

CONTEÚDO

5.1	Introdução	180	5.5.1	Hidratação proteica	213
5.2	Propriedades físico-químicas dos aminoácidos	181	5.5.2	Solubilidade	216
5.2.1	Propriedades gerais	181	5.5.2.1	pH e solubilidade	217
5.2.1.1	Estrutura e classificação	181	5.5.2.2	Força iônica e solubilidade	218
5.2.1.2	Estereoquímica dos aminoácidos	181	5.5.2.3	Temperatura e solubilidade	218
5.2.1.3	Propriedades ácido-básicas dos aminoácidos	183	5.5.2.4	Solventes orgânicos e solubilidade	218
5.2.1.4	Hidrofobicidade dos aminoácidos	185	5.5.3	Propriedades interfaciais das proteínas	219
5.2.1.5	Propriedades ópticas dos aminoácidos	186	5.5.3.1	Propriedades emulsificantes	222
5.2.2	Reatividade química dos aminoácidos	187	5.5.3.2	Propriedades espumantes	225
5.3	Estrutura da proteína	187	5.5.4	Fixação de aroma	228
5.3.1	Hierarquia estrutural das proteínas	187	5.5.4.1	Termodinâmica das interações proteína-aroma	229
5.3.1.1	Estrutura primária	190	5.5.4.2	Fatores que influenciam a fixação do aroma	229
5.3.1.2	Estrutura secundária	191	5.5.5	Viscosidade	230
5.3.1.3	Estrutura terciária	194	5.5.6	Gelificação	232
5.3.1.4	Estrutura quaternária	196	5.5.7	Texturização	234
5.3.2	Forças envolvidas na estabilidade da estrutura das proteínas	197	5.5.7.1	Texturização por formação de fibra (<i>spun-fiber</i>)	234
5.3.2.1	Restrições estéricas	197	5.5.7.2	Texturização por extrusão	234
5.3.2.2	Interações de van der Waals	197	5.5.8	Formação de massa	235
5.3.2.3	Pontes de hidrogênio	197	5.6	Hidrolisados proteicos	238
5.3.2.4	Interações eletrostáticas	198	5.6.1	Propriedades funcionais	238
5.3.2.5	Interações hidrofóbicas	199	5.6.2	Alergenicidade	239
5.3.2.6	Pontes dissulfeto	200	5.6.3	Peptídeos amargos	240
5.3.3	Estabilidade conformacional e adaptabilidade das proteínas	200	5.7	Propriedades nutricionais das proteínas	240
5.4	Desnaturação proteica	202	5.7.1	Qualidade proteica	240
5.4.1	Termodinâmica da desnaturação	203	5.7.2	Digestibilidade	242
5.4.2	Agentes desnaturantes	204	5.7.2.1	Conformação proteica	242
5.4.2.1	Agentes físicos	204	5.7.2.2	Fatores antinutricionais	242
5.4.2.2	Agentes químicos	209	5.7.2.3	Processamento	243
5.5	Propriedades funcionais das proteínas	211	5.7.3	Avaliação do valor nutritivo da proteína	243
			5.7.3.1	Métodos biológicos	243
			5.7.3.2	Métodos químicos	244
			5.7.3.3	Métodos enzimáticos e microbiológicos	244

5.8 Alterações físicas, químicas e nutricionais das proteínas induzidas pelo processamento	244
5.8.1 Alterações na qualidade nutricional e formação de compostos tóxicos	245
5.8.1.1 Efeito dos tratamentos térmicos moderados	245
5.8.1.2 Alterações na composição durante a extração e o fracionamento	245
5.8.1.3 Alterações químicas dos aminoácidos	245
5.8.1.4 Efeitos de agentes oxidantes	249
5.8.1.5 Reações carbonila-amina	252
5.8.1.6 Outras reações de proteínas em alimentos	253
5.8.2 Alterações nas propriedades funcionais das proteínas	255
5.9 Modificações químicas e enzimáticas das proteínas	255
5.9.1 Modificações químicas	255
5.9.1.1 Alquilação	256
5.9.1.2 Acilação	256
5.9.1.3 Fosforilação	258
5.9.1.4 Sulfitólise	258
5.9.1.5 Esterificação	258
5.9.2 Modificação enzimática	258
5.9.2.1 Hidrólise enzimática	259
5.9.2.2 Reação de plasteína	259
5.9.2.3 Ligação cruzada de proteínas	259
Leitura complementar	260
Referências	260

5.1 INTRODUÇÃO

As proteínas desempenham um papel central nos sistemas biológicos. Embora a informação da evolução e da organização biológica das células esteja contida no DNA, as enzimas realizam, de forma exclusiva, os processos químicos e biológicos que sustentam a vida da(o) célula/organismo. Milhares de enzimas foram descobertas. Cada uma delas catalisa uma reação biológica bem específica nas células. Além de funcionarem como enzimas, as proteínas (como colágeno, queratina, elastina, etc.) também funcionam como componentes estruturais das células e dos organismos complexos. A diversidade funcional das proteínas resulta essencialmente de sua composição química.

As proteínas são polímeros complexos, compostos por 21 aminoácidos diferentes. Os componentes são ligados por meio de ligações amida substituídas. Diferente das ligações glicosídicas e fosfodiéster em polissacarídeos e ácidos nucleicos, respectivamente, a ligação amida em proteínas tem um caráter parcial de ligação dupla, o que ressalta ainda mais a complexidade estrutural dos polímeros proteicos. As inúmeras funções biológicas desempenhadas por proteínas não poderiam ser possíveis sem a complexidade de sua composição, o que dá origem a diversas formas estruturais tridimensionais, com diferentes funções biológicas. Para de-

monstrar sua importância biológica, essas macromoléculas foram chamadas de proteínas, nome que deriva da palavra grega *proteois*, que significa o primeiro tipo.

Em nível elementar, as proteínas contêm em base m/m 50-55% de carbono, 6-7% de hidrogênio, 20-23% de oxigênio, 12-19% de nitrogênio e 0,2-3,0% de enxofre. A síntese proteica ocorre nos ribossomos. Depois da síntese, enzimas citoplasmáticas modificam alguns constituintes dos aminoácidos. Isso muda a composição elementar de algumas proteínas. As que não são modificadas enzimaticamente nas células são chamadas homoproteínas, e as que são modificadas ou complexadas com componentes não proteicos são chamadas proteínas conjugadas ou heteroproteínas. Os componentes não proteicos costumam ser chamados de grupos prostéticos. Exemplos de proteínas conjugadas incluem nucleoproteínas (ribossomos), glicoproteínas (ovoalbumina e κ -caseína), fosfoproteínas (α e β -caseínas, quinases e fosforilases), lipoproteínas (proteínas da gema do ovo e várias proteínas plasmáticas) e metaloproteínas (hemoglobina, mioglobina e várias enzimas). As glico- e fosfoproteínas contêm carboidratos e grupos fosfato em ligação covalente, respectivamente, enquanto as outras proteínas conjugadas são complexos não covalentes que contêm ácidos nucleicos, lipídeos e íons metálicos. Esses complexos podem ser dissociados sob condições apropriadas.

As proteínas também podem ser classificadas de acordo com sua organização estrutural aparente. Desse modo, *proteínas globulares* são as que existem em formas esféricas ou elipsoidais, resultantes do dobramento das cadeias polipeptídicas sobre si mesmas. Por outro lado, as *proteínas fibrosas* são moléculas em forma de bastonete (*rod-shaped*) que contêm cadeias polipeptídicas lineares torcidas (p. ex., tropomiosina, colágeno, queratina e elastina). As proteínas fibrosas também podem ser formadas como resultado de agregação linear de pequenas proteínas globulares, por exemplo, actina e fibrina. A maioria das enzimas são proteínas globulares, sendo que as proteínas fibrosas funcionam invariavelmente como *proteínas estruturais*.

As proteínas podem ser categorizadas, conforme sua função biológica, como *catalisadores enzimáticos*, *proteínas estruturais*, *proteínas contráteis* (miosina, actina e tubulina), *hormônios* (insulina e hormônio do crescimento), *proteínas transportadoras* (albumina sérica, transferrina e hemoglobina), *anticorpos* (imunoglobulinas), *proteínas de armazenamento* (albumina do ovo e proteínas dos grãos) e *proteínas protetoras* (toxinas e alérgenos). As proteínas de armazenamento são encontradas principalmente em ovos e sementes de plantas. Essas proteínas agem como fontes de nitrogênio e de aminoácidos para a germinação de sementes e embriões. As proteínas protetoras fazem parte do mecanismo de defesa para a sobrevivência de alguns microrganismos e animais.

Todas as proteínas são essencialmente compostas dos mesmos 20 aminoácidos primários; entretanto, algumas não contêm todos os 20. As diferenças de estrutura e função dos milhares de proteínas surgem a partir do fato de que os aminoácidos são ligados entre si por meio de ligações amida. Literalmente, bilhões de proteínas com propriedades únicas podem ser sintetizadas pela alteração da sequência de ami-

noácidos, do tipo e da proporção dos aminoácidos e do comprimento da cadeia dos polipeptídeos.

Todas as proteínas biologicamente produzidas podem ser usadas como *proteínas alimentares*. Entretanto, para efeitos práticos, as *proteínas alimentares* podem ser definidas como aquelas que apresentam fácil digestão, são atóxicas, adequadas no aspecto nutricional, funcionalmente utilizáveis em produtos alimentícios, disponíveis em abundância e cultiváveis por agricultura sustentável. O leite, as carnes (incluindo peixe e aves), os ovos, os cereais, as leguminosas e as oleaginosas têm sido as principais fontes de proteínas alimentares utilizadas. Elas são proteínas de armazenamento em tecidos animais e vegetais, agindo como fonte de nitrogênio para o crescimento embrionário. Entretanto, devido ao aumento crescente da população mundial, fontes não tradicionais de proteínas para a alimentação humana precisam ser desenvolvidas para atendimento a demandas futuras. No entanto, a adequação dessas novas fontes de proteínas para uso em alimentos depende de seu custo e de sua capacidade de cumprir a função normal dos ingredientes proteicos tanto de alimentos processados como dos preparados em casa.

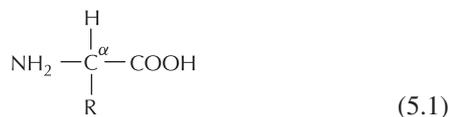
As propriedades funcionais das proteínas nos alimentos estão relacionadas a suas características estruturais e outras características físico-químicas. A compreensão fundamental das propriedades físicas, químicas, nutricionais e funcionais das proteínas e as mudanças que essas propriedades sofrem durante o processamento é essencial quando se quer melhorar o desempenho das proteínas presentes em alimentos e quando se desejam fontes proteicas novas ou menos dispendiosas para competir com proteínas alimentares tradicionais.

5.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS AMINOÁCIDOS

5.2.1 Propriedades gerais

5.2.1.1 Estrutura e classificação

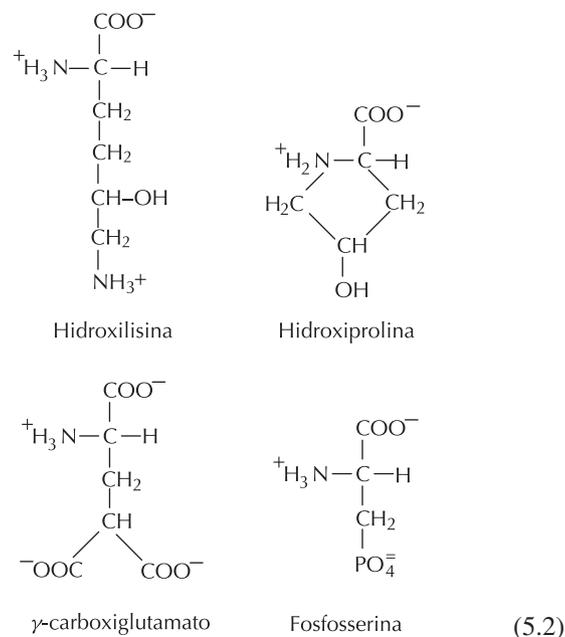
Os α -aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas. Esses aminoácidos consistem de um átomo de carbono α ligado covalentemente a um átomo de hidrogênio, um grupo amino, um grupo carboxílico e um grupo R de cadeia lateral.



As proteínas naturais contêm até 21 aminoácidos primários diferentes ligados entre si por meio de ligações amida. O 21º e mais novo aminoácido, que foi reconhecido como aminoácido natural é a selenocisteína [12]. Esses aminoácidos diferem apenas na natureza química do grupo R de cadeia lateral (Figura 5.1). As propriedades físico-químicas dos aminoácidos, como carga líquida, solubilidade, reatividade química e potencial de ligação com hidrogênio, são dependentes da natureza química do grupo R.

Os aminoácidos listados na Figura 5.1 possuem códigos genéticos, incluindo a selenocisteína. Ou seja, cada um dos

aminoácidos possui um *t*-RNA específico que traduz a informação genética do m-RNA, em uma sequência de aminoácidos, durante a síntese proteica. Além dos 21 aminoácidos primários listados na Figura 5.1, várias proteínas também contêm outros tipos de aminoácidos, os quais são derivados dos aminoácidos primários. Os *aminoácidos derivados* são aminoácidos de ligações cruzadas ou derivados simples de aminoácidos específicos. As proteínas que contêm aminoácidos derivados são chamadas de proteínas conjugadas. A cisteína, que é encontrada na maioria das proteínas, é um bom exemplo de aminoácido de ligação cruzada. Outros aminoácidos de ligação cruzada, como desmosina, isodesmosina, di e tritiosina, são encontrados em proteínas estruturais como a elastina e a resilina. Vários derivados simples de aminoácidos são encontrados em diversas proteínas. Por exemplo, 4-hidroxi prolina e 5-hidroxi lisina são encontradas no colágeno. Esses derivados resultam de uma modificação pós-translacional durante a maturação da fibra do colágeno. A fosfoserina e a fosfotreonina são encontradas em diversas proteínas, incluindo as caseínas. A *N*-metil-lisina é encontrada na miosina e o γ -carboxiglutamato é encontrado em vários fatores de coagulação do sangue e proteínas de ligação ao cálcio:



5.2.1.2 Estereoquímica dos aminoácidos

Com exceção da Gly, o átomo de carbono α de todos os aminoácidos é assimétrico, o que significa que quatro diferentes grupos são anexados a ele. Em decorrência desse centro assimétrico, os aminoácidos exibem atividade óptica, ou seja, eles giram o plano de luz polarizada linearmente. Além do átomo de carbono α assimétrico, os átomos de carbono β da Ile e da Thr também são assimétricos, sendo assim, tanto a Ile como a Thr podem existir em quatro formas enantioméricas. Entre os aminoácidos derivados, a hidroxiprolina e a hidroxilisina também contêm dois carbonos centrais assimétricos. Todas as proteínas encontradas na natureza contêm

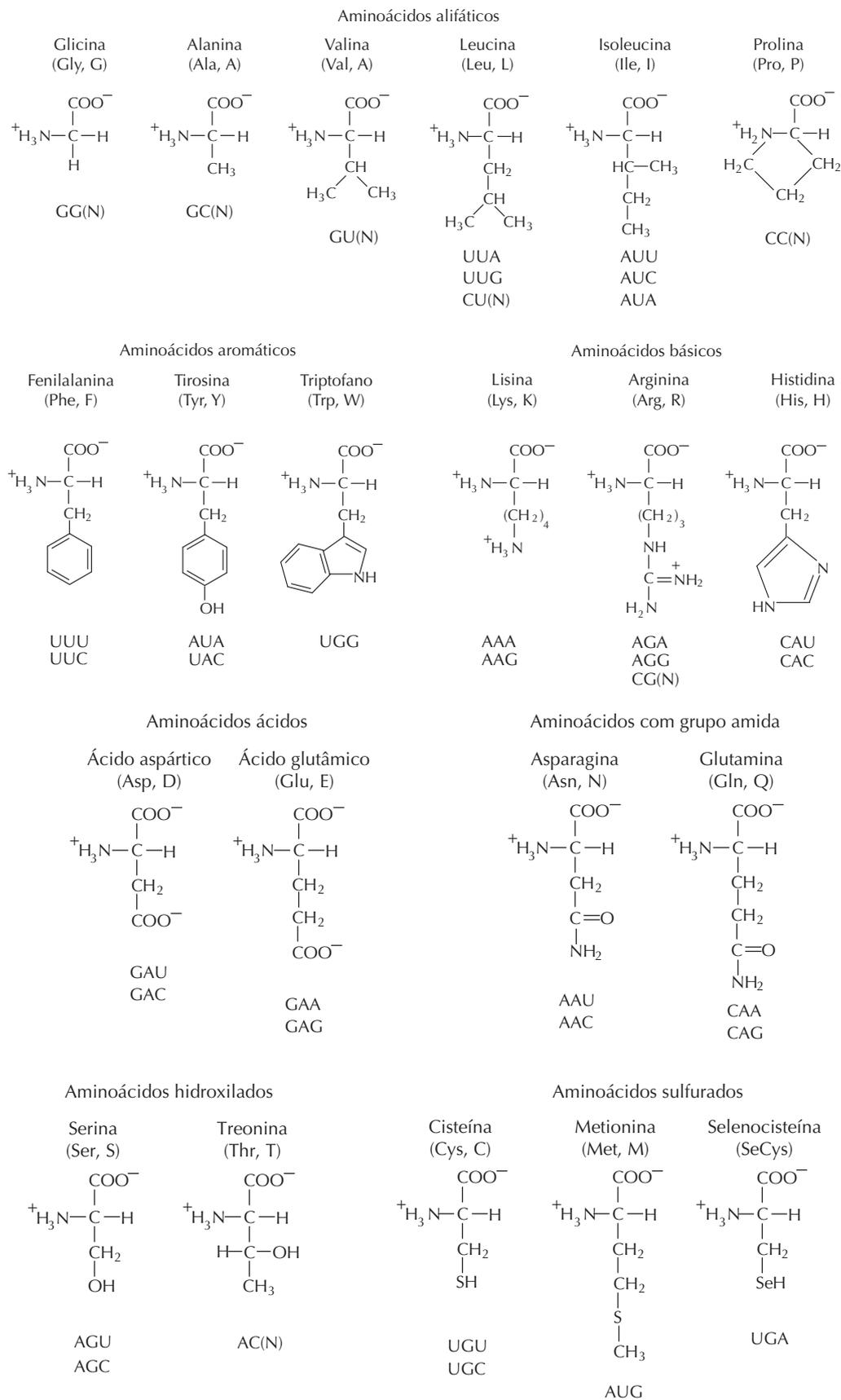
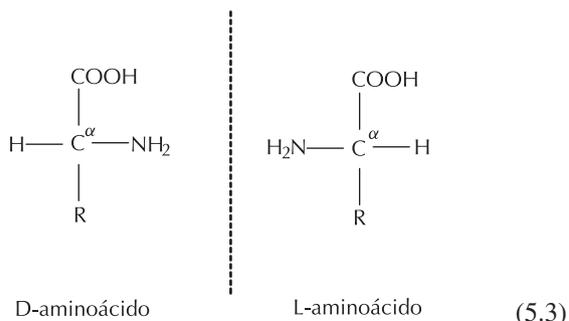


FIGURA 5.1 α-Aminoácidos primários ocorrentes em proteínas. Os códigos de três letras e de uma letra dos aminoácidos são apresentados dentro dos parênteses. Os códons mRNA para os aminoácidos também são apresentados para cada aminoácido.

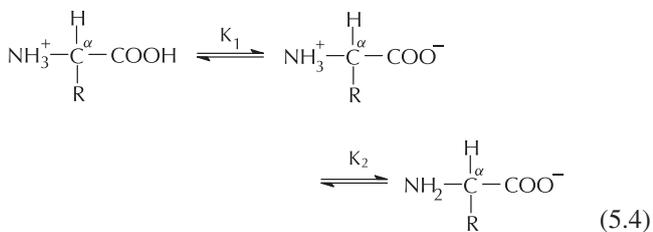
apenas L-aminoácidos. Convencionalmente, os enantiômeros L e D são representados como:



Essa nomenclatura se baseia nas configurações do D- e do L-gliceraldeído e não na direção real da rotação da luz polarizada linearmente. Ou seja, a configuração L não se refere à rotação levógira como no caso do L-gliceraldeído. Na realidade a maioria dos L-aminoácidos são dextrorrotatórios e não levorrotatórios.

5.2.1.3 Propriedades ácido-básicas dos aminoácidos

Como os aminoácidos contêm um grupo carboxílico (ácido) e um grupo amino (básico), eles se comportam tanto como ácidos quanto como bases, ou seja, eles são *anfólitos*. Por exemplo, Gly, o mais simples de todos os aminoácidos, pode existir em três diferentes estados ionizados, dependendo do pH da solução.



Em pH próximo ao neutro, tanto os grupos α -amino como os α -carboxílicos são ionizados e a molécula trata-se de um *ión dipolar* ou *zwitterion*. O pH no qual o íon dipolar é eletricamente neutro é chamado de *ponto isoelétrico* (pI). Quando o *zwitterion* é titulado com um ácido, o grupo COO^- torna-se protonado. O pH no qual as concentrações de COO^- e COOH são iguais é conhecido como $\text{p}K_{a1}$ (i.e., logaritmo negativo da constante de dissociação ácida K_{a1}). Da mesma forma, quando o *zwitterion* é titulado com uma base, o grupo NH_3^+ torna-se desprotonado. Como antes, o pH no qual $[\text{NH}_3^+] = [\text{NH}_2]$ é conhecido como $\text{p}K_{a2}$. Uma curva de titulação eletrométrica típica para um aminoácido dipolar é apresentada na Figura 5.2. Além dos grupos α -amino e α -carboxílico, as cadeias laterais de Lys, Arg, His, Asp, Glu, Cys e Tyr também contêm grupos ionizáveis. Os valores do $\text{p}K_a$ de todos os grupos ionizáveis nos aminoácidos são fornecidos pela Tabela 5.1. Os pontos isoelétricos dos aminoácidos podem ser estimados a partir de seus valores de $\text{p}K_{a1}$, $\text{p}K_{a2}$ e $\text{p}K_{a3}$, usando-se as seguintes expressões:

Para aminoácidos sem cadeia lateral carregada,
 $\text{pI} = (\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2})/2$

Para aminoácidos ácidos, $\text{pI} = (\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a3})/2$, e

Para aminoácidos básicos, $\text{pI} = (\text{p}K_{a2} + \text{p}K_{a3})/2$

Os subscritos 1, 2 e 3 referem-se aos grupos α -carboxílico, α -amino e aos grupos ionizáveis da cadeia lateral, respectivamente.

Nas proteínas, o α -COOH de um aminoácido é acoplado covalentemente ao α -NH₂ do próximo aminoácido por meio de uma ligação amida, desse modo, os únicos grupos ionizáveis das proteínas são os grupos amino N-terminais, o grupo carboxílico C-terminal e os grupos ionizáveis das cadeias laterais. O $\text{p}K_a$ dos grupos ionizáveis das proteínas é diferente do encontrado em aminoácidos livres (Tabela 5.2). Mudanças significativas nos valores do $\text{p}K_a$ das pro-

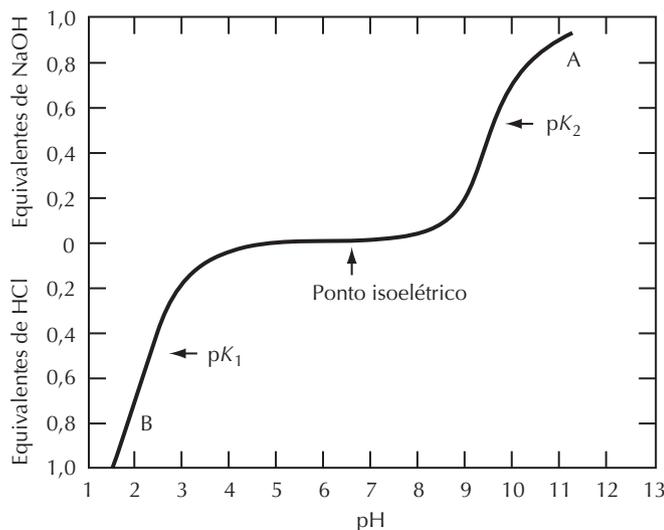
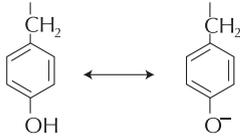


FIGURA 5.2 Curva de titulação de um aminoácido típico.

TABELA 5.1 Propriedades de grupos ionizáveis em aminoácidos livres a 25°C

Aminoácido	pK _{a1} •(-COOH)	pK _{a2} •(-NH ₃ ⁺)	pK _{a3} (cadeia lateral)	pI
Alanina	2,34	9,69	–	6,00
Arginina	2,17	9,04	12,48	10,76
Asparagina	2,02	8,80	–	5,41
Ácido aspártico	1,88	9,60	3,65	2,77
Cisteína	1,96	10,28	8,18	5,07
Glutamina	2,17	9,13	–	5,65
Ácido glutâmico	2,19	9,67	4,25	3,22
Glicina	2,34	9,60	–	5,98
Histidina	1,82	9,17	6,00	7,59
Isoleucina	2,36	9,68	–	6,02
Leucina	2,30	9,60	–	5,98
Lisina	2,18	8,95	10,53	9,74
Metionina	2,28	9,21	–	5,74
Fenilalanina	1,83	9,13	–	5,48
Prolina	1,94	10,60	–	6,30
Serina	2,20	9,15	–	5,68
Treonina	2,21	9,15	–	5,68
Triptofano	2,38	9,39	–	5,89
Tirosina	2,20	9,11	10,07	5,66
Valina	2,32	9,62	–	5,96

TABELA 5.2 Valores médios de pK_a dos grupos ionizáveis em proteínas

Grupo ionizável	pK _a	Forma ácida ↔ Forma básica
COOH terminal	3,75	–COOH ↔ –COO [–]
NH ₂ terminal	7,8	–NH ₃ ⁺ ↔ –NH ₂
COOH da cadeia lateral (Glu, Asp)	4,6	–COOH ↔ –COO [–]
NH ₂ da cadeia lateral	10,2	–NH ₃ ⁺ ↔ –NH ₂
Imidazólico	7,0	
Sulfidrila	8,8	–SH ↔ –S [–]
Fenólico	9,6	
Guanidil	>12	

teínas, em comparação aos aminoácidos livres, estão relacionadas à alteração nos ambientes dielétrico e eletrônico desses grupos nas proteínas. (Essa propriedade é importante nas enzimas.)

O grau de ionização de um grupo em qualquer pH de solução dado pode ser determinado pelo uso da equação de Henderson–Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido conjugado}]} \quad (5.5)$$

A carga líquida de uma proteína em um determinado pH pode ser estimada por meio da determinação do grau de ionização dos grupos ionizáveis individuais usando-se essa equação e, em seguida, somando-se o número total de cargas negativas e positivas.

Os aminoácidos podem ser classificados em várias categorias com base na natureza da interação da cadeia lateral com a água. Aminoácidos com cadeias laterais alifáticas (Ala, Ile, Leu, Met, Pro e Val) e aromáticas (Phe, Trp e Tyr) são hidrofóbicos e, por isso, eles exibem solubilidade limitada

em água (Tabela 5.3). Os aminoácidos polares (hidrofílicos) são completamente solúveis em água, sendo carregados (Arg, Asp, Glu, His e Lys) ou sem carga (Ser, Thr, Asn, Gln, e Cys). As cadeias laterais da Arg e da Lys contêm grupos guanidil e amino, respectivamente, e desse modo, são carregados de modo positivo (básicos), em pH neutro. O grupo imidazólico da His é básico em estado natural. Entretanto, em pH neutro, sua carga líquida é apenas um pouco positiva. As cadeias laterais dos ácidos Asp e Glu contêm um grupo carboxílico. Esses aminoácidos apresentam uma carga líquida negativa, em pH neutro. Tanto os aminoácidos básicos como os ácidos são fortemente hidrofílicos. A carga líquida de uma proteína em condições fisiológicas depende dos números relativos de resíduos ácidos e básicos dos aminoácidos contidos nela.

As polaridades de aminoácidos neutros sem carga situam-se entre as polaridades dos aminoácidos hidrofóbicos e as dos carregados. A natureza polar da Ser e da Thr é atribuída ao grupo hidroxila que é capaz de ligar o hidrogênio à água. Como a Tyr também contém um grupo fenólico ionizável que se ioniza em pH alcalino, ela também é considerada um aminoácido polar. Entretanto, com base em suas características de solubilidade em pH neutro, ela deveria ser considerada como um aminoácido hidrofóbico. O grupo amida da Asn e da Gln é capaz de interagir com a água por meio de pontes de hidrogênio. Quando ocorre hidrólise ácida ou alcalina, o grupo amida da Asn e da Gln é convertido em grupo carboxílico com liberação de amônia. A maioria dos resíduos de Cys em proteínas existe como cistina, que é um dímero Cys produzido pela oxidação de grupos tiol para formar uma ligação cruzada dissulfeto.

A prolina é um aminoácido ímpar, pois é o único *imi-noácido* das proteínas. Na prolina, a cadeia lateral propil é ligada covalentemente tanto ao átomo de carbono α como ao grupo α -amina, formando uma estrutura de anel pirrolidina.

5.2.1.4 Hidrofobicidade dos aminoácidos

Um dos principais fatores que afetam as propriedades físico-químicas de proteínas e peptídeos, tais como estrutura, solubilidade, propriedade de ligação a lipídeos, etc., é a hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos constituintes. A hidrofobicidade pode ser definida como o excesso de energia livre de um soluto dissolvido em água em comparação ao de um solvente orgânico sob condições similares. A forma mais simples e direta de se estimar a hidrofobicidade das cadeias laterais dos aminoácidos se dá por meio da determinação experimental das alterações de energia livre para a dissolução das cadeias laterais dos aminoácidos em água e em um solvente orgânico, como o octanol ou o etanol. O potencial químico de um aminoácido dissolvido em água pode ser expresso por:

$$\mu_{AA,w} = \mu_{AA,w}^{\circ} + RT \ln \gamma_{AA,w} C_{AA,w} \quad (5.6)$$

onde $\mu_{AA,w}^{\circ}$ é o potencial químico padrão do aminoácido na solução aquosa, γ_{AA} é o coeficiente de atividade, C_{AA} é a concentração, T é a temperatura absoluta e R é a constante dos gases. Do mesmo modo, o potencial químico de um aminoácido dissolvido em um solvente orgânico, por exemplo, octanol, pode ser expresso como

$$\mu_{AA,oct} = \mu_{AA,oct}^{\circ} + RT \ln \gamma_{AA,oct} C_{AA,oct} \quad (5.7)$$

TABELA 5.3 Propriedades dos aminoácidos a 25°C

Aminoácido	Peso molecular	Volume do resíduo Δ^3	Área do resíduo Δ^2	Solubilidade (g/L)	Hidrofobicidade (kcal/mol) ^a (ΔG_{tr}^0)
Ala	89,1	89	115	167,2	0,4
Arg	174,2	173	225	855,6	-1,4
Asn	132,1	111	150	28,5	-0,8
Asp	133,1	114	160	5,0	-1,1
Cys	121,1	109	135	-	2,1
Gln	146,1	144	180	7,2 (37°C)	-0,3
Glu	147,1	138	190	8,5	-0,9
Gly	75,1	60	75	249,9	0
His	155,2	153	195	-	0,2
Ile	131,2	167	175	34,5	2,5
Leu	131,2	167	170	21,7	2,3
Lys	146,2	169	200	739,0	-1,4
Met	149,2	163	185	56,2	1,7
Phe	165,2	190	210	27,6	2,4
Pro	115,1	113	145	620,0	1,0
Ser	105,1	89	115	422,0	-0,1
Thr	119,1	116	140	13,2	0,4
Trp	204,2	228	255	13,6	3,1
Tyr	181,2	194	230	0,4	1,3
Val	117,1	140	155	58,1	1,7

^a Os valores de ΔG são relativos à glicina e estão baseados nos coeficientes de distribuição (K_{eq}) da cadeia lateral entre 1-octanol e água [41].

Em soluções saturadas, nas quais $C_{AA,w}$ e $C_{AA,oct}$ representam as solubilidades em água e octanol, respectivamente, os potenciais químicos do aminoácido em água e octanol são os mesmos, isto é,

$$\mu_{AA,w} = \mu_{AA,oct} \quad (5.8)$$

Logo

$$\begin{aligned} \mu_{AA,oct}^{\circ} + RT \ln \gamma_{AA,oct} C_{AA,oct} = \\ \mu_{AA,w}^{\circ} + RT \ln \gamma_{AA,w} C_{AA,w} \end{aligned} \quad (5.9)$$

A quantidade $(\mu_{AA,w}^{\circ} - \mu_{AA,oct}^{\circ})$ que representa a diferença entre os potenciais químicos padrão decorrente da interação do aminoácido com o octanol e com a água, pode ser definida como a mudança da energia livre ($\Delta G_{tr,oct \rightarrow w}^0$) de transferência do aminoácido do octanol para a água. Desse modo, supondo-se que a proporção entre os coeficientes de atividade seja um, a equação supracitada pode ser expressa como

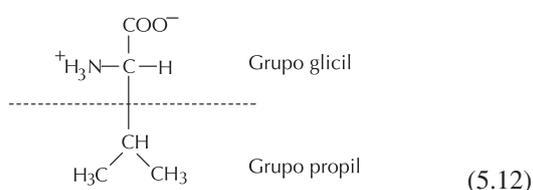
$$\Delta G_{tr,(oct \rightarrow w)}^0 = -RT \ln(S_{AA,w}/S_{AA,oct}) \quad (5.10)$$

onde $S_{AA,oct}$ e $S_{AA,w}$ representam as solubilidades do aminoácido no octanol e na água, respectivamente.

Como ocorre com todos os outros parâmetros termodinâmicos, ΔG_{tr}^0 é uma função aditiva. Isto é, se uma molécula tem dois grupos, A e B, atraídos covalentemente, o ΔG_{tr}^0 de transferência de um solvente para outro é a soma das mudanças de energia livre para a transferência dos grupos A e B. Isto é,

$$\Delta G_{tr,AB}^0 = \Delta G_{tr,A}^0 + \Delta G_{tr,B}^0 \quad (5.11)$$

A mesma lógica pode ser aplicada à transferência de um aminoácido do octanol para a água. Por exemplo, a Val pode ser considerada um derivado da Gly com uma cadeia lateral isopropil no átomo de carbono α .



A mudança de energia livre de transferência da valina do octanol para a água pode então ser considerada como:

$$\Delta G_{tr,Val}^0 = \Delta G_{tr,Gly}^0 + \Delta G_{tr,cadeia\ lateral}^0 \quad (5.13)$$

ou

$$\Delta G_{tr,cadeia\ lateral}^0 = \Delta G_{tr,Val}^0 - \Delta G_{tr,Gly}^0 \quad (5.14)$$

Em outras palavras, a hidrofobicidade das cadeias laterais dos aminoácidos pode ser determinada subtraindo-se $\Delta G_{tr,Gly}^0$ de $\Delta G_{tr,Val}^0$:

Os valores da hidrofobicidade das cadeias laterais dos aminoácidos obtidos dessa forma são fornecidos pela na Tabela 5.3. As cadeias com grandes valores positivos de ΔG_{tr}^0 são hidrofóbicas; elas preferem estar em fases orgânicas em detrimento de fases aquosas. Em proteínas, esses resíduos tendem a se localizar no interior da proteína, onde a polaridade do ambiente é similar à da fase orgânica. Os resíduos de aminoácidos com valores negativos de ΔG_{tr}^0 são hidrofílicos, sendo que esses resíduos costumam localizar-se na superfície das moléculas proteicas. A hidrofobicidade dos resíduos não polares está correlacionada linearmente a sua área de superfície, como demonstrado na Figura 5.3.

5.2.1.5 Propriedades ópticas dos aminoácidos

Os aminoácidos aromáticos Trp, Tyr e Phe absorvem luz na região próxima do ultravioleta (250-300 nm). Além disso, Trp e Tyr também apresentam fluorescência nessa região. Os comprimentos de onda máximos de absorção e emissão de fluorescência dos aminoácidos aromáticos são fornecidos pela Tabela 5.4. Esses resíduos de aminoácidos são responsáveis pelas propriedades da absorção ultravioleta das proteínas na faixa de 250-300 nm, com absorção máxima perto de 280 nm, para a maioria das proteínas. Uma vez que tanto as propriedades de absorção como as de fluorescência desses aminoácidos são influenciadas pela polaridade de seu ambiente, as mudanças das propriedades ópticas das proteínas costumam ser usadas como meio de controle das alterações conformacionais das proteínas.

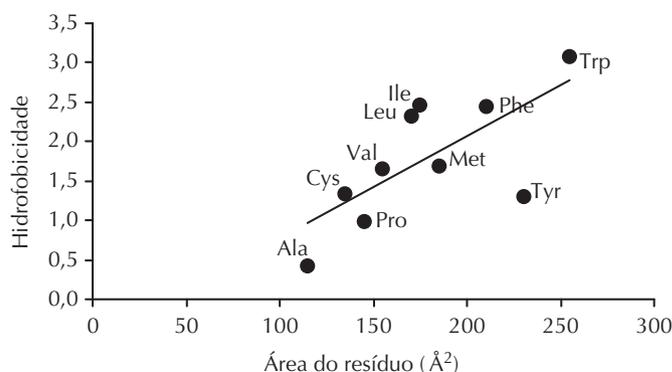


FIGURA 5.3 Correlação entre área de superfície e hidrofobicidade de resíduos não polares de aminoácidos.

TABELA 5.4 Absorbância no ultravioleta e fluorescência de aminoácidos aromáticos

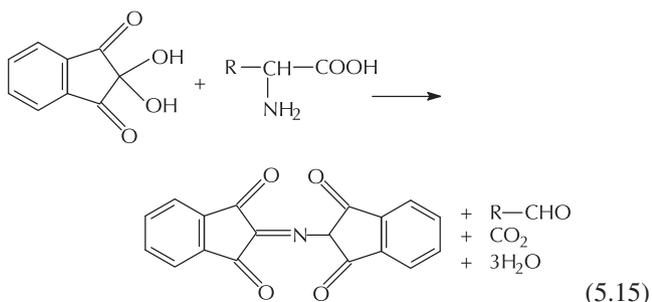
Aminoácido	$\lambda_{\text{máx}}$ de absorvância (nm)	Coefficiente de extinção molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{máx}}$ de fluorescência (nm)
Fenilalanina	260	190	282 ^a
Triptofano	278	5.500	348 ^b
Tirosina	275	1.340	304 ^b

^aExcitação a 260 nm.^bExcitação a 280 nm.

5.2.2 Reatividade química dos aminoácidos

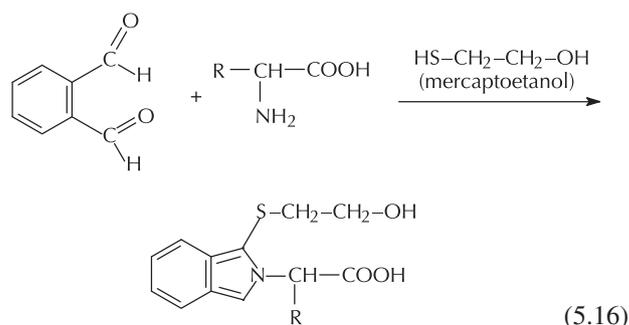
Os grupos reativos, como amino, carboxílico, sulfidríla, fenólico, hidroxila, tioéter (Met), imidazol e guanil, em proteínas e aminoácidos livres, são capazes de sofrer reações químicas similares às que ocorreriam se eles estivessem vinculados a outras moléculas orgânicas pequenas. Algumas reações típicas de vários grupos de cadeia lateral estão representadas na Tabela 5.5. Várias dessas reações podem ser usadas para alterar as propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas e as propriedades funcionais de proteínas e peptídeos. Algumas dessas reações também podem ser usadas na quantificação de aminoácidos e resíduos específicos de aminoácidos em proteínas. Por exemplo, a reação de aminoácidos com nin-hidrina, *O*-ftaldialdeído ou fluorescamina é usada regularmente na quantificação de aminoácidos.

Reação com nin-hidrina: A reação com nin-hidrina é frequentemente usada na quantificação de aminoácidos livres. Quando um aminoácido reage com um montante excessivo de nin-hidrina, para cada mol de aminoácido consumido, forma-se um mol de amônia, um de aldeído, um de CO_2 e um de hidrindantina (Equação 5.15). A amônia liberada posteriormente reage com um mol de nin-hidrina e um mol de hidrindantina, formando um produto de cor púrpura conhecido como púrpura de Ruhemann, o qual apresenta absorvância máxima em 570 nm. A partir da prolina e da hidroxiprolina, forma-se um produto de coloração amarela, que apresenta absorvância máxima em 440 nm. Essas reações de cor fornecem a base da determinação colorimétrica dos aminoácidos.

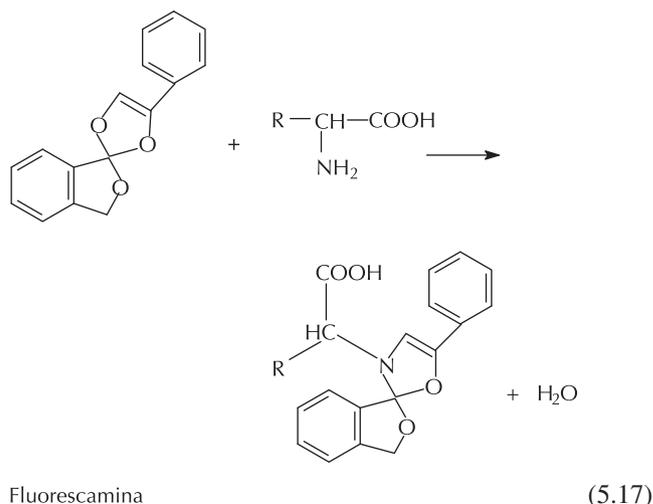


A reação com nin-hidrina costuma ser usada para se determinar a composição de aminoácidos de proteínas. Nesse caso, a proteína é inicialmente hidrolisada em meio ácido a aminoácidos. Estes liberados são então separados e identificados usando-se cromatografia hidrofóbica/troca iônica. Os eluatos da coluna reagem com a nin-hidrina, sendo quantificados por medição da absorvância a 570 e 440 nm.

Reação com *O*-ftaldialdeído: A reação dos aminoácidos com *O*-ftaldialdeído (1,2-benzeno dicarbonal) na presença de 2-mercaptoetanol produz um derivado altamente fluorescente que apresenta excitação máxima a 380 nm e emissão de fluorescência máxima a 450 nm.



Reação com fluorescamina: A reação de aminoácidos, peptídeos e proteínas que contêm aminas primárias com fluorescamina produz um derivado altamente fluorescente com emissão de fluorescência máxima entre 475 nm e 390 nm, quando excitado. Esse método pode ser usado na quantificação de aminoácidos, bem como na quantificação de proteínas e peptídeos.

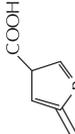


5.3 ESTRUTURA DA PROTEÍNA

5.3.1 Hierarquia estrutural das proteínas

Existem quatro níveis de estrutura das proteínas: *primário*, *secundário*, *terciário* e *quaternário*.

TABELA 5.5 Reações químicas dos grupos funcionais em aminoácidos e proteínas

Tipo de reação	Reagente e condições	Produto	Observações
A. Grupos amino			
1. Alquilação redutora	HCHO, NaBH ₄ (formaldeído)	$\text{R}-\text{NH}-\begin{matrix} +\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	Útil para radiomarcagem de proteínas
2. Reação de guanidina	$\begin{matrix} \text{O}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}=\text{C}-\text{NH}_2 \end{matrix}$ (O-metilisourea) pH 10,6, 4°C por quatro dias	$\text{R}-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH}_2)-\text{NH}_2$	Converte a cadeia lateral lisil em homocisteína
3. Acetilação	Anidrido acético	$\text{R}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$	Elimina a carga positiva
4. Succinilação	Anidrido succínico	$\text{R}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$	Introduz uma carga negativa nos resíduos lisil
5. Tioilação	 Ácido tioparacônico	$\text{R}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{SH}$	Elimina a carga positiva e introduz um grupo tiol nos resíduos lisil
6. Aromaticidade	1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB)	$\text{R}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$	Usado para determinação de grupos amino
7. Desaminação	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TBNS)	$\text{R}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3$	O coeficiente de extinção é $1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 367 nm; usado para determinar resíduos lisil reativos em proteínas
B. Grupos carboxílicos			
1. Esterificação	NaNO ₂ 1,5 M em ácido acético, 0°C	$\text{R}-\text{OH} + \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$	A hidrólise do éster ocorre a pH > 6,0
2. Redução	Metanol acidificado	$\text{R}-\text{COOCH}_3 + \text{H}_2\text{O}$	
3. Descarboxilação	Boro-hidreto em tetra-hidrofurano, ácido trifluoroacético Ácido, álcali, tratamento térmico	$\text{R}-\text{CH}_2\text{OH}$ $\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Ocorre somente com aminoácido, não com proteínas

C. Grupo sulfidríla

1. Oxidação

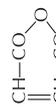
Ácido perfórmico



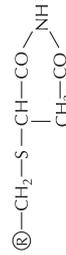
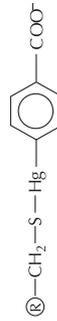
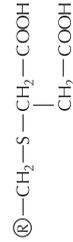
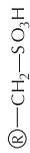
(etileneimina)

2. Bloqueio

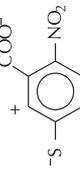
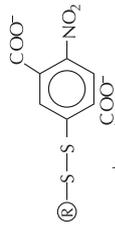
Ácido iodoacético



(Anidrido maleico)

p-mercuribenzoato

5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB)



(Tionitrobenzoato)

CH₃-COClCH₃I

Introduz grupo amino

Introduz um grupo amino

Introduz duas cargas negativas para cada grupo SH bloqueado

O coeficiente de extinção deste derivado a 250 nm (pH 7) é 7.500 M⁻¹ cm⁻¹; esta reação é usada para determinar o conteúdo de SH em proteínas

Usado para bloquear grupos SH

Um mol de tionitrobenzoato é liberado; o ε₄₁₂ do tionitrobenzoato é 13.600 M⁻¹ cm⁻¹; esta reação é usada para determinar grupos SH em proteínas

D. Serina e treonina

1. Esterificação

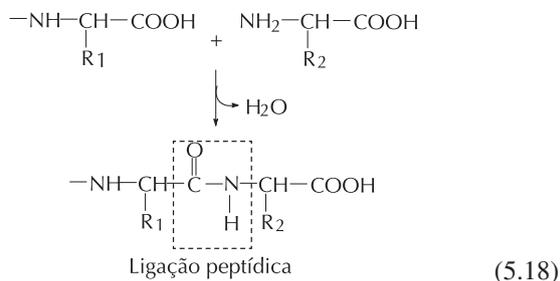
E. Metionina

1. Alquil halidas

2. β-propiolactona

5.3.1.1 Estrutura primária

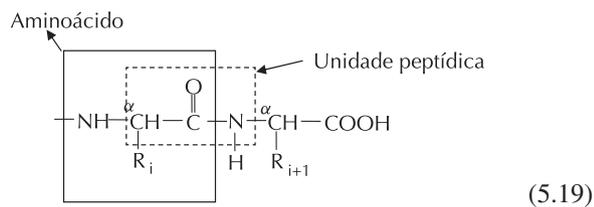
A estrutura primária de uma proteína refere-se à sequência linear na qual os aminoácidos constituintes são covalentemente ligados por meio de ligações amida, também chamadas de ligações peptídicas. A ligação peptídica resulta da condensação do grupo α -carboxílico de um determinado aminoácido (i) e o grupo α -amino do aminoácido $i+1$ com a remoção de uma molécula de água. Nessa sequência linear, todos os resíduos de aminoácidos encontram-se na configuração L. Uma proteína com n resíduos de aminoácidos contém $n-1$ ligações peptídicas.



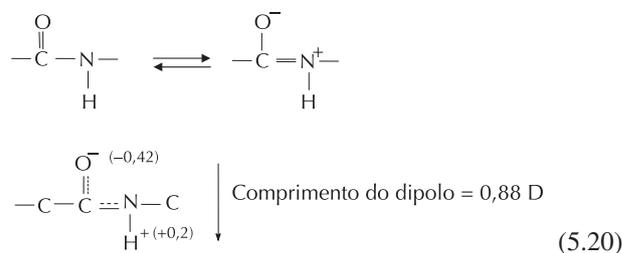
A extremidade com o grupo α -amino livre é conhecida como N-terminal e a com o grupo α -COOH livre é conhecida como C-terminal. Por convenção, N representa o início e C, o final da cadeia polipeptídica quando a informação da sequência primária é indicada.

O comprimento da cadeia (n) e a sequência na qual os resíduos n estão ligados determinam as propriedades físico-químicas, estruturais, biológicas e as funções de uma proteína. A sequência de aminoácidos age como um código para a formação das estruturas secundária e terciária e, finalmente, determina a funcionalidade biológica da proteína. A massa molecular varia de alguns milhares de Daltons (Da) para mais de um milhão de Da. Por exemplo, a titina, que é uma proteína de cadeia simples encontrada no músculo, apresenta massa molecular de mais de um milhão, enquanto a secretina apresenta uma massa molecular de cerca de 2.300 Da. A massa molecular da maioria das proteínas está na faixa entre 20.000 e 100.000 Da.

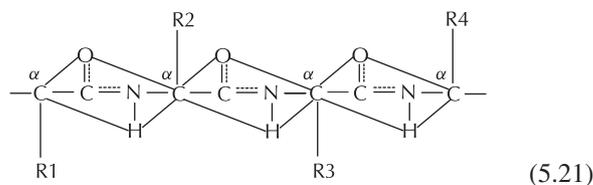
A sequência de polipeptídeos pode ser descrita como unidades repetitivas de $\text{—N—C—C}^\alpha\text{—}$ ou $\text{—C}^\alpha\text{—C—N—}$. A expressão $\text{—NH—}^\alpha\text{CHR—CO—}$ refere-se a um resíduo de aminoácido, considerando que $\text{—}^\alpha\text{CHR—CO—NH—}$ representa uma unidade peptídica.



Embora a ligação CO—NH seja descrita como uma ligação covalente simples, na realidade, ela tem um caráter parcial de ligação dupla devido à estrutura de ressonância causada pela deslocalização de elétrons.



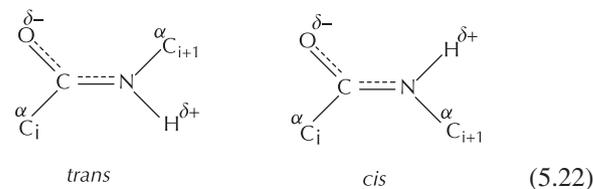
Isso tem várias implicações estruturais importantes nas proteínas. Primeiro, a estrutura de ressonância evita a protonação do grupo N—H do peptídeo. Segundo, em decorrência do caráter parcial de ligação dupla, a rotação da ligação CO—NH é restrita a um máximo de 6° , conhecido como ângulo ω . Devido a essa restrição, cada segmento de seis átomos ($\text{—C}^\alpha\text{—CO—NH—C}^\alpha\text{—}$) da sequência peptídica encontra-se em um plano único. A sequência polipeptídica, em essência, pode ser descrita como uma série de planos $\text{—C}^\alpha\text{—CO—NH—C}^\alpha\text{—}$ ligados ao longo dos átomos C^α como mostrado a seguir:



Uma vez que as ligações peptídicas constituem cerca de um terço do total das ligações covalentes da sequência, sua liberdade rotacional restrita reduz drasticamente a flexibilidade da sequência. Apenas as ligações N—C $^\alpha$ e C $^\alpha$ —C apresentam liberdade rotacional, sendo denominadas ângulos diedrais ϕ (*phi*) e ψ (*psi*), respectivamente.

Esses ângulos também são conhecidos como ângulos de torção da cadeia principal. Terceiro, a deslocalização de elétrons também transmite uma carga parcial negativa ao átomo de oxigênio da carbonila e uma carga parcial positiva ao átomo de hidrogênio do grupo N—H. Por causa disso, pontes de hidrogênio (interação dipolo-dipolo) entre os grupos C=O e N—H da cadeia peptídica são possíveis sob condições apropriadas.

Outra consequência da natureza parcial de ligação dupla da ligação peptídica é que os quatro átomos anexados à ligação peptídica podem estar presentes na configuração *cis* ou na *trans*.



Entretanto, quase todas as ligações peptídicas das proteínas estão presentes na configuração *trans*. Isso acontece devido ao fato de que a configuração *trans* é termodinamicamente mais estável que a configuração *cis*. Uma vez que a transformação *trans* \rightarrow *cis* aumenta a energia livre da ligação peptídica em 8,3 kcal/mol, a isomerização das ligações peptídicas

não ocorre em proteínas. Uma exceção são as ligações peptídicas que envolvem resíduos de prolina. Como a mudança da energia livre da transformação *trans*→*cis* da ligação peptídica que envolve resíduos de prolina é de aproximadamente apenas 1,86 kcal/mol, em altas temperaturas, essas ligações peptídicas algumas vezes sofrem isomerização *trans* → *cis*.

Embora as ligações N–C^α e C^α–C sejam de fato ligações simples, e, portanto, os ângulos di-hedrais N e P possam, teoricamente, ter liberdade rotacional de 360°, na verdade, sua liberdade rotacional é restringida por impedimentos estéricos dos átomos da cadeia lateral. Essas restrições diminuem ainda mais a flexibilidade da cadeia polipeptídica.

5.3.1.2 Estrutura secundária

A estrutura secundária refere-se ao arranjo espacial periódico dos resíduos de aminoácido em alguns segmentos da cadeia polipeptídica. As estruturas periódicas surgem quando resíduos de aminoácidos consecutivos de um segmento compreendem o mesmo conjunto de ângulos de torção ϕ e ψ . A mudança desses ângulos é orientada por interações não covalentes de curto alcance ou de vizinhança próxima entre as cadeias laterais dos aminoácidos, o que leva à diminuição da energia livre local. Estrutura *aperiódica* ou *aleatória* refere-se às regiões da cadeia polipeptídica onde resíduos sucessivos de aminoácidos possuem diferentes conjuntos de ângulos de torção ϕ e ψ .

