



*UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS*



***SECAGEM DE HIDROLISADO PROTÉICO DE PELE DE CAÇÃO
POR ATOMIZAÇÃO: Otimização do processo de hidrólise e
avaliação das características físico-químicas do pó***

JULIO CÉSAR RODRÍGUEZ DÍAZ

Engenheiro de Alimentos

Profª. Dra. Míriam Dupas Hubinger

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Mestre
em Engenharia de Alimentos.

CAMPINAS, Fevereiro de 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP**

R618s Rodriguez Diaz, Julio César
Secagem de hidrolisado protéico de pele de cação: otimização do
processo de hidrólise e avaliação das características físico-químicas do
pó / Julio César Rodriguez Diaz. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Míriam Dupas Hubinger
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cação. 2. Hidrólise protéica. 3. Secagem por atomização. 4.
Propriedades físico-químicas. 5. Capacidade antioxidante. I.
Hubinger, Míriam Dupas. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Spray drying of shark protein hydrolysate: hydrolysis process
optimization and evaluation of the physicochemical powder
characteristics

Palavras-chave em inglês (Keywords): Shark, Protein hydrolysis, Spray drying
Physicochemical properties, Antioxidant capacity

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Míriam Dupas Hubinger
Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Renata Valeriano Tonon

Data da Defesa: 25/02/2011

Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em ____/____/____
por **JULIO CÉSAR RODRÍGUEZ DÍAZ** aprovado pela comissão julgadora em
____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Míriam Dupas Hubinger
(Orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Teresa Bertoldo
(Membro Titular – ITAL CAMPINAS)

Prof^ª. Dr^ª. Renata Valeriano Tonon
(Membro Titular – EMBRAPA RJ)

Prof^ª. Dr^ª. Flávia Maria Netto
(Membro Suplente – FEA/UNICAMP)

Prof^ª. Dr^ª. Kil Jin Park
(Membro Suplente – FEAGRI/UNICAMP)

Ser gente nova é sonhar acordado.

Ser gente nova é ser audaz e desafiar a realidade até conseguir os nossos sonhos, fazendo possível o que para outros é impossível.

Ser gente nova é ter o valor para mudar as circunstâncias.

Ser gente nova é lutar por alcançar nossos objetivos.

Ser gente nova significa maturidade e mudar dia a dia para ser melhor.

Ser gente nova é ser capaz de oferecer a própria vida para atingir nossos sonhos.

Ser gente nova significa dar o melhor de si mesmo, até doer se for necessário.

Ser gente nova é viver comprometido com o amor através do perdão, da compaixão e a ação, entregando o mais valioso de cada para atingir nossos ideais em fraternidade, justiça e liberdade.

Ser gente nova é ser herói em nossos tempos, protagonista da nossa história e paladino dos valores... é cumprir com uma missão superior, é ser a presença ignorada de Deus através da bondade, é nos entregarmos sem reserva alguma para construir um mundo melhor, gente nova é a resistência de nossos tempos, guerreiros da luz iluminando ao mundo

Ser gente nova é ousarmos a ser as mãos de Deus.

Ser Gente Nueva!

(Miguel Angel Cornejo)

Dedico este trabalho:

A Deus, por ser fonte de inspiração, força e ânimo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, María e Héctor, a quem devo tudo o que consegui e tudo o que sou.

Aos meus irmãos, Juan Carlos e Fiorella, minha avô María, minha cunhada Michelle e meus sobrinhos Héctor Ricardo e Alejandra Sofia, por fazerem parte da família que sempre sonhei e da qual sinto tanta falta.

A Noemí por ser uma pessoa tão especial na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Brasil, país que me acolheu com os braços abertos e me brindou a oportunidade de estudar e conhecer essa terra linda onde habitam tantas pessoas maravilhosas, cuja amizade levarei comigo para sempre.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA – UNICAMP) pela oportunidade e pela estrutura e recursos oferecidos para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Míriam Dupas Hubinger, pela orientação, pela confiança que sempre demonstrou no meu trabalho, mas sobretudo, pela grande amizade construída nesses anos. Graças à oportunidade que você me brindou, aceitando-me como orientado, eu fui capaz de melhorar muito como pessoa e profissional. Hoje, eu me sinto muito mais preparado para afrontar os desafios que virão no futuro. Por isso, minha gratidão, carinho e amizade perpetua.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro, vitais para a conclusão da presente dissertação.

A todos os membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões e correções que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Flávia Maria Netto, pela amizade, pela concessão de uso do HPLC de seu laboratório, pela boa vontade e disposição para ajudar na avaliação dos resultados e demais consultas, sempre que eu precisei.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA/FEA/UNICAMP) pela convivência, paciência, colaboração e dedicação durante as horas de aula e fora delas.

Às técnicas Joyce e dona Ana (LEP/FEA), Kelly (LRAC/FEQ), Fífa (LEB/FEA), Antonia e a Adriane (LME/IB) e Eliana e o Chico (LBN/FEA), pela amizade, ajuda e auxílio para a realização de análises e utilização de equipamentos.

À família Diaz Valdivia (Jorge, Verónica, Christiam, Ingrid, Javier, Pamela, Susana e Pablo), pela ajuda desinteressada e por me fazer sentir como em casa.

À Andrea e ao Helmut, meus maiores amigos em Campinas. A ti Andrea por ser amiga e confidente ontem, agora e sempre e a ti, Helmut, pela valiosa ajuda principalmente nos meus primeiros dias no Brasil, minha imensa gratidão para vocês.

Aos meus grandes amigos(as) Frank, Silvia, Angela, César, Maira, Noelia e bom Mirko também heheheh, companheiros fieis, na hora da comida e da bebida, mas também na hora dos problemas. Pelos inúmeros churrascos e almoços peruanos, pelas muitas risadas dadas, em fim, por todas as vivências inesquecíveis muito obrigado a vocês.

A todos os amigos e “agregados” da turminha mais legal que apareceu no DEA (Andrea, Elen, Glaucia Santos e Jonas, Glaucia Hirata, Natália, Diego e Juliana, Vanessa, Andréia, Vânia, Titi e Pedro, Ju Muzambinho, Vitor, Flávio, Mirko e Julice, Maitê, Carolina, Renato, Marisa e demais amigos) pelas incontáveis horas de estudo, comparação de resultados, consultas em tempos de desespero, troca de experiências, pelos muitos momentos de descontração, risadas e piadas, mas sobretudo pelo companheirismo e pela amizade que nunca terá fim.

A todos os membros do grupo de pesquisa: Bia, Lorena, Vânia, Marcela, Analia, Paula, Ana Silvia, Tina, Mariana e especialmente meu grande agradecimento para a Lou, Rê, Elen, Gau e Vanessinha, pelas eternas consultas e por serem quase minhas “co-orientadoras”, pela ajuda na difícil tarefa de tradução dos trabalhos, e por me ensinarem, com o exemplo, que sempre tem um jeito melhor de fazer as coisas e que é possível conseguir coisas grandes mantendo a simplicidade e a essência de cada pessoa. Nunca esquecerei nossas horas de cafezinho e bom papo. A todas vocês muitíssimo obrigado.

A todo o pessoal da sala 28, LEP, EXTRAE, LEB, LASEFI e da comunidade do DEA em geral, pela agradável convivência durante esses anos.

Finalmente quiero hacer un agradecimiento especial a mi familia: mis papás Héctor y María, mis hermanos Juan Carlos y Fiorella, mis sobrinos Héctor Ricardo y Alejandra Sofía, mi abuelita “la mamá Mía” y mi cuñada Michelle, por todo el amor y cariño, por sus oraciones, por la fuerza y por el apoyo incondicional y desinteresado en los momentos más felices y más tristes de mi vida...A ustedes, papá y mamá, gracias por inculcar en mí los valores que ahora hacen de mí la persona y profesional que soy...Para todos ustedes mi amor, cariño, respeto y gratitud.

(Tradução) Finalmente quero fazer um agradecimento especial a minha família: meus pais Héctor e María, meus irmãos Juan Carlos e Fiorella, meus sobrinhos Héctor Ricardo e Alejandra Sofía, minha avó “mamá Mía” e minha cunhada Michelle, pelo amor e carinho, orações, força e apoio incondicional e desinteressado nos momentos mais felizes e mais tristes da minha vida... A vocês, pai e mãe, obrigado por inculcarem em mim todos os valores que fazem de mim a pessoa e profissional que sou agora... A todos vocês meu amor, carinho, respeito e gratidão.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABELAS	xix
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT	xxiii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.2. OBJETIVOS	4
1.2.1. OBJETIVO GERAL.....	4
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	5
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. CAÇÃO.....	9
2.2. HIDRÓLISE PROTÉICA.....	11
2.2.1. ASPECTOS GERAIS.....	11
2.2.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA NA HIDRÓLISE PROTÉICA.....	14
2.2.3. CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS.....	17
2.2.3.1. VALOR NUTRICIONAL DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS	17
2.2.3.2. DISTRIBUIÇÃO E TAMANHO DE PEPTÍDEOS NOS HIDROLISADOS PROTÉICOS	18
2.2.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM HIDROLISADOS PROTÉICOS	21
2.3. SECAGEM POR SPRAY	26
2.3.1. ASPECTOS GERAIS.....	26
2.3.2. SECAGEM DE HIDROLISADOS PROTÉICOS POR ATOMIZAÇÃO	30
2.3.3. MALTODEXTRINA.....	32
2.3.4. CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS OBTIDAS POR SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO	33
2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO 3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PELE DE CAÇÃO.....	47
RESUMO.....	47
3.1. INTRODUÇÃO.....	48
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	50
3.2.1. MATERIAL	50
3.2.1.1. MATÉRIA-PRIMA	50

3.2.1.2.	ENZIMA.....	51
3.2.2.	MÉTODOS.....	51
3.2.2.1.	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	51
3.2.2.2.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	51
3.2.2.3.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	54
3.2.2.4.	GRAU DE HIDRÓLISE E RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA	55
3.2.2.5.	PARÂMETROS CINÉTICOS E CONSTANTES DE HIDRÓLISE	57
3.2.2.6.	OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA HIDRÓLISE PROTÉICA.....	58
3.2.2.7.	PERFIL DE AMINOÁCIDOS	58
3.2.2.8.	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	59
3.2.2.9.	SEPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SE-HPLC)	60
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.3.1.	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	61
3.3.2.	CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	62
3.3.3.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	66
3.3.3.1.	GRAU DE HIDRÓLISE E RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA	66
3.3.3.2.	PARÂMETROS CINÉTICOS E CONSTANTES DE HIDRÓLISE	73
3.3.3.3.	OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE PROTÉICA	83
3.3.4.	CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO PROTÉICO.....	84
3.3.4.1.	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	84
3.3.4.2.	PERFIL DE AMINOÁCIDOS	86
3.3.4.3.	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	89
3.3.4.4.	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	90
3.4.	CONCLUSÕES.....	92
3.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
CAPÍTULO 4. SECAGEM DE HIDROLISADO PROTÉICO DE PELE DE CAÇÃO POR ATOMIZAÇÃO		101
RESUMO.....		101
4.1.	INTRODUÇÃO.....	102
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS	104
4.2.1.	MATERIAL	104
4.2.1.1.	MATÉRIA-PRIMA	104
4.2.1.2.	ENZIMA.....	104
4.2.1.3.	AGENTE CARREADOR.....	104
4.2.1.4.	REAGENTES	104
4.2.2.	MÉTODOS.....	105
4.2.2.1.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	105
4.2.2.2.	SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO.....	106
4.2.2.3.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	107
4.2.2.4.	UMIDADE	108
4.2.2.5.	ATIVIDADE DE ÁGUA	108
4.2.2.6.	DENSIDADE APARENTE.....	108

4.2.2.7.	HIGROSCOPICIDADE	108
4.2.2.8.	DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA	109
4.2.2.9.	MICROESTRUTURA DA PARTÍCULA.....	109
4.2.2.10.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PARA A REDUÇÃO DO ÍON FÉRRICO (Método FRAP)	110
4.2.2.11.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE POR CAPTURA DO RADICAL CATIONICO ABTS ^{+O} (Método TEAC)	111
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112
4.3.1.	UMIDADE E ATIVIDADE DE ÁGUA	113
4.3.2.	DENSIDADE APARENTE E HIGROSCOPICIDADE	116
4.3.3.	DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA E MICROESTRUTURA	121
4.3.4.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	125
4.4.	CONCLUSÕES.....	135
4.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
CAPÍTULO 5.	CONCLUSÕES GERAIS	141
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS		143
APÊNDICE A		145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1. Mecanismo de reação do radical $ABTS^{0-}$ em contato com o antioxidante para a determinação da atividade antioxidante pelo método TEAC. (adaptado de HUANG, et al. (2005)).	25
Figura 2.2 Mecanismo de redução do íon férrico para a determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (adaptado de HUANG, et al. (2005))	26
Figura 2.3. Estágios para a formação das partículas durante o processo de secagem por atomização (Adaptado de SEYDEL et al., 2006)	30
Figura 3.1. Diagrama de fluxo para o processamento de hidrolisado protéico de pele de cação	53
Figura 3.2. Sistema montado para a hidrólise enzimática de pele de cação	54
Figura 3.3. Curvas experimentais para grau de hidrólise (GH) em função do tempo dos: (a) ensaios fatoriais, (b) axiais e (c) ponto central do processo de hidrólise enzimática de pele de cação. Os números entre parênteses indicam o número de ensaio do planejamento experimental.	64
Figura 3.4. Taxa de hidrólise em função do grau de hidrólise dos: (a) ensaios fatoriais, (b) axiais e (c) ponto central do processo de hidrólise enzimática de pele de cação. Os números entre parênteses indicam o número de ensaio do planejamento experimental.	65
Figura 3.5. Superfícies de resposta para a influência das variáveis de processo sobre o grau de hidrólise do hidrolisado protéico de pele de cação produzido nas condições: (a) pH = 6,8; (b) T = 61 °C; (c) E/S = 5,0 %	71
Figura 3.7. Superfícies de resposta para as constantes de reação: (a) hidrólise K_h ; (b) inativação K_d ,no processo de hidrólise enzimática de pele de cação	82
Figura 3.8. Grau de hidrólise e recuperação de proteína para os ensaios de validação do processo de hidrólise enzimática de pele de cação nas condições otimizadas.	84
Figura 3.9. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de pele de cação e hidrolisado protéico produzido em diferentes tempos de reação comparados com o padrão de peso molecular	89
Figura 3.10. Perfis cromatográficos obtidos por SE-HPLC para os hidrolisados protéicos de pele de cação produzidos em diferentes tempos de hidrólise. (A) 1h; (B) 2h; (C) 3h; (D) 4h.	91

Figura 4.1. Mini spray dryer usado para a produção de hidrolisado protéico de pele de cação em pó.	106
Figura 4.2. Superfície de resposta para a umidade do hidrolisado protéico de pele de cação obtido por spray drying.	115
Figura 4.3. Superfícies de resposta para: (a) densidade aparente (ρ_{ap}) e (b) higroscopicidade (H) do hidrolisado protéico de pele de cação em pó.	118
Figura 4.4. Mudanças visuais causadas pela adsorção de água ao longo do tempo no hidrolisado de pele de cação seco, na maltodextrina e nos pós obtidos a partir do hidrolisado protéico com 5, 12,5 e 20% de maltodextrina. (temperatura ambiente, UR $\approx$ 75,29%). MD10 = maltodextrina pura.	120
Figura 4.5. (a) Distribuição de tamanho de partícula para os ensaios axiais do planejamento, onde os números entre parênteses indicam o número de ensaio. Microestrutura do hidrolisado em pó seco a 170°C (b) com 5% de maltodextrina (c) com 20% de maltodextrina, aumentos de 1000 e 3000x	123
Figura 4. 6. Superfícies de resposta para a capacidade antioxidante: (a) método FRAP e (b) método TEAC, do hidrolisado protéico de pele de cação em pó	133

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição centesimal de algumas espécies de cação comercializadas no Brasil e alguns resíduos.	10
Tabela 2. 2. Hidrolisados protéicos produzidos a partir de diferentes resíduos de pescado.	13
Tabela 3.1. Ensaios do planejamento experimental para o estudo da hidrólise enzimática de pele de cação, variando o pH de reação, a relação enzima/substrato (E/S) e a temperatura (T)	55
Tabela 3. 2. Composição centesimal de pele de cação em porcentagem	61
Tabela 3.3. Resultados experimentais de grau de hidrólise (GH) e recuperação de proteína (RP) para o processo de hidrólise enzimática de pele de cação	66
Tabela 3.4. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para o grau de hidrólise e a recuperação de proteína	68
Tabela 3.5. Análise de variância (ANOVA) para os modelos ajustados do grau de hidrólise e da recuperação de proteína.	69
Tabela 3.6. Parâmetros cinéticos obtidos por regressão não linear dos dados obtidos da hidrólise enzimática de pele de cação.....	74
Tabela 3.7. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para os parâmetros cinéticos “a” e “b”	76
Tabela 3.8. Análise de variância (ANOVA) para os modelos dos parâmetros cinéticos “a” e “b”	77
Figura 3.6. Superfícies de resposta para a influência das variáveis de processo sobre os parâmetros cinéticos: (a) “a”; (b) “b”	79
Tabela 3.9. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para constantes de hidrólise K_h e de inativação K_d	80
Tabela 3.10. Análise de variância (ANOVA) para os modelos das constantes K_h e K_d	80
Tabela 3.11. Composição centesimal do hidrolisado protéico de pele de cação obtido em condições ótimas.	85
Tabela 3.12. Perfil de aminoácidos para a pele e o hidrolisado protéico de pele de cação obtido nas condições ótimas (g/100g de proteína).	87

Tabela 4.1. Planejamento experimental para o estudo da secagem por atomização do hidrolisado protéico de pele de cação.....	107
Tabela 4.2. Resultados experimentais da umidade e da atividade de água, densidade aparente, higroscopicidade e diâmetro volumétrico médio de partícula para o hidrolisado protéico de pele de cação em pó.....	112
Tabela 4.3. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para a umidade e a atividade de água do hidrolisado os protéicos de pele de cação em pó.	114
Tabela 4.4. Análise de variância (ANOVA) para o modelo ajustado da umidade.....	114
Tabela 4.5. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para a densidade aparente (ρ_{ap}) e a higroscopicidade (H) do hidrolisado protéico de pele de cação em pó.....	117
Tabela 4.6. Análise de variância (ANOVA) para os modelos da densidade aparente e da higroscopicidade do hidrolisado protéico de pele de cação em pó.....	117
Tabela 4.7. Efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para o diâmetro médio de partícula do hidrolisado protéico de pele de cação em pó.	121
Tabela 4.8. Capacidade antioxidante pela redução do íon férrico (FRAP), expresso em μmol equivalente em $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Trolox, ácido gálico e ácido ascórbico por grama de proteína e por grama de amostra, para o hidrolisado de pele de cação puro líquido, puro em pó, e formulado com diferentes concentrações de maltodextrina (DE = 10).	127
Tabela 4.9. Capacidade antioxidante pela captura de radical ABTS^{+0} (TEAC), expresso em μmol equivalente em Trolox, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ácido gálico e ácido ascórbico por grama de proteína e por grama de amostra, para o hidrolisado de pele de cação puro líquido, puro em pó, e formulado com diferentes concentrações de maltodextrina (DE = 10).	128
Tabela 4.10. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para as capacidades antioxidantes pelos métodos FRAP e TEAC, do hidrolisado protéico de pele de cação em pó.....	132
Tabela 4.11. Análise de variância para os modelos das capacidades antioxidantes, pelos métodos FRAP e TEAC, do hidrolisado protéico de pele de cação em pó.....	132

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolisado protéico de pele de cação em pó pelos processos de hidrólise enzimática e secagem por atomização. Na primeira etapa, foi estudado o processo de hidrólise utilizando a enzima comercial ProtamexTM, visando a otimização do processo para a recuperação de peptídeos de baixo peso molecular. A influência da temperatura, do pH e da relação Enzima/Substrato sobre o grau de hidrólise, recuperação de proteína e cinética enzimática foram avaliadas. As condições ótimas de processo foram fixadas em: 51 °C, 4,0% p/p de enzima e pH 7,1. Nessas condições, o hidrolisado obtido foi caracterizado em termos de composição química, composição de aminoácidos e distribuição de tamanho de peptídeo. O grau de hidrólise atingiu 19,3%, recuperou-se 90,3% do total da proteína presente na matéria-prima e o peso molecular foi inferior a 6,5 kDa. Na segunda etapa do projeto, foi avaliada a influência das variáveis do processo de secagem por atomização sobre as propriedades físico-químicas e antioxidantes do hidrolisado protéico de pele de cação em pó, usando maltodextrina (DE=10) como agente carreador. A temperatura do ar e a concentração de agente carreador foram variadas. As respostas analisadas foram a umidade final, a atividade de água, a densidade aparente, a higroscopicidade, o tamanho de partícula e a capacidade antioxidante, determinada pelos métodos de redução do íon férrico (*FRAP*) e captura do radical catiônico ABTS⁺ (*TEAC*). Os resultados mostraram que a adição de maltodextrina contribuiu significativamente para obtenção de partículas com menor umidade e higroscopicidade e maiores tamanhos de partícula e densidade aparente. Além disso, quanto maior foi a concentração de maltodextrina adicionada, maiores foram os valores de capacidade antioxidante, provavelmente devido à formação de compostos de Maillard durante a secagem.

