circ\text{C}$ e tempo de reação de 90 minutos, indicando que nestas condições a polimerização das proteínas lácteas do sorvete foi mais extensiva.

Tabela 2.2. Delineamento central composto com as variáveis independentes e suas respostas experimentais e preditas.

Testes	Fatores			Índice de consistência (Pa s ⁿ)	
	Transglutaminase (U g ⁻¹ proteína)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Experimental*	Predito
1	2	30	60	0,29 ± 0,03	0,23
2	2	50	60	0,36 ± 0,09	0,38
3	2	30	120	0,26 ± 0,04	0,28
4	2	50	120	0,35 ± 0,04	0,40
5	6	30	60	0,26 ± 0,01	0,27
6	6	50	60	0,30 ± 0,08	0,34
7	6	30	120	0,38 ± 0,06	0,42
8	6	50	120	0,32 ± 0,09	0,45
9	0,64	40	90	0,21 ± 0,05	0,22
10	7,36	40	90	0,40 ± 0,07	0,30
11	4	40	39,6	0,22 ± 0,09	0,25
12	4	40	140,4	0,50 ± 0,03	0,39
13	4	23,2	90	0,40 ± 0,08	0,42
14	4	56,8	90	0,69 ± 0,04	0,58
15	4	40	90	0,61 ± 0,06	0,57
16	4	40	90	0,58 ± 0,02	0,57
17	4	40	90	0,60 ± 0,05	0,57
18	4	40	90	0,49 ± 0,05	0,57

*média dos valores ± desvio padrão.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar a relação entre as respostas e as variáveis significativas (Tabela 2.3) para obter a condição ótima da atividade da TG. Estes resultados mostram que o modelo foi significativo ($F = 4,11$ e $p < 0,05$) e o ajuste do modelo com $p > 0,05$ indicou que o modelo quadrático está ajustado, ou seja, válido para o estudo. Os efeitos quadráticos dos fatores concentração de TG e tempo de reação foram significativos ($p < 0,05$), no entanto, os efeitos da temperatura e a interação entre as variáveis não foram significativos neste estudo. Estes mesmos fatores foram avaliados por Gauche et al. (2008) na polimerização das proteínas do soro de leite, utilizando delineamento central

composto. Os autores observaram que o índice de consistência foi significativo para os três fatores estudados, obtendo resposta máxima com a concentração de TG de 50 U g⁻¹ de proteína, a 36 °C por 128 minutos de reação. Rodriguez-Nogales (2006) avaliou a temperatura e o tempo do pré-aquecimento do leite de ovelha antes da adição da TG para aumentar a atividade da enzima na polimerização das proteínas lácteas. Ambos os fatores avaliados pela análise de superfície de resposta foram significativos no estudo, sendo que a melhor resposta foi obtida a 78 °C por 60 minutos de aquecimento.

Tabela 2.3. Resultados dos coeficientes de regressão e da análise de variância do índice de consistência dos sorvetes submetidos ao tratamento com transglutaminase.

	Coeficientes de regressão	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F	P
Modelo	0,573896	0,337513	9	0,037501	4,11335	0,029458
(1) TG (U g ⁻¹) (L)	0,023394	0,007467	1	0,007467	0,81900	0,391910
TG (U g⁻¹) (Q)	-0,110819	0,154884	1	0,154884	16,98768	0,003337
(2) Tempo (min) (L)	0,041803	0,023845	1	0,023845	2,61529	0,144500
Tempo (min) (Q)	-0,091332	0,105202	1	0,105202	11,53856	0,009404
(3) Temperatura (°C) (L)	0,045966	0,028830	1	0,028830	3,16208	0,113257
Temperatura (°C) (Q)	-0,025785	0,008385	1	0,008385	0,91968	0,365642
1L / 2L	0,022500	0,004050	1	0,004050	0,44420	0,523852
1L / 3L	-0,022500	0,004050	1	0,004050	0,44420	0,523852
2L / 3L	-0,010000	0,000800	1	0,000800	0,08774	0,774609
Ajuste do modelo		0,063939	5	0,012788	4,262629	0,131187
Erro puro		0,009000	3	0,003000		
Total SQ		0,359378	17			

TG = concentração da transglutaminase; L = efeito linear; Q = efeito quadrático; GL = graus de liberdade. Linhas em negrito correspondem os valores que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os coeficientes de regressão significativos foram negativos, indicando que uma superfície de resposta com ponto de máximo foi obtida no delineamento experimental. Um

modelo quadrático, construído através da análise de regressão, explicou a relação matemática entre as variáveis independentes e a variável resposta (Equação 3).

$$K = 0,573896 - 0,110819.TG^2 - 0,091332.t^2 \quad (3)$$

Sendo K: índice de consistência (Pa s^n), TG: concentração da transglutaminase (U g^{-1} de proteína) e t: tempo de reação (minutos).

Para a representação gráfica das funções deste delineamento são utilizados gráficos que descrevem os efeitos individuais e cumulativos das variáveis testadas e seus efeitos na resposta (PRAKASH; TALAT; HASAN, 2009). A Figura 2.2 apresenta o gráfico de superfície resposta (A - tridimensional) e o gráfico de contornos (B - plano bidimensional) do modelo de regressão ajustado aos dados.

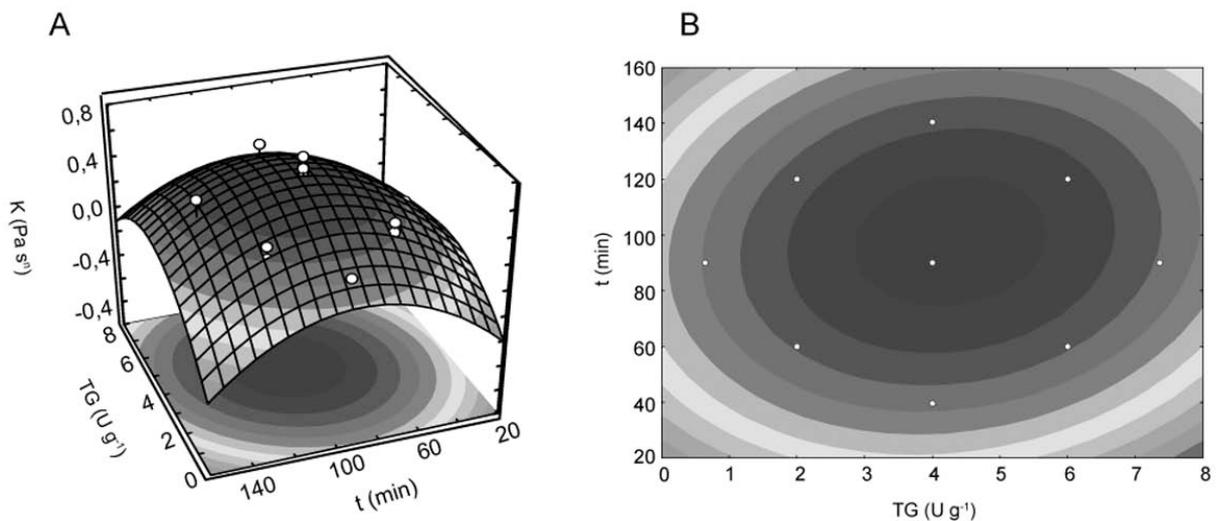


Figura 2.2. Gráfico de superfície resposta (A) e de contornos (B) e do índice de consistência em relação à concentração da transglutaminase (U g^{-1}) e tempo de reação (min), com temperatura fixada em $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Observou-se que a região ótima de atividade enzimática da TG em sorvetes foi encontrada na concentração de 4 U g^{-1} de proteína com 90 minutos de reação (Figura 2.2). O índice de consistência aumentou progressivamente até a concentração de 4 U g^{-1} de proteína, onde em concentrações maiores que esta foi observado diminuição da resposta. Segundo Lorenzen (2007) a diminuição do índice de consistência pode estar relacionada ao grau de

polimerização enzimática, pois para ocorrer a reação, a TG depende da disponibilidade dos resíduos reativos de glutamina localizados na superfície das proteínas. A molécula de κ -caseína é a mais reativa entre as caseínas por estar localizada na superfície da micela, e possui na sua composição 14 resíduos de glutaminas, mas apenas 4 são reativos para a TG (BÖNISCH; HEIDEBACH; KULOZIK, 2008). A β -caseína, localizada no interior da micela, apresenta estrutura aberta, desordenada e flexível ficando acessível ao ataque da TG (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006). Apresenta 5 resíduos de glutamina reativos de um total de 21 resíduos (CHRISTENSEN et al., 1996). As proteínas do soro também apresentam limitados resíduos de glutaminas disponíveis para a TG devido sua estrutura globular compacta. A α -lactoalbumina, por exemplo, apresenta 6 resíduos mas apenas 5 destes são reativos para a TG. A disponibilidade dos resíduos dependem da temperatura, pH e da presença ou ausência de Ca^{+2} (NIEUWENHUIZEN et al., 2003). A β -lactoglobulina possui 7 resíduos de glutaminas, mas somente 4 destes são reativos (NIEUWENHUIZEN et al., 2004).

Assim, um número limitado de resíduos de glutaminas reativos das caseínas e das proteínas do soro está disponível para a TG. Concentrações de TG superiores a 4 U g^{-1} de proteína podem ser maiores que as requeridas para a reação nos sorvetes, o que de acordo com JONG; KOPPELMAN (2002), a saturação do substrato protéico pode ocorrer e o excesso de polímeros formados pode inibir o desenvolvimento uniforme da rede proteica, o que explica a diminuição do índice de consistência nos sorvetes. Bönisch, Heidebach e Kulozik (2008) estudaram o impacto da TG no processo de coagulação do leite e observaram que concentrações superiores a 5 U g^{-1} foram maiores que as requeridas para a reação, pois reduziram a agregação das micelas de para- κ -caseína diminuindo a elasticidade das amostras.

Adequação do modelo

A avaliação do modelo é importante para assegurar que este forneça uma aproximação adequada dos resultados obtidos nas condições experimentais. Assim, a normalidade dos dados, avaliada através do gráfico de probabilidade normal dos resíduos (Figura 2.3A), mostrou que os pontos experimentais foram distribuídos normalmente ao redor da reta, indicando que a suposição da normalidade foi satisfeita. Um coeficiente de determinação (R^2) de 0,85 foi obtido para este modelo, indicando um ótimo ajuste entre os valores observados e os valores preditos da resposta. O gráfico dos resíduos padronizados *versus* os valores

preditos (Figura 2.3B) demonstrou que os resíduos foram distribuídos aleatoriamente em torno do zero e não apresentou valores discrepantes, pois todos os pontos ficaram dentro da faixa aceita para validar o modelo (-3 e +3) (RORIZ et al., 2009). Assim, os resultados da análise de variância foram válidos, pois as suposições do modelo foram atendidas.

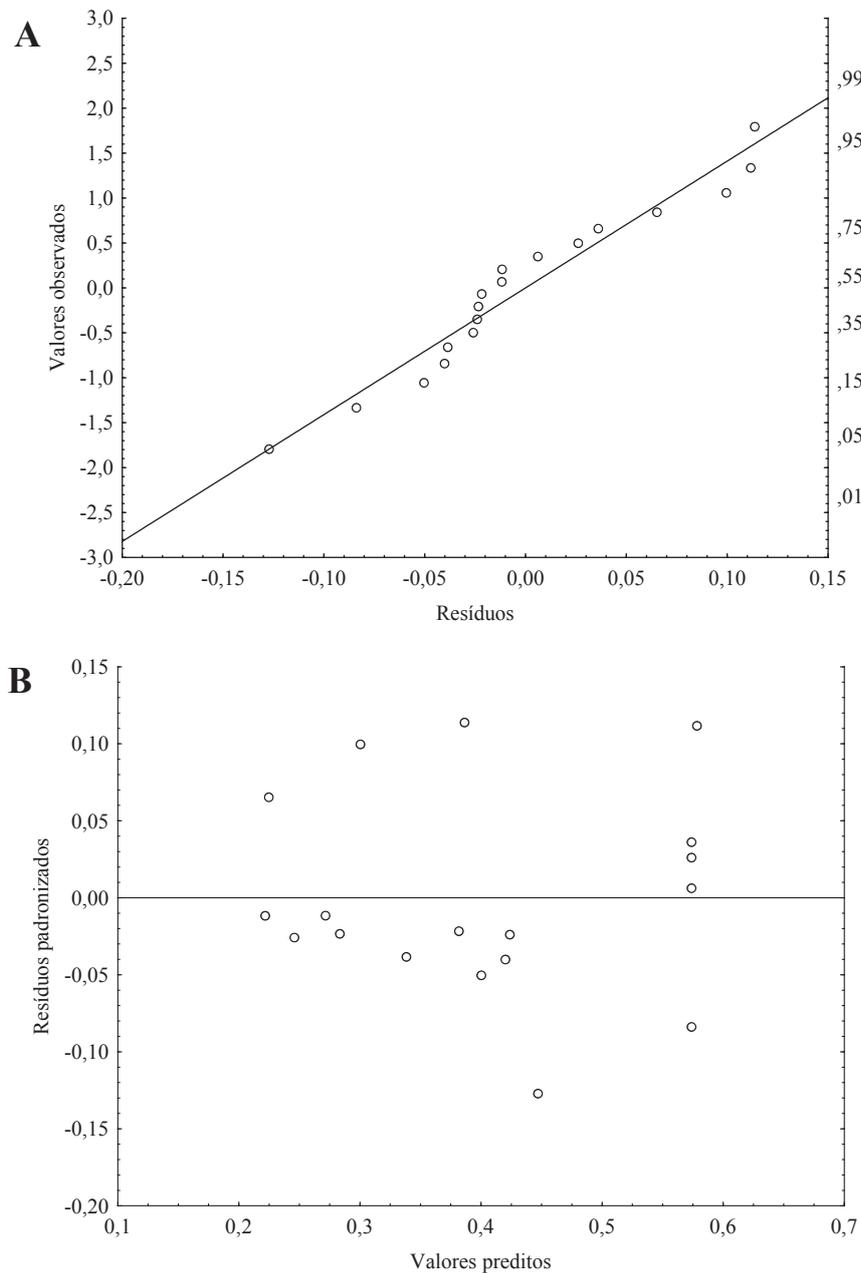


Figura 2.3. Valores observados *versus* resíduos (A) e resíduos padronizados *versus* valores preditos (B) para o índice de consistência dos sorvetes com transglutaminase.

3.2. Comportamento reológico

O modelo Lei de Potência foi utilizado para calcular o índice de consistência (K) e o índice de comportamento de fluxo (n) das amostras de sorvetes controle (sem tratamento enzimático com TG) e da amostra que apresentou resposta máxima para o índice de consistência no delineamento experimental (Tabela 2.4). O modelo se ajustou adequadamente aos dados da curva da tensão de cisalhamento *versus* a taxa de deformação para todas as amostras ($R^2 > 0,98$).

Tabela 2.4. Parâmetros reológicos obtidos pelo modelo de Lei de Potência das amostras submetidas ao tratamento com transglutaminase (4 U g⁻¹, 56,8 °C e 90 min).

Tratamento	Índice de consistência (Pa s ⁿ)	Índice de comportamento de fluxo	R ²
Controle	0,29 ^a ± 0,05	0,91 ^a ± 0,02	0,9938
Sorvete + transglutaminase	0,62 ^b ± 0,07	0,70 ^b ± 0,08	0,9890

Valores da coluna com a mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$) (teste de Tukey).

O valor do índice de consistência é baseado na variação da taxa de deformação e informa a viscosidade de um fluido (KARACA et al., 2009). Foi observado que a TG interferiu no comportamento reológico das amostras de sorvetes aumentando o índice de consistência, conseqüentemente, aumentando a viscosidade destes produtos (Tabela 2.4).

