

AUTORES
AUTHORS

✉ **Caroline Dário CAPITANI**¹
Maria Teresa Bertoldo PACHECO^{2*}
Ana Maria PILOSO³
Oscar E. PÉREZ³

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo, SP;

²Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada,
Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL),
Av. Brasil, 2880, CEP 13070-178, Campinas, SP;

³Departamento de Industrias,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, (UBA),
Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina

*e-mail: mtb@ital.sp.gov.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi fracionar e precipitar as proteínas do soro de leite utilizando a técnica de complexação com carboximetilcelulose (CMC), frente as variações de pH do meio e a temperatura. Foram obtidos três coacervados por ajuste gradual do pH da mistura de soro de leite com CMC. No pH 3,0 foi possível obter uma fração contendo as proteínas totais (PT/CMC), no pH 4,0 da β -lactoglobulina (β -Lg/CMC) e no pH 3,2 a maior proporção de α -lactoalbumina (α -La/CMC). As condições foram otimizadas para escala de produção em planta piloto. O comportamento dinâmico dos complexos foi avaliado por sua dissociação e estabilidade térmica, em valores de pH variando de 2,0 a 6,0. A dissociação dos complexos foi verificada nos valores de pH 2,0; 5,0 e 6,0. Nestas condições observa-se maior porcentagem de proteínas e CMC dissociados e solúveis. Contudo para valores de pH 3,0 e 4,0, o coacervado permaneceu co-solúvel e não houve dissociação. Os resultados do DSC mostraram que tanto a associação de hidrocolóide à proteína como sua presença promove a elevação da estabilidade térmica das proteínas.

SUMMARY

This study aimed was to fractionate and precipitate milk whey proteins through polysaccharide interaction technique using carboxymethylcellulose (CMC). It was used the polymer concentration 0,3% (w/v) and different pH values to obtain selective precipitation of whey proteins. After pH gradual adjustment the precipitation of total proteins (PT/CMC) was achieved for pH 3; for pH 4 β -lactoglobulin (β -Lg/CMC) precipitation and for pH 3,2 the greatest proportion of α -lactoalbumin (α -La/CMC) precipitation. The conditions were optimized to obtain a pilot scale production. The dynamic behavior after complexes was evaluated by its dissociation and thermal stability at pH values varying from 2.0 to 6.0. The complexes dissociation was verified at the pH values 2.0, 5.0 and 6.0. At these conditions it can be observed a higher protein and CMC dissociation and solubility percentage. However, at 3.0 and 4.0 pH values the coacervate remained co-soluble and without dissociation. DSC measurements could indicate that the hydrocolloid association to protein was well as its presence promotes a protein thermal stability elevation.

PALAVRAS-CHAVE
KEY WORDS

Polissacarídeo, carboximetilcelulose, coacervação,
proteínas do soro de leite, estabilidade térmica.
Hydrocolloids, carboxymethylcellulose,
cocervation, whey milk proteins, thermal stability.

1. INTRODUÇÃO

As proteínas do soro de leite possuem elevado potencial de aplicação na indústria de alimentos em consequência de suas características físico-químicas, as quais resultam numa ampla diversidade de propriedades funcionais (CAYOT; LORIENT, 1997). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas visando a recuperação destas proteínas, sendo que o custo elevado e o baixo rendimento no processo de secagem, limitam seu processamento, principalmente quando se tratam de pequenos e médios produtores (FONSECA; BRADLEY Jr, 2001).

A interação de proteínas com hidrocolóides constitui uma alternativa tecnológica para a recuperação de proteínas do soro e obtenção de novos ingredientes funcionais. Adicionalmente, pode ser considerada uma tecnologia limpa, que não ocasiona acréscimo de agentes poluidores ao meio ambiente (LALI et al., 2000). A técnica baseia-se na interação eletrostática entre proteínas e polissacarídeos aniônicos, e ocorre em uma faixa de pH acima do valor da constante de ionização (pK) dos grupos aniônicos (grupos carboxílicos) dos polissacarídeos e abaixo do ponto isoelétrico (pI) das proteínas (TOSTOGUZOV, 1997). Esta condição de pH afeta o balanço de cargas e promove a interação entre as cargas opostas e formação de coacervados insolúveis, que podem ser facilmente retirados do meio aquoso.