Palavras chave: cação, hidrólise protéica, *spray drying*, propriedades físico-químicas, capacidade antioxidante.

ABSTRACT

The objective of the present work was to obtain a shark skin protein hydrolysate powder by enzymatic hydrolysis and spray drying. In the first part of this work was studied the enzymatic hydrolysis process by using the commercial enzyme ProtamexTM, aiming the process optimization for recovery of low molecular weight peptides. The influence of temperature, pH and Enzyme/Substrate ratio on the degree of hydrolysis, protein recovery and enzymatic kinetics was evaluated. Optimal conditions were established at: 51°C, 4.0% p/p of enzyme and pH of 7.1. At these conditions, protein hydrolysate was characterized with respect to chemical composition, amino acid composition and peptide size distribution. Degree of hydrolysis achieved 19.3%, 90.3% of total protein was recovered and peptide size was lower than 6,5 kDa. In the second part of the project, the influence of spray drying variables process on physicochemical and antioxidant properties of shark skin protein hydrolysate powders, using maltodextrin (DE=10) as a carrier agent, was evaluated. Air temperature and maltodextrin concentration were varied. The responses analyzed were the final moisture content, water activity, bulk density, hygroscopicity, particle size distribution and antioxidant capacity determined by ferric reduction antioxidant power (FRAP) and ABTS⁺⁰ radical cation capture (TEAC) assays. Results showed that maltodextrin addition significantly contributed to obtaining particles with less moisture content, lower hygroscopicity and higher particle size and bulk density. Besides, antioxidant capacity was increased as increasing of maltodextrin concentration, probably due to the formation of Maillard compounds during drying process.

Keywords: shark, protein hydrolysis, *spray drying*, physicochemical properties, antioxidant activity.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1.INTRODUÇÃO GERAL

A cada ano, o setor dedicado ao processamento de pescado produz maiores quantidades de subprodutos e resíduos, devido à crescente demanda mundial do produto, principalmente nas formas fresca e congelada (54% da produção mundial). Esses resíduos possuem importantes quantidades de proteína e outras substâncias bioativas, que na maioria dos casos são pouco aproveitadas. Geralmente, esses resíduos são destinados à fabricação de farinha e óleo de peixe, ou simplesmente eliminados ao meio ambiente sem nenhum tipo de tratamento. Dessa forma, vários países no mundo têm implantado normas que proíbem o descarte desses resíduos sem tratamento prévio. Contudo, o processamento de descartes resulta caro para as empresas, principalmente quando os produtos finais desse tratamento possuem baixo valor, como é o caso da farinha de peixe cujo preço médio nos últimos anos foi de R\$1,75/kg de farinha (FAO, 2009).

No Brasil, a produção de pescado estimada em 2007, incluindo a pesca extrativa e a aquicultura, foi de 1,07 milhões de toneladas, cujo valor corresponde a mais de 3,6 milhões de reais, significando um crescimento na produção total na ordem de 2,0% em relação a 2006. Porém, o consumo *per capita* de pescado foi de 6,75 kg/habitante, praticamente a metade da média mundial, cujo valor foi de 13,6 kg/habitante no ano 2009 (FAO, 2009; IBAMA, 2007). A pesca extrativa foi a principal atividade pesqueira do país, contribuindo com 73% (783,2 mil toneladas) da produção total de peixe; no entanto, o setor que apresentou maior crescimento no ano 2007 foi a aquicultura continental (crescimento relativo de 10,2% em relação a 2006).

A quantidade de cação, capturado anualmente em costas brasileiras, ultrapassa as 11,9 mil toneladas. A carne de cação é comercializada principalmente nas formas fresca e congelada, sendo os principais produtores os estados de Pará, Santa Catarina, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo, os quais concentram mais de 60% da produção nacional anual (IBAMA, 2007).

O resíduo industrial do cação integrado por pele, vísceras, cartilagem, cauda e cabeça, pode atingir mais de 40% do peso total do peixe. Em particular, tanto a pele quanto a cartilagem de cação possuem um elevado teor de proteína (composta principalmente por colágeno), sendo uma fonte natural de gelatina (KITTIHATTANABAWON et al., 2010). Assim, a preparação de hidrolisados protéicos a partir desse resíduo torna-se uma alternativa interessante para: a recuperação de peptídeos funcionais, a obtenção de um produto com maior valor agregado do que a farinha de peixe e o tratamento de resíduos industriais sem prejudicar a renda da empresa. Além disso, pelo fato da pele de cação possuir baixo teor de lipídeos, as operações de separação de impurezas e recuperação da proteína solúvel poderiam ser facilitadas.

A hidrólise protéica é uma técnica que consiste na clivagem química ou enzimática, de moléculas de proteína. O preparo de hidrolisados protéicos pode ser feito mediante o uso de ácidos e bases fortes, como é o caso da hidrólise química. No entanto, o uso de enzimas (endoproteases, exoproteases ou mistura das duas) permite manter um controle maior e mais eficiente do processo de hidrólise protéica (KRISTINSSON e RASCO, 2000). Dentre as vantagens da hidrólise protéica enzimática está a diminuição da viscosidade e o aumento da solubilidade da proteína, favorecendo a incorporação dos hidrolisados protéicos em outro tipo de sistemas ou preparações.

Os hidrolisados protéicos são uma excelente fonte de peptídeos de baixo peso molecular e possuem elevada digestibilidade e funcionalidade, quando comparados às proteínas *in natura* (ABDUL-HAMID et al., 2002). Tal funcionalidade é dependente tanto da composição de aminoácidos quanto do comprimento e estrutura das cadeias polipeptídicas (MAHMOUD, 1994).

Por outro lado, numerosos trabalhos revelaram potenciais aplicações dos hidrolisados protéicos para a prevenção e tratamento de doenças tais como hipertensão, hipercolesterolêmia, alergias produzidas por alimentos e câncer (LEE et al., 2010; NAKADE et al., 2009; SICHERER & SAMPSON 2009; CORDLE, 1994; SHEIH et al., 2010), sugerindo que estes hidrolisados podem ser utilizados como ingrediente na formulação de alimentos nutracêuticos e produtos farmacêuticos.

Contudo, os hidrolisados protéicos são altamente perecíveis. O alto teor de umidade e a elevada concentração de peptídeos presentes neles tornam estes produtos susceptíveis à deterioração microbiana (ADLER-NISSEN, 1985). Neste caso, a secagem por atomização é o método mais usado para a obtenção de pós a partir de fluidos e pode ser utilizado para reduzir o teor de água presente nos hidrolisados protéicos, prolongando a vida útil destes produtos.

A secagem por *spray drier* se fundamenta no aumento da área de contato entre o material a ser seco e o agente dessecante (geralmente ar quente). O material líquido é atomizado para a criação de gotículas que, em contato com o ar quente, evaporam rapidamente produzindo partículas na forma de pó, grânulos ou aglomerados (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005; ROSA et al., 2003). Hidrolisados protéicos em pó podem ser

incorporados em diferentes produtos para consumo humano (suplementos para atletas, dietas para pessoas com dificuldade de digestão), assim como em rações.

Porém, os hidrolisados protéicos desidratados por atomização são altamente higroscópicos devido a sua grande área superficial interna (produto da sua estrutura amorfa). Além disso, estes produtos possuem baixa estabilidade por causa da sua baixa temperatura de transição vítrea (T_g), a qual é responsável por alterações estruturais como aglomeração, adesividade, colapso e cristalização (ROOS e KAREL, 1991). Assim, a adição de agentes carreadores, em especial a maltodextrina, tem sido sugerida para melhorar a estabilidade de alguns hidrolisados protéicos, tais como carne de peito de frango e caseína, mediante o aumento da T_g e a redução da higroscopicidade (KUROSAWA, 2009; ROCHA et al., 2009).

Dessa forma, o estudo da hidrólise enzimática de pele de cação e da sua secagem por atomização representa uma alternativa interessante para a obtenção de um produto nutritivo e com alto valor agregado a partir destes resíduos e cuja aplicação pode ser facilmente estendida para outro tipo de resíduos de indústrias processadoras de pescado e carne.

1.2.OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar o processo de obtenção de hidrolisado protéico de pele de cação em pó, através da hidrólise enzimática e secagem por atomização.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- Avaliar a influência das variáveis de processo (temperatura, pH e relação Enzima/Substrato) sobre o grau de hidrólise, recuperação de proteína e cinética do processo de hidrólise enzimática de pele de cação usando a enzima Protamex™.
- Otimizar as condições de processo para a hidrólise enzimática de pele de cação visando obter o máximo valor de grau de hidrólise e recuperação de proteína mediante a metodologia de superfície de resposta e validar experimentalmente os resultados.
- Caracterizar o hidrolisado protéico obtido em condições ótimas quanto ao seu perfil de aminoácidos, tamanho de peptídeo e capacidade antioxidante.
- Avaliar a influência da temperatura e concentração de agente carreador sobre a umidade, a_w , densidade aparente, higroscopicidade, distribuição de tamanho de partícula, morfologia e capacidade antioxidante dos pós obtidos por atomização do hidrolisado protéico de pele de cação.

1.3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Visando um melhor entendimento dos resultados, o presente trabalho foi organizado em capítulos brevemente descritos a seguir:

No presente capítulo (Capítulo 1) é apresentada uma introdução geral do trabalho focando na justificativa, objetivo e estrutura do mesmo.

No capítulo 2 foi realizada uma revisão bibliográfica dos principais temas que serão tratados em capítulos posteriores, objetivando dar a base teórica para a melhor discussão dos resultados.

Posteriormente, no capítulo 3, são apresentados os resultados da primeira etapa de experimentos relacionados ao estudo da influência das variáveis de processo (temperatura, pH e relação Enzima/Substrato) sobre o grau de hidrólise, recuperação de proteína e cinética enzimática no processamento de hidrolisado protéico de pele de cação, assim como os resultados da caracterização da matéria-prima e do hidrolisado protéico resultante.

O capítulo 4 apresenta os resultados da segunda etapa de experimentos onde foi estudado o processo de secagem por atomização (*spray drying*) de hidrolisado protéico de pele de cação. Neste capítulo os pós, obtidos em diferentes condições de processo (temperatura e concentração de agente carreador), foram avaliados em relação a suas propriedades físicas e físico-químicas (umidade, atividade de água, densidade aparente, higroscopicidade, distribuição de tamanho de partícula, microestrutura) e à capacidade antioxidante.

Finalmente, no capítulo 5, são apresentadas as conclusões gerais do trabalho, algumas recomendações para trabalhos futuros e a produção bibliográfica derivada da presente pesquisa.

1.4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G.H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**, v. 78, p. 69-74, 2002.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985. 427p.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, P. **Food Powders Physical Properties, Processing, and Functionality**. New York: Kluwer Academic, 2005. 372p.

CORDLE, C.T. Control of food allergies using protein hydrolysates. **Food Technology**, v. 48, No 10, p. 72-76, 1994.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2008**. Rome : Electronic Publishing Policy and Support Branch Communication Division FAO, 2009. p. 3-84.

IBAMA. **Estatística da pesca 2007 Brasil grandes regiões e unidades da federação**. Brasília : Coordenação de Estatística e Informação Pesqueira, 2007. p. viii – 98.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F. Effect of extraction temperature on functional properties and antioxidative activities of gelatin from shark skin. **Food and Bioprocess Technology**, *In press*: DOI 10.1007/s11947-010-0427-0, 2010.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO B.A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 40, v. 1, p. 43-81, 2000.

KUROZAWA, L.E. **Estudos dos processos de hidrólise enzimática e secagem por atomização para obtenção de hidrolisado protéico de frango em pó**. Campinas, 2009. 148p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

LEE, S.; QIAN, Z.; KIM, S. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 118, p. 96-102, 2010.

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products, **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 89-113, 1994.

NAKADE, K.; HANEKO, H.; OKA, T.; AHMED, A.M. A cattle heart protein hydrolysate ameliorates hypercholesterolemia accompanied by suppression of the cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.73, p. 607-612, 2009.

ROCHA, G.; TRINDADE, M.; NETTO, F.; FAVARO-TRINDADE, C. Microcapsules of a casein hydrolysate: Production, characterization and application in protein bars. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 4, p. 407-413, 2009.

ROSA, E.D., TSUKADA, M., FREITAS, L.A.P. **Secagem por atomização na indústria alimentícia: Fundamentos e aplicações**. São Paulo: Labmaq do Brasil Ltda. 2003. p. 1-12.

ROOS, Y.; KAREL, M. Applying state diagrams to food processing and development. **Food Technology**, v.45, n.12, p.66-71. 1991.

SHEIH, I.; FANG, T.; WU, T.; LIN, P. Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1202-1207, 2010.

SICHERER, S.H.; SAMPSON, H.A. Food allergy: Recent advances in pathophysiology and treatment. **Annual Review of Medicine**, v. 60, p. 261-277, 2009.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.CAÇÃO

Cação é uma designação comum a todos os peixes elasmobrânquios, pleurotremados, da subordem dos esqualos, com fendas branquiais laterais e corpo piciforme, sendo chamados tubarões, particularmente as espécies de grande porte. São peixes caracterizados por possuir um esqueleto cartilaginoso sendo comumente encontrados em abundância nos mares de todo o mundo. Não possuem bexiga natatória, sendo obrigados a permanecerem em constante movimento para não afundarem (FERREIRA, 1986; SUZUKI, 1986).

Os cações azuis, chamados também de tubarões azuis, são classificados na ordem *Pleurotremata*, sub-ordem *Gallaoidea*, família *Carcharhinidae* e gênero *Prionace* (SUZUKI, 1986). Essa espécie possui corpo alongado (podem atingir até 383 cm de comprimento), focinho longo e pontudo, e geralmente habitam em águas superficiais de mares temperados e tropicais. Podem ser encontrados em abundância ao longo de toda a costa brasileira, tomando nomes como lombo-preto, mole-mole e focinhudo (AMORIN et al., 1986).

No Brasil a pesca de cações e tubarões é feita principalmente por barcos atuneiros usando o sistema de arraste ou espinhel. Em média são capturadas 11,9 mil toneladas de cação e tubarão por ano, sendo os principais estados produtores: Pará (3,97 mil t/ano), Santa Catarina (3,05 mil t/ano) e Rio Grande do Norte (1,24 mil t/ano). Essas produções somadas à produção da área costeira da região Sudeste do Brasil (Estados de Rio de

Janeiro, Espírito Santo e São Paulo) concentram mais de 60% da produção nacional (IBAMA, 2007). No estado de São Paulo, 498 toneladas de cação são capturadas anualmente, das quais o cação-azul (*Prionace glauca*) é a principal espécie capturada, representando quase 90% do total de pescas de cações do estado (ÁVILA-DA-SILVA et al., 2007).

A composição centesimal do cação varia de acordo com diversos fatores, entre os quais figuram a espécie, idade, peso, época de captura, entre outros. A composição de algumas espécies de cação comercializadas no Brasil, assim como alguns dos seus resíduos, encontra-se apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Composição centesimal de algumas espécies de cação comercializadas no Brasil e alguns resíduos.

	UMIDADE	PROTEÍNA	LIPÍDEOS	CINZAS	REFERÊNCIA
<u>Espécie</u>					
<i>Carcharhinus sp.</i>	80,5	17,9	0,6	0,9	HENSE, 1990
<i>Isurus oxyrhynchus</i>	76,6	N.I.	N.I.	1,3	HENSE, 1990
<i>Squatina sp.</i>	77,9	20,2	0,9	0,9	HENSE, 1990
<i>Prionace glauca</i>	85,3	13,3	0,3	1,1	HENSE, 1990
<i>Squalus acanthias</i>	74,6	18,63	5,7	1,1	DINIZ e MARTIN, 1998
<u>Resíduo</u>					
Cartilagem	66,8-70,3	14,0-15,0	0,2	66,8-70,3	KITTIPHATTANABAWON et al., 2010a
Fígado	31,4	8,2	54,8	0,32	PACHECO, 1991

Valores expressos em base úmida; N.I. Não Informado

Apesar de não ter sido encontrada nenhuma referência com respeito da composição centesimal da pele de cação, sabe-se que é uma boa fonte de proteína, constituída principalmente por colágeno. Isto pode ser confirmado por algumas pesquisas que mostram esse resíduo como uma fonte alternativa de colágeno para a obtenção de gelatina (rendimentos entre 19 e 25%), com características similares às obtidas de fontes bovinas

que adicionalmente, possuem propriedades funcionais e características antioxidantes, similares a gelatina bovina (KITTIHATTANABAWON et al., 2010b; KITTIHATTANABAWON et al., 2010c). Finalmente, a produção de hidrolisados protéicos a partir de colágeno extraído de peles de peixe tem sido estudada com o objetivo de obter produtos com capacidade antioxidante e antihipertensiva (YOU et al., 2010; KIM et al., 2001; ZHUANG et al., 2010).

2.2.HIDRÓLISE PROTÉICA

2.2.1. ASPECTOS GERAIS

Os hidrolisados protéicos podem ser definidos como proteínas que tiveram suas cadeias polipeptídicas rompidas, química ou enzimaticamente, e convertidas em fragmentos de peptídeos de tamanhos variáveis (SKANDERBY, 1994). Tanto os peptídeos como as proteínas são formados por uma seqüência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, nas quais o grupo carboxila de uma molécula se liga covalentemente com o grupo amina de outra molécula. O tamanho dos peptídeos é variável, iniciando a partir da união de dois aminoácidos. Embora a demarcação entre um peptídeo e uma proteína não esteja bem estabelecida, pode ser chamado de proteína aquela cadeia que contém pelo menos 50 aminoácidos, e o termo poli-peptídeo pode ser usado para nomear tanto a peptídeos quanto a proteínas (IRVINE, 1997).