Todas as amostras apresentaram comportamento pseudoplástico (Figura 2.4). As propriedades reológicas dos sorvetes são geralmente descritas como pseudoplásticas (AIME et al., 2001; GONZÁLES-TOMÁS et al., 2008; SOUKOULIS; CHANDRINOS; TZIA, 2008; KARACA et al., 2009) onde há diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 2.4B) (BRAUN; ROSEN, 2000). Esta diminuição ocorreu, parcialmente, devido à agregação dos glóbulos de gordura que durante o cisalhamento diminuem de tamanho e conseqüentemente a viscosidade dos sorvetes (NAZARUDDIN; SYALIZA; ROSNANI, 2008).

O grau da característica pseudoplástica ou dilatante de um fluido pode ser avaliado através dos dados dos índices de comportamento de fluxo (n). No caso do sorvete submetido ao tratamento enzimático, houve um aumento das propriedades pseudoplásticas com o

afastamento do índice de comportamento de fluxo do valor um. Este comportamento também foi evidenciado por Gauche et al. (2008) com a polimerização das proteínas do soro de leite pela ação da TG. O favorecimento do comportamento pseudoplástico ocorreu, provavelmente, devido aos polímeros de alta massa molar formados pela reação de ligação cruzada promovida pela TG. Innocente, Comparin e Corradini (2002) afirmam que grandes polímeros, com o aumento da taxa de cisalhamento, tendem a se desintegrarem e possivelmente alinharem-se ao fluxo oferecendo menor resistência a este.

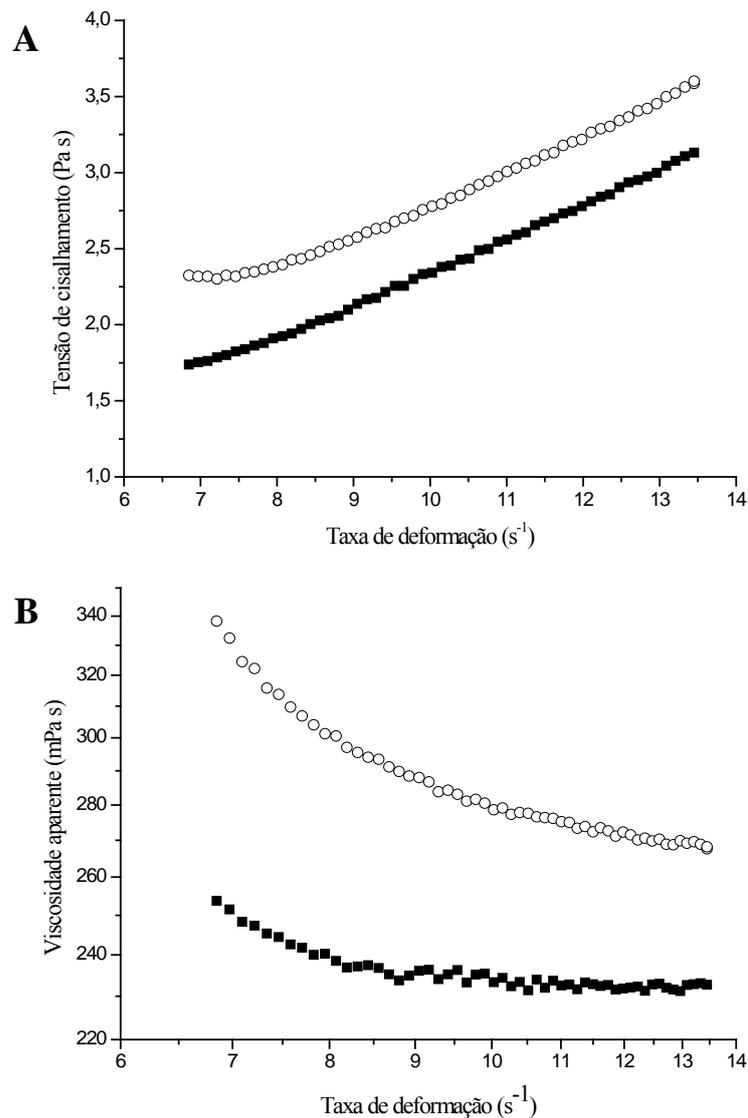


Figura 2.4. Comportamento reológico das amostras submetidas ao tratamento com transglutaminase (4 U g^{-1} , $56,8 \text{ }^\circ\text{C}$ e 90 min). (■) sorvete controle; (○) sorvete com transglutaminase.

3.3. Perfil de eletroforese

As ligações cruzadas intra e intermoleculares formadas nas proteínas lácteas pela ação da TG foram confirmadas com o auxílio da eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Esta técnica é considerada adequada para confirmar a polimerização das proteínas, pois mostra a ocorrência da polimerização através da formação de novas bandas de alta massa molar (PINTERITS; ARNTFIELD, 2008).

Através da análise de eletroforese foi possível observar que o tratamento enzimático promoveu o surgimento de novas bandas com altas massas molares (Figura 2.5, linha 3 e 4). A formação destas bandas foi acompanhada pela perda da intensidade das bandas de κ - e β -caseínas, indicando que os polímeros maiores foram formados via polimerização das proteínas de baixo peso molecular, como confirmado por Sharma, Lorenzen e Qvist (2001) e Moon et al. (2008). As frações de caseínas são consideradas bons substratos para a TG devido ao baixo grau de sua estrutura terciária, flexibilidade, arranjo espiral e ausência de ligação dissulfeto na β -caseína, deixando os grupos reativos expostos para TG (ÖZRENK, 2006).

Em relação às proteínas do soro, a banda da α -lactoalbumina sofreu maior enfraquecimento do que a banda da β -lactoglobulina. Estas proteínas tendem a formar ligações cruzadas menos eficientes que as caseínas, pois sua estrutura globular compacta é mais estável e possui muitas ligações dissulfeto que dificultam a ação da enzima (BÖNISCH et al., 2007). Contudo, a polimerização destas proteínas foi mais perceptível na amostra em que foi realizada a etapa de pré-aquecimento do leite, demonstrando que a desnaturação das proteínas do soro facilitou a formação dos polímeros (Figura 2.5, linha 3).

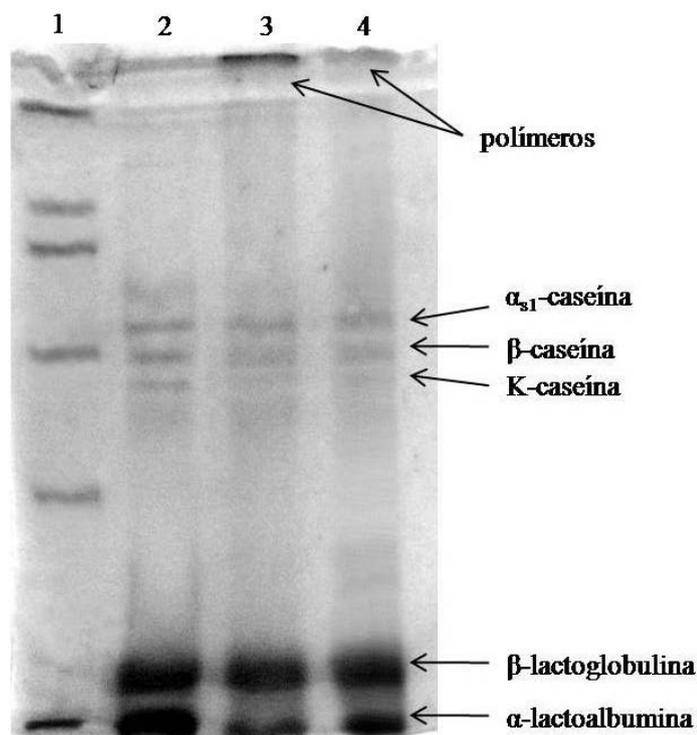


Figura 2.5. Perfil de SDS-PAGE das amostras de sorvetes. Linha 1: marcador de massa molar; linha 2: amostra controle (sem TG); e linha 3: amostra de sorvete com TG e com pré-tratamento térmico do leite; linha 4: amostra de sorvete com TG sem pré-tratamento térmico do leite (4 U g⁻¹ proteína, 90 minutos de reação a 40°C).

4. Conclusão

A aplicação da metodologia de superfície de resposta foi eficaz na otimização dos parâmetros para a atividade da TG em sorvetes. O tratamento enzimático aumentou consideravelmente o índice de consistência, alcançando valor máximo a uma concentração de TG em 4 U g⁻¹ proteína com 90 minutos de reação enzimática. Este aumento, bem como o aumento das propriedades pseudoplásticas em relação à amostra controle, foi ocasionado pelos polímeros de alta massa molar formados durante a reação de ligação cruzada. Estes polímeros foram confirmados com auxílio da eletroforese, onde demonstrou que a k-caseína foi mais susceptível ao ataque da TG do que as proteínas do soro de leite em sorvetes. Estes resultados demonstraram que a TG pode melhorar as propriedades funcionais dos sorvetes, sendo que poucas ligações cruzadas são necessárias para alcançar resultados adequados. Portanto, a regulação grau de polimerização é crucial quando se pesquisa a funcionalidade da proteína.

Capítulo 3

Caracterização de sorvetes com diferentes teores de gordura e com transglutaminase microbiana

Caracterização de sorvetes com diferentes teores de gordura e com transglutaminase microbiana

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos da enzima transglutaminase microbiana (TG) (*Streptovercillium mobaraense*) nas propriedades de sorvetes com diferentes concentrações de gordura. A TG foi adicionada na concentração de 4 U g^{-1} e a caracterização físico-química, capacidade de incorporação de ar, coalescência da gordura, comportamento de derretimento e reológico, textura e análise da cor foram avaliados. A TG se mostrou efetiva no controle das propriedades dos sorvetes, proporcionando maior capacidade de incorporação de ar, maior coalescência da gordura e resistência ao derretimento em relação às amostras controle (sem TG), devido à formação de uma rede proteica mais coesa, aumentando assim, a estabilidade dos sorvetes. Em relação aos parâmetros reológicos, verificou-se que a enzima promoveu o aumento do índice de comportamento de fluxo e as propriedades pseudoplásticas das amostras. A firmeza dos sorvetes foi diminuída com a TG e foi inversamente proporcional ao conteúdo de gordura. Este estudo mostrou ainda que a enzima diminuiu os parâmetros de cor a e b , e aumentou os valores de L . A elaboração de sorvetes com 4 e 6 % de gordura submetidos ao tratamento enzimático levou à formação de um produto com características semelhantes ao sorvete elaborado com 8 % de gordura, demonstrando que a TG pode ser empregada para substituir parcialmente a gordura em sorvetes.

Palavras-chave: sorvete, transglutaminase, redução de gordura, reologia.

1. Introdução

Sorvetes são sistemas coloidais complexos, contendo na fase congelada: cristais de gelo, bolhas de ar, glóbulos e agregados de gorduras parcialmente coalescidos, todos em fases descontínuas envolvidas por uma matriz contínua não congelada de açúcares, proteínas, sais, polissacarídeos e água (GOFF, 2002). Contém elevada concentração de gordura, aproximadamente 10 % (METWALLY, 2007), sendo que essa gordura é considerada um ingrediente multifuncional no sistema influenciando na cremosidade (KOXHOLT; EISENMANN; HINRICHS, 2001), textura, sensação de lubricidade (ADAPA et al., 2000), cor e sabor desses produtos (LI et al., 1997; GONZÁLEZ-TOMÁS et al., 2008). Contribuem com as propriedades dos sorvetes durante o congelamento e batimento, especialmente através da formação da rede tridimensional parcialmente coalescida de glóbulos de gordura (GOFF, 1997b). Parte desses glóbulos envolve as bolhas de ar, estabilizando a fase gasosa, sendo que o aumento dos níveis da agregação da gordura melhora a resistência do sorvete ao derretimento (GRANGER et al., 2005) e à recristalização do gelo (GOFF, 2002).

As proteínas do leite presentes nas formulações do sorvete emulsionam a gordura e contribuem para a coalescência parcial e formação da estrutura da gordura. São adsorvidas na interface ar, conduzindo a um aumento da aeração e da estabilidade da espuma. As proteínas que não estão presentes nessas interfaces contribuem para o aumento da viscosidade e da textura dos sorvetes (VEGA; GOFF, 2005).

A formação da estrutura do sorvete é dificultada quando o teor de gordura é diminuído (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003). Os atributos referentes à qualidade como viscosidade, cristalização do gelo, firmeza, derretimento e flavor são afetados (EL NAGAR et al., 2002). Quando os componentes gordurosos são reduzidos, frequentemente são substituídos por outros que possam satisfazer as mesmas propriedades funcionais das gorduras e mantendo as qualidades organolépticas do produto (DEVEREUX et al., 2003; BENJAMINS et al., 2009). Diversos substitutos de gordura são utilizados principalmente a base de carboidratos e proteínas (CHUNG; HEYMAN; GRÜN, 2004; AYKAN; SEZGIN; GUZEL-SEYDIM, 2008; AKALM; KARAGÖZLÜ; ÜNAL, 2008). Contudo, pouca atenção é dada às enzimas, especialmente a transglutaminase (TG), que possui alta afinidade com as proteínas lácteas, modificando suas propriedades funcionais. A TG é afirmada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo órgão *Food and Drug Administration* (FDA, 2010) e

segundo Motoki e Seguro (1998) e Yokoyama, Nio e Kikuchi (2004), mostra ser uma excelente substituta da gordura em sorvetes.

A TG microbiana (EC 2.3.2.13) é uma enzima que catalisa uma reação de transferência entre os grupos acil e γ -carboxiamida dos peptídeos ligados aos resíduos de glutamina e os grupos aminos primários em uma variedade de componentes amino (MOTOKI; SEGURO, 1998; AKTAS; KILIÇ, 2005, TRESPALACIOS; PLA, 2007). Pode modificar as propriedades funcionais dos alimentos protéicos através da incorporação de aminos, ligações cruzadas e desaminação (LORENZEN, 2007; TRESPALACIOS; PLA, 2007). A afinidade da TG pelos diferentes tipos de proteínas depende da distribuição de resíduos de glutaminas bem como da estrutura secundária e terciária das proteínas, sendo que sua estrutura é estabilizada pela forte polimerização covalente ϵ -(γ -glutamil)lisina entre as cadeias peptídicas (IONESCU et al., 2008). Dentre as proteínas do leite, presentes nas formulações de sorvetes, a κ - e a β -caseína são as mais susceptíveis ao ataque da TG (LORENZEN, 2007). As proteínas do soro, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, geralmente necessitam de tratamentos prévios, como aquecimento, para proporcionar sua desnaturação e aumentar a interação com as micelas de caseínas, como consequência, aumentar a susceptibilidade das proteínas à reação com a TG (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição da enzima TG microbiana (*Streptovercillium mobaraense*) nas propriedades funcionais (comportamento de derretimento, desestabilização da gordura e incorporação de ar) e reológicas de sorvetes elaborados com diferentes teores de gordura.

2. Material e métodos

2.1. Material

Para a formulação base de cada amostra de sorvete foram utilizados: leite bovino pasteurizado integral (1 L), sacarose (250 g), leite em pó (100 g), emulsificante Emustab[®] (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, SC, Brazil) (10 g) e estabilizante Super Liga Neutra[®] (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, SC, Brazil) (10 g). O creme de leite foi adicionado apenas nas amostras S6 e S6-TG (240 g) e nas amostras S8 e S8-TG (480 g). A enzima transglutaminase microbiana, contendo lactose e maltodextrina, foi gentilmente fornecida pela Ajinomoto no

Brasil (Ajinomoto, São Paulo, SP, Brasil). A transglutaminase apresentou atividade enzimática média de 100 U g^{-1} (dado fornecido pela indústria) e foi utilizada na sua forma original, sem qualquer purificação. Todos os reagentes utilizados para as análises foram de qualidade analítica p.a.

Foram elaboradas seis diferentes formulações de sorvetes. As amostras foram codificadas como: sorvete com 4 % de gordura sem TG (S4) e com TG (S4-TG); sorvete com 6 % de gordura sem TG (S6) e com TG (S6-TG); e sorvete com 8 % de gordura sem TG (S8) e com TG (S8-TG).