Estes complexos insolúveis podem ser utilizados para processos de microencapsulação e na obtenção de diversos ingredientes alimentares (TOSTOGUZOV, 1998; WEINBRECK; KRUIF, 2003). Contudo, para a utilização destes complexos em alimentos industrializados, é necessário fazer um estudo detalhado do seu comportamento frente às variações de pH e temperatura de sistemas alimentares onde podem ser utilizados (TOLSTOGUZOV; 1991, 1994, 1997).

A técnica de coacervação com carboximetilcelulose (CMC) pode ser utilizada para fracionamento das proteínas do soro de leite in natura. Através da variação do pH dos meios de mistura e concentração reduzida de CMC é possível realizar uma precipitação seletiva das proteínas do soro de leite. O estudo do comportamento dinâmico dos coacervados frente às variações extrínsecas do meio é de fundamental importância para sua aplicação como ingrediente funcional. O objetivo deste trabalho foi recuperar as proteínas do soro de leite de maneira seletiva, utilizando a técnica de coacervação complexa com o polissacarídeo carboximetilcelulose (CMC). Avaliou-se a influência do pH na dissociação do complexo e, utilizando a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC), avaliou-se a influência do hidrocolóide na estabilidade térmica das proteínas coacervadas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Matéria-prima

O soro de leite comercial "in natura" foi obtido numa indústria de queijos (tipo "minas frescal") situada na região de Espírito Santo do Pinhal, estado de São Paulo. O polissacarídeo foi a carboximetilcelulose sódica (CMC INDUSKOL FG-3000 /

Denver), com grau de substituição (GS) de 0,65-0,85, de alta viscosidade.

Metodologia

2.1 Obtenção dos complexos de proteínas com CMC

O polissacarídeo (CMC) foi solubilizado em água ligeiramente aquecida ($22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) a uma concentração de 0,3% (p/v). Em seguida foi adicionada ao soro líquido desnatado na mesma temperatura com o objetivo de obter três complexos diferentes. A mistura foi deixada em agitação por 15 minutos e centrifugada para separação (centrífuga de cesto GEDR-Heinel mod. 2250) a 2150 rpm. Os precipitados foram desidratados por liofilização. O ajuste dos valores de pH foi feito com soluções de HCl 1,0 N, sendo no pH 3,0 obtida a fração contendo as proteínas totais (PT/CMC), no pH 4,0 da -lactoglobulina (-Lg/CMC) e no pH 3,2 a maior proporção de -lactoalbumina (-La/CMC).

2.2 Composição Centesimal

A composição centesimal foi determinada de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (2000). O nitrogênio total foi multiplicado pelo fator 6,38 e o carboidrato determinado por diferença.

2.3 Comportamento dissociativo dos complexos

Para este estudo foram realizadas análises de proteínas e do polissacarídeo solúvel em valores de pH que variaram de 2,0 a 6,0. As amostras (0,5g) foram dispersas em água e o pH ajustado para os valores desejados com NaOH 0,1N e HCl 0,1N. Após agitação por 30 minutos com agitador magnético a dispersão foi centrifugada a 13.000 rpm. Dos sobrenadantes foram retiradas alíquotas para análises de carboidratos (Hodge e Hofreiter, 1962), e proteínas solúveis pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2000).

2.4 Eletroforeses

A fração protéica solúvel nos diferentes valores de pH foi determinada após a solubilização dos complexos liofilizados em 1 mL de tampão (tampão glicina 0,05M: pH 2,0; tampão acetato de sódio 0,05M: pH 3,0; 4,0 e 5,0 e tampão fosfato potássio monobásico 0,05M: pH 6,0). A partir dos sobrenadantes foram realizadas corridas em géis de poliacrilamida utilizando eletroforese nativa (NATIVE-PAGE), com 10% de concentração no gel de separação.