Dentre os métodos mais usados para a produção dos hidrolisados protéicos destacam-se: o método químico (o mais antigo e mais difundido na indústria para a produção de fertilizantes e alimentos para animais), onde a hidrólise é feita pela adição de soluções ácidas ou básicas. O procedimento mais recente é o método onde são utilizadas

enzimas proteolíticas, endógenas ou exógenas, tendo um enorme campo de aplicação na geração de produtos de alto valor nutritivo e funcional (KRISTINSSON e RASCO, 2000a).

O uso de enzimas no processamento de peixe e de seus resíduos tem sido extensivamente estudado na última década. A principal vantagem é que o método promove um melhor controle sobre o processo de hidrólise (se comparado com os outros métodos), permitindo a obtenção de um hidrolisado de melhor qualidade e funcionalidade (SHAHIDI et al., 1995). De acordo com a literatura, tais resultados não foram atingidos pelos processos de hidrólise química ou por enzimas endógenas. Uma lista de estudos sobre a obtenção de hidrolisados a partir de diferentes resíduos de pescado é apresentada na Tabela 2.2.

Em geral, a hidrólise enzimática reduz a viscosidade e aumenta a solubilidade e digestibilidade da proteína, mantendo ou melhorando o valor nutricional da mesma (RAKSAKULTHAI e HAARD, 2003). Porém, o principal problema na hidrólise de proteínas é o desenvolvimento do sabor amargo, cuja intensidade depende tanto do grau de hidrólise (GH) quanto da composição aminoacídica da proteína a hidrolisar. O desenvolvimento do sabor amargo, durante a hidrólise protéica, está associado à liberação de frações hidrofóbicas de peptídeos. O amargor é máximo quando ambos os grupos α -carboxil e α -amino de um aminoácido hidrofóbico participam das ligações peptídicas dessas frações hidrofóbicas. Por outro lado, o amargor é mais fraco quando o aminoácido hidrofóbico está localizado na posição terminal da cadeia peptídica e mais fraco ainda, quando o aminoácido está na forma livre. Têm sido reportados como aminoácidos hidrofóbicos o triptofano, arginina, prolina, leucina, fenilalanina, isoleucina, valina e tirosina (RAKSAKULTHAI e HAARD, 2003; SYNOWIECKI et al., 1996).

Tabela 2. 2. Hidrolisados protéicos produzidos a partir de diferentes resíduos de pescado.

SUBSTRATO	NOME CIENTÍFICO	ENZIMA USADA	REFERÊNCIA
Cabeça e vísceras de sardinela lombuda	<i>Sardinella aurita</i>	Alcalase®	SOUISSI et al. (2007)
Carne e osso de corvina	<i>Pennahia argentata</i>	Alcalase® 2.4L; Neutrase®0.8L; Protamex™; Flavourzyme™;	CHOI et al. (2009)
Carne ¹ , Resíduos ² e Vísceras ³ de sardinha	<i>Sardina pilchardus</i>	Alcalase® ^{1,2,3} ; Protamex™ ³ ; Flavourzyme™ ³	QUAGLIA & ORBAN (1990) ¹ ; RAVALLEC-PLÉ et al. (2001) ² ; DUMAY, et al. (2006) ³
Carne ³ e resíduo industrial ⁴ de bacalhau do Atlântico	<i>Gadus morhua</i>	Validase FP60 ⁴ ; Validase TSP Conc II ⁴ ; Concentrado de proteasas alcalinas ⁴ ; Corolase LAP ⁴ ; Corolase N ⁴ ; Corolase PN-L ⁴ ; Corolase 7089 ⁴ ; Alcalase® ^{4,5} ; Neutrase® ^{4,5} ; Flavourzyme™ ⁴ ; Pepsina ⁵ ; Kojizyme™ ⁵	GILMARTIN & JERVIS (2002) ⁴ ; LIASET et al.(2000) ⁵
Carne ⁵ e cabeça ⁶ de salmão	<i>Salmo salar</i>	Alcalase® 2.4L ^{6,7} ; Flavourzyme™ ^{6,7} ; Corolase 7089 ⁶ ; Corolase PN-L ⁶ ; enzimas endógenas do ceco pilórico do salmão ⁶ ;	KRISTINSSON & RASCO (2000b) ⁶ ; GBOGOURI et al.(2004) ⁷
Pele de carpa de limo	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Alcalase® 2.4L	WASSWA et al.(2007)
Pele de pota	<i>Dosidicus eschrichtii</i> <i>Steenstrup</i>	Proteasa neutra; Properasa E; Papaína; Pepsina	LIN & LI (2006)
Resíduo de caranguejo	<i>Chionoecetes opilio</i>	Protamex™	BEAULIEU et al. (2009)
Resíduo industrial de atum	<i>Thunnus albacares</i>	Umamizima	GUERARD et al. (2002)
Resíduo industrial de indústrias pesqueiras		Flavourzyme™; Kojizyme™	NILSANG et al. (2005)
Resíduo industrial de raia longa	<i>Raja clavata</i>	Enzima endógena; Papaína; Pepsina	PASTORIZA et al. (2003)
Vísceras de bacalhau do Atlântico	<i>Gadus morhua L.</i>	Alcalase®2.4L ⁸ ; Neutrase®0.8L ⁸ ; Protamex™ ⁸ ; Papaína ⁸ ; Bromelina ⁸ ; Actinina ⁸ ; Supermix proteasas de plantas ⁸ ; Flavourzyme™ ⁹ ; Neutrase® ⁹	ASPMO et al. (2005) ⁸ ; ŠLIŽYTĖ et al. (2005) ⁹
Vísceras de choco-vulgar e sardinha	<i>Sepia officinalis</i> ; <i>Sardina pilchardus</i>	Protamex™; Alcalase®; Flavourzyme™	KECHAOU et al. (2009)

O processo de obtenção de hidrolisados com baixo grau de hidrólise ($\text{GH} \approx 5\%$) permite obter produtos menos amargos. Contudo, isto tem como desvantagem o baixo rendimento. Neste caso, a adição de algumas exopeptidases, pode contribuir na obtenção de hidrolisados menos amargos (ADLER NISSEN, 1985; RAKSAKULTHAI e HAARD, 2003).

A vantagem da incorporação dos hidrolisados protéicos de peixe na nutrição e alimentação humana é considerável, já que os mesmos são uma excelente fonte de peptídeos simples e aminoácidos essenciais, destacando-se a grande quantidade de lisina presente nestes produtos (YÁÑEZ et al., 1976).

2.2.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA NA HIDRÓLISE PROTÉICA

O conhecimento da cinética de reações biotecnológicas é um parâmetro importante para a projeção de bioreatores e a obtenção de produtos com uma determinada característica ou funcionalidade. Porém, o estudo da cinética de hidrólise enzimática de proteínas é complicado, devido à existência de diferentes tipos de ligações peptídicas e à diferente acessibilidade dessas ao ataque enzimático. Existe então dificuldade em estabelecer modelos cinéticos para a hidrólise de macromoléculas. Se o modelo for muito simples, a sua representação inadequada do mecanismo real limitará sua aplicação, enquanto que um modelo complicado dificulta sua análise estatística. Nesse caso, uma equação empírica simples da variação do grau de hidrólise pelo tempo (Eq. 2.1) pode ser aplicada para expressar as curvas de hidrólise (MÁRQUEZ e VÁZQUEZ, 1999; MÁRQUEZ e FERNÁNDEZ, 1993).

$$\frac{d(GH)}{dt} = a \times \exp[-b \times GH] \quad (2.1)$$

Onde:

GH= grau de hidrólise (%); t = tempo (min);

a = parâmetro empírico de cinética de hidrólise (min⁻¹)

b = parâmetro empírico de cinética de hidrólise (adimensional)

Essa equação de cinética considera uma reação de ordem zero, com uma simultânea inativação da enzima de segunda ordem. Então, se a reação for:



A taxa de reação será determinada pelo estágio irreversível:

$$r = S_0 \frac{d(GH)}{dt} = K_h |ES| \quad (2.3)$$

Onde:

E = enzima; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato;

P = produto; r = taxa de reação (g/L.min);

S₀ = concentração inicial de substrato (g/L);

|ES| = concentração do complexo enzima-substrato (AU/L); e

K_h = constante da cinética de hidrólise enzimática (g/AU.min).

Se a reação de inativação da enzima for:



Então a equação da cinética para esse processo é dada por:

$$-\frac{de}{dt} = K_d |E| |ES| \quad (2.5)$$

Onde:

Ei = enzima inativa; e = concentração de enzima (AU/L);

|E| = concentração de enzima (AU/L);

K_d = constante da cinética de inativação da enzima (g/AU.min).

A combinação dos processos de hidrólise enzimática e de inativação da enzima resulta na seguinte equação de taxa de hidrólise:

$$r = K_H e_0 \exp \left[-\frac{K_d}{K_H} \times GH \right] \quad (2.6)$$

Finalmente temos a equação 2.7 pela substituição da equação 2.3 na equação 2.6.

$$\frac{d(GH)}{dt} = \frac{K_h e_0}{S_0} \exp \left[-\frac{K_d}{K_h} \times GH \right] \quad (2.7)$$

Comparando as equações 2.1 e 2.7, pode-se obter a relação entre os parâmetros “a” e “b” com as constantes de hidrólise e inativação de enzima:

$$a = K_h \frac{e_0}{S_0} \quad (2.8)$$

$$b = \frac{K_d}{K_h} \quad (2.9)$$

Considerando que o GH é igual a zero na condição inicial (t = 0), a integração da equação 2.7 nos deixa uma expressão que relaciona o grau de hidrólise em função do tempo:

$$GH = \frac{1}{b} \ln(1 + abt) \quad (2.10)$$

2.2.3. CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS.

2.2.3.1. VALOR NUTRICIONAL DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS

O valor nutritivo de uma proteína depende principalmente da sua capacidade de satisfazer às necessidades de nitrogênio e aminoácidos essenciais. Entre os métodos mais usados para a determinação da qualidade nutricional de uma proteína *in vitro* estão a composição de aminoácidos, o Escore de Aminoácidos essenciais (EA) e a razão de eficiência protéica, cujo termo em inglês é *Protein Efficiency Ratio (PER)*.

O escore de aminoácidos essenciais (EA) é um parâmetro utilizado para comparar os teores de aminoácidos essenciais de uma amostra com um padrão de referência, onde na maioria dos casos é usado o padrão de referência da FAO/WHO (1991). O Escore de aminoácidos essenciais pode ser calculado através da equação:

$$EA = \frac{\text{Teor de aminoácido essencial na amostra}}{\text{Teor de aminoácido essencial no padrão de referência}} \quad (2.11)$$

A análise de *PER* consiste na medição do ganho de peso em ratos alimentados com uma dieta contendo 10% da proteína, testada durante um tempo determinado. No entanto, esse é um método caro e demorado (ŠLIŽYTĖ et al., 2005). Segundo Alsmeyer et al. (1974), quantidades relativas de vários aminoácidos, na composição da proteína dos alimentos podem ser usadas como estimadores confiáveis da sua qualidade. Não obstante, outros autores afirmam que os valores de *PER* não refletem a verdadeira qualidade da mesma por carecer de precisão e não guardar relação proporcional com outros valores

experimentais (ABDUL-HAMID et al., 2002). Mesmo assim, estimativas de *PER*, a partir de modelos empíricos com base na composição de aminoácidos, tem sido feitas por diversos autores com fins comparativos, para a caracterização de diferentes hidrolisados protéicos tais como: vísceras de atum, peito de frango, resíduos de bacalhau, tilápia, entre outros (OVISSIPOUR, et al., 2010; KUROSZAWA, et al., 2008; ŠLIŽYTĖ et al., 2005; ABDUL-HAMID, et al., 2002).

Os modelos mais usados para a predição da razão de eficiência protéica, a partir da composição de aminoácidos da proteína propostos por Lee et al. (1978) são apresentados a seguir:

$$\mathbf{PER_7=0,08084[X_7]-0,1094} \quad (2.14)$$

$$\mathbf{PER_{10}=0,06320[X_{10}]-0,1539} \quad (2.15)$$

Onde:

X_7 = Treonina + Valina + Metionina + Isoleucina + Leucina + Fenilalanina + Lisina;

X_{10} = X_7 + Histidina + Arginina + Tirosina.

2.2.3.2. DISTRIBUIÇÃO E TAMANHO DE PEPTÍDEOS NOS HIDROLISADOS PROTÉICOS

Os hidrolisados podem ser destinados a diferentes usos, dependendo do peso molecular dos peptídeos nele presentes. Se o objetivo for obter produtos com alto valor terapêutico e nutricional, então os hidrolisados protéicos terão que ser ricos em peptídeos de baixo peso molecular e com a menor quantidade de aminoácidos livres possível. Não obstante, tem sido reportado que peptídeos maiores (mais de 20 resíduos de aminoácidos) estão associados à melhora da funcionalidade das proteínas (GUERARD, 2006).

Mahmoud (1994) classificou os hidrolisados protéicos em duas categorias: proteínas altamente hidrolisadas, compostas majoritariamente por aminoácidos livres e peptídeos de cadeia curta (di e tri-peptídeos), e proteínas parcialmente hidrolisadas com moléculas maiores que 5 kDa. Segundo o autor, o primeiro grupo de proteínas ajuda a reduzir substancialmente algumas reações alergênicas, e por isso, tem sido usadas para a formulação de produtos hipoalergênicos para crianças. No caso das proteínas parcialmente hidrolisadas, o uso tem sido focado na preparação de dietas especializadas e suplementos alimentícios como fonte de nitrogênio. Segundo Vercruysse et al. (2005), os peptídeos bioativos podem afetar diversas funções fisiológicas do organismo, por apresentar capacidades antihipertensivas, imunomoduladoras, antitrombóticas, antioxidantes, anticancer e antimicrobiana. Esses peptídeos são inativos dentro da sequência da proteína de origem, mas podem ser liberados por proteólise mediante hidrólise enzimática ou fermentação com microorganismos.

Dentre os métodos mais utilizados para a determinação do tamanho de peptídeo em hidrolisados protéicos estão a eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE* e *TSDS-PAGE*) e a cromatografia de exclusão molecular (*SE-HPLC*)

A eletroforese é um método utilizado para conseguir maior percepção na composição, hidrólise ou qualquer outra modificação que possa acontecer nas proteínas. Entre as principais aplicações da eletroforese de proteínas estão a comparação de amostras, avaliação de pureza, purificação de pequenas quantidades de proteínas para análises posteriores e determinação das características físicas, tais como peso molecular, ponto isoelétrico e composição das subunidades. Na eletroforese *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e *TSDS-PAGE* (*Tricine-Sodium Dodecyl*

Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis), a amostra é aplicada a um gel de poliacrilamida e seus componentes são separados por aplicação de campo elétrico através do gel. A separação ocorre quando as proteínas são desnaturadas por aquecimento em uma solução tampão contendo *SDS* com o agente redutor 2-mercaptoetanol. Os polipeptídeos desnaturados adotam uma estrutura que possui uma relação uniforme carga:massa e que é proporcional ao seu peso molecular, assim, a separação é dependente da carga e do tamanho das proteínas na amostra. A diferença entre as duas técnicas de eletroforese está na resolução, sendo que a *TSDS-PAGE* permite a separação de peptídeos com tamanho inferior a 10 kDa, enquanto a outra técnica oferece melhor resolução para peptídeos maiores que 10kDa (WROLSTAD et al., 2005; SCHÄGGER e JAGOW, 1987; BIO-RAD, 2007).

Cromatografia de exclusão molecular (*Size Exclusion – High-Performance Liquid Chromatography SE-HPLC*) é um termo aplicado para a separação cromatográfica de moléculas com base no seu tamanho. Um pequeno volume de amostra é aplicado sobre uma coluna, que contém camadas de materiais porosos cujo tamanho é compatível com o tamanho de molécula que se deseja separar. A amostra diluída na fase móvel (eluente) é conduzida através da coluna e o tamanho de soluto presente na mesma determina o grau de penetração dentro dos poros. As moléculas, que são totalmente excluídas da coluna, emergem em primeiro lugar e os pesos moleculares podem ser determinados por cromatografia de moléculas maiores. As moléculas que entram livremente nos poros da coluna têm acesso a um espaço adicional, chamado volume interno de poro. Essas moléculas emergem sequencialmente segundo o seu tamanho, até que estejam suficientemente pequenas para ser distribuídas livremente dentro ou fora dos poros da

coluna. No caso de hidrolisados protéicos, as moléculas de peptídeos com peso molecular maior (parcialmente hidrolisadas) emergem mais rapidamente da coluna e pelo contrário, os peptídeos de baixo peso molecular (que dependendo do grau de hidrólise atingido, podem ser tri e di-peptídeos ou inclusive aminoácidos livres) emergem da coluna com tempos de retenção maiores (IRVINE, 1997).

Dentre as principais aplicações do *SE-HPLC*, com respeito à análise de peptídeos estão: purificação e análise de pureza, rápida estimativa de peso molecular e estudo das interações, por auto-associação ou associação com outras moléculas. Dentre estas aplicações, a estimativa de peso molecular é a mais difundida. O peso molecular de um peptídeo pode ser estimado a partir de uma curva que relaciona o tempo de retenção de uma mistura de padrões com peso molecular conhecido, com o logaritmo do peso molecular dos mesmos.

2.2.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM HIDROLISADOS PROTÉICOS

Durante a respiração e metabolismo, radicais livres e substâncias reativas com o oxigênio e/ou nitrogênio (*ROS/RNS: Reactive Oxygen/Nitrogen Species*), são gerados naturalmente como subprodutos de reações como, por exemplo: produção de energia, degradação de lipídeos e formação de catecolaminas devido ao estresse ou processos inflamatórios. Essas substâncias são eliminadas do corpo mediante um sistema de enzimas (superóxido dismutase, peroxidase, glutathione peroxidase) e algumas substâncias químicas (ácido ascórbico e algumas proteínas), mantendo dessa forma o equilíbrio. Quando a formação de pro-oxidantes excede a capacidade antioxidante do organismo, os danos oxidativos em biomoléculas chave para o funcionamento do organismo (DNA, enzimas,

proteínas e lipídeos) são acumulados, resultando na aparição de diferentes patologias degenerativas, tais como câncer, úlceras gástricas, mal de Alzheimer, arteriosclerose, diabetes, entre outras (DI BERNARDINI et al., 2011; SHEIH, et al., 2009; VENUGOPAL, 2009; PIHLANTO, 2006).

Em alimentos, as reações de oxidação são a causa de diversas alterações nos parâmetros de qualidade como textura, sabor, cor e valor nutricional, provocando a diminuição da vida útil e rejeição por parte do consumidor. Em alguns casos ocorre a formação de produtos potencialmente tóxicos para a saúde humana (LIN e LIANG, 2002). Entre os compostos responsáveis por essas alterações estão alguns ânions superóxido e radicais hidroxila (SHAHIDI e ZHONG, 2006)

Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a um substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz (RUFINO et al., 2006). Pode ter diferentes funções dependendo da sua aplicação. Os antioxidantes em alimentos são substâncias que podem retardar ou prevenir as reações de oxidação lipídica e estender a vida útil dos produtos. Por outro lado, o consumo de antioxidantes previne a formação de radicais livres e outro tipo de substâncias reativas com o oxigênio/nitrogênio (*ROS/RNS*), protegendo o organismo contra o efeito do estresse oxidativo, e permitindo a redução do risco de contrair doenças, tais como as anteriormente mencionadas. Dentre os principais tipos de antioxidantes estão os inibidores de reações em cadeia, sequestradores de metais, inibidores de enzimas oxidativas e cofatores de enzimas antioxidativas (HUANG, et al., 2005; SHAHIDI e ZHONG, 2006).