Em geral, duas formas de estruturas secundárias periódicas (regulares) são encontradas nas proteínas, a saber, estruturas helicoidais e do tipo folha estendida. Características geométricas de várias estruturas regulares encontradas em proteínas são fornecidas pela Tabela 5.6.

Estruturas helicoidais: As estruturas helicoidais das proteínas são formadas quando os ângulos ϕ e ψ de resíduos consecutivos de aminoácidos são torcidos para alcançar um mesmo conjunto de valores. Ao selecionar diferentes combinações de ângulos ϕ e ψ , é teoricamente possível que se criem vários tipos de estruturas helicoidais com diferentes geometrias. Entretanto, nas proteínas, apenas três tipos dessas estruturas são encontradas, a saber, α -hélice, 3_{10} -hélice e β -hélice.

Entre essas três estruturas helicoidais, a α -hélice é a principal forma encontrada nas proteínas, sendo, ainda, a mais estável (Figura 5.4). O passo dessa hélice, que trata-se de aumento do comprimento axial por rotação, é 5,4 Å. Cada rotação helicoidal envolve 3,6 resíduos de aminoácidos, sendo que cada um aumenta o comprimento axial em 1,5 Å. O ângulo de rotação por resíduo é de 100° (i.e., 360°/3,6). As cadeias laterais dos aminoácidos estão orientadas perpendicularmente ao eixo da hélice.

A α -hélice é estabilizada por pontes de hidrogênio. Nessa estrutura, cada sequência de grupo N–H é ligada por ponte de hidrogênio ao grupo C=O do quarto resíduo precedente. Treze átomos da sequência encontram-se nessa volta mantida por pontes de hidrogênio, de modo que a α -hélice algumas vezes é chamada de hélice $3,6_{13}$ (Figura 5.4). As pontes de hidrogênio são orientadas paralelamente ao eixo da hélice, e os átomos N, H e O da ponte de hidrogênio encontram-se quase em linha reta, isto é, o ângulo da ponte de hidrogênio é quase zero. O comprimento da ponte de hidrogênio, isto é, a distância N–H...O, é de cerca de 2,9 Å, e a força dessa ligação é cerca de 4,5 kcal/mol. A α -hélice pode existir tanto na orientação para a direita como para a esquerda. Entretanto, a orientação para a direita é a mais estável.

Os detalhes da formação da α -hélice são encaixados como um código binário na sequência dos aminoácidos [61]. Esse código está relacionado à disposição dos resíduos polares e não polares da sequência. Segmentos polipeptídicos com repetição de sequências de sete aminoácidos (hepteto) –P–N–P–P–N–N–P–, em que P e N são resíduos polares e não polares, respectivamente, formam α -hélices em soluções aquosas, com rapidez. É o código binário e não as identidades precisas dos resíduos polares e não polares da sequência do hepteto o que dita a formação da α -hélice. Pequenas variações no código binário do hepteto são toleradas, desde que outras interações inter ou intramoleculares sejam favoráveis à formação da α -hélice. Por exemplo, a tropomiosina, uma proteína muscular, existe inteiramente na forma de bastonete α -helicoidal do tipo *coiled-coil*. A repetição da sequência do hepteto nessa proteína é –N–P–P–N–P–P–P–, sendo um pouco diferente da sequência supracitada. Apesar dessa variação, a tropomiosina existe por completo na forma de

TABELA 5.6 Características geométricas de conformações regulares de polipeptídeos

Estrutura	ϕ	ψ	n	r	h (Å)	t
α -hélice dextrógira	–58°	–47°	3,6	13	1,5	100°
π -hélice	–57°	–70°	4,4	16	1,15	81,8°
3_{10} -hélice	–49°	–26°	3	10	2	120°
folha β -paralela	–119°	+113°	2	–	3,2	–
folha β -antiparalela	–139°	+135°	2	–	3,4	–
Poliprolina I (<i>cis</i>)	–83°	+158°	3,33	1,9	–	–
Poliprolina II (<i>trans</i>)	–78°	+149°	3,00	3,12	–	–

ϕ e ψ representam ângulos di-hedrais das ligações N–C_α e C_α–C, respectivamente; n é o número de resíduos por volta; r , número de átomos da cadeia principal dentro de uma volta de hélice ligada ao hidrogênio; h , elevação da hélice por resíduo de aminoácido; $t = 360^\circ/n$, torção da hélice por resíduo.

Fonte: Creighton, T. E. 1993. *Proteins: Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman Co., New York, pp. 158–159.

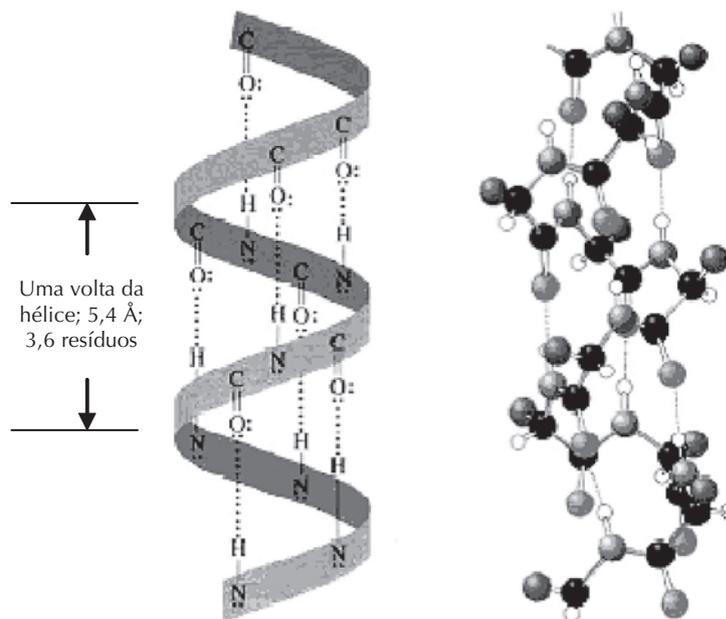


FIGURA 5.4 Arranjo espacial de polipeptídeos na α -hélice.

α -hélice devido a outras interações estabilizadoras no bastonete do tipo *coiled-coil* [82].

A maior parte da estrutura α -helicoidal encontrada nas proteínas é de caráter anfifílico, isto é, uma das metades da superfície da hélice é ocupada por resíduos hidrofóbicos e a outra, por resíduos hidrofílicos. Isso é demonstrado esquematicamente, sob a forma de uma roda helicoidal, na Figura 5.5 [13]. Na maioria das proteínas, a superfície não polar da hélice volta-se para o interior da proteína, estando geralmente envolvida em interações hidrofóbicas com outras superfícies não polares.

Outros tipos de estruturas helicoidais encontradas nas proteínas são a β -hélice e a 3_{10} -hélice. A β -hélice e a 3_{10} -hélice são menos estáveis que a α -hélice, em cerca de 0,5 kcal/mol e 1,0 kcal/mol, respectivamente. Essas hélices existem somente como pequenos segmentos que envolvem alguns resíduos de aminoácidos, não sendo componentes importantes na maioria das proteínas.

Em resíduos de prolina, devido à estrutura de anel formada pela ligação covalente da cadeia lateral propil com o grupo amino, a rotação da ligação N—C $^{\alpha}$ não é possível e, portanto, o ângulo ϕ possui o valor fixo de 70°. Além disso, uma vez que não há hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio, ele não pode formar pontes de hidrogênio. Em virtude desses dois atributos, os segmentos que contêm resíduos de prolina não podem formar α -hélice. Na verdade, a prolina é considerada como um aminoácido que quebra a α -hélice. Proteínas que contêm altos níveis de resíduos de prolina tendem a assumir uma estrutura aleatória ou aperiódica. Por exemplo, os resíduos de prolina constituem cerca de 17% do total de resíduos de aminoácidos na β -caseína, e 8,5%, na α_{s1} -caseína, sendo que, em decorrência da distribuição uniforme desses resíduos em suas estruturas primárias, as α -hélices não estão

presentes nessas proteínas e apresentam estruturas aleatórias. Entretanto, a poliprolina é capaz de formar dois tipos de estruturas helicoidais, denominadas *poliprolina I* e *poliprolina II*. Na poliprolina I, as ligações peptídicas estão na configuração *cis*, e na II, estão na *trans*. Outras características geométricas dessas hélices são fornecidas pela Tabela 5.6. O colágeno, que é a proteína animal mais abundante, apresenta-se como hélice poliprolina tipo II. No colágeno, em média, todo terceiro resíduo é uma glicina, que é usualmente precedida por um resíduo de prolina. Três cadeias polipeptídicas são entrelaçadas para se formar uma tripla hélice, sendo que a estabilidade da tripla hélice é mantida por pontes de hidrogênio intercadeias. Essa estrutura de tripla hélice singular é responsável pela alta força de tensão do colágeno.

Estrutura folha β : A folha β é uma estrutura estendida com geometrias específicas, as quais são apresentadas na Tabela 5.6. Nessa forma estendida, os grupos C=O e N—H são orientados perpendicularmente à direção da cadeia e, portanto, há possibilidade de ponte de hidrogênio apenas entre segmentos (intersegmento), e não dentro de um segmento (intra-segmento). As fitas β costumam ser compostas de 5-15 resíduos de aminoácidos. Nas proteínas, duas fitas β da mesma molécula interagem via pontes de hidrogênio, formando uma estrutura tipo folha conhecida como folha β -pregueada. Na estrutura tipo folha, as cadeias laterais são orientadas perpendicularmente (acima e abaixo) em relação ao plano da folha. Dependendo das orientações direcionais N \rightarrow C das fitas, podem formar-se dois tipos de estruturas de folha β -pregueada, denominadas *folha β paralela* e *folha β antiparalela* (Figura 5.6). Na folha β paralela, as direções das β -fitas correm em paralelo uma com a outra, enquanto na outra, elas correm em direções opostas, uma em relação à outra. Essas diferenças direcionais das cadeias afetam a geometria das pontes de hi-

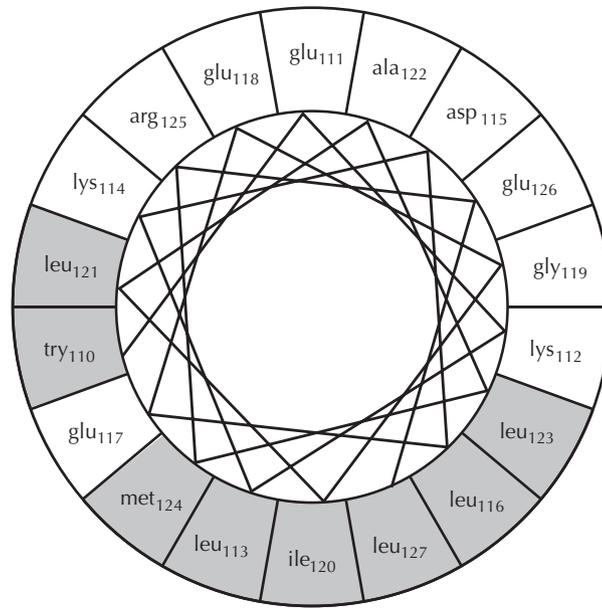


FIGURA 5.5 Vista transversal da estrutura helicoidal dos resíduos 110-127 do hormônio de crescimento bovino. A parte superior da roda helicoidal (não preenchida) representa a superfície hidrofílica e a base (preenchida) representa a superfície hidrofóbica da hélice anfifílica. (De Brems, D. N. 1990. em *Protein Folding* (Gierasch, L. M. e J. King, Eds.), American Association for the Advancement of Science, Washington, DC, p. 133. Cortesia da American Association for the Advancement of Science.)

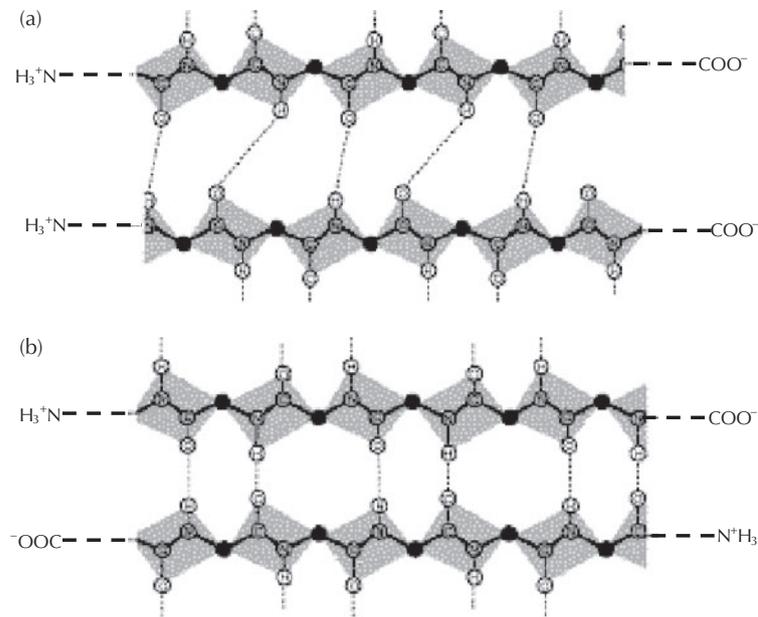


FIGURA 5.6 Folhas β (a) paralelas e (b) antiparalelas. As linhas pontilhadas representam as pontes de hidrogênio entre os grupos de peptídeos. As cadeias laterais dos átomos de C_{α} são orientadas perpendicularmente (para cima ou para baixo), em relação à direção da cadeia principal. (<http://www.schoolscience.com.uk>)

drogênio. Nas folhas β antiparalelas, os átomos $N-H \cdots O$ posicionam-se em linha reta (ângulo da ponte H zero), o que aumenta a estabilidade da ponte de hidrogênio, enquanto nas folhas β paralelas, eles se posicionam em um ângulo, o que reduz a estabilidade das pontes de hidrogênio. As folhas β antiparalelas são, portanto, mais estáveis que as paralelas.

O código binário que especifica a formação das estruturas das folhas β nas proteínas é $-N-P-N-P-N-P-N-P-$. Claramente, os segmentos polipeptídicos que contêm resíduos alternados polares e não polares apresentam forte propensão a formar estruturas de folha β . Segmentos ricos em volumosas cadeias laterais hidrofóbicas, como Val e Ile, também

têm tendência a formar uma estrutura folha β . Como esperado, um pouco de variação no código é tolerada.

A estrutura de folha β costuma ser mais estável que a de α -hélice. As proteínas que contêm grandes frações de estrutura folha β costumam exibir altas temperaturas de desnaturação. Exemplos disso são β -lactoglobulina (51% folha β) e globulina 11S da soja (64% de folha β), as quais apresentam temperaturas de desnaturação térmica de 75,6 e 84,5°C, respectivamente. Por outro lado, a temperatura de desnaturação da albumina sérica bovina, que tem 64% de estrutura α -hélice, é apenas cerca de 64°C [25,27]. Quando soluções de proteínas do tipo α -hélice são aquecidas e resfriadas, a α -hélice é usualmente convertida em folha β [27]. Entretanto, a conversão de folha β para α -hélice ainda não foi observada em proteínas.

Outra característica estrutural comum encontrada em proteínas é a curva- β ou volta- β . Ela acontece como resultado da inversão de 180° da cadeia polipeptídica envolvida na formação da folha β . A curva do tipo fechada (*hairpin-type*) é o resultado da formação da folha β antiparalela, enquanto a curva *crossover* é o resultado da formação da folha β paralela. Em geral, a curva- β envolve um segmento de quatro resíduos dobrando-se sobre si mesma e a curva é estabilizada por uma ponte de hidrogênio. Os resíduos dos aminoácidos Asp, Cys, Asn, Gly, Tyr e Pro são comuns em curvas β . Os conteúdos da estrutura secundária de várias proteínas são fornecidos pela Tabela 5.7.

5.3.1.3 Estrutura terciária

A estrutura terciária refere-se ao arranjo espacial atingido quando a cadeia linear da proteína com segmentos da estrutu-

ra secundária dobram-se ainda mais em uma forma compacta tridimensional. As estruturas terciárias da β -lactoglobulina e da faseolina (proteína de armazenamento do feijão) são apresentadas na Figura 5.7 [74,98].

A transformação de uma proteína proveniente de uma configuração linear (estrutura primária) em uma estrutura terciária dobrada é um processo complexo. Em nível molecular, as particularidades da formação da estrutura terciária da proteína estão presentes em sua sequência de aminoácidos. A partir da perspectiva termodinâmica, a formação da estrutura terciária envolve a otimização de várias interações (hidrofóbica, eletrostática, van der Waals e ponte de hidrogênio) entre vários grupos na proteína e a entropia conformacional da cadeia polipeptídica, a fim de que a energia líquida livre da molécula seja reduzida ao valor mínimo possível. A reconfiguração mais importante que acompanha a redução da energia livre durante a formação da estrutura terciária é o fato de a maioria dos resíduos hidrofóbicos do interior da estrutura proteica afastar-se do ambiente aquoso e, ainda, a ocorrência de uma relocação da maioria dos resíduos hidrofílicos, em especial os resíduos carregados, na interface proteína-água. Embora exista uma forte tendência para que resíduos hidrofóbicos sejam inseridos no interior da proteína, em geral, isso pode ser realizado apenas parcialmente devido a restrições espaciais. De fato, na maioria das proteínas globulares, os resíduos não polares ocupam cerca de 40-50% da superfície acessível à água das moléculas de proteína [84]. Além disso, alguns grupos polares são inevitavelmente inseridos no interior das proteínas. Entretanto, esses grupos polares inseridos são ligados via pontes de hidrogênio a outros grupos polares, de forma que suas energias

TABELA 5.7 Conteúdo da estrutura secundária de proteínas globulares selecionadas^a

Proteína	% α -hélice	% folha β	% β -voltas	% aperiódico
Desoxi-hemoglobina	85,7	0	8,8	5,5
Albumina sérica bovina	67,0	0	0	33,0
α ₅₁ -caseína	15,0	12,0	19,0	54,0
β -caseína	12,0	14,0	17,0	57,0
κ -caseína	23,0	31,0	14,0	32,0
Quimiotripsinogênio	11,0	49,4	21,2	18,4
Imunoglobulina G	2,5	67,2	17,8	12,5
Insulina (dímero)	60,8	14,7	10,8	15,7
Inibidor da tripsina bovina	25,9	44,8	8,8	20,5
Ribonuclease A	22,6	46,0	18,5	12,9
Lisozima de ovo	45,7	19,4	22,5	12,4
Ovomucoide	26,0	46,0	10,0	18,0
Ovoalbumina	49,0	13,0	14,0	24,0
Papaína	27,8	29,2	24,5	18,5
α -lactoalbumina	26,0	14,0	0	60,0
β -lactoglobulina	6,8	51,2	10,5	31,5
Soja 11S	8,5	64,5	0	27,0
Soja 7S	6,0	62,5	2,0	29,5
Faseolina	10,5	50,5	11,5	27,5
Mioglobina	79,0	0	5,0	16,0

^a Os valores representam a porcentagem do número total de resíduos de aminoácidos.

Fonte: Compilada a partir de várias fontes.

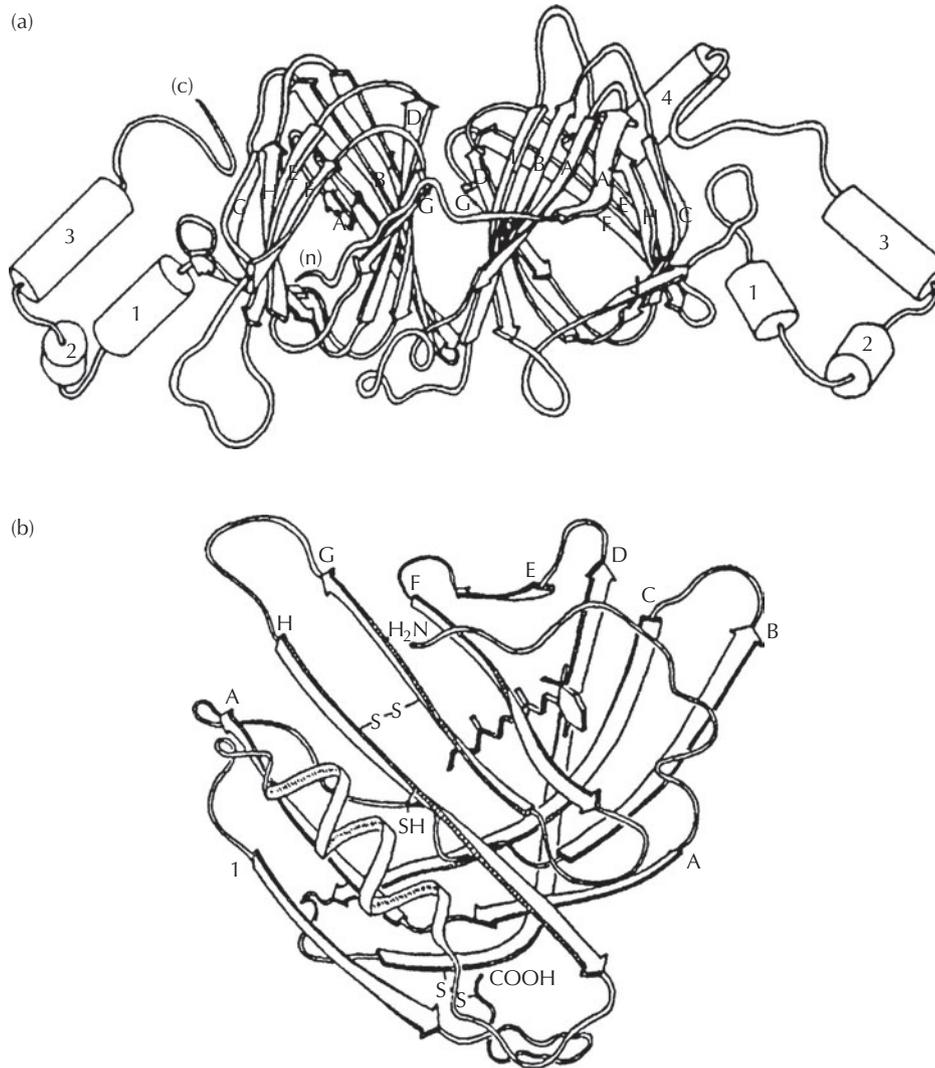


FIGURA 5.7 Estruturas terciárias da (a) subunidade da faseolina e (b) β -lactoglobulina. As setas indicam as fitas de folha β e os cilindros indicam a α -hélice. (De Lawrence, M. C. et al. 1990. *EMBO J.* 9:9-15 e Papiz, M. Z. et al. 1986. *Nature* 324:383-385, respectivamente.)

livres sejam minimizadas no ambiente apolar do interior da proteína. A proporção de superfícies apolares em relação às polares na superfície da proteína influencia muito várias de suas propriedades físico-químicas.

O dobramento de uma proteína a partir de uma estrutura linear, que resulta em uma estrutura terciária dobrada, é acompanhado pela redução da área interfacial proteína-água. Na verdade, a proteína é forçada a se dobrar a fim de minimizar a área interfacial proteína-água. A *área interfacial acessível* de uma proteína é definida como a área interfacial total de um espaço tridimensional, ocupado pela proteína, como determinado pela rolagem, falando de modo figurativo, de uma molécula esférica de água com raio 1,4 Å ao longo de toda a superfície da molécula proteica. Para as proteínas globulares nativas, a área interfacial acessível (em Å²) é uma função simples de sua massa molecular, M , como demonstrado por [84]:

$$A_s = 6,3M^{0,73} \quad (5.23)$$

A área interfacial acessível total de um polipeptídeo nascente, em seu estado estendido (molécula toda estendida sem as estruturas secundária, terciária ou quaternária), também está correlacionada ao peso molecular por [84]:

$$A_t = 1,48M + 21 \quad (5.24)$$

A área inicial de uma proteína que se dobrou durante a formação de uma estrutura terciária globular (A_b , área inserida) pode ser estimada pelas Equações 5.23 e 5.24.

A fração e a distribuição dos resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos na estrutura primária afetam várias propriedades físico-químicas da proteína. Por exemplo, a forma da molécula proteica é ditada por sua sequência de aminoácidos. Se a proteína contém um grande número de resíduos hidrofílicos distribuídos uniformemente em sua sequência, ela assumirá uma forma alongada, ou tipo bastonete. Isso se dá, pois, para uma determinada massa, formas alongadas têm uma grande proporção superfície-área em relação ao volume, de modo que mais resíduos hidrofílicos possam ser pos-

tos na superfície. Por outro lado, se uma proteína contém um grande número de resíduos hidrofóbicos, ela assumirá uma forma globular (quase esférica). Isso minimiza a proporção superfície-área em relação ao volume, permitindo que mais resíduos hidrofóbicos sejam inseridos no interior da proteína. Entre proteínas globulares, verifica-se, em geral, que moléculas maiores contêm mais frações de aminoácidos não polares do que as menores.

As estruturas terciárias de várias proteínas polipeptídicas simples são compostas de domínios. Estes são definidos como as regiões da sequência polipeptídica que se dobram, sozinhas, em uma forma terciária. Elas são, em essência, miniproteínas dentro de uma proteína única. A estabilidade estrutural de cada domínio é bastante independente dos demais. Na maioria das proteínas de cadeia simples, os domínios dobram-se independentemente, interagindo uns com os outros para formar a estrutura terciária única da proteína. Em algumas proteínas, como no caso da faseolina (Figura 5.7), a estrutura terciária pode conter dois ou mais domínios distintos (componentes estruturais) conectados por um segmento da cadeia polipeptídica. O número de domínios da proteína costuma depender de seu peso molecular. Proteínas pequenas (p. ex., lisozima, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina) com 100-150 resíduos de aminoácidos geralmente formam um único domínio de estrutura terciária. Proteínas grandes, como as imunoglobulinas, contêm diversos domínios. A cadeia leve da imunoglobulina G contém dois domínios, enquanto a cadeia pesada contém quatro. O tamanho de cada um desses domínios é de cerca de 120 resíduos de aminoácidos. A albumina sérica humana, que é composta de 585 resíduos de aminoácidos, tem três domínios homólogos, sendo que cada domínio contém dois subdomínios [56].

5.3.1.4 Estrutura quaternária

A estrutura quaternária refere-se ao arranjo espacial de uma proteína quando ela contém mais de uma cadeia polipeptídica. Várias proteínas biologicamente importantes existem como dímeros, trímeros, tetrameros, etc. Qualquer um desses complexos quaternários (também conhecidos como oligômeros) podem ser compostos de subunidades proteicas (monômeros) que são iguais (homogêneos) ou diferen-

tes (heterogêneos). Por exemplo, a β -lactoglobulina ocorre como um dímero, na faixa de pH entre 5-8, como um octâmero, na faixa de pH de 3-5 e como um monômero, na faixa de pH acima de 8, sendo que as unidades monoméricas desses complexos são idênticas. Por outro lado, a hemoglobina é um tetrâmero composto de duas cadeias polipeptídicas diferentes, isto é, cadeias α e β .

A formação de estruturas oligoméricas é resultante de interações específicas proteína-proteína. Elas são compostas primeiro por interações não covalentes tais como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. A fração de aminoácidos hidrofóbicos parece influenciar a tendência à formação de proteínas oligoméricas. Proteínas que contêm >30% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos exibem maior tendência a formar estruturas oligoméricas que as que contêm menos resíduos desses aminoácidos.

A formação da estrutura quaternária é impelida principalmente pela necessidade termodinâmica de inserir as superfícies hidrofóbicas expostas das subunidades. Quando o conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos de uma proteína for >30%, será fisicamente impossível formar uma estrutura terciária para encobrir todos os resíduos não polares. Como consequência, há uma maior probabilidade de que porções hidrofóbicas ocorram na superfície, sendo que a interação dessas porções entre monômeros adjacentes pode levar à formação de dímeros, trímeros, etc. (Figura 5.8).

Muitas proteínas alimentares, em especial as proteínas de cereais, ocorrem como oligômeros de polipeptídeos diferentes. Como se espera, essas proteínas costumam conter mais de 35% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Ile, Leu, Trp, Tyr, Val, Phe e Pro). Além disso, elas também contêm 6-12% de prolina [15]. Como resultado, as proteínas de cereais ocorrem em estruturas oligoméricas complexas. As proteínas de armazenamento importantes da soja, β -conglucina e glicinina, contêm cerca de 41 e 39% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, respectivamente. A β -conglucina é uma proteína trimérica composta de três diferentes subunidades. Ela exibe um complexo fenômeno de associação-dissociação em função da força iônica e do pH [89,123]. A glicinina é composta de 12 subunidades, seis delas são ácidas e as outras, básicas. Cada subunidade

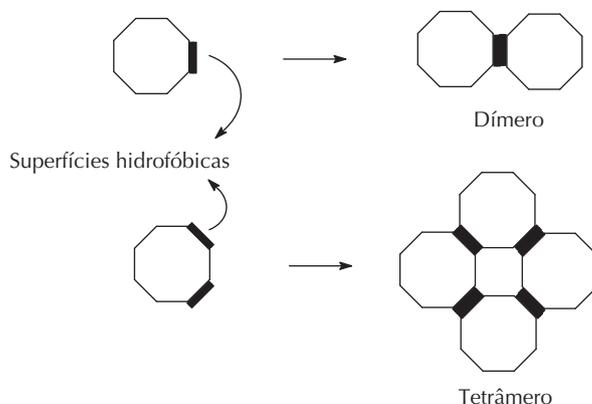


FIGURA 5.8 Representação esquemática da formação de dímeros e oligômeros em proteínas.

básica mantém uma ligação cruzada com uma subunidade ácida por meio de uma ponte dissulfeto. Os seis pares ácido-básicos são mantidos juntos no estado oligomérico por interações não covalentes. A glicinina também exibe um comportamento complexo de associação-dissociação em função da força iônica [89].

Em proteínas oligoméricas, a área superficial acessível, A_s , é correlacionada ao peso molecular do oligômero [84] por:

$$A_s = 5,3M^{0,76} \quad (5.25)$$

Essa relação é diferente da aplicada às proteínas monoméricas. A área de superfície inserida quando a estrutura oligomérica nativa é formada a partir de suas subunidades polipeptídicas constituintes pode ser estimada pela equação:

$$A_b = A_t - A_s = (1,48M + 21) - 5,3M_{0,76} \quad (5.26)$$

onde A_t é a área acessível total das subunidades do polipeptídeo nascente, em seu estado completamente estendido.

5.3.2 Forças envolvidas na estabilidade da estrutura das proteínas

O processo de dobramento de uma cadeia polipeptídica aleatória, para a formação de uma estrutura tridimensional, é bastante complexo. Como já foi mencionado, a base para a conformação biológica nativa está codificada na sequência de aminoácidos da proteína. Na década de 1960, Anfinsen e colaboradores mostraram que quando a ribonuclease desnaturada foi adicionada a uma solução tampão fisiológica, ela se dobrou de novo, atingindo sua conformação nativa e voltando a quase 100% de sua atividade biológica. Mostrou-se, posteriormente, que várias enzimas exibem uma propensão similar. A transformação lenta, porém espontânea, de um estado desordenado para um ordenado é facilitada por várias interações intramoleculares não covalentes. A conformação nativa de uma proteína é um estado termodinâmico, no qual várias interações favoráveis são maximizadas, sendo que as desfavoráveis são minimizadas de modo que a energia livre total de uma molécula de proteína encontra-se em seu menor valor possível. As forças que contribuem para o dobramento proteico podem ser agrupadas em duas categorias: (1) interações intramoleculares que emanam de forças intrínsecas à molécula proteica e (2) interações intramoleculares afetadas pelo solvente circundante. As interações de van der Waals e as interações espaciais pertencem à primeira categoria, enquanto as pontes de hidrogênio e as interações eletrostáticas e hidrofóbicas pertencem à segunda.

5.3.2.1 Restrições estéricas

Embora os ângulos φ e ψ tenham, teoricamente, 360° de rotação livre, seus valores são muito restritos por causa do impedimento espacial dos átomos da cadeia lateral. Em razão disso, os segmentos de uma cadeia polipeptídica podem assumir apenas um número limitado de configurações. Distorções da geometria plana de uma unidade peptídica, ou alongamento e dobramento de ligações, causarão o aumento

da energia livre da molécula. Entretanto, o dobramento de uma cadeia polipeptídica pode ocorrer apenas de modo que a deformação do comprimento e dos ângulos das ligações seja evitada.

5.3.2.2 Interações de van der Waals

Trata-se de interações dipolo induzidas por dipolo e dipolo-dipolo induzidas entre átomos neutros das moléculas de proteína. Quando dois átomos se aproximam um do outro, cada átomo induz um dipolo no outro por meio da polarização de uma nuvem de elétrons. A interação entre os dipolos induzidos tem um componente atrativo e um repulsivo. As magnitudes dessas forças dependem da distância interatômica. A energia de atração é inversamente proporcional à sexta potência da distância interatômica, e a interação repulsiva é inversamente proporcional à 12ª potência dessa distância. Portanto, a uma distância r , a energia líquida de interação entre dois átomos é dada pela função da energia potencial:

$$E_{vdW} = E_a + E_r = \frac{A}{r^6} + \frac{B}{r^{12}} \quad (5.27)$$

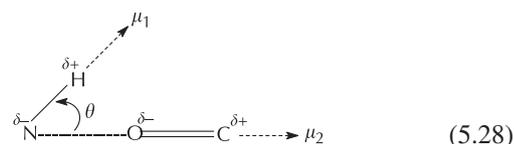
onde A e B são constantes para o par de átomos dado, e E_a e E_r são as energias de interação atrativa e repulsiva, respectivamente. As interações de van der Waals são muito fracas, diminuem rápido com a distância e se tornam desprezíveis acima de 6 \AA . A energia da interação de van der Waals para vários pares de átomos se estende de $-0,04$ a $-0,19 \text{ kcal/mol}$. Nas proteínas, contudo, uma vez que numerosos pares de átomos estão envolvidos nas interações de van der Waals, a soma de sua contribuição para o dobramento e a estabilidade da proteína é muito significativa.

5.3.2.3 Pontes de hidrogênio

As pontes de hidrogênio envolvem a interação de um átomo de hidrogênio que está covalentemente ligado a um átomo eletronegativo (como N, O ou S) com outro átomo eletronegativo. Uma ponte de hidrogênio pode ser representada como $D-H \cdots A$, em que D e A são os átomos eletronegativos doador e receptor, respectivamente. A força de uma ponte de hidrogênio varia entre 2 e $7,9 \text{ kcal/mol}$, dependendo do par de átomos eletronegativos envolvidos e o ângulo da ponte.

As proteínas contêm vários grupos capazes de formar pontes de hidrogênio. Alguns dos possíveis candidatos são demonstrados na Figura 5.9 [113]. Entre esses grupos, o maior número de pontes de hidrogênio é formado entre grupos de ligações peptídicas $N-H$ e $C=O$, nas estruturas α -hélice e folha β .

A ligação entre hidrogênio e peptídeo pode ser considerada como uma interação dipolo-dipolo permanente entre os dipolos $N^{\delta-}H^{\delta+}$ e $C^{\delta+}=O^{\delta-}$, como a seguir:



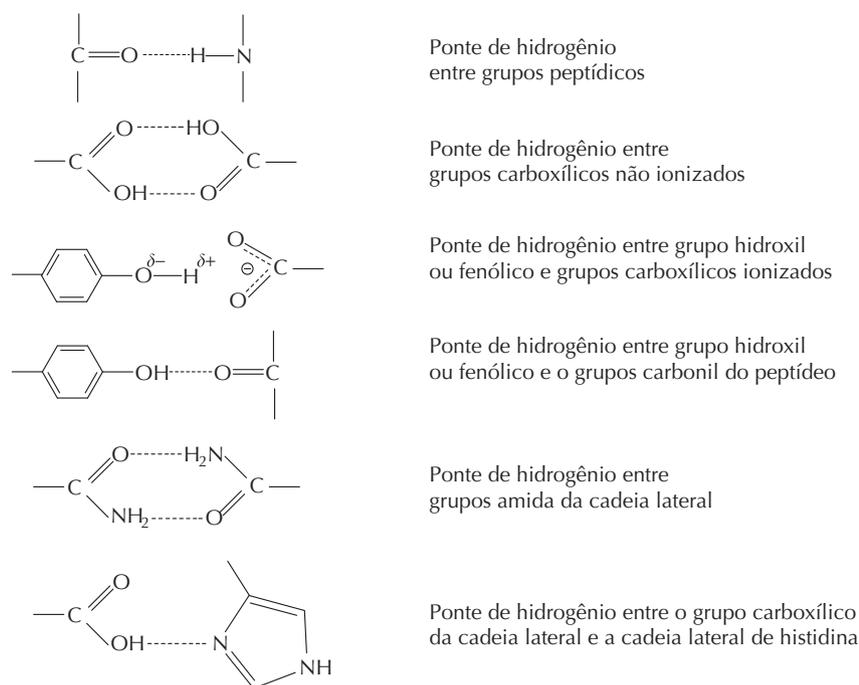


FIGURA 5.9 Grupos ligados por pontes de hidrogênio em proteínas. (Scheraga, H. A. 1963. Em *The Proteins*, 2nd edn., Vol. 1 (Neurath, H., Ed.), Academic Press, New York, pp. 478–594.)

A força da ponte de hidrogênio é dada pela função da energia potencial:

$$E_{\text{ponte-H}} = \frac{\mu_1 \mu_2}{4\pi \epsilon_0 \epsilon r^3} \cos \theta \quad (5.29)$$

onde μ_1 e μ_2 são momentos dipolo, ϵ_0 é a permitividade do vácuo, ϵ é a constante dielétrica do meio, r é a distância entre os átomos eletronegativos e θ é o ângulo da ponte de hidrogênio.

A energia da ponte de hidrogênio é diretamente proporcional ao produto dos momentos dipolo e ao cosseno do ângulo da ponte, sendo inversamente proporcional à terceira potência da distância $N \cdots O$ e à constante dielétrica do meio. A força da ponte de hidrogênio alcança o máximo quando θ é zero, sendo zero quando θ é 90° . As pontes de hidrogênio de estruturas α -hélice e folha β antiparalela apresentam valor de θ muito próximo de zero, enquanto as de folhas β paralelas apresentam valores θ maiores. A distância ótima $N \cdots O$ para a energia máxima da ponte de hidrogênio é $2,9 \text{ \AA}$. Em distâncias menores, a interação eletrostática repulsiva entre átomos $N^{\delta-}$ e $O^{\delta-}$ causa diminuição significativa da força da ponte de hidrogênio. Em distâncias maiores, a fraca interação entre os grupos $N-H$ e $C=O$ diminui a força da ponte de hidrogênio. A força das pontes de hidrogênio $N-H \cdots O=C$ no interior das proteínas, onde a constante dielétrica está próxima a um, é cerca de $4,5 \text{ kcal/mol}$. “Força” refere-se à quantidade de energia necessária para se quebrar a ponte.

A existência de pontes de hidrogênio nas proteínas está bem estabelecida. Já que a formação de cada ponte de hidrogênio diminui a energia livre da proteína em cerca de $-4,5 \text{ kcal/mol}$, acredita-se que, em geral, elas podem agir

não apenas como a força motriz do dobramento da proteína, mas também, podem contribuir muito para a estabilidade da estrutura nativa. Contudo, essa suposição não é válida. Uma vez que a água poder competir pela ponte de hidrogênio com os grupos $N-H$ e $C=O$, nas proteínas, as pontes de hidrogênio entre grupos não conseguem ocorrer espontaneamente, nem a constituição de pontes de hidrogênio $N-H \cdots O=C$ pode ser a força motriz para a formação de α -hélice e folha β pregueada nas proteínas. A ponte de hidrogênio é, principalmente, uma interação iônica. Como outras interações iônicas, sua estabilidade também depende da constante dielétrica do ambiente. A estabilidade de uma ponte de hidrogênio nas estruturas secundárias deve-se à constante dielétrica baixa criada pela interação entre resíduos não polares. Essas cadeias laterais volumosas impedem o acesso da água às pontes de hidrogênio $N-H \cdots O=C$. Elas são estáveis apenas enquanto estão protegidas da água.

5.3.2.4 Interações eletrostáticas

Como já foi citado, as proteínas contêm vários resíduos de aminoácidos com grupos ionizáveis. Em pH neutro, os resíduos de Asp e Glu estão negativamente carregados, e Lys, Arg e His estão carregados positivamente. Em pH alcalino, os resíduos de Cys e Tyr assumem carga negativa.

Dependendo do número relativo de resíduos carregados negativa e positivamente, as proteínas assumem uma carga líquida negativa ou uma carga líquida positiva, em pH neutro. O pH no qual a carga líquida é zero é chamado de *pH isoelétrico* (pI), sendo este diferente do *ponto isoiónico*. Ponto isoiónico é o pH da solução proteica na ausência de eletrólitos. O pH isoelétrico de uma proteína pode ser esti-

mado a partir de sua composição de aminoácidos e dos valores de pK_a de grupos ionizáveis, usando-se a equação de Hendersen-Hasselbach (Equação 5.5).

Com poucas exceções, quase todos os grupos carregados das proteínas estão distribuídos na superfície da molécula proteica. Visto que, em pH neutro, as proteínas assumem uma carga líquida positiva ou negativa, pode esperar-se que a interação repulsiva líquida entre cargas semelhantes desestabilize a estrutura da proteína. É ainda razoável supor que interações atrativas entre grupos com cargas opostas, em alguns locais críticos, possam contribuir para a estabilidade da estrutura proteica. Contudo, na realidade, o montante das forças repulsivas e atrativas é minimizado em soluções aquosas, por causa da alta permissividade da água. A energia de interação eletrostática entre duas cargas fixas q_1 e q_2 separadas pela distância r é dada por:

$$E_{\text{ele}} = \pm \frac{q_1 q_2}{4\pi \epsilon_0 \epsilon r} \quad (5.30)$$

No vácuo ou no ar ($\epsilon = 1$), a energia de interação eletrostática entre duas cargas a uma distância de cerca de 3 a 5 Å vai de ± 110 a ± 66 kcal/mol. Na água, entretanto, a energia de interação é reduzida para $\pm 1,4$ a $\pm 0,84$ kcal/mol, a qual é da ordem da energia térmica da molécula de proteína, a 37 °C. Portanto, as interações eletrostáticas atrativas e repulsivas entre cargas localizadas na superfície da proteína não contribuem de maneira significativa para a estabilidade proteica. No entanto, grupos parcialmente carregados inseridos no interior da proteína, onde a permissividade é menor do que a da água, costumam formar pontes salinas com energia de interação forte. Assim, a energia de interação eletrostática pode variar entre $\pm 0,84$ e ± 110 kcal/mol, dependendo da distância e da permissividade local.

Embora as interações eletrostáticas possam não agir como forças motrizes primárias para o dobramento de proteínas, a disposição dos grupos carregados que permanecerem expostos ao ambiente aquoso certamente influenciará o padrão do dobramento.

5.3.2.5 Interações hidrofóbicas

A partir das discussões anteriores, torna-se óbvio que, em soluções aquosas, as pontes de hidrogênio e as interações eletrostáticas entre diversos grupos polares em uma cadeia polipeptídica não possuem energia suficiente para agir como forças motrizes para o dobramento da proteína. As interações polares das proteínas não são muito estáveis em ambiente aquoso, sendo que suas estabilidades dependem da manutenção de um ambiente apolar. A principal força motriz do dobramento da proteína vem das interações hidrofóbicas entre grupos não polares.

Em soluções aquosas, a interação hidrofóbica entre grupos não polares é o resultado de uma interação termodinamicamente desfavorável entre água e grupos não polares. Quando um hidrocarboneto é dissolvido em água, a diferença da energia livre padrão (ΔG) é positiva e as diferenças de volume (ΔV) e de entalpia (ΔH) são negativas. Embora ΔH seja negativa, o que significa que existe interação favo-

rável entre a água e o hidrocarboneto, ΔG é positiva. Como $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ (onde T é a temperatura e ΔS é a diferença de entropia), a diferença positiva de ΔG deve resultar de uma grande diferença negativa de entropia, a qual compensa a diferença favorável de ΔH . A diminuição da entropia é causada pela formação de uma tela ou estrutura aquosa, semelhante a uma gaiola, ao redor do hidrocarboneto. Por causa da diferença positiva líquida de ΔG , a interação entre água e grupos não polares é bastante restrita. Conseqüentemente, em soluções aquosas, os grupos não polares tendem a se agregar, de modo que a área de contato direto com a água é minimizada (ver Capítulo 2). A interação induzida pela estrutura da água entre grupos não polares em soluções aquosas é conhecida como interação hidrofóbica. Nas proteínas, a interação hidrofóbica entre cadeias laterais não polares de resíduos de aminoácidos é a principal razão para o dobramento de proteínas em estruturas terciárias singulares, nas quais a maioria dos grupos não polares é proveniente do ambiente aquoso.

Uma vez que a interação hidrofóbica é a antítese da solução de grupos não polares na água, o valor de ΔG para interações hidrofóbicas é negativo, enquanto os valores de ΔV , ΔH e ΔS são positivos. Diferente de outras interações não covalentes, as interações hidrofóbicas são endotérmicas, isto é, são mais fortes a altas temperaturas, sendo mais fracas a baixas temperaturas (em oposição ao que acontece com as pontes de hidrogênio). A variação de energia livre hidrofóbica com a temperatura costuma seguir uma função quadrática,

$$\Delta G_{H\phi} = a + bT + cT^2 \quad (5.31)$$

onde a , b e c são constantes e T é a temperatura absoluta.

A energia de interação hidrofóbica entre duas moléculas esféricas não polares pode ser estimada a partir da equação de energia potencial [59]:

$$E_{H\phi} = -20 \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} e^{-D/D_0} \text{ kcal/mol} \quad (5.32)$$

onde R_1 e R_2 são os raios das moléculas não polares, D é a distância em nm entre as moléculas, e D_0 é a extensão do decaimento (1nm). Diferente das ligações eletrostáticas, as pontes de hidrogênio e as interações de van der Waals, que seguem uma relação que se baseia na lei de potência com a distância entre os grupos que interagem, a interação hidrofóbica segue uma relação exponencial com a distância entre os grupos que interagem. Desse modo, ela é efetiva em distâncias relativamente longas (p. ex., 10 nm).

A energia hidrofóbica livre das proteínas não pode ser quantificada usando-se a equação supracitada, o que se deve ao envolvimento de vários grupos não polares. É possível, contudo, estimar-se a energia hidrofóbica livre de uma proteína por meio de outras correlações empíricas. A energia hidrofóbica livre de uma molécula é diretamente proporcional à área de superfície não polar que está acessível à água (Figura 5.10) [107]. A constante de proporcionalidade, isto é, a inclinação, varia entre 22 cal mol⁻¹ Å⁻² para as cadeias laterais de Ala, Val, Leu e Phe, e 26 cal mol⁻¹ Å⁻² para Ser, Thr, Trp e Met. Em média, a hidrofobicidade das cadeias laterais dos

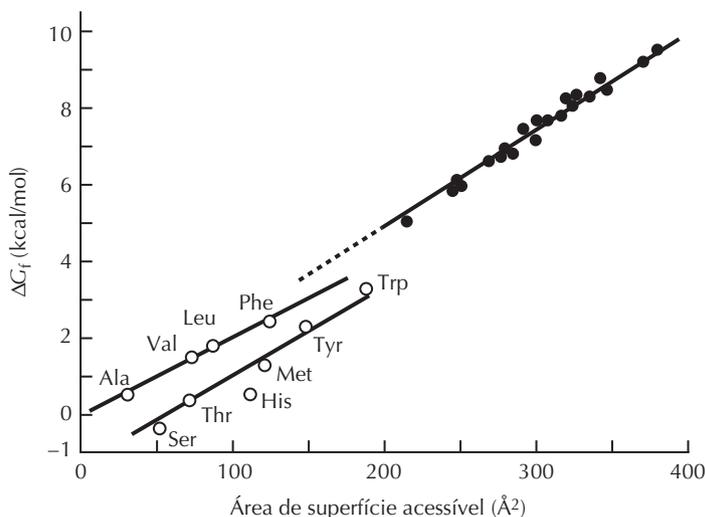


FIGURA 5.10 Relação entre hidrofobicidade e área de superfície acessível das cadeias laterais de aminoácidos (círculos abertos) e hidrocarbonetos (círculos preenchidos). (De Richards, F. M. 1977. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 6:151–176. Cortesia da Annual Reviews, Inc.)

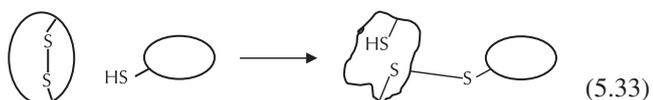
aminoácidos é cerca de $24 \text{ cal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. Isso está próximo do valor de $25 \text{ cal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ para os alcanos, o que significa que para a remoção de cada um \AA^2 de área da superfície não polar do ambiente aquoso, uma proteína diminuirá sua energia livre em 24 cal/mol . Sendo assim, a energia hidrofóbica livre de uma proteína pode ser estimada pela multiplicação do total da área de superfície “inserida” por $24 \text{ cal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$.

A área de superfície inserida em várias proteínas globulares e as energias hidrofóbicas livres são mostradas na Tabela 5.8 [11]. É evidente que a energia hidrofóbica livre contribui do modo significativo para a estabilidade da estrutura proteica. A média de energia hidrofóbica livre por resíduo de aminoácido em proteínas globulares chega a aproximadamente $2,5 \text{ kcal/mol}$.

5.3.2.6 Pontes dissulfeto

As pontes dissulfeto são as únicas ligações cruzadas de cadeia lateral covalentes encontradas nas proteínas. Elas podem ocorrer tanto intramolecular como intermolecularmente. Nas proteínas monoméricas, as pontes dissulfeto são formadas como resultado do dobramento de proteínas. Quando dois resíduos Cys ficam próximos um do outro, com orientação apropriada, a oxidação de grupos sulfidril pelo oxigênio molecular resulta em formação de pontes dissulfeto. Uma vez formadas, elas ajudam a estabilizar a estrutura dobrada das proteínas.

Misturas proteicas que contêm resíduos de cistina e de Cys são capazes de sofrer reações de troca sulfidril-dissulfeto como é mostrado a seguir:



A reação de troca também pode ocorrer dentro de uma única proteína desnaturada se ela contiver um grupo sulfidril livre e uma ponte dissulfeto. Essa reação costuma levar à diminuição de estabilidade da molécula proteica.

Em resumo, a formação de uma estrutura de proteína tridimensional específica é o resultado líquido de diversas interações não covalentes de atração e repulsão e quaisquer pontes dissulfeto.

5.3.3 Estabilidade conformacional e adaptabilidade das proteínas

A estabilidade da estrutura nativa das proteínas é definida como a diferença de energia livre entre os estados nativo e desnaturado (ou desordenado) da molécula proteica. Ela costuma ser representada como ΔG_D , referindo-se à quantidade de energia necessária para desdobrar uma proteína do estado nativo para um estado desnaturado.

Todas as interações não covalentes discutidas anteriormente, exceto as interações eletrostáticas repulsivas, contribuem para a estabilidade da estrutura nativa da proteína. A influência estabilizadora sobre a estrutura nativa das mudanças na energia livre total atribuída a essas interações chega a centenas de kcal/mol. Entretanto, o ΔG_D líquido da maioria das proteínas está na faixa de $5\text{--}20 \text{ kcal/mol}$. A principal força que desestabiliza a estrutura nativa é a entropia conformacional da cadeia polipeptídica. A perda dos movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais ocorrente quando um polipeptídeo em estado desordenado é ordenado em uma estrutura compacta diminui sua entropia conformacional. O aumento de energia livre resultante dessa perda de entropia conformacional é mais do que compensado pelas interações não covalentes favoráveis, resultando em redução líquida de energia livre. Desse modo, a diferença de energia livre entre os estados nativo e desnaturado pode ser expresso como

$$\Delta G_{D \rightarrow N} = \Delta G_{\text{ponte-H}} + \Delta G_{\text{ele}} + \Delta G_{H\phi} + \Delta G_{\text{vdW}} - T\Delta S_{\text{conf}} \quad (5.34)$$

onde $\Delta G_{\text{ponte-H}}$, ΔG_{ele} , $\Delta G_{H\phi}$ e ΔG_{vdW} , são, respectivamente, as mudanças de energia livre para interações com pontes de

TABELA 5.8 Área de superfície acessível (A_s), área de superfície inserida (A_b) e energia hidrofóbica livre em proteínas

Proteína	MW (Daltons)	A_s (Å ²)	A_b (Å ²)	$\Delta G_{H\phi}$ (kcal/mol)
Parvalbumina	11.450	5.930	11.037	269
Citocromo C	11.930	5.570	12.107	294
Ribonuclease A	13.690	6.790	13.492	329
Lisozima	14.700	6.620	15.157	369
Mioglobina	17.300	7.600	18.025	439
Proteína transportadora de retinol (RDB)	20.050	9.160	20.535	500
Papaína	23.270	9.140	25.320	617
Quimotripsina	25.030	10.440	26.625	648
Subtilsina	27.540	10.390	30.390	739
Anidrase carbônica B	28.370	11.020	30.988	755
Carboxipeptidase A	34.450	12.110	38.897	947
Termolisina	34.500	12.650	38.431	935

Os valores de A_s são da Referência 84.

A_b foi calculado a partir das Equações 5.22 e 5.23.

hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e interações de van der Waals, enquanto ΔS_{conf} é a entropia conformacional da cadeia polipeptídica. A ΔS_{conf} de uma proteína em estado desordenado é de cerca de 1,9 a 10 cal mol⁻¹K⁻¹ por resíduo. Em geral, supõe-se um valor médio de 5,2 cal mol⁻¹K⁻¹ por resíduo.