2.5 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para avaliar os parâmetros temperatura inicial de desnaturação (T_0), temperatura de pico (T_p) (máxima de desnaturação) e a entalpia (ΔH / calor necessário no processo de desnaturação das proteínas) foram preparadas soluções dos complexos -Lg/CMC, -La/CMC e PT/CMC numa concentração final de 25% de sólidos. Após o ajuste de pH entre 2,0 e 8,0, foram analisadas as variações destes

parâmetros, a fim de verificar a influência do pH na estabilidade térmica dos complexos. As corridas foram realizadas em cápsulas de alumínio de 160 L, contendo no mínimo 50 mg de solução, utilizando o calorímetro diferencial de varredura (Mettler-Toledo DSC 822). A análise dos termogramas foi realizada com o Software Stare. Como referência utilizou-se uma cápsula de alumínio vazia padrão. As soluções foram aquecidas a uma velocidade de 10°C/min, numa faixa de temperatura entre 5 a 100°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra a composição centesimal do soro de leite utilizado como matéria-prima e dos complexos liofilizados. Observou-se que a fração -Lg/CMC arrastou maior quantidade de lipídeos, aumentando cerca de dez vezes sua concentração em relação ao soro de leite desnatado. Comportamento similar foi observado para o complexo PT/CMC. Com relação ao teor de proteínas o rendimento mais elevado foi o da fração -Lg/CMC, provavelmente devido a -lactoglobulina ser a fração protéica mais abundante no soro e por apresentar quase 50% de sua estrutura na forma desorganizada, tornando-a sensível e reativa às variações de pH e a outras alterações do meio (MODLER, 2000). A amostra -La/CMC, resultou em menor teor de lipídeos e proteínas, apresentou maior conteúdo de carboidratos proveniente da CMC, sendo a proporção de 1:1,5 de Proteína:CMC.

3.1 Efeito da variação de pH na estabilidade dos complexos

O grau de estabilidade do complexo foi medido pela quantidade de CMC e proteínas livre em solução, pois, à medida que o complexo se dissocia libera estes componentes para o meio aquoso (GIRARD, TURGEON; PAQUIN, 2002).

Para todas as amostras a porcentagem mínima de proteínas e CMC solúveis ocorreram nos valores de pH iguais ou próximos ao de obtenção dos complexos (3,0 a 4,0), como pode ser observado na Figura 1. Nestas condições, a solubilidade da proteína foi de 18,3% para a -Lg/CMC (pH 4,0) e 23,01% para a -La/CMC (pH 3,0). O complexo PT/CMC em pH 3,0 e 4,0, apresentou a menor dissociação sendo o valor de proteínas solúveis inferior a 2%. Todavia, os resultados mostraram que em pH 2,0 e pH 6,0 a concentração de proteínas solúvel foi maior para todas as amostras, sendo

menos expressiva para a PT/CMC.

Com relação à análise de carboidrato, pode-se observar na Figura 2 que para a amostra -La/CMC a maior dissociação ocorreu em pH 2,0 (56,52% solúvel). A mínima concentração de CMC solúvel foi observada na faixa de pH 3,0 (45,11%), sendo que os valores permaneceram praticamente constantes com a elevação do pH, variando de 46 para 49,5%. Os resultados obtidos de proteína solúvel e da eletroforese levam a concluir que para a amostra em questão, provavelmente no valor de pH de obtenção do complexo (pH 3,0), existe uma parte da CMC que se encontra co-solúvel no meio e se precipita com a aplicação da força centrífuga sem, contudo, estar coacervado com a proteína.

Esses fatores justificam a menor quantidade de CMC e proteínas solúveis nas faixas de pH de obtenção dos complexos. Entretanto, como a coacervação ocorre através de interações do tipo eletrostática, essas ligações podem se dissociar com as mudanças das condições do meio, como a variação de pH (TOLSTOGUZOV, 1998; KRUIF; TURNIER, 2001). Conseqüentemente, os resultados obtidos comprovam a maior concentração de proteínas e carboidratos solúveis no sobrenadante ocorrem à medida que se afasta do pH de obtenção dos coacervados.

3.1 Estudo eletroforético das frações protéicas solúveis em diferentes valores de pH eletroforese NATIVA

A partir das eletroforeses foi possível observar para as

Tabela 2 Valores de To e Tp obtidos com as amostras de WPC e complexos fracionados (25% de concentração), e mistura de WPC:CMC (20% de concentração), em pH 6,5 ± 0,5.