Na última década, diversas pesquisas têm estudado as propriedades antioxidantes dos hidrolisados protéicos, produzidos a partir de diferentes produtos marinhos, assim como dos seus resíduos industriais, como por exemplo: carne de cadoz, carne de carpa capim, carne de cavala, espinhas de bacalhau, resíduos protéicos de algas, pele de *bigeye snapper*, proteína solúvel de atum, pele e espinhas de escamudo-de-Alaska, resíduos de peixe-espada, isolados protéicos de bagre e peles de linguado e lula (YOU et al., 2009; REN et al., 2008; WU et al., 2003; ŠLIŽYTĖ et al., 2009; SHEIH et al., 2009; PHANTURAT et al., 2010; HSU et al., 2009; KIM et al., 2001; JE et al., 2005; BATISTA et al., 2010; THEODORE et al., 2008; GIMÉNEZ et al., 2009). De acordo com Di Bernardini et al. (2011), a atividade antioxidante de alguns peptídeos ou aminoácidos pode estar associada à afinidade particular dessas moléculas com lipídeos ou ácidos graxos, ou também à composição específica de aminoácidos.

Algumas pesquisas têm relacionado a capacidade antioxidante dos hidrolisados protéicos com o peso molecular de seus peptídeos. A capacidade antioxidante de proteínas de batata, estudada por Wang e Xiong (2005), foi relacionada aos peptídeos de baixo peso molecular (<6 kDa) e aos aminoácidos livres (resíduos de cisteína e triptofano). Je et al. (2005) fracionaram o hidrolisado protéico de pescado (*Alaska pollack*) de acordo com o peso molecular, e observaram maior capacidade antioxidante na fração de menor peso molecular (<1 kDa). Aminoácidos como tirosina, metionina, histidina, lisina, triptofano (CHEN et al., 1996; PEÑA-RAMOS et al., 2004), prolina (MENDIS et al., 2005; PEÑA-RAMOS et al., 2004), glicina, alanina (MENDIS et al., 2005), treonina (AMAROWICZ e SHAHIDI, 1997) e cisteína (SINHA et al., 2006) apresentam capacidade de retardar a oxidação lipídica.

Para a determinação da atividade antioxidante têm sido sugeridas inúmeras metodologias, as quais podem ser divididas em dois grandes grupos: os métodos *in vivo* e os métodos *in vitro*. Os ensaios *in vitro* são os métodos mais usados para a determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados protéicos, contudo, ensaios *in vivo* devem ser realizados para assegurar que os peptídeos identificados nos ensaios *in vitro* estejam disponíveis após a ingestão e cumpram com sua função em sistemas vivos (VERMEIRSEN et al., 2004).

Baseados nas reações químicas envolvidas nos ensaios de capacidade antioxidante, os ensaios *in vitro* podem ser divididos em duas categorias: ensaios baseados em reações de transferência de átomos de hidrogênio (*HAT-Hydrogen Atom Transfer*) e os ensaios baseados em reações de transferência de elétrons (*ET – Electron Transfer*). Os ensaios *HAT* envolvem um gerador sintético de radicais livres, uma substância oxidável conhecida e um antioxidante, sendo a quantificação feita a partir de curvas cinéticas das reações competitivas. O método *ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)* e o ensaio *TRAP (Total Trapping Antioxidant Parameter)* são os mais usados dentro dessa categoria. Já os ensaios *ET* medem a capacidade de um antioxidante, para a captura de radicais, em vez de medir a capacidade antioxidante preventiva de alguma amostra. Esses métodos consistem na reação de dois compostos, um antioxidante e um oxidante (com características conhecidas). Nesse caso, o oxidante subtrai um elétron do antioxidante produzindo mudanças na cor do oxidante, sendo essa mudança, proporcional à concentração de antioxidante presente na amostra. Para a determinação da atividade antioxidante, a variação da absorbância produzida pelas amostras é comparada à variação de absorbância produzida por soluções de concentração conhecida de uma substância antioxidante através de uma

curva padrão. Entre os métodos *ET* mais usados na literatura para a determinação da atividade antioxidante em hidrolisados protéicos encontram-se os ensaios: *TEAC* (*Trolox Equivalence Antioxidant Capacity*), *FRAP* (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e *DPPH* (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (HUANG et al., 2005).

O método *TEAC* foi reportado inicialmente por Miller et al. (1993), e modificado posteriormente por Re et al. (1999). O oxidante é formado pela oxidação de 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico) (ABTS^{2-}) com persulfato, originando o radical ABTS^{0+} de coloração verde azulada intensa. Após diluição e adição da substância antioxidante, ocorre uma descoloração do radical produzido pela redução provocada pelo antioxidante no mesmo (Figura 2. 1). A diferença entre a cor do radical antes da adição do antioxidante e a cor final após o tempo de reação é usada para o cálculo dos resultados, os quais são geralmente expressos em equivalentes de trolox (*TE*) ou de ácido gálico (*GAE*).

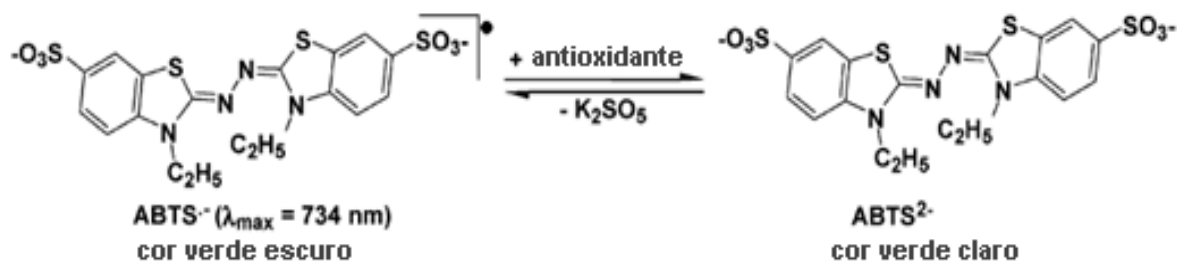


Figura 2. 1. Mecanismo de reação do radical ABTS^{0+} em contato com o antioxidante para a determinação da atividade antioxidante pelo método *TEAC*. (adaptado de HUANG, et al. (2005)).

O método *FRAP*, que mede a capacidade de redução de um íon férrico, foi relatado inicialmente por BENZIE e STRAIN (1996). Neste método a substância oxidante é um sal férrico ($\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$) de coloração laranja, produzido pela mistura de TPTZ (2,4,6-

tripyridyl-s-triazine) com cloreto férrico e tampão acetato. A diferença entre o método *TEAC* e o *FRAP* está no pH de reação, sendo utilizado um pH de 7,4 para o *TEAC* e condições mais ácidas para o *FRAP* (pH = 3,6). A redução do ferro produz a mudança na cor do oxidante de laranja claro para azul intenso, segundo o mecanismo de reação apresentado na Figura 2.2. A intensidade de cor é comparada com aquela produzida por soluções de concentração conhecida de sulfato ferroso.

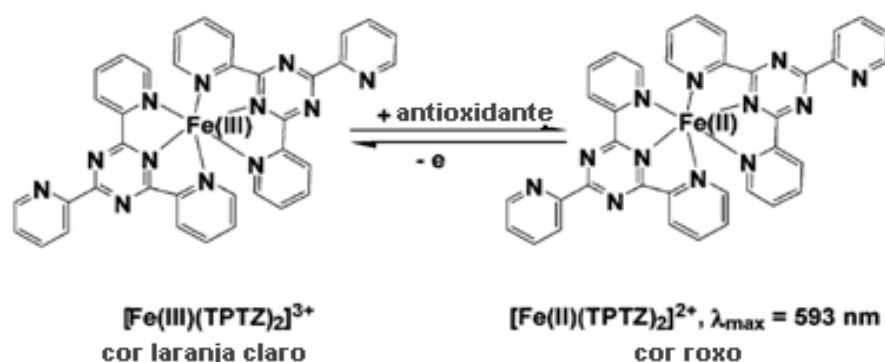


Figura 2.2 Mecanismo de redução do íon férrico para a determinação da atividade antioxidante pelo método *FRAP* (adaptado de HUANG, et al. (2005))

2.3. SECAGEM POR SPRAY

2.3.1. ASPECTOS GERAIS

A secagem é uma operação complexa que envolve transferências de calor e massa em diferentes taxas, assim como transformações físicas e/ou químicas, e que pode causar mudanças na qualidade e características do produto. As mudanças físicas que decorrem de um processo de secagem incluem: contração, *puffing*, cristalização, variação da temperatura de transição vítrea, entre outras. Em alguns casos, podem ocorrer reações químicas ou bioquímicas tanto desejáveis quanto indesejáveis, levando a mudanças na cor, textura, odor, ou outras propriedades do produto sólido (MUJUMDAR, 2008)

Spray drying, ou secagem por atomização, é uma técnica pela qual um produto líquido é atomizado para criar gotículas que são secas e transformadas em partículas individuais, na forma de pó, grânulos ou aglomerados, quando conduzidas através de um meio gasoso quente, na maioria dos casos ar. O material alimentado ao atomizador pode ser uma solução, uma suspensão ou uma pasta (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005; GHARSALLAOUI et al., 2007).

A primeira aplicação desta tecnologia foi relatada para a fabricação de leite em pó em 1850 e, atualmente, constitui um dos métodos mais importantes para a secagem de alimentos fluidos. As baixas temperaturas das partículas durante a secagem e os tempos curtos de processo permitem a aplicação dessa tecnologia para a secagem de produtos termo sensíveis (FILKOVÁ et al., 2007).

Entre as principais vantagens do uso desse método de secagem temos (XIN e MUJUMDAR, 2010):

- As propriedades e a qualidade do produto são mais eficientemente preservadas.
- Os alimentos sensíveis ao calor, como produtos biológicos e farmacêuticos, podem ser secos à pressão atmosférica e baixas temperaturas.
- Grandes produções em operação contínua, com equipamento relativamente simples, produção de partículas relativamente uniformes e esféricas com aproximadamente a mesma proporção de compostos voláteis do produto inicial.
- A eficiência é comparável a outros tipos de secadores diretos e o processo apresenta baixo custo.

O processo de secagem por atomização consiste das seguintes etapas: inicialmente, o fluido é bombeado até um atomizador, o qual pode ser dos tipos: rotatório, bico pressurizado, bico pneumático ou bico ultrasônico. O atomizador usualmente está localizado na parte superior do interior da câmara de secagem. O ar de secagem, tomado do ambiente, passa por um filtro e depois através de um equipamento aquecedor, que dependendo da capacidade pode ser: um trocador de calor a base de óleo ou vapor, ou com resistências elétricas. Na câmara de secagem, o ar aquecido entra em contato com as gotículas produzidas no atomizador, provocando uma evaporação instantânea da água contida na solução de alimentação, mantendo a temperatura das partículas baixa. Simultaneamente, acontece um resfriamento no ar de secagem. As partículas secas são conduzidas pelo ar de secagem até um ciclone onde é produzida a separação tanto de ar quanto de partículas secas. Finalmente o material seco é coletado na parte inferior do ciclone (FILKOVÁ et al., 2007).

A atomização é a operação mais importante no processo de *spray drying*. Seu principal objetivo é a geração de uma fase dispersa (na forma de gotículas), na qual os processos de transferência de massa e calor são intensificados devido ao incremento da área de contato. O tipo de atomizador não só determina a quantidade de energia requerida para formar a atomização mas também o tamanho e a distribuição de tamanho das gotículas e a sua trajetória e velocidade, as quais influenciam no tamanho de partícula e na área de contato e taxa de evaporação. O *design* da câmara de secagem é também influenciado pela escolha do tipo de atomizador. Outras variáveis importantes no processo de secagem por *spray drying* são: a temperatura do ar de entrada e saída, a velocidade e a umidade do ar de entrada e, finalmente, a vazão de alimentação e a concentração de sólidos do material a ser

seco. Todas essas variáveis possuem influência marcada nas características físico-químicas dos pós produzidos por *spray drying*, e podem ser controladas com o objetivo de aumentar os rendimentos e produzir um produto com características específicas de qualidade (FRITSCHING, 2006; RÉ, 1998; O'HAGAN et al., 2005; GOULA e ADAMOPOULOS, 2008).

Seydel et al. (2006) modelou matematicamente a formação de partículas dentro de um *spray dryer* baseado em um modelo físico que descreve a formação da partícula durante a secagem. No primeiro estágio de secagem, a gotícula de solução produzida no bico atomizador sofre um processo de encolhimento devido à evaporação do solvente (neste caso água), e a concentração de soluto na superfície da gotícula aumenta continuamente. Quando a concentração de soluto ultrapassa a concentração de saturação, então um processo de cristalização é iniciado. Se a concentração de soluto na superfície da gotícula for suficientemente alta, uma casca sólida é formada ao redor da gotícula líquida. Pelo perfil de concentração do soluto e os movimentos internos da gotícula, os solutos são concentrados na parede da partícula, com exceção de processos onde o encolhimento da gotícula é lento. Neste caso, a partícula será menor e tenderá a se formar no centro da gotícula. O segundo estágio da secagem começa quando a água presente na superfície da gotícula é evaporada completamente, originando uma estrutura sólida em forma de crosta. Nesse caso, a temperatura no interior da gotícula pode exceder a temperatura de bulbo úmido e a transferência de massa de vapor até a superfície da gotícula é restrita pela casca formada, gerando-se uma bolha de vapor dentro da gotícula. No caso do solvente ser transportado à superfície por forças capilares, então a pressão interna da gotícula cai e partículas ocas são geradas. Pelo contrário, se a casca formada for impermeável, as pressões

internas podem ultrapassar a resistência mecânica da casca, então são originadas partículas com diferentes morfologias, tais como estruturas quebradas ou encolhidas.

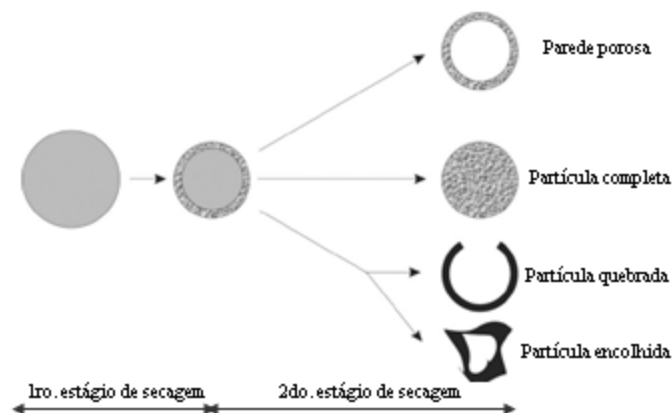


Figura 2.3. Estágios para a formação das partículas durante o processo de secagem por atomização (Adaptado de SEYDEL et al., 2006)

2.3.2. SECAGEM DE HIDROLISADOS PROTÉICOS POR ATOMIZAÇÃO

Os hidrolisados protéicos em geral são altamente perecíveis, devido principalmente ao seu alto teor de umidade e alto conteúdo de proteína (ADLER-NISSEN, 1985). Neste contexto, a secagem por atomização pode ser aplicada para a redução da umidade dos hidrolisados protéicos, visando a conservação dos mesmos. Contudo, os hidrolisados protéicos desidratados por *spray drying*, são altamente higroscópicos e possuem uma temperatura de transição vítrea (T_g) baixa devido ao alto teor de peptídeos de baixo peso molecular e à sua estrutura amorfa. Sendo a temperatura de transição vítrea dependente do peso molecular, diversos materiais de maior peso molecular têm sido adicionados aos hidrolisados protéicos para melhorar a sua estabilidade e reduzir a sua higroscopicidade (ROOS e KAREL, 1991).

Kurozawa (2009) reportou que a adição de agentes carreadores tais como goma arábica e maltodextrina (DE=10) contribuíram para a melhora da estabilidade do hidrolisado protéico de peito de frango, pela redução da higroscopicidade e pelo acréscimo na temperatura de transição vítrea. Em outro trabalho, Rocha et al. (2009) estudaram a eficiência do uso de maltodextrinas, com equivalentes de dextrose diferentes (DE= 10 e 20), na microencapsulação de hidrolisados protéicos de caseína usando *spray drying*. Os autores observaram que ambos os materiais de parede foram efetivos para a redução da higroscopicidade e do sabor amargo dos hidrolisados. Favaro-Trindade et al. (2010) avaliaram diferentes misturas de isolado protéico de soja e gelatina, com o objetivo de melhorar a estabilidade e reduzir o sabor amargo de um hidrolisado protéico comercial de caseína, usando *spray drying*. Todas as formulações testadas apresentaram uma higroscopicidade menor e uma temperatura de transição vítrea 25°C acima dos resultados para o hidrolisado de caseína puro. Além disso, a mistura de materiais de parede foi efetiva para a redução do sabor amargo do hidrolisado de caseína.

Embora a hidrólise protéica a partir de diferentes fontes marinhas e os seus resíduos industriais tenha sido estudada amplamente, poucos trabalhos na literatura reportam o uso de agentes carreadores e *spray drying* para a conservação ou melhora da estabilidade dos hidrolisados protéicos obtidos a partir destas fontes. Abdul-Hamid et al. (2002), avaliaram o impacto da temperatura de secagem na qualidade nutricional dos hidrolisados protéicos produzidos a partir de tilápia. Os autores reportaram que uma redução significativa no conteúdo de todos os aminoácidos foi produzida quando usadas altas temperaturas de secagem (180°C). Cabe ressaltar que nesse trabalho não foi usado nenhum tipo de material de parede. Liu et al. (2010) pesquisaram a otimização do processo de hidrólise enzimática

de caranguejo marinho, indicando que o método por *spray drying* pode ser aplicado para a preparação de temperos para macarrão instantâneo a base desse hidrolisado. No entanto, apenas uma condição de secagem foi avaliada: temperatura de ar de entrada de 215°C e adição de 10% de maltodextrina.

Os pós obtidos a partir de hidrolisados protéicos possuem potencial uso na elaboração de fórmulas balanceadas para atletas, dietas para pessoas com problemas de digestão ou absorção deficiente de proteínas, suplementos alimentares e alimentos nutracêuticos ou funcionais. Além disso, o uso pode ser estendido para a alimentação animal (ADLER NISSEN, 1985; KRISTINSSON e RASCO, 2000a).

2.3.3. MALTODEXTRINA

As maltodextrinas são polissacarídeos nutritivos não doces formados pela hidrólise parcial, ácida ou enzimática, do amido de milho e constituídas de grupos de D-glicose com ligações α (1→4). Estes agentes carreadores são comercializados em diferentes equivalentes de dextrose (DEs). Para ser chamada de maltodextrina o hidrolisado de amido deve possuir um DE inferior a 20; do contrário o mesmo hidrolisado será chamado de xarope de milho (SHAHIDI e HAN, 1993; MADENE et al., 2006).