Uma proteína com 100 resíduos de aminoácidos e 310 K terá entropia conformacional de cerca de $5,2 \times 100 \times 310 = 161,2$ kcal/mol. Essa energia conformacional desestabilizadora reduzirá a estabilidade líquida da estrutura nativa resultante de interações não covalentes.

Os valores de ΔG_D , isto é, a energia necessária ao desdobramento de várias proteínas, estão apresentados na Tabela 5.9. Esses valores indicam que, apesar de numerosas interações intramoleculares, as proteínas são apenas marginalmente estáveis. Por exemplo, os valores de ΔG_D da maioria das proteínas correspondem ao equivalente energético de uma a três pontes de hidrogênio ou cerca de duas a cinco interações hidrofóbicas, o que sugere que a quebra de algumas interações não covalentes desestabilizaria a estrutura nativa de muitas proteínas.

Em contrapartida, parece que as proteínas não foram projetadas para serem moléculas rígidas. Elas são flexíveis, seu

TABELA 5.9 Valores de ΔG_D para proteínas selecionadas

Proteína	pH	T (°C)	ΔG_D (kcal/mol)
α -lactoalbumina	7	25	4,4
β -lactoglobulina bovina A + B	7,2	25	7,6
β -lactoglobulina bovina A	3,15	25	10,2
β -lactoglobulina bovina B	3,15	25	11,9
Lisozima T4	3,0	37	4,6
Lisozima da clara do ovo de galinha	7,0	37	12,2
Actina G	7,5	25	6,5
Lipase (de <i>Aspergillus</i>)	7,0	–	11,2
Troponina	7,0	37	4,7
Ovoalbumina	7,0	25	6,0
Citocromo C	5,0	37	7,9
Ribonuclease	7,0	37	8,1
α -quimiotripsina	4,0	37	8,1
Tripsina	–	37	13,2
Pepsina	6,5	25	10,9
Hormônio do crescimento	8,0	25	14,2
Insulina	3,0	20	6,5
Fosfatase alcalina	7,5	30	20,3

ΔG_D representa $G_U - G_N$, sendo que G_U e G_N são, respectivamente, as energias livres dos estados desnaturado e nativo de uma molécula proteica.

Fonte: Compilada a partir de várias fontes.

estado nativo é um estado metaestável e a quebra de uma a três pontes de hidrogênio ou de algumas interações hidrofóbicas pode causar mudanças conformacionais cooperativas com facilidade. A adaptabilidade conformacional a mudanças nas condições da solução é necessária para que as proteínas realizem diversas funções biológicas importantes. Por exemplo, a ligação eficiente dos substratos ou ligantes prostéticos a enzimas envolve, invariavelmente, a reorganização dos segmentos polipeptídicos nos sítios de ligação. Por outro lado, as proteínas que necessitam de alta estabilidade estrutural para realizar suas funções fisiológicas costumam ser estabilizadas por pontes dissulfeto intramoleculares, que neutralizam de maneira efetiva a entropia conformacional (i.e., a tendência da cadeia polipeptídica a desdobrar-se).

5.4 DESNATURAÇÃO PROTEICA

A estrutura nativa de uma proteína é o resultado líquido de várias interações atrativas e repulsivas que emanam de forças intramoleculares variadas, bem como da interação de vários grupos proteicos com a água como solvente circundante. Contudo, a estrutura nativa é, em grande parte, o produto do ambiente da proteína. O estado nativo é, termodinamicamente, o mais estável com a energia livre mais baixa possível. Qualquer mudança em seu ambiente, tal como pH, força iônica, temperatura, composição de solvente, etc., forçará a molécula a assumir uma nova estrutura de equilíbrio. Mudanças sutis na estrutura, as quais não alterem drasticamente a arquitetura molecular da proteína, costumam ser consideradas como “adaptabilidade conformacional”, enquanto mudanças importantes nas estruturas secundária, terciária e quaternária, sem clivagem das ligações peptídicas da cadeia principal, são consideradas “desnaturação”. Do ponto de vista estrutural, enquanto a estrutura nativa de uma proteína é uma entidade bem definida, com coordenadas estruturais para cada um dos átomos da molécula, podendo ser obtida a partir de sua estrutura cristalográfica, o mesmo não ocorre com a estrutura desnaturada. A desnaturação é um fenômeno no qual o estado inicial bem definido de uma proteína formada sob condições

fisiológicas é transformado em uma estrutura final mal definida sob condições não fisiológicas, usando-se um agente desnaturante. Isso não envolve nenhuma mudança química na proteína. No estado desnaturado, em decorrência de um maior movimento de rotação dos ângulos di-hedrais da cadeia polipeptídica, a proteína pode assumir vários estados conformacionais, diferindo apenas ligeiramente em energia livre. A Figura 5.11 demonstra isso de forma esquemática. Alguns estados desnaturados possuem mais estruturas residuais dobradas que outros. Deve-se notar que, mesmo no estado completamente desnaturado, as proteínas globulares típicas, com exceção da gelatina, não se comportam como verdadeiras *random coil* (estado de desordem estrutural). Isso se deve ao fato de que o caráter parcial da ligação dupla das ligações amida e as restrições espaciais locais causadas pelas cadeias laterais volumosas não permitem a liberdade rotacional de 360° para a sequência polipeptídica.

A viscosidade intrínseca ($[\eta]$) de uma proteína desnaturada por completo é uma função do número de resíduos de aminoácidos, sendo expressa por [121]:

$$[\eta] = 0,716\eta^{0,66} \quad (5.35)$$

onde η é o número de resíduos de aminoácidos da proteína.

Com frequência, a desnaturação tem uma conotação negativa, pois ela indica perda de algumas propriedades. Muitas proteínas biologicamente ativas perdem sua atividade após a desnaturação. No caso das proteínas alimentares, a desnaturação costuma causar perda da solubilidade e de algumas propriedades funcionais. No entanto, do ponto de vista da aplicação do alimento, a desnaturação proteica durante o processamento não é sempre indesejável. De fato, em alguns casos, ela é muito desejável. Por exemplo, a desnaturação parcial de proteínas na interface ar-água e óleo-água melhora as propriedades emulsificantes e de formação de espuma, enquanto a desnaturação térmica excessiva das proteínas de soja diminui suas propriedades emulsificantes e de formação de espuma. Por outro lado, a desnaturação térmica melhora acentuadamente a digestibilidade das proteínas das leguminosas, o que resulta da inativação de inibidores de

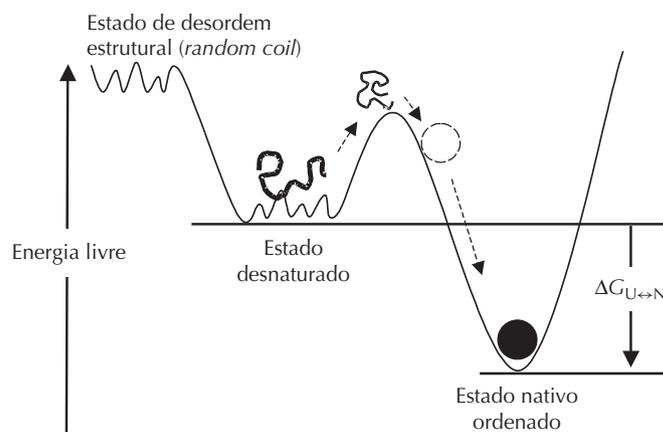


FIGURA 5.11 Representação esquemática da energia de uma molécula proteica em função de sua conformação. A conformação com a menor energia geralmente é a do estado nativo.

tripsina. Em geral, as proteínas parcialmente desnaturadas são mais digeríveis do que as naturais. Em bebidas proteicas, nas quais a alta solubilidade e a dispersibilidade de proteínas é necessária, até mesmo desnaturações parciais da proteína, durante o processamento, podem causar floculação e precipitação durante o armazenamento, podendo, assim, afetar de modo adverso os atributos sensoriais do produto. Assim, para se desenvolver estratégias de processamento apropriadas, é imperativo que haja um entendimento básico sobre os fatores ambientais e sobre outros fatores que afetam a estabilidade estrutural das proteínas em sistemas alimentícios.

5.4.1 Termodinâmica da desnaturação

A desnaturação é um fenômeno que envolve a transformação de uma estrutura dobrada e bem definida de uma proteína, formada sob condições fisiológicas, em um estado desordenado, sob condições não fisiológicas. Como a estrutura não é um parâmetro facilmente quantificável, a medição direta das frações das proteínas nativa e desnaturada não é possível. Entretanto, mudanças conformacionais nas proteínas afetam invariavelmente várias de suas propriedades físicas e químicas, como absorvância no ultravioleta, fluorescência, viscosidade, coeficiente de sedimentação, rotação óptica, di-croísmo circular, reatividade de grupos sulfidril e atividade enzimática. Desse modo, a desnaturação proteica pode ser estudada por monitoramento das mudanças nessas propriedades físico-químicas.

Quando mudanças em uma propriedade física ou química, y , são monitoradas como função da temperatura ou da concentração do desnaturante, muitas proteínas globulares monoméricas exibem perfis de desnaturação, como demonstrado na Figura 5.12. y_N e y_D são valores de y para os estados nativo e desnaturado da proteína, respectivamente.

Para a maioria das proteínas, à medida que a concentração do desnaturante (ou temperatura) aumenta, o valor de y permanece inalterado a princípio e, acima de um ponto crítico, seu valor muda abruptamente de y_N para y_D , dentro de uma faixa estreita de concentração ou temperatura do desnaturante. Para a maioria das proteínas globulares, essa transição é muito íngreme, indicando que a desnaturação da proteína é um processo cooperativo. Ou seja, uma vez que a molécula de proteína começa a se desdobrar ou, uma vez que algumas interações na proteína são quebradas, a molécula inteira se desdobra, com leve aumento adicional de concentração ou temperatura do desnaturante. A natureza cooperativa do desdobraimento sugere que as proteínas globulares ocorrem apenas nos estados nativo e desnaturado, isto é, nos estados intermediários não são possíveis. Isso é conhecido como modelo de “transição em dois estados”. Para o modelo de dois estados, o equilíbrio entre os estados nativo e desnaturado na região de transição cooperativa pode ser expresso como:



onde K_D é a constante de equilíbrio. Como a concentração de moléculas de proteína desnaturada é extremamente baixa (entre 1 e 10^9) na ausência de um desnaturante (ou quantidade crítica de calor) a estimativa de K_D não é possível. Entretanto, na região de transição, ou seja, em concentração alta o suficiente de desnaturante (ou temperatura suficientemente alta), o aumento da quantidade de moléculas de proteína desnaturada permite a determinação de uma constante de equilíbrio aparente, $K_{D,app}$. Na região de transição, onde tanto as moléculas proteicas naturais como as desnaturadas estão presentes, o valor de y é dado por:

$$y = f_N y_N + f_D y_D \quad (5.37)$$

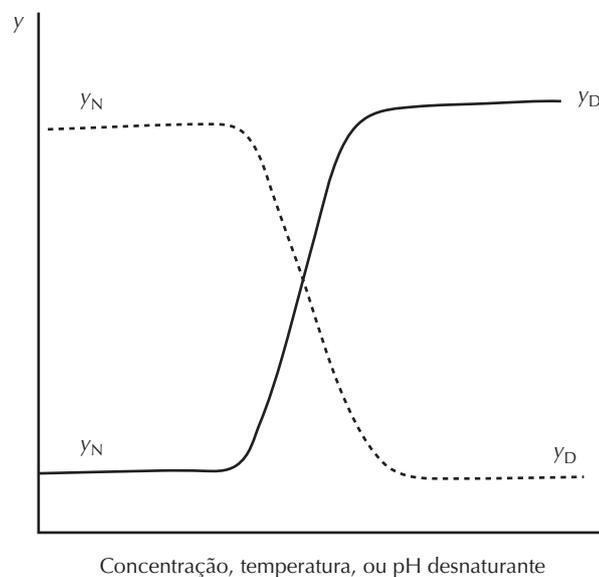


FIGURA 5.12 Curvas típicas de desnaturação proteica, y representa qualquer propriedade física ou química mensurável de uma molécula de proteína que varia com a conformação proteica, y_N e y_D são os valores de y para os estados nativo e desnaturado, respectivamente.

onde f_N e f_D são as frações da proteína nos estados nativo e desnaturado, e y_N e y_D são valores de y para os estados nativo e desnaturado, respectivamente. A partir da Figura 5.12,

$$f_N = \frac{(y_D - y)}{(y_D - y_N)} \quad (5.38)$$

$$f_D = \frac{(y - y_N)}{(y_D - y_N)} \quad (5.39)$$

A constante de equilíbrio aparente é dada por:

$$K_{app} = \frac{f_D}{f_N} = \frac{(y - y_N)}{(y - y_D)} \quad (5.40)$$

e a energia livre da desnaturação é dada por:

$$\Delta G_{app} = RT \ln K_{D,app} \quad (5.41)$$

O gráfico de $-RT \ln K_{D,app}$ versus a concentração de desnaturante é geralmente linear e então a K_D e a ΔG_D da proteína em água pura (ou em tampão na ausência de desnaturante) é obtida a partir da intersecção com y . A entalpia de desnaturação, ΔH_D , é obtida a partir da variação da mudança de energia livre com a temperatura, utilizando-se a equação de van't Hoff:

$$\Delta H_D = -R \frac{d(\ln K_D)}{d(1/T)} \quad (5.42)$$

As proteínas monoméricas que contêm dois ou mais domínios com estabilidades estruturais diferentes costumam exibir diversas etapas de transição no perfil de desnaturação. Se as etapas de transição estiverem bem separadas, as estabilidades de cada domínio podem ser obtidas a partir do perfil de transição, utilizando-se o modelo de dois estados supracitada. A desnaturação de proteínas oligoméricas ocorre via dissociação de subunidades, seguida da desnaturação das subunidades.

A desnaturação proteica pode ser reversível, em especial para proteínas monoméricas pequenas. Quando o desnaturante é removido da solução proteica (ou a amostra é resfriada), a maioria das proteínas monoméricas (na ausência de agregação) se reorganiza para atingir sua conformação nativa sob condições de solução apropriadas, como pH, força iônica, potencial redox e concentração proteica. Muitas proteínas reorganizam-se quando a concentração proteica está abaixo de $1 \mu\text{M}$. Acima de $1 \mu\text{M}$ de concentração proteica, a reorganização é parcialmente inibida por causa da maior interação intermolecular ocorrida à custa de interações intramoleculares. Potenciais redox comparáveis aos do fluido biológico facilitam a formação de pares corretos de pontes dissulfeto durante o redobramento.

5.4.2 Agentes desnaturantes

5.4.2.1 Agentes físicos

5.4.2.1.1 Temperatura e desnaturação

O calor é o agente desnaturante mais utilizado no processamento e na preservação de alimentos. As proteínas passam por graus variados de desnaturação durante o processamen-

to. Isso pode afetar suas propriedades funcionais em alimentos, sendo, por isso, importante que se entendam os fatores que afetam a desnaturação proteica.

Quando uma solução proteica é aquecida gradualmente acima da temperatura crítica, ela sofre uma transição brusca do estado nativo para o desnaturado. A temperatura no ponto médio de transição, no qual a proporção da concentração dos estados nativo e desnaturado é 1, é conhecido como temperatura de fusão T_f ou como temperatura de desnaturação T_d . O mecanismo de desnaturação das proteínas induzido pela temperatura envolve principalmente o efeito da temperatura sobre a estabilidade das interações não covalentes. Nesse aspecto, as pontes de hidrogênio e as interações eletrostáticas, que são exotérmicas por natureza, são desestabilizadas, sendo que as interações hidrofóbicas, que são endotérmicas, são estabilizadas à medida que a temperatura aumenta. A força das interações hidrofóbicas alcança seu máximo em cerca de $70-80^\circ\text{C}$ [22]. Além das interações não covalentes, a dependência da temperatura da entropia conformacional, $T\Delta S_{conf}$, também desempenha um papel importante na estabilidade das proteínas. A entropia conformacional da cadeia aumenta conforme a temperatura se eleva, o que favorece um estado desordenado. A estabilidade líquida de uma proteína em determinada temperatura é, desse modo, a soma total dessas interações. Entretanto, uma análise cuidadosa do efeito da temperatura sobre várias interações em proteínas revela o seguinte: nas proteínas globulares, a maioria dos grupos carregados ocorre na superfície da molécula proteica, estando completamente expostos ao meio aquoso muito dielétrico. Por causa do efeito de varredura dielétrica da água, as interações eletrostáticas atrativas e repulsivas entre os resíduos carregados são muito reduzidas. Além disso, sob força iônica fisiológica, a varredura de grupos carregados nas proteínas por contraíons, reduz ainda mais as interações eletrostáticas nas proteínas. Por causa desses fatos, a influência das interações eletrostáticas nas proteínas não é significativa. De modo semelhante, as pontes de hidrogênio são instáveis em meio aquoso e, em consequência disso, sua estabilidade nas proteínas depende das interações hidrofóbicas que criam um meio dielétrico baixo no local. Isso implica que, à medida que um meio não polar é mantido, as pontes de hidrogênio na proteína permanecem intactas com o aumento da temperatura. Esses fatos sugerem que, embora as interações polares sejam afetadas pela temperatura, elas não costumam contribuir para a desnaturação proteica induzida pelo calor. Com base nessas considerações, a estabilidade do estado nativo da proteína pode ser considerada como uma diferença de energia líquida livre proveniente das interações hidrofóbicas que tendem a favorecer o estado ordenado e a entropia conformacional da cadeia que favorece o estado desordenado. Isto é,

$$\Delta G_{N \rightarrow D} = \Delta G_{H\phi} + \Delta G_{conf} \quad (5.43)$$

A dependência da estabilidade da proteína em relação à temperatura, sob pressão constante, pode ser expressa como [33]

$$\frac{\partial \Delta G_{N \rightarrow D}}{\partial T} = \frac{\partial \Delta G_{H\phi}}{\partial T} + \frac{\partial \Delta G_{conf}}{\partial T} \quad (5.44)$$

As interações hidrofóbicas são fortalecidas em temperaturas mais altas; portanto $\partial \Delta G_{H\phi} / \partial T > 0$. A entropia conformacional aumenta a partir do desdobramento da proteína; portanto, $\partial \Delta G_{conf} / \partial T < 0$. À medida que a temperatura aumenta, a interação entre essas forças opostas alcança um ponto no qual $\partial \Delta G_{N \rightarrow D} / \partial T \approx 0$. A temperatura na qual esse processo ocorre sinaliza a temperatura de desnaturação (T_d) da proteína. As contribuições relativas das forças principais para a estabilidade da molécula proteica em função da temperatura estão representadas na Figura 5.13. Deve-se notar que a estabilidade das pontes de hidrogênio nas proteínas não é afetada significativamente pela temperatura. Os valores de T_d de algumas proteínas estão listados na Tabela 5.10 [14].

Supõe-se, com frequência, que quanto menor a temperatura, maior será a estabilidade de uma proteína. Isso não é sempre verdadeiro. Algumas proteínas são desnaturadas em baixas temperaturas [16]. Por exemplo (Figura 5.14) [18,73], a estabilidade da lisozima aumenta com a redução da temperatura, enquanto a estabilidade da mioglobina e de um mutante da lisozima do fago T_4 demonstram sua estabilidade máxima a cerca de 30 e 12,5° C, respectivamente. Abaixo e acima dessas temperaturas, a mioglobina e a lisozima do fago T_4 são menos estáveis. Quando armazenadas abaixo de 0°C, essas duas proteínas sofrem desnaturação induzida pelo frio. A temperatura da estabilidade máxima (mínimo de energia livre) depende do impacto relativo da temperatura sobre as forças de estabilização e desestabilização na proteína. As proteínas que são estabilizadas principalmente por interações hidrofóbicas são mais estáveis em temperaturas próximas à ambiente do que em temperatura de refrigeração. As pontes dissulfeto intramoleculares

das proteínas tendem a estabilizá-las, tanto em baixas como em altas temperaturas, pois elas se opõem à entropia conformacional da cadeia proteica.

Várias proteínas alimentares sofrem desnaturação e dissociação reversíveis em baixas temperaturas. A glicinina, uma das proteínas de armazenamento da soja, agrega-se e precipita-se quando armazenada a 2°C [68], tornando-se então solúvel quando retorna à temperatura ambiente. Quando o leite desnatado é armazenado a 4°C, a β -caseína dissocia-se das micelas de caseína, e isso altera as propriedades físico-químicas e coagulantes das micelas de caseína. Diversas enzimas oligoméricas, como lactato desidrogenase e gliceraldeído fosfato desidrogenase, perdem a maior parte de sua atividade enzimática quando armazenadas a 4°C, o que tem sido atribuído à dissociação das subunidades. Entretanto, quando aquecidas até a temperatura ambiente e mantidas nessa temperatura por algumas horas, elas se reassociam e recuperam completamente sua atividade [127].

A composição de aminoácidos afeta a estabilidade térmica das proteínas. As proteínas que contêm maiores porções de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente Val, Ile, Leu e Phe, tendem a ser mais estáveis que as mais hidrofílicas [137]. Além disso, há uma forte correlação positiva entre a termoestabilidade e o número percentual de alguns resíduos de aminoácidos. Por exemplo, a análise estatística de quinze proteínas diferentes demonstrou que suas temperaturas de desnaturação térmica estão correlacionadas positivamente ($r = 0,98$) à soma do número percentual dos resíduos de Asp, Cys, Glu, Lys, Leu, Arg, Trp e Tyr. Por outro lado, as temperaturas de desnaturação térmica do mesmo grupo de proteínas estão correlacionadas negativamente ($r = -0,975$) à soma do número percentual de Ala, Asp, Gly,

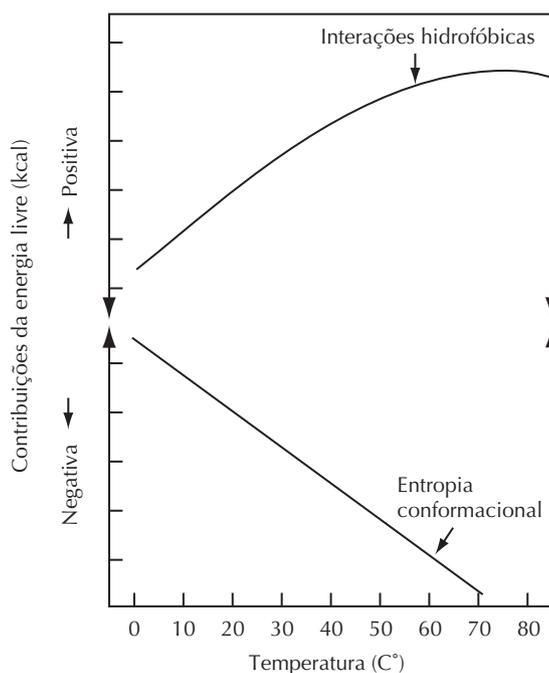


FIGURA 5.13 Mudanças relativas em contribuições da energia livre por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e entropia conformacional para a estabilidade das proteínas em função da temperatura.

TABELA 5.10 Temperaturas de desnaturação térmica (T_d) e hidrofobicidades médias de proteínas

Proteína	T_d	Hidrofobicidade média (kcal mol ⁻¹ resíduo ⁻¹)
Tripsinogênio	55	0,89
Quimiotripsinogênio	57	0,90
Elastase	57	–
Pepsinogênio	60	0,97
Ribonuclease	62	0,78
Carboxipeptidase	63	–
Álcool desidrogenase	64	–
Albumina sérica bovina	65	1,02
Hemoglobina	67	0,96
Lisozima	72	0,90
Insulina	76	1,00
Albumina do ovo	76	0,97
Inibidor de tripsina	77	–
Mioglobina	79	1,05
α -lactoalbumina	83	1,03
Citocromo C	83	1,06
β -lactoglobulina	83	1,09
Avidina	85	0,92
Glicinina de soja	92	–
Proteína 11S de feijão-fava	94	–
Proteína 11S de girassol	95	–
Globulina de aveia	108	–

Fonte: Os dados foram compilados a partir de Bull, H. B. e K. Breese. 1973. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**:681–686.

Gln, Ser, Thr, Val e Tyr (Figura 5.15) [101]. Outros resíduos de aminoácidos exercem pouca influência sobre a T_d .

A estabilidade térmica das proteínas de organismos termofílicos e hipertermofílicos, os quais podem resistir a temperaturas extremamente altas, também é atribuída a sua composição singular de aminoácidos [111]. Essas proteínas contêm níveis mais baixos de resíduos de Asn e Gln do que os de organismos mesofílicos. Sugere-se, nesse caso, que, pelo fato de Asn e Gln serem suscetíveis à desamidação em altas temperaturas, níveis maiores desses resíduos em proteínas mesofílicas podem contribuir parcialmente para a instabilidade. Os conteúdos de Cys, Met e Trp, que podem ser oxidados com facilidade sob altas temperaturas, são também baixos nas proteínas hipertermoestáveis. Por outro lado, as proteínas termoestáveis apresentam altos níveis de Ile e Pro [117,126]. Acredita-se que o alto conteúdo de Ile ajuda na melhora do acondicionamento do núcleo proteico [110], o que reduz as cavidades ocultas ou os espaços vazios. A ausência de espaços vazios pode reduzir a mobilidade da cadeia polipeptídica em altas temperaturas, o que minimiza o aumento da entropia configuracional da cadeia polipeptídica em altas temperaturas. Acredita-se que conteúdos elevados de Pro, em especial nas regiões de “alça” da cadeia proteica, fornecem rigidez à estrutura [75,87]. O exame de estruturas cristalográficas de várias proteínas/enzimas de organismos termofílicos mostra que eles também contêm um número significativamente maior de pares iônicos nas fendas proteicas, além de uma quantidade substancialmente maior de

moléculas de água inseridas e comprometidas em pontes de hidrogênio entre segmentos, em comparação a seus equivalentes mesofílicos [4,132]. Ao serem consideradas juntas, parece que as interações polares (pontes salinas e pontes de hidrogênio entre os segmentos) no interior da proteína não polar são responsáveis pela termoestabilidade das proteínas de organismos termofílicos e hipertermofílicos, sendo que tal ambiente é facilitado por altos conteúdos de Ile. Como já foi discutido, é concebível que cada ponte salina no interior da proteína, onde a constante dielétrica é cerca de quatro, pode aumentar a estabilidade da estrutura da proteína em cerca de 20 kcal/mol.

A desnaturação térmica de proteínas globulares monoméricas é, em sua maior parte, reversível. Por exemplo, quando enzimas monoméricas são aquecidas acima de suas temperaturas de desnaturação, ou mesmo mantidas durante pouco tempo a 100°C, e, então, imediatamente resfriadas em temperatura ambiente, elas recuperam por completo suas atividades. Contudo, a desnaturação térmica pode tornar-se irreversível quando a proteína é aquecida a 90-100°C por um período prolongado, mesmo em pH neutro [5]. Essa irreversibilidade ocorre devido a várias modificações químicas na proteína, como desamidação dos resíduos de Asn e Gln, clivagem de ligações peptídicas nos resíduos de Asp, destruição de resíduos de Cys e de cistina e agregação [5,124].

A água facilita muito a desnaturação térmica das proteínas [46]. Proteínas secas em pó são extremamente estáveis à desnaturação térmica. A T_d diminui muito com o aumento do

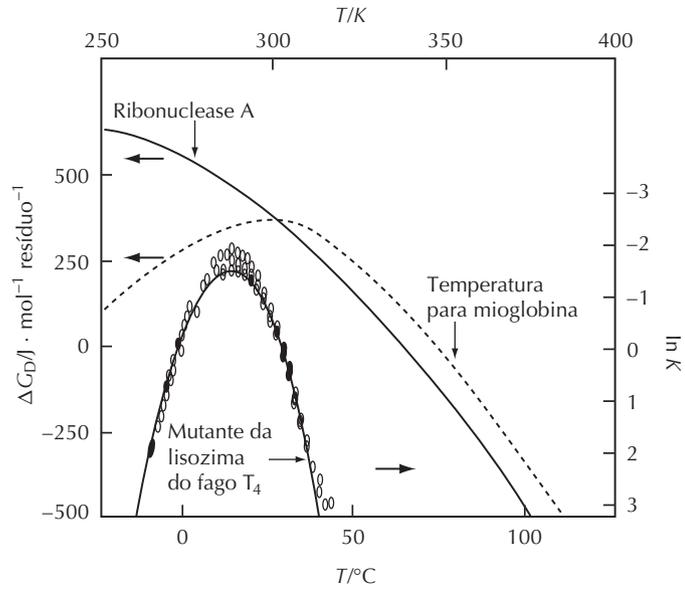


FIGURA 5.14 Variação da estabilidade proteica (ΔG_D) com a temperatura para mioglobina (---), ribonuclease A (—) e um mutante da lisozima do fago T₄ (○-○). K é a constante de equilíbrio (Compilada a partir de Chen, B. e J. A. Schellman. 1989. *Biochemistry* 28:685–691 e Lapanje, S. 1978. *Physicochemical Aspects of Protein Denaturation*. Wiley-Interscience, New York.).

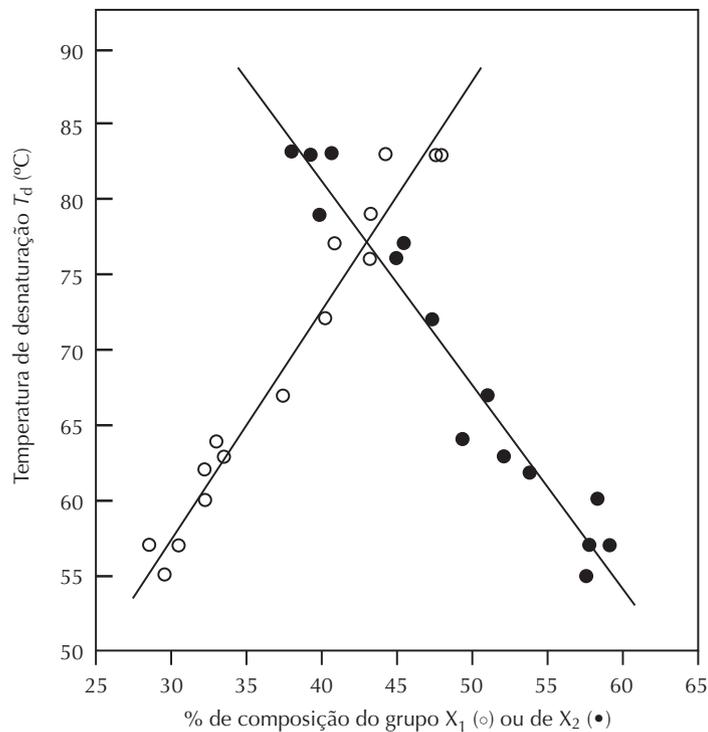


FIGURA 5.15 Correlações de grupos de resíduos de aminoácidos com a estabilidade térmica de proteínas globulares. O grupo X₁ representa Asp, Cys, Glu, Lys, Leu, Arg, Trp e Tyr. O grupo X₂ representa Ala, Asp, Gly, Gln, Ser, Thr, Val e Tyr. (Adaptada de Ponnuswamy, P. K. et al. 1982. *Int. J. Biol. Macromol.* 4:186–190.)

conteúdo de água de 0 a 0,35 g de água/g de proteína (Figura 5.16). Aumentos no conteúdo de água de 0,35 a 0,75 g de água/g de proteína causam apenas diminuição marginal de T_d . Acima de 0,75 g de água/g de proteína, a T_d da proteína

é igual à encontrada em uma solução diluída de proteína. O efeito da hidratação sobre a termoestabilidade é fundamentalmente relacionado à dinâmica da proteína. No estado seco, as proteínas apresentam estrutura estática, isto é, os

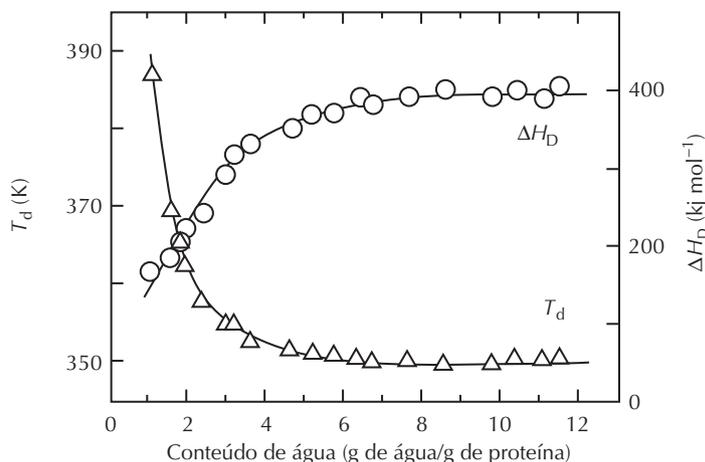


FIGURA 5.16 Influência do teor de água sobre a temperatura (T_d) e sobre a entalpia (ΔH_d) de desnaturação da ovoalbumina. (Fujita, Y. e Y. Noda. 1981. *Bull. Chem. Soc. Japan* **54**:3233–3234.)

segmentos polipeptídicos têm mobilidade restrita. À medida que o conteúdo de água aumenta, a hidratação e a penetração parcial da água nas cavidades de superfície causam a expansão da proteína. O estado expandido, no qual a proteína e sua água se convertem de um estado amorfo para um estado com consistência de borracha, alcança seu valor máximo em um conteúdo de água de 0,3-0,4 grama/grama de proteína, em temperatura ambiente. A expansão da proteína aumenta a mobilidade e a flexibilidade da cadeia, sendo que a molécula de proteína assume uma estrutura fundida mais dinâmica. Quando aquecida, essa estrutura dinâmica flexível promove mais acesso de água às pontes salinas e às pontes de hidrogênio peptídicas do que seria possível no estado seco, resultando em uma T_d menor.

Aditivos como sais e açúcares afetam a termoestabilidade das proteínas em soluções aquosas. Açúcares como sacarose, lactose, glicose e glicerol estabilizam as proteínas contra a desnaturação térmica [69]. A adição de 0,5 M de NaCl a proteínas, tais como β -lactoglobulina, proteínas de soja, albumina sérica e globulina de aveia, aumenta significativamente sua T_d [25,27,54].

5.4.2.1.2 Pressão hidrostática e desnaturação

Uma das variáveis termodinâmicas que afeta a conformação das proteínas é a pressão hidrostática. Diferente da desnaturação induzida pela temperatura, que costuma ocorrer no intervalo de 40-80°C à pressão de uma atmosfera, a desnaturação induzida pela pressão pode ocorrer a 25 °C se a pressão for alta o suficiente. A maioria das proteínas sofre desnaturação induzida pela pressão no intervalo de 1-12 kbar, como é evidenciado pelas alterações em suas propriedades espectrais. O ponto médio da transição induzida pela pressão ocorre entre 4-8 kbar [57].

A desnaturação de proteínas induzida pela pressão ocorre porque as proteínas são flexíveis e compressíveis. Embora os resíduos de aminoácidos estejam compactados com densidade no interior das proteínas globulares, alguns espaços vazios existem invariavelmente, o que leva à compressibili-

dade. O volume médio parcial específico das proteínas globulares no estado hidratado, v^0 , é de cerca de 0,74 mL/g. O volume parcial específico pode ser considerado como a soma de três componentes:

$$v^0 = V_C + V_{Cav} + \Delta V_{Sol} \quad (5.45)$$

onde V_C é a soma dos volumes atômicos, V_{Cav} é a soma dos volumes dos espaços vazios no interior da proteína e ΔV_{Sol} é a mudança de volume decorrente da hidratação [47]. Quanto maior for V_{Cav} , maior será a contribuição dos espaços vazios para o volume parcial específico e mais instável será a proteína quando pressurizada. As proteínas fibrosas são, em sua maioria, desprovidas de espaços vazios e, em consequência disso, elas são mais estáveis à pressão hidrostática do que as globulares.

A desnaturação de proteínas globulares induzida pela pressão costuma ser acompanhada pela redução de volume por volta de 30-100 mL/mol. Essa redução é causada por dois fatores: eliminação de espaços vazios à medida que a proteína se desdobra e hidratação dos resíduos de aminoácidos não polares que ficam expostos durante o desdobramento. Esse último evento resulta em decréscimo de volume (ver Seção 5.3.2). A alteração de volume é associada à mudança de energia livre pela expressão:

$$\Delta V = \frac{d(\Delta G)}{dp} \quad (5.46)$$

onde p é a pressão hidrostática.

Se uma proteína globular for completamente desdobrada durante a pressurização, a mudança de volume deve ser cerca de 2%. Entretanto, mudanças de volume de 30-100 mL/mol, observadas nas proteínas desnaturadas por pressão, correspondem a uma mudança de apenas 0,5% de volume. Isso indica que as proteínas se desdobram apenas parcialmente mesmo sob pressão hidrostática de até 10 kbar.

A desnaturação proteica induzida por pressão é altamente reversível. A maior parte das enzimas, em soluções diluídas, recupera sua atividade, uma vez que a pressão seja re-

duzida à pressão atmosférica [66]. Entretanto, a regeneração quase completa da atividade costuma levar muitas horas. No caso de enzimas e proteínas oligoméricas desnaturadas pela pressão, as subunidades primeiro se dissociam a 0,001-2 kbar e, em seguida, as subunidades desnaturam-se a pressões maiores [128]; quando a pressão é removida, as subunidades reassociam-se e a restauração quase completa da atividade enzimática ocorre depois de várias horas.

Altas pressões hidrostáticas estão sendo investigadas como uma ferramenta no processamento de alimentos, por exemplo, para inativação microbiana ou gelificação. Uma vez que altas pressões hidrostáticas (2-10kbar) danificam irreversivelmente as membranas celulares, causando a dissociação de organelas dos microrganismos, haverá destruição de microrganismos vegetativos [72]. A gelificação por pressão da clara do ovo, da solução de proteína de soja a 16%, ou da solução de actomiosina a 3%, pode ser realizada pela aplicação de uma pressão hidrostática de 1-7 kbar, por 30 min, a 25° C. Os géis induzidos por pressão são mais macios do que os induzidos termicamente [94]. Além disso, a exposição do músculo de carne bovina a pressões hidrostáticas de 1-3 kbar causam fragmentação parcial das miofibrilas, o que pode ser útil no amaciamento da carne [119] e na gelificação de proteínas miofibrilares. O processamento sob pressão, diferente do processamento térmico, não causa danos aos aminoácidos essenciais, à cor natural e ao sabor, assim como não causa o desenvolvimento de compostos tóxicos. Dessa forma, o processamento de alimentos com alta pressão hidrostática pode apresentar vantagens (exceto pelo custo), para alguns produtos alimentícios.

5.4.2.1.3 *Cisalhamento e desnaturação*

O elevado cisalhamento mecânico gerado por agitação, amassamento, batimento, etc., pode causar a desnaturação de proteínas. Muitas proteínas desnaturam-se e precipitam-se quando são agitadas com força [93]. Nessas circunstâncias, a desnaturação ocorre por causa da incorporação de bolhas de ar e da adsorção de moléculas de proteínas na interface ar-líquido. À medida que a energia dessa interface é maior do que a da fase principal, as proteínas sofrem modificações conformacionais na interface. A dimensão das modificações conformacionais depende da flexibilidade da proteína. As proteínas altamente flexíveis desnaturam-se com mais rapidez em interfaces ar-líquido do que as proteínas rígidas. Os resíduos não polares da proteína desnaturada orientam-se em direção à fase gasosa e os resíduos polares orientam-se em direção à fase aquosa.

Várias operações do processamento de alimentos envolvem alta pressão, cisalhamento e altas temperaturas, por exemplo, extrusão, mistura sob alta velocidade e homogeneização. Quando uma lâmina rotatória produz uma alta taxa de cisalhamento, criam-se pulsos subsônicos e ainda ocorre cavitação nos bordos de fuga da lâmina. Ambos os eventos contribuem para a desnaturação da proteína. Quanto maior a taxa de cisalhamento, maior será o grau de desnaturação. A combinação de alta temperatura com alta força de cisalhamento causa a desnaturação irreversível das proteínas.

Por exemplo, quando uma solução de proteína do soro a 10-20%, em pH 3,5-4,5 e a 80-120°C, está sujeita a uma taxa de cisalhamento de 7.500-10.000/s, ela forma partículas macrocoloidais esféricas insolúveis de aproximadamente 1 µm de diâmetro. “*Simplese*”, um material hidratado produzido sob essas condições, fica macio, com características organolépticas similares às da emulsão [118].

5.4.2.2 *Agentes químicos*

5.4.2.2.1 *pH e desnaturação*

As proteínas são mais estáveis à desnaturação em seus pontos isoelétricos do que em qualquer outro pH. Em pH neutro, a maioria das proteínas está carregada negativamente, sendo que algumas estão carregadas positivamente. Como a energia repulsiva eletrostática líquida é pequena em comparação a outras interações favoráveis, a maior parte das proteínas é estável em pH próximo ao neutro. No entanto, a forte repulsão eletrostática intramolecular causada pela alta carga líquida em valores extremos de pH resulta em expansão e desdobramento da molécula proteica. O grau de desdobramento é maior em valores extremos de pH alcalino do que em valores extremos de pH ácido. O primeiro comportamento é atribuído à ionização dos grupos carboxílicos, sulfidril e fenólico, parcialmente inseridos, que levam a cadeia polipeptídica a desnovelar-se à medida que eles tentam se expor ao ambiente aquoso. A desnaturação induzida pelo pH é, em sua maioria, reversível. Entretanto, em alguns casos, hidrólises parciais de ligações peptídicas, desamidação de Asn e Gln, destruição de grupos sulfidril em pH alcalino ou agregação podem resultar na desnaturação irreversível das proteínas.

5.4.2.2.2 *Solventes orgânicos e desnaturação*

Os solventes orgânicos afetam a estabilidade das interações hidrofóbicas da proteína, das pontes de hidrogênio e das interações eletrostáticas, de diferentes formas [52]. Uma vez que as cadeias laterais não polares são mais solúveis em solventes orgânicos do que em água, os solventes orgânicos enfraquecem as interações hidrofóbicas. Por outro lado, desde que a estabilidade e a formação de pontes de hidrogênio peptídicas sejam aumentadas em um ambiente de baixa permissividade, alguns solventes orgânicos podem, de fato, fortalecer ou promover a formação de pontes hidrogênio peptídicas. Por exemplo, o 2-cloroetanol causa aumento de conteúdo de α -hélice em proteínas globulares. A ação de solventes orgânicos em interações eletrostáticas é dupla. Pela diminuição da permissividade, eles aumentam as interações eletrostáticas entre grupos de cargas opostas, elevando também a repulsão entre grupos com carga semelhante. Portanto, o efeito líquido de um solvente orgânico sobre a estrutura da proteína costuma depender da dimensão de seu efeito sobre as várias interações polares e não polares. Em baixas concentrações, alguns solventes orgânicos podem estabilizar várias enzimas contra a desnaturação [9]. Em altas concentrações, contudo, todos os solventes orgânicos geram a desnaturação de proteínas, em decorrência de seu efeito solubilizante sobre as cadeias laterais não polares.

5.4.2.2.3 Desnaturação por aditivos de baixo peso molecular

Vários solutos de baixo peso molecular, como ureia, hidrocloreto de guanidina (GuHCl), detergentes, açúcares e sais neutros afetam a estabilidade proteica em soluções aquosas. Enquanto a ureia, o GuHCl e os detergentes desestabilizam a conformação nativa das proteínas [34], o açúcar tende a estabilizar a estrutura nativa. No caso de sais neutros, enquanto alguns sais, como sulfato, fosfato e sais de fluoreto de sódio, denominados cosmotrópicos, estabilizam a estrutura da proteína, outros, como brometo, iodeto, perclorato e tiocianato, denominados caotrópicos, desestabilizam a estrutura proteica.

Acredita-se que os efeitos estabilizadores e desestabilizadores de aditivos de baixo peso molecular das proteínas sigam um mecanismo universal. Isso está relacionado a suas interações preferenciais com a fase aquosa e a superfície proteica. Os aditivos que estabilizam a estrutura das proteínas ligam-se muito fracamente à superfície proteica, mas aumentam sua hidratação preferencial (Figura 5.17). Esses aditivos costumam ser excluídos da região ao redor da proteína, isto é, sua concentração próxima à proteína é mais baixa do que na solução como um todo. Presume-se que esse gradiente de concentração crie um gradiente de pressão osmótica ao redor da molécula proteica, suficiente o bastante para elevar a temperatura de desnaturação térmica da proteína. Por exemplo, estudos sobre estabilização da proteína pelo glicerol mostraram que a lisozima em soluções de glicerol assume um estado levemente comprimido, em comparação a seu estado na água [51]. Isso pode ocorrer em virtude da criação de uma zona de exclusão ao redor da superfície da proteína para o glicerol e o desenvolvimento de um gradiente de pressão osmótica.

No caso de aditivos que desestabilizam a estrutura de proteínas, o oposto parece ser verdadeiro. Ou seja, os aditivos que diminuem a estabilidade das proteínas ligam-se

preferencialmente à superfície proteica, causando desidratação da proteína. Nesses casos, as moléculas de água são excluídas da região que circunda a proteína e a concentração do aditivo nessa região sem água é mais alta do que no solvente como um todo. A interação favorável desses aditivos com a superfície da proteína, em particular a superfície não polar, promove o desdobramento da proteína, de modo que as superfícies não polares inseridas estejam mais expostas à interação favorável com o aditivo.

Quando a proteína é exposta a uma mistura de solutos estabilizadores e desestabilizadores, o efeito líquido sobre sua estabilidade costuma seguir uma regra de aditividade. Por exemplo, a sacarose e os polióis são considerados estabilizadores da estrutura proteica, enquanto o GuHCl é um desestabilizador da estrutura. Quando a sacarose é misturada com o GuHCl, a concentração de GuHCl necessária ao desdobramento das proteínas eleva-se com o aumento da concentração de sacarose [122]. Além disso, alterações na estrutura da água causadas pelo GuHCl e pela ureia são contrabalançadas pela adição de compostos poli-hídricos como a sacarose. Desse modo, na presença de um polioliol, a desnaturação proteica requer maiores concentrações de GuHCl e de ureia [122]. Isso também evidencia que mudanças na estrutura da água em presença de aditivos estão relacionadas, de alguma forma fundamental, à transmissão dos efeitos dos aditivos sobre a estabilidade da proteína. O mecanismo exato ainda é difícil de ser compreendido, em parte, porque a “estrutura da água” ainda não é um conceito bem definido.

5.4.2.2.4 Solutos orgânicos e desnaturação

Os solutos orgânicos, principalmente a ureia e o GuHCl, causam desnaturação de proteínas. Para muitas proteínas globulares, o ponto médio de transição do estado nativo para o estado desnaturado ocorre a 4-6 M de ureia e a 3-4 M de GuHCl, em temperatura ambiente. A transição com-

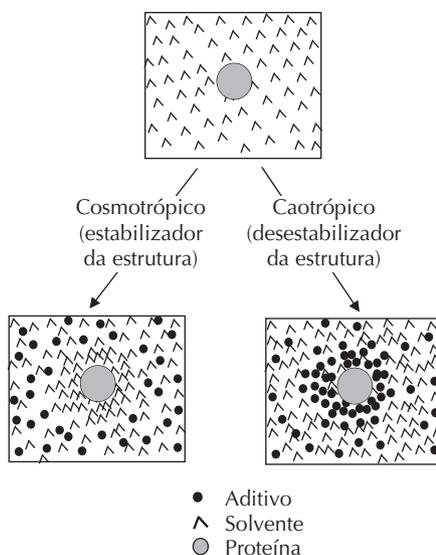


FIGURA 5.17 Representação esquemática da ligação preferencial e hidratação preferencial da proteína na presença de aditivos. (Adaptada de Creighton, T. E. 1993. *Proteins: Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman Co., New York, pp. 158–159.)

pleta geralmente ocorre em 8 M de ureia e em cerca de 6 M de GuHCl. Este é um desnaturante mais poderoso do que a ureia por causa de seu caráter iônico. Muitas proteínas globulares não sofrem desnaturação completa mesmo em 8 M de ureia, enquanto em 8 M de GuHCl, elas costumam existir em estado (completamente desnaturado) de *random coil* (estado de desordem estrutural).

A desnaturação proteica pela ureia e pelo GuHCl é associada a dois mecanismos. O primeiro envolve ligações preferenciais de ureia e GuHCl com a proteína desnaturada. A remoção da proteína desnaturada como um complexo proteína-desnaturante move o equilíbrio $N \leftrightarrow D$ para a direita. À medida que a concentração do desnaturante aumenta, a conversão contínua da proteína para o complexo proteína-desnaturante resulta, no final das contas, na sua desnaturação completa. Uma vez que a ligação do desnaturante com a proteína desnaturada é muito fraca, necessita-se de uma alta concentração de desnaturante para que haja desnaturação completa. O segundo mecanismo envolve a solubilização de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos nas soluções de ureia e GuHCl. Uma vez que a ureia e o GuHCl têm o potencial de formar pontes de hidrogênio, em alta concentração, esses solutos quebram a estrutura de ponte de hidrogênio da água. A desestruturação da água faz com que ela seja um solvente melhor para resíduos não polares. Isso resulta em desdobramento e solubilização de resíduos apolares provenientes do interior da molécula proteica.

A desnaturação induzida por ureia ou GuHCl é reversível. Entretanto, a reversibilidade completa da desnaturação da proteína induzida pela ureia é difícil algumas vezes. Isso acontece porque parte da ureia é convertida para cianato e amônia. O cianato reage com grupos amino, alterando a carga da proteína.

5.4.2.2.5 Detergentes e desnaturação

Detergentes, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), são poderosos agentes desnaturantes de proteínas. O SDS em concentração de 3-8 mM desnatura a maioria das proteínas globulares. Esse mecanismo envolve ligações preferenciais do detergente com a molécula de proteína desnaturada. Isso causa deslocamento de equilíbrio entre os estados nativo e desnaturado. Diferente da ureia e do GuHCl, os detergentes ligam-se fortemente a proteínas desnaturadas, sendo essa a razão para a desnaturação completa em concentrações relativamente baixas de detergente de 3-8 mM. Em virtude dessa forte ligação, a desnaturação induzida pelo detergente é irreversível. As proteínas globulares desnaturadas pelo SDS não existem em estado *random coil* (estado de desordem estrutural), em vez disso, elas assumem um formato de bastonete α -helicoidal nas soluções de SDS. Esse formato é considerado adequadamente como desnaturado.

5.4.2.2.6 Sais caotrópicos e desnaturação

Os sais afetam a estabilidade das proteínas de dois modos diferentes. Em baixas concentrações, os íons interagem com proteínas por meio de interações eletrostáticas não específicas. A neutralização eletrostática das cargas proteicas

costuma estabilizar a estrutura da proteína. A neutralização completa da carga por íons ocorre em 0,2 M de força iônica ou abaixo desse patamar, sendo que isso independe da natureza do sal. Entretanto, em maiores concentrações (> 1 M), os sais têm efeitos iônicos específicos que influenciam a estabilidade estrutural das proteínas. Sais como Na_2SO_4 e NaF a aumentam, enquanto NaSCN e NaClO_4 a enfraquecem. A estrutura da proteína é influenciada mais por ânions do que por cátions. Por exemplo, o efeito de vários sais de sódio sobre a temperatura de desnaturação térmica da β -lactoglobulina é demonstrado na Figura 5.18. Em mesma força iônica, Na_2SO_4 e NaCl aumentam a T_d , enquanto NaSCN e NaClO_4 a reduzem. Independentemente de sua constituição química e suas diferenças conformacionais, a estabilidade da estrutura de macromoléculas, incluindo o DNA, é afetada de forma negativa pelas altas concentrações de sais [21]. NaSCN e NaClO_4 são desnaturantes fortes. A capacidade relativa de vários ânions no ponto iso-iônico de influenciar a estabilidade da proteína (e do DNA) costuma seguir as séries, $\text{F}^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^- < \text{SCN}^- < \text{Cl}_3\text{CCOO}^-$. Esse *ranking* é conhecido como série de Hofmeister ou série caotrópica. Sais de fluoreto, cloreto e sulfato são estabilizadores estruturais, enquanto sais de outros ânions são desestabilizadores estruturais.

O mecanismo dos efeitos dos sais sobre estabilidade estrutural das proteínas está relacionado a sua capacidade relativa de se ligar às proteínas e alterar suas propriedades de hidratação. Os sais que estabilizam as proteínas aumentam a hidratação proteica, ligando-se fracamente a elas, enquanto os sais que desestabilizam as proteínas diminuem a hidratação proteica e ligam-se fortemente a elas [8]. Esses efeitos são consequência das perturbações energéticas na interface proteína-água. Em nível mais fundamental, a estabilização ou a desnaturação proteica por sais está relacionada a seus efeitos sobre a estrutura da água como um todo. Os sais que estabilizam a estrutura proteica também aumentam a estrutura de ponte de hidrogênio da água, e os que desnaturam as proteínas também quebram a estrutura da água como um todo, tornando-a um solvente melhor para moléculas apolares. Em outras palavras, o efeito desnaturante dos sais caotrópicos pode estar relacionado à desestabilização das interações hidrofóbicas nas proteínas.