Amostra	To (°C)	Tp (°C)
-La/CMC	81	88.3
-Lg/CMC	79	83
PT/CMC	80.7	85
WPC:CMC	77.7	77.8
WPC	70	75.3

To = temperatura inicial de desnaturação;
Tp = temperatura máxima de desnaturação.

Tabela 1 Composição centesimal do soro de leite desnatado e das amostras de proteínas complexadas com carboximetil celulose (CMC), em base seca.

Determinações	Soro de Leite desnatado	-Lg/CMC	-La/CMC	PT/CMC
Proteínas Totais (%)	13,05 ± 0,43	57,23 ± 0,32	35,96 ± 1,73	48,33 ± 0,53
Lipídeos Totais (%)	0,89 ± 0,05	9,42 ± 0,01	3,21 ± 0,002	7,37 ± 0,13
Resíduo Mineral (%)	9,31 ± 0,05	1,98 ± 0,96	4,14 ± 1,81	1,76 ± 0,04
Carboidratos (%)*	76,73	31,37	56,69	42,54

* Calculado por diferença: 100 - (Proteínas + Lipídeos + Cinzas) = % carboidratos.

frações obtidas que nos pH 3,0 e 4,0, embora tenham sido dosadas proteínas e carboidratos solúveis no meio, estes encontram-se unidos, pois não ocorre a entrada de proteína no gel. A presença de bandas protéicas podem ser visualizadas à medida que houve dissociação do coacervado nos pH 2,0, 5,0 e 6,0 (Figura 2).

Nos pH 3,0 e 4,0 as proteínas não se fizeram presentes, na eletroforese indicando que a reduzida quantidade de proteínas (23% solúvel) e polissacarídeos (29% solúvel) se apresentam na forma coacervada e devido a elevada massa molecular não penetram no gel. Por outro lado, nas faixas de pH 2,0; 5,0 e 6,0 o coacervado se dissocia parcialmente e a proteína é capaz de penetrar livremente no gel.

A Figura 2C apresenta o resultado da eletroforese nativa da amostra de PT/CMC. Pode-se verificar que este complexo também foi insolúvel nos pH 3,0 e 4,0, sendo que em pH 5,0, 6,0 ou 2,0 as bandas de proteínas de soro de leite puderam ser visualizadas. Nesta amostra, a quantidade de proteínas solúveis em pH 3,0 e 4,0 foi menor que 2%, indicando que aproximadamente 98% das proteínas continuam unidas e insolúveis.

Provavelmente, em valores de pH próximos a 6,0 os dois polímeros estão carregados negativamente, favorecendo a repulsão entre eles (BAEZA; PILOSOFF, 2002).

3.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A influência da dissociação do complexo na estabilidade térmica protéica pode ser observada a partir das análises de calorimetria diferencial de varredura.

Ao relacionar as temperaturas de início (T_o) e de pico (T_p) de desnaturação térmica na mesma faixa de pH de $6,5 \pm 0,5$, mostrados pelos resultados da Tabela 2, pode-se afirmar que provavelmente todos os complexos, inclusive a mistura de WPC:CMC, (sem interação) tiveram aumento da estabilidade térmica em relação ao WPC puro. Isto indica que

tanto a complexação com CMC como simplesmente a sua presença ocasiona um aumento na estabilidade da proteína em relação à temperatura.

Diversos trabalhos utilizando a técnica de DSC citam resultados de temperatura de início e temperatura de pico de desnaturação para as frações protéicas do soro de leite -Lg, -La e BSA (RUEGG et al.; 1977; BERNAL; JELEN, 1985; RELKIN, 1996; de WIT; KLARENBECK, 1984). Ao comparar estes dados com os resultados expressos na Tabela 2, é possível dizer que nas faixas de pH 6,0 a 7,5 os autores encontraram valores menores de T_p para todas as proteínas estudadas, incluindo o WPC. Portanto, os resultados obtidos indicam que as proteínas do soro quando complexadas com CMC resultaram em aumento da estabilidade térmica.