2.2. Métodos

Polimerização enzimática e preparação dos sorvetes

O leite foi submetido ao tratamento térmico de $78 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos para a desnaturação das proteínas do soro de leite. Após o resfriamento ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), a TG foi adicionada no leite, antes da mistura dos ingredientes. Sua concentração foi calculada considerando o teor de proteína do sorvete, quantificado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005). As condições de atividade enzimática foram: 4 U g^{-1} proteína, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ com 90 min de reação. Após a incubação da TG, a enzima foi inativada utilizando temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2, conforme descrito por Rodriguez-Nogales (2006).

Os ingredientes, com exceção do emulsificante, foram misturados e pasteurizados a $85 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min com agitação constante formando a calda. Após a pasteurização, esta foi resfriada rapidamente até $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e homogeneizada por 3 minutos. Em seguida, foi maturada a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente, foi adicionado o emulsificante e realizado o batimento (Bellagio, Britania, Curitiba, PR, Brasil) a 815 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos. O congelamento foi realizado em freezer vertical (CVU30, Consul, Whirlpool S.A., São Paulo, Brasil) a $-20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e o sorvete foi estocado nesta condição até a realização das análises. As amostras S4, S6 e S8 foram elaboradas seguindo o mesmo procedimento descrito acima, porém sem adição da TG.

Caracterização físico-química

Para a caracterização físico-química foram determinados o pH, teor de gordura pelo método de Soxhlet, proteínas através do método de Kjeldahl, açúcares totais por titulação, cinzas e sólidos totais por método gravimétrico (AOAC, 2005).

Análise de incorporação de ar

A quantidade de ar incorporado nos sorvetes foi avaliada através da média do peso do sorvete (m_1) e o peso da calda (m_2), a um volume constante (WILDMOSER; SCHEIWILLER; WINDHAB, 2004). A porcentagem de incorporação de ar foi calculada seguindo a seguinte Equação 1.

$$IC = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

Desestabilização da gordura

A desestabilização da gordura dos sorvetes foi determinada conforme metodologia proposta por Goff e Jordan (1989). Os sorvetes foram diluídos 500 vezes com água destilada e deionizada, e em seguida, centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm (Jaetzki K24, Jena, Alemanha). As absorbâncias foram medidas após 10 minutos em espectrofotômetro em 540 nm (Hitachi U2010, Tokyo, Japão). A água destilada e deionizada foi utilizada como branco. A desestabilização da gordura foi calculada seguindo a Equação 2.

$$\% \text{ desestabilização da gordura} = \frac{(A_1 - A_2)}{A_1} \times 100 \quad (2)$$

Sendo A_1 : absorbância do sorvete diluído centrifugado; e A_2 : absorbância do sorvete diluído sem ser centrifugado.

Comportamento de derretimento

O comportamento de derretimento das amostras de sorvetes foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Lee e White (1991), em temperatura de 25 ± 1 °C (ambiente). O sorvete foi colocado em um suporte com porosidade de tamanho 10 mesh e o filtrado foi transferido para um frasco graduado. O peso do sorvete derretido foi avaliado em intervalos de 10 minutos e o seu percentual calculado e representado graficamente em função do tempo.

Comportamento reológico

O comportamento reológico dos sorvetes foi avaliado em reômetro rotacional com cilindro concêntrico (Brookfield Engineering Laboratories model DV-III Ultra, Stoughton, MA, USA) e spindle ULA. Os dados foram coletados através do software Rheocalc[®] 32 versão 2.5 (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA). O reômetro foi controlado termostaticamente por banho de água circulante (TE-184, TECNAL, Brasil) a $4,0 \pm 0,1$ °C, e as amostras permaneceram em repouso por 10 minutos antes das análises. O comportamento de fluxo das amostras foi avaliado através do aumento linear da taxa de deformação de $19,6$ a $67,3$ s⁻¹ nos primeiros 20 minutos e retornou para $19,6$ s⁻¹ nos 20 minutos seguintes. O modelo reológico Lei de Potência foi utilizado para descrever o comportamento de fluxo e o índice de consistência das amostras de sorvetes tratados enzimaticamente (Equação 3). A viscosidade aparente das amostras de sorvetes em função do tempo de cisalhamento foi avaliada sob taxa de cisalhamento constante de 20 s⁻¹.

$$\sigma = K(\dot{\gamma})^n \quad (3)$$

Sendo σ : tensão de cisalhamento (Pa); K : índice de consistência (Pa sⁿ); $\dot{\gamma}$: taxa de deformação (s⁻¹); e n : índice de comportamento de fluxo (adimensional).

Os dados reológicos tempo-dependentes foram ajustados através do Modelo de Weltmann (1943) (Equação 4) a uma taxa de deformação média de 18 s⁻¹ durante 70 minutos, com o objetivo de caracterizar o comportamento tixotrópico das amostras de sorvetes.

$$\sigma = A + B\log t \quad (4)$$

Sendo σ : tensão de cisalhamento (Pa); A: tensão inicial requerida (Pa); B: coeficiente de ruptura tixotrópica (Pa); e t: tempo (s).

Medidas de textura

As medidas de textura foram avaliadas com auxílio do texturômetro TA-XTplus Texture Analyser (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, UK) e software Exponent 32 (Stable Systems, versão 4.0.13.0, 2007). As amostras foram mantidas em recipiente de 80 mL e armazenadas a temperatura de -20 ± 1 °C até o momento da análise. Para cada amostra, seis medidas foram realizadas usando um corpo de prova cilíndrico (PL 0,5) de poliacetal Delrin de 12 mm de diâmetro acoplado a um peso de 50 Kg. A profundidade de penetração no centro geométrico das amostras foi de 35 mm e a velocidade de $2,0 \text{ mm s}^{-1}$. A firmeza (g) foi determinada através do pico da força de compressão durante a penetração na amostra.

Análise de cor

A cor das amostras de sorvetes armazenados a -20 ± 1 °C durante 1 mês foi medida no colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japão). Os parâmetros registrados foram *a* (componente vermelho - verde), *b* (componente amarelo - azul) e *L* (luminosidade).

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através da Análise de Variância das médias dos valores obtidos e analisados pelo *software* Statistica® (versão 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA, 2007). O teste de Tukey foi aplicado quando verificada diferença entre os valores ao nível de 5% de significância. Os modelos reológicos foram avaliados no *software* OriginLab® (versão 6.0, Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA, 2007). Todas as análises foram realizadas em triplicata. As análises físico-químicas, de incorporação de ar, desestabilização da gordura, comportamento de derretimento, reológicas e textura foram avaliadas pela Análise de Componentes Principais (ACP), após a ANOVA.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização físico-química

Os resultados referentes à caracterização físico-química das amostras de sorvetes são mostrados na Tabela 3.1. A adição da TG não alterou significativamente ($p < 0,05$) a composição dos sorvetes. A concentração de gordura nas amostras S4 e S4-TG foi em média 4,23 %, nas amostras S6 e S6-TG 6,5 % e nas amostras S8 e S8-TG 8,51 %.

Tabela 3.1. Caracterização físico-química das amostras de sorvetes.

	S4	S4-TG	S6	S6-TG	S8	S8-TG
Proteína (% m/m)	3,82 ^a	3,91 ^a	3,83 ^a	3,91 ^a	3,87 ^a	3,84 ^a
	± 0,14	± 0,02	± 0,05	± 0,08	± 0,01	± 0,09
Gordura (% m/m)	4,14 ^a	4,31 ^a	6,49 ^b	6,51 ^b	8,55 ^c	8,47 ^c
	± 0,11	± 0,02	± 0,01	± 0,28	± 0,12	± 0,08
Açúcar total (% m/m)	22,39 ^a	22,57 ^a	22,48 ^a	21,56 ^a	22,37 ^a	21,65 ^a
	± 0,49	± 0,24	± 0,42	± 0,32	± 0,51	± 0,11
Sólidos totais (% m/m)	33,18 ^a	33,32 ^a	33,17 ^a	33,30 ^a	33,19 ^a	33,27 ^a
	± 0,08	± 0,03	± 0,01	± 0,04	± 0,05	± 0,04
Umidade (% m/m)	66,82 ^a	66,68 ^a	66,83 ^a	66,70 ^a	66,81 ^a	66,73 ^a
	± 0,08	± 0,03	± 0,01	± 0,04	± 0,05	± 0,04
Cinzas (% m/m)	0,94 ^a	0,96 ^a	0,89 ^a	0,98 ^a	0,90 ^a	0,88 ^a
	± 0,01	± 0,04	± 0,02	± 0,02	± 0,02	± 0,01
pH	6,94 ^a	6,96 ^a	7,00 ^a	6,83 ^a	6,89 ^a	7,00 ^a
	± 0,06	± 0,00	± 0,01	± 0,23	± 0,13	± 0,01

*Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em triplicata seguidos pelo desvio padrão.

**Valores não distribuídos com mesma letra (linha) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (teste de Tukey).

*** sorvete com 4 % de gordura sem TG (S4) e com TG (S4-TG); sorvete com 6 % de gordura sem TG (S6) e com TG (S6-TG) sorvete com 8 % de gordura sem TG (S8) e com TG (S8-TG).

3.2. Análise da incorporação de ar e de desestabilização (coalescência) da gordura

A incorporação de ar durante o processamento do sorvete refere-se ao aumento do volume do produto em relação à calda. (NAZARUDDIN; SYALISA; ROSNANI, 2008; CRUZ et al., 2009). As bolhas de ar formadas são envolvidas por gorduras e por proteínas

lácteas e definem a estrutura do produto final, proporcionando ao sorvete maior estabilidade à espuma, textura e porcentagem de derretimento (SOFJAN; HARTEL, 2004; SOUKOULIS; CHANDRINOS; TZIA, 2008; CRUZ et al., 2009; AKHTAR et al., 2009). Neste estudo, observou-se que a quantidade de ar incorporado nas amostras variou de 39,13 a 107,15 % dependendo da composição (Tabela 3.2). Foi obtida uma maior incorporação na amostra contendo 4 % de gordura e submetida ao tratamento enzimático com TG (S4-TG), seguida pelas amostras S6-TG (63,86 %) e S8-TG (49,90 %). Em geral, a adição da TG aumentou a quantidade de ar incorporado nos sorvetes em comparação às suas amostras controles (sem TG), sendo que a amostra S4-TG, que apresentava a menor concentração de gordura, apresentou valores significativamente maiores que as amostras controle S6 e S8, que apresentavam teor de gordura mais elevado. Segundo Faergemand et al. (1999), a TG polimeriza as caseínas através de ligações covalentes e intermoleculares, tornando-se capaz de estabilizar emulsões e espumas. Assim, a formação dos polímeros de caseínas, como mostrado na Figura 2.5 do Capítulo 2, envolvendo as bolhas de ar foi, provavelmente, responsável pelo aumento do volume e estabilização do ar incorporado nas amostras de sorvetes.

Além disso, foi observada a diminuição significativa ($p < 0,05$) na incorporação de ar conforme o aumento da concentração de gordura. A relação inversa entre o conteúdo de gordura e a incorporação de ar em sorvetes também foi observada por Adapa et al. (2000) e por Alamprese et al. (2002). O aumento do teor de gordura pode ter diminuído a capacidade de incorporação de ar por ser um componente de maior viscosidade, o que pode impossibilitar a incorporação de ar no sorvete. Segundo Stanley, Goff e Smith (1996), sistemas de alta viscosidade não favorecem a formação da espuma, mas favorecem a estabilidade dessas espumas.

O tempo de batimento, 5 minutos, empregado durante o processo de elaboração do sorvete também pode ter influenciado na diminuição da quantidade de ar nas amostras com concentrações maiores de gordura. No estudo realizado por Adapa et al. (2000), foi observada uma maior incorporação na amostra de sorvete contendo 6 % de gordura, seguida pelas amostras apresentando 12 e 8 % de gordura, quando foi realizado o batimento da calda por 4 minutos. Contudo, ao utilizar o batimento por 8 e 12 minutos, não foi observada diferença significativa entre as amostras com teor de 6 e 12 % de gordura.

Segundo a Resolução RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005, os sorvetes podem apresentar densidade aparente mínima de 475 g L^{-1} , ou seja, podem conter no máximo 110 %

de ar incorporado no produto (BRASIL, 2005b). Assim, os sorvetes elaborados com e sem TG e com diferentes concentrações de gordura encontraram-se dentro do preconizado pela legislação brasileira em vigor.

Tabela 3.2. Efeito da adição da transglutaminase nos parâmetros de incorporação de ar e na desestabilização da gordura das amostras de sorvetes.

Tratamentos	Incorporação de ar (%)	Coalescência da gordura (%)
S4	67,19 ^a ± 1,77	21,83 ^a ± 0,36
S4-TG	107,15 ^b ± 0,92	37,94 ^b ± 0,23
S6	58,06 ^c ± 2,03	48,81 ^c ± 0,55
S6-TG	63,86 ^d ± 1,56	54,77 ^d ± 0,18
S8	39,13 ^e ± 1,20	79,45 ^e ± 0,50
S8-TG	47,90 ^f ± 1,76	91,95 ^f ± 0,57

*Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em triplicata seguidos pelo desvio padrão.

**Valores não distribuídos com mesma letra (coluna) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (teste de Tukey).

*** sorvete com 4 % de gordura sem TG (S4) e com TG (S4-TG); sorvete com 6 % de gordura sem TG (S6) e com TG (S6-TG) sorvete com 8 % de gordura sem TG (S8) e com TG (S8-TG).

O método espectroturbidimétrico foi utilizado para confirmar a diferença na desestabilização da gordura em sorvetes produzidos com TG e redução de gordura. A desestabilização da gordura, referente ao processo de coalescência parcial da gordura, aumentou significativamente ($p < 0,05$) nos sorvetes que foram submetidos ao tratamento enzimático com TG (Tabela 3.2). Foi observada maior coalescência na amostra S8-TG (91,95 %) e valores mais baixos na amostra S4 (21,83 %).

A gordura no sorvete, recoberta por uma camada de proteínas e emulsificantes (AKHTAR et al., 2009), na forma parcialmente coalescida influencia na qualidade do sorvete, contribuindo principalmente na textura, no corpo (ADAPA et al., 2000; GOFF, 2006) e na estabilização da estrutura das bolhas de ar e da espuma (GRANGER et al., 2005; ZHANG; GOFF, 2005). Em estudo realizado por Metwally (2007), a TG, através da polimerização das proteínas do soro de leite e das caseínas presentes nos glóbulos de gordura, aumentou as propriedades de coesão das membranas das bolhas de ar e a aderência do filme adsorvido dos glóbulos de gordura. Esta ação juntamente com a maior concentração de gordura, foi, provavelmente, a responsável pelo aumento da porcentagem de gordura coalescida nas amostras de sorvetes tratadas enzimaticamente com TG.

Segundo Segall e Goff (2002), os fatores que afetam a incorporação de ar também afetam a coalescência dos glóbulos de gordura durante o congelamento. Contudo, ao comparar os resultados da análise de coalescência da gordura com os da análise de incorporação de ar, observou-se, no geral, que quanto maior o grau de coalescência da gordura menor foi a porcentagem de bolhas de ar incorporadas nos sorvetes. De acordo com Tong, Jordan e Houghton (1984) e Goff e Jordan (1989), este resultado pode acontecer quando a coalescência ocorre muito cedo no processo de congelamento, antes de certa viscosidade ser atingida. Como consequência, as bolhas de ar podem se romper dificultando o desenvolvimento de uma incorporação de ar adequada. No presente estudo, a etapa de congelamento foi realizada de forma mais lenta e não concomitantemente com o processo de batimento, como é frequentemente realizada em escala industrial, o que pode ter ocasionado a relação inversa entre a coalescência da gordura com a quantidade de ar incorporado no produto.