5.5 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS

As preferências alimentares dos seres humanos estão baseadas principalmente nos atributos sensoriais, tais como textura, sabor, cor e aparência. Os atributos sensoriais de um alimento são o efeito líquido de interações complexas entre vários componentes de menor ou maior porte do alimento. As proteínas no geral têm uma grande influência sobre os atributos sensoriais dos alimentos. Por exemplo, as propriedades sensoriais dos produtos de padaria estão relacionadas às propriedades viscoelásticas e de formação da massa do glúten do trigo; as características texturais e de suculência de produtos cárneos dependem muito das proteínas do músculo

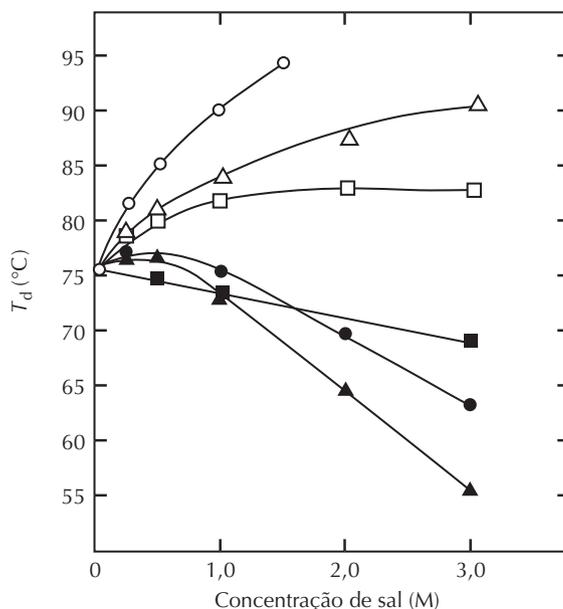


FIGURA 5.18 Efeitos de vários sais de sódio sobre a temperatura de desnaturação, T_d , da β -lactoglobulina em pH 7,0. Δ . NaBr; \bullet NaClO₄; \blacktriangle NaSCN; \blacksquare ureia. (De Damodaran, S. 1989. *Int. J. Biol. Macromol.* **11**:2–8.)

(actina, miosina, actomiosina e várias proteínas solúveis da carne); as propriedades texturais e de formação do coágulo dos produtos lácteos são fruto da estrutura coloidal singular das micelas de caseína; e a estrutura de alguns bolos, bem como as propriedades de batimento de alguns produtos de sobremesa, dependem das propriedades das proteínas da clara do ovo. Os papéis funcionais de várias proteínas em diversos produtos alimentícios estão listados na Tabela 5.11 [64]. A funcionalidade das proteínas dos alimentos refere-se às propriedades físico-químicas que influenciam no desempenho das proteínas dos sistemas alimentares durante processamento, armazenamento, preparo e consumo.

Os atributos sensoriais dos alimentos são obtidos pelas interações complexas entre vários ingredientes funcionais. Por exemplo, os atributos sensoriais de um bolo emanam do calor/formação de gel, formação de espuma e propriedades emulsificantes dos ingredientes usados. Portanto, para que uma proteína seja útil como ingrediente em bolos e outros produtos semelhantes, ela deve possuir diversas funcionalidades. As proteínas de origem animal, por exemplo, do leite (caseínas), do ovo e as proteínas da carne são muito usadas em alimentos industrializados. Essas proteínas são misturas de várias proteínas com diversas propriedades físico-químicas, sendo capazes de realizar múltiplas funções. Por exemplo, a clara do ovo possui muitas funcionalidades, gelificação, emulsificação, formação de espuma, ligação com a água e coagulação pelo calor, tornando-a uma proteína altamente desejável para muitos alimentos. As suas múltiplas funcionalidades surgem a partir de interações complexas entre seus constituintes proteicos, a saber, ovoalbumina, conalbumina, lisozima, ovomucina e outras proteínas semelhantes à albumina. As proteínas vegetais (i.e., proteínas de soja e outras proteínas de leguminosas e sementes oleaginosas), bem como outras proteínas, tais como as do soro do leite,

são usadas em grau limitado nos alimentos convencionais. Embora essas proteínas também sejam misturas de várias outras, elas não funcionam tão bem quanto às proteínas animais na maioria dos produtos alimentícios. As propriedades moleculares exatas das proteínas que são responsáveis por várias funcionalidades desejáveis nos alimentos ainda não são bem compreendidas.

As propriedades físico-químicas que controlam a funcionalidade proteica incluem tamanho; forma; composição e sequência dos aminoácidos; carga líquida e distribuição das cargas; razão de hidrofobicidade/hidrofilicidade; estruturas secundárias, terciárias e quaternárias; flexibilidade e rigidez molecular; e capacidade de interagir/reagir com outros componentes. Uma vez que as proteínas apresentam múltiplas propriedades físico-químicas, é difícil delinear o papel de cada uma dessas propriedades em relação a uma propriedade funcional determinada.

Em nível empírico, as diversas propriedades funcionais das proteínas podem ser observadas como manifestações de três aspectos moleculares das proteínas: (1) propriedades de hidratação; (2) propriedades relacionadas à superfície proteica; e (3) propriedades hidrodinâmicas/reológicas (Tabela 5.12). Embora se conheça muito a respeito das propriedades físico-químicas de várias proteínas de alimentos, a previsão das propriedades funcionais a partir de suas propriedades moleculares ainda não foi bem-sucedida. Estabeleceram-se algumas correlações empíricas entre as propriedades moleculares e algumas propriedades funcionais em sistemas-modelo de proteínas. No entanto, o comportamento dos sistemas-modelo muitas vezes não é o mesmo que o existente nos produtos alimentícios reais. Isso pode ser atribuído, em parte, à desnaturação das proteínas durante o processamento. A extensão da desnaturação depende do pH, da temperatura, de outras condições de

TABELA 5.11 Funções das proteínas alimentares em sistemas de alimentícios

Função	Mecanismo	Alimento	Tipo de proteína
Solubilidade	Hidrofiliabilidade	Bebidas	Proteínas do soro
Viscosidade	Ligação à água, forma e tamanho hidrodinâmicos	Sopas, molhos de carne, molhos para salada, sobremesas	Gelatina
Ligação à água	Pontes de hidrogênio, hidratação iônica	Salsichas de carne, bolos e pães	Proteínas da carne, proteínas do ovo
Gelificação	Retenção e imobilização de água, formação de redes	Carnes, géis, bolos, produtos de panificação, queijo	Proteínas da carne, proteínas do leite e do ovo
Coesão-adesão	Ligações hidrofóbicas, iônicas e de hidrogênio	Carnes, salsichas, massas, produtos assados	Proteínas da carne, proteínas do ovo e proteínas do soro
Elasticidade	Ligações hidrofóbicas, ligações cruzadas dissulfeto	Carnes, produtos de panificação	Proteínas da carne, proteínas de cereais
Emulsificação	Formação de película e adsorção nas interfaces	Salsichas, almôndega, sopa, bolos, molhos	Proteínas da carne, proteínas do ovo, proteínas do leite
Formação de espuma	Adsorção interfacial e formação de película	Chantilis, sorvetes, bolos, sobremesas	Proteínas do ovo, proteínas do leite
Fixação de lipídeos e aroma	Ligações hidrofóbicas, retenção	Produtos de panificação com baixo teor de gordura, <i>doughnuts</i>	Proteínas do leite, proteínas do ovo, proteínas de cereais

Fonte: Kinsella, J. E. et al. 1985. Em *New Protein Foods: Seed Storage Proteins* (Altshul, A. M. e H. L. Wilcke, Eds.), Academic Press, London, pp. 107–179.

processamento e de características do produto. Além disso, nos alimentos reais, as proteínas interagem com outros componentes alimentares, como lipídeos, açúcares, polisacarídeos, sais e componentes menores, o que modifica seu comportamento funcional. Apesar dessas dificuldades inerentes, tem-se alcançado um progresso considerável no que diz respeito à compreensão da relação entre as várias propriedades físico-químicas das moléculas proteicas e suas propriedades funcionais.

5.5.1 Hidratação proteica

A água é um constituinte essencial dos alimentos. As propriedades reológicas e texturais dos alimentos dependem da interação da água com outros constituintes do alimento, em especial com as macromoléculas como as proteínas e os polissacarídeos. A água modifica as propriedades físico-químicas das proteínas. Por exemplo, o efeito plastificante da água sobre as proteínas amorfas e semicristalinas dos alimentos altera sua temperatura de transição vítrea (ver Capítulo 2) e sua T_d . Temperatura de transição vítrea refere-se à conversão de um sólido amorfo quebradiço (vítreo) em um estado flexível tipo borracha, enquanto temperatura de fusão refere-se à transição de um sólido cristalino para uma estrutura desordenada.

Muitas propriedades funcionais das proteínas, como dispersibilidade, umectabilidade, expansão, solubilidade, espessamento/viscosidade, capacidade de retenção de água, gelificação, coagulação, emulsificação e formação de espuma dependem das interações entre água e proteína. Em alimentos de umidade baixa ou intermediária, como os produtos de panificação e os produtos cárneos triturados, a capacidade das proteínas de se combinar com a água é importante para a aceitabilidade. A capacidade de uma proteína de exibir equilíbrio adequado de interações proteína-proteína e proteína-água é essencial para suas propriedades térmicas de gelificação.

As moléculas de água ligam-se a diversos grupos nas proteínas. Esses grupos incluem grupos carregados (interações íon-dipolo); grupos peptídicos da cadeia principal; grupos amida da Asn e Gln; grupos hidroxila dos resíduos de Ser, Thr e Tyr (todas as interações dipolo-dipolo); e resíduos não polares (interação dipolo-dipolo induzida e hidratação hidrofóbica).

A capacidade da proteína de se ligar à água é definida como gramas de água ligada por grama de proteína, quando um pó seco de proteína é equilibrado com vapor d'água a uma umidade relativa de 90-95%. A capacidade de ligação com a água (também chamada de capacidade de hidratação) de vários grupos de proteínas polares e não polares é apresentada

TABELA 5.12 Ligação entre os aspectos físico-químicos das proteínas e seu impacto sobre a funcionalidade nos alimentos

Propriedade geral	Funções afetadas
1. Hidratação	Solubilidade, dispersibilidade, umectabilidade, expansão, espessamento, absorção de água, capacidade de retenção de água
2. Propriedade surfactante	Emulsificação, formação de espuma, fixação de aroma, ligação a pigmentos
3. Hidrodinâmica/Reologia	Elasticidade, viscosidade, coesividade, mastigabilidade, adesão, viscosidade, gelificação, formação de massa, texturização

na Tabela 5.13 [70]. Os resíduos de aminoácidos com grupos carregados ligam-se a cerca de 6 moles de água por resíduo, os resíduos polares não carregados ligam-se a cerca de 2 moles por resíduo e os grupos apolares ligam-se em cerca de 1 mol por resíduo. Portanto, a capacidade de hidratação de uma proteína está relacionada, em parte, a sua composição em aminoácidos, ou seja, quanto maior o número de resíduos carregados, maior a capacidade de hidratação. A capacidade de hidratação de uma proteína pode ser calculada a partir de sua composição em aminoácidos, usando-se a equação empírica [71]:

$$a = f_C + 0,4f_P + 0,2f_N \quad (5.47)$$

onde a é g de água/g de proteína e f_C , f_P e f_N são as frações dos resíduos carregados polares e não polares, respectivamente, na proteína. As capacidades de hidratação experimentais de várias proteínas globulares monoméricas coincidem com as calculadas a partir da equação supracitada. No entanto, isso não se aplica às proteínas oligoméricas. Uma vez que as estruturas oligoméricas envolvem uma inserção parcial da superfície proteica na interface subunidade-subunidade, os valores calculados costumam ser maiores do que os valores experimentais. Por outro lado, a capacidade de hidratação experimental das micelas de caseína (em torno de 4g de água/g de proteína) é muito maior do que a prevista pela equação supracitada. Isso se deve à enorme quantidade de espaço vazio dentro da estrutura da micela de caseína, a qual embebe água por meio de ação capilar e aprisionamento físico.

Em nível macroscópico, a ligação da água com as proteínas ocorre em um processo gradativo. Os grupos iônicos de alta afinidade são solvatados primeiro em baixa atividade de água, seguidos pelos grupos polares e não polares. A sequência das etapas envolvidas na atividade de água crescente é apresentada na Figura 5.19. ([109]; ver também Capítulo 2). As isotermas de sorção das proteínas, isto é, a quantidade de água ligada por grama de proteína como uma função da umidade relativa é, invariavelmente, uma curva sigmoide (ver Capítulo 2). Para a maioria das proteínas, a cobertura saturada da monocamada de água ocorre a uma atividade de água (a_w) de cerca de 0,7-0,8, enquanto as multicamadas de água são formadas em $a_w > 0,8$. A cobertura da monocamada saturada corresponde a cerca 0,3-0,5 g de água/g de proteína. A água da monocamada saturada está primariamente associada a grupos iônicos, polares e apolares da superfície da proteína. Essa água não pode ser congelada, não participa como solvente em reações químicas e é chamada com frequência de “água ligada”, o que deve ser compreendido como água com mobilidade “restrita”. Na faixa de hidratação que vai de 0,07-0,27 g/g, a energia requerida para a dessorção da água a partir da superfície da proteína é de apenas 0,18 kcal/mol, a 25°C. Como a energia cinética térmica da água a 25°C é cerca de ~1 kcal/mol, sendo maior do que a energia livre de dessorção, as moléculas de água da monocamada são razoavelmente móveis.

Em $a_w = 0,9$, as proteínas ligam-se próximo de 0,3-0,5 g de água/g de proteína (Tabela 5.14) [65,71]. Em $a_w > 0,9$, a

TABELA 5.13 Capacidade de hidratação de resíduos de aminoácidos^a

Resíduo de aminoácido	Hidratação (moles de H ₂ O/mol de resíduo)
Polar	
Asn	2
Gln	2
Pro	3
Ser, The	2
Trp	2
Asp (não ionizada)	2
Glu (não ionizada)	2
Tyr	3
Arg (não ionizada)	3
Lys (não ionizada)	4
Iônico	
Asp ⁻	6
Glu ⁻	7
Tyr ⁻	7
Arg ⁺	3
His ⁺	4
Lys ⁺	4
Apolar	
Ala	1
Gly	1
Phe	0
Val, Ile, Leu, Met	1

^a Representa a água não congelada associada a resíduos de aminoácidos, com base em estudos de ressonância magnética nuclear de polipeptídeos.

Fonte: Kuntz, I. D. 1971. *J. Amer. Chem. Soc.* **93**:514-516.

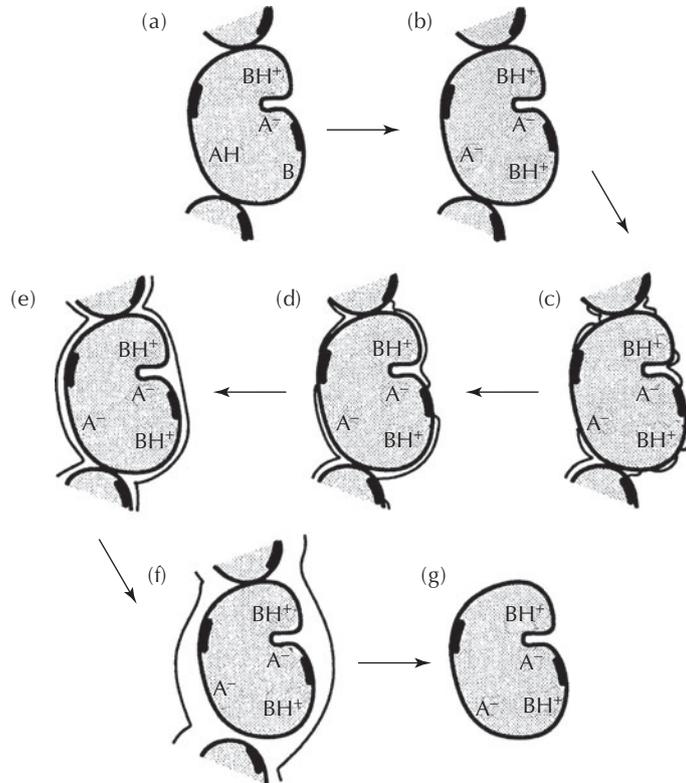


FIGURA 5.19 Sequência das etapas envolvidas na hidratação de uma proteína. (a) Proteína não hidratada. (b) Hidratação inicial dos grupos carregados. (c) Formação de agrupamentos de água perto de sítios polares e carregados. (d) Hidratação completa nas superfícies polares. (e) Hidratação hidrofóbica dos segmentos não polares; cobertura completa da monocamada. (f) Formação de pontes entre a água associada a proteínas e a água total. (g) Hidratação hidrodinâmica completa. (Rupley, J. A. et al. 1980. Em *Water in Polymers* (De Rowland, S. P., Ed.), ACS Symp. Ser. 127, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 91–139.)

água líquida total se condensa nos interstícios e nas fendas das moléculas proteicas, ou em capilares de sistemas proteicos insolúveis, como as miofibrilas. As propriedades dessa água são semelhantes às da água total. Essa água é chamada de água hidrodinâmica, movendo-se junto à molécula proteica.

Vários fatores ambientais, como pH, força iônica, temperatura, tipo de sais e conformação proteica, influenciam na capacidade das proteínas de ligar água. As proteínas são menos hidratadas no seu pH isoeletrico, no qual o aumento das interações proteína-proteína resulta em uma interação mínima com a água. Acima e abaixo do pH isoeletrico, em virtude do aumento da carga líquida e das forças repulsivas, as proteínas incham e ligam mais água. A capacidade de ligar água da maior parte das proteínas é maior em um pH de 9-10 do que em qualquer outro pH. Isso se deve à ionização da sulfidrina e dos resíduos de tirosina. Acima de pH 10, a perda de grupos ϵ -amino positivamente carregados dos resíduos lisil resulta na redução da ligação com a água.

Em baixas concentrações (<0,2 M), os sais aumentam a capacidade de ligação das proteínas à água. Isso ocorre porque os íons de sais hidratados, em especial os ânions, ligam-se fracamente a grupos carregados nas proteínas. Nessa baixa concentração, a ligação de íons às proteínas não afeta a camada de hidratação dos grupos carregados na proteína, e o aumento da ligação com a água se deve, essencialmente, à água associada aos íons ligados. No en-

tanto, em concentrações elevadas de sal, grande parte da água existente está ligada a íons salinos, resultando em desidratação da proteína.

A capacidade das proteínas de ligar água costuma diminuir à medida que a temperatura sobe, por causa da redução das pontes de hidrogênio e da diminuição da hidratação dos grupos iônicos. A capacidade de uma proteína desnaturada de ligar água costuma ser cerca de 10% maior do que a de uma proteína nativa. Isso se deve ao aumento da razão entre a área da superfície em relação à massa, com exposição de alguns grupos hidrofóbicos previamente inseridos. Se a desnaturação levar à agregação da proteína, então sua capacidade de ligação à água pode, na verdade, diminuir por causa do deslocamento da água pelo aumento das interações proteína-proteína. As proteínas alimentares desnaturadas geralmente mostram baixa solubilidade em água. Suas capacidades de ligar água, no entanto, não são tão diferentes das encontradas no estado nativo. Dessa forma, a capacidade de ligar água não pode ser usada para se prever as características de solubilidade das proteínas. A solubilidade de uma proteína não depende apenas de sua capacidade de ligar água, mas também de outros fatores termodinâmicos.

Em aplicações alimentares, a capacidade de uma proteína de reter água é mais importante do que a capacidade de se ligar à água. Capacidade de retenção de água refere-se à capacidade da proteína embeber água e retê-la contra

TABELA 5.14 Capacidade de hidratação de várias proteínas

Proteína	g de água/ g de proteína
Proteína pura ^a	
Ribonuclease	0,53
Lisozima	0,34
Mioglobina	0,44
β -lactoglobulina	0,54
Quimiotripsinogênio	0,23
Albumina sérica	0,33
Hemoglobina	0,62
Colágeno	0,45
Caseína	0,40
Ovoalbumina	0,30
Preparações comerciais de proteína ^b	
Concentrados de proteína do soro	0,45–0,52
Caseinato de sódio	0,38–0,92
Proteína de soja	0,33

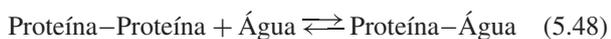
^a A 90% de umidade relativa^b A 95% de umidade relativaFonte: De Kinsella, J. E. e P. F. Fox. 1986. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **24**:91–139 e Kuntz, I. D. e W. Kauzmann. 1974. *Adv. Protein Chem.* **28**:239–345.

a força gravitacional dentro de uma matriz proteica, como géis proteicos ou músculo de carne bovina e de peixe. Essa água é a soma da água ligada, da água hidrodinâmica e da água aprisionada fisicamente. Esta contribui mais para a capacidade de retenção de água do que as águas ligada e hidrodinâmica. No entanto, estudos mostraram que a capacidade de retenção de água das proteínas está correlacionada positivamente à capacidade de se ligar à água. A capacidade das proteínas de aprisionar água está associada à suculência e à maciez dos produtos cárneos triturados e às propriedades texturais desejáveis de pães e de outros produtos tipo gel.

5.5.2 Solubilidade

As propriedades funcionais das proteínas costumam ser afetadas pela solubilidade da proteína, sendo que as mais afetadas são espessamento, formação de espuma, emulsificação e gelificação. As proteínas insolúveis têm usos muito limitados em alimentos.

A solubilidade de uma proteína é uma manifestação termodinâmica do equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-solvente:



As principais interações que influenciam as características de solubilidade das proteínas são de natureza hidrofóbica e iônica. As interações hidrofóbicas promovem as interações proteína-proteína, resultando em diminuição de solubilidade enquanto as iônicas promovem interações proteína-água e resultam em aumento de solubilidade. Os resíduos iônicos introduzem dois tipos de forças de repulsão entre as moléculas proteicas em solução, o primeiro envolve a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína que se deve à

carga positiva ou à negativa líquida, em qualquer pH que não seja o pH isoelétrico; o segundo envolve a repulsão entre as camadas de hidratação ao redor dos grupos iônicos.

Bigelow [11] propôs que a solubilidade de uma proteína está fundamentalmente relacionada à hidrofobicidade média dos resíduos de aminoácidos e à frequência da carga. A hidrofobicidade média é definida como:

$$\Delta G = \sum \Delta g_{\text{resíduo}}/n \quad (5.49)$$

onde $\Delta g_{\text{resíduo}}$ é a hidrofobicidade de cada cadeia lateral do aminoácido obtida a partir da mudança de energia livre para transferência do octanol para a água (Ver Seção 5.2.1.4), e n é o número total dos resíduos na proteína. A frequência da carga é definida por:

$$\sigma = \frac{(n^+ + n^-)}{n} \quad (5.50)$$

onde n^+ e n^- são o número total dos resíduos com carga positiva e negativa, respectivamente, enquanto n é o número total dos resíduos. De acordo com Bigelow [11], quanto menor a hidrofobicidade média e maior a frequência da carga, maior será a solubilidade da proteína. Embora essa correlação empírica seja verdadeira para a maioria das proteínas, ela não é absoluta. A solubilidade proteica é ditada pela hidrofobicidade e pela hidrofobicidade da superfície da proteína que entra em contato com a água circundante, e não pela hidrofobicidade média e pela frequência da carga da molécula como um todo. Como a maioria dos resíduos hidrofóbicos está inserida no interior da proteína, apenas os grupos não polares que estão na superfície afetariam a solubilidade. Quanto menor o número de segmentos hidrofóbicos da superfície, maior a solubilidade.

Com base nas características de solubilidade, as proteínas são classificadas em quatro categorias. As *albuminas* são

as proteínas que são solúveis em água em pH 6,6 (p. ex., albumina sérica, ovoalbumina e α -lactoalbumina), as *globulinas* são as solúveis em soluções salinas diluídas em um pH de 7,0 (p. ex., glicinina, faseolina e β -lactoglobulina), as *glutelinas* são as solúveis apenas em soluções ácidas de pH 2,0 e soluções alcalinas de pH 12 (p. ex., glutelinas do trigo) e as *prolaminas* são as que solúveis em etanol a 70% (p. ex., zeína e gliadinas). Tanto as prolaminas como as glutelinas são proteínas altamente hidrofóbicas.

Além das propriedades físico-químicas intrínsecas, a solubilidade é influenciada por várias condições da solução, como pH, força iônica, temperatura e presença de solventes orgânicos.

5.5.2.1 pH e solubilidade

Em valores de pH abaixo ou acima do pH isoelétrico, as proteínas possuem uma carga líquida positiva ou negativa, respectivamente. A repulsão eletrostática e a hidratação dos resíduos carregados promovem a solubilidade da proteína. Quando a solubilidade é plotada contra o pH, a maior parte das proteínas dos alimentos exibe uma curva em forma de U. A solubilidade mínima ocorre em proximidade ao pH isoelétrico das proteínas. Quase todas as proteínas dos alimentos são proteínas ácidas; isto é, a soma dos resíduos de Asp e Glu é maior do que a soma dos resíduos de Lys, Arg e Hys, portanto, elas exibem sua solubilidade mínima em pH de 4-5 (pH isoelétrico) e sua solubilidade máxima em pH alcalino.

A ocorrência da solubilidade mínima próxima ao pH isoelétrico deve-se, principalmente, à falta de repulsão eletrostática, o que promove a agregação e a precipitação por meio de interações hidrofóbicas. Algumas proteínas dos alimentos são altamente solúveis em seu pH isoelétrico, por exemplo, a β -lactoglobulina (pI 5,2) e a albumina sérica bovina (pI 5,3). Isso se deve ao fato de que essas proteínas contêm grandes proporções de resíduos hidrofílicos superficiais em relação aos grupos não polares superficiais. Deve-se lembrar que, embora a proteína seja eletricamente neutra em seu pI, ela ainda tem um número igual de cargas positivas e negativas na superfície, as quais contribuem para a hidrofobicidade proteica. Se a hidrofobicidade e as forças de repulsão da hidratação que surgem dos resíduos carregados forem maiores que as interações hidrofóbicas proteína-proteína, então a proteína ainda será solúvel no pI.

Como a maior parte das proteínas é altamente solúvel em pH alcalino de 8-9, a extração proteica de fontes vegetais, como farinha de soja, é realizada a esse pH. Na Figura 5.20 apresenta-se um processo industrial típico para o isolamento da proteína de soja, com base em seu comportamento de solubilidade-pH.

A desnaturação pelo calor muda o perfil da solubilidade-pH das proteínas (Figura 5.21). O isolado proteico do soro nativo (WPI) é completamente solúvel na faixa de pH de 2-9, porém, quando aquecido a 70°C, durante 1-10 min, desenvolve-se um perfil de solubilidade típico em forma de U, com solubilidade mínima em pH de 4,5. A alteração do

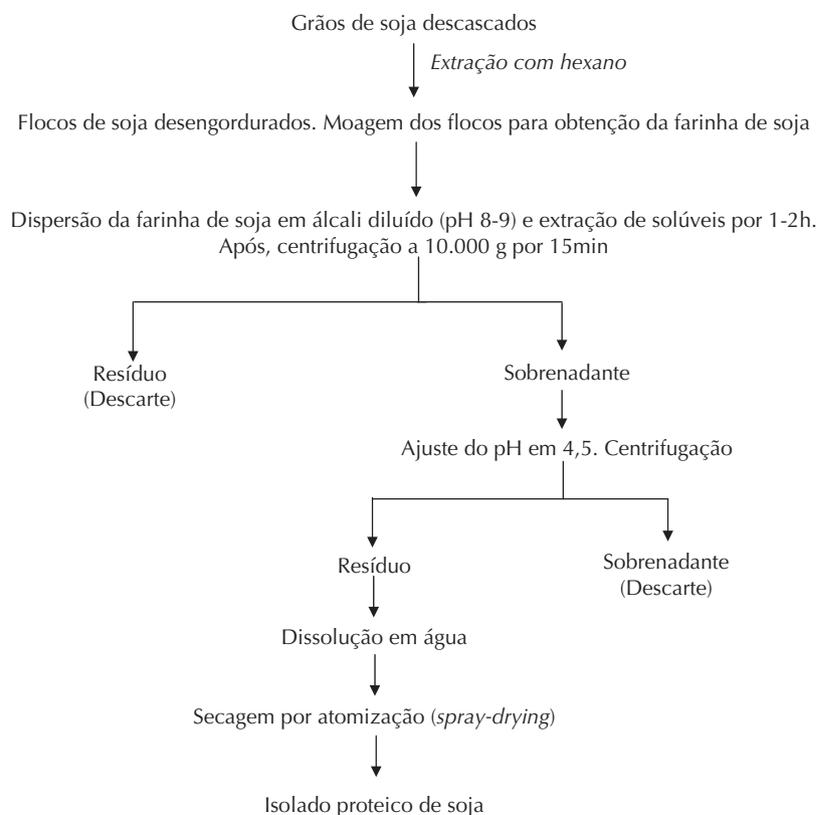


FIGURA 5.20 Processo industrial típico para isolamento da proteína da soja a partir de farinha de soja desengordurada.

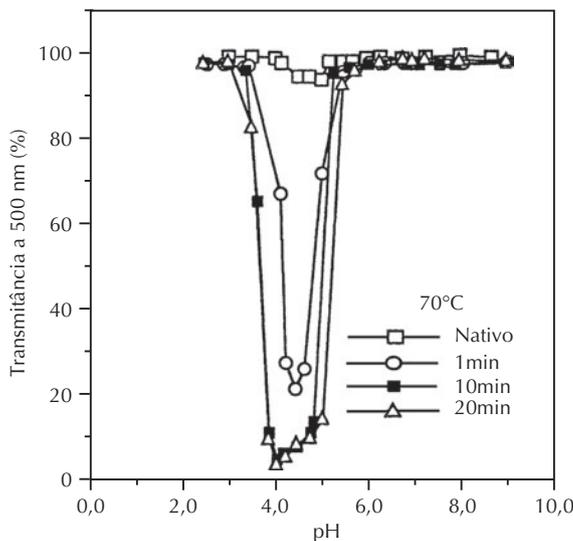


FIGURA 5.21 Perfil de solubilidade-pH das soluções do isolado proteico do soro aquecido a 70°C em vários momentos.

perfil de solubilidade na presença da desnaturação pelo calor se deve ao aumento da hidrofobicidade da superfície proteica como consequência do desdobramento. Este altera o equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-solvente, a favor da primeira.

5.5.2.2 Força iônica e solubilidade

A força iônica de uma solução salina é dada por:

$$\mu = 0,5 \sum C_i Z_i^2 \quad (5.51)$$

onde C_i é a concentração de um íon e Z_i é sua valência. A uma força iônica baixa ($< 0,5$), os íons neutralizam as cargas na superfície das proteínas. Esse peneiramento de carga afeta a solubilidade de duas maneiras, dependendo das características da superfície proteica. A solubilidade diminui para as proteínas que contêm alta incidência de trechos não polares e aumenta para as que não os contêm. O primeiro comportamento é típico de proteínas de soja e o último comportamento é exibido pela β -lactoglobulina. Enquanto a diminuição de solubilidade é causada pelo aumento das interações hidrofóbicas, o aumento de solubilidade é causado pela diminuição de atividade iônica do macroíon. A uma força iônica $> 1,0$, os sais têm efeitos específicos do íon sobre a solubilidade da proteína. À medida que a concentração do sal aumenta, os sais de sulfatos e fluoretos decrescem a solubilidade progressivamente (*salting out*), enquanto os sais de brometo, iodeto, tiocianatos e perclorato aumentam a solubilidade (*salting in*). A uma força iônica constante, a eficácia relativa dos diversos íons sobre a solubilidade segue a série de Hofmeister, sendo que os ânions promovem a solubilidade na ordem $\text{SO}_4^{2-} < \text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^- < \text{SCN}^-$, enquanto os cátions diminuem a solubilidade na ordem $\text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$. Esse comportamento é análogo aos efeitos dos sais sobre a temperatura de desnaturação térmica das proteínas (Ver Seção 5.4).

Em geral, a solubilidade das proteínas de soluções salinas segue a seguinte relação:

$$\log\left(\frac{S}{S_0}\right) = \beta - K_s C_s \quad (5.52)$$

onde S e S_0 são solubilidades da proteína em solução salina e na água, respectivamente, K_s é a constante de *salting out*, C_s é a concentração molar do sal e β é a constante característica apenas da proteína. K_s é positiva para os sais do tipo *salting out* e negativa para os sais do tipo *salting in*.

5.5.2.3 Temperatura e solubilidade

Em pH e força iônica constantes, a solubilidade da maioria das proteínas costuma aumentar com temperaturas entre 0 e 40°C. Ocorrem exceções com proteínas de alta hidrofobicidade, como β -caseína e algumas proteínas de cereais, as quais exibem uma relação negativa com a temperatura. Acima de 40°C, o aumento na energia cinética térmica ocasiona desdobramento da proteína (desnaturação), exposição de grupos não polares, agregação e precipitação, ou seja, diminuição de solubilidade.

5.5.2.4 Solventes orgânicos e solubilidade

A adição de solventes orgânicos, como etanol e acetona, reduz a permitividade do meio aquoso. Isso aumenta as forças eletrostáticas intra e intermoleculares, tanto repulsivas como atrativas. As interações eletrostáticas intramoleculares repulsivas ocasionam o desdobramento da molécula de proteína. No estado de desdobramento, a baixa permitividade do meio promove a ligação intermolecular de hidrogênio entre os grupos peptídicos expostos e as interações eletrostáticas intermoleculares de atração entre grupos de cargas opostas. As interações polares intermoleculares levam à precipitação proteica em solventes orgânicos ou à redução da solubilidade em meio aquoso. O papel das interações hidrofóbicas ao

causar precipitação em solventes orgânicos é mínimo, o que se deve ao efeito de solubilização dos solventes orgânicos sobre resíduos não polares. Uma exceção são as proteínas do tipo prolamina. Essas proteínas são hidrofóbicas ao ponto de serem solúveis apenas em etanol a 70%.

Como a solubilidade das proteínas está intimamente relacionada a seus estados estruturais, ela é usada com frequência como medida do grau de desnaturação durante os processos de extração, isolamento e purificação. Ela também é usada como índice das aplicações potenciais das proteínas. Os concentrados e isolados proteicos preparados comercialmente mostram uma ampla faixa de solubilidade. As características de solubilidade dessas preparações proteicas são expressas como *índice de solubilidade proteica* (PSI) ou *índice de dispersibilidade proteica* (PDI). Ambos os termos expressam a porcentagem (%) de proteína solúvel presente em uma amostra proteica. O PSI dos isolados proteicos comerciais varia entre 25 e 80%.

5.5.3 Propriedades interfaciais das proteínas

Diversos alimentos naturais e processados são produtos de espuma ou produtos do tipo emulsão. Esses tipos de sistemas dispersos são instáveis a menos que uma substância anfifílica adequada esteja presente na interface entre as duas fases (ver Capítulo 13). As proteínas são moléculas anfifílicas, migrando espontaneamente para uma interface ar-água ou uma interface óleo-água. A migração espontânea das proteínas a partir do volume total de líquido para uma interface indica que a energia livre das proteínas é menor na interface que na fase aquosa total. Dessa forma, quando o equilíbrio é estabelecido, a concentração da proteína na região interfacial é sempre muito maior do que a encontrada na fase aquosa total. Diferente dos surfactantes de baixo peso molecular, as proteínas formam uma película altamente viscoelástica, em uma interface, a qual tem a capacidade de suportar choques mecânicos durante a estocagem e a manipulação. Desse modo, as espumas e as emulsões estabilizadas por proteínas são mais estáveis do que as preparadas com surfactantes de baixo peso molecular e, por causa disso, as proteínas são muito usadas para esses fins.

Embora todas as proteínas sejam anfifílicas, elas diferem significativamente em suas propriedades surfactantes. As diferenças de propriedades surfactantes entre as proteínas não podem ser atribuídas a diferenças de proporção de resíduos hidrofóbicos em relação aos hidrofílicos. Se as altas proporções de hidrofobicidade/hidrofiliicidade fossem o principal determinante da atividade superficial das proteínas, então as proteínas vegetais que contêm mais de 40% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos deveriam ser melhores surfactantes do que proteínas do tipo albumina, como a ovoalbumina e a albumina sérica bovina, que contêm <30% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Em contrapartida, a ovoalbumina e a albumina sérica são melhores agentes emulsificantes e espumantes do que as proteínas da soja e outras proteínas vegetais. Além disso, a hidrofobicidade média da maioria das proteínas encontra-se dentro de um intervalo estreito, embora

exibam notáveis diferenças em sua propriedade surfactante. Deve-se concluir, portanto, que as diferenças de propriedade surfactante estão relacionadas, principalmente, às diferenças de conformação das proteínas. Fatores conformacionais de importância incluem estabilidade/flexibilidade da cadeia polipeptídica, facilidade de adaptação a mudanças no ambiente e padrão de distribuição de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície proteica. Todos esses fatores conformacionais são interdependentes, exercendo uma grande influência conjunta sobre a propriedade surfactante das proteínas.

Demonstrou-se que as proteínas com propriedade surfactante desejável possuem três atributos: (1) capacidade de adsorver rapidamente à interface; (2) capacidade de desdobrar-se com rapidez e reorientar-se em uma interface; e (3) uma vez na interface, a capacidade de interagir com moléculas vizinhas e formar uma forte película coesiva e viscoelástica que pode suportar movimentos térmicos e mecânicos [31].

A formação e a estabilização de espumas e emulsões requerem a presença de um surfactante que possa reduzir efetivamente a tensão interfacial entre as fases ar-óleo e aquosa. Isso pode ser alcançado usando-se surfactantes pequenos, tais como lecitina, monoacilglicerol, etc., ou macromoléculas, tais como as proteínas. Em uma concentração equivalente na interface, as proteínas costumam ser menos efetivas do que surfactantes pequenos na diminuição da tensão interfacial. Tipicamente, a maioria das proteínas diminui a tensão nas interfaces ar-água e óleo-água, em cerca de 15 mN m^{-1} , na cobertura da monocamada saturada, em comparação com $30\text{-}40 \text{ mN m}^{-1}$, para surfactantes de baixo peso molecular. A incapacidade das proteínas de reduzir a tensão interfacial está relacionada a suas propriedades estruturais complexas. Embora as proteínas contenham grupos hidrofóbicos e hidrofílicos em sua estrutura primária, não existe uma cabeça hidrofílica ou uma cauda hidrofóbica claramente definidas, como se encontram na lecitina ou no monoacilglicerol. Esses grupos são disseminados de modo aleatório em toda a estrutura primária das proteínas, sendo que na conformação terciária dobrada, existem alguns resíduos hidrofóbicos como segmentos segregados na superfície da proteína, enquanto a maior parte deles está de fato inserida no interior da proteína.

O padrão de distribuição dos segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos sobre a superfície das proteínas afeta sua rapidez de adsorção à interface ar-água ou óleo-água. Se a superfície da proteína for extremamente hidrofílica e não contiver segmentos hidrofóbicos discerníveis, é provável que a ancoragem da proteína na interface não aconteça, pois a superfície da proteína terá uma energia livre mais baixa na fase aquosa do que na interface. À medida que o número dos segmentos hidrofóbicos da superfície proteica aumenta, a adsorção espontânea na interface torna-se mais provável (Figura 5.22) [26]. Os resíduos hidrofóbicos isolados distribuídos aleatoriamente sobre a superfície proteica não constituem um segmento hidrofóbico nem possuem uma energia de interação suficiente para se ancorar fortemente à proteína em uma interface. Embora mais de 40% da superfície acessível total da proteína globular típica esteja coberta com resíduos não polares, eles não aumentarão a adsorção proteica a não

ser que ocorram como segmentos ou regiões segregadas. Em outras palavras, as características moleculares da superfície proteica exercem uma grande influência sobre o fato de a proteína adsorver-se espontaneamente, ou não, a uma interface, e em até que ponto ela será eficaz como estabilizadora de dispersões.

O modo de adsorção das proteínas a uma interface é diferente do modo dos surfactantes de baixo peso molecular. No caso de surfactantes de baixo peso molecular, como os fosfolípídeos e os monoacilgliceróis, os limites conformacionais para adsorção e orientação não existem, pois as partes hidrofílicas e hidrofóbicas estão presentes nos extremos opostos da molécula. No caso das proteínas, no entanto, o padrão de distribuição dos segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície, assim como a rigidez estrutural da molécula, causam limitações à adsorção e à orientação. Em

decorrência da natureza dobrada e volumosa das proteínas, uma vez adsorvida, uma grande porção da molécula permanece na fase principal e apenas uma pequena porção é ancorada na interface (Figura 5.23). A tenacidade com a qual essa pequena porção da molécula de proteína permanece presa à interface depende do número de segmentos peptídicos ancorados à interface e da energética da interação entre esses segmentos e a interface. A proteína será retida na interface apenas quando a soma das mudanças de energia livre negativa das interações dos segmentos for muito maior que a energia cinética térmica da molécula de proteína. O número de segmentos do peptídeo ancorado na interface depende, em parte, da flexibilidade conformacional da molécula. As moléculas altamente flexíveis, como as caseínas, podem sofrer mudanças conformacionais rápidas uma vez adsorvidas à interface, permitindo que segmentos polipeptídicos adicionais

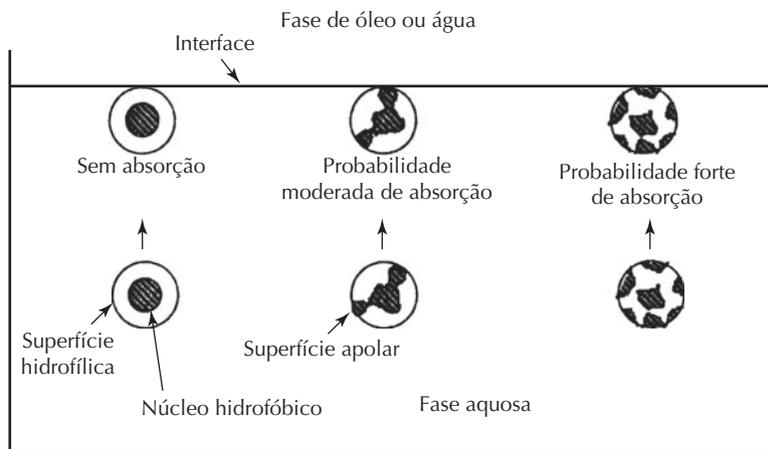


FIGURA 5.22 Representação esquemática do papel dos segmentos hidrofóbicos de superfície sobre a probabilidade de adsorção de proteínas na interface ar-água. (De Damodaran, S. 1990. *Adv. Food Nutr. Res.* 34:1-79.)

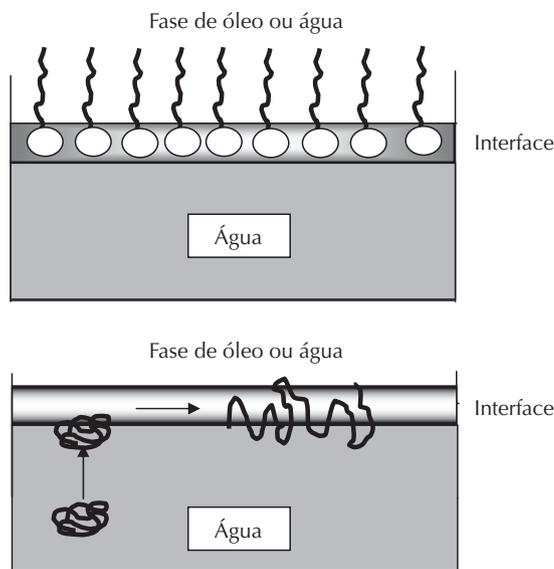


FIGURA 5.23 Diferença entre o modo de adsorção de um surfactante de baixo peso molecular e o de uma proteína, nas interfaces ar-água e óleo-água.

se liguem à interface. Por outro lado, as proteínas globulares rígidas, como a lisozima e a proteína da soja, não podem sofrer mudanças conformacionais extensas na interface.

Nas interfaces, as cadeias polipeptídicas assumem três configurações distintas: fileiras, alças e caudas (Figura 5.24) [26]. As fileiras são segmentos que estão em contato direto com a interface, as alças são segmentos do polipeptídeo que estão suspensos na fase aquosa e as caudas são segmentos N- e C-terminais da proteína, os quais costumam estar localizados na fase aquosa. A distribuição relativa dessas três configurações depende das características conformacionais da proteína. Quanto maior a proporção de segmentos polipeptídicos na configuração de uma fileira, mais forte será a ligação e mais baixa, a tensão interfacial.

A propriedade molecular isolada mais importante, a qual causa impacto sobre a propriedade surfactante das proteínas, é a flexibilidade molecular. Isso se refere à capacidade inata da proteína de sofrer rápida mudança conformacional quando é transferida de um ambiente para outro, por exemplo, da fase aquosa total para uma interface. A compressibilidade adiabática das proteínas costuma ser usada como medida de sua flexibilidade molecular. Pesquisas com várias proteínas não relacionadas têm mostrado que a atividade superficial

dinâmica das proteínas, isto é, a redução da tensão superficial causada por um miligrama de proteína por cm^2 , durante a adsorção da fase principal para a interface ar-água, está positiva e linearmente correlacionada à compressibilidade adiabática (flexibilidade) de proteínas (Figura 5.25) [106]. A mudança rápida de conformação em uma interface é essencial para que a proteína reoriente seus resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos em direção ao óleo e às fases aquosas, bem como para maximizar a exposição e a partição desses resíduos em duas fases. Isso assegurará uma rápida redução na tensão interfacial, em especial nas fases iniciais de formação de uma emulsão.

A força mecânica de uma película proteica em uma interface depende das interações intermoleculares coesivas. Elas incluem interações eletrostáticas atrativas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A polimerização interfacial das proteínas adsorvidas por meio de reações de troca dissulfeto-sulfidrila também aumenta suas propriedades viscoelásticas. A concentração de proteínas na película interfacial é de cerca de 20-25% (m/v), sendo que a proteína ocorre em um estado de quase gel. O equilíbrio de várias interações não covalentes é crucial para a estabilidade e as propriedades viscoelásticas da película tipo gel.

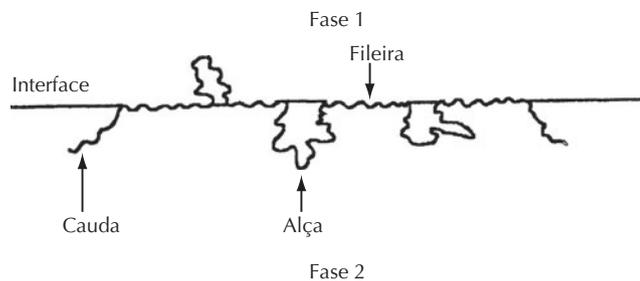


FIGURA 5.24 As várias configurações de um polipeptídeo flexível em uma interface. (De Damodaran, S.1990. *Adv. Food Nutr. Res.* 34:1-79.)

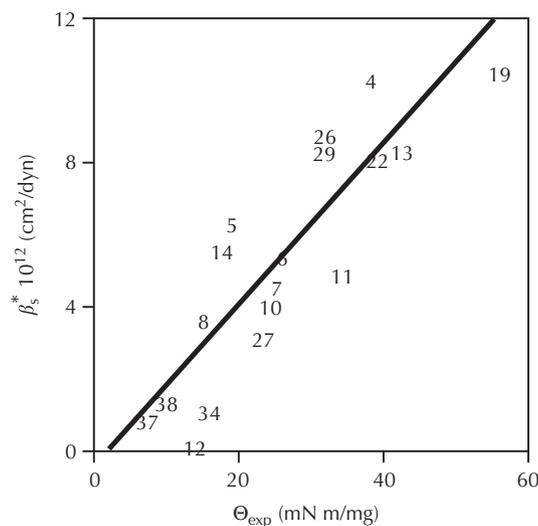


FIGURA 5.25 Relação entre compressibilidade adiabática e propriedade surfactante das proteínas. Os números do gráfico referem-se às identidades das proteínas. (Ver Referência 106 para maiores detalhes.)

Por exemplo, se as interações hidrofóbicas forem muito fortes, isso pode levar a agregação interfacial, coagulação e, finalmente, precipitação da proteína em detrimento da integridade da película. Se as forças eletrostáticas repulsivas forem mais fortes que as interações atrativas, isso pode impedir a formação de uma película espessa e coesa. Portanto, é necessário que haja equilíbrio adequado das interações de atração, repulsão e hidratação, a fim de que se forme uma película viscoelástica estável. Os diversos processos moleculares que ocorrem durante a adsorção e a formação das películas de proteína nas interfaces estão resumidos na Figura 5.26.

Os princípios básicos envolvidos na formação e na estabilidade das emulsões e espumas são muito semelhantes, no entanto, como a energética dessas interfaces é diferente, os requisitos moleculares para a funcionalidade da proteína nesses ambientes não são iguais. Em outras palavras, uma proteína que é um bom emulsificador pode não ser um bom agente de formação de espuma.

Deve ficar claro, agora, que o comportamento das proteínas nas interfaces é muito complexo, não sendo, ainda, bem compreendido. Portanto, a discussão seguinte sobre as propriedades emulsificantes e de formação de espuma dos alimentos proteicos será, em grande parte, de natureza qualitativa.

5.5.3.1 Propriedades emulsificantes

A físico-química da formação da emulsão e os fatores que afetam a formação de creme, floculação, coalescência e estabilidade foram abordados no Capítulo 13.

Vários alimentos naturais e processados, como leite, gema de ovo, leite de coco, leite de soja, manteiga, margarina, maionese, pastas para passar no pão, molhos para salada, sobremesas geladas, salsichas, linguíças e bolos, são produtos do tipo emulsão, nos quais as proteínas desempenham um papel importante como emulsificantes. No leite nativo, a membrana composta de lipoproteínas estabiliza os glóbulos de gordura. Quando o leite é homogeneizado a película de proteína formada de micelas de caseína e de proteínas do soro substitui a membrana lipoproteica. O leite homogeneizado é mais estável à formação de nata em comparação com o leite, pois a película proteica de micelas soro-caseína é mais resistente do que a membrana lipoproteica nativa.

5.5.3.1.1 Métodos para determinação das propriedades emulsificantes das proteínas

As propriedades emulsificantes das proteínas alimentares são avaliadas por meio de vários métodos, tais como distribuição por tamanho das gotículas de óleo formadas, atividade emulsificante, capacidade de emulsão (CE) e estabilidade da emulsão.

Índice de atividade emulsificante: As propriedades físicas e sensoriais de uma emulsão estabilizada por proteína dependem do tamanho das gotículas formadas e da área interfacial total criada. O tamanho médio das gotículas das emulsões pode ser determinado por diversos métodos, tais como microscopia de luz (não muito confiável), microscopia eletrô-

nica, espalhamento de luz (espectroscopia por correlação de fóton) ou uso de um contador Coulter. Conhecendo-se o tamanho médio da gotícula, a área interfacial total pode ser obtida a partir da seguinte relação:

$$A = \frac{3\phi}{R} \quad (5.53)$$

onde ϕ é a fração do volume da fase dispersa e R é o raio médio das partículas de emulsão. Se m é a massa da proteína então o Índice de atividade de emulsificante (IAE), isto é, a área interfacial criada por unidade de massa da proteína é

$$\text{IAE} = \frac{3\phi}{Rm} \quad (5.54)$$

Outro método simples e mais prático para determinação do IAE das proteínas é o método turbidimétrico [99]. A turbidez de uma emulsão é dada por:

$$T = \frac{2,303A}{l} \quad (5.55)$$

onde A é a absorvância e l é o comprimento do percurso. De acordo com a teoria de espalhamento de luz de Mie, a área interfacial de uma emulsão constitui o dobro de sua turbidez. Se ϕ é a fração do volume do óleo, então C é o peso da proteína por volume unitário da fase aquosa, dessa forma, o IAE da proteína é dado por:

$$\text{IAE} = \frac{2T}{(1-\phi)C} \quad (5.56)$$

Deve-se mencionar que no artigo original [99], ϕ , em vez de $(1-\phi)$ foi usado no denominador da equação supracitada. Essa expressão é a correta, uma vez que ϕ é definido como a fração do volume do óleo e, então, $(1-\phi)C$ é a massa total da proteína, em um volume unitário da emulsão [17]. Embora esse método seja simples e prático, sua principal desvantagem é que ele se baseia na mensuração da turbidez em um único comprimento de onda, 500 nm. Como a turbidez de emulsões alimentícias é dependente do comprimento de onda, a área interfacial obtida a partir da turbidez em 500 nm não é muito acurada. Portanto, o uso da equação supracitada para se estimar o diâmetro médio da partícula ou o número de partículas presentes na emulsão dá resultados que não são muito confiáveis. Entretanto, esse método pode ser usado para comparação qualitativa de atividades emulsificantes de diferentes proteínas, ou mudanças na atividade emulsificante de uma proteína após vários tratamentos.

Carga proteica: A quantidade de proteína adsorvida na interface óleo-água de uma emulsão influencia sua estabilidade. Para se determinar a quantidade de proteína adsorvida, a emulsão é centrifugada, a fase aquosa é separada e a fase lipídica é lavada e centrifugada, diversas vezes, para que se remova qualquer proteína fracamente adsorvida. A quantidade de proteínas adsorvidas nas partículas de emulsão é determinada pela diferença entre o total de proteína inicialmente presente na emulsão e a quantidade presente no fluido de lavagem da

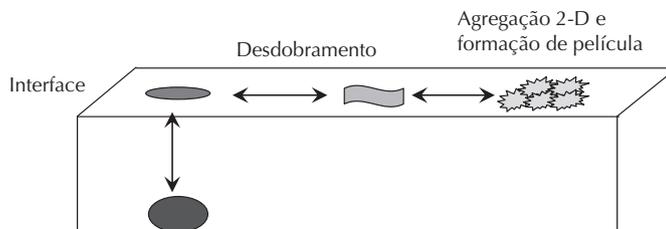


FIGURA 5.26 Ilustração esquemática de diversos processos moleculares ocorrentes nas películas de proteínas das interfaces.

fase lipídica. Conhecendo-se a área total interfacial das partículas de emulsão, pode-se calcular a quantidade de proteína adsorvida/m² de área interfacial. No geral, a carga proteica está localizada na faixa que vai de aproximadamente 1-3 mg/m² da área interfacial. À medida que a fração de volume da fase óleo aumenta, a carga proteica diminui, considerando-se um conteúdo proteico constante na emulsão total. Para emulsões com muita gordura e gotículas de tamanho pequeno, necessita-se de mais proteína para o revestimento adequado da área interfacial e a estabilização da emulsão.