O aumento da estabilidade térmica de proteínas associadas a carboidratos também foi observado por BAEZA; PILOSOFF (2002), utilizando a técnica de DSC. Este trabalho relatou valores de T_p para a -Lg pura de 79,9 e 76,8 °C, para os valores de pH 6,0 e 7,0, respectivamente. No entanto, ao adicionar o hidrocolóide -Carragena, em pH 6,0, houve um aumento de 1,3°C na T_p . Outros autores ao complexarem por coacervação as proteínas mioglobina e BSA com alginato, pectina e CMC, também obtiveram resultados satisfatórios em relação ao aumento da estabilidade térmica (IMENSON; LEDWARD; MITCHELL, 1977).

Observa-se na Figura 3 que a temperatura de início de desnaturação térmica (T_o) é máxima na faixa de pH 3,5 - 4,0 para todos os complexos. Ao acidificar ou alcalinizar o meio, a T_o diminui sendo mais expressiva para a -La/CMC. Comportamento similar foi obtido para a temperatura máxima de desnaturação (T_p). Estes resultados se correlacionam com as análises de solubilidade e de eletroforese apresentadas anteriormente, podendo indicar que a dissociação dos biopolímeros provavelmente ocasiona um arranjo estrutural mais estável de modo a aumentar a resistência à desnaturação térmica e adicionalmente à presença de CMC.

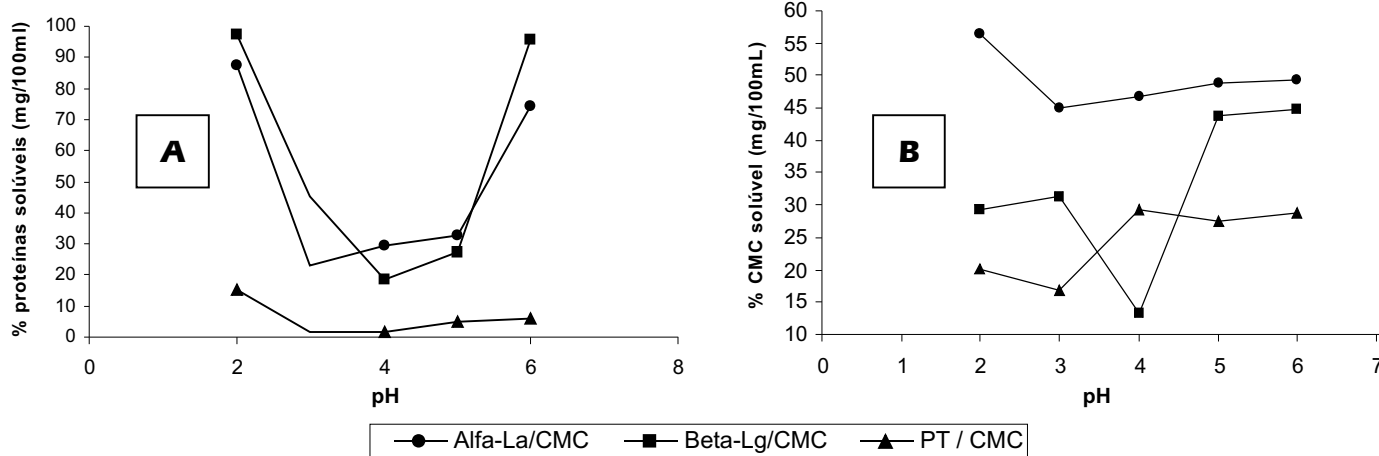


Figura 1 Sobrenadantes das amostras: -Lg/CMC, -La/CMC e PT/CMC, obtidos a partir de soluções a 1 mg/mL em pHs variando de 2,0 a 6,0. A) Concentração de proteínas solúvel; B) Concentração de CMC solúvel.

Estudos do comportamento térmico da -Lg isolada mostraram que esta proteína apresenta máxima estabilidade térmica em pH igual ou menor que seu pI que é próximo a 4,0 (RELKIN, 1994). Neste valor de pH o grupo tiol livre desta fração protéica é capaz de reagir e formar novas pontes dissulfeto. Tem sido constatado que o desdobraimento de proteínas globulares é acompanhado de um efeito térmico exotérmico, que diminui, desta forma, a T_p (de WIT; KLARENBECK, 1984).