A porcentagem de gordura coalescida varia consideravelmente em sorvetes, sendo afetada principalmente pela formulação e processo de fabricação desses produtos (GOFF, 1997b; BOLLIGER et al., 2000; OZDEMIR et al., 2008; HWANG; SHYU; HSU, 2009). Metwally (2007) relatou uma coalescência da gordura de 82 e 3,5 % em sorvetes com 10 e 5 % de gordura, respectivamente, ambos submetidos ao tratamento com TG. Innocente, Comparin e Corradini (2002) encontraram valores de 61 e 66 % de gordura coalescida em sorvete experimental com peptona proteose e em sorvete comercial com mono e diglicerídeo, respectivamente. Contudo, o sorvete produzido sem a presença de emulsificante apresentou apenas 20 % de gordura coalescida. Whelan et al. (2008) observaram que a substituição de parte da sacarose pelos adoçantes comerciais tagatose, eritriol e trealose em diferentes proporções, juntamente com maltitol e povidexose, não ocasionaram mudanças significativas nos valores da desestabilização da gordura, ficando esta em torno de 50 %. Adapa et al. (2000) verificaram que sorvetes contendo maior concentração de gordura (12 %) apresentaram maior porcentagem de desestabilização em relação às amostras apresentando 8 e 4 % de gordura.

3.4. Comportamento de derretimento

A Figura 3.1 apresenta a porcentagem das amostras de sorvetes derretidas a 25 °C em função do tempo. Observou-se que a TG conferiu maior estabilidade às amostras,

proporcionando maior resistência ao derretimento em relação aos sorvetes controle (sem adição de TG), apresentando a maior diferença entre as amostras S4 e S4-TG. Isto demonstrou que a polimerização das proteínas lácteas pela ação da TG pode auxiliar na estabilidade dos sorvetes, principalmente quando a gordura é reduzida na formulação, mostrando ser uma boa substituta da gordura nestes produtos.

Os sorvetes com maiores concentrações de gordura apresentaram maior resistência ao derretimento (Figura 3.1) (KOXHOLT; EISENMANN; HINRICHS, 2001; ALAMPRESE et al., 2002; SEGALL; GOFF, 2002; GRANGER et al., 2006; KARACA et al., 2009). A amostra S8-TG apresentou maior resistência seguida pela amostra S8 e S6-TG. A amostra de sorvete com a menor concentração de gordura e sem ser submetida à TG (S4) foi a que derreteu mais rapidamente. Este resultado está de acordo com a análise de desestabilização da gordura, pois a amostra que apresentou maior desestabilização (S8-TG) foi aquela que obteve a menor porcentagem de sorvete derretido ao longo do tempo. Segundo Cruz et al. (2009), o tempo de derretimento do sorvete está relacionado com sua estabilidade após a incorporação de ar e indica a extensão da estabilização e da coalescência parcial da gordura. Além disso, o aumento de gordura coalescida proporciona maior resistência ao fluxo da fase líquida acarretando no seu derretimento mais lento (MUSE; HARTEL, 2004).

Em temperatura ambiente, observa-se no sorvete o seu derretimento e o colapso da estrutura da espuma estabilizada pela gordura (NAZARUDDIN; SYALISA; ROSNANI, 2008). O derretimento envolve tanto o aquecimento quanto o fenômeno de transferência de massa. O aquecimento gradual ocorre da região externa para o interior do sorvete causando o derretimento dos cristais de gelo. A fase líquida produzida é difundida juntamente com a fase contínua descongelada (mais viscosa) e começa a fluir, devido à gravidade, por meio da estrutura complexa da espuma do sorvete (MUSE; HARTEL, 2004; SOUKOULIS; CHANDRINOS; TZIA, 2008). A TG, devido sua capacidade de polimerizar as proteínas lácteas formando uma rede proteica mais coesa, possui a habilidade de estabilizar os glóbulos de gordura afetando significativamente o comportamento de derretimento dos sorvetes. A Figura 3.2 ilustra o derretimento das amostras de sorvetes no momento inicial (0 minutos), após 30 e 60 minutos.

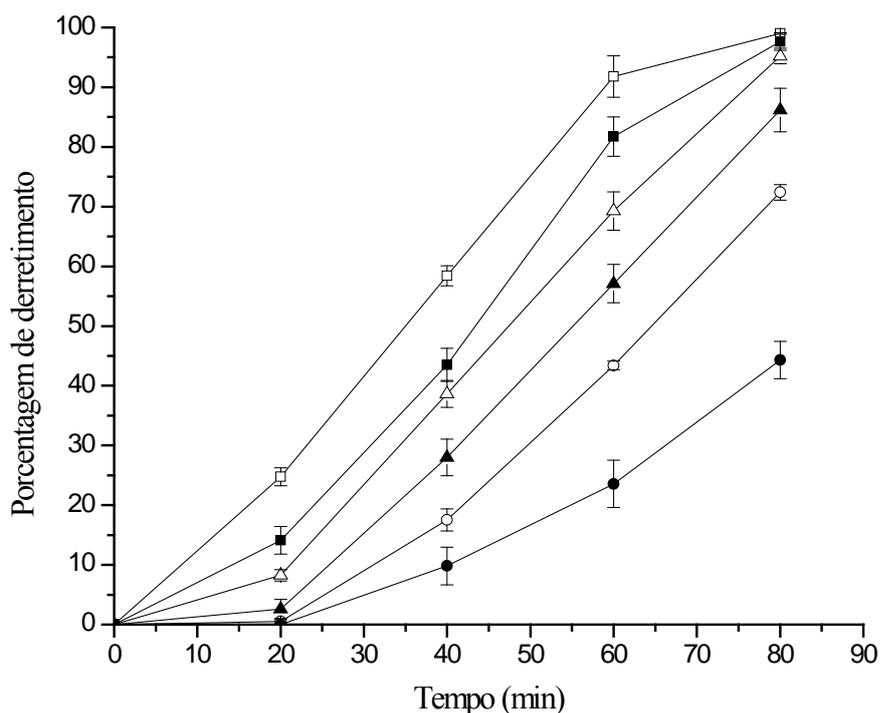


Figura 3.1. Comportamento de derretimento das diferentes formulações de sorvetes.

* (□) sorvete com 4 % de gordura (S4); (■) sorvete com 4 % de gordura com TG (S4-TG); (Δ) sorvete com 6 % de gordura (S6); (▲) sorvete com 6 % de gordura com TG (S6-TG); (○) sorvete com 8 % de gordura (S8); (●) sorvete com 8 % de gordura com TG (S8-TG).

Vários trabalhos têm demonstrado que as propriedades de derretimento dos sorvetes representam um parâmetro crítico de desempenho do produto, sendo afetadas por vários fatores e ingredientes (INNOCENTE; COMPARIN; CORRADINI, 2002; MUSE; HARTEL, 2004). Goh, Ye e Dele (2006) relataram que a adição de óleo de linhaça em concentrações de 6, 9 e 12 % aumentou consideravelmente a porcentagem de derretimento dos sorvetes, quando comparado com amostra com concentração inferior a 4 %. Em estudo realizado por El Nagar et al. (2002), foi observado que o aumento da concentração de inulina em sorvetes com iogurte reduziu significativamente a porcentagem de derretimento. Contudo, Akalm, Karagözlü e Ünal (2008) observaram os sorvetes apresentando diminuição de gordura contendo inulina derreteram mais rapidamente em relação ao sorvete regular, entretanto, quando foi utilizada proteína isolada de soja o resultado foi o inverso. Li et al. (1997) relataram que sorvetes com alto teor de sólidos totais do leite (39 %) derreteram mais rapidamente do que aqueles com baixo conteúdo de sólidos totais.

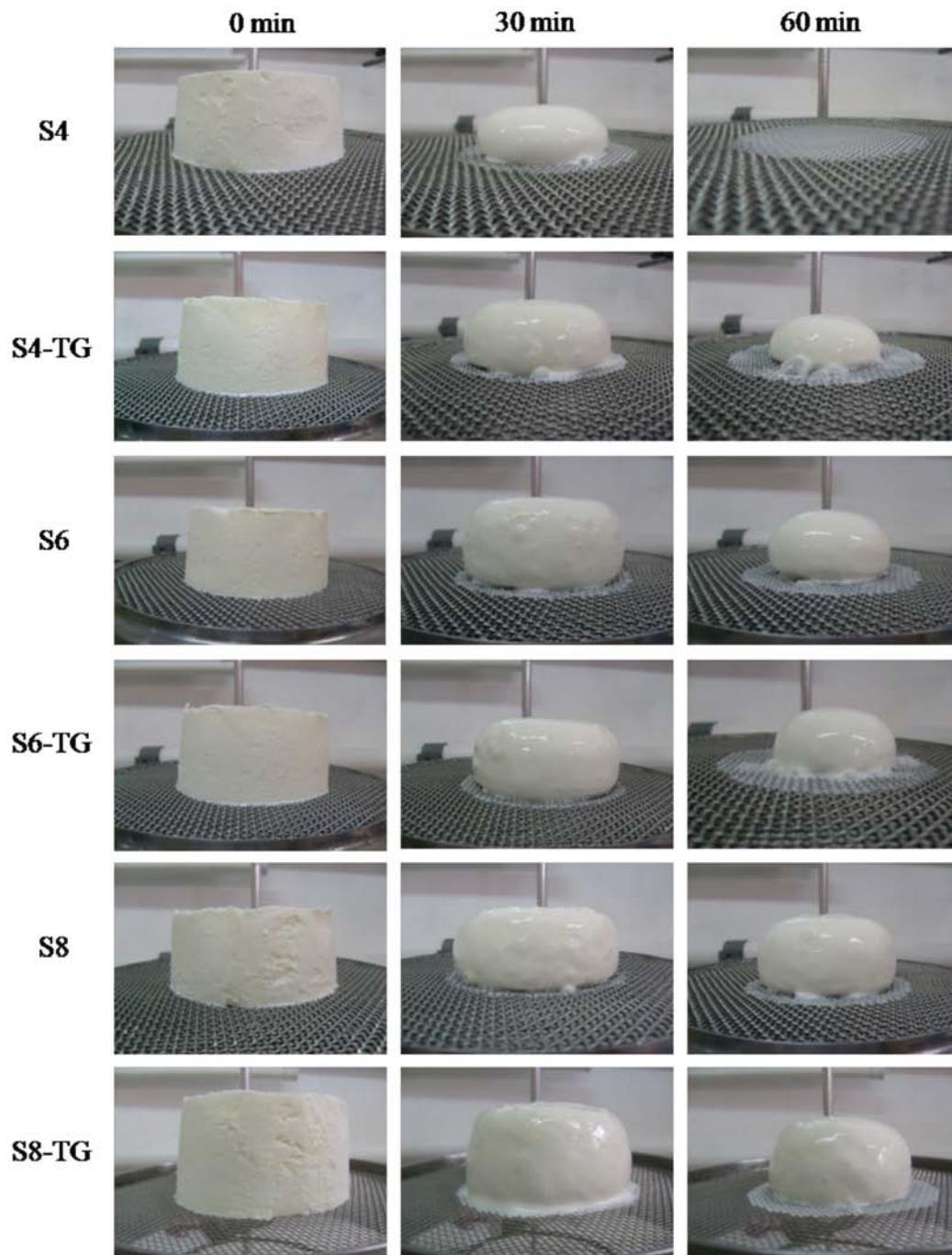


Figura 3.2. Ilustração do comportamento de derretimento após 0, 30 e 60 minutos de exposição das amostras de sorvete a temperatura ambiente (25 °C).

*sorvete com 4 % de gordura sem TG (S4) e com TG (S4-TG); sorvete com 6 % de gordura sem TG (S6) e com TG (S6-TG) sorvete com 8 % de gordura sem TG (S8) e com TG (S8-TG).

3.5. Perfil reológico

Na Tabela 3.3, encontram-se os dados da viscosidade aparente, índice de consistência e índice de comportamento de fluxo das amostras de sorvetes elaborados com diferentes teores de gordura e submetidos ao tratamento com TG. Estes parâmetros foram obtidos através o modelo reológico Lei de Potência das curvas ascendentes (aumento da taxa de deformação) e descendentes (diminuição da taxa de deformação), pois apresentou os maiores coeficientes de determinação ($R^2 > 0,99$).

A viscosidade é um parâmetro muito importante para os sorvetes, uma vez que proporciona corpo e textura desejável a esses produtos (INNOCENTE; COMPARIN; CORRADINI, 2002; PARK et al., 2006; OZDEMIR et al., 2008), sendo influenciada principalmente pela gordura e pela estrutura das proteínas (LIM et al., 2008). Observou-se que a viscosidade aparente, obtida tanto na curva ascendente quanto na curva descendente, avaliada sob taxa de deformação constante de 20 s^{-1} a 4 °C , foi influenciada pelo tratamento enzimático com TG e pelo conteúdo de gordura (Tabela 3.3, Figura 3.3).

Todas as amostras com TG apresentaram valores de viscosidade aparente significativamente maiores em comparação às suas amostras controles (sem TG), devido, provavelmente, da capacidade da TG em formar polímeros de alto peso molecular a partir de monômeros de proteínas conferindo maior resistência ao fluxo. Dentre as amostras, a S4-TG foi a que apresentou a maior viscosidade aparente (187,20 mPa s), seguida pelas amostras S6-TG (172,87 mPa s) e S8-TG (167,70 mPa s) (Tabela 3.3). Estes resultados demonstram que a utilização da TG pode ser um método efetivo quando se deseja aumentar a viscosidade em sorvetes com teores menores de gordura.

Tabela 3.3. Parâmetros reológicos das curvas ascendentes (aumento da taxa de deformação) e descendentes (diminuição da taxa de deformação) obtidos pelo modelo Lei de Potência das amostras de sorvetes.

Amostras	Viscosidade aparente (mPa s)	K (Pa s ⁿ)	n	R ²
Curva ascendente				
S4	122,00 ^a ± 2,09	0,28 ^a ± 0,02	0,64 ^a ± 0,01	0,9976
S4-TG	187,20 ^b ± 1,65	0,71 ^b ± 0,01	0,57 ^b ± 0,01	0,9924
S6	158,93 ^c ± 0,98	0,48 ^c ± 0,01	0,60 ^c ± 0,00	0,9989
S6-TG	172,87 ^d ± 1,01	0,67 ^d ± 0,02	0,55 ^d ± 0,02	0,9954
S8	161,20 ^e ± 1,23	0,52 ^e ± 0,03	0,63 ^a ± 0,02	0,9995
S8-TG	167,60 ^f ± 0,76	0,57 ^f ± 0,03	0,56 ^{bd} ± 0,01	0,9998
Curva descendente				
S4	69,60 ^a ± 1,76	0,08 ^a ± 0,01	0,92 ^a ± 0,02	0,9996
S4-TG	121,20 ^b ± 2,01	0,15 ^b ± 0,02	0,97 ^b ± 0,01	0,9990
S6	79,22 ^c ± 1,02	0,03 ^c ± 0,02	0,95 ^a ± 0,03	0,9997
S6-TG	107,60 ^d ± 1,33	0,10 ^a ± 0,01	0,98 ^b ± 0,03	0,9984
S8	91,87 ^e ± 2,11	0,11 ^{ab} ± 0,01	0,93 ^a ± 0,01	0,9989
S8-TG	100,27 ^f ± 0,89	0,12 ^{ab} ± 0,01	0,92 ^a ± 0,02	0,9993

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em triplicata seguidos pelo desvio padrão.

**Valores não distribuídos com mesma letra (coluna) são significativamente diferentes (p<0,05) (Teste de Tukey).

***K = índice de consistência (Pa sⁿ); n = índice de comportamento de fluxo; sorvete com 4 % de gordura sem TG (S4) e com TG (S4-TG); sorvete com 6 % de gordura sem TG (S6) e com TG (S6-TG); sorvete com 8 % de gordura sem TG (S8) e com TG (S8-TG).

Analisando as amostras sem o tratamento enzimático, verificou-se que quanto maior o teor de gordura, maior foi a viscosidade aparente (Tabela 3.3). Resultado similar também foi encontrado por Goff, Davidson e Cappi (1994) e Yilsay, Yilmaz e Bayizit (2006). Este resultado pode ser explicado devido ao grau de cristalização da gordura produzida durante o processo de maturação do sorvete. Quanto maior o conteúdo de gordura maior é a concentração de gordura cristalina. Estes cristais comportam-se como esferas mais rígidas proporcionando maior resistência à tensão de cisalhamento, conseqüentemente, aumentando a viscosidade dos sorvetes (GOH; YE; DALE, 2006).