Capacidade de emulsão (CE): CE é o volume (mL) de óleo que pode ser emulsificado por grama de proteína antes que ocorra a inversão de fase (mudança da emulsão óleo em água para água em óleo). Esse método envolve a adição de óleo ou gordura fundida a taxa e temperatura constantes, em solução aquosa de proteína continuamente agitada em um processador de alimentos. A inversão da fase é detectada por mudança abrupta de viscosidade ou cor (em geral, adiciona-se um corante ao óleo) ou por aumento da resistência elétrica. Para uma emulsão estabilizada por proteína, a inversão de fase costuma ocorrer quando o ϕ está em torno de 0,65-0,85. A inversão não se processa instantaneamente, sendo precedida pela formação de uma emulsão dupla água em óleo em água. Como a CE é expressa como volume de óleo emulsificado por grama de proteína na inversão de fase, ela diminui com o aumento da concentração de proteína logo que se alcança o ponto no qual a proteína não adsorvida se acumula na fase aquosa. Portanto, para se comparar capacidades de emulsão de diferentes proteínas, deve-se usar perfis CE *versus* concentração de proteína, em detrimento de CE a uma concentração proteica específica.

Estabilidade da emulsão: As emulsões estabilizadas por proteína costumam permanecer estáveis durante dias. Dessa forma, não se observa uma quantidade detectável de formação de creme ou separação de fase em um intervalo de tempo razoável quando as amostras são armazenadas sob condições atmosféricas. Portanto, frequentemente, usam-se condições drásticas, como estocagem a uma temperatura elevada ou separação sob força centrífuga para avaliação de estabilidade da emulsão. Quando se usa centrifugação, a estabilidade passa a ser então expressa como o decréscimo percentual da área da interface (i.e., turbidez) da emulsão ou do volume percentual do creme separado ou, ainda, como conteúdo de gordura da camada de nata. No entanto, com mais frequência, a estabilidade da emulsão é expressa como:

$$EE = \frac{\text{volume da camada de nata}}{\text{volume total da emulsão}} \times 100 \quad (5.57)$$

onde o volume da camada de nata é medido após tratamento padronizado de centrifugação. A técnica de centrifugação comum envolve a centrifugação de um volume conhecido de emulsão em um tubo de centrífuga graduado a 1.300 g, por 5min. O volume da fase lipídica separada é então medido e expresso como percentual do volume total. Às vezes, usa-se a centrifugação a uma força gravitacional relativamente baixa (180g) por um tempo mais longo (15min) para que se evite a coalescência das gotículas.

O método turbidimétrico (ver acima) também pode ser usado para se avaliar a estabilidade da emulsão. Nesse caso, a estabilidade é expressa como Índice da estabilidade da emulsão (IEE), o qual é definido como tempo necessário para se alcançar a turbidez da emulsão que representa a metade do valor original.

Os métodos usados para determinação da estabilidade da emulsão são muito empíricos. A grandeza mais importante relacionada à estabilidade é a mudança de área interfacial ao longo do tempo, mas ela é difícil de ser medida diretamente.

5.5.3.1.2 Fatores que influenciam a emulsificação

As propriedades das emulsões estabilizadas pelas proteínas são afetadas por vários fatores. Eles incluem fatores intrínsecos, como pH, força iônica, temperatura, presença de surfactantes de baixo peso molecular, açúcares, volume da fase óleo, tipo de proteína e o ponto de fusão do óleo usado; e fatores extrínsecos, como o tipo de equipamento, taxa de entrada de energia e taxa de cisalhamento. Ainda não surgiram métodos padronizados para se avaliar sistematicamente as propriedades emulsificantes das proteínas. Portanto, os resultados entre os laboratórios não podem ser comparados com precisão, o que impede a compreensão dos fatores moleculares que afetam as propriedades emulsificantes das proteínas.

As forças gerais envolvidas na formação e na estabilização das emulsões foram discutidas no Capítulo 13. Portanto, apenas os fatores moleculares que afetam as emulsões estabilizadas por proteínas necessitam ser discutidos aqui.

A solubilidade desempenha um papel nas propriedades emulsificantes, porém, a existência de 100% de solubilidade não é um requisito absoluto. Embora as proteínas altamente insolúveis não funcionem bem como emulsificantes, não existe nenhuma relação confiável entre solubilidade e propriedades emulsificantes na faixa de 25-80% de solubilidade [76]. Entretanto, como a estabilidade de uma película

proteica na interface óleo-água depende de interações favoráveis, tanto com a fase água como com a fase óleo, pode ser necessário que haja algum grau de solubilidade. O requisito mínimo de solubilidade para um bom desempenho pode ser variável entre as proteínas. Em emulsões cárneas, como linguiças e salsichas, a solubilização das proteínas miofibrilares em 0,5 M NaCl aumenta suas propriedades emulsificantes. Alguns isolados proteicos de soja comerciais, os quais são obtidos por processamento térmico, têm baixas propriedades emulsificantes por causa de sua solubilidade muito baixa.

A formação e a estabilidade das emulsões estabilizadas por proteínas são afetadas pelo pH. Vários mecanismos estão envolvidos nesse processo. Geralmente, as proteínas que têm alta solubilidade em pH isoeletrico (p. ex., albumina sérica, gelatina e proteínas da clara do ovo) mostram CE e atividade emulsificante máxima nesse pH. A falta de carga líquida e as interações repulsivas eletrostáticas em pH isoeletrico ajudam a maximizar a carga proteica na interface, promovendo a formação de uma película altamente viscoelástica e contribuindo para a estabilidade da emulsão. No entanto, a falta de interações repulsivas eletrostáticas entre as partículas de emulsão pode, em alguns casos, promover floculação, coalescência e, dessa forma, diminuir a estabilidade da emulsão. Por outro lado, se a proteína estiver altamente hidratada em pH isoeletrico (o que é incomum), então as forças de repulsão de hidratação entre as partículas da emulsão podem prevenir a floculação e a coalescência e, assim, estabilizar a emulsão. Como, em seu pH isoeletrico, a maior parte das proteínas alimentares (caseínas, proteínas comerciais do soro, proteínas da carne e proteínas da soja) é pouco solúvel, pouco hidratada e desprovida de forças repulsivas eletrostá-

ticas, elas geralmente não são bons emulsificantes a esse pH. Essas proteínas podem, no entanto, tornar-se emulsificadores eficazes quando se distanciam de seu pH isoeletrico.

As propriedades emulsificantes das proteínas demonstram uma fraca correlação positiva com a hidrofobicidade de superfície, mas não com a residual média (i.e., kcal mol⁻¹ resíduo⁻¹). A capacidade de várias proteínas de diminuir a tensão interfacial na interface óleo-água e de aumentar o IAE está relacionada a seus valores de hidrofobicidade de superfície (Figura 5.27). No entanto, essa relação não é, de modo algum, perfeita. As propriedades emulsificantes de várias proteínas, como β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e proteínas de soja não mostram uma correlação forte com a hidrofobicidade de superfície.

A hidrofobicidade de superfície das proteínas costuma ser determinada ao se medir a quantidade de uma sonda fluorescente hidrofóbica, como o ácido *cis*-parinário, que pode ligar-se a proteínas [62]. Embora esse método forneça alguma informação sobre a hidrofobicidade da superfície proteica, é questionável se o valor medido realmente reflete a hidrofobicidade da superfície proteica. A verdadeira definição da hidrofobicidade de superfície é: a porção da superfície não polar da proteína que faz contato com a água total circundante. Entretanto, o ácido *cis*-parinário é capaz de se ligar apenas às cavidades hidrofóbicas. Essas cavidades proteicas são acessíveis a ligantes não polares, mas elas não são acessíveis à água, podendo não ser acessíveis a qualquer uma das duas fases em uma emulsão óleo-água, a não ser que a proteína seja capaz de passar por um rápido rearranjo conformacional na interface. A baixa correlação da hidrofobicidade de superfície (como medida pela ligação do

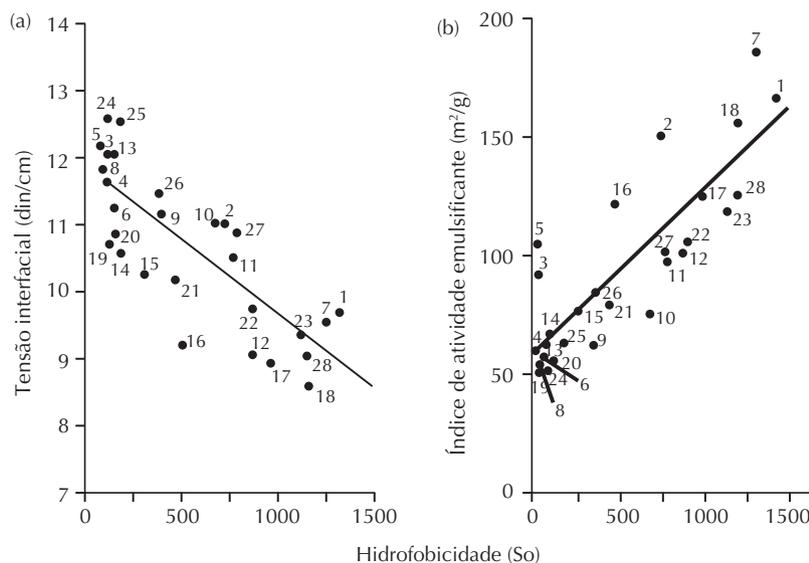


FIGURA 5.27 Correlações da hidrofobicidade superficial de várias proteínas com (a) tensão interfacial óleo-água e (b) IAE (Índice de atividade emulsificante). A hidrofobicidade superficial foi determinada a partir da quantidade de sonda fluorescente hidrofóbica por unidade de peso da proteína. Os números plotados representam (1) albumina sérica bovina; (2) β -lactoglobulina; (3) tripsina; (4) ovoalbumina; (5) conalbumina; (6) lisozima; (7) κ -caseína; (8-12) ovoalbumina desnaturada pelo calor a 85°C por 1, 2, 3, 4 ou 5 min, respectivamente; (13-18) lisozima desnaturada pelo calor a 85°C por 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 min, respectivamente; (19-23) ovoalbumina ligada a 0,2, 0,3, 1,7, 5,7 ou 7,9 mólis de dodecil sulfato por mol de proteína, respectivamente; (24-28) ovoalbumina ligada a 0,3, 0,9, 3,1, 4,8 ou 8,2 mólis de linoleato por mol de proteína, respectivamente. (Kato, A. e S. Nakai. 1980. *Biochim. Biophys. Acta* **624**:13-20.)

ácido *cis*-parinário) com as propriedades emulsificantes de algumas proteínas pode estar relacionada ao fato de que o ácido *cis*-parinário não fornece indicação de flexibilidade molecular. Essa flexibilidade na interface óleo-água pode ser o determinante mais importante das propriedades emulsificantes das proteínas.

A desnaturação parcial das proteínas antes da emulsificação, a qual não resulta em insolubilização, costuma melhorar suas propriedades emulsificantes. Isso se deve ao aumento da flexibilidade molecular e da hidrofobicidade de superfície. No estado desordenado, as proteínas que contêm grupos sulfidríla livres e pontes dissulfeto sofrem lenta polimerização por meio da reação de troca dissulfeto-sulfidríla [32], o que leva à formação de uma película altamente viscoelástica na interface óleo-água. A desnaturação excessiva pelo calor pode prejudicar as propriedades emulsificantes, tornando a proteína insolúvel.

Emulsificadores de baixo peso molecular, como os fosfolípidos, que geralmente são encontrados em alimentos, competem com as proteínas pela adsorção na interface óleo-água [24,38,67]. Como os surfactantes de baixo peso molecular podem difundir-se com rapidez na interface e são desprovidos de restrições conformacionais para reorientação nela, eles podem efetivamente inibir a adsorção das proteínas em concentrações elevadas. Se emulsificantes de baixo peso molecular forem adicionados a uma emulsão estabilizada por proteína, eles poderão deslocá-la da interface, causando instabilidade na emulsão.

Outro fator que afeta as emulsões estabilizadas por proteínas é a composição proteica. Em geral, as proteínas dos alimentos são misturas de vários componentes proteicos. Por exemplo, a proteína do ovo é uma mistura de cinco proteínas principais e vários componentes proteicos secundários. Da mesma forma, a proteína do soro constitui uma mistura de α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e várias outras proteínas secundárias. As proteínas de reserva de sementes, como isolado proteico de soja, contêm pelo menos duas frações proteicas principais, a saber, leguminas e vicilinas. Durante a emulsificação, os componentes proteicos da mistura competem entre si pela adsorção à interface. A composição da película proteica formada na interface depende das atividades de superfícies relativas de vários componentes proteicos da mistura. Por exemplo, quando se permite que a mistura de 1:1 de α - e β -caseínas se adsorvam à interface óleo-água, a quantidade de α -caseína da película proteica em equilíbrio é quase o dobro daquela da β -caseína [30]. Na interface ar-água, entretanto, observa-se um comportamento oposto [6]. Variações na composição proteica da fase principal afetariam a composição proteica da película adsorvida e, possivelmente, a estabilidade da emulsão.

A uma concentração elevada, as misturas proteicas costumam exibir incompatibilidade para se misturar em solução [100]. Nas películas de proteínas mistas em uma interface óleo-água, na qual a concentração proteica local encontra-se na faixa de 15 a 30%, a ocorrência de uma separação de fases bidimensional das proteínas é possível com o tempo de estocagem. Relataram-se evidências para isso nas interfaces ar-água [105,114] e óleo-água [30]. Se ocorrer uma separa-

ção das proteínas em fases distintas, em películas de proteína mista ao redor das gotículas de óleo, é possível que a interface dessas regiões separadas por fase possa agir como fonte de instabilidade nas emulsões. No entanto, ainda não se determinou uma correlação direta entre a incompatibilidade termodinâmica de se misturar as proteínas em películas proteicas mistas na interface óleo-água e a estabilidade cinética das emulsões compostas de misturas proteicas.

5.5.3.2 Propriedades espumantes

As espumas consistem de uma fase contínua aquosa e uma fase dispersa gasosa (ar). Muitos alimentos processados são produtos do tipo espuma. Eles incluem cremes batidos, sorvetes, bolos, merengues, pães, suflês, musses e *marshmallows*. As propriedades texturais singulares e a sensação sensorial bucal causada por esses produtos são provenientes das minúsculas bolhas de ar dispersas. Na maioria desses produtos, as proteínas são os principais agentes ativos de superfície que ajudam na formação e na estabilização da fase dispersa gasosa.

Em geral, a formação de bolhas ou o ato de bater ou agitar uma solução proteica criam espumas estabilizadas por proteínas. A propriedade de uma proteína de formar espuma refere-se a sua capacidade de formar uma película fina e resistente na interface gás-líquido, de modo que grandes quantidades de bolhas de gás possam ser incorporadas e estabilizadas. As propriedades de formação de espuma são avaliadas de várias maneiras. A capacidade de formar espumas ou a espumabilidade de uma proteína refere-se à quantidade de área interfacial que pode ser criada pela proteína. Ela pode ser expressa de diversas maneiras, como *overrun* (volume de espuma em estado estável) ou *poder espumante* (ou expansão da espuma). O *overrun* é definido como

$$\text{Overrun} = \frac{\text{Volume de espuma}}{\text{Volume de líquido inicial}} \times 100 \quad (5.58)$$

O poder espumante (FP) é expresso como:

$$\text{FP} = \frac{\text{Volume de gás incorporado}}{\text{Volume de líquido}} \times 100 \quad (5.59)$$

O poder espumante geralmente aumenta com a concentração proteica até que um valor máximo seja atingido. Ele também é afetado pelo método usado para formação de espuma. O FP a uma dada concentração proteica costuma ser usado como base para comparação das propriedades de formação de espuma das diversas proteínas. Os FPs de várias proteínas em pH 8,0 são dados na Tabela 5.15 [82].

Estabilidade da espuma refere-se à capacidade da proteína de estabilizar a espuma contra as tensões gravitacionais e mecânicas. Ela costuma ser expressa como tempo necessário à drenagem de 50% do líquido da espuma ou para redução em 50% do volume da espuma. Esses métodos são muito empíricos, não dando informações fundamentais sobre os fatores que afetam a estabilidade da espuma. A medida mais direta da estabilidade da espuma é a redução da área interfacial da espuma em função do tempo. Isso pode ser

TABELA 5.15 Comparação do poder espumante de soluções proteicas

Tipo de proteína	Poder espumante ^a a 0,5% de conc. proteica (p/v) (%)
Albumina sérica bovina	280
Isolado proteico de soro	600
Clara do ovo	240
Ovoalbumina	40
Plasma bovino	260
β -lactoglobulina	480
Fibrinogênio	360
Proteína de soja (hidrolisada por enzimas)	500
Gelatina (pele suína processada por ácido)	760

^a Calculada de acordo com a Equação 5.56

Fonte: Poole, S. et al. 1984. *J. Sci. Food Agric.* 35:701-711.

feito como se segue. De acordo com o princípio de Laplace, a pressão interna de uma bolha é maior do que a pressão (atmosférica) externa e, em condições estáveis, a diferença de pressão ΔP , é

$$\Delta P = p_i - p_o = \frac{4\gamma}{r} \quad (5.60)$$

onde p_i e p_o são as pressões interna e externa, respectivamente, r é o raio da bolha de espuma e γ é a tensão superficial. De acordo com a equação supracitada, a pressão dentro de um recipiente fechado que contém espuma aumentará quando a espuma entrar em colapso. A mudança líquida na pressão é [92]

$$\Delta P = \frac{-2\gamma \Delta A}{3V} \quad (5.61)$$

onde V é o volume total do sistema, ΔP é a mudança de pressão e ΔA é a mudança líquida na área interfacial resultante da fração de espuma que entrou em colapso. A área interfacial inicial da espuma é dada por:

$$A_0 = \frac{3V\Delta P_\infty}{2\gamma} \quad (5.62)$$

onde ΔP_∞ é a mudança líquida de pressão quando a espuma total entra em colapso. O valor A_0 é a medida da espumabilidade; a taxa de decréscimo de A ao longo do tempo pode ser usada como medida da estabilidade da espuma. Essa abordagem tem sido usada para estudar as propriedades de formação de espuma das proteínas dos alimentos [133,135].

Força ou *firmeza* da espuma refere-se ao peso máximo que uma coluna de espuma pode suportar antes de entrar em colapso. A mensuração da viscosidade da espuma também serve para avaliar essa propriedade.

5.5.3.2.1 Fatores ambientais que influenciam a formação e a estabilidade da espuma

pH: Diversos estudos mostraram que as espumas estabilizadas por proteínas são mais estáveis em pH isoeletrico da proteína do que em qualquer outro pH, contanto que não haja insolubilização da proteína no pI. Na região do pH isoeletrico ou perto dela, a falta de interações repulsivas promove inte-

rações favoráveis de proteína-proteína e a formação de uma película viscosa na interface. Além disso, ocorre aumento de quantidade de proteína adsorvida à interface no pI por causa da falta de repulsão entre a interface e as moléculas em adsorção. Esses dois fatores aumentam tanto a espumabilidade como a estabilidade da espuma. Se a proteína é pouco solúvel no pI, como acontece com a maioria das proteínas alimentares, então, apenas a fração da proteína solúvel será envolvida na formação da espuma. Se a concentração dessa fração solúvel for muito baixa, a quantidade de espuma formada será menor, mas a estabilidade será elevada. Embora a fração insolúvel não contribua para a espumabilidade, a adsorção dessas partículas proteicas insolúveis poderá estabilizar a espuma, talvez por aumento das forças coesivas na película proteica. Geralmente a adsorção das partículas hidrofóbicas aumenta a estabilidade das espumas. Em um pH diferente do pI, a espumabilidade das proteínas costuma ser boa, porém, a estabilidade da espuma é baixa. As proteínas da clara do ovo exibem boas propriedades de formação de espuma em pH de 8-9 e em seu pH isoeletrico de 4-5.

Sais: Os efeitos dos sais sobre as propriedades de formação de espuma das proteínas dependem do tipo de sal e das características de solubilidade da proteína na solução salina. A espumabilidade e a estabilidade da espuma da maioria das proteínas globulares, como albumina sérica bovina, albumina do ovo, glúten e proteínas da soja, aumentam com a elevação da concentração de NaCl. Esse comportamento costuma ser atribuído à neutralização das cargas pelos íons salinos. Entretanto, algumas proteínas, como a proteína do soro de leite mostram o efeito oposto: tanto a espumabilidade como a estabilidade da espuma decrescem com o aumento da concentração de NaCl (Tabela 5.16) [136]. Isso é atribuído ao *salting in* (solubilização por sais) das proteínas do soro, em especial da β -lactoglobulina. As proteínas que são *salted out* (precipitadas por sais), em solução salina determinada, geralmente exibem maiores propriedades de formação de espuma, enquanto as que são *salted in* exibem propriedades de formação de espuma precárias. Cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} , melhoram de maneira drástica tanto a formação da espuma como sua estabilidade a concentrações de 0,02-0,04 M. Isso se deve, principalmente, às ligações

TABELA 5.16 Efeito do NaCl sobre espumabilidade e estabilidade da espuma do isolado proteico do soro de leite

Concentração de NaCl (M)	Área interfacial total (cm ² /ml de espuma)	Tempo para o colapso de 50% da área inicial (s)
0,00	333	510
0,02	317	324
0,04	308	288
0,06	307	180
0,08	305	165
0,10	287	120
0,15	281	120

Fonte: Compilada a partir de Zhu, H. e S. Damodaran. 1994. *J. Food Sci.* 59:554–560.

cruzadas das moléculas proteicas e à criação de películas com melhores propriedades viscoelásticas [134].

Açúcares: A adição de sacarose, lactose e outros açúcares a soluções proteicas costuma prejudicar a espumabilidade, porém aumenta a estabilidade das espumas. O efeito positivo dos açúcares sobre a estabilidade das espumas se deve ao aumento da viscosidade da fase principal, o que reduz a taxa de drenagem do fluido da lamela. A diminuição da capacidade de formação de espuma se deve ao aumento da estabilidade da estrutura proteica nas soluções de açúcar. Em razão disso, a molécula proteica é menos capaz de se desdobrar quando da adsorção na interface. Isso diminui a capacidade da proteína de reduzir a tensão interfacial, produzir grandes áreas interfaciais e um grande volume de espuma durante o batimento. Em produtos de sobremesa do tipo espuma, que contêm açúcar, como merengues, suflês e bolos, é preferível que se acrescente o açúcar depois do batimento, quando possível. Isso permitirá a adsorção da proteína e seu desdobramento, formando uma película estável, então, o açúcar acrescentado aumentará a estabilidade da espuma, elevando a viscosidade do fluido da lamela.

Lipídeos: Quando presentes em concentrações >0,5%, lipídeos, em especial os fosfolipídeos, diminuem acentuadamente as propriedades de formação de espuma das proteínas. Como os lipídeos são mais ativos na superfície do que as proteínas, eles se adsorvem rapidamente na interface ar-água, inibindo a adsorção das proteínas durante a formação de espuma. Como as películas de lipídeos são desprovidas das propriedades coesivas e viscoelásticas, as quais são necessárias para se opor à pressão interna das bolhas de espuma, elas se expandem rápido e depois sofrem colapso quando batidas. Dessa forma, os isolados e os concentrados proteicos do soro (WPC) livre de lipídeos, bem como as proteínas da soja e as proteínas do ovo sem gema, mostram melhores propriedades de formação de espuma do que as preparações contaminadas por lipídeos.

Concentração proteica: Diversas propriedades das espumas são influenciadas pela concentração de proteínas. Quanto maior a concentração de proteína, mais firme será a espuma. A firmeza desta resulta do pequeno tamanho da bolha e da alta viscosidade. A estabilidade da espuma é aumentada por grandes concentrações proteicas, uma vez que isso aumenta a viscosidade e facilita a formação de uma película proteica

coesiva de múltiplas camadas na interface. A espumabilidade costuma atingir seu valor máximo em algum ponto durante o aumento da concentração de proteínas. Algumas proteínas, por exemplo, a albumina sérica, são capazes de formar espumas relativamente estáveis a uma concentração proteica de 1%, enquanto proteínas como o WPI e as proteínas da soja exigem o mínimo de 2 a 5% para a formação de espumas relativamente estáveis. No geral a maior parte das proteínas exibe sua espumabilidade máxima a uma concentração de 2 a 8%. A concentração interfacial das proteínas nas espumas é de cerca de 2 a 3 mg/m².

A desnaturação parcial por calor melhora as propriedades de formação de espuma das proteínas. Por exemplo, o aquecimento do WPI a 70°C durante 1min aumenta as propriedades de formação de espuma, enquanto o aquecimento a 90°C durante 5min as diminuem, embora as proteínas aquecidas permaneçam solúveis em ambos os casos [135]. A diminuição das propriedades de formação de espuma do WPI aquecido a 90°C deve-se à extensa polimerização da proteína por meio das reações de troca dissulfeto-sulfidril. Proteínas com alto teor de ligação cruzada e de polimerização não são capazes de se adsorverem à interface ar-água durante a formação de espuma.

O método de geração de espuma influencia as propriedades de formação de espuma das proteínas. A introdução de ar por formação de bolhas ou pulverização costuma resultar em uma espuma “úmida” com bolhas de tamanho relativamente grande. O batimento a uma velocidade moderada resulta em espumas com bolhas de tamanho pequeno, pois a ação de cisalhamento resulta em desnaturação parcial da proteína antes que ocorra a adsorção. No entanto, o batimento a uma alta taxa de cisalhamento ou mesmo o excesso de batimento podem diminuir o poder de formação de espuma por causa de desnaturação extensa, agregação e precipitação das proteínas.

Alguns alimentos do tipo espuma, como *marshmallow*, bolos e pães, são aquecidos depois que a espuma é formada. Durante o aquecimento, a expansão do ar e a redução da viscosidade podem causar ruptura das bolhas e colapso da espuma. Nesses casos, a integridade da espuma depende da gelificação da película proteica na interface, de modo que se desenvolva uma força mecânica suficiente para estabilização da espuma. A gelatina, o glúten, a clara do ovo, produtos que apresentam boas propriedades de formação de espuma e gelificação, são bastante adequados para essa finalidade.

5.5.3.2.2 *Propriedades moleculares que influenciam na formação e a estabilidade da espuma*

Para que uma proteína aja de forma efetiva como agente de formação de espuma ou como emulsificador, ela deve satisfazer os seguintes requisitos básicos; (1) deve ser capaz de adsorver-se com rapidez à interface ar-água; (2) deve desdobrar-se prontamente e rearranjar-se na interface; e (3) deve ser capaz de formar uma película coesiva viscosa por meio de interações intermoleculares. As propriedades moleculares que afetam as propriedades de formação de espuma são flexibilidade molecular, densidade e distribuição da carga e hidrofobicidade.

A energia livre da interface ar-água é significativamente maior do que a da óleo-água. Portanto, para estabilizar a interface ar-água, a proteína deve ter a capacidade de adsorver-se com rapidez à interface recém-criada, diminuindo instantaneamente a tensão interfacial a um valor baixo. A redução da tensão interfacial depende da capacidade da proteína de se desdobrar de modo rápido, de rearranjar-se e expor seus grupos hidrofóbicos na interface. As proteínas do tipo *random coil* (estado de desordem estrutural), como a β -caseína, agem bem dessa forma. Por outro lado, proteínas globulares densamente dobradas, como a lisozima, adsorvem-se muito devagar, desdobram-se apenas parcialmente e reduzem a tensão na superfície apenas de forma leve [130]. Portanto, a lisozima é um agente precário de formação de espuma. Desse modo, a flexibilidade molecular da interface é essencial para o bom desempenho de um agente de formação de espuma.

Bem como a flexibilidade molecular, a hidrofobicidade também desempenha sua função na espumabilidade das proteínas. O poder de formação de espuma das proteínas está correlacionado positivamente à hidrofobicidade média. No entanto, o poder de formação de espuma das proteínas varia curvilinearmente com a hidrofobicidade da superfície, não havendo uma correlação significativa entre essas duas propriedades em valores de hidrofobicidades maiores do que 1.000 [63]. Isso indica que é necessária uma hidrofobicidade de superfície de no mínimo 1.000 para adsorção inicial das proteínas na interface ar-água, enquanto, uma vez adsorvida, a capacidade da proteína de criar mais área interfacial durante a formação da espuma depende de sua hidrofobicidade média.

Proteínas que apresentam boa espumabilidade não precisam ser bons estabilizadores de espuma, por exemplo, embora a β -caseína exiba excelente espumabilidade, a estabilidade de sua espuma é baixa. Por outro lado, a lisozima apresenta espumabilidade baixa, mas suas espumas são muito estáveis. No geral, as proteínas que apresentam bom poder de espumabilidade não têm capacidade de estabilizar a espuma, enquanto as que produzem espumas estáveis costumam exibir baixo poder de formação de espuma. Aparentemente, a espumabilidade e a estabilidade são influenciadas por dois conjuntos diferentes de propriedades moleculares das proteínas, os quais, com frequência, são antagônicos. Enquanto a espumabilidade é afetada por taxa de adsorção, flexibilidade e hidrofobicidade, a estabilidade depende das propriedades reológicas da película de proteína. As propriedades

reológicas das proteínas dependem de hidratação, espessura, concentração da proteína e de interações intermoleculares favoráveis. As proteínas que se desdobram apenas em parte, retendo algum grau de estrutura dobrada, costumam formar películas mais espessas e mais densas e espumas mais estáveis (p. ex., a lisozima e a albumina sérica) do que as que se desdobram por completo (p. ex., β -caseína) na interface ar-água. No primeiro caso, a estrutura dobrada estende-se para a subsuperfície na forma de alças. As interações não covalentes e talvez a ligação cruzada dissulfeto entre essas alças promovem a formação de uma rede de gel que possui excelentes propriedades viscoelásticas e mecânicas. Para que uma proteína possua espumabilidade e estabilidade de espuma satisfatórias, ela deve apresentar o equilíbrio apropriado entre flexibilidade e rigidez, deve sofrer desdobramento com facilidade e deve envolver-se em um grande número de interações coesivas na interface. No entanto, é difícil, se não impossível, prever que grau de desdobramento é desejável para uma determinada proteína. Além desses fatores, a estabilidade da espuma costuma exibir uma relação inversa à densidade da carga das proteínas. A alta densidade de carga parece interferir na formação de películas coesivas.

A maioria das proteínas alimentares é constituída de misturas de várias proteínas e, portanto, suas propriedades de formação de espuma são influenciadas por interações entre os componentes proteicos na interface. As excelentes propriedades de batimento da clara do ovo são atribuídas às interações entre seus componentes proteicos, a saber, ovoalbumina, conalbumina e lisozima. Diversos estudos indicaram que as propriedades de formação de espuma de proteínas ácidas podem ser melhoradas quando misturadas com proteínas básicas, tais como lisozima e clupeína [102]. Esse efeito de intensificação parece estar relacionado à formação de um complexo eletrostático entre as proteínas ácidas e básicas.

A hidrólise enzimática limitada das proteínas geralmente aumenta suas propriedades de formação de espuma. Isso se deve ao aumento da flexibilidade molecular e à maior exposição dos grupos hidrofóbicos. Entretanto, a hidrólise extensiva prejudica a espumabilidade, pois os peptídeos de baixo peso molecular não podem formar uma película coesiva na interface.

5.5.4 **Fixação de aroma**

As proteínas em si são inodoras. No entanto, elas podem ligar-se a compostos de aroma e, dessa forma, afetar as propriedades sensoriais dos alimentos. Várias proteínas, em especial de sementes oleaginosas e WPCs, carregam sabores indesejáveis, o que limita sua utilidade em aplicações nos alimentos. Esses *off-flavors* (odores indesejáveis) são, principalmente, o resultado de aldeídos, cetonas e álcoois gerados pela oxidação de ácidos graxos insaturados. Quando de sua formação, esses compostos carbonílicos ligam-se às proteínas e produzem odores indesejáveis característicos. Por exemplo, o odor gorduroso e semelhante ao feijão das preparações de proteína da soja é atribuído à presença do hexanal. A afinidade de ligação de algumas dessas carbonílicos é tão forte que

elas resistem até mesmo à extração por solvente. É necessário que se tenha um entendimento básico sobre o mecanismo de ligação dos odores indesejáveis às proteínas para que possam ser desenvolvidos métodos apropriados para sua remoção.

A propriedade de fixação de aroma das proteínas também tem aspectos desejáveis, pois elas podem ser usadas como carregadores ou modificadores de aroma em alimentos industrializados. Isso é útil em análogos da carne que contêm proteínas vegetais, nos quais a imitação bem-sucedida de um aroma semelhante à carne é essencial para sua aceitação por parte do consumidor. Para que uma proteína funcione como bom carregador de aroma, ela deve se ligar estreitamente aos aromas, retê-los durante o processamento e liberá-los durante a mastigação do alimento. No entanto, as proteínas não se ligam a todos os compostos de aroma com afinidade igual. Isso leva à retenção desigual e desproporcional de alguns aromas e a perdas indesejáveis durante o processamento. Como os flavorizantes ligados às proteínas não contribuem para o gosto e o aroma, a não ser que eles sejam prontamente liberados na boca, é essencial que se conheçam os mecanismos de interação e afinidade de ligação dos diversos flavorizantes caso se deseje criar estratégias efetivas para o desenvolvimento de produtos proteicos com aroma ou para a remoção dos odores indesejáveis.

5.5.4.1 Termodinâmica das interações proteína-aroma

Nos sistemas-modelo água-aroma, a adição das proteínas causa redução da concentração *headspace* dos compostos de aroma. Isso se deve à ligação dos aromas às proteínas. O mecanismo de ligação do aroma às proteínas depende do conteúdo de umidade da amostra de proteína, mas as interações costumam ser não covalentes. Os pós-proteicos secos ligam-se aos aromas, principalmente por meio de interações eletrostáticas, van der Waals e por pontes de hidrogênio. O aprisionamento físico dentro dos capilares e dos interstícios dos pós-proteicos também podem contribuir para suas propriedades aromáticas. Em alimentos líquidos ou de alta umidade, o mecanismo da ligação do aroma por parte das proteínas envolve basicamente a interação dos compostos de aroma não polares (ligantes) aos segmentos ou às cavidades hidrofóbicas da superfície da proteína. Além das interações hidrofóbicas, os compostos de aroma com grupos polares, como grupos hidroxil e carboxil, também podem interagir com proteínas por meio de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas. Após se ligarem às regiões hidrofóbicas da superfície, os aldeídos e as cetonas podem difundir-se para o interior hidrofóbico da molécula proteica.

A interação proteína-aroma é, em geral, reversível por completo. No entanto, os aldeídos podem ligar-se covalentemente ao grupo amino das cadeias laterais da lisina, sendo que essa interação é irreversível. Contudo, apenas a fração ligada de modo não covalente pode contribuir para o aroma e o sabor do produto proteico.

A dimensão da fixação do aroma com as proteínas hidratadas depende do número de regiões de ligação hidrofóbica disponíveis na superfície da proteína [28]. Os sítios

de ligação geralmente são compostos de grupos de resíduos hidrofóbicos segregados na forma de uma cavidade bem-definida. Os resíduos não polares individuais sobre a superfície proteica têm menos probabilidade de agir como sítios de ligação. Em condições de equilíbrio, a ligação não covalente reversível de um composto de aroma com proteínas segue a equação de Scatchard:

$$\frac{v}{[L]} = nK - vK \quad (5.63)$$

onde v são moles do ligante fixados por mol de proteína, n é o número total dos sítios de ligação por mol de proteína, $[L]$ é a concentração do ligante livre em equilíbrio e K é a constante de equilíbrio da ligação (M^{-1}). De acordo com essa equação, um gráfico de $v/[L]$ versus v será uma linha reta; os valores de K e n podem ser obtidos a partir da inclinação e da interseção, respectivamente. A mudança de energia livre para a fixação do ligante à proteína é obtida a partir da equação

$$\Delta G = -RT \ln K$$

onde R é a constante do gás e T é a temperatura absoluta. As constantes termodinâmicas para a ligação de compostos carbonila a várias proteínas são apresentadas na Tabela 5.17 [28,29,95]. A constante de ligação aumenta cerca de três vezes para cada acréscimo de grupo metileno ao comprimento da cadeia, com uma mudança de energia livre correspondente de $-0,55$ kcal/mol por grupo CH_2 . Isso indica que a ligação é de natureza hidrofóbica.

Supõe-se, na relação de Scatchard, que todos os sítios de fixação do ligante em uma proteína tenham a mesma afinidade e que nenhuma mudança conformacional ocorra com a fixação do ligante a esses sítios. Ao contrário dessa segunda suposição, as proteínas, na verdade, costumam passar por uma mudança conformacional modesta quando se ligam a compostos de aroma. A difusão dos compostos de aroma para o interior da proteína pode perturbar as interações hidrofóbicas entre os segmentos da proteína e, dessa forma, desestabilizar a estrutura proteica. Os ligantes de aroma com grupos reativos, como aldeídos, podem ligar-se covalentemente aos grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina, alterar a carga líquida da proteína e, então, causar o desdobramento da proteína. O desdobramento resulta na exposição de novos sítios hidrofóbicos para fixação do ligante. Por causa dessas mudanças estruturais, os gráficos de Schatcard para as proteínas costumam ser curvilíneos. No caso de proteínas oligoméricas, como as proteínas da soja, as mudanças conformacionais podem envolver tanto a dissociação como o desdobramento de subunidades. As proteínas desnaturadas no geral exibem um grande número de sítios de ligação com fracas constantes de associação. Os métodos para mensuração da fixação de aroma podem ser encontrados nas Referências 28 e 29.

5.5.4.2 Fatores que influenciam a fixação do aroma

Uma vez que os aromas voláteis reagem com as proteínas hidratadas, principalmente por meio de interações hidrofó-

TABELA 5.17 Constantes termodinâmicas para a fixação de compostos carbonila às proteínas

Proteína	Compostos carbonila	<i>n</i> (moles/mol)	<i>K</i> (M ⁻¹)	Δ <i>G</i> (kcal/mol)
Albumina sérica	2-nonanona	6	1.800	-4,4
	2-heptanona	6	270	-3,3
β-lactoglobulina	2-heptanona	2	150	-3,0
	2-octanona	2	480	-3,7
	2-nonanona	2	2.440	-4,7
Proteína de soja nativa	2-heptanona	4	110	-2,8
	2-octanona	4	310	-3,4
	2-nonanona	4	930	-4,1
	5-nonanona	4	541	-3,8
	Nonanal	4	1.094	-4,2
Parcialmente desnaturada	2-nonanona	4	1.240	-4,3
Succinilada	2-nonanona	2	850	-4,0

n, número de sítios de ligação no estado nativo; *K*, constante de equilíbrio da ligação

Fonte: Compilada a partir de Damodaran, S. e J. E. Kinsella. 1980. *J. Agric. Food Chem.* **28**:567-571; Damodaran, S. e J. E. Kinsella. 1981. *J. Agric. Food Chem.* **29**:1249-1253; e O'Neill, T. E. e J. E. Kinsella. 1987. *J. Agric. Food Chem.* **35**:770-774.

bicas, qualquer fator que afete as interações hidrofóbicas ou a hidrofobicidade de superfície das proteínas influenciará na fixação do aroma.

A temperatura tem muito pouco efeito sobre a fixação do aroma, a não ser que haja um desdobramento térmico significativo da proteína. Isso se deve ao fato de o processo de associação ser basicamente conduzido por entropia e não por entalpia. As proteínas desnaturadas por meio térmico apresentam capacidade aumentada de fixar aromas, no entanto, sua constante de ligação é geralmente baixa em comparação à das proteínas naturais. Os efeitos dos sais sobre a fixação do aroma estão relacionados a suas propriedades de *salting in* e *salting out*. Os sais do tipo *salting in*, que desestabilizam as interações hidrofóbicas, diminuem a fixação do aroma, enquanto os do tipo *salting out* aumentam a fixação do aroma.

O efeito do pH sobre a fixação do aroma quase sempre está relacionado às mudanças conformacionais induzidas pelo pH nas proteínas. A fixação do aroma geralmente aumenta mais em um pH alcalino do que em um pH ácido. Isso se deve ao fato de que as proteínas tendem a se desnaturar em maior grau em pH alcalino do que em pH ácido. A quebra das ligações dissulfeto das proteínas ocorrente em pH alcalino causa desdobramento das proteínas, e, em geral, aumenta a fixação do aroma. A proteólise que interrompe e diminui o número de regiões hidrofóbicas nas proteínas diminui a fixação do aroma. Isso pode ser usado como uma forma de remover aromas indesejáveis das proteínas das sementes de oleaginosas.

5.5.5 Viscosidade

A aceitação de vários alimentos dos tipos semissólido e líquido por parte do consumidor (p. ex., molhos, sopas, bebidas, etc.) depende da viscosidade ou da consistência do produto. A viscosidade de uma solução se relaciona a sua resistência ao fluxo quando uma força é aplicada (ou ten-

são de cisalhamento). Para uma solução ideal, a tensão de cisalhamento (i.e., força por unidade de área, *F/A*) é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento (i.e., o gradiente de velocidade entre as camadas do líquido, *dv/dr*) isso é expresso como

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dr} \quad (5.64)$$

A constante de proporcionalidade *n* é conhecida como coeficiente de viscosidade. Os fluidos que obedecem à expressão supracitada são chamados de fluidos newtonianos.

O comportamento de fluxo das soluções é muito influenciado pelo tipo de soluto. Polímeros solúveis de alto peso molecular aumentam muito a viscosidade, mesmo em concentrações muito baixas. Isso depende mais uma vez de diversas propriedades moleculares, tais como tamanho, forma, flexibilidade e hidratação. As soluções de macromoléculas em *random coil* (estado de desordem estrutural) apresentam viscosidade maior do que as soluções de macromoléculas compactas dobradas de mesma massa molecular. A maior parte dessas soluções, inclusive as soluções proteicas, não apresenta comportamento newtoniano, especialmente em elevadas concentrações proteicas. Para esses sistemas, o coeficiente de viscosidade diminui quando a taxa de cisalhamento aumenta. Esse comportamento é conhecido como *shear-thinning* ou pseudoplástico, seguindo a seguinte relação:

$$\frac{F}{A} = m \left(\frac{dv}{dr} \right)^n \quad (5.65)$$

onde *m* é o coeficiente de consistência e *n* é um expoente conhecido como “índice de comportamento de fluxo”. O comportamento pseudoplástico das soluções proteicas resulta da tendência das moléculas proteicas de orientar seus eixos principais na direção do fluxo. A dissociação de dímeros e oligômeros fracamente ligados em monômeros também contribui para o cisalhamento fino. Quando o cisalhamento

ou o fluxo cessam, a viscosidade pode ou não retornar ao valor original, dependendo da taxa de retorno das moléculas proteicas à orientação aleatória. As soluções de proteínas fibrosas, por exemplo, gelatina e actomiosina, geralmente permanecem orientadas e, dessa forma, não voltam a sua viscosidade original. Por outro lado, as soluções de proteínas globulares, como as proteínas da soja e do soro, recuperam rapidamente sua viscosidade quando o fluxo cessa. Essas soluções são chamadas de *tixotrópicas*.

O coeficiente de viscosidade (ou consistência) da maior parte das soluções proteicas segue uma relação exponencial com a concentração da proteína, tanto por causa das interações proteína-proteína como por causa das interações entre as esferas de hidratação das moléculas proteicas. Um exemplo que envolve frações proteicas da soja é mostrado na Figura 5.28 [104]. Em concentrações elevadas de proteína ou em géis proteicos, nos quais as interações proteína-proteína são numerosas e fortes, as proteínas apresentam um comportamento viscoelástico plástico. Nesses casos, para se iniciar o fluxo necessita-se uma quantidade específica de força conhecida como tensão de escoamento.

O comportamento da viscosidade das proteínas é uma manifestação das complexas interações entre diversas variáveis, incluindo tamanho, forma, interações proteína-solvente, volume hidrodinâmico e flexibilidade molecular no estado hidratado. Quando dissolvidas em água, as proteínas absorvem água e se expandem. O volume das moléculas hidratadas é muito maior do que o volume não hidratado. A água associada à proteína induz efeitos de longo alcance

sobre o comportamento de fluxo do solvente. A dependência da viscosidade em relação à forma e ao tamanho das moléculas proteicas segue a equação abaixo:

$$\eta_{sp} = \beta C(\bar{v}_2 + \delta_1 \bar{v}_1) \tag{5.66}$$

onde η_{sp} é a viscosidade específica, β é o fator de forma e C é a concentração e \bar{v}_2 e \bar{v}_1 são os volumes específicos da proteína não hidratada e do solvente, respectivamente; δ_1 são gramas de água ligada por grama de proteína. Aqui, \bar{v}_2 também está relacionado à flexibilidade molecular; quanto maior o volume específico da proteína, maior será sua flexibilidade.

A viscosidade das soluções proteicas diluídas é expressa de diversas formas. A *viscosidade relativa* η_{rel} refere-se à proporção da viscosidade da solução proteica em relação à do solvente. Ela é medida em um viscosímetro capilar do tipo Ostwal-Fenske, sendo expressa como

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{\rho t}{\rho_0 t_0} \tag{5.67}$$

onde ρ e ρ_0 são densidades da solução proteica e do solvente, respectivamente, enquanto t e t_0 são tempos de fluxo para um volume determinado da solução proteica e do solvente, respectivamente, ao longo do capilar. Outras formas de se expressar viscosidade podem ser obtidas a partir da viscosidade relativa. A viscosidade específica é definida como

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \tag{5.68}$$

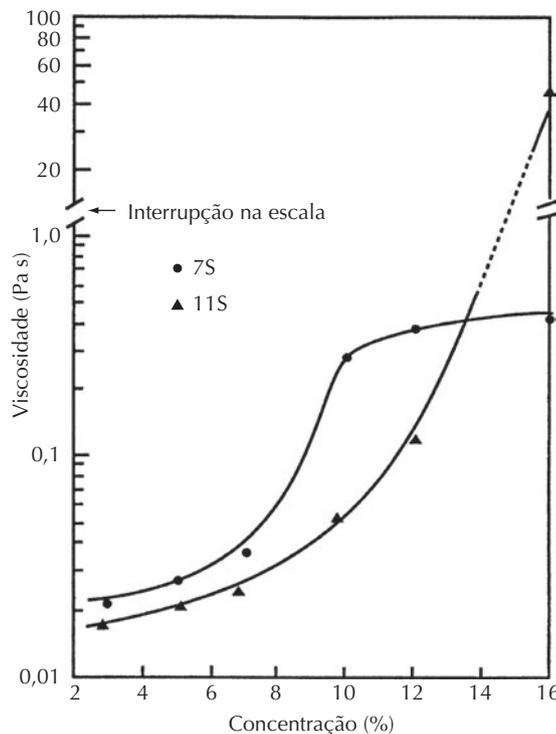


FIGURA 5.28 Efeito da concentração sobre a viscosidade (ou índice de consistência) de soluções de proteína de soja 7S e 11S, a 20°C. (Rao, M. A. et al. 1986. Em *Food Engineering and Process Applications* (Le Maguer, M. e P. Jelen, Eds.), Elsevier Applied Sci., New York, pp. 39–48.)

A viscosidade reduzida é

$$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{sp}}}{C} \quad (5.69)$$

onde C é a concentração proteica e a viscosidade intrínseca é

$$[\eta] = \text{Lim} \frac{\eta_{\text{sp}}}{C} \quad (5.70)$$

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ é obtida extrapolando-se um gráfico de viscosidade reduzida *versus* concentração proteica para concentração proteica zero (Lim). Como as interações proteína-proteína são inexistentes na diluição infinita, a viscosidade intrínseca descreve com cuidado os efeitos da forma e do tamanho sobre o comportamento de fluxo das moléculas proteicas individuais. As mudanças na forma hidrodinâmica das proteínas, as quais resultam de tratamentos por calor e pH, podem ser estudadas medindo-se suas viscosidades intrínsecas.

5.5.6 Gelificação

O gel é uma fase intermediária entre o sólido e o líquido. Tecnicamente, ele é definido como “sistema substancialmente diluído que não exhibe um estado constante de fluxo” [43]. Ele é composto de polímeros em ligação cruzada por meio de ligações covalentes ou não covalentes para a formação de uma rede capaz de aprisionar a água, bem como outras substâncias de baixo peso molecular (ver Capítulo 13).

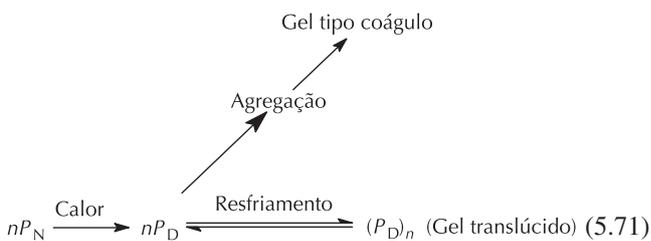
Gelificação proteica refere-se à transformação de uma proteína do estado de “sol” para o “estado semelhante a gel”. O calor, as enzimas ou os cátions divalentes em condições apropriadas facilitam essa transformação. Todos esses agentes induzem a formação de uma estrutura de rede, no entanto, os tipos de interações covalentes e não covalentes envolvidos, bem como o mecanismo de formação da rede, podem diferir de maneira considerável.

A maior parte dos géis proteicos de alimentos é preparada por meio do aquecimento de uma solução proteica moderadamente concentrada. Nesse modo de gelificação, a proteína em estado “sol”, é primeiro transformada em estado “pró-gel” por meio da desnaturação. No estado “sol”, o número de grupos de ligação não covalente disponível nas proteínas para a formação da estrutura de rede é limitado. O estado pró-gel, no entanto, é um estado de líquido viscoso no qual algum grau de desnaturação proteica e de polimerização já ocorreu. Além disso, no estado pró-gel, um número importante de grupos funcionais, como pontes de hidrogênio e grupos hidrofóbicos que podem formar ligações não covalentes intermoleculares, ficam expostos, de modo que a segunda etapa pode ocorrer, a saber, a formação da rede proteica. A conversão do sol em pró-gel é irreversível, uma vez que ocorrem muitas interações proteína-proteína entre as moléculas desdobradas. Quando o pró-gel é resfriado até a temperatura ambiente ou de refrigeração, a diminuição da energia cinética térmica facilita a formação de ligações não covalentes estáveis entre grupos funcionais expostos das diversas moléculas, sendo isso o que constitui a gelificação.

As interações envolvidas na formação da rede são principalmente pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas e hidrofóbicas. As contribuições relativas dessas forças variam com tipo de proteína, condições de aquecimento, extensão da desnaturação e condições ambientais. As pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas contribuem mais do que as interações eletrostáticas para a formação da rede, exceto quando íons multivalentes estão envolvidos na ligação cruzada. Como as proteínas costumam deter carga líquida, ocorre repulsão eletrostática entre as moléculas proteicas, o que geralmente não leva à formação da rede. No entanto, os grupos carregados são essenciais para a manutenção das interações proteína-água e da capacidade de retenção de água dos géis.

As redes de gel que são sustentadas por ligações não covalentes são termicamente reversíveis, ou seja, ao se aquecer, elas se fundirão, formando um estado pró-gel, como costuma ser observado com os géis de gelatina. Isso é mais verdadeiro quando as pontes de hidrogênio são os principais constituintes da formação da rede. Como as interações hidrofóbicas são fortes em temperaturas elevadas, as redes de gel formadas por interações hidrofóbicas são termicamente irreversíveis, por exemplo, os géis da clara de ovo. As proteínas que contêm tanto grupos de cisteína como de cistina podem sofrer polimerização por meio de reações de intercâmbio dissulfeto-sulfidril, durante o aquecimento, formando uma rede covalente contínua ao se resfriar. Esses géis costumam ser termicamente irreversíveis. Exemplos de géis desse tipo são ovoalbumina, β -lactoglobulina e géis da proteína do soro.

As proteínas formam dois tipos de géis, isto é, géis do tipo coágulo (opacos) e géis translúcidos. O tipo de gel formado por uma proteína é determinado por suas propriedades moleculares e suas condições de solução. As proteínas que contêm grandes quantidades de resíduos de aminoácidos não polares sofrem agregação hidrofóbica durante a desnaturação.



P_N é o estado nativo, P_D é o estado desordenado e n é o número das moléculas de proteína que participam da ligação cruzada.

Esses agregados insolúveis se associam aleatoriamente, formando um gel irreversível do tipo coágulo. Uma vez que as taxas de agregação e formação da rede são mais rápidas do que a taxa de desnaturação, as proteínas desse tipo formam com facilidade uma rede de gel, mesmo ao serem aquecidas. A opacidade desses géis se deve ao espalhamento de luz causado pela rede (isotrópica) não ordenada de agregados proteicos insolúveis. Os géis do tipo coágulo costumam ser fracos e propensos à sinerese.

As proteínas que contêm pequenas quantidades de resíduos de aminoácidos não polares formam complexos solúveis durante a desnaturação. Uma vez que a taxa de asso-

ciação dos complexos solúveis é mais lenta do que a taxa de desnaturação e a rede de gel é quase toda formada por interações de pontes de hidrogênio, eles com frequência não formam um gel até que ocorra aquecimento seguido de resfriamento (usa-se tipicamente uma concentração de proteína de 8-12%). Com o resfriamento, a taxa de associação lenta dos complexos solúveis facilita a formação de uma rede de gel ordenada e translúcida.

No âmbito molecular, os géis do tipo coágulo tendem a se formar quando a soma dos resíduos proteicos de Val, Pro, Leu, Ile, Phe e Trp exceder 31,5 mol% [116]. Os que contêm <31,5 mol% dos resíduos hidrofóbicos supracitados costumam formar géis translúcidos se o solvente usado for água. Entretanto, essa regra não é obedecida quando soluções salinas são usadas como solvente. Por exemplo, o conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos da β -lactoglobulina é de 32 mol%, ainda assim, ela forma um gel translúcido em água. Entretanto, quando o NaCl é incluído, ela forma um gel do tipo coágulo, mesmo em baixa concentração de sal, de 50 mM. Isso ocorre por causa da neutralização da carga pelo NaCl, o qual promove agregação hidrofóbica ao se aquecer. Dessa forma, o equilíbrio entre as interações hidrofóbicas atrativas e as interações eletrostáticas repulsivas controla o mecanismo de gelificação e a aparência do gel. Essas duas forças, de fato, controlam o equilíbrio das interações proteína-proteína e proteína-solvente no sistema de formação de gel. Se as interações proteína-proteína forem maiores do que as interações proteína-solvente, haverá propensão à formação de um precipitado. Se as interações proteína-solvente predominarem, o sistema poderá não gelificar. Um gel do tipo coágulo ou um gel translúcido se formará quando a magnitude das forças hidrofóbicas e hidrofílicas estiver em algum ponto entre esses dois extremos.