Segundo Blanchard e Katz (2006), conforme o amido é progressivamente hidrolisado, grupos redutores terminais adicionais são expostos junto com o monossacarídeo reduzido dextrose (D-glicose), que é o produto final em teoria. Então o poder redutor do produto é uma medida do grau de clivagem do amido. Se esse “poder redutor” for calculado como dextrose e expresso como porcentagem da matéria seca, teremos a definição de equivalente de dextrose. O equivalente de dextrose possui uma

relação inversamente proporcional ao grau de polimerização (*Degree of Polymerization-DP*), que neste caso particular, expressaria o número de unidades α -D-glicose, unidas por enlaces (1 $\rightarrow$ 4).

Dentre as principais vantagens do uso de maltodextrina como agente carreador estão a alta solubilidade em água (até 35,5% dependendo do DE), baixo custo, baixa viscosidade em altas concentrações e a sua disponibilidade em diferentes pesos moleculares. Do ponto de vista das emulsões, as maltodextrinas não possuem capacidade emulsificante devido à ausência de proteína na sua composição, o que a torna inadequada para a retenção de compostos voláteis (GHARSALLAOUI et al., 2007; MADENE et al., 2006).

Ademais, as maltodextrinas possuem muitas propriedades funcionais importantes para a indústria de alimentos, dentre as quais se destacam: *bulking*, inibidor da cristalização, promotor de dispersões, controlador de congelamento e ligante. São amplamente usadas na indústria de alimentos como substituto de gorduras, agente *bulking* e na encapsulação de *flavors* e corantes para uso em padaria, confeitaria, e indústrias de bebidas, laticínios, sobremesas, carnes e molhos (XIE et al., 2005).

2.3.4. CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS OBTIDAS POR SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO

O conhecimento e entendimento das propriedades dos alimentos é essencial para otimizar processos, determinar funcionalidades e reduzir custos. A caracterização das partículas envolve a descrição das propriedades primárias de pós. Tais propriedades primárias incluem: a forma e a densidade das partículas, que analogamente às propriedades primárias de um fluído (viscosidade e densidade) e a concentração e estado da dispersão,

determinam algumas propriedades secundárias tais como: velocidade de sedimentação, taxa de reidratação, resistência para filtração, entre outras (ORTEGA-RIVAS, 2005).

As propriedades de um pó podem ser classificadas como propriedades físicas ou químicas. As propriedades físicas incluem a forma da partícula, densidade, porosidade, características superficiais, dureza, diâmetro e tamanho de partícula. Já as propriedades químicas dos pós estão relacionadas com a composição e a interação com outras substâncias, tais como solventes ou algum outro componente dentro da estrutura do pó (BARBOSA-CÁNOVAS e JULIANO, 2005).

A. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA

De todas as propriedades físicas mencionadas, o tamanho de partícula é a mais importante. A medida da distribuição de tamanho de partícula é um método comum em qualquer processo físico, mecânico ou químico devido ao fato de estar diretamente relacionada com o comportamento do material e/ou as propriedades físicas do produto. Propriedades tais como a densidade e compressibilidade, além das características de escoamento do material são altamente dependentes do tamanho de partícula (ORTEGA-RIVAS, 2005; GOULA e ADAMOPOULOS, 2005). Além disso, o tamanho de partícula tem influência sobre os processos de manufatura de outros alimentos, afetando algumas operações, como por exemplo: a reidratação, a mistura com outros componentes, a compactação e a segregação em uma mistura, assim como as características sensoriais do produto final (O'HAGAN et al., 2005; MUJUMDAR, 2008).

A distribuição do tamanho de partículas consiste em expressar a frequência da quantidade de partículas sólidas em cada faixa de tamanho, que normalmente é dada em

fração mássica ou volumétrica, em função dos diferentes diâmetros de partícula encontrados em uma amostra. A descrição da distribuição do tamanho das partículas é utilizada para caracterizar as propriedades de materiais particulados como pós, suspensões, emulsões e gotas, quanto à sua abrasividade, aglomeração, grau de dispersão, deposição, fluidez, granulação, permeabilidade, sedimentação e turbidez, entre outras características (SATO, 2005).

Pelo fato de as partículas não possuírem uma forma definida e uniforme, o conceito de diâmetro esférico equivalente tem sido usado para descrever a forma complexa de uma partícula através de um simples número, que relaciona as dimensões de uma partícula aos diâmetros de esferas de diferentes tamanhos (O'HAGAN et al., 2005; TONON, 2009). A forma mais usada para a determinação do tamanho de uma partícula consiste na determinação do diâmetro médio de Brouckere ($D[4,3]$) e do diâmetro médio de Sauter ($D[3,2]$). O primeiro, é o mais utilizado no caso de partículas de pó, e as caracteriza pelo diâmetro de uma esfera com volume equivalente. Já o segundo determina o diâmetro médio como sendo o diâmetro de uma esfera com mesma área superficial, sendo mais utilizado em estudos relacionados aos fenômenos interfaciais (RAMALHO e OLIVEIRA, 1999).

2.4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G.H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**, v. 78, p. 69-74, 2002.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985. 427p.

ALSMEYER, R.; CUNNINGHAM, A.; HAPPICH, M. Equation predicts PER from amino acids analysis. **Food Technology**, v. 37, p. 1263-1269, 2002.

AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 58, p.355-359, 1997.

AMORIN, A.; ARFELLI, C.; GADID, O. **Aspectos gerais sobre a biologia dos tubarões**. Brasília, SUDEPE, 1986. p. 16-18

ASPMO, S.I.; HORN, S.J.; EIJSINK, V.G.H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process biochemistry**, v. 40, p. 1957-1966, 2005.

ÁVILA-DA-SILVA, A.O.; CARNEIRO, M.H.; MENDONÇA, J.T.; SERVO, G.J.M.; BASTOS, G.C.C.; BATISTA, P.A. Produção pesqueira marinha do estado de São Paulo no ano 2005. **Série de Relatórios Técnicos, São Paulo**, n. 26, p. 1-44, 2007.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.; JULIANO, P. Physical and chemical properties of food powders. In: ONWULATA, C., **Encapsulated and Powdered Foods**. London: CRC Press, 2005, p. 39-71.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, P. **Food Powders Physical Properties, Processing, and Functionality**. New York: Kluwer Academic, 2005. 372p.

BATISTA, I.; RAMOS, C.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N.; NUNES, M. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 18-24, 2010.

BEAULIEU, L.; THIBODEAU, J.; BRYL, P.; CARBONNEAU, M.E. Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab, (*Chionoecetes opilio*) by-product fractions: A source of high-valued biomolecules. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3332-3342, 2009.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BIO-RAD. **Mini-PROTEAN® Tetra Cell Instruction Manual**. Bio-Rad Laboratories Inc., __, 26p.

BLANCHARD, P.; KATZ, F. Starch hydrolysates. In: STEPHEN, A.; PHILIPS, G.; WILLIAMS, P., **Food Polysaccharides and Their Applications**, 2. ed. London: CRC Press, 2006. p. 119-145.

CHEN, H.M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digest of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p.2619-2623, 1996.

CHOI, Y.J.; HUR, S.; CHOI, B.D.; KONNO, K.; PARK, J.W. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 74, n.1, p. C17-C24, 2009.

DI BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A.N.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1296-1307, 2011.

DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein. **Food Science and Technology International**, v. 4, p. 91-98.

DUMAY, J.; DONNAR-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGÉ, J.P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2327-2332, 2006.

FAO/WHO. **Energy and Protein Requirements**. Report of joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, n. 724, 1991.

FAVARO-TRINDADE, C.; SANTANA, A.; MONTERREY-QUINTERO, E.; TRINDADE, M.; NETTO, F. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 336-340, 2010.

FERREIRA, A. **Novo Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa**, 2da ed., Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira, 1986, 1800p.

FILKOVÁ, I.; HUANG, L.; MUJUMDAR, A. Industrial spray drying systems. In: MUJUMDAR, A., **Handbook of Industrial Drying**. 3. ed. London: CRC Press, 2007. p. 1667-1716.

FRITSCHING, U. Spray systems. In: CROWE, C. **Multiphase Flow Handbook**. London: CRC Press, 2006. p. 8-1 – 8-100.

GBOGOURI, G.A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. C615-C622, 2004.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GILMARTIN, L.; JERVIS, L. Production of cod (*Gadus morhua*) muscle hydrolysates. Influence of combinations of commercial enzyme preparations on hydrolysate peptide size range. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5417-5423, 2002.

GIMÉNEZ, B.; ALEMÁN, A.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. **Food Chemistry**, v. 114, p. 976-983, 2009.

GOULA, A.; ADAMOPOULOS, G. Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. Powder properties. **Drying Technology**, v. 26, p. 726-737, 2008.

GOULA, A.; ADAMOPOULOS, G. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 35-42, 2005.

GUERARD, F. Enzymatic methods for marine by-products recovery. In: SHAHIDI, F. **Maximizing the value of marine by-products**. London: CRC Press, 2006. p. 107-143

GUERARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 489-498, 2002.

HENSE, H. **Avaliação dos parâmetros termofísicos e cinética de congelamento de cação**. Campinas, 1990. 167p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

HSU, K.; LU, G.; JAO, C. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*). **Food Research International**, v. 42, p. 647-652, 2009.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IBAMA. **Estatística da pesca 2007 Brasil grandes regiões e unidades da federação**. Brasília : Coordenação de Estatística e Informação Pesqueira, 2007. p. viii – 98.

IRVINE, G.B. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review, **Analytica Chimica Acta**, v. 352, p. 387-397, 1997.

JE, J.; PARK, P.; KIM, S. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) from protein hydrolysate. **Food Research International**, v. 38, p. 45-50, 2005.

KECHAOU, E.S.; DUMAY, J.; DONNAR-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J.P.; BERGÉ J.P.; AMAR, R.B. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardine pichardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 158-164, 2009.

KIM, S.; KIM, Y.; BYUN, H.; NAM, K.; JOO, D.; SHAHIDI, F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska Pollack skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1984-1989, 2001.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 792-800, 2010a.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F. Effect of extraction temperature on functional properties and antioxidative activities of gelatin from shark skin. **Food and Bioprocess Technology**, *In press*: DOI 10.1007/s11947-010-0427-0, 2010b.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F. Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo shark and blacktip shark as affected by extraction conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 164-171, 2010c.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO B.A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 40, v. 1, p. 43-81, 2000a.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 657-666, 2000b.

KUROZAWA, L.E. **Estudos dos processos de hidrólise enzimática e secagem por atomização para obtenção de hidrolisado protéico de frango em pó**. Campinas, 2009. 148p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KUROZAWA, L.E.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, p. C405-C412, 2008.

LEE, Y.B.; ELLIOT, J.G.; RICHANSRUD, D.A.; HAGBERG, E.C. Predicting protein efficiency ratio by the chemical determination of connective tissue content in meat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, n. 5, p. 1359-1362, 1978.

LIASET, B.; LIED, E.; ESPE, M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 581-589, 2000.

LIN C.; LIANG, J. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 530-533, 2002.

LIN, L.; LI, B. Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii Steenstrup*) skin gelatin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2290-2295, 2006.

LIU, G.; CAO, M.; YU, H.; HU, Y.; ZHANG, L.; SU, W. Optimisation of enzymatic hydrolysis of the by-products of marine crab processing using mixed enzymes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1198-1204, 2010.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, A.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1-21, 2006.

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 89-113, 1994.

MARQUEZ, M.C.; FERNANDEZ, V. Enzymatic hydrolysis of vegetable proteins: Mechanism and kinetics. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 481-490, 1993.

MÁRQUEZ, M.C.; VÁSQUEZ, M.A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 111-117, 1999.

MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S.K. Antioxidant properties of a radicalscavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.581-587, 2005.

MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidants status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MUJUMDAR, A. Drying: Principles and practice. In: ALBRIGHT, F. **Albright's Chemical Engineering Handbook**. London: CRC Press, 2008. p. 1667-1716.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 571-578, 2005.

O'HAGAN, P.; HASAPIDIS, K.; CODER, A.; HELSING, H.; POKRAJAC, G. Particle size analysis of food powders. In: ONWULATA, C. **Encapsulated and Powdered Foods**. London: CRC Press, 2005, p. 215-245.

ORTEGA-RIVAS, E. Handling and processing of food powders and particulates. In: ONWULATA, C. **Encapsulated and Powdered Foods**. London: CRC Press, 2005, p. 75-144.

OVISSIPOUR, M.; ABEDIAN, A.K.; MOTAMEDZADEGAN, A.; NAZARI, R.M. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacores*). **Food and Bioprocess Technology**, DOI 10.1007/s11947-010-0357-x.

PACHECO, M.T.B. **Obtenção e fracionamento do óleo do fígado de tubarão azul (*Prionace glauca*) e sua estabilização com antioxidantes**. Campinas, 1991. 123p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PASTORIZA, L.; SAMPEDRO, G.; CABO, M.; HERRERA, J.; BERNÁRDEZ, M. Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 83-88, 2003.

PEÑA-RAMOS, E.A.; XIONG, Y.L.; ARTEAGA, G.E. Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolyzed whey protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, p.1908-1918, 2004.

PHANTURAT, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; ROYTRAKUL, S. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 86-97, 2010.

PIHLANTO, A. Review: Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1306-1314, 2006.

QUAGLIA, G.; ORBAN, E. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1571-1573, 1990.

RAKSAKULTHAI, R.; HAARD N. F. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 4, p. 401-445, 2003.

RAMALHO, J.B.V.S.; OLIVEIRA, M.C.K. Metodologia para determinação da distribuição do diâmetro de gotas em emulsões de petróleo do tipo água-óleo por difração a laser. **Boletim Técnico Petrobrás**, v.42, p.72-76, 1999.

RAVALLEC-PLÉ, R.; CHARLOT, C.; PIRES, C.; BRAGA, V.; BATISTA, I.; VAN WORMHOUDT, A.; LE GAL, Y.; FOUCHEREAU-PERÓN, M. The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 1120-1125, 2001.

RÉ, M. Microencapsulation by spray Drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REN, J.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, J.; JIANG, Y.; CUI, C.; KAKUDA, Y.; XUE, S. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1624-1632, 2008.

ROCHA, G.; TRINDADE, M.; NETTO, F.; FAVARO-TRINDADE, C. Microcapsules of a casein hydrolysate: Production, characterization and application in protein bars. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 4, p. 407-413, 2009.

ROOS, Y.; KAREL, M. Applying state diagrams to food processing and development. **Food Technology**, v.45, n.12, p.66-71. 1991.

RUFINO, M.; ALVES, R., DE BRITO, E.; DE MORAIS, S.; SAMPAIO, C.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia científica: determinação de atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Comunicado Técnico on line, 125, ISSN 1679-6535, Fortaleza, 2006.

SATO, A. **Influência do tamanho de partículas no comportamento reológico da polpa de jabuticaba**. Campinas, 2005. 73p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SCHAGGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v.166, n.2, p.368-379, 1987.

SEYDEL, P.; BLÖMER, J.; BERTLING, J. Modeling particle formation at spray drying using population balances. **Drying Technology**, v. 24, n. 2, p. 137-146, 2006.

SHAHIDI, F.; HAN X.Q. Encapsulation of Food Ingredients. **Critical Review in Food Science and Nutrition**. v. 33, p. 501-547, 1993.

SHAHIDI, F.; HAN, X.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, n. 53, p. 285-293, 1995.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants from marine by-products. In: SHAHIDI, F. **Maximizing the value of marine by-products**. London: CRC Press, 2006. p. 397-412.

SHEIH, I.C.; WU, T.K.; FANG, T.J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3419-3425, 2009.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v.101, p.1484-1491, 2006.

SKANDERBY, M. Protein hydrolysates: their functionality and applications. **Food Technology**, v. 10, p. 141, 1994.

ŠLIŽYTĖ, R.; DAUKŠAS, E.; FALCH, E.; STORRØ, I.; RUSTAD, T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2021-2033, 2005.

ŠLIŽYTĖ, R.; MOZURAITYTĖ, R.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; FALCH, E.; FOUCHEREAU-PERON, M.; RUSTAD, T. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 668-677, 2009.

SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Biochemical and functional properties of *Sardinella (Sardinella aurita)* by-product hydrolysates. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 187-194, 2007.

SUZUKI, C. **Guia de Peixes do Litoral Brasileiro**. 2da ed., Rio de Janeiro: Edições Marítimas, 1986. p. 113

SYNOWIECKI, J.; JAGIELKA, R.; SHAHIDI, F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. **Food Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 435-439, 1996.

THEODORE, A.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7459-7466, 2008.

TONON, R. **Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto**. Campinas, 2009. 212p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

VENUGOPAL, V. Seafood proteins: nutritional value, bioactive peptides, marine and cold-adapted enzymes. In: VENUGOPAL, V. **Marine Products for Healthcare. Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds From the Ocean**. London: CRC Press, 2009. p. 103-142.

VERCRUYSSSE, L.; VAN CAMP, J.; SMAGGHE, G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8106-8115, 2005.

VERMEISSEN, V.; VAN CAMP, J.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, v. 92, p. 357-366, 2004.

WANG, L.; XIONG, Y., Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9186-9192, 2005.

WASSWA, J.; TANG, J.; GU, X.; YUAN, X. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1698-1704, 2007.

WROLSTAD, R.E.; ACREE T.E.; DECKER, E.A.; PENNER, M.H.; REID, D.S.; SCHWARTZ, S.J.; SHOEMAKER, C.F.; SMITH, D.M.; SPORNS, P. (ed.). Electrophoresis analysis. In:_____.**Handbook of Food Analytical Chemistry: Water, proteins, enzymes, lipids and carbohydrates**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2005. p. 157-165.

WU, H.; CHEN, H.; SHIAU, C. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, p. 949-957, 2003.

XIE, S.; LIU, Q.; CUI, S. Starch modification and applications. In: CUI, S. **Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties and Applications**. London: CRC Press, 2005.

XIN, H.; MUJUMDAR, A. Spray drying and its application in food processing. In: PASSOS, M.; RIBEIRO, C. **Innovation in Food Engineering New Techniques and Products**. London: CRC Press, 2010. p. 303-329.

YÁÑEZ, E.; BALLESTER, D.; MONCKEBERG F. Enzymatic fish protein hydrolyzate: Chemical composition, nutritive value and use as a supplement to cereal protein. **Journal of Food Science**, v. 41, p. 1289-1292, 1976.

YOU, L.; ZHAO, M.; CUI C.; ZHAO, H.; YANG, B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. **Innovative Food Sciece and Emerging Technologies**, v. 10, p. 235-240, 2009.

YOU, L.; REGENSTEIN, J.M.; LIU, R.H. Optimization of hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from fish gelatin using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. C582-C587, 2010.

ZHUANG, Y.; SUN, L.; LI, B. Production of the Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptide from hydrolysates of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) collagen. **Food and Bioprocess Technology**, *In press*: DOI 10.1007/s11947-010-0439-9, 2010.