Todas as amostras exibiram comportamento não-newtoniano, devido à diminuição da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento (RAO, 1999; BRAUN; ROSEN, 2000) (Figura 3.3). Esta diminuição ocorreu, parcialmente, devido à agregação dos glóbulos de gordura que durante o cisalhamento diminuem de tamanho e consequentemente a viscosidade dos sorvetes (NAZARUDDIN; SYALIZA; ROSNANI, 2008).

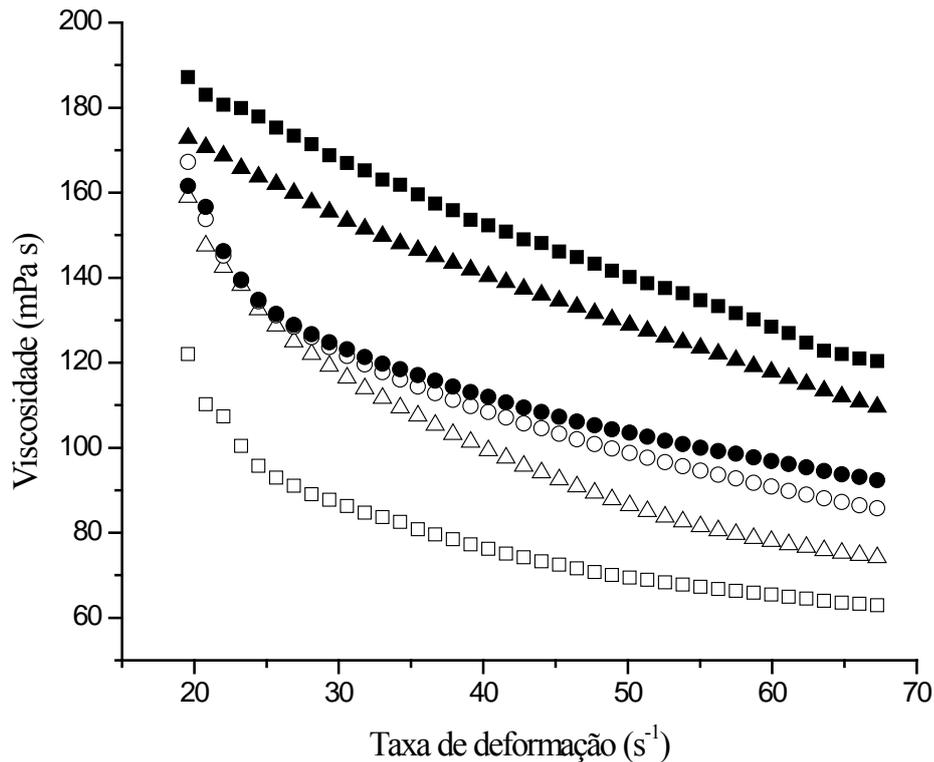


Figura 3.3. Efeito da taxa de deformação na viscosidade aparente das amostras de sorvetes.

*As curvas representam os valores médios obtidos em triplicata.

**(\square) sorvete com 4 % de gordura (S4); (\blacksquare) sorvete com 4 % de gordura com TG (S4-TG); (Δ) sorvete com 6 % de gordura (S6); (\blacktriangle) sorvete com 6 % de gordura com TG (S6-TG); (\circ) sorvete com 8 % de gordura (S8); (\bullet) sorvete com 8 % de gordura com TG (S8-TG).

O modelo Lei de Potência ajustou-se adequadamente aos dados ($R^2 > 0,99$) e foi utilizado para calcular o índice de comportamento de fluxo (n) e o índice de consistência (K) das diferentes amostras de sorvetes. O índice de consistência, baseado na variação da taxa de deformação, também informa a viscosidade de um fluido (KARACA et al., 2009). Do mesmo modo que a viscosidade aparente, a TG também aumentou o índice de consistência, principalmente na amostra com menor concentração de gordura (S4-TG) (Tabela 3.3), como resultado da agregação das proteínas e da maior polimerização proteica catalisada pela TG,

não alterando as características físico-químicas dos sorvetes (Tabela 3.1) (GAUCHE et al., 2009).

Outro parâmetro obtido pelo modelo Lei de Potência foi o índice de comportamento de fluxo que indica o grau da característica pseudoplástica ou dilatante de um fluido (AKALN; KARAGÖZLÜ; ÜNAL, 2008). Os índices de comportamento de fluxo (n) variaram de 0,55 a 0,64 ($n < 1$), indicando que os sorvetes comportaram-se como fluidos não Newtonianos pseudoplásticos (Tabela 3.3). Segundo Aime et al. (2001), Gonzáles-Tomás et al. (2008) e Soukoulis, Chandrinos e Tzia (2008), as propriedades reológicas dos sorvetes são geralmente descritas como pseudoplásticas. No caso dos sorvetes submetidos ao tratamento enzimático, houve um aumento das propriedades pseudoplásticas com o afastamento do índice de comportamento de fluxo do valor um. Este comportamento também foi evidenciado por Gauche et al. (2008) na polimerização das proteínas do soro de leite pela ação da TG. O favorecimento do comportamento pseudoplástico ocorreu, provavelmente, devido aos polímeros de alta massa molar formados pela reação de ligação cruzada promovida pela TG. Goff, Davidson e Cappi (1994) e Innocente, Camparin e Corradini (2002) afirmam que grandes polímeros, com o aumento da taxa de cisalhamento, tendem a se desintegrarem e possivelmente alinham-se ao fluxo oferecendo menor resistência a este.

O comportamento reológico das amostras após a diminuição da taxa de deformação (curvas descendentes) pode ser observado na Tabela 3.3. Utilizando o modelo de Lei de Potência, foi observado que o K variou de 0,08 a 0,15 Pa s⁻¹, valores estes menores do que os obtidos na curva ascendente. A amostra S4-TG apresentou o maior K , enquanto que a amostra S6 obteve os menores valores. Todas as amostras submetidas à TG proporcionaram valores maiores de K em relação às amostras sem TG, demonstrando que a TG confere maior resistência para os sorvetes perante a quebra estrutural. Além disso, os valores de índice de comportamento de fluxo (n) foram maiores do que da curva ascendente, mostrando que houve uma diminuição da pseudoplasticidade quando diminuída a taxa de cisalhamento. A diminuição de K e o aumento de n podem ser atribuídos à quebra estrutural de rede proteica dos sorvetes devido ao cisalhamento, o que favorecem este comportamento.

Uma característica importante da relação tensão de cisalhamento / taxa de deformação obtida pelo aumento da taxa de cisalhamento e sua consequente diminuição é a formação da histerese (RAZAVI; KARAZHIYAN, 2009). A área formada entre as curvas indica que o fluido apresenta viscosidade dependente do tempo de cisalhamento (TÁRREGA; DURÁN; COSTELL, 2004). A Tabela 3.4 apresenta os valores de histerese encontrados para as

amostras de sorvetes, obtidos através da curva de tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação. Pode-se observar que a adição da TG promoveu um aumento do grau de histerese em relação às amostras controles (sem TG). Entretanto, não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras S4-TG e S6-TG que apresentaram a maior histerese. Isto demonstra que estas duas amostras necessitaram de maior energia para quebrar a estrutura do sorvete formada a partir da polimerização proteica pela TG, que proporcionou uma estrutura mais firme ao produto. Essas amostras, S4-TG e S6-TG, foram as mesmas que apresentaram os maiores valores de viscosidade aparente e índice de consistência. Segundo Tárrega, Durán e Costell (2004) e Kuş, Altan e Kaya (2005), um fluido tixotrópico de maior viscosidade deve apresentar uma maior área de histerese que um fluido com menor viscosidade, mesmo que este último sofra uma forte destruição da estrutura. A presença de histerese em amostras de sorvetes também foi observada por Kuş, Altan e Kaya (2005), Bazmi et al. (2008), Gonzáles-Tomás et al. (2008) e Karaca et al. (2009).

Tabela 3.4. Histerese (tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação) das amostras de sorvetes submetidas ao tratamento enzimático com transglutaminase e com diferentes teores de gordura.

Amostras	Histerese (Pa)
S4	20,50 ^a ± 1,02
S4-TG	59,31 ^b ± 0,87
S6	39,58 ^c ± 1,43
S6-TG	59,49 ^b ± 1,56
S8	32,34 ^d ± 1,55
S8-TG	38,90 ^c ± 0,69

*Média dos valores obtidos em triplicata.

**Valores não distribuídos com mesma letra (coluna) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Teste de Tukey).

***Sorvete com 4 % de gordura sem TG (S4) e com TG (S4-TG); sorvete com 6 % de gordura sem TG (S6) e com TG (S6-TG) sorvete com 8 % de gordura sem TG (S8) e com TG (S8-TG).

A Figura 3.4 ilustra a histerese das amostras S4 e S4-TG que apresentaram o menor e o maior valor de histerese, respectivamente. O efeito da polimerização proteica catalisada pela TG na formação do sorvete pode ser visualizado pela quebra estrutural mais acentuada na amostra tratada enzimaticamente, assim como pela maior viscosidade aparente obtida tanto no início quanto no final do ciclo de cisalhamento.

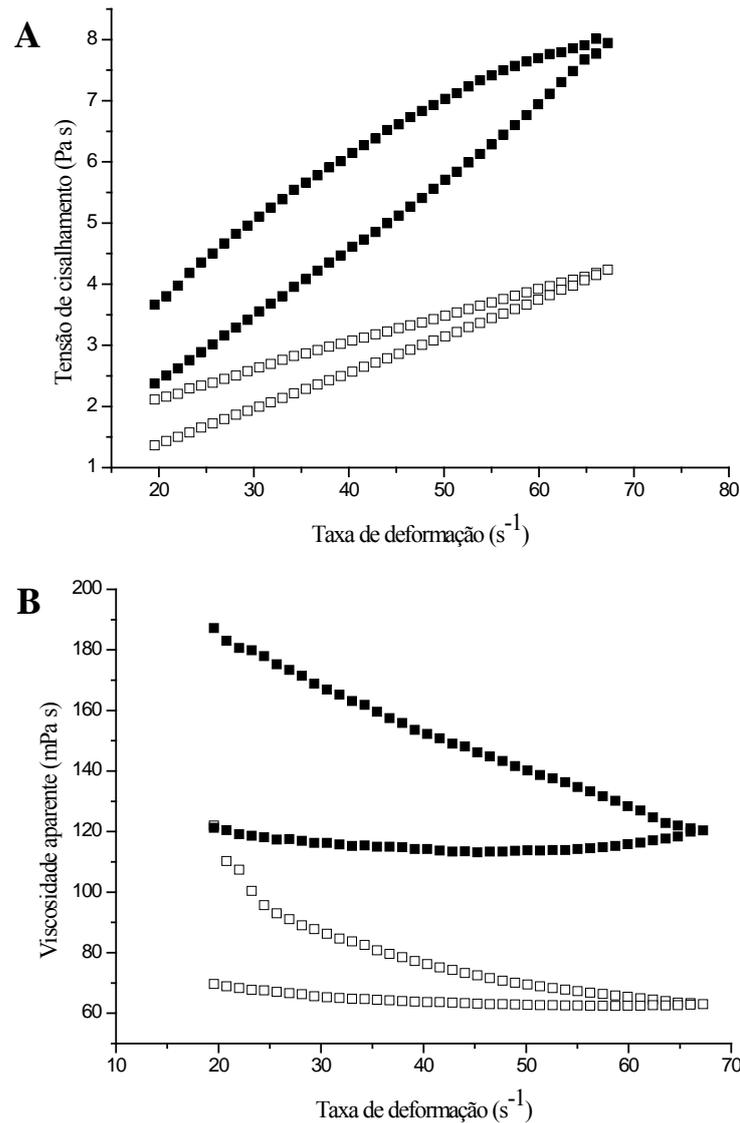


Figura 3.4. Curvas de histerese para as amostras de sorvetes. A – viscosidade aparente *versus* taxa de deformação; B - tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação.

(□) sorvete com 4 % de gordura (S4); (■) sorvete com 4 % de gordura com TG (S4-TG).

Os dados reológicos tempo-dependentes foram ajustados através do Modelo de Weltman (1943), com o objetivo de caracterizar o comportamento tixotrópico das amostras de sorvetes. Observou-se que a adição da TG proporcionou um aumento significativo da tensão inicial requerida (A) para iniciar a quebra estrutural das amostras de sorvetes (Tabela 3.5), devido à formação de uma rede mais estável. Resultado similar foi encontrado em amostras de iogurte (GAUCHE et al., 2009) e em queijos processados (SÁ; BORDIGNON-LUIZ, 2010), ambos adicionados de TG. A amostra S4-TG (5,55 Pa) foi a que apresentou a maior tensão inicial, seguida pelas amostras S6-TG (4,33 Pa) e S8-TG (4,41 Pa), que não apresentaram

diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si. Em relação ao coeficiente de ruptura tixotrópico (B), este foi menor nas amostras submetidas ao tratamento enzimático com TG em relação às amostras controle (sem TG). Ao avaliar as amostras sem TG (S4, S6 e S8) e com TG (S4-TG, S6-TG e S8-TG) separadamente, observou-se que o coeficiente B apresentou valores maiores nas amostras com concentrações maiores de gordura, não havendo diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras S6 e S8 e entre as amostras S4-TG e S6-TG.

Tabela 3.5. Parâmetros tixotrópicos obtidos através do Modelo de Weltman para as amostras de sorvetes.

Amostras	Tensão inicial requerida (A, Pa)	Coefficiente de ruptura tixotrópico (- B, Pa)	Coefficiente de determinação (R^2)
S4	3,81 ^a ± 0,22	1,05 ^a ± 0,05	0,95
S4-TG	5,55 ^b ± 0,41	1,90 ^b ± 0,11	0,99
S6	2,56 ^c ± 0,09	0,52 ^c ± 0,01	0,98
S6-TG	4,33 ^a ± 0,03	1,62 ^b ± 0,04	0,99
S8	3,21 ^a ± 0,28	0,63 ^c ± 0,21	0,99
S8-TG	4,41 ^{ac} ± 0,13	1,16 ^a ± 0,03	0,97

*Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em triplicata seguidos pelo desvio padrão.

**Valores não distribuídos com mesma letra (coluna) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (teste de Tukey).

***Sorvete com 4 % de gordura sem TG (S4) e com TG (S4-TG); sorvete com 6 % de gordura sem TG (S6) e com TG (S6-TG) sorvete com 8 % de gordura sem TG (S8) e com TG (S8-TG).

3.6. Análise de textura

A firmeza das amostras de sorvetes foi avaliada através do teste de penetração com auxílio de texturômetro. O gráfico de força máxima (g) requerida para penetrar o sorvete é mostrado na Figura 3.5. A utilização da TG na concentração de 4 U g⁻¹ de proteína contribuiu para a obtenção de um sorvete com menor firmeza em relação aos sorvetes controle (sem TG). Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras S4-TG, S8 e S8-TG, demonstrando que a TG pode proporcionar aos sorvetes com 4 % de gordura uma firmeza semelhante aos sorvetes contendo 8 % de gordura.

Tang, Wang e Yang (2007), Myllärinen, Buchert e Autio (2007), Trespalacios e Pla (2007), Wang et al. (2007) e Gauche et al. (2009) observaram que o tratamento enzimático com a TG proporcionou um aumento da firmeza em tofu, gel de caseinato de sódio

acidificado, gel de carne de frango, gel de soja e de iogurtes, respectivamente. O fortalecimento da rede proteica produz uma emulsão uniforme e estável e acarreta na diminuição da formação de cristais de gelo durante o armazenamento (EL NAGAR et al., 2002). Assim, como a TG conduz à formação de uma rede proteica mais coesa através da polimerização das proteínas lácteas presentes no sorvete, provavelmente diminuiu a cristalização do gelo, diminuindo a firmeza dos sorvetes.