Comparando as três amostras estudadas (Figura 3 A e B), as curvas mostram que a -La/CMC foi a que apresentou maiores valores de T_o e T_p dentro da faixa de pH estudado. Este fato pode estar associado à maior quantidade de CMC presente nesta amostra que provavelmente favorece a estabilidade da proteína (TOLSTOGUZOV, 1997).

Comparando os resultados de temperatura de desnaturação (T_p) das proteínas coacevadas e em diversas faixas de pH com os dados obtidos em outros trabalhos que utilizaram a técnica de DSC, é possível dizer que a presença do

polissacarídeo, tanto no complexo unido como no solúvel, promoveu um aumento da estabilidade térmica para todas as proteínas (BERNAL; JELEN, 1985; RELKIN, 1996; de WIT; KLARENBECK, 1984). Este fenômeno também foi observado por Ruegg et al. (1977), que obteve a máxima estabilidade térmica (T_p) da fração -La isolada em pH 6,7, sendo de 65,2 °C. Neste trabalho a fração -coacevada com o hidrocolóide CMC e em pH 6,5 obteve valores de T_p de 85,4 °C.

Apesar de ser esperado ocorrer uma tendência em diminuir a estabilidade térmica ao variar o pH do meio, principalmente do lado mais ácido (pH 2,0), as temperaturas de desnaturação das proteínas do soro continuam superiores às das proteínas originais, ou seja, 74, 63 e 83 °C, para a -La, -Lg e BSA, respectivamente (MODLER, 2000). Isto sugere que a presença da CMC estabilizou as proteínas frente ao processo de desnaturação mesmo em situações de dissociação do complexo.

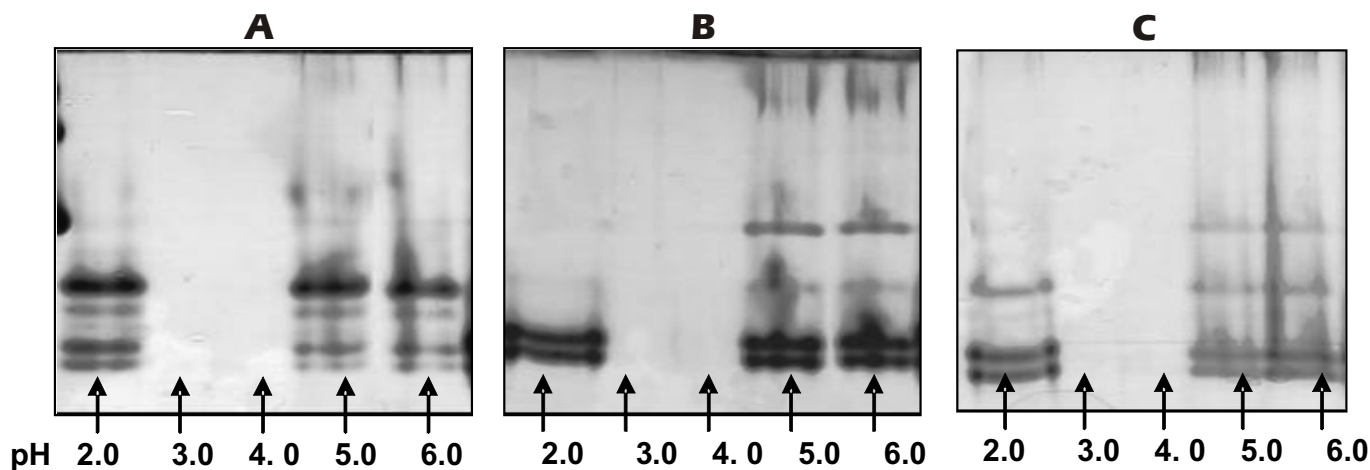


Figura 2 Eletroforese Page-Native (gel de poliacrilamida 10%) da amostra de -La/CMC (A), -Lg/CMC (B) e PT/CMC (C) em diferentes pHs.