CAPÍTULO 3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PELE DE CAÇÃO

RESUMO

Neste capítulo, avaliou-se a hidrólise enzimática de pele de cação usando a enzima ProtamexTM e visando a otimização do processo para a recuperação de peptídeos de baixo peso molecular. A influência da temperatura (45 – 65 °C), do pH (6,8 – 8,0) e da relação enzima/substrato (1 – 5%) sobre o grau de hidrólise, a recuperação da proteína e a cinética enzimática foram avaliadas de acordo com um delineamento composto central rotacional 2³ completo. A relação enzima/substrato foi a variável mais influente sobre o processo, dentre todas as variáveis estudadas. As condições ótimas de processo foram fixadas em: temperatura de 51 °C, relação Enzima/Substrato de 4,0% e pH de 7,1, condições nas quais o modelo foi validado experimentalmente. Nessas condições, o grau de hidrólise atingiu 19,3%, recuperando-se 90,3% do total da proteína presente na matéria-prima. O hidrolisado obtido foi caracterizado quanto a sua composição centesimal e de aminoácidos, assim como ao seu tamanho de peptídeo. O perfil de aminoácidos mostrou que o hidrolisado protéico de pele de cação é uma boa fonte de aminoácidos essenciais. Já o escore de aminoácidos indicou que o hidrolisado fornece a quantidade mínima diária de aminoácidos requerida por um adulto. No caso das crianças os aminoácidos limitantes foram a leucina e a fenilalanina. As análises de eletroforese e cromatografia de exclusão molecular indicaram que o peso molecular dos peptídeos presentes no hidrolisado ficou abaixo de 6,5 kDa, demonstrando a efetividade do processo para a recuperação de peptídeos de baixo peso molecular.

3.1.INTRODUÇÃO

O aproveitamento dos resíduos das indústrias processadoras de pescado, para a recuperação de compostos bioativos, tem sido amplamente estudado nos últimos anos, permitindo a elaboração de alternativas para o tratamento eficiente desses resíduos e a redução da sua emissão ao ambiente. Dessa forma, é possível obter produtos com maior valor agregado e maximizar os benefícios econômicos das empresas pesqueiras (JE et al., 2009; GUERARD et al., 2005).

Segundo o IBAMA (2007) e o Instituto de Pesca do Estado de São Paulo (ÁVILA-SILVA et al., 2007), o cação azul é a espécie de cação mais capturada e consumida em costas brasileiras. Porém, a quantidade de resíduos gerados durante o seu processamento é grande (mais de 30% do peso total), pois só é aproveitada a carne comercializada fresca ou congelada. Os resíduos industriais do cação, o qual inclui vísceras, pele e cartilagem, são geralmente destinados para a fabricação de farinha de peixe, um produto de baixo valor econômico e pouco atrativo para as empresas. Considerando que a pele possui alto conteúdo de proteína e baixo teor de lipídeos (o qual facilitaria a separação da fração de proteína solúvel do hidrolisado), a recuperação de peptídeos bioativos a partir dessa fonte via hidrólise enzimática, representa uma alternativa interessante do ponto de vista econômico e tecnológico.

Os peptídeos bioativos estão conformados por pequenas seqüências de aminoácidos, normalmente entre 2 e 20 unidades, que podem exercer diferentes funções biológicas ou efeitos fisiológicos no organismo, neste caso, como carreador de minerais, antihipertensivo, imuno-estimulante e antitrombótico (SMACCHI e GOBBETTI, 2000). O valor nutricional

e funcionalidade variam em função de diferentes fatores tais como: natureza da matéria-prima, quantidade e composição de aminoácidos, estrutura e comprimento das cadeias peptídicas, susceptibilidade à hidrólise durante a digestão e interação com outros componentes na dieta. Estes peptídeos podem ser recuperados a partir de resíduos de diversas fontes protéicas, animais ou vegetais, mediante processos de hidrólise enzimática (usando enzimas endógenas ou comerciais) ou através da fermentação com microorganismos (ZHANG et al., 2010; DI BERNARDINI et al., 2011; VENUGOPAL, 2009; VERCRUYSSSE et al., 2005; FRIEDMAN, 1996, MAHMOUD, 1994).

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm sido realizadas visando a obtenção de hidrolisados protéicos ricos em peptídeos de baixo peso molecular mediante o uso de diferentes enzimas e a partir de diversos tipos de resíduos, incluindo músculo escuro, peles, vísceras e espinhos de vários tipos de peixes, tais como: atum, sardinha, caranguejo, carpa capim, bacalhau e salmão (HSU, 2010; OVISSIPOUR et al., 2010; BOUGATEF et al., 2010; BEAULIEU et al., 2009; ŠLIŽYTE et al., 2005; ASPMO et al., 2005; LIASET et al., 2003).

Algumas outras pesquisas focaram o estudo nas potenciais aplicações dos hidrolisados protéicos na formulação de alimentos nutracêuticos e/ou produtos farmacêuticos para a prevenção e tratamento de algumas doenças, tais como: hipertensão, hipercolesterolemia, alergias e câncer (LEE et al., 2010; NAKADE et al., 2009; SICHERER E SAMPSON, 2009; CORDLE, 1994; SHEIH et al., 2010).

Dentre as principais variáveis que influenciam o processo de hidrólise enzimática estão o tipo e concentração da enzima, a temperatura e o pH de reação e a natureza do

substrato, o que torna o estudo das variáveis de processo importante (ADLER-NISSEN, 1985). Além disso, a descrição da cinética de reação enzimática permite estabelecer parâmetros que são determinantes para o escalonamento do processo, a projeção de equipamentos e a otimização do processo (MÁRQUEZ e FERNÁNDEZ, 1993).

Portanto, o objetivo do presente capítulo foi avaliar a influência das variáveis de processo (pH, temperatura de reação e relação enzima/substrato) sobre o grau de hidrólise, recuperação de proteína e parâmetros cinéticos de um modelo descrito para hidrólise de proteínas, no processo de hidrólise enzimática de pele de cação usando a enzima ProtamexTM, bem como descrever a cinética de reação enzimática do processo. Assim também, otimizar as condições de processo, mediante a metodologia de superfície de resposta, e validar experimentalmente o modelo matemático encontrado para a predição do grau de hidrólise. Finalmente, caracterizar o hidrolisado, obtido nas condições ótimas de processo, quanto à sua composição centesimal, perfil de aminoácidos e tamanho de peptídeo.

3.2.MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. MATERIAL

3.2.1.1. MATÉRIA-PRIMA

Para a realização desse trabalho, foram utilizados retalhos de pele de cação congelados (resíduo da indústria de preparo de filés de cação) fornecidos pela empresa BOM PEIXE S.A. (Pirassununga, Brasil).

3.2.1.2. ENZIMA

No processo de hidrólise enzimática da pele de cação foi utilizada a ProtamexTM, uma mistura comercial de serina e metaloendopeptidases do tipo alcalina, de origem bacteriana (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens*). Sua atividade enzimática declarada é de 1,5 UA/g na temperatura ótima entre 50 e 55 °C e pH ótimo entre 6,0 e 7,5, segundo o fabricante (NOVOZYMES, Bagsvaerd, Dinamarca).

3.2.2. MÉTODOS

3.2.2.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição centesimal tanto da matéria-prima quanto do hidrolisado protéico foi obtida através das análises de umidade, cinzas e proteínas, segundo metodologia da AOAC (1997) e lipídios segundo a metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959). As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.2.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados de acordo com o procedimento apresentado na Figura 3.1. Foi utilizado um reator de 250 mL com sistema de agitação e aquecimento (Figura 3.2) utilizando o método pH-estático proposto por Adler-Nissen (1985).

A pele foi cortada em cubos, de 1 a 1,5 cm aproximadamente, manualmente usando uma faca. Devido à dureza da matéria-prima (pela presença de dentículos dérmicos) e com o objetivo de facilitar o corte, a pele de cação foi previamente congelada.. Uma vez cortada, a pele de cação foi misturada com água destilada (proporção pele:água de 1:4 p/p).

A mistura foi aquecida até 90 °C durante 5 minutos com o objetivo de aplicar um tratamento térmico, visando à inativação de enzimas endógenas e o amaciamento dos tecidos da pele. Dessa forma, foi facilitada a etapa posterior de homogeneização. A mistura foi homogeneizada utilizando um triturador manual e transferida para um béquer encamisado com agitação magnética. A temperatura foi regulada com ajuda de um banho termostatzado e o pH foi ajustado mediante a adição de uma solução de NaOH 1N. As condições de cada ensaio foram ajustadas de acordo com o planejamento experimental descrito posteriormente. Em seguida, a enzima foi adicionada e a reação monitorada durante 4 horas com ajuda de um titulador automático (METTLER TOLEDO, modelo T50, Schwerzenbach, Suíça), utilizando-se NaOH 1N como titulante, de modo a manter o pH constante. A partir da quantidade de base consumida, foi calculado o grau de hidrólise ao longo do tempo e estes dados foram usados para os cálculos dos parâmetros cinéticos, conforme descrito mais adiante. Finalizado o tempo de reação, a enzima foi inativada por aquecimento da mistura a 90°C durante 10 minutos, sendo esta posteriormente resfriada até a temperatura ambiente. Finalmente o hidrolisado protéico foi centrifugado a 4000g por 15 minutos, utilizando uma centrífuga (BECKMAN COULTER, modelo Allegra 25R, Fullerton, California, Estados Unidos) com objetivo de separar a fração insolúvel. Foram pesadas as massas do sobrenadante e do precipitado para o cálculo da recuperação de proteína.

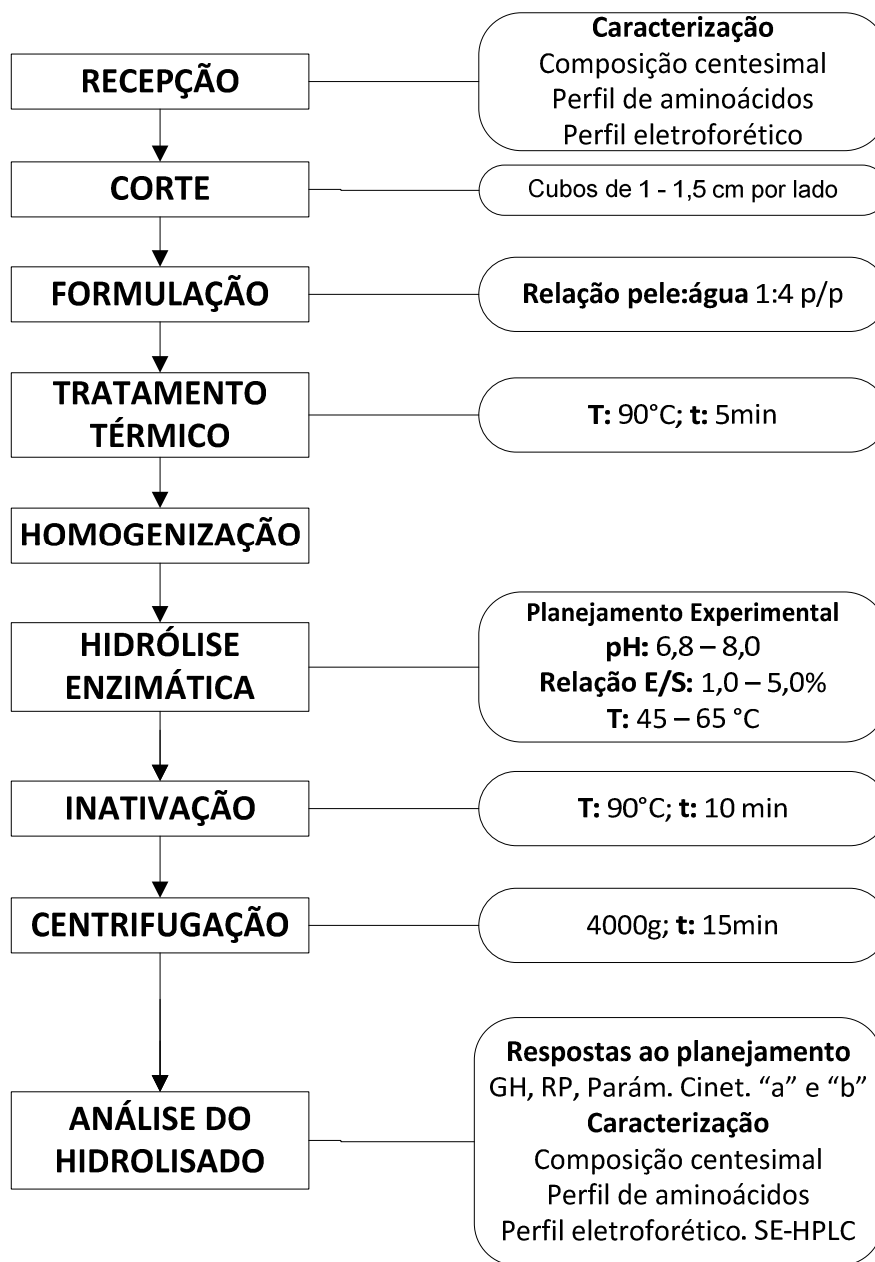


Figura 3.1. Diagrama de fluxo para o processamento de hidrolisado protéico de pele de cação



Figura 3.2. Sistema montado para a hidrólise enzimática de pele de cão

3.2.2.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para o estudo da influência das variáveis de processo na hidrólise enzimática de pele de cão foi utilizado um planejamento experimental 2^3 completo, com três pontos centrais (nível 0) e seis pontos axiais (níveis $\pm \alpha$), totalizando 17 ensaios, onde as variáveis independentes avaliadas foram: a temperatura de reação (T), a relação enzima:substrato (E/S) e o pH. As respostas analisadas foram o grau de hidrólise (GH), a recuperação da proteína (RP) e os parâmetros cinéticos (“a” e “b”) do modelo empírico proposto por Márquez e Vásquez (1999), descrito no Capítulo 2 (item 2.2.2). Os intervalos estudados de temperatura de reação, relação enzima:substrato e pH utilizados nos experimentos foram definidos através de ensaios preliminares. O delineamento experimental assim como as faixas de cada variável estudada estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Ensaios do planejamento experimental para o estudo da hidrólise enzimática de pele de cação, variando o pH de reação, a relação enzima/substrato (E/S) e a temperatura (T)

ENSAIO	VARIÁVEIS CODIFICADAS			VARIÁVEIS DECODIFICADAS		
	pH	E/S	T	pH	E/S (g/100g proteína)	T (°C)
1	-1	-1	-1	7,0	1,8	49
2	1	-1	-1	7,8	1,8	49
3	-1	1	-1	7,0	4,2	49
4	1	1	-1	7,8	4,2	49
5	-1	-1	1	7,0	1,8	61
6	1	-1	1	7,8	1,8	61
7	-1	1	1	7,0	4,2	61
8	1	1	1	7,8	4,2	61
9 (a)	-1,68	0	0	6,8	3,0	55
10 (a)	1,68	0	0	8,0	3,0	55
11 (a)	0	-1,68	0	7,4	1,0	55
12 (a)	0	1,68	0	7,4	5,0	55
13 (a)	0	0	-1,68	7,4	3,0	45
14 (a)	0	0	1,68	7,4	3,0	65
15 (c)	0	0	0	7,4	3,0	55
16 (c)	0	0	0	7,4	3,0	55
17 (c)	0	0	0	7,4	3,0	55

(a): ponto axial; (c): ponto central do planejamento

3.2.2.4. GRAU DE HIDRÓLISE E RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA

O grau de hidrólise (GH) foi calculado a partir do volume e da molaridade da base adicionada para manter o pH constante segundo o método descrito por Adler-Nissen (1985). O GH pode ser definido como a razão entre a porcentagem do número de ligações peptídicas clivadas (h), e o número total de ligações por unidade de peso (h_{tot} ; meq/kg proteína), calculada a partir da composição aminoacídica do substrato, e pode ser estimado usando a equação 3.1.

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 = \frac{B \times N_B}{a \times h_{tot} \times MP} \times 100 \quad (3.1)$$

Onde:

B = consumo da base consumida para manter o pH em mL;

N_B = normalidade da base; α = grau de dissociação dos grupos α-amino; e

MP = massa de proteína em gramas (%N x 6,25)

O grau de dissociação (α) foi obtido a partir da equação 3.2.

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK}} \quad (3.2)$$

O número total de ligações por unidade de peso (h_{tot}) da pele de cação foi calculado a partir da composição de aminoácidos, considerando um peso molecular médio de aminoácidos de 125 g/mol. Na matéria-prima foram considerados um conteúdo total de aminoácidos de 67,82 g/100g de amostra e um teor de proteína de 90,57 g/100g de amostra (pele de cação liofilizada). Assim o h_{tot} para a pele de cação foi aproximado a 6,00 meq/g de proteína, valor que foi usado para o cálculo do grau de hidrólise.

Finalmente, segundo Steinhardt e Beychok (1964) citado por Kristinsson e Rasco (2000), o valor do pK pode ser calculado pela equação 3.3

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400 \quad (3.3)$$

Onde T é a temperatura em K

A recuperação de proteína foi calculada usando a equação 3.4.

$$RP(\%) = \frac{MP_s}{MP} \times 100 = \frac{MP_s}{MP_s + MP_p} \times 100 = \frac{X_{prot,s} \times m_s}{X_{prot,s} \times m_s + X_{prot,p} \times m_p} \times 100 \quad (3.4)$$

Onde:

RP = recuperação de proteína (%); MP = massa de proteína total (g);

MP_s = massa de proteína no sobrenadante (g);

MP_p = massa de proteína no precipitado (g);

X_{prot,s} = conteúdo de proteína no sobrenadante (g proteína/g sobrenadante);

X_{prot,p} = conteúdo de proteína no precipitado (g proteína/g precipitado);

m_s = massa de sobrenadante (g); m_p = massa de precipitado (g).

O conteúdo de proteína no sobrenadante e no resíduo foram determinados pelo método micro-Kjeldhal (AOAC, 1997).

3.2.2.5. PARÂMETROS CINÉTICOS E CONSTANTES DE HIDRÓLISE

Os resultados experimentais do grau de hidrólise e tempo foram ajustados ao modelo empírico mostrado na equação 3.5, o qual descreve a cinética de reação enzimática no processo de hidrólise de proteínas (MÁRQUEZ e VÁZQUEZ, 1999; MÁRQUEZ e FERNÁNDEZ, 1993). Os parâmetros cinéticos *a* e *b* deste modelo foram determinados através de uma análise de regressão não linear dos dados experimentais, utilizando o software Statistica 8.0 (STATSOFT, Tulsa, Estados Unidos), usando como método de ajuste o modelo Quasi-Newton. Os valores das constantes de hidrólise (K_h) e de inativação enzimática (K_d) foram calculados com base nos valores de “a” e “b” obtidos assim como da quantidade inicial de enzima e substrato, usando as equações 3.6 e 3.7 e expressos como grama de proteína hidrolisada/UA.min.

$$GH = \frac{1}{b} \ln(1 + abt) \quad (3.5)$$

$$a = K_h \frac{e_0}{S_0} \quad (3.6)$$

$$b = \frac{K_d}{K_h} \quad (3.7)$$

Onde:

GH= grau de hidrólise (%); t = tempo (min);

a = parâmetro empírico de cinética de hidrólise (min⁻¹)

b = parâmetro empírico de cinética de hidrólise (adimensional)

K_h = constante da cinética de hidrólise enzimática (g/AU.min).

K_d = constante da cinética de inativação da enzima (g/AU.min)

e₀ = quantidade inicial de enzima (UA/g)

S₀ = quantidade inicial de substrato (g proteína)

3.2.2.6. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA HIDRÓLISE PROTÉICA

As condições de processo de hidrólise de pele de cação foram otimizadas visando maximizar o grau de hidrólise e a recuperação de proteína mediante a metodologia de superfície de resposta. Posteriormente o modelo matemático foi validado em triplicata nas condições ótimas. O hidrolisado obtido foi congelado e armazenado em *freezer* doméstico. Estes hidrolisados foram usados para a segunda etapa de experimentos referente ao estudo das condições de secagem por atomização do hidrolisado protéico de pele de cação.