O aumento da concentração de gordura também reduziu a firmeza dos sorvetes (Figura 3.5). Estes resultados estão consistentes com os observados nos estudos de Guinard et al. (1997), Alamprese et al. (2002), El Nagar et al. (2002) e Akalm, Karagözü e Ünal (2008), que verificaram que a firmeza foi inversamente proporcional ao conteúdo de gordura. Segundo Guinard et al. (1997), o aumento do teor de gordura proporciona a diminuição da formação de cristais de gelo, o que pode proporcionar menor firmeza nos sorvetes com concentração maior de gordura.

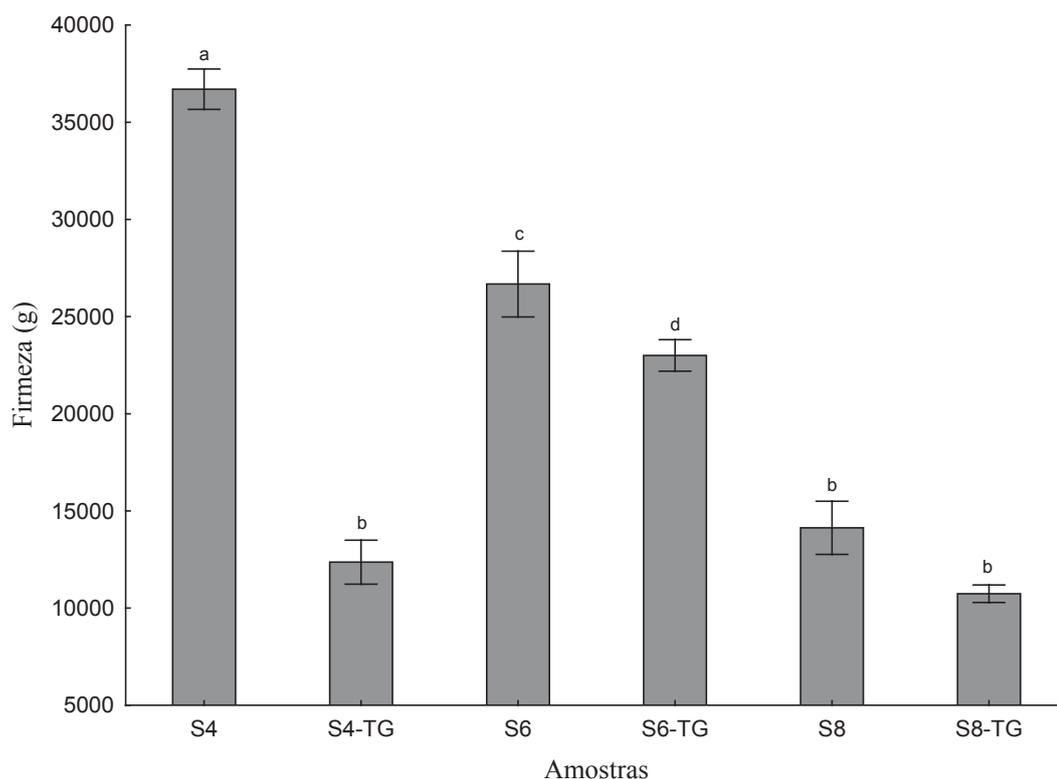


Figura 3.5. Firmeza dos sorvetes obtida através da análise de textura experimental expressos em força (g).

*Os valores correspondem às médias \pm desvio padrão.

**Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$) (teste de Tukey).

***Sorvete com 4 % de gordura sem TG (S4) e com TG (S4-TG); sorvete com 6 % de gordura sem TG (S6) e com TG (S6-TG) sorvete com 8 % de gordura sem TG (S8) e com TG (S8-TG).

3.7. Análise de cor

Os resultados das medidas colorimétricas das amostras de sorvetes contendo TG e diferentes concentrações de gordura estão presentes na Tabela 3.6. Todas as amostras com TG apresentaram valores maiores de *a* em relação às amostras sem TG. Não foi observada diferença significativa no parâmetro *b* nas amostras S4 e S4-TG e entre as amostras S6-TG e S8-TG. Observou-se também que as amostras com concentração de 8 e 6 % de gordura apresentaram valores maiores de *b* do que as amostras contendo 4 % de gordura, contudo, quando a TG foi adicionada observou-se uma diminuição deste parâmetro. Os valores positivos indicam uma tendência para a coloração amarela, sendo estes valores maiores nas amostras que apresentavam maior conteúdo de gordura. Resultado similar foi encontrado por Akalm, Karaözlü e Ünal (2008) em sorvetes com redução de gordura contendo proteína isolada de soja e inulina. As amostras com TG apresentaram maior valor de *L* em relação às amostras sem TG.

Tabela 3.6. Intensidade de cor das amostras de sorvete.

Amostras	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>
S4	-2,55 ^a ± 0,06	7,64 ^a ± 0,06	91,77 ^a ± 0,25
S4-TG	-1,85 ^b ± 0,09	7,70 ^a ± 0,20	95,79 ^b ± 0,24
S6	-2,50 ^a ± 0,11	11,55 ^b ± 0,16	90,17 ^c ± 0,30
S6-TG	-1,78 ^b ± 0,08	8,87 ^c ± 0,03	93,08 ^d ± 0,07
S8	-2,61 ^a ± 0,08	12,31 ^d ± 0,36	92,15 ^a ± 0,28
S8-TG	-1,84 ^b ± 0,06	9,10 ^c ± 0,02	95,00 ^b ± 0,24

*Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em triplicata seguidos pelo desvio padrão.

**Valores não distribuídos com mesma letra (coluna) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (teste de Tukey).

*** *a* = componente vermelho-verde; *b* = componente amarelo-azul; *L* = componente luminosidade; sorvete com 4 % de gordura sem TG (S4) e com TG (S4-TG); sorvete com 6 % de gordura sem TG (S6) e com TG (S6-TG) sorvete com 8 % de gordura sem TG (S8) e com TG (S8-TG).

3.8. Análise de componentes principais (ACP)

A análise de componentes principais (ACP) contribuiu para descrever a correlação entre os parâmetros: teor de gordura (GOR); porcentagem de ar incorporado no produto (IC);

coalescência parcial da gordura (CG); porcentagem de derretimento (PD) após 1 h de exposição do sorvete a temperatura de 25 °C; parâmetros reológicos como viscosidade aparente (VIS), índice de consistência (K), índice de comportamento de fluxo (n), histerese (HIS), tensão inicial requerida para iniciar a quebra estrutural das amostras de sorvetes (A) e coeficiente de ruptura tixotrópico (B); e firmeza (FIR) das amostras de sorvetes. A Figura 3.6 representa o gráfico do Fator 1 *versus* Fator 2. Observou-se que as amostras foram separadas por duas funções (Fator 1 e Fator 2) que explicaram 88,65 % da dispersão total dos dados, sendo que o primeiro Fator explicou 49,95 % e o segundo fator explicou 38,70 % da dispersão total (Figura 3.6). Pôde-se verificar que o Fator 1 explicou a maior variabilidade dos dados e foi possível separar as amostras de sorvetes com e sem a enzima TG. As amostras com TG (S4-TG, S6-TG e S8-TG) foram correlacionadas positivamente com o Fator 1 e as amostras sem TG (S4, S6 e S8) foram correlacionadas negativamente com este fator.

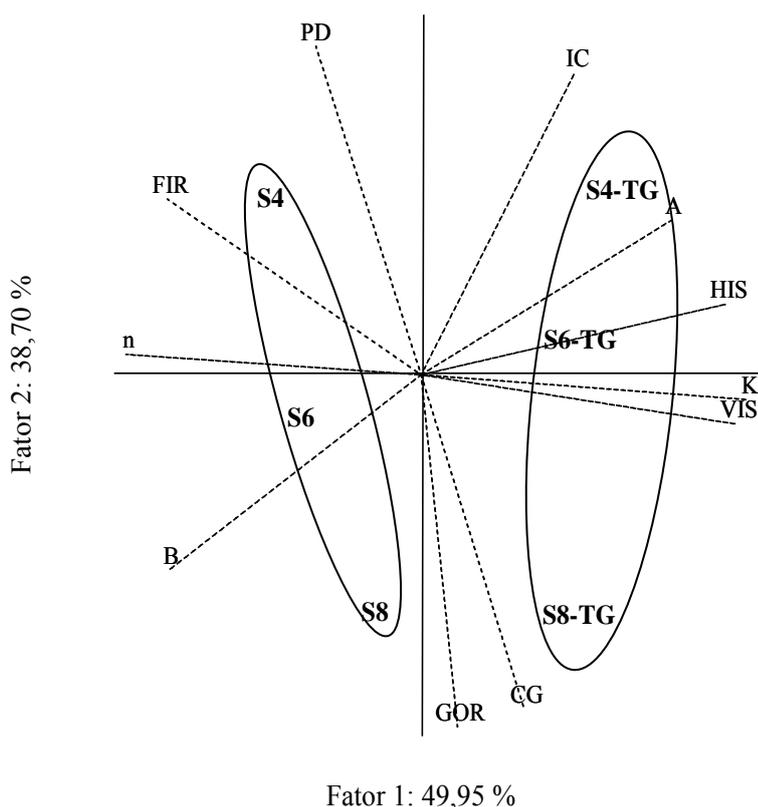


Figura 3.6. Análise de componentes principais obtidos das amostras de sorvetes.

Sorvete com 4 % de gordura sem TG (S4) e com TG (S4-TG); sorvete com 6 % de gordura sem TG (S6) e com TG (S6-TG) sorvete com 8 % de gordura sem TG (S8) e com TG (S8-TG).

Em relação às variáveis analisadas, os parâmetros reológicos: VIS ($R^2 = 0,94$), K ($R^2 = 0,97$), HIS ($R^2 = 0,91$) e A ($R^2 = 0,74$) apresentaram alta correlação positiva com o Fator 1,

enquanto que os parâmetros n ($R^2 = -0,88$), B ($R^2 = -0,75$) e FIR ($R^2 = -0,75$) teve correlação negativa com este fator. GOR ($R^2 = -0,99$) e a CG ($R^2 = -0,94$) apresentaram alta correlação negativa com o Fator 2, enquanto que a IC ($R^2 = 0,85$) e a PD ($R^2 = 0,93$) foi correlacionada positivamente com este fator (Figura 3.6).

A partir da Figura 3.6 pôde-se observar que a adição da TG à formulação contribuiu para maior viscosidade aparente (VIS) e índice de consistência (K), pois as amostras S4-TG, S6-TG e S8-TG (adicionadas de TG) apresentaram-se à esquerda do gráfico, em direção a estes parâmetros. Em relação à histerese, esta foi correlacionada positivamente com o parâmetro tixotrópico A . Segundo Tárrega, Duran e Costell (2004) e Gonzáles-Tomás et al. (2008) quanto maior histerese maior é a correlação com a tixotropia de um produto, ou seja, maior será a energia necessária para destruir a estrutura responsável pelo fluxo dependente do tempo de cisalhamento.

A amostra S4-TG apresentou alta correlação positiva com a IC . Isto demonstra que a substituição parcial da gordura pela TG aumentou a capacidade de incorporação de ar em amostras de sorvetes com teor reduzido de gordura através do fortalecimento da rede proteica.

A firmeza e a porcentagem de derretimento foram correlacionadas positivamente com a amostra S4, que apresentava o menor conteúdo de gordura sem ser submetida ao tratamento enzimático com TG. Além disso, foi correlacionada inversamente com a viscosidade aparente e o índice de comportamento de fluxo. Muse e Hartel (2004) observaram que a firmeza foi influenciada pelas propriedades reológicas dos sorvetes, sendo maior nos sorvetes que apresentaram valores maiores de índice de consistência, ou seja, mais viscosos. Contudo, em nosso trabalho as amostras de sorvete S4 e S6 que apresentaram o menor índice de consistência (Tabela 3.3) foram as que alcançaram a maior firmeza (Figura 3.6). Resultado similar foi encontrado por Akalm, Karagözlü e Ünal (2008).

O índice de comportamento de fluxo (n) teve correlação positiva com a firmeza das amostras. Muse e Hartel (2004) também observaram essa correlação em amostras de sorvetes apresentando três diferentes adoçantes (sacarose, frutose de xarope de milho com DE 42 e xarope de milho com DE 20) e dois diferentes níveis do emulsificante polisorbato 80. Este resultado demonstra que quanto mais firme um sorvete for, menor será a característica pseudoplástica do produto.

Em relação à porcentagem de derretimento, a amostra S4 foi correlacionada positivamente e a amostra S8-TG foi inversamente correlacionada com este parâmetro, demonstrando que a maior concentração de gordura à formulação bem como a presença da

enzima TG proporcionaram ao sorvete maior resistência ao derretimento. Além disso, a amostra S8-TG apresentou correlação positiva com o teor gordura e com a coalescência parcial da gordura, demonstrando que o aumento da concentração de gordura e da adição da TG nas amostras de sorvetes proporcionou um aumento da coalescência da gordura.

4. Conclusões

Sorvetes com 4, 6 e 8 % de gordura e submetidos ao tratamento enzimático com transglutaminase apresentaram maior capacidade de incorporação de ar, maior coalescência parcial da gordura, resistência ao derretimento e menor firmeza em relação às amostras sem a enzima. Em relação aos parâmetros reológicos, a TG mostrou favorecer as características pseudoplásticas dos sorvetes e proporcionou valores maiores de viscosidade aparente, índice de consistência, histerese e tensão inicial requerida para iniciar a quebra estrutural das amostras.

A transglutaminase proporcionou ao sorvete com 4 % de gordura características semelhantes ao sorvete contendo 8 %, demonstrando que a enzima pode ser utilizada na substituição parcial da gordura em sorvetes, sem afetar as propriedades funcionais desses produtos.

Conclusões Gerais

A metodologia de superfície de resposta permitiu avaliar as condições de maior atividade da enzima transglutaminase em sorvetes, verificando maior índice de consistência em concentração de 4 U g^{-1} e com 90 minutos de reação enzimática. A faixa de temperatura estudada (23,2 a 56,8 °C) não interferiu na atividade da transglutaminase. A reação foi confirmada com auxílio da eletroforese em gel de poliacrilamida e demonstrou que k-caseína foi mais susceptível ao ataque da TG em relação às demais caseínas e às proteínas do soro de leite.

A transglutaminase promoveu o aumento da capacidade de incorporação de ar, da coalescência da gordura, da resistência ao derretimento e diminuiu a firmeza das amostras de sorvetes com diferentes concentrações de gordura. Em relação aos parâmetros reológicos, mostrou favorecer as características pseudoplásticas dos sorvetes e proporcionou valores maiores de viscosidade aparente, índice de consistência, histerese e tensão inicial requerida para iniciar a quebra estrutural das amostras.

A transglutaminase proporcionou ao sorvete com 4 % de gordura características semelhantes ao sorvete contendo 8 %, demonstrando que a enzima pode ser utilizada na substituição parcial da gordura em sorvetes, sem afetar as propriedades funcionais desses produtos.

Referências

ABIS. **Associação Brasileira das Indústrias de Sorvetes**. Disponível em: <<http://www.abis.com.br/>>. Acesso em: 07 abril 2010.

ABDULLAH, A.Z.; SALAMATINIA, B.; KAMARUDDIN, A.H. Application of response surface methodology for the optimization of NaOH treatment on oil palm frond towards improvement in the sorption of heavy metals. **Desalination**, v. 244, n. 1-3, p. 227–238, 2009.

ABU-JDAYIL, B. Modelling the time-dependent rheological behavior of semisolid foodstuffs. **Journal of Food Engineering**, v. 57, n. 1, p. 97-102, 2003.

ADAPA, S.; DINGELDEIN, H.; SCHMIDT, K.A.; HERALD, T.J. Rheological properties of ice cream mixes and frozen ice creams containing fat and fat replacers. **Journal Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2224–2229, 2000.

AICHINGER, P.A.; MICHEL, M.; SERVAIS, C.; DILLMAN, M.L.; ROUVET, M.; D'AMICO, N.; ZINK, R.; KLOSTERMEYER, H.; HORNE, D.S. Fermentation of a skim milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chimosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, p. 243-255, 2003.