Os géis proteicos são sistemas altamente hidratados que contêm até 98% de água, em alguns casos. A água retida nesses géis tem um potencial (atividade) químico semelhante ao das soluções aquosas diluídas, porém carece de fluidez e não pode ser expresso com facilidade. O mecanismo pelo qual a água líquida pode ser mantida em um estado semissólido em géis não é bem compreendido. No entanto, o fato de que os géis translúcidos, formados basicamente por interações de pontes de hidrogênio, retêm mais água do que os géis do tipo coágulo e são menos propensos à sinerese, sugere que grande parte da água esteja ligada pelo hidrogênio aos grupos C=O e N-H das ligações peptídicas, esteja associada a grupos carregados em forma de camadas de hidratação e/ou exista em redes água-água, parecidas com o gelo, extensivamente ligadas por pontes de hidrogênio. Ainda, é possível que dentro do ambiente restrito da microestrutura da rede de gel possa existir água como um fator de ligação cruzada de pontes de hidrogênio entre os grupos C=O e N-H dos segmentos peptídicos (ver Capítulo 2). Isso pode restringir a capacidade de fluxo de água dentro de cada célula, o que se acentua à medida que o tamanho da célula diminui. É possível, ainda, que um pouco de água possa ser retida como água capilar nos poros da estrutura do gel, em especial nos géis do tipo coágulo.

A estabilidade da estrutura do gel contra as forças térmicas e mecânicas depende do número e dos tipos de li-

gações cruzadas formadas pelas cadeias de monômeros. Termodinamicamente, a estrutura do gel seria estável apenas quando a soma das energias de interação de um monômero na rede de gel fosse maior do que sua energia cinética térmica. Isso depende de vários fatores intrínsecos (como tamanho, carga líquida, etc.) e extrínsecos (tais como pH, temperatura, força iônica, etc). A raiz quadrada da dureza dos géis proteicos apresenta uma relação linear com o peso molecular [125]. Proteínas globulares com peso molecular <23.000 Da não podem formar géis induzidos pelo calor em nenhuma concentração proteica razoável, a não ser que elas contenham pelo menos um grupo sulfidril livre ou uma ponte dissulfeto. Os grupos sulfidril e as pontes dissulfeto facilitam a polimerização e, dessa forma, aumentam o peso molecular efetivo dos polipeptídeos para >23.000 Da. As preparações de gelatina com pesos moleculares efetivos de <20.000 Da não podem formar géis.

Outro fator crítico é a concentração da proteína. Para formar uma rede de gel que se mantenha sozinha, exige-se uma concentração mínima de proteína, conhecida como o menor ponto de equivalência (LCE-*least concentration endpoint*) [50]. O LCE é 8% para as proteínas da soja, 3% para a albumina do ovo e cerca de 0,6% para a gelatina. Acima dessa concentração mínima, a relação entre a força do gel, G , e a concentração da proteína, C , segue uma lei exponencial:

$$G \propto (C - C_0)^n \quad (5.72)$$

onde C_0 é o LCE. Para as proteínas, o valor de n varia de 1 a 2.

Vários fatores ambientais, como pH, sais e outros aditivos, também afetam a gelificação das proteínas. No ponto isoelétrico, ou próximo a ele, as proteínas geralmente formam géis do tipo coágulo. Em extremos de pH, formam-se géis fracos por causa da forte repulsão eletrostática. O pH ótimo para a formação de gel é encontrado em torno de 7-8 para a maioria das proteínas.

A formação de géis de proteína pode, por vezes, ser facilitada por uma proteólise limitada. Um exemplo bem conhecido é o queijo. A adição de quimosina (renina) às micelas de caseína do leite resulta na formação de um gel do tipo coágulo. Isso é alcançado pela clivagem da κ -caseína, um componente da micela, o qual ocasiona a liberação de uma porção hidrofílica conhecida como glicomacropéptídeo. As chamadas micelas paracaseína restantes possuem superfícies altamente hidrofóbicas que facilitam a formação de uma rede de gel fraca.

A ligação cruzada enzimática das proteínas em temperatura ambiente também pode resultar na formação de uma rede de gel. A transglutaminase é a enzima que costuma ser usada na preparação desses géis. Essa enzima catalisa a formação de ligações cruzadas de ϵ -(γ -glutamil)lisil entre os grupos glutamina e lisil das moléculas proteicas [91]. Usando-se esse método de ligação cruzada enzimática, os géis altamente elásticos e irreversíveis podem ser formados até mesmo em concentrações proteicas baixas.

Cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , também podem ser usados na formação de géis proteicos. Esses íons formam ligações cruzadas entre grupos carregados negativamente de

moléculas proteicas. Um bom exemplo desse tipo de gel é o tofu obtido a partir das proteínas da soja. Os géis de alginato também podem ser formados dessa forma. Um método geral para a produção do tofu é apresentado na Figura 5.29.

5.5.7 Texturização

Texturização significa a transformação de uma proteína do estado globular para uma estrutura física fibrosa que tem características sensoriais semelhantes à carne. As diversas propriedades funcionais esperadas para os produtos proteicos texturizados incluem mastigabilidade, elasticidade, maciez e suculência. As proteínas vegetais costumam ser a fonte proteica preferida para a texturização, uma vez que elas não têm outras propriedades funcionais desejáveis, as quais são apresentadas por proteínas de origem animal. As proteínas vegetais texturizadas são fabricadas usando-se dois processos diferentes, a saber, *texturização por formação de fibra (spun-fiber)* e *texturização por extrusão*.

5.5.7.1 Texturização por formação de fibra (*spun-fiber*)

Nesse processo, uma solução de isolado proteico de soja altamente concentrado (~20% m/v) é ajustada a pH 12-13, sendo envelhecida até a sua viscosidade aumentar para 50.000-100.000 centipoise, como resultado de desnaturação proteica

e de algumas reações de ligação cruzada induzidas por álcali. Esse “material” de elevada viscosidade é então bombeado por meio de *spinneret*, um dispositivo com uma placa que contém milhares de micro-orifícios. O extrusado fibroso passa por um banho com sal e ácido fosfórico em pH de 2,5.

A proteína coagula instantaneamente nesse banho, transformando-se em uma massa fibrosa. A fibra é então encaminhada para passar por rolos de aço, onde é comprimida e esticada para aumentar sua força. Em seguida, é lavada para a remoção do excesso de acidez e sal. As fibras lavadas passam por uma série de tanques que contêm gordura, aromas, corantes e ligantes, dependendo do produto final. A fibra é aquecida a 80-90°C para induzir a gelificação da proteína ligante. A clara do ovo costuma ser usada como ligante em virtude de suas excelentes propriedades de coagulação pelo calor. O produto final sofre processo de secagem e classificação por tamanho. O fluxograma do processo de *texturização por formação de fibra (spun-fiber)* é apresentado na Figura 5.30.

5.5.7.2 Texturização por extrusão

Nesse processo, a farinha de soja desengordurada ou o concentrado de proteína da soja com alto índice de solubilidade proteica (PSI- *protein solubility index*) são condicionados com vapor, sendo que o teor de umidade é ajustado a 20-25%. Essa massa sólida é colocada em um extrusor que é, basicamente, uma rosca rotatória inserida em um tubo cilíndrico com extremidade cônica no qual o espaço entre a rosca

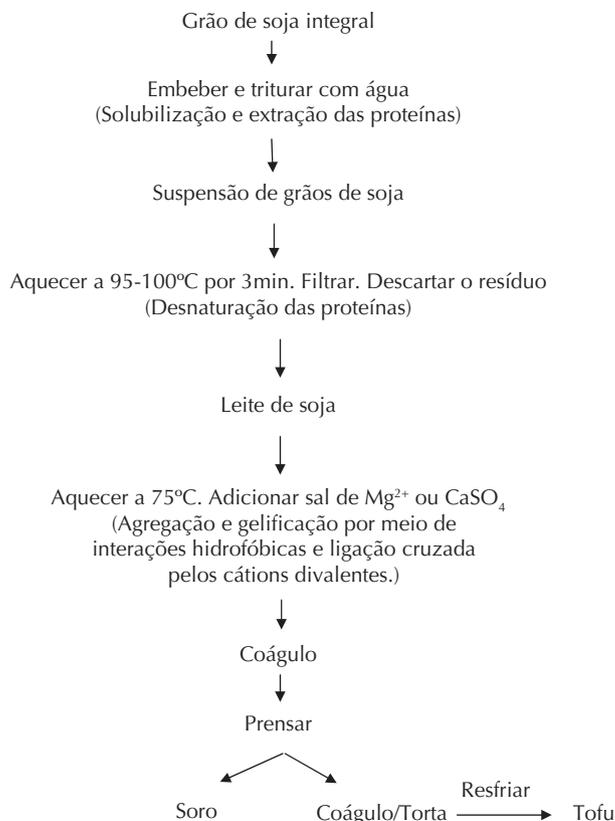


FIGURA 5.29 Processo comercial típico para a produção do tofu.

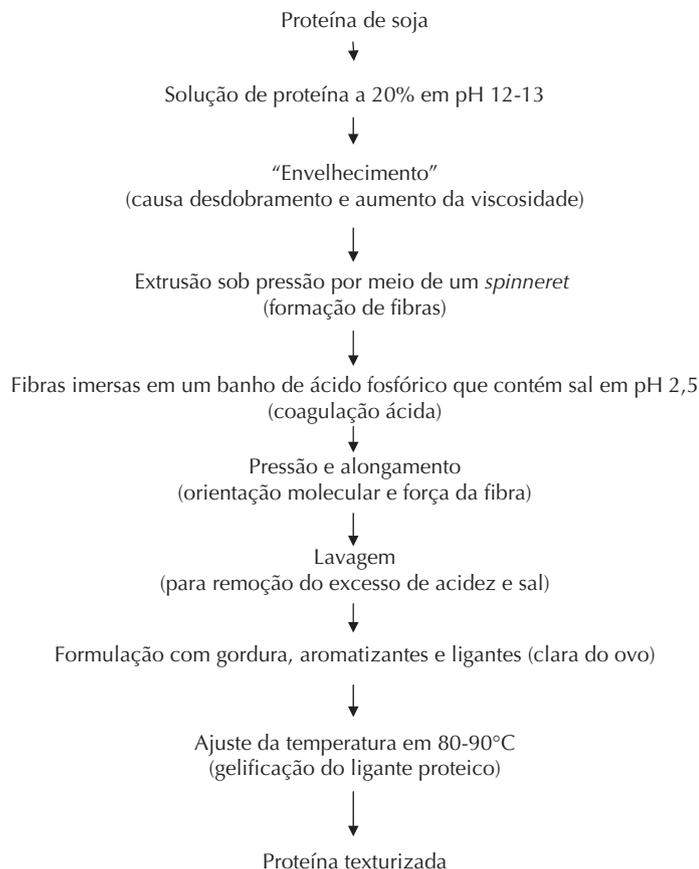


FIGURA 5.30 Processo típico de texturização por *spun-fiber* das proteínas da soja.

e o tubo diminui de modo progressivo ao longo do eixo do parafuso. À medida que a massa da proteína avança ao longo da rosca, ela é rapidamente aquecida a 150-180°C. Essa temperatura elevada e o acúmulo progressivo de pressão, conforme a massa se move descendo ao longo da rosca, fazem com que haja cozimento sob pressão e, como resultado disso, a massa proteica funde-se e as proteínas são desnaturadas. Em termos técnicos, isso é conhecido como fusão termoplástica. As proteínas desnaturadas tornam-se alinhadas em forma de fibra à medida que a massa se move ao longo da rosca. Quando a massa sai do molde, a liberação repentina da pressão faz com que a água evapore, ocorrendo expansão (*puffing*) do produto. Ajustando-se a pressão e a temperatura, pode-se controlar a expansão. Caso se deseje um produto denso, a massa é resfriada antes de sair do molde. O extrusado é então cortado em pedaços, sendo que seu processamento posterior depende de seu uso. O fluxograma geral do processo para texturização das proteínas por extrusão é apresentado na Figura 5.31

Os princípios gerais envolvidos em ambos os métodos supracitados são a desnaturação térmica ou alcalina das proteínas, o realinhamento das proteínas desnaturadas em forma de rede fibrosa, a ligação das fibras por uso de um ligante proteico e a flavorização do produto final. As proteínas vegetais texturizadas são cada vez mais usadas como complementos em produtos cárneos triturados (bolinhos de carne,

molhos e hambúrgueres, etc.) e como análogos de carne ou “imitação de carne”.

5.5.8 Formação de massa [79,80,115]

Quando a mistura de farinha de trigo e água (proporção de cerca de 3:1) é amassada, ela forma uma massa viscoelástica a qual é adequada para a confecção de pães e outros produtos de panificação. Essas características não usuais da massa podem ser atribuídas às proteínas da farinha de trigo.

A farinha de trigo contém várias frações solúveis e insolúveis de proteínas. As proteínas solúveis, compreendendo cerca de 20% das proteínas totais, são, principalmente, albumina e enzimas do tipo globulina, bem como algumas glicoproteínas menos importantes. Estas proteínas não contribuem para as propriedades de formação da massa da farinha de trigo. A principal proteína de armazenamento do trigo é o glúten. Este é uma mistura heterogênea de proteínas, principalmente as gliadinas e as gluteninas, com solubilidade limitada em água. Quando misturado com água, o glúten forma uma massa viscoelástica capaz de aprisionar o gás durante a fermentação.

O glúten tem uma composição singular de aminoácidos, sendo que Gln e Pro são responsáveis por mais de 40% de seus resíduos de aminoácidos (Tabela 5.18). A baixa solubilidade do glúten em água é atribuída a seu baixo teor de

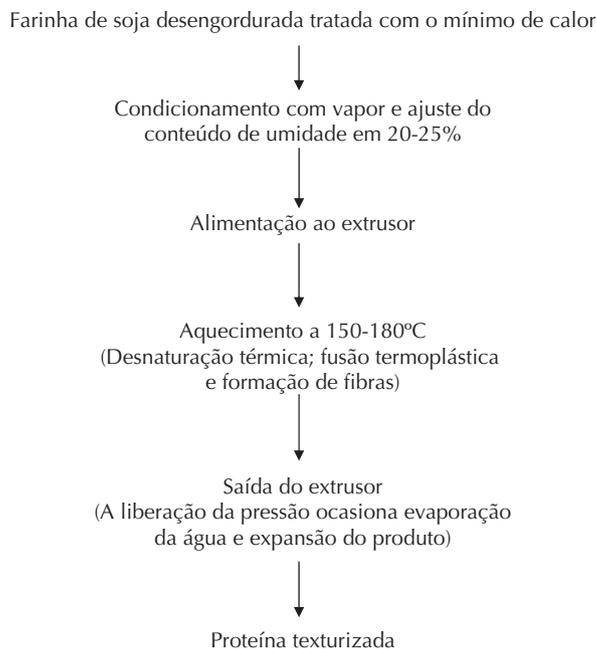


FIGURA 5.31 Texturização por extrusão da farinha de soja.

resíduos de Lis, Arg, Glu e Asp, que juntos perfazem <10% do total de resíduos de aminoácidos. Cerca de 30% dos resíduos de aminoácidos do glúten são hidrofóbicos, sendo que os resíduos contribuem muito para sua capacidade de formar agregados proteicos por meio de interações hidrofóbicas e de se ligar a lipídeos e outras substâncias não polares. Os teores elevados de glutamina e aminoácidos hidroxilados (~10%) do glúten são responsáveis por suas propriedades de ligação à água. Além disso, as pontes de hidrogênio entre a gluta-

mina e os resíduos hidroxilados dos polipeptídeos do glúten contribuem para suas propriedades de coesão-adesão. Os resíduos de cisteína e cistina são responsáveis por 2–3 mol% do total de resíduos de aminoácidos do glúten. Durante a formação da massa, esses resíduos sofrem reações de intercâmbio sulfidril-dissulfeto, resultando em polimerização extensa das proteínas do glúten [115].

Ocorrem diversas transformações físico-químicas durante a mistura da água com a farinha de trigo e o amassamento.

TABELA 5.18 Composição de aminoácidos da glutenina e da gliadina

Aminoácido	Glutenina (mol%)	Gliadina (mol%)
Cys	2,6	3,3
Met	1,4	1,2
Asp	3,7	2,8
Thr	3,4	2,4
Ser	6,9	6,1
Glx ^a	28,9	4,6
Pro	11,9	16,2
Gly	7,5	3,1
Ala	4,4	3,3
Val	4,8	4,8
Ile	3,7	4,3
Leu	6,5	6,9
Tyr	2,5	1,8
Phe	3,6	4,3
Lys	2,0	0,6
His	1,9	1,9
Arg	3,0	2,0
Trp	1,3	0,4

^a Glx corresponde à mistura de Glu e Gln. A maior parte da Glx das proteínas do trigo é encontrada sob a forma de Gln (37).

Sob aplicação das forças de tensão e cisalhamento, as proteínas do glúten absorvem água, sendo parcialmente desdobradas. O desdobramento parcial das moléculas proteicas facilita as interações hidrofóbicas, assim como as reações de intercâmbio sulfidril-dissulfeto, o que resulta na formação de polímeros em forma de fio. Acredita-se que esses polímeros lineares, por sua vez, interagem entre si, supostamente por meio de pontes de hidrogênio, associações hidrofóbicas e ligação cruzada de dissulfeto, formando uma película tipo folha que é capaz de reter o gás. Por causa dessas transformações no glúten, a resistência da massa aumenta com o tempo, até que se alcance o grau máximo, sendo que isso é seguido por diminuição de resistência, o que indica a quebra da estrutura da rede. A quebra envolve o alinhamento dos polímeros na direção do cisalhamento e de alguma cisão das ligações cruzadas de dissulfeto, o que reduz o tamanho dos polímeros. O tempo necessário para que se alcance a força máxima da massa ($R_{\text{máx}}$) durante o amassamento é usado para se medir a qualidade do trigo na confecção de pães – quanto mais tempo, melhor a qualidade.

A viscoelasticidade da massa de trigo está relacionada à extensão das reações de intercâmbio sulfidril-dissulfeto. Tal ponto de vista é embasado no fato de que, quando redutores, como cisteína ou agentes bloqueadores da sulfidril, como *N*-etilmaleimida, são acrescentados à massa, a viscosidade diminui muito. Por outro lado, a adição de agentes oxidantes como iodatos e bromatos, aumenta a elasticidade da massa. Isso significa que o glúten do trigo rico em grupos SH e S-S pode possuir qualidades superiores para produção de pão, mas essa relação não é confiável. Dessa forma, interações que não sejam ligações cruzadas dissulfeto, como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, também desempenham um papel vital na viscoelasticidade da massa de trigo.

As diferenças na qualidade de produção de pães a partir de diferentes cultivos de trigo podem estar relacionadas a diferenças na composição do próprio glúten. Como já foi mencionado, o glúten é constituído de gliadinas e gluteninas. As gliadinas são compostas de quatro grupos, a saber, α -, β -, γ - e ω -gliadinas. No glúten, elas existem como polipeptídeos separados com pesos moleculares que vão de 30.000 a 80.000 Da. As gliadinas contêm um número constante de resíduos de cisteína. Elas existem como pontes dissulfeto intramoleculares. As pontes dissulfeto estão inseridas no interior da proteína, de modo que elas não participam das reações de intercâmbio sulfidril-dissulfeto com outras proteínas. As pontes dissulfeto parecem permanecer como dissulfetos intramoleculares durante a confecção da massa. Dessa forma, a massa feita a partir de gliadinas isoladas e de amido é viscosa, mas não é viscoelástica.

As gluteninas, por outro lado, são polipeptídeos heterogêneos com pesos moleculares que variam entre 12.000 e 130.000 Da. Elas são classificadas a seguir em gluteninas de alto peso molecular (PM > 90.000, APM) e de baixo peso molecular (PM < 90.000, BPM). No glúten, os polipeptídeos de glutenina estão presentes como polímeros unidos por ligações cruzadas de dissulfeto, com pesos moleculares que chegam a milhões. Por causa de sua capacidade de se poli-

merizar extensivamente por meio de reações de intercâmbio sulfidril-dissulfeto, as gluteninas contribuem muito para a elasticidade da massa. Alguns estudos mostraram uma correlação positiva significativa entre o conteúdo de glutenina APM e a qualidade do pão elaborado com algumas variedades de trigo [10]. Informações disponíveis indicam que um padrão específico de associação com ligações cruzadas dissulfeto entre gluteninas de BPM e APM na estrutura do glúten pode ser muito mais importante para a qualidade do pão do que a quantidade da proteína APM. Por exemplo, a associação/polimerização entre as gluteninas de BPM proporcione uma estrutura semelhante à formada pela gliadina de APM. Esse tipo de estrutura contribui para a viscosidade da massa, mas não para sua elasticidade. Por outro lado, a elasticidade da massa aumenta quando as gluteninas de BPM fazem ligação cruzada com as gluteninas de APM por meio das ligações cruzadas dissulfeto (no glúten). É possível que nas variedades de trigo de boa qualidade, um número maior de gluteninas de BPM possam se polimerizar às de APM, enquanto nas variedades de trigo de baixa qualidade, a maior parte das gluteninas de BPM pode polimerizar-se entre si. As diferenças entre os estados associados das gluteninas do glúten de diversas variedades de trigo podem estar relacionadas às diferenças entre suas propriedades conformacionais, como hidrofobicidade de superfície e reatividade dos grupos sulfidril e dissulfeto.

Em resumo, as pontes de hidrogênio entre os grupos amida e hidroxila, as interações hidrofóbicas e as reações de intercâmbio sulfidril-dissulfeto contribuem para o desenvolvimento das propriedades viscoelásticas ímpares da massa de trigo. No entanto, o resultado dessas interações para a obtenção de boas propriedades de fabricação da massa pode depender das propriedades estruturais de cada proteína e das proteínas com as quais ela se associa na estrutura total do glúten.

Como os polipeptídeos do glúten, em especial as gluteninas, são ricos em prolina, eles apresentam uma estrutura secundária muito pouco ordenada. Qualquer estrutura ordenada que exista inicialmente nas gliadinas e nas gluteninas se perde durante a mistura e o amassamento. Portanto, não ocorre nenhum desdobramento adicional durante o cozimento do pão.

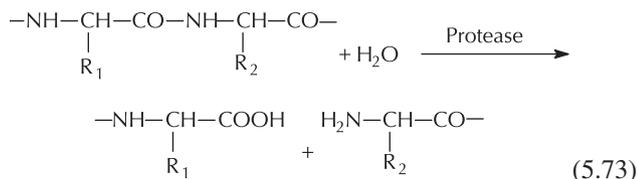
A suplementação da farinha de trigo com albumina e proteínas do tipo globulina, por exemplo, proteínas do soro e da soja, afeta de modo adverso suas propriedades viscoelásticas, bem como a qualidade de cocção da massa. Essas proteínas diminuem o volume do pão, interferindo na formação da rede de glúten. A adição de fosfolipídeos ou outros surfactantes à massa, neutraliza os efeitos adversos das proteínas estranhas sobre o volume do pão. Nesse caso, a película surfactante/proteína compensa a película de glúten danificada. Embora esse processo resulte em um volume de pão aceitável, as suas qualidades sensoriais e de textura são menos desejáveis do que o normal.

Às vezes, o glúten isolado é usado como ingrediente proteico em produtos que não estão relacionados à panificação. Suas propriedades de coesão-adesão o tornam um ligante efetivo nos produtos cárneos triturados e do tipo surimi.

5.6 HIDROLISADOS PROTEICOS

A hidrólise parcial de proteínas com uso de enzimas proteolíticas é uma das estratégias para melhorar as propriedades funcionais. Estas, como solubilidade, dispersibilidade, formação de espuma e emulsificação, podem ser melhoradas pela proteólise limitada das proteínas. Os hidrolisados proteicos têm muitos usos em alimentos para fins especiais, como alimentos geriátricos, fórmulas infantis não alergênicas, bebidas para esportistas e alimentos dietéticos. Como os hidrolisados proteicos podem ser digeridos com facilidade, eles são úteis em fórmulas infantis e em alimentos geriátricos.

Proteólise significa hidrólise enzimática de ligações peptídicas em proteínas.



Nessa reação, para cada ligação peptídica clivada pela enzima, libera-se um mol de grupo carboxila e um mol de grupo amino. Quando é permitido que a reação se complete, o produto final é a mistura de todos os aminoácidos constituintes da proteína. A proteólise incompleta resulta na liberação de uma mistura de polipeptídeos provenientes de proteína original. As propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos dependem do grau de hidrólise (DH – *degree of hydrolysis*) e das propriedades físico-químicas, isto é, tamanho, solubilidade, etc., dos polipeptídeos do hidrolisado.

O DH é definido como a fração de ligações peptídicas clivadas, sendo geralmente expresso como percentual:

$$\%DH = \frac{n}{n_T} \times 100 \quad (5.74)$$

onde n_T é o número total de mols de ligações peptídicas presentes em um mol de proteína e n é o número de mols de ligações peptídicas clivadas por mol de proteína. Quando a massa molar de uma proteína não é conhecida ou a amostra de proteína é uma mistura de várias proteínas, n e n_T são expressos como o número de ligações peptídicas por grama de proteína.

O DH costuma ser monitorado usando-se o método pH-Stat. O princípio subjacente a esse método é que, quando a ligação peptídica é hidrolisada, o grupo carboxila recém-formado ioniza-se por completo em um pH > 7, o que “libera” um íon H^+ . Como resultado, o pH da solução proteica diminui progressivamente com o tempo de hidrólise. Na faixa de pH entre 7–8, o número de mols de íon H^+ liberado é equivalente ao número de mols das ligações peptídicas hidrolisadas. No método pH-Stat, o pH da solução proteica é mantido em pH constante pela titulação com NaOH. O número de mols de NaOH consumidos durante a proteólise é equivalente ao número de mols de ligações peptídicas clivadas.

Várias proteases podem ser utilizadas na preparação de hidrolisados proteicos. Algumas dessas proteases são enzimas de sítios específicos (Tabela 5.19). Por causa de suas especificidades, os tipos de fragmentos polipeptídicos liberados no hidrolisado diferem entre as proteases. A alcalase oriunda do *Bacillus licheniformis* é a principal enzima comercial utilizada na fabricação do hidrolisado proteico. Essa enzima pertence à família das subtilisinas, as quais são serina-proteases.

5.6.1 Propriedades funcionais

As propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos dependem do tipo de enzimas utilizadas em sua preparação. Isso se deve principalmente às diferenças de tamanho e a outras propriedades físico-químicas dos polipeptídeos liberados durante a hidrólise. Em geral, a solubilidade da maioria das proteínas melhora depois da hidrólise, independentemente da enzima utilizada. Quanto maior o DH, maior será a solubilidade. No entanto, o aumento líquido em solubilidade depende do tipo de enzima usada. A Figura 5.32 [2] demonstra o perfil de solubilidade-pH da caseína, antes e depois da hidrólise, com a protease V-8. Deve-se observar que a solubilidade da caseína em seu pH isoelétrico aumenta significativamente depois da hidrólise parcial. Esse tipo de comportamento também é observado com outras proteínas. A alta solubilidade proteica tem particular importância nas bebidas proteicas ácidas, nas quais a precipitação e a sedimentação são indesejáveis.

TABELA 5.19 Especificidade de várias proteases

Protease	Tipo	Especificidade
Elastase	Endoproteinase	Ala-aa; Gly-aa
Bromelina	Endoproteinase	Ala-aa; Tyr-aa
Tripsina	Endoproteinase	Lys-aa; Arg-aa
Quimotripsina	Endoproteinase	Phe-aa; Trp-aa; Tyr-aa
Pepsina	Endoproteinase	Leu-aa; Phe-aa
Protease V-8	Endoproteinase	Asp-aa; Glu-aa
Termolisina	Endoproteinase	aa-Phe; aa-Leu
Alcalase	Endoproteinase	Inespecífica
Papaína	Endoproteinase	Lys-aa; Arg-aa; Phe-aa; Gly-aa
Prolilendopeptidase	Endoproteinase	Pro-aa
Subtilisina A	Endoproteinase	Inespecífica

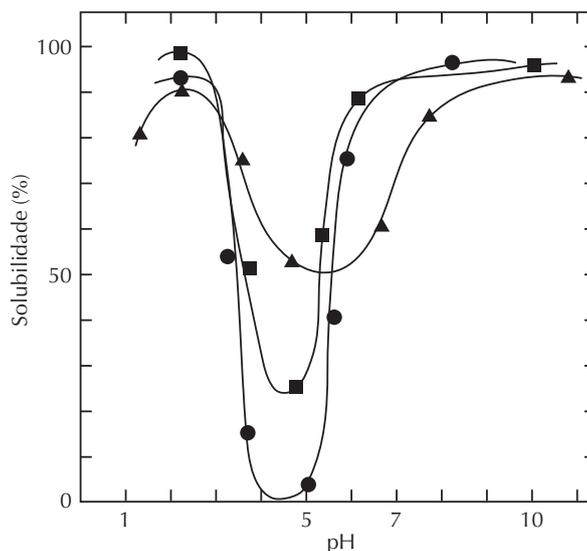


FIGURA 5.32 Perfis de solubilidade-pH da caseína nativa e da caseína modificada pela protease V-8 do *Staphylococcus aureus*. A solubilidade foi expressa como percentual da proteína total da solução. ●, caseína nativa; ■, 2% de DH; ▲, 6,7% de DH. (De Adler-Nissen, J. 1979. *J. Agric. Food Chem.* 27:1256–1260.)

Uma vez que a solubilidade da proteína é essencial para suas propriedades emulsificantes e de formação de espuma, as proteínas parcialmente hidrolisadas costumam demonstrar melhores propriedades emulsificantes e de formação de espuma. No entanto, essa melhora depende do tipo de enzima usada e do DH. Em geral, a capacidade de emulsificação e de formação de espuma melhora até um DH de < 10 % e diminui em um DH > 10 %. Por outro lado, as estabilidades de espumas e emulsões feitas com hidrolisados proteicos são mais baixas do que as da proteína intacta. Uma das razões para isso é a incapacidade de polipeptídeos pequenos formarem uma película viscoelástica coesiva nas interfaces água e óleo-água.

Os hidrolisados proteicos não costumam formar géis termoinduzidos, sendo que uma exceção disso é a gelatina. Esta é produzida a partir do colágeno por hidrólise ácida ou alcalina. Trata-se de uma mistura heterogênea de polipeptídeos. A média de peso molecular dos polipeptídeos na amostra de gelatina depende do DH. Isso afeta profundamente sua força de gel. Quanto maior a média do peso molecular, maior será a força do gel. Amostras de gelatina com média de peso molecular <20.000 Da não chegam a formar géis em qualquer concentração de gelatina [43]. As propriedades de gelificação de produtos comerciais de gelatina são expressos em termos de força de gel, utilizando-se um gelômetro Bloom.

A força de gel é definida como o peso em gramas necessário para o direcionamento de uma submersão de gelômetro em 4 cm dentro de um gel de gelatina a 6,67% (m/v), o qual foi incubado por 17 horas em um banho de água a 10°C. A Tabela 5.20 mostra os requisitos da força de gel para vários tipos de alimentos produzidos à base de gelatina.

5.6.2 Alergenicidade

Várias proteínas alimentares, incluindo leite de vaca, proteínas da soja, glúten, proteínas do ovo e proteínas do amendoim, ocasionam várias reações alérgicas em crianças e adultos. Entre a população que é alérgica às proteínas do leite, cerca de 60% são alérgicas às caseínas, 60-80%, à β -lactoglobulina e 50%, à α -lactoalbumina [1]. Entretanto, os hidrolisados dessas proteínas possuem menor alergenidade do que seus equivalentes naturais. A alergenidade das proteínas intactas origina-se da presença de sítios antigênicos (epitopos) que se ligam à imunoglobulina E (IgE). Nos hidrolisados proteicos, os epitopos são destruídos pela clivagem proteolítica. Por exemplo, a hidrólise da caseína a um DH de 55%, usando-se pancreatina (mistura de enzimas pancreáticas), diminui sua alergenidade em cerca de 50% [81]. Da mesma forma, os hidrolisados proteicos do soro com DH de 12,9-16,1% não produzem reações alérgicas quando tes-

TABELA 5.20 Requerimentos de força de gel (*bloom rating*) para alguns produtos alimentícios à base de gelatina

Produto	Força de gel (g)	Concentração usada em alimentos (%)
Bala recheada com geleia	220	7–8
Geleia de frutas	100–120	10–12
Marshmallow	220	2–3
Pastilhas	50–100	1

tados em cobaias sensibilizadas com proteínas de soro intactas [97]. Dessa forma, os hidrolisados proteicos são a fonte preferida de proteína/aminoácido para bebês e crianças que apresentam predisposição ou alto risco de desenvolvimento de reação alérgica às proteínas alimentares.

A redução líquida na alergenicidade dos hidrolisados proteicos depende do tipo de protease usada. As proteases inespecíficas ou uma mistura de proteases são mais efetivas do que as de sítio específico, na redução da alergenicidade das proteínas. O DH também exerce seu papel: quanto maior ele for, maior será a redução da alergenicidade. Por essas razões, a eficácia das proteases na redução da alergenicidade de uma proteína costuma ser expressa como índice de redução de alergenicidade (ARI – *allergenicity reduction index*). O ARI é definido como a proporção da % de redução na alergenicidade em relação à % de DH.

5.6.3 Peptídeos amargos

Uma das propriedades mais indesejáveis dos hidrolisados proteicos é seu sabor amargo. Ele é proveniente de alguns peptídeos liberados durante a hidrólise. Existem muitas evidências de que o amargor dos peptídeos está relacionado à hidrofobicidade. Os peptídeos com hidrofobicidade residual média de $<1,3$ kcal/mol não são amargos (ver Capítulo 10). Por outro lado, os peptídeos com hidrofobicidade residual média $>1,4$ kcal/mol são amargos [3]. Nesse caso, com frequência, a hidrofobicidade residual média dos peptídeos é calculada usando-se as energias livres de transferência de resíduos de aminoácidos do etanol para a água (ver Tabela 10.1). A formação de peptídeos amargos nos hidrolisados proteicos depende da composição e da sequência de aminoácidos e do tipo de enzimas usadas. Os hidrolisados de proteínas altamente hidrofóbicas, como caseína, proteínas da soja e proteína do milho (zeína) são muito amargos, enquanto os hidrolisados das proteínas hidrofílicas, como a gelatina, são menos amargos. As caseínas e as proteínas da soja hidrolisadas com várias proteases comerciais produzem diversos peptídeos amargos. O amargor pode ser reduzido ou eliminado utilizando-se uma mistura de endo- e exopeptidases, o que promove a quebra dos peptídeos amargos em fragmentos que têm $<1,3$ kcal/mol de hidrofobicidade residual média.

5.7 PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DAS PROTEÍNAS

As proteínas diferem em seu valor nutritivo. Vários fatores, como conteúdo de aminoácidos essenciais e digestibilidade, contribuem para essas diferenças. Portanto, a necessidade diária de proteínas depende do tipo e da composição das proteínas da dieta.

5.7.1 Qualidade proteica

A “qualidade” de uma proteína está relacionada principalmente a seu conteúdo de aminoácidos essenciais e digestibilidade. As proteínas de alta qualidade são aquelas que contêm

todos os aminoácidos essenciais em níveis maiores do que os níveis de referência da FAO/OMS/UNU [40], apresentando digestibilidade comparável ou melhor do que as proteínas da clara do ovo ou do leite. As proteínas animais são de melhor “qualidade” que as vegetais.

As proteínas dos principais cereais e leguminosas costumam ser deficientes em pelo menos um dos aminoácidos essenciais. Enquanto as proteínas de cereais, como arroz, trigo, cevada e milho são muito pobres em lisina e ricas em metionina, as de leguminosas e sementes oleaginosas são deficientes em metionina e ricas ou adequadas em lisina. Algumas proteínas de sementes oleaginosas, como a do amendoim, são deficientes tanto em teores de metionina como de lisina. Os aminoácidos essenciais cujas concentrações de uma proteína estão abaixo dos níveis de uma proteína de referência são denominados de *aminoácidos limitantes*. Adultos que consomem apenas proteínas de cereais ou proteínas de leguminosas têm dificuldade para manter sua saúde; crianças abaixo de 12 anos de idade que consomem dieta que contém apenas uma dessas fontes de proteínas não conseguem manter uma taxa normal de crescimento. Os teores de aminoácidos essenciais de vários alimentos proteicos estão listados na Tabela 5.21 [35,40].

Tanto as proteínas animais como as vegetais costumam conter quantidades adequadas ou mais do que adequadas de His, Ile, Leu, Phe + Tyr e Val. Esses aminoácidos geralmente não são limitantes nos principais alimentos. Com mais frequência, Lys, Thr, Trp e aminoácidos que contêm enxofre são os limitantes. A qualidade nutricional de uma proteína deficiente em um aminoácido essencial pode ser melhorada misturando-a com outra proteína que seja rica nesse aminoácido essencial. Por exemplo, a mistura de proteínas de cereais com proteínas de leguminosas fornece um nível completo e balanceado dos aminoácidos essenciais. Dessa forma, dietas que contêm quantidades apropriadas de cereais e leguminosas (grãos) e que sejam nutricionalmente completas nos demais aspectos são adequadas para que se promova crescimento e manutenção. Uma proteína de baixa qualidade também pode ser nutricionalmente melhorada por suplementação com aminoácidos essenciais livres que estejam sub-representados. A suplementação de leguminosas com Met e de cereais com Lys costuma melhorar sua qualidade.

A qualidade nutricional de uma proteína ou de uma mistura proteica é ideal quando contém todos os aminoácidos essenciais em proporções que produzam excelentes taxas de crescimento e/ou ótima capacidade de manutenção. Os padrões ideais de aminoácidos essenciais para crianças e adultos são apresentados na Tabela 5.22 [108]. Entretanto, como as necessidades reais de aminoácidos essenciais dos indivíduos de uma determinada população variam dependendo de suas condições nutricionais e fisiológicas, as necessidades de aminoácidos essenciais de crianças pré-escolares (2-5 anos de idade) geralmente são recomendadas como um nível seguro para todos os grupos etários [39].

O consumo exacerbado de qualquer aminoácido específico pode levar ao “antagonismo de aminoácidos” ou toxicidade. A ingestão excessiva de um aminoácido costuma resultar no aumento da necessidade de outros aminoácidos essenciais. Isso se deve à competição entre os aminoácidos

TABELA 5.21 Conteúdos de aminoácidos essenciais e valor nutricional das proteínas obtidas a partir de várias fontes (mg/g de proteína)

Propriedade (mg/g de proteína)	Fonte de proteína												
	Ovo	Leite de vaca	Carne	Peixe	Trigo	Arroz	Milho	Cevada	Soja	Soja para ração (cozida)	Ervilha	Amendoim	Vagem
Concentração de aminoácido (mg/g de proteína)													
His	22	27	34	35	21	21	27	20	30	26	26	27	30
Ilê	54	47	48	48	34	40	34	35	51	41	41	40	45
Leu	86	95	81	77	69	77	127	67	82	71	70	74	78
Lys	70	78	89	91	23 ^a	34 ^a	25 ^a	32 ^a	68	63	71	39 ^a	65
Met + Cys	57	33	40	40	36	49	41	37	33	22 ^b	24 ^b	32	26
Phe + Tyr	93	102	80	76	77	94	85	79	95	69	76	100	83
Thr	47	44	46	46	28	34	32 ^b	29 ^b	41	33	36	29 ^b	40
Trp	17	14	12	11	10	11	6 ^b	11	14	8 ^a	9 ^a	11	11
Val	66	64	50	61	38	54	45	46	52	46	41	48	52
Total de aminoácidos essenciais	512	504	480	485	336	414	422	356	466	379	394	400	430
Conteúdo proteico (%)	12	3,5	18	19	12	7,5	—	—	40	32	28	30	30
Escore químico (%) (baseado no padrão da FAO/OMS, 1985)	100	100	100	100	40	59	43	55	100	73	82	67	—
PER	3,9	3,1	3,0	3,5	1,5	2,0	—	—	2,3	—	2,65	—	—
VB (em ratos)	94	84	74	76	65	73	—	—	73	—	—	—	—
NPU	94	82	67	79	40	70	—	—	61	—	—	—	—

^a Primeiro aminoácido limitante^b Segundo aminoácido limitante

PER, quociente de eficiência proteica; VB, valor biológico; NPU, utilização líquida da proteína

Fonte: Eggum, B. O. e R. M. Beames, 1983. Em *Seed Proteins* (Cottschalk, W. e H. P. Muller, Eds.), Nijhoff/Junk, The Hague, pp. 499-531 e FAO/WHO/UNU, 1985. Energy e protein requirements, Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. World Health Organization Technical Rep. Ser. 724, WHO, Geneva.

pelos sítios de absorção na mucosa intestinal. Por exemplo, altos níveis de Leu diminuem a absorção de Ile, Val e Tyr, mesmo se os níveis dietéticos desses aminoácidos forem adequados. Isso leva ao aumento da necessidade dietética desses últimos três aminoácidos. O consumo exacerbado de outros aminoácidos essenciais também pode inibir o crescimento, induzindo a condições patológicas.

5.7.2 Digestibilidade

Embora o conteúdo dos aminoácidos essenciais seja o indicador primário da qualidade proteica, a verdadeira qualidade também depende do nível de utilização desses aminoácidos no organismo. Dessa forma, a digestibilidade (biodisponibilidade) de aminoácidos pode afetar a qualidade das proteínas. As digestibilidades de várias proteínas pelos seres humanos estão listadas na Tabela 5.23 [40]. As proteínas alimentares de origem animal são mais bem digeridas do que as de origem vegetal. Vários fatores afetam a digestibilidade de proteínas.

5.7.2.1 Conformação proteica

O estado estrutural da proteína influencia sua hidrólise pelas proteases. As proteínas naturais costumam ter hidrólise

menos completa em comparação às proteínas parcialmente desnaturadas. Por exemplo, o tratamento da faseolina (uma proteína do grão de feijão) com uma mistura de proteases resulta apenas na clivagem limitada da proteína, o que produz a liberação de um polipeptídeo de 22.000 Da como produto principal. Quando a faseolina desnaturada pelo calor é tratada sob condições similares, ela é hidrolisada por completo até que se obtenha aminoácidos e dipeptídeos. Em geral, proteínas fibrosas insolúveis e proteínas globulares extensivamente desnaturadas são de difícil hidrólise.

5.7.2.2 Fatores antinutricionais

A maioria dos isolados e concentrados proteicos vegetais contém inibidores de tripsina e quimotripsina (tipo Kunitz e tipo Bowman-Birk) e lectinas. Esses inibidores prejudicam a hidrólise completa de proteínas de leguminosas e de sementes oleaginosas pelas proteases pancreáticas. As lectinas, que são glicoproteínas, ligam-se às células da mucosa intestinal interferindo na absorção de aminoácidos. As lectinas e os inibidores da protease tipo Kunitz são termotáveis, enquanto o inibidor do tipo Bowman-Birk é estável sob condições de processamento térmico normal. Dessa forma, as proteínas de leguminosas e de sementes oleagi-

TABELA 5.22 Padrão recomendado de aminoácidos essenciais para as proteínas alimentares

Aminoácido	Padrão recomendado (mg/g de proteína)			
	Bebês	Pré-escolares (2-5 anos)	Escolares (10-12 anos)	Adulto
Histidina	26	19	19	16
Isoleucina	46	28	28	13
Leucina	93	66	44	19
Lisina	66	58	44	16
Met + Cys	42	25	22	17
Phe + Tyr	72	63	22	19
Treonina	43	34	28	9
Triptofano	17	11	9	5
Valina	55	35	25	13
Total	434	320	222	111

Fonte: De FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and protein requirements, Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. World Health Organization Technical Rep. Ser. 724, WHO, Geneva.

TABELA 5.23 Digestibilidade de várias proteínas alimentares em seres humanos

Fonte proteica	Digestibilidade (%)	Fonte proteica	Digestibilidade (%)
Ovo	97	Milheto	79
Leite, queijo	95	Ervilhas	88
Carne, peixe	94	Amendoim	94
Milho	85	Farinha de soja	86
Arroz (polido)	88	Isolado proteico de soja	95
Trigo integral	86	Feijões	78
Farinha de trigo branca	96	Cereal de milho	70
Glúten de trigo	99	Cereal de trigo	77
Farinha de aveia	86	Cereal de arroz	75

Fonte: De FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and protein requirements, Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. World Health Organization Technical Rep. Ser. 724, WHO, Geneva.

nosas tratadas pelo calor são, em geral, mais digeríveis do que os isolados proteicos naturais (apesar da presença de um pouco de inibidor residual do tipo Bowman-Birk). As proteínas vegetais também contêm outros fatores antinutricionais, como taninos e fitatos. Os taninos, que são produtos da condensação dos polifenóis, reagem covalentemente com os grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina. Isso inibe a clivagem catalisada pela tripsina dos polipeptídeos nos sítios de lisina.

5.7.2.3 Processamento

A interação de proteínas com os polissacarídeos e as fibras da dieta também reduzem a taxa e o grau da hidrólise. Isso é particularmente importante nos produtos alimentícios extrusados, nos quais temperatura e pressão altas costumam ser usadas. As proteínas sofrem várias alterações químicas que envolvem resíduos de lisina quando expostas a altas temperaturas e pH alcalino. Essas alterações reduzem sua digestibilidade. A reação de açúcares redutores com grupos ϵ -amino também diminui a digestibilidade da lisina.

5.7.3 Avaliação do valor nutritivo da proteína

Como a qualidade nutricional das proteínas pode variar muito, sendo influenciada por muitos fatores, é importante que haja procedimentos para a avaliação da qualidade. Estimativas de qualidade são úteis para: (a) determinar a quantidade necessária para promover um nível seguro de aminoácidos essenciais para crescimento e manutenção e (b) monitorar mudanças no valor nutritivo de proteínas durante o processamento de alimentos, de forma que as condições de processamento que minimizam a perda de qualidade possam ser reconhecidas. A qualidade nutritiva das proteínas pode ser avaliada por diversos métodos biológicos, químicos e enzimáticos.

5.7.3.1 Métodos biológicos

Os métodos biológicos são baseados em ganho de peso ou retenção de nitrogênio nos animais de teste quando alimentados com dieta que contenha proteína. Uma dieta livre de proteínas é usada como controle. O protocolo recomendado pela FAO/OMS [39] costuma ser usado para avaliação da qualidade da proteína. Os ratos geralmente são os animais de teste, embora os seres humanos sejam usados às vezes. Usa-se uma dieta com conteúdo aproximado de 10% de proteínas em base seca para que se assegure que a ingestão de proteínas esteja abaixo das necessidades diárias. Uma energia adequada é suprida na dieta. Sob essas condições, a proteína da dieta é utilizada ao máximo para o crescimento. O número de animais de teste usado deve ser suficiente para assegurar resultados que sejam estatisticamente confiáveis. É comum usar-se um período de teste de nove dias. Durante cada dia desse período, a quantidade (g) de dieta consumida é tabulada para cada animal, e as fezes e a urina são coletadas para análises de nitrogênio.

Os dados de estudos de alimentação animal são usados de diversas maneiras para avaliar a qualidade proteica. O *quo-*

ciente de eficiência proteica (PER – *protein efficiency ratio*) é o peso (em gramas) ganho por grama de proteína consumida. Trata-se de uma expressão simples de uso comum. Outra expressão útil é o *quociente de eficiência líquida da proteína* (NPR – *net protein ratio*). Ela é calculada da seguinte forma:

$$\text{NPR} = \frac{\left(\frac{\text{ganho de peso}}{\text{proteína ingerida}}\right) - \left(\frac{\text{perda de peso}}{\text{proteína ingerida}}\right) - \left(\frac{\text{grupo livre}}{\text{proteína ingerida}}\right)}{\text{proteína ingerida}} \quad (5.75)$$

Os valores de NPR dão informações sobre a capacidade das proteínas de fornecer suporte tanto à manutenção como ao crescimento. Como os ratos crescem muito mais rápido do que os seres humanos, e como uma maior porcentagem de proteína é usada para manutenção em crianças em fase de crescimento do que em ratos, costuma-se questionar se os valores de PER e NPR derivados dos estudos dos ratos são úteis para estimar as necessidades humanas [108]. Embora esse argumento seja válido, procedimentos de correção apropriados estão disponíveis.

Outra abordagem para avaliação da qualidade da proteína envolve a medida de absorção e de perda de nitrogênio. Isso permite o cálculo de dois parâmetros úteis de qualidade de proteína. A *digestibilidade aparente da proteína*, ou *coeficiente de digestibilidade de proteína*, obtida a partir da diferença entre a quantidade de nitrogênio ingerido e a quantidade de nitrogênio excretado nas fezes. Entretanto, como o nitrogênio fecal total também inclui o nitrogênio metabólico ou endógeno, deve-se fazer uma correção para se obter a *digestibilidade verdadeira da proteína*. A digestibilidade verdadeira (DV) pode ser calculada da seguinte maneira:

$$\text{DV} = \frac{I - (N_F - N_{F,e})}{I} \times 100 \quad (5.76)$$

onde I é o nitrogênio ingerido, N_F é o nitrogênio fecal total e $N_{F,e}$ é o nitrogênio fecal endógeno. O $N_{F,e}$ é obtido por uma alimentação com dieta livre de proteína.

A digestibilidade verdadeira proporciona informações sobre o percentual de consumo de nitrogênio absorvido pelo organismo. No entanto, ela não fornece informações sobre quanto do nitrogênio absorvido é realmente retido ou utilizado pelo organismo.

O valor biológico, VB, é calculado como segue:

$$\text{VB} = \frac{I - (N_F - N_{F,e}) - (N_U - N_{U,e})}{I - (N_F - N_{F,e})} \times 100 \quad (5.77)$$

onde N_U e $N_{U,e}$ são as perdas de nitrogênio total e endógeno, respectivamente, na urina.

A *utilização líquida da proteína* (NPU – *net protein utilization*), isto é, a porcentagem de consumo de nitrogênio retido como nitrogênio corporal, é obtida a partir do produto de DV e VB. Então,

$$\text{NPU} = \text{DV} \times \text{VB} = \frac{I - (N_F - N_{F,e}) - (N_U - N_{U,e})}{I} \times 100 \quad (5.78)$$

O PER, os VBs e os NPUs de várias proteínas alimentares estão apresentados na Tabela 5.21.

Outros bioensaios que são ocasionalmente usados na avaliação da qualidade das proteínas incluem ensaios para atividade enzimática, mudanças no teor de aminoácidos essenciais do plasma, níveis de ureia no plasma e na urina e taxa de repleção das proteínas do plasma ou ganho de peso corporal de animais previamente alimentados com dieta livre de proteínas.

5.7.3.2 Métodos químicos

Os métodos biológicos são caros e consomem muito tempo. A determinação do conteúdo de aminoácidos de uma proteína e a comparação dele com o padrão de aminoácidos essenciais de uma proteína de referência ideal podem fornecer uma avaliação rápida do valor nutricional proteico. O padrão ideal de aminoácidos essenciais em proteínas (proteína de referência) para pré-escolares (2-5 anos) é fornecido pela Tabela 5.22 [40], sendo esse o padrão para todos os grupos etários, exceto para bebês. A cada aminoácido essencial de uma proteína de teste se dá um *escore químico*, o qual é definido como:

$$\frac{\text{mg de aminoácido/g de proteína teste}}{\text{mg do mesmo aminoácido por g da proteína de referência}} \times 100 \quad (5.79)$$

O aminoácido essencial que mostra o menor escore é o aminoácido mais limitante da proteína de teste. O escore químico desse aminoácido limitante fornece o escore químico da proteína de teste. Como já foi mencionado, Lys, Thr, Trp e aminoácidos sulfurados geralmente são os aminoácidos limitantes nas proteínas alimentares. Portanto, os escores químicos desses aminoácidos costumam ser suficientes para avaliação do valor nutricional das proteínas. O escore químico permite a estimativa da quantidade de uma proteína de teste ou da mistura de proteínas necessária para se alcançar a exigência diária de um aminoácido limitante. Isso pode ser calculado da seguinte forma:

$$\text{Consumo necessário da proteína} = \frac{\text{Consumo recomendado da proteína de ovo ou leite}}{\text{Escore químico da proteína}} \times 100 \quad (5.80)$$

Uma das vantagens do método do escore químico é o fato de ele ser simples e permitir a determinação dos efeitos complementares das proteínas sobre a dieta. Ele também permite o desenvolvimento de dietas proteicas de alta qualidade, misturando-se várias proteínas adequadas a diversos programas de alimentação. Existem, contudo, vários inconvenientes em se usar esse método. Uma suposição subjacente ao escore químico é que todas as proteínas de teste são completa ou igualmente digeríveis e que todos os aminoácidos essenciais são absorvidos por completo. Pelo fato de essa suposição ser violada com frequência, a correlação entre os resultados de bioensaios e escores químicos geralmente não é boa. Entretanto, a correlação melhora quando os escores químicos são corrigidos levando-se em conta a digestibilidade da proteína. A digestibilidade aparente das proteínas pode ser rapidamente determinada *in vitro* usando-se uma

combinação de três ou quatro enzimas, como tripsina, quimotripsina, peptidase e protease bacteriana.