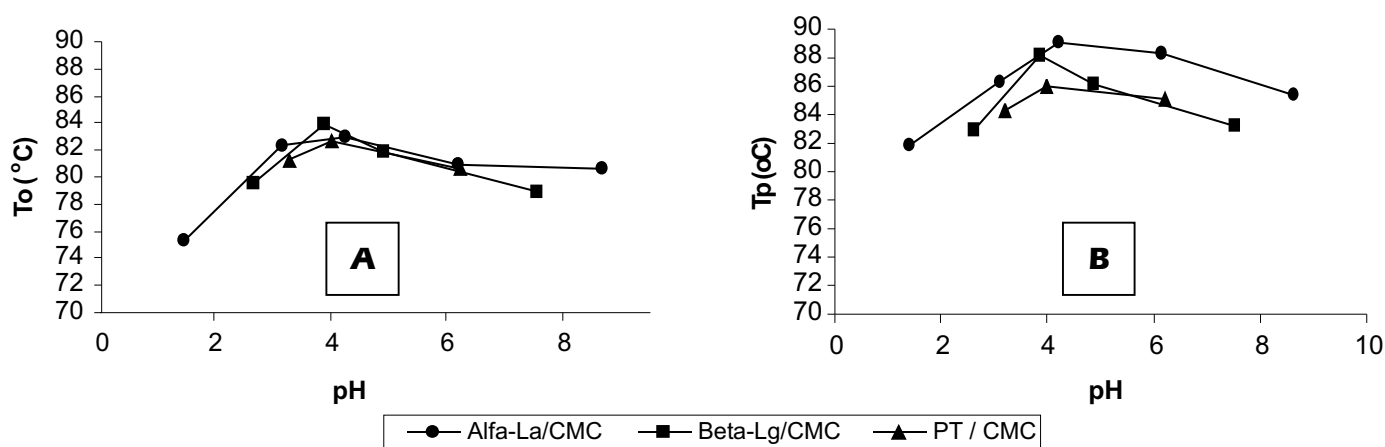


Figura 3 Estabilidade térmica das proteínas coacevadas: A) Temperatura inicial (T_o) de desnaturação; B) Temperatura máxima (T_p) de desnaturação das amostras (-Lg/CMC, -La/CMC e PT/CMC), a 25% de concentração, em diferentes valores de pH.

4. CONCLUSÕES

A técnica de coacervação utilizando diferentes condições de pH e concentração de CMC mostrou-se eficiente para a obtenção de dois complexos coacervados ricos em -Lg, -La e um terceiro composto das principais frações protéicas do soro lácteo (PT/CMC), como observado nas análises de eletroforese.

A variação de pH do meio promoveu um comportamento dissociativo dos complexos sendo este resultado mais acentuado nos valores de pH 2,0; 5,0 e 6,0. Dentre todos os complexos, a maior solubilidade de CMC foi obtida pela -La/CMC em pH 2,0, e a máxima solubilidade protéica pela -Lg/CMC nos pHs 2,0 e 6,0.

Através dos resultados das eletroforeses nativas em gel de poliácridamida, concluiu-se que os coacervados são insolúveis no pH original do processo de obtenção, e parcialmente dissociados e/ou solúveis de acordo com a variação de pH.

A presença de CMC, mesmo quando não unido à proteína promoveu uma proteção à desnaturação térmica protéica. Maiores valores de temperatura de desnaturação foram obtidos na faixa de pH de obtenção dos complexos, sendo os melhores resultados expressos pela -La/CMC em todos os pHs testados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. In: HORWITZ, W. (Ed.), *Official Methods of Analysis*. Washington, 2000. 16TH. ed.

BAEZA, R.I.; PILOSOFF, A.M.R.. Calorimetric studies of thermal denaturation of -Lactoglobulina in the presence of polysaccharides. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, Oxford, v. 35, p. 393-399, 2002.

BERNAL, V.; JELEN, P. Thermal stability of whey proteins a calorimetric study. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 68, p. 2847, 1985.

CAYOT, P.; LORIENT, D. Structure-function relationships of whey proteins. In: DAMONDARAM, S.; PARAF, A. *Food Proteins and their Applications*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. Cap. 8, p. 225-256.

de WIT, J.N.; KLARENBECK, G. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.67, p.2701-2710, 1984.