AIME, D.B.; ARNTFIELD, S.D.; MALCOLMSON, L.J.; RYLAND, D. Textural analysis of fat reduced vanilla ice cream products. **Food Research International**, v. 34, n. 2-3, p. 237-246, 2001.

AKALM, A.S.; KARAGÖZLÜ, C.; ÜNAL, G. Rheological properties of reduced-fat and low-fat ice cream containing whey protein isolate and inulin. **European Food Research Technology**, v. 227, n. 3, p. 889–895, 2008.

AKHTAR, M.; BLAKEMORE, I.; CLAYTON, G.; KNAPPER, S. The use of spinning disc reactor for processing ice cream base – effect of ageing in making model ice cream. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 1139-1145, 2009.

AKTAŞ, N.; KILIÇ, B. Effect of microbial transglutaminase on thermal and electrophoretic properties of ground beef. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 8, p. 815–819, 2005.

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SAVANI, L. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 201–208, 2002.

ALDAZABAL, J.; MARTÍN-MEIZOSO, A.; MARTÍNEZ-ESNAOLA, J.M.; FARR, R. Deterministic model for ice cream solidification. **Computational Materials Science**, v. 38, n. 1, p. 9-21, 2006.

ALVES, M.M.M. A Reologia. In: de Castro, A.G. **A química e a reologia no processamento dos alimentos**. Lisboa: Instituto Piaget, 2003. p. 37-61.

ANDERSON, P.J.; BROOKS, C.L.; BERLINER, L.J. Functional identification of calcium binding residues in bovine α -lactalbumin. **Biochemistry**, v. 36, p. 11648-11654, 1997.

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; YANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2613-2617, 1989.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. Mayland: AOAC International, 2005.

ARBUCKLE, W.S. **Ice cream**. 4. ed. Westport: The Avi Publishing Company, 1986. 483p.

AYKAN, V.A.; SEZGIN, E.; GUZEL-SEYDIM, B. Use of fat replacers in the production of reduced-calorie vanilla ice cream. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2008, v. 110, n. 6, p. 516–520, 2008.

BABIKER, E.E. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. **Food Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 139-145, 2000.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.E.; WALTERS, K. F. R. S. **An Introduction to Rheology**. The Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V., 1993. 199p.

BAZMI, A.; LAUNAY, B.; CUVELIER, G.; RELKIN, P. Impact of crystalline milk fat on rheological properties of ice cream mix emulsions during aging time at 4 °C. **Journal of Texture Studies**, v. 39, n. 4, p. 309-325, 2008.

BENJAMINS, J.; VINGERHOEDS, M.H.; ZOET, F.D.; HOOG, E.H.A.; van AKEN, G.A. Partial coalescence as a tool to control sensory perception of emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 102–115, 2009.

BOLLIGER, S.; KORNBURST, B.; GOFF, H.D.; THARP, B.W.; WINDHAB, E.J. Influence of emulsifiers on ice cream produced by conventional freezing and low-temperature extrusion processing. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 7, p. 497-504, 2000.

BÖNISCH, M.P.; HUSS, M.; WEITL, K.; KULOZIK, U. Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1360–1371, 2007.

BÖNISCH, M.P.; HEIDEBACH, T.C.; KULOZIK, U. Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 2, p. 288–297, 2008.

BOUGUYON, E.; BEAUVALLET, C.; HUET, J.C.; CHANAT, E. Disulphide bonds in casein micelle from milk. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 2, p. 450-458, 2006.

BOURNE, M. **Food Texture and Viscosity – concept and measurement**. 3. ed. London: Academic Press, 2002. 446p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 348, de 02 de dezembro de 2003. Aprova de forma complementar ao Anexo da Resolução CNNPA n° 24 de 1976, a utilização de enzimas na indústria de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 dez. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 205, de 14 de novembro de 2005. Aprova o "Regulamento Técnico sobre Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano". **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 nov. 2005a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 266, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 set. 2005b.

BRAUN, D.B.; ROSEN, M.R. **Rheology Modifiers Handbook: practical use and application**. New York: William Andrew Publishing, 2000. 505p.

CHANG, Y.W.; HARTEL, R.W. Development of air cells in a batch ice cream freezer. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 1, p. 71-78, 2002.

CHEFTEL, J.C. CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas Alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas**. Zaragoza: Acribia, 1989. 345p.

CHRISTENSEN, B.M.; SØRENSEN, E.S.; HØJRUP, P.; PETERSEN, T.E.; RASMUSSEN, L.K. Localization of potential transglutaminase cross-linking sites in bovine caseins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1943-1947, 1996.

CHRYSINA, E.D.; BREW, K.; ACHARYA, K.R. Crystal Structures of Apo- and Holo-bovine α -Lactalbumin at 2.2-Å Resolution Reveal an Effect of Calcium on Inter-lobe Interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 37021-37029, 2000.

CHUNG, S.J.; HEYMANN, H.; GRÜN, I.U. Release of artificial cherry flavor from ice creams varying in fat and fat replacers. **Journal of Sensory Studies**, v. 19, n. 3, p. 211-236, 2004.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1233-1239, 2009.

DEVEREUX, H.M.; JONES, G.P.; MCCORMACK, L.; HUNTER, W.C. Consumer acceptability of low fat foods containing inulin and oligofructose. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 5, p. 1850-1854, 2003.

DREWETT, M.E.; HARTEL, R.W. Ice crystallization in a scraped surface freezer. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n.3, p. 1060-1066, 2007.

ELHWEG, B.; BURNS, I.W.; CHEW, Y.M.J.; MARTIN, P.J.; RUSSELL, A.B.; WILSON, D.I. Viscous dissipation and apparent wall slip in capillary rheometry of ice cream. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 4, p. 266-272, 2009.

EL-NAGAR, G.; CLOWES, G.; TUDORICĂ, C.M.; KURI, V.; BRENNAN, C.S. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 2, 2002.

EISNER, M.D.; WILDMOSER, H.; WINDHAB, E.J. Air cell microstructuring in a high viscous ice cream matrix. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 263, n. 1-3, p. 390-399, 2005.

FAERGEMAND, M.; QVIST, K.B. Transglutaminase: effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 3, p. 287-292, 1997.

FARGEMAND, M.; MURRAY, B.S.; DICKINSON, E.; QVIST, Q.B. Cross-linking of adsorbed casein films with transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3-6, p. 343-346, 1999.

FALCONE, P.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; DEL DUCA, S. Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 142, p. 265-273, 1993.

FARNSWORTH, J.P.; LIA, J.; HENDRICKS, G.M.; GUO, M.R. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. **Small Ruminant Research**, v. 65, n. 1, p. 113-121, 2006.

FARRELL JR. H.M.; MALIN, E.L.; BROWN, E.M.; QI, P.X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 2-3, p. 135-147, 2006.

FDA - Food and Drug Administration. **Numerical Listing of GRAS Notices**. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?filter=transglutaminase&sortColumn=&rpt=grasListing>>. Acesso em: 25 março 2010.

FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 1069p.

FERNÁNDEZ, P.P.; OTERO, L.; MARTINO, M.M.; MOLINA-GARCÍA, A.D.; SANZ, P.D. High-pressure shift freezing: recrystallization during storage. **European Food Research Technology**, v. 227, n. 5, p. 1367-1377, 2008.

FOLK, J.E. Transglutaminases. **Annual Review Biochemistry**, v. 49, p. 517-31, 1980.

FOX, P.F. The major constituents of milk. In: **Dairy Processing: Improving Quality**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2003. 546p.

GABRIELE, D.; MIGLIORI, M.; DI SANZO, R.; ROSSI, C.O.; RUFFOLO, S.A.; CINDIO, B. Characterisation of dairy emulsions by NMR and rheological techniques. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 619-628, 2009.

GAUCHE, C.; VIEIRA, J.T.C.; OGLIARI, P.J.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 788-794, 2008.

GAUCHE, C.; TOMAZI, T.; BARRETO, P.L.M.; OGLIARI, P.J.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and Transglutaminase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 239-243, 2009.

GINGER, M.R.; GRIGOR, M.R. Comparative aspects of milk caseins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 124, n. 2, p. 133-145, 1999.

GOFF, H.D. Instability and partial coalescence in whippable dairy emulsions. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2620–2630, 1997a.

GOFF, H.D. Review colloidal aspects of ice cream - A review. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 6-7, p. 363-373, 1997b.

GOFF, H.D. Formation and stabilization of structure in ice-cream and related products. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 7, n. 5-6, p. 432–437, 2002.

GOFF, H.D. Ice cream. FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. In: **Advanced Dairy Chemistry**, vol. 2, 3. ed. New York: Springer Science / Business Media, 2006. p. 441-450.

GOFF, H.D.; DAVIDSON, V.J.; CAPPI, E. Viscosity of ice cream mix at pasteurization temperatures. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 8, p. 2207-2213, 1994.

GOFF, H.D.; JORDAN, K. Action of emulsifiers in promoting fat destabilization during the manufacture of ice cream. **Journal Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 18-29, 1989.

GOFF, H.D.; VERESPEJ, E.; SMITH, A.K. A study of fat and air structures in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 11, p. 817-829, 1999.

GOFF, H.D. 65 Years of ice cream science. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 754–758, 2008.

GOFF, H.D. **Dairy Science and Technology Education**, University of Guelph, Canadá. Disponível em: <<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/icstructure.html>>. Acesso em: 26 janeiro 2009.

GOH, K.K.T.; YE, A.; DALE, N. Characterisation of ice cream containing flaxseed oil. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 946-953, 2006.

GONZÁLEZ-TOMÁS, L.; BAYARRI, S.; TAYLOR, A.J.; COSTELL, E. Rheology, flavour release and perception of low-fat dairy desserts. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 8, p. 858–866, 2008.

GRANGER, C.; LEGERB, A.; BAREY, P.; LANGENDORFF, V.; CANCELL, M. Influence of formulation on the structural networks in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 3, p. 255–262, 2005.

GRANGER, C.; DA COSTA, J.P.; TOUTAIN, J.; BAREY, P.; CANCELL, M. Mapping of ice cream formulation using front-face fluorescence spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 5, p. 489–496, 2006.

GUINARD, J.X.; ZOUMAS-MORSE, C.; MORI, L.; UATONI, B.; PANYAM, D.; KILARA, A. Sugar and fat effects on sensory properties of ice cream. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 5, p. 1087-1094, 1997.

GRIFFIN, M.; CASADIO, R.; BERGAMINI, C.M. Transglutaminases: Nature's biological glues. **Biochemical Journal**, v. 368, p. 377-396, 2002.

HA, C.R.; IUCHI, I. Transglutaminase. In: WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2002. 1128p.

HEMUNG, B.O.; LI-CHAN, E.C.Y.; YONGSAWATDIGUL, J. Identification of glutaminyl sites on b-lactoglobulin for threadfin bream liver and microbial transglutaminase activity by MALDI-TOF mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 149-154, 2009.

HERRERA, M.L.; GATTI, M.L.; HARTEL, R.W. A kinetic analysis of crystallization of a milk fat model system. **Food Research International**, v. 32, n. 4, p. 289-298, 1999.

HILLER, B.; LORENZEN, P.C. Effect of phosphatase/transglutaminase treatment on molar mass distribution and techno-functional properties of sodium caseinate. **LWT -Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 87-92, 2009.

HINZ, K.; HUPPERTZ, T.; KULOZIK, U.; KELLY, A.L. Influence of enzymatic cross-linking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 4, p. 289-293, 2007.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.R.; YARMAND, M.S.; RAZAVIC, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 50-55, 2008.

HORNE, D.S. Casein micelle structure: Models and muddles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 2-3, p. 148-153, 2006.

HWANG, J.Y.; SHYU, Y.S.; HSU, C.K. Grape wine lees improves the rheological and adds antioxidant properties to ice cream. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 312-318, 2009.

IAMETTI, S.; DE GREGORI, B.; VECCHIO, G.; BONOMI, F. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, n. 1, p. 106-112, 1996.

INNOCENTE, N.; COMPARIN, D.; CORRADINE, C. Proteose-peptone whey fraction as emulsifier in ice-cream preparation. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 1, p. 69-74, 2002.

IONESCU, A.; APRODU, I.; DARABA, A.; PORNEALĂ, L. 2008 The effects of transglutaminase on the functional properties of the myofibrillar protein concentrate obtained from beef heart. **Meat Science**, v. 79, n. 2, p. 278–284, 2008.

JAROS, D.; PARTSCHEFELD, C.; HENLE, T.; ROHM, H. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. **Journal of Texture Studies**, v. 37, n. 2, p. 113–155, 2006.

JONG, G.A.H.; KOPPELMAN, S.J. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2798-2806, 2002.

KANAJI, T.; OZAKI, H.; TAKAO, T.; KAWAJIRI, H.; IDE, H.; MOTOKI, M.; SHIMONISHI, Y. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain s-8112". **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 16, p. 11565-11572, 1993.

KARACA, O.B.; GÜVEN, M.; YASAR, K.; KAYA, S.; KAHYAOGLU, T. The functional, rheological and sensory characteristics of ice creams with various fat replacers. **International Journal of Dairy Technology**, v 62, n. 1, p. 93-99, 2009.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited Review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 785-796, 2004.

KOXHOLT, M.M.R.; EISENMANN, B.; HINRICHS, J. Effect of the fat globule sizes on the meltdown of ice cream. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 5, p. 31-37, 2001.

KUŞ, S.; ALTAN, A.; KAYA, A. Rheological behavior and time-dependent characterization of ice cream mix with different salep content. **Journal of Texture Studies**, v. 36, n. 3, p. 273–288, 2005.

KÜTEMEYER, C.; FROECK, M.; WERLEIN, H.D.; WATKINSON, B.M. The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. **Food Control**, v. 16, n. 8, p. 735-737, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAL, S.N.D.; O'CONNOR, C.J.; EYRES, L. Application of emulsifiers/stabilizers in dairy products of high rheology. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 123-126, p. 433-437, 2006.

LEE, F.Y.; WHITE, C.H. Effect of ultrafiltration retentates and whey protein concentrates on ice cream quality during storage. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1170-1180, 1991.

LEWIS, M.J. **Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993. 494p.

LI, Z.; MARSHALL, R.; HEYMANN, H.; FERNANDO, L. Effect of milk fat content on flavor perception of vanilla ice cream. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 12, p. 3133-3141, 1997.

LILLEY, G.R.; SKILL, J.; GRIFFIN, M.; BONNER, P.L.R. Detection of Ca²⁺-dependent transglutaminase activity in root and leaf tissue of monocotyledonous and dicotyledonous plants. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1115-1123, 1998.

LIM, S.Y.; SWANSON, B.G.; ROSS, C.F.; CLARK, S. High hydrostatic pressure modification of whey protein concentrate for improved body and texture of lowfat ice cream. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1308-1316, 2008.

LORENZEN, P.C.; NEVE, H.; MAUTNER, A.; SCHLIMME, E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, 2002.

LORENZEN, P.C. Effects of varying time/temperature-conditions of pre-heating and enzymatic cross-linking on techno-functional properties of reconstituted dairy ingredients. **Food Research International**, v. 40, n. 6, p. 700-708, 2007.

LUCAS, T.; RAY, D.; BAREY, P.; MARIETTE, F. NMR assessment of ice cream: Effect of formulation on liquid and solid fat. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1225–1233, 2005.

MARCOA, C.; ROSELL, C.M. Effect of different protein isolates and transglutaminase on rice flour properties. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 132-139, 2008.

MARSHALL, R.T.; GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. **Ice cream**. 6. ed. New York: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 375.

MEZA, B.E.; VERDINI, R.A.; RUBIOLO, A.C. Viscoelastic behavior of heat-treated whey protein concentrate suspensions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 661–666, 2009.

METWALLY, A.M.M.E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on properties of ice cream with different composition. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, n. 8, p. 939-947, 2007.