Outra deficiência do escore químico é que ele não distingue entre D- e L-aminoácidos. Como apenas os L-aminoácidos podem ser usados pelos animais, esse escore superestima o valor nutricional da proteína, especialmente das proteínas expostas a alto pH, o que causa racemização. Esse método também é incapaz de prever os efeitos negativos de altas concentrações de um aminoácido essencial sobre a biodisponibilidade de outros aminoácidos essenciais, sendo que ele também não leva em conta o efeito de fatores anti-nutricionais, como os inibidores da protease e as lectinas, que podem estar presentes na dieta. Apesar dessas grandes deficiências, achados recentes indicam que os escores químicos quando corrigidos, considerando-se a digestibilidade proteica, correlacionam-se bem com ensaios biológicos para as proteínas que apresentam VBs acima de 40%; quando o VB está abaixo de 40%, a correlação é fraca [39].

5.7.3.3 Métodos enzimáticos e microbiológicos

Os métodos enzimáticos *in vitro* às vezes são utilizados para medir a digestibilidade e a liberação de aminoácidos essenciais. Em um método, as proteínas de teste são inicialmente digeridas com pepsina e depois com pancreatina (extrato de pâncreas liofilizado) [83]. Em outro método, as proteínas são digeridas com três enzimas, denominadas tripsina pancreática, quimotripsina e peptidase intestinal suína, sob condições de ensaio padronizadas [39]. Esses métodos, além de dar informações sobre a digestibilidade inata das proteínas, são úteis para detectar mudanças na qualidade proteica induzidas pelo processamento.

O crescimento de vários microrganismos, tais como *Streptococcus zymogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Clostridium perfringens* e *Tetrahymena pyriformis* (protozoário) também tem sido utilizado para determinar o valor nutricional das proteínas [44]. Desses microrganismos, o *T. pyriformis* é particularmente útil, pois suas necessidades de aminoácidos são similares às de ratos e humanos.

5.8 ALTERAÇÕES FÍSICAS, QUÍMICAS E NUTRICIONAIS DAS PROTEÍNAS INDUZIDAS PELO PROCESSAMENTO

O processamento comercial de alimentos pode envolver aquecimento, resfriamento, secagem, aplicação de produtos químicos, fermentação, irradiação ou vários outros tratamentos. Desses, o aquecimento é o mais comum, sendo normalmente realizado para destruir microrganismos, desativar enzimas endógenas que causam alterações oxidativas e hidrolíticas nos alimentos durante a estocagem e para transformar uma mistura pouco atraente de ingredientes alimentares crus em um produto final atraente do ponto de vista organoléptico. Além disso, proteínas como β -lactoglobulina e α -lactoalbumina bovinas e a proteína da soja, que algumas vezes causam respostas alergênicas ou hipersensíveis, podem, em algumas ocasiões, tornar-se inócuas por desna-

turação térmica. Infelizmente, os efeitos benéficos alcançados pelo aquecimento de alimentos proteicos costumam ser acompanhados por mudanças que podem afetar adversamente o valor nutritivo e as propriedades funcionais das proteínas. Nesta seção, serão discutidos tanto os efeitos desejáveis como os indesejáveis do processamento de alimentos sobre as proteínas.

5.8.1 Alterações na qualidade nutricional e formação de compostos tóxicos

5.8.1.1 Efeito dos tratamentos térmicos moderados

A maioria das proteínas dos alimentos é desnaturada quando exposta a tratamentos térmicos moderados (60-90°C, 1h ou menos). A desnaturação extensiva das proteínas frequentemente resulta em insolubilização, a qual pode prejudicar as propriedades funcionais que dependem da solubilidade. Do ponto de vista nutricional, a desnaturação parcial das proteínas costuma melhorar a digestibilidade e a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais.

Várias proteínas vegetais purificadas e preparações proteicas de ovo, embora livres de inibidores da protease, exibem baixa digestibilidade *in vitro* e *in vivo*. O aquecimento moderado melhora sua digestibilidade sem desenvolver derivados tóxicos.

Além de melhorar a digestibilidade, o tratamento térmico moderado também inativa várias enzimas, como proteases, lipases, lipoxigenases, amilases, polifenoloxidase e outras enzimas oxidativas e hidrolíticas. A falha em desativar essas enzimas pode resultar no desenvolvimento de odores indesejáveis, rancidez, alterações na textura e descoloração de alimentos durante a estocagem. Por exemplo, as sementes oleaginosas e leguminosas são ricas em lipoxigenases. Durante esmagamento ou fracionamento desses grãos para extração de óleo ou de isolados proteicos, essa enzima, na presença de oxigênio molecular, catalisa a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados para, inicialmente, produzir hidroperóxidos. Esses hidroperóxidos decompõem-se em seguida e liberam aldeídos e cetonas, os quais produzem odores indesejáveis na farinha de soja e em seus isolados e concentrados proteicos. Para se evitar a formação de odor indesejável, é necessário que se desative a lipoxigenase por meio térmico antes do esmagamento.

O tratamento térmico moderado é particularmente benéfico para as proteínas vegetais, uma vez que elas costumam conter fatores antinutricionais proteicos. As proteínas das leguminosas e das oleaginosas contêm vários inibidores de tripsina e quimotripsina. Esses inibidores prejudicam a digestão eficiente das proteínas e, então, reduzem sua biodisponibilidade. Além disso, a inativação e a complexação de tripsina e quimotripsina por esses inibidores induz a superprodução e secreção dessas enzimas pelo pâncreas, o que pode levar a hipertrofia pancreática (crescimento do pâncreas) e adenoma pancreático. As proteínas das leguminosas e das oleaginosas também contêm lectinas, as quais são glicoproteínas, sendo também conhecidas como fito-hemaglutininas uma vez

que causam aglutinação das hemáceas. As lectinas exibem uma forte afinidade de ligação com carboidratos. Quando consumidas por seres humanos, elas prejudicam a digestão proteica [103] e causam má absorção intestinal de outros nutrientes. Essa última consequência resulta da ligação das lectinas às glicoproteínas da membrana das células da mucosa intestinal, o que altera sua morfologia e suas propriedades de transporte [96]. Tanto os inibidores da protease como as lectinas encontrados em proteínas vegetais são termolábeis. A tostagem das leguminosas e oleaginosas ou o tratamento por calor úmido da farinha de soja inativam tanto as lectinas como os inibidores da protease, aumentam a digestibilidade e o PER dessas proteínas (Figura 5.33) [45] e impedem a hipertrofia pancreática [53]. Esses fatores antinutricionais não ocasionam problemas nas leguminosas processadas por cozimento doméstico ou industrial, nem nos produtos à base de farinha quando as condições de aquecimento são adequadas para inativá-los.

As proteínas do leite e do ovo também contêm vários inibidores da protease. A ovomucoide, que possui atividade antitriptica, constitui cerca de 11% da clara do ovo. A proteína ovo-inibidora, que inibe tripsina, quimotripsina e algumas proteases fúngicas, está presente em um nível de 0,1% na clara do ovo. O leite contém vários inibidores da protease, como o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI – *plasminogen activator inhibitor*) e o inibidor de plasmina (PI – *plasmin inhibitor*), derivado do sangue. Todos esses inibidores perdem suas atividades quando submetidos a tratamento térmico moderado na presença de água.

Os efeitos benéficos do tratamento térmico também incluem a inativação das toxinas proteicas, como a toxina botulínica do *Clostridium botulinum* (inativada por aquecimento a 100°C) e a enteroxina do *Staphylococcus aureus*.

5.8.1.2 Alterações na composição durante a extração e o fracionamento

O preparo de isolados proteicos a partir de fontes biológicas envolve várias operações unitárias, como extração, precipitação isoelétrica, precipitação de sais, termocoagulação e ultrafiltração/diafiltração. É muito provável que algumas das proteínas do extrato bruto possam ser perdidas durante algumas dessas operações. Por exemplo, durante a precipitação isoelétrica, algumas proteínas tipo albuminas ricas em enxofre, que costumam ser solúveis em pH isoelétrico, podem ser perdidas no fluido sobrenadante. Essas perdas podem alterar a composição de aminoácidos e o valor nutricional dos isolados proteicos quando comparados com os dos extratos brutos. Por exemplo, o WPC preparado por ultrafiltração/diafiltração e os métodos de troca iônica passam por alterações marcantes em seus conteúdos de proteose-peptona. Isso afeta consideravelmente suas propriedades de formação de espuma.

5.8.1.3 Alterações químicas dos aminoácidos

As proteínas passam por várias mudanças químicas quando processadas a altas temperaturas. Essas mudanças incluem

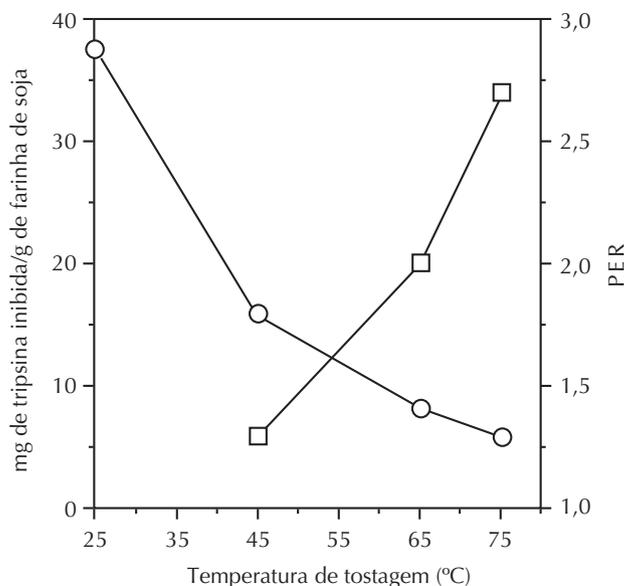


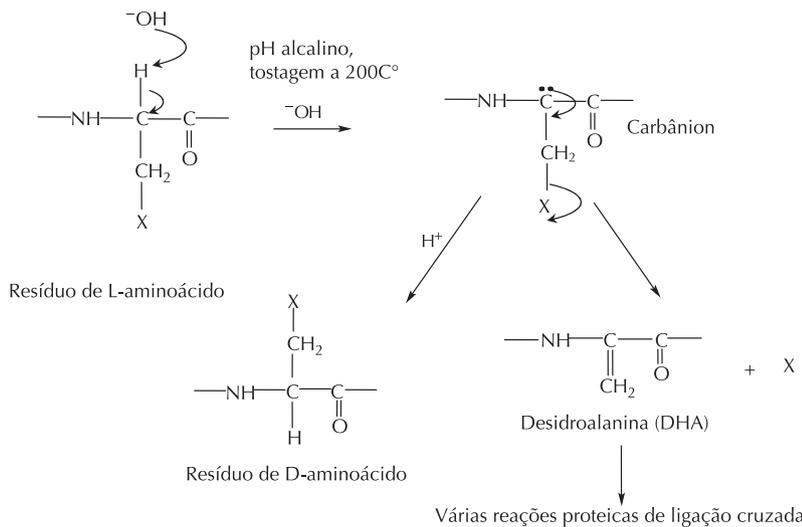
FIGURA 5.33 Efeito da tostagem sobre a atividade inibitória da tripsina e PER da farinha de soja. (Adaptada de Friedman, M. e M. R. Gumbmann, 1986. *Adv. Exp. Med. Biol.* **199**:357-390.)

racemização, hidrólise, dessulfuração e desamidação. A maior parte dessas alterações químicas é irreversível e algumas delas resultam na formação de tipos de aminoácidos modificados que podem ser tóxicos.

5.8.1.3.1 Racemização

O processamento térmico das proteínas em pH alcalino, como é realizado na preparação de alimentos texturizados, invariavelmente leva à racemização parcial dos resíduos de L-aminoácidos para D-aminoácidos [77]. A hidrólise ácida das proteínas também causa racemização parcial dos aminoácidos [42]; a tostagem de proteínas ou alimentos com conteúdo proteico acima de 200C° também ocasiona esse processo [55]. O mecanismo em pH alcalino envolve subtração inicial do próton do átomo de carbono- α por um íon hidroxila. O carbânion resultante perde sua assimetria tetra-

édrica. A adição subsequente de um próton da solução pode ocorrer do topo ou da base do carbânion. O fato de essa probabilidade ser igual resulta em racemização do resíduo do aminoácido (Equação 5.81) [77]. A taxa de racemização de um resíduo é afetada pela força da retirada do elétron da cadeia lateral. Desse modo, resíduos como Asp, Ser, Cys, Glu, Phe, Asn e Thr são racemizados a uma taxa mais rápida do que os outros resíduos de aminoácidos [78]. A taxa de racemização também depende da concentração do íon hidroxila, mas independe da concentração de proteínas. É interessante observar que essa taxa é cerca de dez vezes mais rápida em proteínas do que em aminoácidos livres [78], sugerindo que as forças intramoleculares de uma proteína reduzem a energia de ativação da racemização. Além da racemização, o carbânion formado em pH alcalino também pode sofrer reação de β -eliminação para produzir uma desidroalanina interme-



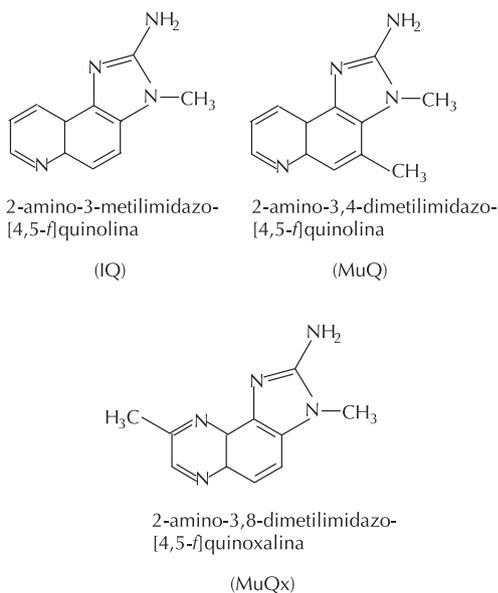
(5.81)

diária reativa. Os resíduos de cisteína e fosfoserina exibem uma maior propensão a essa via em comparação a outros resíduos de aminoácidos. Essa é uma das razões pelas quais uma quantidade significativa da D-cisteína não é encontrada em proteínas tratadas por alcali.

A racemização dos resíduos de aminoácidos causa redução de digestibilidade da proteína, uma vez que as ligações peptídicas que envolvem resíduos de D-aminoácidos são hidrolisadas com menos eficiência por proteases gástricas e pancreáticas. Isso leva à perda de aminoácidos essenciais que foram racemizados e prejudica o valor nutricional da proteína. Os D-aminoácidos também são absorvidos com menos eficiência ao longo das células da mucosa intestinal e, ainda que absorvidos, eles não podem ser utilizados na síntese proteica *in vivo*. Além disso, verificou-se que alguns D-aminoácidos, por exemplo, D-prolina, são neurotóxicos em galinhas [20].

Além da racemização e das reações de β -eliminação, o aquecimento de proteínas em pH alcalino destrói vários resíduos de aminoácidos, como Arg, Ser, Thr e Lys. A Arg se decompõe em ornitina.

Quando as proteínas são aquecidas acima de 200° C, como costuma ocorrer em superfícies de alimentos durante os processos de fervura, assamento ao forno e grelhado, os resíduos de aminoácidos sofrem decomposição e pirólise. Vários produtos da pirólise têm sido isolados e identificados a partir da carne grelhada, sendo altamente mutagênicos conforme determinado pelo teste de Ames. Os produtos mais carcinogênicos/mutagênicos são formados a partir da pirólise dos resíduos de Trp e Glu [19]. A pirólise dos resíduos de Trp origina a formação de carbolinas e seus derivados. Os compostos mutagênicos também são produzidos em carnes a temperaturas moderadas (190-200° C). Eles são conhecidos como compostos IQ (imidazo quinolinas), que são produtos da condensação de creatina, açúcares e alguns aminoácidos, como Gly, Thr, Ala e Lys [60]. Os três mutagênicos mais potentes formados em peixe grelhado estão demonstrados a seguir:



(5.82)

Após o aquecimento de alimentos de acordo com procedimentos recomendados, os compostos IQ costumam ser encontrados apenas em concentrações muito baixas (μg).

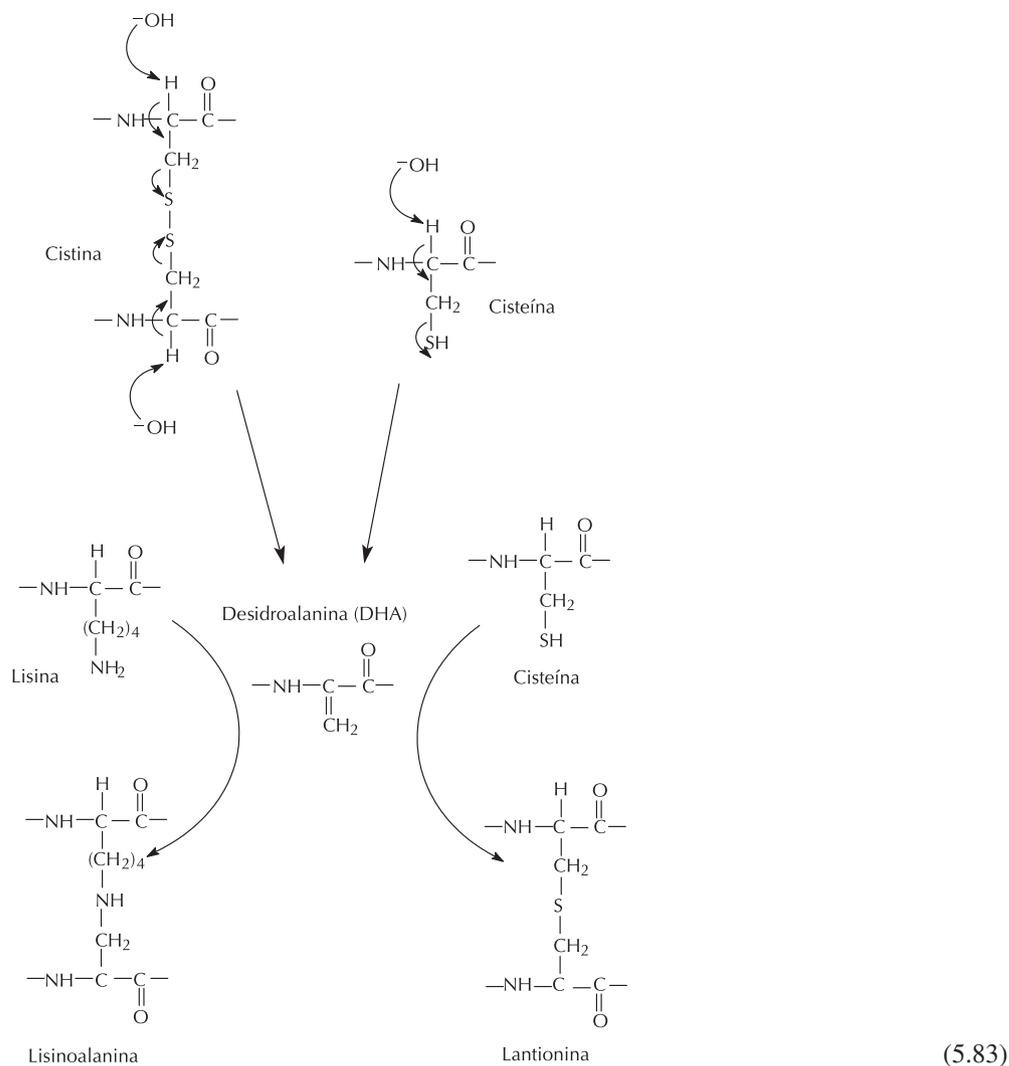
5.8.1.3.2 Ligação cruzada de proteínas

Várias proteínas alimentares contêm tanto ligações cruzadas intra e intermoleculares, como pontes dissulfeto em proteínas globulares, desmosina e isodesmosina, como ligações cruzadas dos tipos di e tritirosina em proteínas fibrosas tais como queratina, elastina, resilina e colágeno. O colágeno também contém ligação cruzada ϵ -N-(γ -glutamil)lisil e/ou ϵ -N-(γ -aspartil)lisil. Uma das funções dessas ligações cruzadas em proteínas naturais é minimizar a proteólise *in vivo*. O processamento de proteínas alimentares, especialmente em pH alcalino, também induz a formação de ligação cruzada. As ligações covalentes não naturais entre as cadeias polipeptídicas reduzem a digestibilidade e a biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais que estão envolvidos na ligação cruzada ou próximos a ela.

Como discutido na seção anterior, o aquecimento em pH alcalino ou acima de 200° C em pH neutro, resulta em subtração do próton do átomo do carbono α , resultando na formação de um carbânion, que leva à formação de resíduo de desidroalanina (DHA). A formação de DHA também pode ocorrer por meio de um mecanismo de um estágio sem o carbânion intermediário. Uma vez formados, os resíduos de DHA altamente reativos reagem com grupos nucleofílicos, como o grupo ϵ -amino do resíduo lisil, o grupo tiol do resíduo Cys, o grupo δ -amino da ornitina (formado pela decomposição da arginina) ou um resíduo histidil, resultando na formação de ligações cruzadas de lisinoalanina, lantionina, ornitoalanina, histidinilalanina, respectivamente, em proteínas. A lisinoalanina é a ligação cruzada mais importante encontrada em proteínas tratadas por álcali, em virtude da abundância de resíduos lisil acessíveis na hora (Equação 5.83).

A formação das ligações cruzadas de proteína-proteína em proteínas tratadas por álcali diminui sua digestibilidade e seu valor biológico. A diminuição de digestibilidade está relacionada à incapacidade da tripsina de clivar a ligação peptídica na ligação cruzada lisinoalanina. Além disso, as restrições espaciais impostas pelas ligações cruzadas também impedem a hidrólise de outras ligações peptídicas nas proximidades das ligações cruzadas lisinoalanina e similares. Evidências sugerem que a lisinoalanina livre é absorvida no intestino, mas o organismo não a utiliza, sendo que a maior parte dela é excretada na urina. Uma parte da lisinoalanina é metabolizada nos rins. A incapacidade do organismo de clivar a ligação covalente lisinoalanina reduz a biodisponibilidade da lisina em proteínas tratadas por álcali.

Ratos alimentados com 100 ppm de lisinoalanina pura ou com 3.000 ppm de lisinoalanina ligada à proteína desenvolvem nefrocitomegalia (um distúrbio renal). Entretanto, efeitos nefrotóxicos não têm sido observados em outras espécies de animais, como codornas, camundongos, *hamsters* e macacos. Isso tem sido atribuído às diferenças nos tipos de metabólitos formados em ratos *versus* outros animais. Nos



níveis encontrados em alimentos, a lisinoalanina ligada à proteína aparentemente não causa nefrotoxicidade em seres humanos. Não obstante, a minimização da formação da lisinoalanina durante o processamento alcalino das proteínas é uma meta.

Os conteúdos de lisinoalanina de vários alimentos comerciais estão listados na Tabela 5.24 [120]. O nível de formação de lisinoalanina depende do pH e da temperatura. Quanto maior o pH, maior será o nível de formação da lisinoalanina. Tratamentos térmicos a altas temperaturas de alimentos, como o leite, levam ao aumento significativo da lisinoalanina, mesmo em pH neutro. A formação de lisinoalanina em proteínas pode ser minimizada ou inibida pela adição de compostos nucleofílicos de baixo peso molecular, como cisteína, amônia ou sulfitos. A efetividade da cisteína se deve ao fato de o grupo nucleofílico SH reagir mais de 1.000 vezes mais rápido do que o grupo ε-amino da lisina. O sulfito de sódio e a amônia exercem seus efeitos inibidores ao competir com o grupo ε-amino da lisina, pelo DHA. O bloqueio dos grupos ε-amino de resíduos de lisina pela reação com anidridos ácidos antes do tratamento alcalino também diminui a formação da lisinoalanina. Entretanto, esse

processo resulta em perda de lisina, podendo ser inadequado para aplicações alimentares.

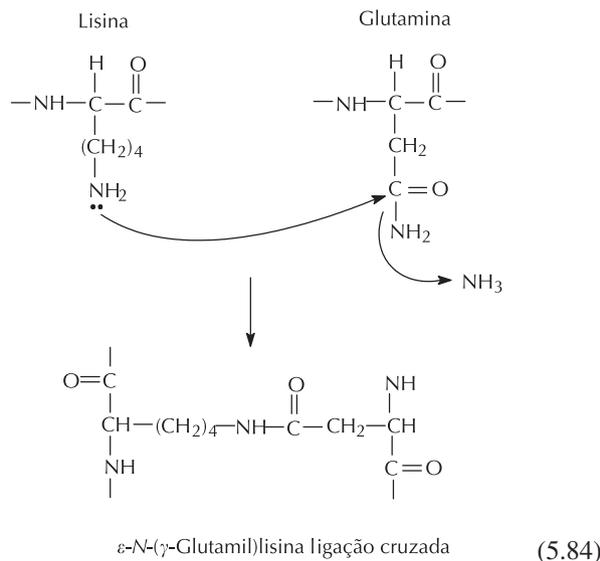
Sob condições normais usadas no processamento de vários alimentos, apenas pequenas quantidades de lisinoalanina são formadas. Desse modo, acredita-se que a sua toxicidade em alimentos tratados por álcali não seja preocupante. Entretanto, redução de digestibilidade, perda da biodisponibilidade da lisina e racemização de aminoácidos (alguns dos quais são tóxicos) são todos resultados indesejáveis em alimentos como a proteína vegetal texturizada, os quais são tratados por álcali.

O aquecimento excessivo de soluções de proteína pura ou alimentos proteicos de baixo teor de carboidratos também resulta na formação de ligações cruzadas ε-N-(γ-glutamil)lisil e ε-N-(γ-aspartil)lisil. Elas envolvem a reação de transaminação entre os resíduos de Lys e de Gln ou de Asn (Equação 5.84). As ligações cruzadas resultantes são denominadas ligações isopeptídicas, pois são estranhas às proteínas naturais. Os isopeptídeos resistem à hidrólise enzimática no intestino e, portanto, essas ligações cruzadas prejudicam a digestibilidade das proteínas e a biodisponibilidade da lisina.

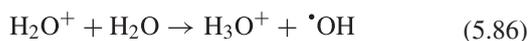
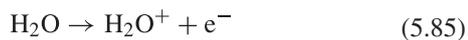
TABELA 5.24 Conteúdo de lisinoalanina (LAL) em alimentos processados

Alimento	LAL (µg/g de proteína)
Flocos de milho	390
Pretzels	500
Canjica	560
Tortilhas	200
Tacos	170
Leite (fórmula infantil)	150-640
Leite evaporado	590-860
Leite condensado	360-540
Leite UHT	160-370
Leite HTST	260-1.030
Leite em pó (<i>spray-dried</i>)	0
Leite desnatado evaporado	520
Simulação de queijo	1.070
Sólidos secos da clara do ovo	160-1.820
Caseinato de cálcio	370-1.000
Caseinato de sódio	430-6.900
Caseína ácida	70-190
Proteína vegetal hidrolisada	40-500
Agente espumante (<i>whipping</i>)	6.500-50.000
Isolado proteico de soja	0-370
Extrato de levedura	120

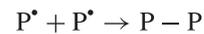
Fonte: Swaisgood, H. E. e G. L. Catignani. 1991. *Adv. Food Nutr. Res.* 35:185-236.



A radiação ionizante de alimentos resulta na formação de peróxido de hidrogênio por meio da radiólise da água na presença de oxigênio, o que, por sua vez, gera alterações oxidativas e polimerização nas proteínas. Essa radiação também pode produzir, diretamente, radicais livres pela ionização da água.



O radical livre hidroxil pode induzir a formação de radicais proteicos livres que, por sua vez, podem causar a polimerização das proteínas.



O aquecimento de soluções de proteína a 70-90°C e em pH neutro geralmente conduz a reações de intercâmbio sulfidríla-dissulfeto (se esses grupos estiverem presentes), resultando na polimerização das proteínas. Entretanto, esse tipo de ligação cruzada induzida por calor no geral não tem efeitos adversos sobre a digestibilidade das proteínas e a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, uma vez que essas ligações podem ser quebradas *in vivo*.

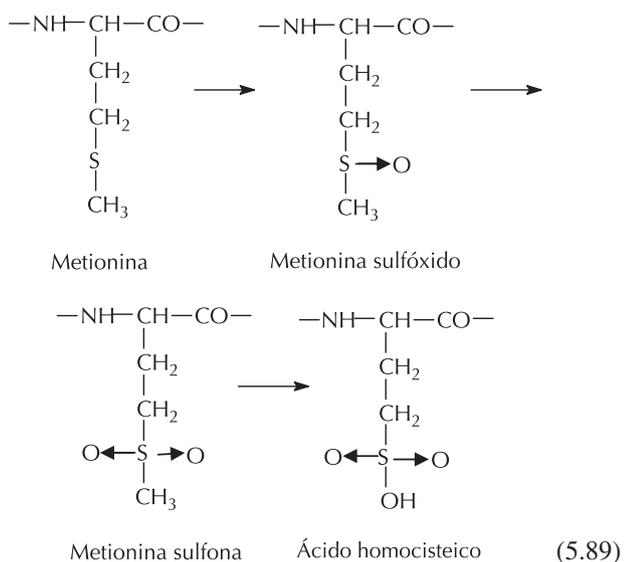
5.8.1.4 Efeitos de agentes oxidantes

Agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio e o peróxido de benzoíla são usados como agentes bactericidas em leite, agentes clareadores em farinhas de cereais, isolados proteicos e concentrados de proteína de peixe, bem como na desintoxicação de tortas de sementes oleaginosas. O hipoclorito de sódio também costuma ser usado como bactericida e agente desintoxicante em farinhas e tortas. Além dos agentes oxidantes que algumas vezes são adicionados aos alimentos, vários compostos oxidativos são produzidos endogenamente em alimentos durante o processamento. Eles incluem radicais livres formados durante a irradiação de alimentos, a peroxidação de lipídeos, a fotoxidação de compostos como riboflavina e clorofila e o escurecimento não enzimático dos alimentos. Além disso, os polifenóis presentes em vários isolados de proteínas vegetais podem ser oxidados pelo oxigênio molecular em quinonas, em pH neutro a alcalino, o que

levará, por fim, à formação de peróxidos. Os agentes oxidantes altamente reativos causam oxidação de vários resíduos de aminoácidos e polimerização de proteínas. Os resíduos de aminoácidos mais suscetíveis à oxidação são Met, Cys, Trp e His, e, em menor extensão, Tyr.

5.8.1.4.1 Oxidação da metionina

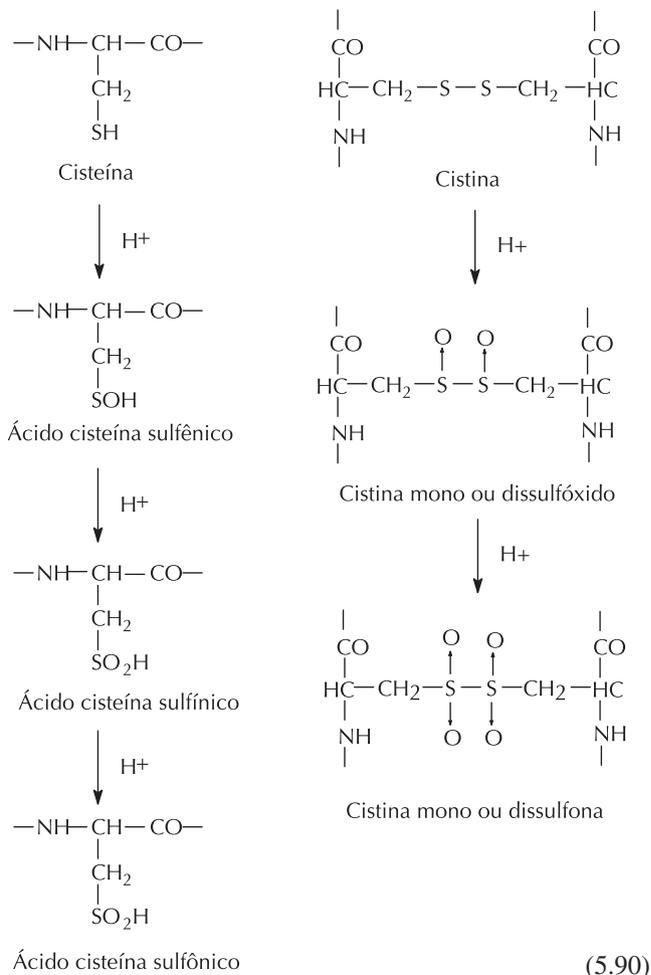
A metionina é facilmente oxidada em metionina sulfóxido por vários peróxidos. A sua incubação ligada à proteína ou da metionina livre com peróxido de hidrogênio (0,1 M), em temperatura elevada por 30min, resulta em conversão completa para metionina sulfóxido [23]. Sob fortes condições oxidantes, a metionina sulfóxido é, ainda, oxidada em metionina sulfona e, em alguns casos, em ácido homocisteico.



A metionina torna-se biologicamente indisponível uma vez oxidada em metionina sulfona ou ácido homocisteico; já a metionina sulfóxido, por outro lado, é reconvertida em Met sob as condições ácidas do estômago. Além disso, algumas evidências sugerem que toda metionina sulfóxido que passa pelo intestino é absorvida, sendo reduzida *in vivo* à metionina. Entretanto, a redução *in vivo* da metionina sulfóxido para metionina é lenta. O PER, ou NPU, da caseína oxidada com 0,1 M de peróxido de hidrogênio (que transforma por completo a metionina em metionina sulfóxido) é cerca de 10% menor do que o da caseína de controle.

5.8.1.4.2 Oxidação da cisteína e da cistina

Sob condições alcalinas, a cisteína e a cistina seguem a via da reação de β-eliminação para a produção de DHA. Entretanto, em pH ácido, a oxidação da cisteína e da cistina, em sistemas simples, resulta na formação de vários produtos intermediários de oxidação. Alguns desses derivados são instáveis.

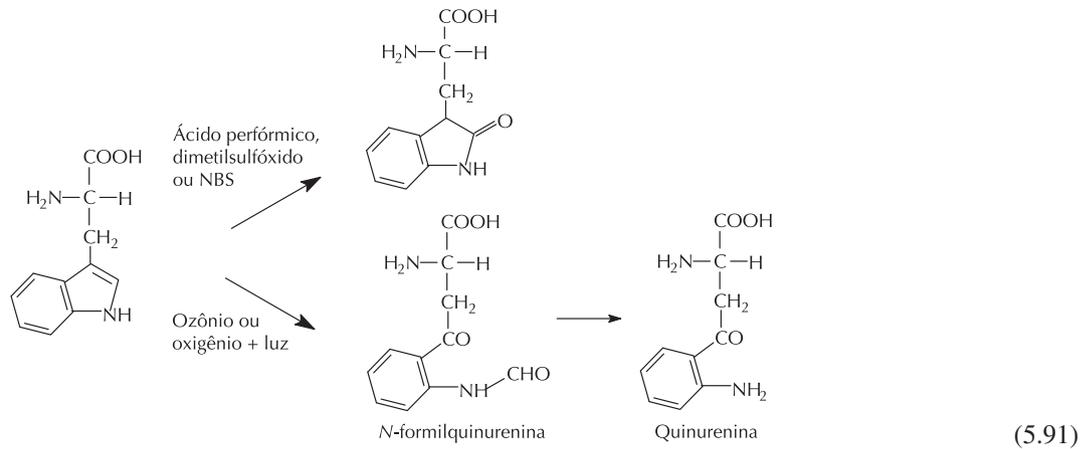


Os mono e dissulfóxidos da L-cistina são biodisponíveis, talvez por serem reduzidos, retornando à forma L-cistina, no organismo. Entretanto, os derivados mono e dissulfona da L-cistina não são biologicamente disponíveis. Da mesma forma, embora o ácido cisteína sulfênico seja biologicamente disponível, o cisteína sulfínico e o cisteico não o são. A taxa e o nível de formação desses produtos de oxidação em alimentos ácidos não estão bem documentados.

5.8.1.4.3 Oxidação do triptofano

Entre os aminoácidos essenciais, o Trp é excepcional devido ao seu papel em várias funções biológicas. Portanto, sua estabilidade em alimentos processados é de grande interesse. Sob condições ácidas, moderadas e oxidantes, como na presença de ácido per fórmico, dimetilsulfóxido ou N-bromosuccinimida (NBS), o Trp é oxidado principalmente em β-oxi-indolil-alanina. Sob condições ácidas, intensas e oxidantes, como na presença de ozônio, peróxido de hidrogênio ou lipídeos peroxidantes, ele é oxidado a N-formilquinurenina, quinurenina e outros produtos não identificados.

A exposição do Trp à luz, na presença de oxigênio e de um fotossensibilizador, como riboflavina ou clorofila, leva à formação de N-formilquinurenina e quinurenina como pro-



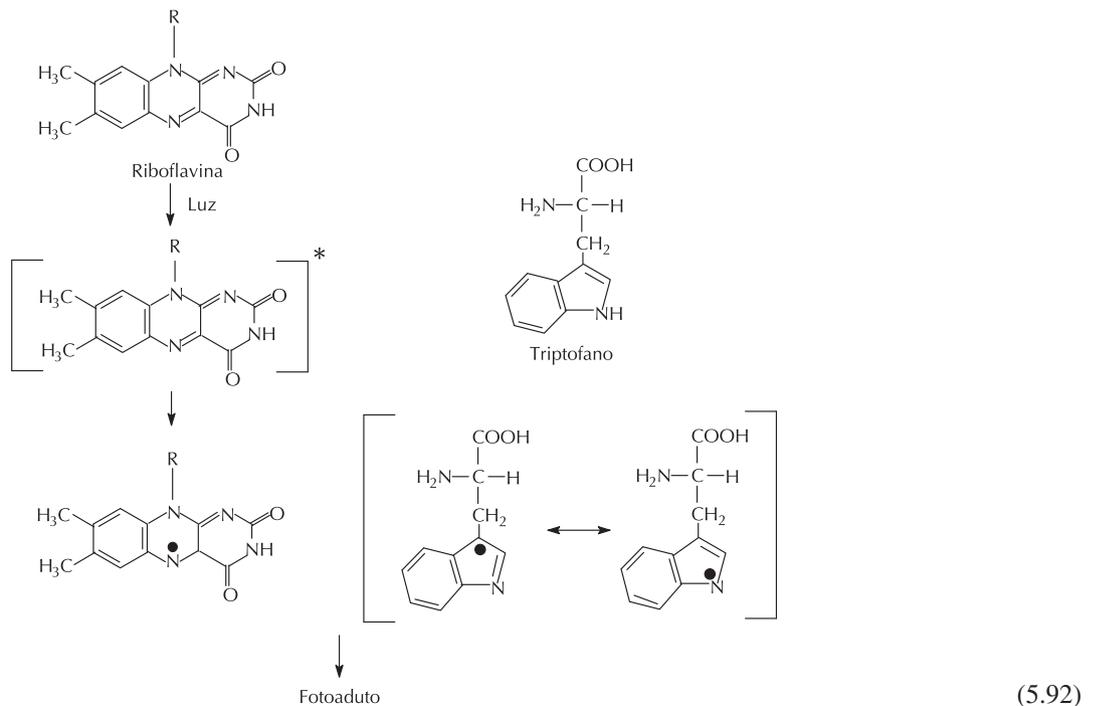
duto majoritários e vários outros minoritários. Dependendo do pH da solução, outros derivados, como 5-hidroxi-formilquinurenina (pH > 7,0) e hidroperóxido tricíclico (pH 3,6-7,1), também são formados [86]. Além dos produtos fotooxidativos, o Trp forma um fotoaduto com a riboflavina.

Tanto o triptofano livre como o ligado à proteína são capazes de formar esse aduto. O nível de formação desse fotoaduto é dependente da disponibilidade de oxigênio, sendo maior em condições anaeróbicas [112].

Os produtos da oxidação do Trp são biologicamente ativos. Além disso, as quinureninas são carcinogênicas em animais e todos os outros produtos da fotooxidação do Trp, bem como as carbolinas formadas durante o grelhado de produtos cárneos, exibem atividades mutagênicas e inibem o crescimento de células de mamíferos em culturas de tecidos. O fotoaduto triptofano-riboflavina mostra efeitos citotóxicos

em células de mamíferos, exercendo disfunções hepáticas durante a nutrição parenteral. Esses produtos indesejáveis normalmente estão presentes em concentração muito baixa em alimentos, a menos que um ambiente oxidativo seja criado de propósito.

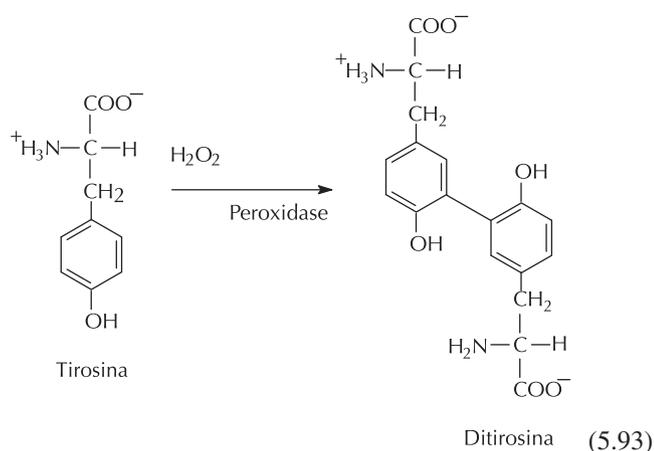
Entre as cadeias laterais dos aminoácidos, apenas as de Cys, His, Met, Trp e Tyr são suscetíveis à fotooxidação. No caso da Cys, o ácido cisteico é o produto final. A Met é fotooxidada primeiro em metionina sulfóxido e, finalmente, em metionina sulfona e ácido homocisteico. A fotooxidação da histidina leva à formação de aspartato e uroia. Os produtos da fotooxidação da tirosina não são conhecidos. Uma vez que os alimentos contêm riboflavina (vitamina B2) tanto endógena como suplementada, e costumam ser expostos a luz e ar, espera-se que ocorra algum grau de fotooxidação sensível nos resíduos do aminoácido supracitado. No leite, a



metionina livre é convertida em metional por oxidação ativamente pela luz, o que confere um sabor característico ao leite. Em concentrações equimolares, as taxas de oxidação dos aminoácidos sulfurados e do Trp provavelmente seguem a ordem Met > Cys > Trp.

5.8.1.4.4 Oxidação da tirosina

A exposição de soluções de tirosina a peroxidase e peróxido de hidrogênio resulta na oxidação da tirosina em ditirosina. A ocorrência desse tipo de ligação cruzada tem sido encontrada em proteínas naturais, como resilina, elastina, queratina e colágeno e, mais recentemente, em massas.

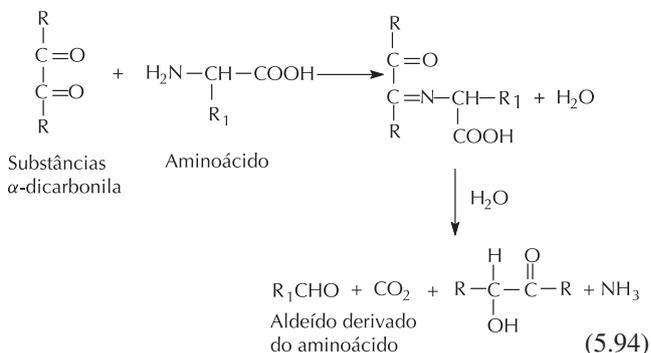


5.8.1.5 Reações carbonila-amina

Dentre as várias modificações químicas em proteínas induzidas pelo processamento, a reação de Maillard (escurecimento não enzimático) causa o maior impacto sobre as propriedades sensoriais e nutricionais. A reação de Maillard refere-se a um conjunto complexo de reações iniciado por reação entre aminas e compostos carbonila, as quais, em alta temperatura, decompõem-se e, finalmente, condensam-se, transformando-se em um produto marrom insolúvel conhecido como melanoidinas (ver Capítulo 14). Essa reação ocorre não apenas em alimentos durante o processamento, mas também em sistemas biológicos. Em ambos os casos, proteínas e aminoácidos costumam fornecer o componente amino e os açúcares redutores (aldoses e cetoses); o ácido

ascórbico e os compostos carbonílicos produzidos a partir da oxidação lipídica fornecem o componente carbonila.

Alguns dos derivados carbonila provenientes do processo de escurecimento não enzimático reagem prontamente com aminoácidos livres. Isso resulta na degradação dos aminoácidos em aldeídos, amônia e dióxido de carbono, sendo que essa reação é conhecida como *degradação de Strecker*. Os aldeídos contribuem para o desenvolvimento do aroma durante a reação de escurecimento. A degradação de Strecker de cada aminoácido produz um aldeído específico com aroma distinto (Tabela 5.25).



A reação de Maillard prejudica o valor nutricional das proteínas. Alguns dos produtos são antioxidantes e outros podem ser tóxicos, mas estes provavelmente não são danosos nas concentrações encontradas em alimentos. Isso ocorre porque o grupo ϵ -amino da lisina é a principal fonte de aminas primárias em proteínas, e costuma estar envolvido na reação carbonila-amina, sofrendo uma grande perda em biodisponibilidade quando essa reação ocorre. O grau de perda da Lys depende da fase da reação de escurecimento. A lisina envolvida nas fases iniciais do escurecimento, incluindo a base de Schiff, é biodisponível. Os derivados iniciais são hidrolisados em lisina e açúcar nas condições ácidas do estômago. Entretanto, após a fase de cetosamina (produto de Amadori) ou de aldossamina (produto de Heyns), a lisina não é mais biodisponível. Isso se deve principalmente à absorção precária dos derivados no intestino [36]. É importante observar que nenhuma cor desenvolve-se nesse estágio. Embora o sulfito iniba a formação de pigmentos marrons [129], ele não pode evitar a perda da disponibilidade da lisina, uma vez que não pode evitar a formação dos produtos de Amadori e Heyns.

TABELA 5.25 Notas de sabor características de aldeídos produzidos pela degradação de Strecker a partir de aminoácidos

Aminoácido	Sabor típico
Phe, Gly	Caramelo
Leu, Arg, His	Pão tostado
Ala	Nozes (em geral)
Pro	Biscoito tipo <i>cracker</i>
Gln, Lys	Manteiga
Met	Caldo, feijão
Cys, Gly	Defumado, queimado
Ácido α -aminobutírico	Noz (fruto da noqueira)
Arg	Pipoca

A atividade biológica da lisina nos vários estágios da reação de Maillard pode ser determinada quimicamente pela adição de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB), seguida por hidrólise ácida da proteína derivada. O FDNB reage com os grupos ϵ -amino disponíveis dos resíduos lisil. O hidrolisado é então extraído com éter etílico para remoção do FDNB que não reagiu; a concentração de ϵ -dinitrofenil-lisina (ϵ -DNP-lisina) na fase aquosa é determinada medindo-se a absorvância a 435 nm. A lisina disponível também pode ser determinada pela reação com ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com o grupo ϵ -amino. Nesse caso, a concentração do derivado ϵ -trinitrofenil-lisina (ϵ -TNP-lisina) é determinada a partir de absorvância a 346 nm.

O escurecimento não enzimático não causa apenas perdas importantes de lisina, mas as carbonilas insaturadas reativas e os radicais livres formados durante a reação de escurecimento causam a oxidação de vários outros aminoácidos essenciais, em especial Met, Tyr, His e Trp. A ligação cruzada das proteínas por compostos dicarbonila produzidos durante o escurecimento diminui sua solubilidade, prejudicando a digestibilidade proteica.

Suspeita-se que alguns dos produtos de coloração marrom da reação de Maillard sejam mutagênicos. Embora os compostos mutagênicos não sejam necessariamente carcinogênicos, todos os carcinogênicos conhecidos são mutagênicos. Portanto, a formação de compostos de Maillard mutagênicos em alimentos é preocupante. Estudos com misturas de glicose e aminoácidos mostraram que os produtos de Maillard de Lys e Cys são mutagênicos, enquanto os de Trp, Tyr, Asp, Asn e Glu não são, conforme determinado pelo Teste de Ames. Deve-se salientar que os produtos da pirólise de Trp e Glu (em carne grelhada) também são mutagênicos (Teste de Ames). Como discutido anteriormente, o aquecimento de açúcar e aminoácidos na presença da creatina produz os mutagênicos tipo IQ mais potentes (ver Equação 5.82). Embora os resultados baseados em sistemas-modelo não possam ser aplicados com segurança em alimentos, é possível que a interação de produtos da reação de Maillard com outros constituintes de menor peso molecular em alimentos possa produzir substâncias mutagênicas e/ou carcinogênicas.

O ponto positivo é que alguns produtos da reação de Maillard, especialmente as redutonas, têm atividade antioxidante [88]. Isso se deve ao seu poder redutor e sua capacidade de quelar metais, como Cu e Fe, os quais são pró-oxidantes. As aminoredutonas formadas a partir da reação de trioseredutonas com aminoácidos, tais como Gly, Met e Val, mostram excelente atividade antioxidante.

Além de açúcares redutores, outros aldeídos e cetonas presentes em alimentos também podem fazer parte da reação carbonila-amina. É digno de nota que o gossipol (do caroço de algodão), o glutaraldeído (adicionado a dietas proteicas para controlar a esaminação no rúmen dos ruminantes) e os aldeídos (especialmente o malonaldeído) obtidos da oxidação de lipídeos podem reagir com grupos amino das proteínas. Aldeídos bifuncionais, como o malonaldeído, podem formar ligações cruzadas e polimerizar proteínas. Isso pode resultar em insolubilização, perda da digestibilidade e bio-

disponibilidade da lisina e perda das propriedades funcionais das proteínas. O formaldeído também reage com o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina. Acredita-se que o endurecimento do músculo de peixes tipo bacalhau durante a estocagem sob congelamento se deva a reações do formaldeído com as proteínas do peixe.



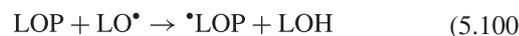
Grupo amino Malonaldeído
da proteína



5.8.1.6 Outras reações de proteínas em alimentos

5.8.1.6.1 Reações com lipídeos

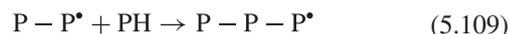
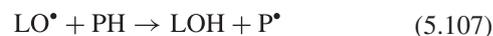
A oxidação de lipídeos insaturados leva à formação de radicais livres alcoxi e peroxi. Esses radicais livres, por sua vez, reagem com proteínas, formando radicais livres lipídeo-proteína. Os radicais livres conjugados lipídeo-proteína podem sofrer ligação cruzada de polimerização de proteínas, levando a diversos produtos com ligações cruzadas.



ou



Além disso, os radicais livres lipídicos podem também levar à formação de radicais livres proteicos nas cadeias laterais de cisteína e histidina, que podem então sofrer reações de polimerização e ligação cruzada.



Os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) dos alimentos podem se decompor, resultando na liberação de aldeídos e cetonas, particularmente malonaldeído. Esses compostos

carbonila reagem com grupos amino de proteínas via reação carbonila-amina e formação da base de Schiff. Como já foi discutido, a reação do malonaldeído com as cadeias laterais de lisil leva à ligação cruzada e à polimerização das proteínas. A reação de peroxidação de lipídeos com proteínas costuma ter efeitos deletérios sobre o valor nutricional das proteínas. A ligação não covalente de compostos carbonilas com proteínas também origina odores indesejáveis.

5.8.1.6.2 Reações com polifenóis

Compostos fenólicos, como ácido *p*-hidroxibenzoico, catecol, ácido cafeico, gossipol e quercetina, são encontrados em todos os tecidos vegetais. Durante a maceração de tecidos vegetais, esses compostos fenólicos podem ser oxidados pelo oxigênio molecular em pH alcalino, transformando-se em quinonas. Isso também pode ocorrer por ação da polifenoloxidase, que costuma estar presente em tecidos vegetais. Essas quinonas altamente reativas podem reagir de maneira irreversível com os grupos sulfidrila e amino das proteínas. A reação das quinonas com grupos (N-terminais) SH e α -amino é muito mais rápida do que com grupos ϵ -amino. Além disso, as quinonas também podem sofrer reações de oxidação, resultando na formação de pigmentos de cor marrom de alto peso molecular. Esses produtos marrons permanecem muito reativos, combinando-se com facilidade com os grupos SH e amino das proteínas. As reações do grupo quinona-amino diminuem a digestibilidade e a biodisponibilidade da cisteína e da lisina ligadas à proteína.

5.8.1.6.3 Reações com solventes halogenados

Os solventes orgânicos halogenados costumam ser usados na extração de óleo e de alguns fatores antinutricionais de sementes oleaginosas, como torta de caroço de algodão e

soja. A extração com tricloroetileno resulta na formação de uma pequena quantidade de *S*-diclorovinil-L-cisteína, que é tóxica. Por outro lado, os solventes diclorometano e tetracloroetileno não parecem reagir com proteínas. O 1,2-dicloroetano reage com resíduos de Cys, His e Met em proteínas. Alguns fumigadores, como o brometo de metila, podem alquilar resíduos de Lys, His, Cys e Met. Todas essas reações diminuem o valor nutricional das proteínas, sendo que algumas são preocupantes do ponto de vista da segurança.