3.2.2.7. PERFIL DE AMINOÁCIDOS

A composição de aminoácidos totais da pele de cação e do seu hidrolisado protéico foi determinada após hidrólise ácida das amostras com HCl 6N / fenol 0,1%, a 110°C por 20 horas, de acordo com o método Pico-Tag descrito por White et al. (1986). Em seguida, foi realizada a derivatização das amostras com 20 µL de solução de

etanol:água:triethylamina:fenilisotiocianato (7:1:1:1, v/v) por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a derivatização na pré-coluna, os aminoácidos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa (modelo PCX 3100, Pickering Laboratories, Mountain View, EUA).

O escore de aminoácidos essenciais (EA), assim como as razões de eficiência protéica PER_7 e PER_{10} (LEE et al., 1978), foram calculados mediante as fórmulas a seguir:

$$EA = \frac{\text{Teor de aminoácido essencial na amostra}}{\text{Teor de aminoácido essencial no padrão de referência}} \quad (3.8)$$

$$PER_7 = 0,08084[X_7] - 0,1094 \quad (3.9)$$

$$PER_{10} = 0.06320[X_{10}] - 0.1539 \quad (3.10)$$

Onde:

X_7 = treonina + valina + metionina + isoleucina + leucina + fenilalanina + lisina;

X_{10} = X_7 + histidina + arginina + tirosina.

3.2.2.8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A determinação dos perfis eletroforéticos, para a pele de cação e o seu hidrolisado protéico, foram obtidos de acordo com a metodologia de Schagger e Jagow (1987), utilizando um gel de separação com 15,5% de acrilamida e de empilhamento com 4%. As amostras do hidrolisado foram diluídas em uma solução tampão com dodecil sulfato de sódio (SDS) a uma concentração de 2% de proteína, sendo aplicados 20µL desta solução no sistema. Essa metodologia apresenta uma boa resolução para peptídeos na faixa de 1 a 100 kDa.

As análises foram realizadas em um sistema Mini-PROTEAN® 3 (BIO-RAD, Madrid, Espanha). O perfil de massa molecular de proteínas e peptídeos foi determinado utilizando-se o padrão de marcadores de massa molecular da *Bio-Rad Laboratories* (#Cat. 161-0326) (Madrid, Espanha): triose-fosfato isomerase de coelho (26,6 kDa); mioglobina de cavalo (16,9 kDa); α -lactalbumina de bovino (14,4 kDa), aprotinina de pâncreas bovino (6,5 kDa), insulina-B cadeia oxidada de bovino (3,5 kDa) e bacitracina oxidada (1,5 kDa).

3.2.2.9. SEPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SE-HPLC)

Para a determinação da distribuição de tamanho de peptídeo dos hidrolisados protéicos, foi utilizado um cromatógrafo *HPLC*, com um injetor VARIAN 9012 e um detector UV/VIS VARIAN 9015 (*VARIAN CHROMATOGRAPHY SYSTEMS*, Califórnia, Estados Unidos). A cromatografia foi realizada em uma coluna modelo *Elut-sec 2000 steel*, diâmetro interno de 7,75 mm e comprimento 300 mm (*VARIAN CHROMATOGRAPHY SYSTEMS*, Califórnia, Estados Unidos), e foram usadas as seguintes condições cromatográficas: volume de injeção de 20 μ L; vazão de alimentação de 0,8 mL/min; tampão fosfato (0,05 M pH=6,8; 0,15 M NaCl; isocrático) como fase móvel; tempo total de eluição foi de 30 min à temperatura ambiente. As leituras de absorbância foram feitas a 280 nm e os pesos moleculares aparentes foram estimados a partir de uma curva de calibração elaborada com uma mistura de substâncias de peso molecular conhecido que incluía: β -lactoglobulina (18,3 kDa), α -lactalbumina (14,7 kDa), Aprotinina (6,5 kDa), β -casomorfina (0,8 kDa). Os resultados foram coletados pelo software Star Chromatography Workstation (Versão 4.5).

3.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A Tabela 3.2 apresenta a composição centesimal da pele de cação. Trata-se de uma importante fonte de proteína, constituindo 85,6% do total de sólidos. Observou-se um baixo teor de lipídeos totais, o que facilitou a separação da fração solúvel do hidrolisado. A quantidade de cinzas presente na pele pode ser explicada pela estrutura da mesma. A parte superficial da pele está conformada por uma camada dura, rugosa e insolúvel (dentículos dérmicos) cuja função principal é conferir proteção ao animal.

Tabela 3. 2. Composição centesimal de pele de cação em porcentagem

Análise	Média ± desvio	
	b.u.	b.s.
Umidade	78,3 ± 1,0	---
Proteína	19,0 ± 0,1	85,6 ± 0,4
Lipídios	0,8 ± 0,1	3,6 ± 0,4
Cinzas	2,6 ± 0,1	11,7 ± 0,4

b.u. = base úmida, %; b.s. = base seca

Os resultados mostrados são próximos aos obtidos por Hense (1990) para quatro espécies diferentes de cação capturados no Brasil, reportando valores entre 76 e 85% para a umidade, entre 13 e 20% para a proteína, entre 0,3 e 0,9 para lipídios e entre 0,9 e 1,1% para cinzas. A cartilagem de cação possui uma composição similar, diferindo apenas no teor de cinzas, tendo conteúdo de umidade de 66,8 - 70,3%, 14,0 – 15,0% de proteína, 0,2% de lipídeos e 12,1 – 15,8% de cinzas (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2010). Embora não tenham sido encontrados na literatura outros estudos que tenham determinado a composição da pele de cação, valores similares foram encontrados por Lin e Li (2006), para a composição centesimal de pele de lula sendo, 82,8 %, 15,3 %, 0,59 % e 0,49 %, os

conteúdos de umidade, proteína, lipídios e cinzas, respectivamente. Wasswa et. al. (2007) reportou conteúdos de 64,1% de umidade, 22,6 % de proteína, 1,1% de lipídios e 0,3% de cinzas para a pele de carpa-capim.

3.3.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

As curvas de cinética enzimática que relacionam o grau de hidrólise com o tempo de reação e a taxa de hidrólise enzimática com o grau de hidrólise, para os diferentes ensaios do planejamento experimental são apresentadas nas Figura 3.3 e 3.4, respectivamente. O processo de hidrólise teve duas etapas bastante diferenciadas: a primeira caracterizada por uma taxa de reação alta, onde ocorre uma quebra intensa de ligações peptídicas pela grande disponibilidade de polipeptídios de alto peso molecular na matéria-prima, e a segunda etapa, onde foi observada uma queda na taxa de reação a partir da segunda hora, com tendência a atingir um comportamento estacionário no final do tempo de reação (4 horas). Segundo Gonzalez-Tello et al. (1994), essa diminuição pode ser explicada por três motivos: pela menor concentração de ligações peptídicas disponíveis para clivagem pela protease, pela possível inibição das enzimas causada por produtos da hidrólise e pela desnaturação da enzima.

Curvas de cinética similares às apresentadas na Figura 3.3 foram reportadas por diversos autores para a hidrólise protéica de diferentes fontes, como por exemplo: resíduos de sardinela, carne escura de atum, resíduos de camarão sete barbas, isolado protéico de canola e farinha de trigo (BOUGATEF et al., 2010; ARASAKI, 2000; HOLANDA, 2004; CHABANON et al., 2007; TANG et al., 2009).

As maiores taxas iniciais de hidrólise foram atingidas nos ensaios 7, 12, 3, 8 e 9 onde, com exceção do ensaio 9, a razão enzima/substrato foi maior que 4,0%. Pelo contrário, nos ensaios 2, 11, 6, 13 e 5 ($E/S = 1,0 - 1,8$ g enzima/100 g proteína, com exceção do ensaio 13), foram observadas taxas de hidrólise mais baixas, indicando que a quantidade de enzima usada teve grande influência sobre o processo de hidrólise (Figura 3.4). Assim mesmo observou-se que, com exceção do ensaio 5 ($pH = 7,0$), os valores de pH foram superiores a 7,4 nos ensaios onde foram registradas as taxas de hidrólise mais baixas, indicando que o pH teve influência negativa sobre o valor da taxa de hidrólise. Por último, a temperatura de reação não apresentou influência aparente sobre o valor da taxa de hidrólise. A influência das variáveis de processo sobre grau de hidrólise é amplamente discutida posteriormente, no item 3.3.3.1 da presente dissertação

Nos gráficos tanto de cinética enzimática quanto de taxa de hidrólise pode ser notado um comportamento similar para os três ensaios feitos no ponto central do planejamento (Figuras 3.3 (c) e 3.4 (c), respectivamente), evidenciando que os experimentos são reprodutíveis no tempo. As pequenas variações observadas, tanto nos valores de grau de hidrólise quanto da taxa de hidrólise, podem ser associadas pequenas variações na composição inicial da matéria-prima.

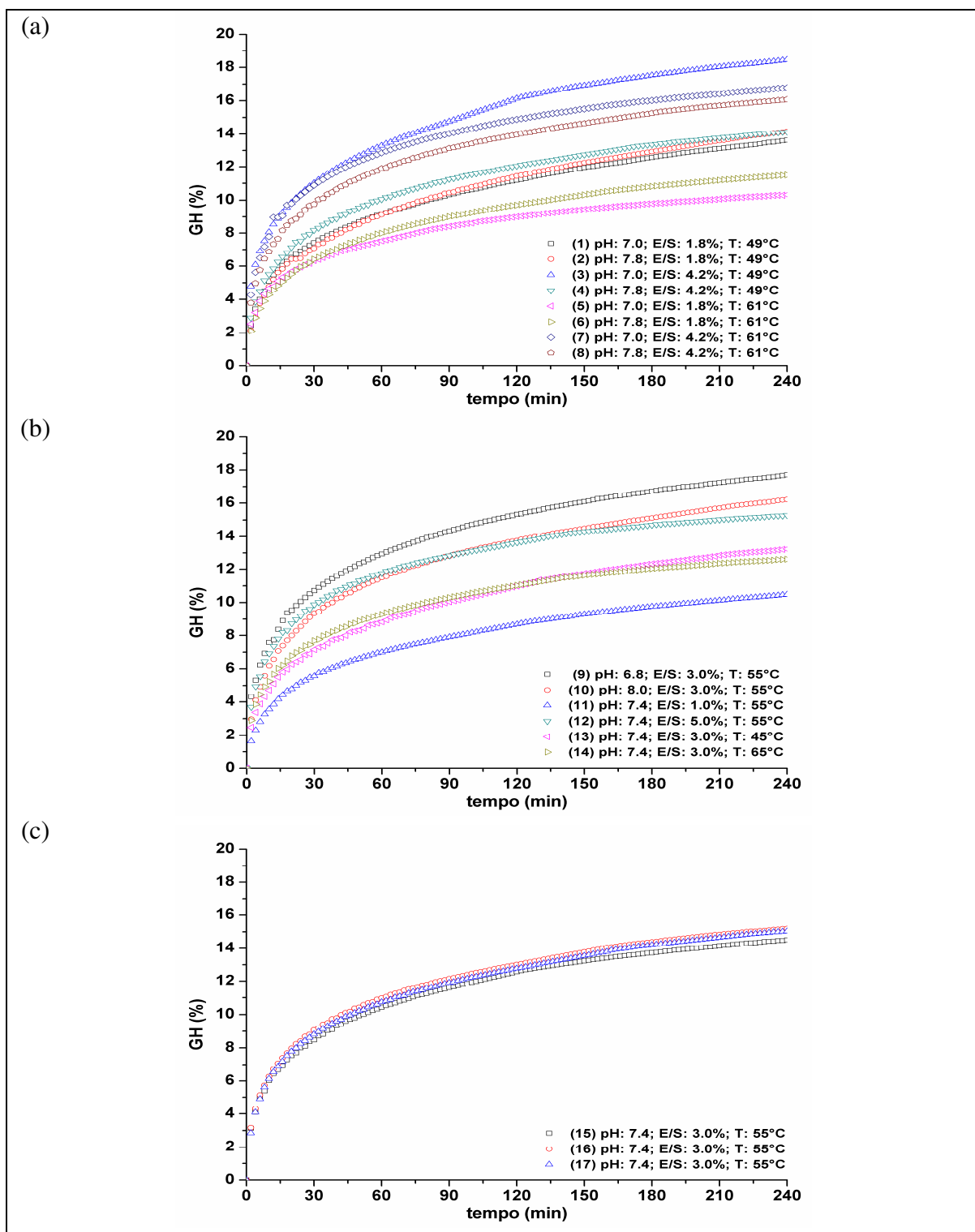


Figura 3.3. Curvas experimentais para grau de hidrólise (GH) em função do tempo dos: (a) ensaios fatoriais, (b) axiais e (c) ponto central do processo de hidrólise enzimática de pele de cação. Os números entre parênteses indicam o número de ensaio do planejamento experimental.

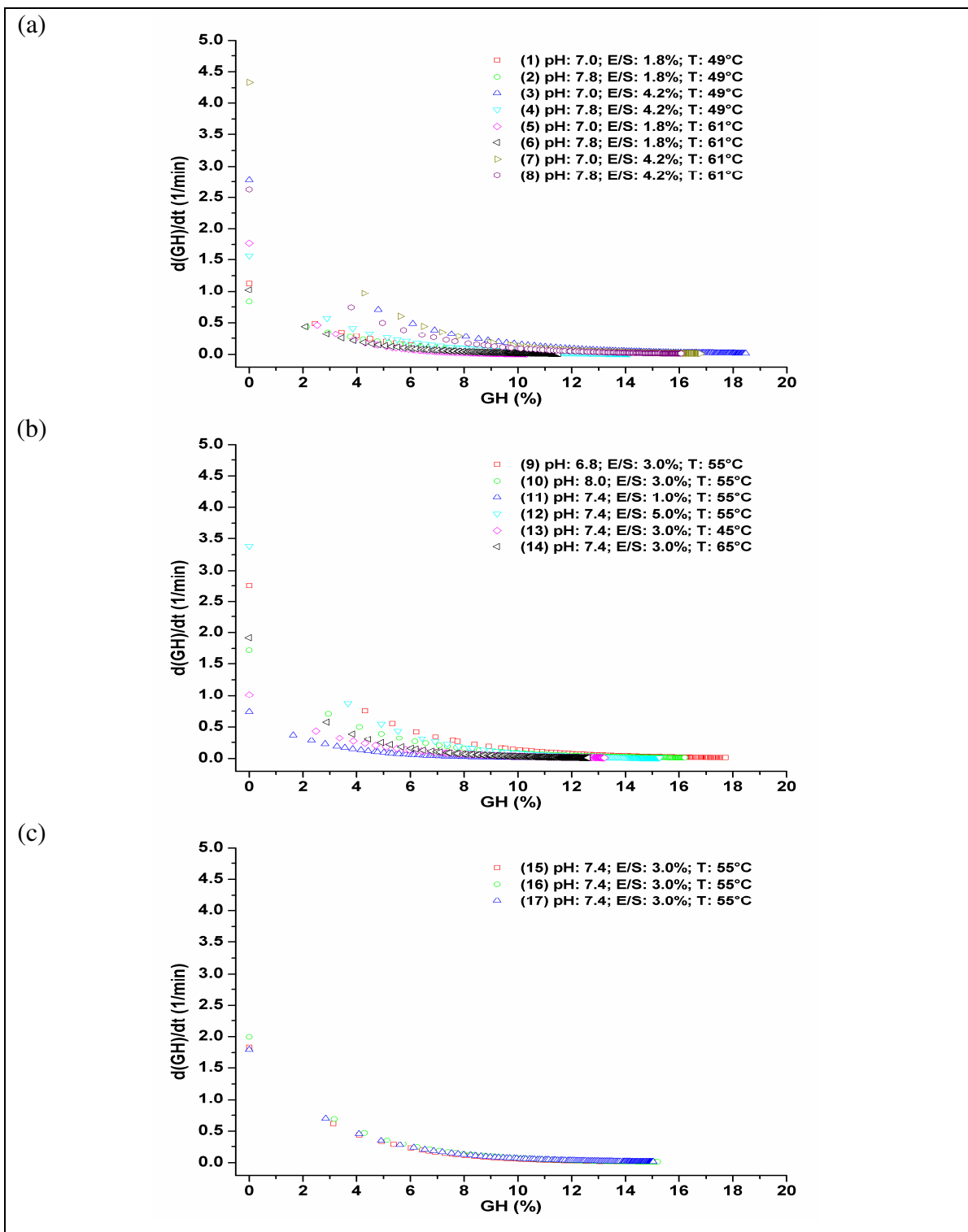


Figura 3.4. Taxa de hidrólise em função do grau de hidrólise dos: (a) ensaios fatoriais, (b) axiais e (c) ponto central do processo de hidrólise enzimática de pele de cação. Os números entre parênteses indicam o número de ensaio do planejamento experimental.

3.3.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

3.3.3.1. GRAU DE HIDRÓLISE E RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA

A Tabela 3.3 apresenta os resultados obtidos experimentalmente para o grau de hidrólise e a recuperação de proteína no processo de hidrólise protéica de pele de cação com ProtamexTM, segundo o planejamento experimental realizado.

Tabela 3.3. Resultados experimentais de grau de hidrólise (GH) e recuperação de proteína (RP) para o processo de hidrólise enzimática de pele de cação

ENSAIO	VARIÁVEIS DECODIFICADAS			RESPOSTAS	
	pH	E/S	T	GH	RP
1	7,0	1,8	49	13,6	94,2
2	7,8	1,8	49	14,2	89,4
3	7,0	4,2	49	18,5	95,1
4	7,8	4,2	49	14,1	93,5
5	7,0	1,8	61	10,3	90,7
6	7,8	1,8	61	11,5	92,9
7	7,0	4,2	61	16,8	97,7
8	7,8	4,2	61	16,1	93,3
9	6,8	3,0	55	17,7	95,0
10	8,0	3,0	55	16,2	93,6
11	7,4	1,0	55	10,5	88,3
12	7,4	5,0	55	15,3	95,3
13	7,4	3,0	45	13,2	94,8
14	7,4	3,0	65	12,6	93,2
15 (C)	7,4	3,0	55	14,5	95,6
16 (C)	7,4	3,0	55	15,2	93,1
17 (C)	7,4	3,0	55	15,0	95,3

Pelos dados reportados na Tabela 3.3, observou-se que os valores experimentais de grau de hidrólise oscilaram entre 10,3% e 18,5%, os quais corresponderam aos ensaios 5 (pH=7,0; E/S=1,8 g enzima/100g proteína; T= 61°C) e 3 (pH=7,0; E/S=4,2 g enzima/100g proteína; T= 49°C) respectivamente. Esses resultados diferem dos encontrados na literatura para o GH de hidrolisados protéicos preparados com ProtamexTM a partir de víscera de

sardinha (3,1%), víscera de sépias (3,2%), carne e osso de corvina (46,7%) e carne de mexilhão (26,5%) (KECHAOU et al., 2009; CHOI et al., 2009; SILVA et al., 2009). Porém, essa diferença pode ter explicação nas diversas condições e tempos de hidrólise utilizados nestes trabalhos.