MYLLÄRINEN, P.; BUCHERT, J.; AUTIO, K. Effect of transglutaminase on rheological properties and microstructure of chemically acidified sodium caseinate gels. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 800–807, 2007.

MONOGIOUDI, E.; CREUSOT, N.; KRUIIS, K.; GRUPPEN, H.; BUCHERT, J.; MATTINEN, M.L. Cross-linking of β -casein by *Trichoderma reesei* tyrosinase and *Streptoverticillium mobaraense* transglutaminase followed by SEC–MALLS. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 2008-2015, 2009.

MOON, J.H.; HONG, Y.H.; HUPPERTZ, T.; FOX, P.F. KELLY, A.L. Properties of casein micelles cross-linked by transglutaminase. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 1, p. 27-32, 2008.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 204-210, 1998.

MOTOKI, M.; KUMAZAWA, Y. Recent research trends in transglutaminase technology for food processing. **Food Science and Technology Research**, v. 6, n. 3, p. 151-160, 2000.

MOUNSEY, J.S.; O'KENNEDY, B.T.; KELLY, P.M. Influence of transglutaminase treatment on properties of micellar casein and products made therefrom. **Le Lait**, v. 85, n. 4-5-, p. 405-418, 2005.

MULLER, H.G. **Introducción a la reología de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1997. 174p.

MURRAY, B.S.; DICKINSON, E.; WANG, Y. Bubble stability in the presence of oil-in-water emulsion droplets: Influence of surface shear versus dilatational rheology. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 4, p. 1198-1208, 2009.

MUSE, M.R.; HARTEL, R.W. Ice cream structural elements that affect melting rate and hardness. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 1-10, 2004.

NAZARUDDIN, R.; SYALIZA, A.S.; ROSNANI, A.I.W. The effect of vegetable fat on the physicochemical characteristics of dates ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 3, p. 265-269, 2008.

NIEUWENHUIZEN, W. DEKKER, H.L.; DE KONING, L.J.; NEVELD, T.G.; DE KOSTER, C.G.; DE JONG, G.A.H. Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo α -lactalbumin with microbial transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7132-7139, 2003.

NIEUWENHUIZEN, W. F.; DEKKER, H.L.; GRÖNEVELD, T.; KOSTER, C.G.; DE JONG, G.A.H. Transglutaminase-mediated modification of glutamine and lysine residues in native bovine β -lactoglobulin. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 3, p. 248-258, 2004.

OZDEMIR, C.; DAGDEMIR, E.; OZDEMIR, S.; SAGDIC, O. The effects of using alternative sweeteners to sucrose on ice cream quality. **Journal of Food Quality**, v. 31, n. 4, p. 415–428, 2008.

OZER, B.; KIRMACI, H.A.; OZTEKIN, S.; HAYALOGLU, A.; ATAMER, M. Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 3, p. 199–207, 2007.

ÖZRENK, E. The use of transglutaminase in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 1, 2006.

PALANUWECH, J.; POTINENI, R.; ROBERTS, R.F.; COUPLAND, J.N. A method to determine free fat in emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 55-62, 2003.

PARK, S.H.; HONG, G.P.; KIM, J.Y.; CHOI, M.J.; MIM, S.G. The influence of food hydrocolloids on changes in the physical properties of ice cream. **Food Science and Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 721-727, 2006.

PARTANEN, R.; AUTIO, K.; MYLLÄRINEN, P.; LILLE, M.; BUCHERT, J.; FORSELL, P. Effect of transglutaminase on structure and syneresis of neutral and acidic sodium caseinate gels. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 4, p. 414–421, 2008.

PATEL, D. **Gel Electrophoresis - Essencial Data**. Editora Jonh Wiley e Sons, 1994. 137p.

PEREDA, J.A.O., *et al.* **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal**. v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.13-37.

PINTERITS, A.; ARNTFIELD, S.D. Improvement of canola protein gelation properties through enzymatic modification with transglutaminase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 128–138, 2008.

PRAKASH, O.; TALAT, M.; HASAN, S.H. Response surface design for the optimization of enzymatic detection of mercury in aqueous solution using immobilized urease from vegetable waste. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 4, p. 265–271, 2009.

RAO, M.A. **Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications**. Gaithersburg: An Aspen Publication, 1999. 433p.

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

RAZAVI, S.M.A.; KARAZHIYAN, H. Flow properties and thixotropy of selected hydrocolloids: experimental and modeling studies. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 908–912, 2009.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: A statistical approach. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 1, p. 26-32, 2006.

RORIZ, M.S.; OSMA, J.F.; TEIXEIRA, J.A.; COUTO, S.R. Application of response surface methodological approach to optimise Reactive Black 5 decolouration by crude laccase from *Trametes pubescens*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1-3, p. 691-696, 2009.

RUSSELL, A.B.; CHENEY, P.E.; WANTLING, S.D. Influence of freezing conditions on ice crystallization in ice cream. **Journal of Food Engineering**, v. 39, n. 2, p. 179-191, 1999.

SÁ, E.M.F.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. The effect of transglutaminase on the properties of milk gels and processed cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 1-9, 2010.

SEGALL, K.I.; GOFF, H.D. A modified ice cream processing routine that promotes fat destabilization in the absence of added emulsifier. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 12, p. 1013-1018, 2002.

SGARBIERI, V.C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, jan./mar., 2005.

SHARMA, R.; LORENZEN, P.C.; QVIST, K.B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 10, p. 785–793, 2001.

SHARMA, R.; ZAKORA, M.; QVIST, K.B. Characteristics of oil-water emulsions stabilized by an industrial α -lactalbumin concentrate, cross-linked before and after emulsification by a microbial transglutaminase. **Food Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 493-500, 2002.

SHI, Q.; JACKOWSKI, G. **One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis**. In: Hames, B.D. Gel Electrophoresis of Proteins. Oxford University Press, 1998. p. 1-52.

SHIMBA, N.; YOKOYAMA, K.; SUZUKI, E. NMR-based screening method for transglutaminases: rapid analysis of their substrate specificities and reaction rates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1330-1334, 2002.

SIEPAIO, M.P.; MEUNIER, J.-C.F. Diamine oxidase and transglutaminase activities in white lupine seedlings with respect to crosslinking of proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 1151-1156, 1995.

SMIDDY, M.A.; MARTIN, J.E.G.H.; KELLY, A.L.; de KRUIF, C.G.; HUPPERTZ, T. Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1906–1914, 2006.

SOFJAN, R.P.; HARTEL, R.W. Effects of overrun on structural and physical characteristics of ice cream. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 3, p. 255–262, 2004.

SOUKOULIS, C.; CHANDRINOS, I.; TZIA, C. Study of the functionality of selected hydrocolloids and their blends with k-carrageenan on storage quality of vanilla ice cream. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1816-1827, 2008.

SOUKOULIS, C.; LEBESI, D.; TZIA, C. Enrichment of ice cream with dietary fiber: effects on rheological properties, ice crystallization and glass transition phenomena. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 665-671, 2009.

SOZER, N. Rheological properties of rice pasta dough supplemented with proteins and gums. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 849–855, 2009.

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

TANG, C.H.; MA, C.Y. Modulation of the thermal stability of β -lactoglobulin by transglutaminase treatment. **European Food Research Technology**, v. 225, n. 5-6, p. 649-652, 2007.

TÁRREGA, A.; DURRÁN, L.; COSTELL, E. Flow behaviour of semi-solid dairy desserts. Effect of temperature. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 4, p. 345–353, 2004.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Colour and consistency of semi-solid dairy desserts: Instrumental and sensory measurements. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 2, p. 655-661, 2007.

TONG, P.S.; JORDAN, W.K.; HOUGHTON R, G. Response surface methodology to study fat destabilization and development of overrun in ice creams produced with polyunsaturated safflower oil and milk fat blends. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 4, p. 779-793, 1984.

TRESPALACIOS, P.; PLA, R. Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 264–272, 2007.

VASBINDER, A.J.; DE KRUIF, C.G. Casein–whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 8, p. 669-677, 2003.

VEGA, C.; GOFF, H.D. Phase separation in soft-serve ice cream mixes: rheology and microstructure. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 3, p. 249-254, 2005.

WALKER, J.M. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: **The Protein Protocols Handbook**. 2 ed. New Jersey: Humana Press, 2002. p. 61-67.

WANG, J.S.; ZHAO, M.M.; YANG, X.Q.; JIANG, Y.M.; CHUN, C. Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 2, p. 174–179, 2007.

WELTMANN, R.N. Breakdown of Thixotropic Structure as Function of Time. **Journal of Applied Physics**, v. 14, 1943.

WHELAN, A.P.; VEGA, V.; KERRY, J.P.; GOFF, H.D. Physicochemical and sensory optimisation of a low glycemic index ice cream formulation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1520–1527, 2008.

WILCOX, C.P.; SWAISGOOD, H.E. Modification of the rheological properties of whey protein isolate through the use of an immobilized microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5546-5551, 2002.

WILDMOSER, H.; SCHEIWILLER, J. WINDHAB, E.J. Impact of disperse microstructure on rheology and quality aspects of ice cream. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 881–891, 2004.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. p. 35-38.

WONG, D.W.S. *Química de los Alimentos – Mecanismos y Teoría*. Zaragoza: Acribia, 1995. 476 p.

YASUEDA, H.; NAKANISHI, K.; KUMAZAWA, Y.; NAGASE, K.; MOTOKI, M.; MATSUI, H. Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, n. 2, p. 411-419, 1995.

YILSAY, T.Ö.; YILMAZ, L.; BAYIZIT, A.A. The effect of using a whey protein fat replacer on textural and sensory characteristics of low-fat vanilla ice cream. **European Food Research Technology**, v. 222, n. 1-2, p. 171–175, 2006.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Appl. Microbial Biotechnol**, v. 64, n. 4, p. 447-454, 2004.

ZHANG, Z.; GOFF, H.D. On fat destabilization and composition of the air interface in ice cream containing saturated and unsaturated monoglyceride. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 5, p. 495–500, 2005.

ZHANG, C.H.; MA, Y.J.; YANG, F.X.; LIU, W.; ZHANG, Y.D. Optimization of medium composition for butyric acid production by *Clostridium thermobutyricum* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4284–4288, 2009.

Anexo

Tabela 1. Parâmetros reológicos da curva ascendente (aumento da taxa de deformação) obtidos pelos modelos de Bingham, Lei de Potência, Casson e Herschel-Bulkley das amostras de sorvetes com diferentes teores de gordura e enzima transglutaminase.

Modelo	Parâmetro	S4	S4-TG	S6	S6-TG	S8	S8-TG
Bingham	σ_0	1,27 ^a ± 0,09	2,26 ^b ± 0,10	1,62 ^c ± 0,03	2,23 ^b ± 0,05	1,89 ^d ± 0,01	1,62 ^c ± 0,03
	η_{pl}	0,04 ^a ± 0,02	0,09 ^b ± 0,02	0,05 ^{ab} ± 0,01	0,08 ^b ± 0,01	0,06 ^{ab} ± 0,00	0,07 ^{ab} ± 0,01
	R^2	0,96	0,97	0,99	0,98	0,99	0,99
Lei de Potência	K	0,28 ^a ± 0,02	0,71 ^b ± 0,01	0,48 ^c ± 0,01	0,67 ^d ± 0,02	0,52 ^e ± 0,03	0,57 ^f ± 0,03
	n	0,64 ^a ± 0,01	0,57 ^b ± 0,01	0,60 ^c ± 0,00	0,55 ^d ± 0,02	0,63 ^a ± 0,02	0,56 ^{bd} ± 0,01
	R^2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Casson	σ_0	0,59 ^a ± 0,04	0,88 ^b ± 0,02	0,73 ^c ± 0,01	0,85 ^b ± 0,01	0,73 ^c ± 0,02	0,82 ^b ± 0,01
	K	0,16 ^a ± 0,01	0,54 ^b ± 0,01	0,23 ^c ± 0,02	0,45 ^d ± 0,01	0,38 ^e ± 0,03	0,42 ^d ± 0,01
	R^2	0,97	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99
Herschel-Bulkley	K	0,19 ^a ± 0,01	0,53 ^b ± 0,02	0,25 ^a ± 0,02	0,46 ^c ± 0,01	0,35 ^d ± 0,02	0,44 ^c ± 0,03
	n	0,75 ^a ± 0,01	0,70 ^b ± 0,02	0,74 ^a ± 0,01	0,69 ^b ± 0,01	0,77 ^a ± 0,03	0,70 ^b ± 0,02
	R^2	0,98	0,98	0,99	0,97	0,99	0,99

*Média dos valores obtidos em triplicata.

**Valores não distribuídos com mesma letra (linha) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Teste de Tukey).

*** K = índice de consistência (Pa sⁿ); n = índice de comportamento de fluxo; R^2 = coeficiente de determinação; σ_0 = limite de escoamento (Pa); η_{pl} = viscosidade plástica (mPa s). S4 – sorvete com 4 % de gordura; S4-TG – sorvete 4 % de gordura com TG; S6 – sorvete com 6 % de gordura; S6-TG – sorvete com 6 % de gordura com TG; S8 – sorvete com 8 % de gordura; S8-TG – sorvete com 8 % de gordura com TG.

Tabela 2. Parâmetros reológicos da curva descendente (diminuição da taxa de deformação) obtidos pelos modelos de Bingham, Lei de Potência, Casson e Herschel-Bulkley das amostras de sorvetes com diferentes teores de gordura e enzima de transglutaminase.

Modelo	Parâmetro	S4	S4-TG	S6	S6-TG	S8	S8-TG
Bingham	σ_0	0,18 ^a ± 0,01	0,29 ^b ± 0,02	0,59 ^c ± 0,02	0,14 ^a ± 0,03	1,14 ^d ± 0,01	0,22 ^a ± 0,02
	η_{pl}	0,06 ^a ± 0,02	0,12 ^a ± 0,03	0,08 ^a ± 0,01	0,11 ^a ± 0,01	0,08 ^a ± 0,02	0,09 ^a ± 0,02
	R ²	0,98	0,99	0,99	0,97	0,99	0,99
Lei de Potência	K	0,08 ^a ± 0,01	0,15 ^b ± 0,02	0,03 ^c ± 0,02	0,10 ^a ± 0,01	0,11 ^{ab} ± 0,01	0,12 ^{ab} ± 0,01
	n	0,92 ^a ± 0,02	0,97 ^b ± 0,01	0,95 ^a ± 0,03	0,98 ^b ± 0,03	0,93 ^a ± 0,01	0,93 ^a ± 0,02
	R ²	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Casson	σ_0	0,02 ^a ± 0,00	0,01 ^a ± 0,01	0,02 ^a ± 0,01	0,01 ^a ± 0,00	0,01 ^a ± 0,01	0,02 ^a ± 0,01
	K	0,23 ^a ± 0,01	0,33 ^b ± 0,02	0,32 ^b ± 0,01	0,33 ^b ± 0,00	0,28 ^c ± 0,02	0,28 ^c ± 0,01
	R ²	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99
Herschel-Bulkley	K	0,09 ^a ± 0,01	0,13 ^a ± 0,01	0,02 ^b ± 0,01	0,10 ^a ± 0,00	0,11 ^a ± 0,02	0,12 ^a ± 0,03
	n	0,92 ^a ± 0,02	0,97 ^b ± 0,01	0,97 ^b ± 0,00	0,98 ^b ± 0,02	0,93 ^a ± 0,01	0,94 ^{ab} ± 0,01
	R ²	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99

*Média dos valores obtidos em triplicata.

**Valores não distribuídos com mesma letra (linha) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Teste de Tukey).

*** K = índice de consistência (Pa s^n); n = índice de comportamento de fluxo; R^2 = coeficiente de determinação; σ_0 = limite de escoamento (Pa); η_{pl} = viscosidade plástica (mPa s). S4 – sorvete com 4 % de gordura; S4-TG – sorvete 4 % de gordura com TG; S6 – sorvete com 6 % de gordura; S6-TG – sorvete com 6 % de gordura com TG; S8 – sorvete com 8 % de gordura; S8-TG – sorvete com 8 % de gordura com TG.