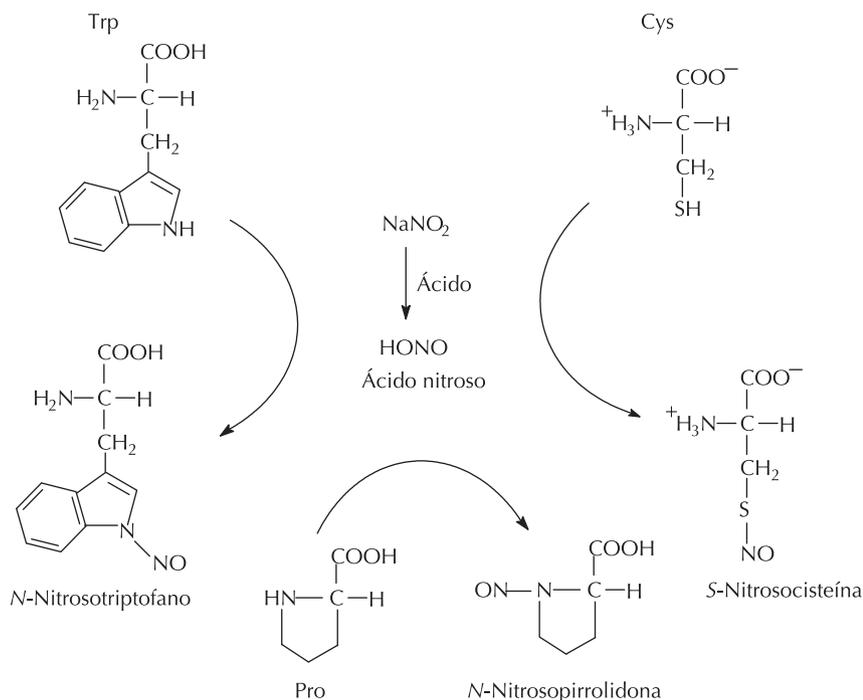
5.8.1.6.4 Reações com nitritos

A reação de nitritos com aminas secundárias e, em certo grau, com aminas primárias e terciárias, resulta na formação de *N*-nitrosamina, que é um dos compostos mais carcinogênicos formados nos alimentos. Os nitritos usualmente são adicionados a produtos cárneos para melhorar a cor e impedir o crescimento bacteriano. Os aminoácidos (ou resíduos) mais envolvidos nessa reação são Pro, His e Trp, mas Arg, Tyr e Cys também podem reagir com nitritos. Essa reação ocorre principalmente sob condições ácidas e em elevadas temperaturas.

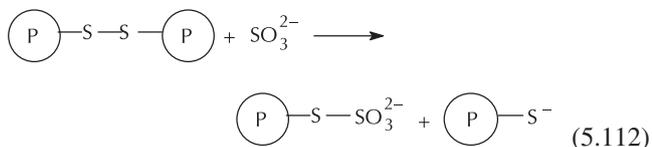
As aminas secundárias produzidas durante a reação de Maillard, como produtos de Amadori e Heyns, também podem reagir com nitritos. A formação de *N*-nitrosaminas durante cozimento e grelhado da carne tem sido uma grande preocupação, mas aditivos, como ácido ascórbico e eritorbato, são efetivos na redução dessa reação.

5.8.1.6.5 Reações com sulfitos

Os sulfitos reduzem as pontes dissulfeto em proteínas para produzir derivados *S*-sulfonados. Eles não reagem com resíduos de cisteína.



(5.111)



Na presença de agentes redutores, como cisteína ou metcaptoetanol, os derivados *S*-sulfonados são novamente convertidos em resíduos de cisteína. Os *S*-sulfonados se decompõem sob pH ácido (como no estômago) e sob pH alcalino, transformando-se em dissulfetos. A *S*-sulfonação não diminui a biodisponibilidade da cisteína. O aumento de eletronegatividade e a ruptura de ligações dissulfeto em proteínas a partir da *S*-sulfonação causam o desdobramento das moléculas de proteína, o que afeta suas propriedades funcionais.

5.8.2 Alterações nas propriedades funcionais das proteínas

Os métodos ou processos usados para o isolamento de proteínas podem afetar suas propriedades funcionais. A desnaturação mínima durante várias etapas do isolamento geralmente é desejável, uma vez que isso ajuda na manutenção de uma solubilidade proteica aceitável, o que costuma ser um pré-requisito para a funcionalidade dessas proteínas em produtos alimentícios. Em alguns casos, a desnaturação controlada ou parcial das proteínas pode melhorar determinadas propriedades funcionais.

As proteínas costumam ser isoladas usando-se a precipitação isoeletrica. As estruturas secundárias, terciárias e quaternárias da maioria das proteínas globulares são estáveis em seu pH isoeletrico, e as proteínas tornam-se novamente solúveis, com rapidez, quando dispersadas em pH neutro. Por outro lado, compostos proteicos como as micelas de caseína, são desestabilizados de forma irreversível pela precipitação isoeletrica. O colapso da estrutura micelar da caseína precipitada isoeletricamente deve-se a vários fatores, incluindo a solubilização do fosfato de cálcio coloidal e a mudança no equilíbrio das interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre os vários tipos de caseínas. As composições das proteínas precipitadas isoeletricamente costumam encontrar-se alteradas em comparação com as de materiais em sua forma nativa. Isso ocorre porque algumas frações proteicas de menor quantidade são solúveis no pH isoeletrico do componente principal, não sendo, portanto, precipitadas. Essa mudança de composição afeta as propriedades funcionais do isolado proteico.

A ultrafiltração (UF) é bastante usada na preparação de WPCs. Tanto a composição proteica como a não proteica do WPC são afetadas pela remoção de pequenos solutos durante a UF. A remoção parcial da lactose e das cinzas influencia muito as propriedades funcionais do WPC. Além disso, o aumento das interações proteína-proteína ocorre no concentrado UF durante a exposição a temperaturas moderadas (50-55°C), o que diminui a solubilidade e a estabilidade da proteína ultrafiltrada, que, por sua vez, altera sua capacidade de ligação com a água e suas propriedades no que diz respeito a gelificação, formação de espuma e emulsificação. Entre os constituintes das cinzas, as variações de conteúdo

de cálcio e fosfato afetam significativamente as propriedades gelificantes do WPC. Os isolados proteicos do soro preparados por troca iônica contêm pouca cinza e, por isso, possuem propriedades funcionais superiores às dos isolados obtidos por ultrafiltração/diafiltração.

Os íons de cálcio costumam induzir a agregação das proteínas. Isso é atribuível à formação de pontes iônicas que envolvem íons de Ca^{2+} e grupos carboxílicos. O grau da agregação depende da concentração do íon cálcio. A maioria das proteínas mostra agregação máxima em concentração de íon Ca^{2+} 40-50 mM. Com algumas proteínas, como caseínas e proteínas da soja, a agregação do cálcio leva à precipitação, enquanto, no caso do isolado proteico do soro, forma-se um agregado coloidal estável (Figura 5.34).

A exposição de proteínas a pH alcalino, particularmente em elevadas temperaturas, causa mudanças conformacionais irreversíveis. Isso se deve em parte à desamidação dos resíduos de Asn e Gln, e à β -eliminação dos resíduos de cistina. O aumento resultante em eletronegatividade e quebra de pontes dissulfeto ocasiona mudanças estruturais bruscas em proteínas expostas ao álcali. Geralmente, as proteínas tratadas com álcali são mais solúveis e possuem melhores propriedades emulsificantes e de formação de espuma.

O hexano costuma ser usado na extração de óleo de sementes oleaginosas, como soja e algodão. Esse tratamento causa, invariavelmente, a desnaturação das proteínas da torta prejudicando sua solubilidade e outras propriedades funcionais.

Os efeitos de tratamentos térmicos em alterações químicas e propriedades funcionais de proteínas são descritos na Seção 5.6. A cisão das ligações peptídicas que envolvem resíduos aspartil durante aquecimento intenso das soluções proteicas libera peptídeos de baixo peso molecular. O aquecimento intenso sob condições de pHs alcalinos e ácidos também causa hidrólise parcial das proteínas. A quantidade de peptídeos de baixo peso molecular em isolados proteicos pode afetar suas propriedades funcionais.

5.9 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E ENZIMÁTICAS DAS PROTEÍNAS

5.9.1 Modificações químicas

A estrutura primária das proteínas contém várias cadeias laterais reativas. As propriedades físico-químicas das proteínas podem ser alteradas, sendo que as funcionais podem ser melhoradas por modificação química das cadeias laterais. Entretanto, deve-se ter a cautela de observar que, embora a derivatização química das cadeias laterais de aminoácidos possa melhorar as propriedades funcionais das proteínas, ela também pode prejudicar o valor nutricional, criar alguns derivados de aminoácidos tóxicos e apresentar problemas regulatórios, embora reações similares possam ocorrer *in vitro* ou *in situ*.

Uma vez que as proteínas contêm várias cadeias laterais reativas, numerosas modificações químicas podem ser realizadas. Algumas dessas reações estão listadas na Tabela 5.5. Entretanto, apenas algumas dessas reações são adequadas para a modificação das proteínas alimentares. Os

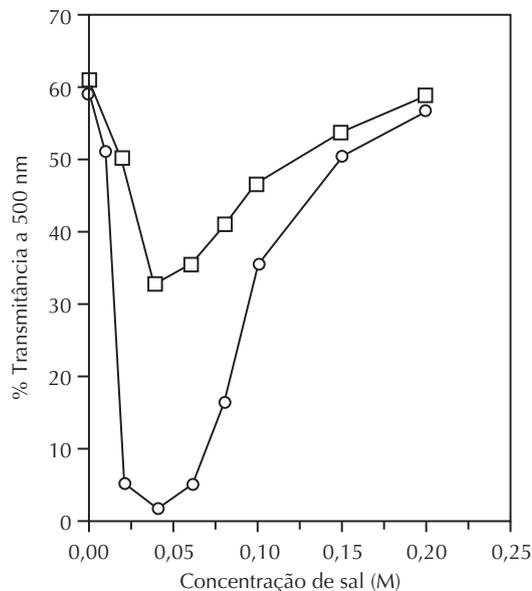


FIGURA 5.34 Concentração de sal versus turbidez do isolado proteico do soro de leite (5%) em soluções de CaCl_2 (○) e MgCl_2 (□), após da incubação por 24h, em temperatura ambiente. (Zhu, H. e S. Damodaran. 1994. *J. Agric. Food Chem.* **42**:856–862.)

grupos ϵ -amino dos resíduos lisil e o grupo SH da cisteína são os grupos nucleofílicos mais reativos das proteínas. A maioria dos procedimentos de modificação química envolve esses grupos.

5.9.1.1 Alquilação

Os grupos SH e amino podem ser alquilados por reação com um iodoacetato ou uma iodoacetamida. A reação com iodoacetato resulta na eliminação da carga positiva do resíduo lisil e na introdução de cargas negativas, tanto nos resíduos de lisil como nos de cisteína.

O aumento da eletronegatividade proteica pode alterar o perfil pH-solubilidade das proteínas, podendo, ainda, causar desdobramento. Por outro lado, a reação com iodoacetamida resulta apenas na eliminação de cargas positivas. Isso também causará aumento local de eletronegatividade, mas o número de grupos carregados negativamente das proteínas permanecerá inalterado. A reação com a iodoacetamida bloqueia efetivamente os grupos sulfidril, de modo que a polimerização proteica induzida pelo dissulfeto não possa ocorrer. Os grupos sulfidril também podem ser bloqueados pela reação com *N*-etilmaleimida (NEM).

Os grupos amino também podem ser alquilados por redução com aldeídos e cetonas em presença de redutores como boro-hidreto de sódio (NaBH_4) ou cianoboro-hidreto de sódio (NaCNBH_3). Nesse caso, a base de Schiff formada pela reação do grupo carbonila com o grupo amino é reduzida em seguida pela ação do redutor. Aldeídos alifáticos e cetonas ou açúcares redutores podem ser usados nessa reação. A redução da base de Schiff impede a progressão da reação de Maillard, resultando em uma glicoproteína, como produto final (glicosilação redutora).

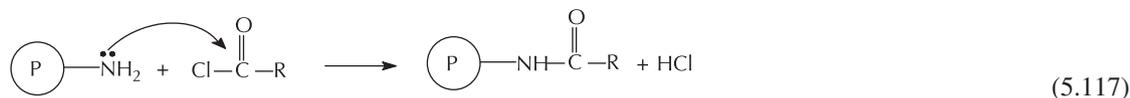
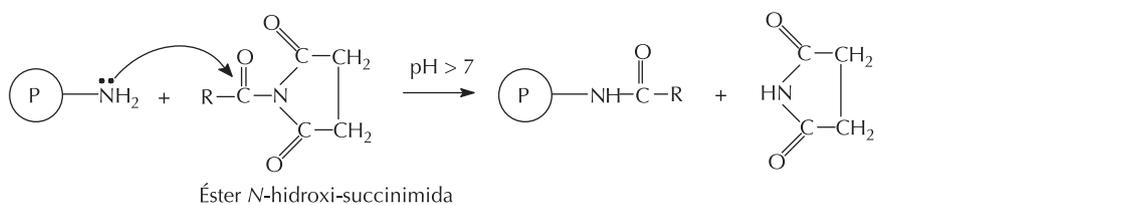
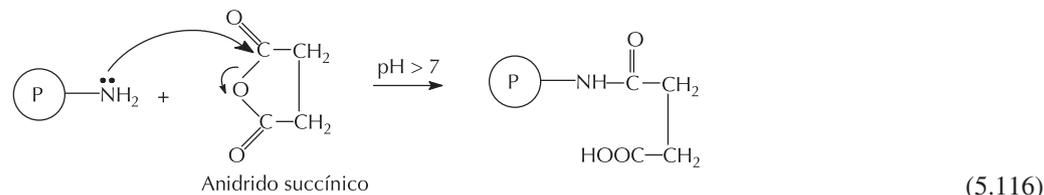
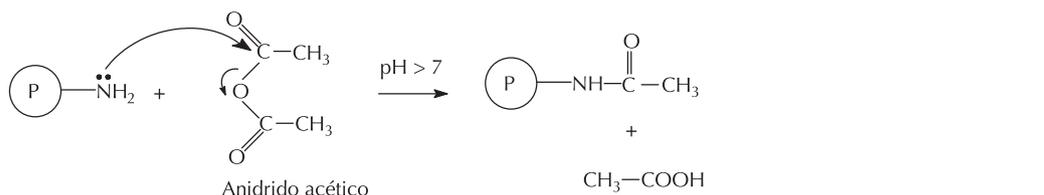
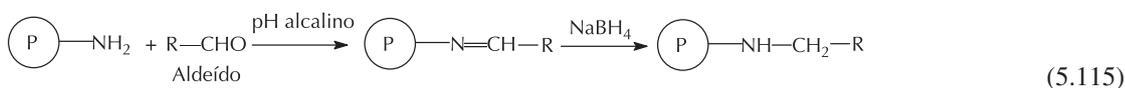
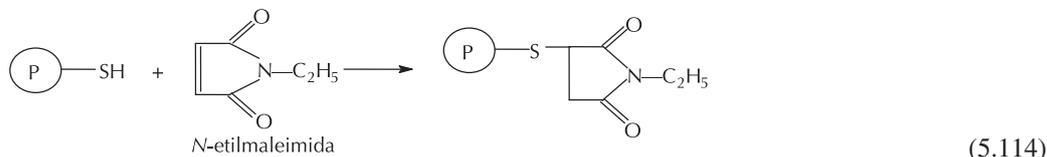
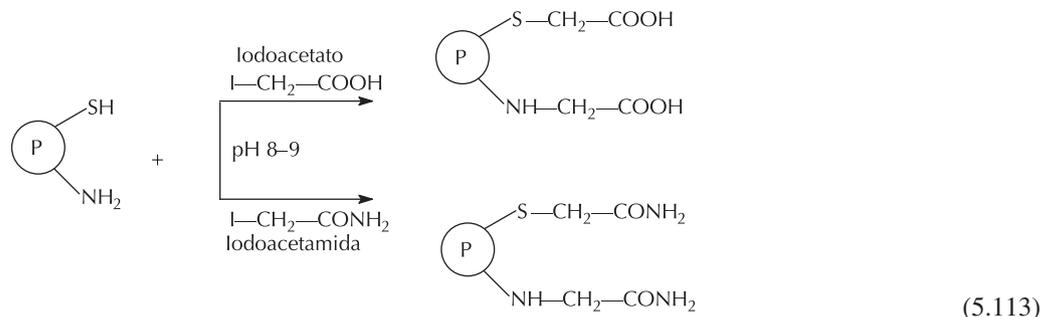
As propriedades físico-químicas da proteína modificada serão afetadas pelo reagente usado. A hidrofobicidade da

proteína pode ser aumentada se um aldeído alifático ou cetona for selecionado para a reação; modificando-se o comprimento da cadeia do grupo alifático, pode-se variar o grau de hidrofobicidade. Por outro lado, se um açúcar redutor for selecionado como reagente, a proteína será mais hidrofílica. Uma vez que as glicoproteínas exibem propriedades superiores de formação de espuma e emulsificantes (como no caso da ovoalbumina), a glicosilação redutora das proteínas deve melhorar sua solubilidade e suas propriedades interfaciais.

5.9.1.2 Acilação

Os grupos amino podem ser acilados por reação com vários anidridos ácidos. Os agentes acilantes mais comuns são anidrido acético e succínico. A reação da proteína com o anidrido acético resulta na eliminação das cargas positivas dos resíduos lisil e no aumento correspondente de eletronegatividade. A acilação com anidrido succínico ou com outros anidridos dicarboxílicos resulta na substituição da carga positiva por uma negativa nos resíduos lisil. Isso aumenta a eletronegatividade das proteínas e o desdobramento da proteína, caso for permitida a ocorrência de uma reação extensa.

As proteínas aciladas costumam ser mais solúveis que as naturais. Na verdade, a solubilidade das caseínas e de outras proteínas de menor solubilidade pode ser aumentada pela acilação com anidrido succínico. Entretanto, a succinilação, dependendo da extensão da modificação, geralmente prejudica outras propriedades funcionais. Por exemplo, as proteínas succiniladas exibem fracas propriedades de gelificação por calor, em decorrência das poderosas forças eletrostáticas repulsivas. A alta afinidade pela água das proteínas succiniladas também diminui sua adsorvidade nas interfaces óleo-água e ar-água, prejudicando suas propriedades de emulsificação e de formação de espuma. Além disso, por causa dos



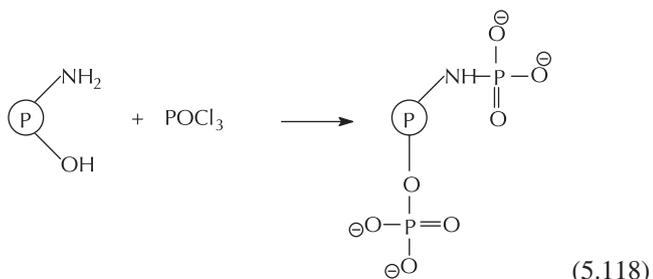
vários grupos carboxílicos introduzidos, as proteínas succiniladas são mais sensíveis à precipitação induzida por cálcio do que a proteína de origem.

As reações de acetilação e succinilação são irreversíveis. A ligação isopeptídica succinil-lisina é resistente à clivagem catalizada pelas enzimas pancreáticas digestivas. Além disso, as células da mucosa intestinal absorvem com precariedade a succinil-lisina. Desse modo, a succinilação e a acetilação reduzem muito o valor nutricional das proteínas.

A ligação de ácidos graxos de cadeia longa ao grupo ε-amino dos resíduos lisil pode aumentar a anfifilicidade das proteínas. Isso pode ser realizado pela reação de um éster de cloreto de acila ou um éster N-hidroxi-succinimida de um ácido graxo com uma proteína. Esse tipo de modificação pode aumentar a lipofilicidade e a capacidade de ligação a lipídeos das proteínas, podendo, ainda, facilitar a formação de novas estruturas micelares e de outros tipos de agregados proteicos.

5.9.1.3 Fosforilação

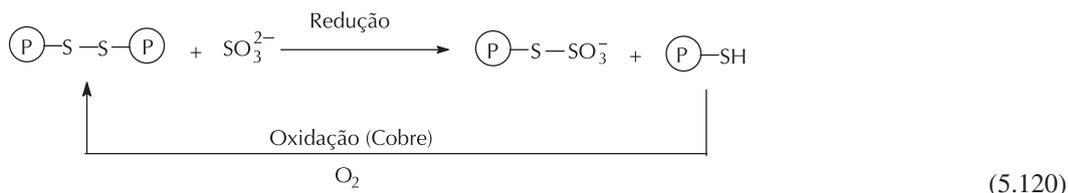
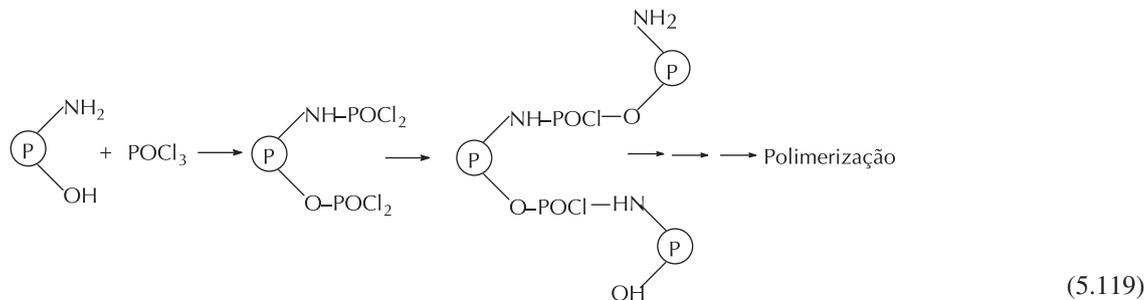
Diversas proteínas alimentares, como as caseínas, são fosfoproteínas. As proteínas fosforiladas são muito sensíveis à coagulação induzida pelo íon cálcio, o que pode ser desejável em simulações de queijos. As proteínas podem ser fosforiladas por reação com oxicloreto de fósforo (POCl₃). A fosforilação ocorre principalmente no grupo hidroxila dos resíduos de serina e de treonina e no grupo amino dos resíduos lisil, e aumenta muito a eletronegatividade proteica.



A fosforilação de grupos amino resulta na adição de duas cargas negativas para cada carga positiva eliminada pela modificação. Sob algumas condições de reação, em especial sob alta concentração proteica, a fosforilação com POCl₃ pode levar à polimerização das proteínas, como demonstrado adiante. Essas reações de polimerização tendem a minimizar o aumento de eletronegatividade e sensibilidade ao cálcio da proteína modificada. A ligação N-P é lábil a ácidos. Assim, espera-se que, sob as condições prevalentes no estômago, as proteínas N-fosforiladas passem por desfosforilação e regeneração dos resíduos lisil. Desse modo, é provável que a digestibilidade da lisina não seja significativamente prejudicada pela fosforilação química.

5.9.1.4 Sulfitólise

Sulfitólise refere-se à conversão das pontes dissulfeto das proteínas em um derivado S-sulfonado por uso de um sistema de oxirredução que envolve sulfito e cobre (Cu^{II}) ou outros oxidantes. Esse mecanismo é mostrado a seguir:



A adição de sulfito à proteína inicialmente cliva a ponte dissulfeto, resultando na formação de um S-SO₃⁻ e um grupo tiol livre. Trata-se de uma reação reversível, sendo que a constante de equilíbrio é baixa. Em presença de um agente oxidante, como cobre (II), os grupos SH recém-liberados são reoxidados, voltando a formar pontes dissulfeto intra ou intermoleculares, sendo que essas, por sua vez, são clivadas de novo pelos íons dissulfeto presentes na mistura da reação. O ciclo de oxirredução se repete até que todas as pontes dissulfeto e grupos sulfidríla sejam convertidos em derivado S-sulfonado [49].

Tanto a clivagem das pontes dissulfeto como a incorporação de grupos SO₃⁻ causam modificações conformacionais nas proteínas, o que afeta suas propriedades funcionais. Por exemplo, a sulfitólise das proteínas do soro do queijo muda drasticamente seus perfis de pH-solubilidade (Figura 5.35) [48].

5.9.1.5 Esterificação

Os grupos carboxílicos dos resíduos de Asp e Glu em proteínas não são altamente reativos. Entretanto, sob condições ácidas, esses resíduos podem ser esterificados com álcoois. Esses ésteres são estáveis em pH ácido, mas são hidrolisados com facilidade em pH alcalino.

5.9.2 Modificação enzimática

Sabe-se que ocorrem várias modificações enzimáticas de proteínas/enzimas nos sistemas biológicos. Essas modificações podem ser agrupadas em seis categorias gerais, a saber, glicosilação, hidroxilação, fosforilação, metilação, acilação e ligação cruzada. Essas modificações enzimáticas das proteínas *in vitro* podem ser usadas para melhorar suas propriedades funcionais. Embora diversas modificações enzimáticas de proteínas sejam possíveis, apenas algumas delas são passíveis de utilização na prática da modificação de proteínas destinadas ao uso em alimentos.

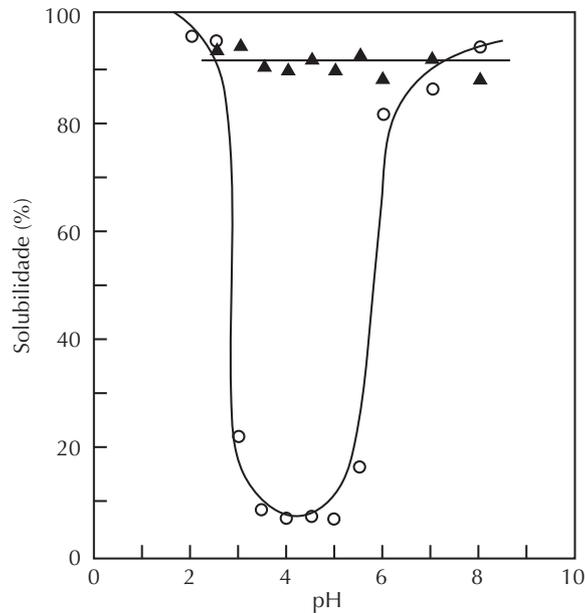


FIGURA 5.35 pH versus perfil de solubilidade proteica de (▲)soro doce original e (○) soro doce sulfonado (Gonzalez, J. M. e S. Damodaran. 1990. *J. Food Sci.* 55:1559–1563.)

5.9.2.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise de proteínas alimentares com uso de proteases, tais como pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína e termolisina, altera suas propriedades funcionais. A hidrólise extensiva por proteases não específicas, como a papaína, causa solubilização até mesmo de proteínas pouco solúveis. Esses hidrolisados costumam conter peptídeos de baixo peso molecular da ordem de dois a quatro resíduos de aminoácidos. A hidrólise extensiva prejudica várias propriedades funcionais, como propriedades de gelificação, formação de espuma e emulsificantes (ver Seção 5.6, para maiores detalhes).

5.9.2.2 Reação de plasteína

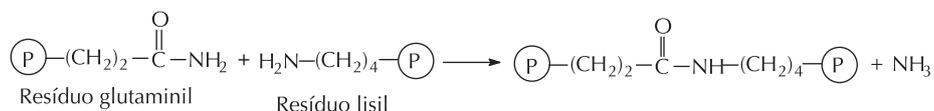
Reação de plasteína refere-se a uma série de reações que envolvem proteólise inicial, seguida de ressíntese de ligações peptídicas por uma protease (geralmente papaína ou quimotripsina). O substrato proteico, a baixas concentrações, é, em primeiro lugar, hidrolisado em parte pela papaína. Quando o hidrolisado contendo a enzima é concentrado a 30-35% de sólidos, sendo incubado, a enzima recombina aleatoriamente os peptídeos, gerando novas ligações peptídicas. A reação de plasteína também pode ser realizada em um processo de etapa única, no qual uma solução de proteína a 30-35% (ou uma pasta) é incubada com papaína na presença de L-cisteína [131]. No entanto, em ambos os casos, o peso molecular dos polipeptídeos formados é tipicamente menor do que o da proteína original. Assim, a enzima, em especial papaína

e quimotripsina, age tanto como protease quanto como esterase, sob condições determinadas. Uma vez que a estrutura e a sequência de aminoácidos dos produtos de plasteína são diferentes das da proteína nativa, esses produtos no geral exibem propriedades funcionais alteradas. Quando a L-metionina é incluída na mistura da reação, ela é covalentemente incorporada aos polipeptídeos recém-formados. Dessa forma, a reação de plasteína pode ser explorada no sentido de se melhorar a qualidade nutricional de alimentos proteicos deficientes em metionina ou lisina.

5.9.2.3 Ligação cruzada de proteínas

A transglutaminase catalisa uma reação de transferência de acil que envolve uma reação entre o grupo ϵ -amino de resíduos lisil (receptor de acil) e o grupo amino de resíduos de glutamina (doador de acil), resultando na formação de uma ligação cruzada isopeptídica.

Essa reação pode ser usada na realização da ligação cruzada de diferentes proteínas e na produção de novas formas de proteínas alimentares que podem apresentar propriedades funcionais melhoradas. Sob alta concentração proteica, a ligação cruzada catalisada pela transglutaminase leva à formação de géis e filmes proteicos, em temperatura ambiente [85,90,91]. Essa reação também pode ser usada para melhorar a qualidade nutricional de proteínas por ligação cruzada de lisina e/ou metionina aos resíduos de glutamina (Tabela 5.23) [58].



(5.121)

LEITURA COMPLEMENTAR

- Bodwell, C. E., J. S. Adkins, and D. T. Hopkins (Eds.) (1981). *Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro Estimation*, AVI Publishing Co., Westport, Connecticut.
- Ghelis, C. and J. Yon (1982). *Protein Folding*, Academic Press, New York.
- Hettiarachchy, N. S. and G. R. Ziegler (Eds.) (1994). *Protein Functionality in Food Systems*, Marcel Dekker, New York.
- Kinsella, J. E. and W. G. Soucie (Eds.) (1989). *Food Proteins*, American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois.
- Mitchell, J. R. and D. A. Ledward (Eds.) (1986). *Functional Properties of Food Macromolecules*, Elsevier Applied Sci., New York.
- Parris, N. and R. Barford (1991). *Interactions of Food Proteins*, ACS Symposium Series 454, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Phillips, R. D. and J. W. Finley (Eds.) (1989). *Protein Quality and the Effects of Processing*, Marcel Dekker, New York.
- Schulz, G. E. and R. H. Schirmer (1980). *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York.
- Whitaker, J. R. and S. R. Tannenbaum (1977). *Food Proteins*, AVI Publishing Co., Westport, Connecticut.
- Whitaker, J. R. and M. Fujimaki (Eds.) (1980). *Chemical Deterioration of Proteins*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC.

REFERÊNCIAS

- Aas, K. 1988. The biochemistry of food allergens: what is essential for future research? In *Food Allergy* (Schmidt, E. and D. Reinhardt, Eds.), Raven Press, Ltd., New York, p. 1.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **27**:1256–1260.
- Adler-Nissen, J. 1986. Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures. In *Protein Tailoring for Food and Medical Uses* (Feeney, R. E. and J. R. Whitaker, Eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 97–122.
- Aguilar, C. F., L. Sanderson, M. Moracci, M. Ciaramella, R. Nucci, M. Rossi, and L. Pearl. 1997. Crystal structure of the β -glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **271**:789–802.
- Ahren, T. J. and A. M. Klivanov. 1985. The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. *Science* **228**:1280–1284.
- Anand, K. and S. Damodaran. 1996. Dynamics of exchange between α_{s1} -casein and -casein during adsorption at air–water interface. *J. Agric. Food Chem.* **44**:1022–1028. Fennema's Food Chemistry
- Angsupanich, K., M. Edde, and D. A. Ledward. 1999. Effects of high pressure on the myofibrillar proteins of cod and turkey muscle. *J. Agric. Food Chem.* **47**:92–99.
- Arakawa, T. and S. N. Timasheff. 1984. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry* **23**:5912–5923.
- Asakura, T., K. Adachi, and E. Schwartz. 1978. Stabilizing effect of various organic solvents on protein. *J. Biol. Chem.* **253**:6423–6425.
- Barro, F., L. Rooke, F. Bekes, P. Gras, A. S. Tatham, R. Fido, P. A. Lazeri, P. R. Shewry, and P. Barcelo. 1997. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat. Biotechnol.* **15**:1295–1299.
- Bigelow, C. C. 1967. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theor. Biol.* **16**:187–211.
- Böck, A., K. Forchhammer, J. Heider, and C. Baron. 1991. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem. Sci.* **16**:463–467.
- Brems, D. N. 1990. Folding of bovine growth hormone. In *Protein Folding* (Gierasch, L. M. and J. King, Eds.), American Association for the Advancement of Science, Washington, DC, p. 133.
- Bull, H. B. and K. Breese. 1973. Thermal stability of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**: 681–686.
- Bushuk, W. and F. MacRitchie. 1989. Wheat proteins: aspects of structure that determine breadmaking quality. In *Protein Quality and the Effects of Processing* (Dixon Phillips, R. and J. W. Finley, Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 345–369.
- Caldarelli, G. and P. De Los Rios. 2001. Cold and warm denaturation of proteins. *J. Biol. Phys.* **27**:229–241.
- Cameron, D. R., M. E. Weber, E. S. Idziak, R. J. Neufeld, and D. G. Cooper. 1991. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index. *J. Agric. Food Chem.* **39**:655–659.
- Chen, B. and J. A. Schellman. 1989. Low-temperature unfolding of a mutant of phage T4 lysozyme. 1. Equilibrium studies. *Biochemistry* **28**:685–691.
- Chen, C., A. M. Pearson, and J. I. Gray. 1990. Meat mutagens. *Adv. Food Nutr. Res.* **34**:387–449.
- Cherkin, A. D., J. L. Davis, and M. W. Garman. 1978. D-proline: stereospecific-sodium chloride dependent lethal convulsant activity in the Chick. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **8**:623–625.
- Collins, K. D. and M. W. Washabaugh. 1985. The Hofmeister effect and the behavior of water at interfaces. *Quat. Rev. Biophys.* **18**:323–422.
- Creighton, T. E. 1993. *Proteins: Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman Co., New York, pp. 158–159.
- Cuq, J. L., M. Provansal, F. Uilleuz, and C. Cheftel. 1973. Oxidation of methionine residues of casein by hydrogen peroxide. Effects on *in vitro* digestibility. *J. Food Sci.* **38**:11–13.
- Dalgleish, D. G., M. Srinivasan, and H. Singh. 1995. Surface-properties of oil-in-water emulsion droplets containing casein and tween-60. *J. Agric. Food Chem.* **43**:2351–2355.
- Damodaran, S. 1989. Influence of protein conformation on its adaptability under chaotropic conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* **11**:2–8.
- Damodaran, S. 1990. Interfaces, protein films, and foams. *Advan. Food Nutr. Res.* **34**:1–79.
- Damodaran, S. 1988. Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. *J. Agric. Food Chem.* **36**:262–269.
- Damodaran, S. and J. E. Kinsella. 1980. Flavor–protein interactions: binding of carbonyls to bovine serum albumin: thermodynamic and conformational effects. *J. Agric. Food Chem.* **28**:567–571.
- Damodaran, S. and J. E. Kinsella. 1981. Interaction of carbonyls with soy protein: thermodynamic effects. *J. Agric. Food Chem.* **29**:1249–1253.
- Damodaran, S. and T. Sengupta. 2003. Dynamics of competitive adsorption of s-casein and -casein at the oil–water interface: evidence for incompatibility of mixing at the interface. *J. Agric. Food Chem.* **51**:1658–1665.
- Dickinson, E. 1998. Proteins at interfaces and in emulsions: stability, rheology and interactions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **88**:2973–2985.
- Dickinson, E. and Y. Matsumura. 1991. Time-dependent polymerization of β -lactoglobulin through disulphide bonds at the oil–water interface in emulsions. *Int. J. Biol. Macromol.* **13**:26–30. Amino Acids, Peptides, and Proteins
- Dill, K. A., A. Dov, and K. Hutchinson. 1989. Thermal stabilities of globular-proteins. *Biochemistry* **28**:5439–5449.
- Dyer, J. M., J. W. Nelson, and N. Murai. 1992. Biophysical analysis of phaseolin denaturation induced by urea, guanidinium chloride, Ph, and temperature. *J. Protein Chem.* **11**:281–288.
- Eggum, B. O. and R. M. Beames. 1983. The nutritive value of seed proteins. In *Seed Proteins* (Gottschalk, W. and H. P. Muller, Eds.), Nijhoff/Junk, The Hague, pp. 499–531.
- Erbersdobler, H. F., M. Lohmann, and K. Buhl. 1991. Utilization of early Maillard reaction products by humans. In *Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing* (Friedman, M., Ed.), Advan. Expt. Med. Biol., vol. 289, Plenum Press, New York, pp. 363–370.
- Ewart, J. A. D. 1967. Amino acid analysis of glutenins and gliadins. *J. Sci. Food Agric.* **10**:111–117.
- Fang, Y. and D. G. Dalgleish. 1996. Competitive adsorption between oleoylphosphatidylcholine and sodium caseinate on oil-water interfaces. *J. Agric. Food Chem.* **44**:59–64.
- FAO/WHO. 1991. Protein Quality Evaluation, Report of a Joint FAO/WHO expert Consultation. FAO Food Nutr. Paper 51, pp. 23–24, FAO, Geneva.
- FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and protein requirements, Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. World Health Organization Technical Rep. Ser. 724, WHO, Geneva.

41. Fauchere, J. L. and V. Pliska. 1983. Hydrophobic parameters-pi of amino-acid side-chains from the partitioning of n-acetyl-amino-acid amides. *Eur. J. Med. Chem.* **18**:369–375.
42. Fay, L., U. Richli, and R. Liardon. 1991. Evidence for the absence of amino acid isomerization in microwave-heated milk and infant formulas. *J. Agric. Food Chem.* **39**:1857–1859.
43. Ferry, J. D. 1961. *Viscoelastic Properties of Polymers*. Wiley, New York, p. 391.
44. Ford, J. E. 1981. Microbiological methods for protein quality assessment. In *Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro Estimation* (Bodwell, C. E., J. S. Adkins, and D. T. Hopkins, Eds.), AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, pp. 278–305.
45. Friedman, M. and M. R. Gumbmann. 1986. Nutritional improvement of legume proteins through disulfide interchange. *Adv. Exp. Med. Biol.* **199**:357–390.
46. Fujita, Y. and Y. Noda. 1981. The effect of hydration on the thermal stability of ovalbumin as measured by means of differential scanning calorimetry. *Bull. Chem. Soc. Japan* **54**:3233–3234.
47. Gekko, K. and Y. Hasegawa. 1986. Compressibility-structure relationship of globular proteins. *Biochemistry* **25**:6563–6571.
48. Gonzalez, J. M. and S. Damodaran. 1990. Recovery of proteins from raw sweet whey using a solid state sulfitolysis. *J. Food Sci.* **55**:1559–1563.
49. Gonzalez, J. M. and S. Damodaran. 1990. Sulfitolysis of disulfide bonds in proteins using a solid state copper carbonate catalyst. *J. Agric. Food Chem.* **38**:149–153.
50. Gosal, W. S. and S. B. Ross-Murphy. 2000. Globular protein gelation [Review]. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **5**:188–194.
51. Grandori, R., I. Matecko, P. Mayr, and N. Muller. 2001. Probing protein stabilization by glycerol using electrospray mass spectrometry. *J. Mass. Spec.* **36**:918–922.
52. Griebenow, K. and A. M. Klibanov. 1996. On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **118**:11695–11700.
53. Gumbmann, M. R., W. L. Spangler, G. M. Dugan, and J. J. Rackis. 1986. Safety of trypsin inhibitors in the diet: effects on the rat pancreas of long-term feeding of soy flour and soy protein isolate. *Adv. Exp. Med. Biol.* **199**:33–79.
54. Harwalkar, V. R. and C.-Y. Ma. 1989. Effects of medium composition, preheating, and chemical modification upon thermal behavior of oat globulin and β -lactoglobulin. In *Food Proteins* (Kinsella, J. E. and W. G. Soucie, Eds.), American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, pp. 210–231.
55. Hayase, F., H. Kato, and M. Fujimaki. 1973. Racemization of amino acid residues in proteins during roasting. *Agric. Biol. Chem.* **37**:191–192.
56. He, X. M. and D. C. Carter. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**:209–214.
57. Heremans, K. 1982. High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **11**:1–21.
58. Ikura, K., M. Yoshikawa, R. Sasaki, and H. Chiba. 1981. Incorporation of amino acids into food proteins by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* **45**:2587–2592. Fennema's Food Chemistry
59. Israelachvili, J. and R. Pashley. 1982. The hydrophobic interaction is long range, decaying exponentially with distance. *Nature* **300**:341–342.
60. Jagerstad, M. and K. Skog. 1991. Formation of meat mutagens. In *Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing* (Friedman, M., Ed.), *Advan. Expt. Med. Biol.*, vol. 289, Plenum Press, New York, pp. 83–105.
61. Kamtekar, S., J. Schiffer, H. Xiong, J. M. Babik, and M. H. Hecht. 1993. Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science* **262**:1680–1685.
62. Kato, A. and S. Nakai. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **624**:13–20.
63. Kato, S., Y. Osako, N. Matsudomi, and K. Kobayashi. 1983. Changes in emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agric. Biol. Chem.* **47**:33–38.
64. Kinsella, J. E., S. Damodaran, and J. B. German. 1985. Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins. In *New Protein Foods: Seed Storage Proteins* (Altshul, A. M. and H. L. Wilcke, Eds.), Academic Press, London, pp. 107–179.
65. Kinsella, J. E. and P. F. Fox. 1986. Water sorption by proteins: milk and whey proteins. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **24**:91–139.
66. Kinsho, T., H. Ueno, R. Hayashi, C. Hashizume, and K. Kimura. 2002. Sub-zero temperature inactivation of carboxypeptidase Y under high hydrostatic pressure. *Eur. J. Biochem.* **269**:4666–4674.
67. Kiosseoglou, V. and A. Perdakis. 1994. Stability of bovine serum albumin-stabilized olive oil-in-water emulsions and the role of the oil minor surface-active lipids. *Food Hydrocolloids* **8**:27–32.
68. Koshiyama, I. 1972. Purification and physicochemical properties of 11S globulin in soybean seeds. *Int. J. Peptide Protein Res.* **4**:167–171.
69. Kulmyrzaev, A., C. Bryant, and D. J. McClements. 2000. Influence of sucrose on the thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.* **48**:1593–1597.
70. Kuntz, I. D. 1971. Hydration of Macromolecules. III. Hydration of polypeptides. *J. Amer. Chem. Soc.* **93**:514–516.
71. Kuntz, I. D. and W. Kauzmann. 1974. Hydration of proteins and polypeptides. *Adv. Protein Chem.* **28**:239–345.
72. Lado, B. H. and A. E. Yousef. 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes Infect.* **4**:433–440.
73. Lapanje, S. 1978. *Physicochemical Aspects of Protein Denaturation*. Wiley-Interscience, New York.
74. Lawrence, M. C., E. Suzuki, J. N. Varghese, P. C. Davis, A. Van Donkelaar, P. A. Tulloch, and P. M. Colman. 1990. The three-dimensional structure of the seed storage protein phaseolin at 3 Å resolution. *EMBO J.* **9**:9–15.
75. Li, P., J. Reilly, and C. Ford. 1997. Effect of introducing proline residues on the stability of *Aspergillus awamori*. *Protein Eng.* **10**:1199–1204.
76. Liao, S. Y. and M. E. Mangino. 1987. Characterization of the composition, physicochemical and functional properties of acid whey protein concentrates. *J. Food Sci.* **52**:1033–1037.
77. Liardon, R. and M. Friedman. 1987. Effect of peptide bond cleavage on the racemization of amino acid residues in proteins. *J. Agric. Food Chem.* **35**:661–667.
78. Liardon, R. and D. Ledermann. 1986. Racemization kinetics of free and protein-bound amino acids under moderate alkaline treatment. *J. Agric. Food Chem.* **34**:557–565.
79. MacRitchie, F. 1992. Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality. *Adv. Protein Chem.* **36**:2–89.
80. MacRitchie, F., D. L. de Cros, and C. W. Wrigley. 1990. Flour polypeptides related to wheat quality. *Adv. Cereal Sci. Tech.* **10**:79–145.
81. Mahmoud, M. I., W. T. Malone, and C. T. Cordle. 1992. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J. Food Sci.* **57**:1223–1227.
82. Mak, A., L. B. Smillie, and G. Stewart. 1980. A comparison of the amino acid sequences of rabbit skeletal muscle and tropomyosins. *J. Biol. Chem.* **255**:3647–3655.
83. Marable, N. L. and G. Sanzone. 1981. *In vitro* assays of protein quality assays utilizing enzymatic hydrolyses. In *Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro Estimation* (Bodwell, C. E., J. S. Adkins, and D. T. Hopkins, Eds.), AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, pp. 261–277.
84. Miller, S., J. Janin, A. M. Lesk, and C. Chothia. 1987. Interior and surface of monomeric proteins. *J. Mol. Biol.* **196**:641–656. Amino Acids, Peptides, and Proteins
85. Motoki, M., H. Aso, K. Seguro, and N. Nio. 1987. α_1 -casein film prepared using transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* **51**:993–996.
86. Nakagawa, M., Y. Yokoyama, S. Kato, and T. Hino. 1985. Dye-sensitized photo-oxygenation of tryptophan. *Tetrahedron* **41**:2125–2132.
87. Nakamura, S., T. Tanaka, R. Y. Yada, and S. Nakai. 1997. Improving the thermostability of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introducing proline into the active site helix. *Protein Eng.* **10**:1263–1269.
88. Namiki, M. 1988. Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv. Food Res.* **32**:115–184.
89. Nielsen, N. C. 1985. Structure of soy proteins. In *New Protein Foods: Seed Storage Proteins, vol. 5* (Altshul, A. M. and H. L. Wilcke, Eds.), Academic Press, Inc., New York, pp. 27–64.
90. Nio, N., M. Motoki, and K. Takinami. 1986. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* **50**:851–855.
91. Nio, N., M. Motoki, and K. Takinami. 1985. Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* **49**:2283–2286.

92. Nishioka, G. M. and S. Ross. 1981. A new method and apparatus for measuring foam stability. *J. Coll. Interf. Sci.* **81**:1–7.
93. Ohnishi, T. and T. Asakura. 1976. Denaturation of oxyhemoglobin S by mechanical shaking. *Biochim. Biophys. Acta* **453**:93–100.
94. Okomoto, M., Y. Kawamura, and R. Hayashi. 1990. Application of high pressure to food processing: textural comparison of pressure- and heat-induced gels of food proteins. *Agric. Biol. Chem.* **54**:183–189.
95. O'Neill, T. E. and J. E. Kinsella. 1987. Binding of alkanone flavors to β -lactoglobulin: effects of conformational and chemical modification. *J. Agric. Food Chem.* **35**:770–774.
96. Ortiz, R., R. Sanchez, A. Paez, L. F. Montano, and E. Zenteno. 1992. Induction of intestinal malabsorption syndrome in rats fed with *Agaricus bisporus* mushroom lectin. *J. Agric. Food Chem.* **40**:1375–1378.
97. Pahud, J.-J., J. C. Monti, and R. Jost. 1985. Allergenicity of whey proteins: its modification by tryptic *in vitro* hydrolysis of the protein. *J. Pediatr. Gastrointest. Nutr.* **4**:408–415.
98. Papiz, M. Z., L. Sawyer, E. E. Eliopoulos, A. C. T. North, J. B. C. Findlay, R. Sivaprasadarao, T.A.Jones, M. E. Newcomer, and P. J. Kraulis. 1986. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* **324**:383–385.
99. Pearce, K. N. and J. E. Kinsella. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* **26**:716–722.
100. Polyakov, V. L., V. Y. Grinberg, and V. B. Tolstoguzov. 1997. Thermodynamic compatibility of proteins. *Food Hydrocolloids* **11**:171–180.
101. Ponnuswamy, P. K., R. Muthusamy, and P. Manavalan. 1982. Amino acid composition and thermal stability of proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **4**:186–190.
102. Poole, S., S. I. West, and C. L. Walters. 1984. Protein–protein interactions: their importance in the foaming of heterogeneous protein systems. *J. Sci. Food Agric.* **35**:701–711.
103. Pusztai, A., E. M. W. Clarke, G. Grant, and T. P. King. 1981. The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. Nitrogen balance and immunochemical studies. *J. Sci. Food Agric.* **32**: 1037–1046.
104. Rao, M. A., S. Damodaran, J. E. Kinsella, and H. J. Cooley. 1986. Flow properties of 7S and 11S soy protein fractions. In *Food Engineering and Process Applications* (Le Maguer, M. and P. Jelen, Eds.), Elsevier Applied Sci., New York, pp. 39–48.
105. Razumovsky, L. and S. Damodaran. 2001. Incompatibility of mixing of proteins in adsorbed binary protein films at the air–water interface. *J. Agric. Food Chem.* **49**:3080–3086.
106. Razumovsky, L. and S. Damodaran. 1999. Surface activity—Compressibility relationship of proteins. *Langmuir* **15**:1392–1399.
107. Richards, F. M. 1977. Areas, volumes, packing, and protein structure. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**:151–176.
108. Ritchey, S. J. and L. J. Taper. 1981. Estimating protein digestibility for humans from rat assays. In *Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro Estimation* (Bodwell, C. E., J. S. Adkins, and Fennema's Food Chemistry
109. Rupley, J. A., P.-H. Yang, and G. Tollin. 1980. Thermodynamic and related studies of water interacting with proteins. In *Water in Polymers* (Rowland, S. P., Ed.), ACS Symp. Ser. 127, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 91–139.
110. Russell, R. J. M., D. W. Hough, M. J. Danson, and G. L. Taylor. 1994. The crystal structure of citrate synthase from the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *Structure* **2**:1157–1167.
111. Russell, R. J. M. and G. L. Taylor. 1995. Engineering thermostability—lessons from thermophilic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**:370–374.
112. Salim-Hanna, M., A. M. Edwards, and E. Silva. 1987. Obtention of a photo-induced adduct between a vitamin and an essential amino acid: binding of riboflavin to tryptophan. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **57**:155–159.
113. Scheraga, H. A. 1963. Intramolecular bonds in proteins II. Noncovalent bonds. In *The Proteins*, 2nd edn., Vol. 1 (Neurath, H., Ed.), Academic Press, New York, pp. 478–594.
114. Sengupta, T. and S. Damodaran. 2001. Lateral phase separation in adsorbed binary protein films at the air–water interface. *J. Agric. Food Chem.* **49**:3087–3091.
115. Shewry, P. R. and A. S. Tatham. 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J. Cereal Sci.* **25**:207–227.
116. Shimada, K. and S. Matsushita. 1980. Relationship between thermo-coagulation of proteins and amino acid compositions. *J. Agric. Food Chem.* **28**:413–417.
117. Shortle, D., W. E. Stites, and A. K. Meeker. 1990. Contributions of the large hydrophobic amino-acids to the stability of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **29**:8033–8041.
118. Singer, N. S., J. Latella, and Y. Shoji. 1990. Fat emulating protein products and processes. U.S. Patent No. 4,961,953.
119. Suzuki, A., M. Watanabe, K. Iwamura, Y. Ikeuchi, and M. Saito. 1990. Effect of high pressure treatment on the ultrastructure and myofibrillar protein of beef skeletal muscle. *Agric. Biol. Chem.* **54**:3085–3091.
120. Swaisgood, H. E. and G. L. Catignani. 1991. Protein digestibility: in vitro methods of assessment. *Adv. Food Nutr. Res.* **35**:185–236.
121. Tanford, C. 1957. Theory of protein titration curves. I. General equations for impenetrable spheres. *J. Amer. Chem. Soc.* **79**:5333–5339.
122. Taylor, L. S., P. York, A. C. Williams, H. G. M. Edwards, V. Mehta, G. S. Jackson, I. G. Badcoe, and A. R. Clarke. 1995. Sucrose reduces the efficiency of protein denaturation by a chaotropic agent. *Biochim. Biophys. Acta* **1253**:39–46.
123. Utsumi, S., Y. Matsumura, and T. Mori. 1997. Structure–function relationship of soy proteins. In *Food Protein and Their Applications* (Damodaran, S. and A. Paraf, Eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 257–291.
124. Wang, C.-H. and S. Damodaran. 1990. Thermal destruction of cysteine and cystine residues of soy protein under conditions of gelation. *J. Food Sci.* **55**:1077–1080.
125. Wang, C.-H. and S. Damodaran. 1990. Thermal gelation of globular proteins: weight average molecular weight dependence of gel strength. *J. Agric. Food Chem.* **38**:1154–1164.
126. Watanabe, K., K. Chishiro, K. Kitamura, and Y. Suzuki. 1991. Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006. *J. Biol. Chem.* **266**:24287–24294.
127. Weber, G. 1992. *Protein Interactions*. Chapman and Hall, New York, pp. 235–270.
128. Weber, G. and H. G. Drickamer. 1983. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Quarterly Rev. Biophys.* **16**:89–112.
129. Wedzicha, B. L., I. Bellion, and S. J. Goddard. 1991. Inhibition of browning by sulfites. In *Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing* (Friedman, M., Ed.), Advan. Expt. Med. Biol., vol. 289, Plenum Press, New York, pp. 217–236.
130. Xu, S. and S. Damodaran. 1993. Comparative adsorption of native and denatured egg-white, human and T4 phage lysozymes at the air–water interface. *J. Coll. Interf. Sci.* **159**:124–133.
131. Yamashita, M., S. Arai, Y. Imaizumi, Y. Amano, and M. Fujimaki. 1979. A one-step process for incorporation of l-methionine into soy protein by treatment with papain. *J. Agric. Food Chem.* **27**:52–56.
132. Yip, K. S. P., T. J. Stillman, K. Britton, P. J. Artymium, P. J. Baker, S. E. Sedelnikova, P. C. Engel, A. Pasquo, R. Chiaraluce, V. Consalvi, R. Scandurra, and D. W. Rice. 1995. The structure of *Pyrococcus Amino Acids, Peptides, and Proteins furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure* **3**:1147–1158.
133. Yu, M.-A. and S. Damodaran. 1991. Kinetics of protein foam destabilization: evaluation of a method using bovine serum albumin. *J. Agric. Food Chem.* **39**:1555–1562.
134. Zhu, H. and S. Damodaran. 1994. Effects of calcium and magnesium ions on aggregation of whey protein isolate and its effect on foaming properties. *J. Agric. Food Chem.* **42**:856–862.
135. Zhu, H. and S. Damodaran. 1994. Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. *J. Agric. Food Chem.* **42**:846–855.
136. Zhu, H. and S. Damodaran. 1994. Proteose peptones and physical factors affect foaming properties of whey protein isolate. *J. Food Sci.* **59**:554–560.
137. Zuber, H. 1988. Temperature adaptation of lactate dehydrogenase. Structural, functional and genetic aspects. *Biophys. Chem.* **29**:171–179.