FONSECA, L.M., E BRADLEY JR, R. Precipitação de proteínas por meio de coacervação com carboidratos complexos. *Revista do Instituto "Cândido Tostes". Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora*, v.56, n.321, p.341-348, 2001 (a).

GIRARD, M.; TURGEON, S.L.; PAQUIN, P. Emulsifying properties of whey protein-carboxymethyl cellulose complexes.

Journal of Food Science, Chicago, v. 67, n.1, p. 113-119, 2002.

HANSEN, P.M.; HIDALGO, J.; GOULD, I.A. Reclamation of whey protein with carboxymethyl cellulose. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 54, n. 6, p. 830-834, 1971.

HIDALGO, J. E HANSEN, M.T. Selective precipitation of whey proteins with carboxymethyl cellulose. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 54, n. 9, p. 270-1274, 1971.

HODGE, J.E.; HOFREITER, B.T. Determination of reducing sugars end carbohydrates, Analyses - Phenol H2SO4 test. In: WISTLER, R.L.; WOLFMON, M.L. (Eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York: Academic Press Inc., 1962. Cap. 115, sessão 4, p. 377-469.

IMENSON, A.P., LEDWARD, D.A. e MITCHELL, J.R.. On the nature of interactions between some anionic polysaccharides and protein. *Journal of Science Food Agriculture*, Washington, v. 28, p. 669-672, 1977.

KRUIF, C.G.; TURNIER, R. Polysaccharide interactions. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 15, p. 555-563, 2001.

LALI A.; ARUNA, N.; JOHN, R.; THAKRAR, D. Reversible precipitation of proteins on carboxymethyl cellulose. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 777-785, 2000.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. Fundamentos básicos de análise térmica. In: LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. (Eds.), *Caracterização de Polímeros, Determinação de Peso molecular e Análise Térmica*. Rio de Janeiro: c_propes Serviços Editoriais, 2001. Cap. 8, p. 213-285.

MODLER, H.W. Milk Processing. In: NAKAI, S.; MODLER, H.W. (Eds.), *Food Proteins Processing Applications*, 2000. Canada: Wiley-VCH, Inc., Cap. 1, p.1-88.

MULVIHILL, D.M.; DONAVAN, M. Whey proteins and their thermal denaturation a review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, v. 11, p. 43-75, 1987.

RELKIN, P. Thermal unfolding of -lactoglobulin, -lactalbumin, and Bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v. 36, n. 6, p. 565601, 1996.

RUEGG, M.; MOOR, V.; BLANC, B. A calorimetric study of thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. *Journal of Dairy Research*, Barking, v.44, p.500-520, 1977.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESODOBRY-BANON, S. e HARDY, J. Structure and techno functional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Orlando, v. 38, p. 689-753, 1998.

TOSTOGUZOV, V.B. Functional properties of protein-polysaccharides mixtures, In: Mitchell, J.R. e Ledward, D.A. (Eds.), *Functional Properties of Food Macromolecules*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p.385-415,

TOLSTOGUZOV, V.B. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction (Review). *Food Hydrocolloids*, Oxford, v.4, p.429-468, 1991.

TOSTOGUZOV, V.B. Some physic-chemical aspects of

protein processing in foods. In: PHILIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A.; WEDLOCK, D.J. (Eds.), *Gums and Stabilizers for the Food Industry 7*. New York: Oxford University Press, 1994. p.115-124,.

TOLSTOGUZOV, V.B. Protein-polysaccharide interactions. In: DAMONDARAN, S.; PARAF, A. (Eds.), *Food Proteins and their Applications*. New York: Marcel Dekker, 1997.Inc. p.171-198.

TOLSTOGUZOV, V.B. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: HILL, S.E; LEDWARD, D.A.; MITCHELL, J.R. *Functional Properties of Food Macromolecules*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc., 1998. Cap. 6, p. 252-277.

WEINBRECK, F.; KRUIF, C.G. Complex coacervation of globular proteins and gum arabic. In: DICKINSON, E.; VLIET, T.V. *Food Colloids, Biopolymers and Materials*. Manchester: The Royal Society of Chemistry, 2003. p. 337-344.