Com exceção de dois ensaios (pontos 2 e 11), todos os valores de recuperação de proteína ultrapassaram 90% nas quatro horas de hidrólise. A recuperação de proteína variou entre 88,3 e 97,7%, correspondentes aos ensaios 11 e 7, respectivamente. O valor mais baixo de recuperação de proteína foi obtido na condição onde a quantidade de enzima foi a menor dentro da faixa estudada (pH= 7,4; E/S = 1,0%; T= 55 °C), e o máximo, no ensaio 7 onde a relação E/S e a temperatura foram mais altas (pH=7,0; E/S= 4,2%; T= 61 °C). Esses rendimentos foram superiores a outros hidrolisados preparados com ProtamexTM, tais como, hidrolisados protéicos de víscera de sardinha (61,2%), víscera de sépias (57,2%), carne e osso de corvina (85,9%), víscera de bacalhau (82,0%) e osso de salmão (75,0%), (KECHAOU et al., 2009; CHOI et al., 2009; ASPMO et al., 2005; LIASET et al., 2002).

Todas as variáveis (termos lineares, quadráticos e de interação) influíram significativamente sobre o grau de hidrólise (Tabela 3.4). O termo linear da relação enzima/substrato teve maior influência, sendo este efeito positivo. Isto significa que quanto maiores as quantidades de enzima utilizada para o processo de hidrólise, maiores foram os graus de hidrólise resultantes. No entanto, o pH e a temperatura tiveram efeitos negativos pequenos sobre a mesma resposta, se comparados com o efeito da relação E/S.

No caso da recuperação de proteína, apenas a relação E/S teve impacto significativo sobre a resposta, assim a maiores quantidades de enzima utilizada para a hidrólise, maior

foi a recuperação de proteína, o que está de acordo com os resultados de outros autores para a hidrólise enzimática de carne de peito de frango, resíduos de atum e ossos de salmão (KUROZAWA et al, 2008; GUERARD et al., 2002; LIASET et al., 2002).

Tabela 3.4. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para o grau de hidrólise e a recuperação de proteína

FATORES	GH				RP			
	Coef. de Regressão	Efeito Estimado	Erro Padrão	P	Coef. de Regressão	Efeito Estimado	Erro Padrão	P
Média	14,9	14,90	0,40	<0,01	94,66	94,66	0,98	<0,01
pH (L)	-0,4	-0,89	0,38	0,06	-0,79	-1,59	0,92	0,13
pH (Q)	0,8	1,53	0,42	0,01	-0,11	-0,22	1,01	0,84
E/S (L)	1,8	3,50	0,38	<0,01	1,76	3,54	0,92	0,01
E/S (Q)	-0,7	-1,37	0,42	0,01	-0,99	-1,99	1,01	0,09
T (L)	-0,5	-0,99	0,38	0,03	-0,02	-0,04	0,92	0,96
T (Q)	-0,6	-1,34	0,42	0,02	-0,23	-0,46	1,01	0,66
pH(L) x E/S(L)	-0,8	-1,69	0,49	0,01	-0,42	-0,86	1,20	0,50
pH(L) x T(L)	0,5	1,07	0,49	0,07	0,52	1,04	1,20	0,42
E/S(L) x T(L)	0,8	1,55	0,49	0,02	0,31	0,62	1,20	0,62

Tendo em consideração apenas os termos significativos, os dois modelos foram avaliados através da análise de variância (Tabela 3.5). Os resultados mostraram que o modelo matemático obtido para o grau de hidrólise pode ser utilizado para a predição desse valor no processo de hidrólise enzimática de pele de cação dentro da faixa estudada em um nível de confiança de 90%. No entanto, o modelo proposto para a predição da recuperação de proteína não apresentou significância estatística ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$) no mesmo nível de confiança, indicando que os dados experimentais não são adequadamente explicados pelo modelo, portanto, o modelo não pode ser usado com fins preditivos e apenas os efeitos das variáveis sobre a resposta podem ser discutidos. Os valores dos coeficientes de

determinação (R^2) foram de 96,1% e 77,4% para o grau de hidrólise e a recuperação de proteína, respectivamente.

Tabela 3.5. Análise de variância (ANOVA) para os modelos ajustados do grau de hidrólise e da recuperação de proteína.

Fontes de variação	Modelo codificado para GH (90% confiança)					Modelo codificado para RP (90% confiança)				
	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado} *	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado} *
Regressão	83,39	9	9,27	19,00	2,73	67,39	9	7,49	2,61	2,72
Resíduos	3,41	7	0,49			20,10	7	2,87		
Falta de ajuste	3,15	5	0,63	4,83	9,29	16,52	5	3,30	1,85	9,29
Erro Puro	0,26	2	0,13			3,58	2	1,79		
Total	86,81	16				87,49	16			
R²	0,96					0,77				

*valores de F_{tabelado} para $p \leq 0,10$

SQ= soma de quadrados; GL= graus de liberdade; MQ = média quadrática

Existe uma relação entre o grau de hidrólise e a recuperação de proteína, na qual a taxa de recuperação de proteína vai decaindo e tende a ser constante conforme maiores valores de grau de hidrólise são atingidos (portanto a maiores tempos de processo). Com o decorrer da hidrólise enzimática, as ligações peptídicas, encarregadas de fornecer a estrutura a uma proteína, são clivadas e, portanto a proteína original torna-se um conjunto de polipeptídios de estruturas mais simples e com características mais solúveis. Quando essas ligações são clivadas totalmente, a proteína original é totalmente solubilizada. A partir desse ponto começa uma clivagem maior dos peptídeos já solubilizados, e a taxa de recuperação de proteína diminui fortemente. Tendo em consideração isto, a taxa de recuperação de proteína pode ter atingido sua fase estacionária antes do tempo de controle (4 horas de processo), portanto pouca variação nos rendimentos dos diferentes ensaios pôde ser observada. Por exemplo, Holanda (2004) verificou que não existiu variação significativa na recuperação de proteína, para os hidrolisados de camarão com

graus de hidrólise maiores que 12%, indicando que a partir desse valor não existiu mais solubilização de proteínas e sim uma clivagem maior dos peptídeos já solubilizados. Além disso, o leve tratamento térmico efetuado sobre a matéria-prima antes da homogeneização poderia ter facilitado a recuperação de proteína em tempos mais curtos. Cui et al. (2009) estudaram o efeito do tratamento térmico sobre o processo de hidrólise enzimática de carne de frango, onde foi demonstrado que o tratamento térmico favoreceu a eliminação da fração de peptídeos maiores que 10,0 kDa nos hidrolisados protéicos obtidos sob altas temperaturas, de 70 a 100°C e tempos de reação acima dos 10 minutos. Porém, uma diminuição no nível de nitrogênio solúvel (que pode ser interpretado como consequência da desnaturação da proteína) e uma formação de peptídeos na faixa de 3,5 até 10,0 kDa também foi observada. Segundo os autores, o tratamento térmico pode modificar a estrutura quaternária da proteína expondo maior quantidade de sítios ativos na mesma (pela quebra de ligações “S-H”) ao ataque enzimático, no entanto, tratamentos térmicos severos podem afetar negativamente a clivagem de proteínas pela formação de pontes dissulfeto, os que são responsáveis por conferir à proteína uma estrutura mais resistente à ação de enzimas proteolíticas.

Comprovada a significância do modelo proposto para prever o grau de hidrólise em função das variáveis e faixas estudadas, foram elaboradas as superfícies de respostas que relacionam o grau de hidrólise com as diferentes variáveis independentes. Estas superfícies são apresentadas na Figura 3.5.

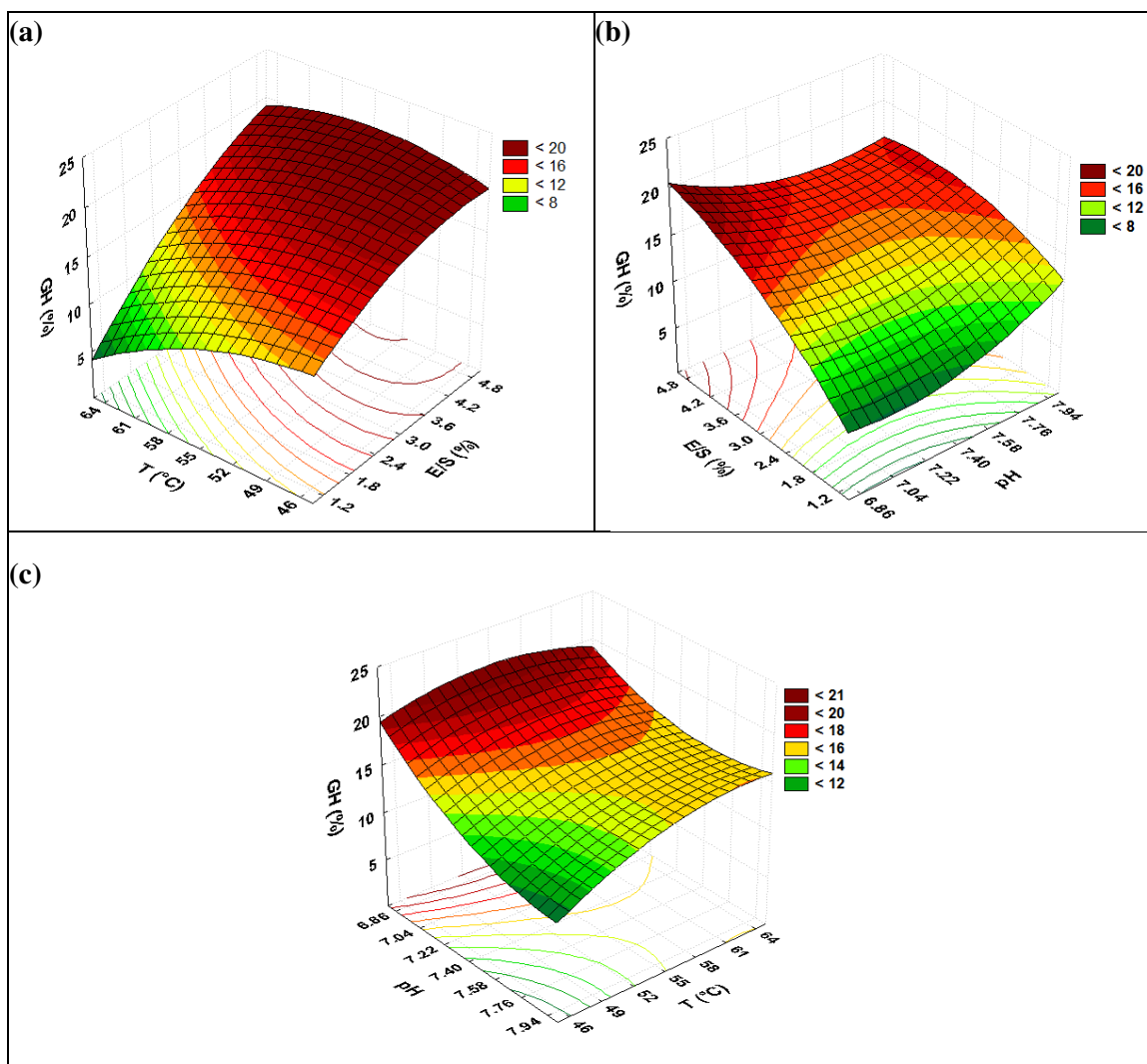


Figura 3.5. Superfícies de resposta para a influência das variáveis de processo sobre o grau de hidrólise do hidrolisado protéico de pele de cão produzido nas condições: (a) pH = 6,8; (b) T = 61 °C; (c) E/S = 5,0 %.

Analisando o efeito da relação enzima/substrato sobre o grau de hidrólise, observou-se nas Figura 3.5(a) e (b) que para maiores concentrações de enzima utilizada, foram obtidos hidrolisados protéicos com maior grau de hidrólise, principalmente quando baixos valores de pH e valores de temperatura entre 49 e 58°C foram usados. A influência positiva da relação E/S sobre a resposta foi reportada também por vários autores para a hidrólise protéica de diversas fontes marinhas usando diferentes enzimas, como por exemplo: carne

de mexilhão usando ProtamexTM, carne de escamudo usando Alcalase®, resíduo de camarão sete barbas usando Alcalase® e Pancreatina suína, concentrado solúvel de peixe usando FlavourzymeTM e KojizymeTM, carne escura de atum usando Savinase® e Proteinase, carne de camarão usando tripsina tipo III e quimotripsina tipo II, e carne de cação usando Alcalase® (SILVA et al., 2010; CHABEAUD et al., 2009; HOLANDA, 2004; NILSANG et al., 2005; ARASAKI, 2000; SIMPSON et al., 1998; DINIZ e MARTIN, 1996). Essa influência pode ser explicada pela maior quantidade de sítios ativos disponíveis para a reação com o substrato, levando a uma maior clivagem de ligações peptídicas, e conseqüentemente, maior solubilização da proteína no hidrolisado.

No caso da temperatura, os graus de hidrólise mais altos foram atingidos na faixa de 49 a 58°C (Figura 3.5(a) e (c)). O pequeno efeito negativo da temperatura sobre o grau de hidrólise pode ser observado principalmente para relações E/S abaixo de 2,0%. Como apresentado posteriormente no item 3.3.3.2, temperaturas altas (acima de 60°C) produziram valores altos na constante de hidrólise (K_h), mas também valores altos na constante de inativação (K_d) da enzima, resultando em graus de hidrólise menores. A taxa de inativação da enzima é maior quando a concentração da mesma é pequena e a temperatura de processo é alta. Na Figura 3.5(b), a combinação de temperatura alta ($T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$) junto com pHs e concentrações de enzima baixas, provocou a queda no grau de hidrólise. Já na Figura 3.5 (c), observou-se que o efeito da temperatura não parece ser tão importante para pHs baixos ($\text{pH} \leq 6,9$) e concentrações altas de enzima (gráfico feito para uma relação E/S de 5,0%), mantendo-se um alto grau de hidrólise na maior parte da faixa de estudo.

O efeito negativo do pH no grau de hidrólise é mostrado nas Figura 3.5 (b) e (c), onde as máximas respostas foram atingidas para níveis de pH inferiores a 7,1.

Provavelmente pHs superiores a esse valor provocaram instabilidade na estrutura da enzima, causando perda de atividade e até mesmo desnaturação. De acordo com Whitaker (1994), mudanças no pH podem afetar a estabilidade da enzima causando danos irreversíveis na estrutura, resultando na sua desnaturação e em contínua perda de atividade.

Todos os resultados mostrados anteriormente estão de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante da enzima (NOVOZYMES, Bagsvaerd, Dinamarca). Essas condições incluem pHs na faixa de 6,0 e 7,5, e temperaturas de reação em torno de 50 e 55°C.

3.3.3.2. PARÂMETROS CINÉTICOS E CONSTANTES DE HIDRÓLISE

Os parâmetros cinéticos “a” e “b” do modelo empírico apresentado na equação 3.5, foram calculados através de uma regressão não linear, a partir dos valores experimentais de grau de hidrólise ao longo do tempo. Esses valores junto com os valores da constante de hidrólise (K_h) e da constante de inativação (K_d), calculados pelas equações 3.6 e 3.7, são apresentados na Tabela 3.6. Além disso, todos esses valores estão acompanhados dos seus respectivos coeficientes de determinação e erros relativos médios. Pelos valores do coeficiente de determinação (R^2 de 0,99 a 1,00) e dos erros relativos médios (E de 0,006 a 0,696%), observou-se um excelente ajuste dos dados experimentais ao modelo cinético utilizado.

Analisando os dados da mesma tabela observou-se que os valores do parâmetro “a” variaram entre 0,739 e 4,335 min^{-1} , correspondentes aos ensaios 11 e 7 respectivamente, lembrando que o ensaio 11 teve a relação de enzima/substrato mais baixa do planejamento (1,0 g enzima/100g proteína) e tanto a temperatura quanto o pH foram mantidos no ponto

central (pH= 7,4; T= 55°C). No caso do ensaio 7, as condições de hidrólise foram mais favoráveis para a atividade da enzima (pH=7,0; E/S= 4,2 g enzima/100g proteína; T= 61°C).

Tabela 3.6. Parâmetros cinéticos obtidos por regressão não linear dos dados obtidos da hidrólise enzimática de pele de cação

ENSAIO	e_0/s_0	a	b	K_h	K_d	R^2	E (%)
1	0,027	1,130	0,340	41,83	14,22	0,997	0,493
2	0,027	0,834	0,296	30,87	9,13	0,997	0,696
3	0,063	2,777	0,285	44,07	12,57	0,997	0,293
4	0,063	1,561	0,345	24,77	8,56	0,999	0,290
5	0,027	1,768	0,526	65,49	34,47	0,999	0,196
6	0,027	1,025	0,402	37,96	15,27	0,999	0,375
7	0,063	4,335	0,351	68,81	24,14	1,000	0,026
8	0,063	2,625	0,333	41,66	13,84	0,999	0,166
9	0,045	2,755	0,300	61,21	18,39	0,999	0,196
10	0,045	1,720	0,300	38,23	11,48	1,000	0,210
11	0,015	0,739	0,416	49,24	20,48	0,999	0,476
12	0,075	3,382	0,369	45,09	16,65	1,000	0,006
13	0,045	1,012	0,338	22,49	7,60	0,997	0,567
14	0,045	1,917	0,415	42,60	17,69	0,999	0,172
15 (C)	0,045	1,834	0,347	40,76	14,15	0,999	0,252
16 (C)	0,045	1,997	0,336	44,38	14,90	0,999	0,219
17 (C)	0,045	1,799	0,333	39,97	13,29	0,999	0,234

e_0/s_0 = UA/kg homogenizado; “a”=min-1; b = adimensional “ K_h ” e “ K_d ”= g. proteína/UA.min

No caso do parâmetro “b” os valores oscilaram entre 0,285 e 0,526 correspondentes aos ensaios 3 e 5 respectivamente. Neste caso, observou-se que os dois ensaios foram realizados no mesmo pH (7,0) mas com a diferença de que no primeiro, foi utilizada uma relação de enzima/substrato maior (4,2 g enzima/100 g proteína) e uma temperatura menor (49°C) quando comparado às condições do segundo experimento (E/S= 1,8 g enzima/100g proteína; T= 61°C).

Os valores de “a” e “b” reportados na literatura variam muito em função do tipo de matéria-prima e do tipo de enzima utilizada. Márquez e Vásquez (1999) reportaram valores de “a” entre 0,27 e 1,70 min⁻¹, e de “b” entre 0,12 e 0,22, para a hidrólise enzimática de hemoglobina bovina com Alcalase®, quando foram testadas diferentes concentrações de enzima, substrato e temperaturas de processo. No mesmo trabalho é estabelecido que “b” não varia em função da concentração inicial de enzima e de substrato, mas sim da temperatura, sendo que, quanto maiores foram as temperaturas de reação aplicadas menores foram os valores de “b” reportados, para condições fixas de pH e concentração de enzima e substrato, um comportamento contrário ao observado no presente trabalho. Essa diferença provavelmente é produto da conjunção de vários fatores, entre eles, a faixa estudada de temperatura (35 – 55°C, abaixo do recomendado para essa enzima), o tipo de proteína e o tipo de enzima. Pelo contrário Kurozawa et al. (2009) estudaram a influência das condições de processo (pH, relação E/S e temperatura) sobre os parâmetros cinéticos para a hidrólise enzimática de carne de peito de frango utilizando a enzima Alcalase®. Os autores reportaram valores de “a” oscilando entre 0,77 e 26914,40 min⁻¹, e de “b” entre 0,12 e 3,22, verificando-se a influência positiva da temperatura sobre o valor de “a” e negativa para o parâmetro “b”. Neste caso, a faixa de temperatura avaliada foi maior, de 50 a 77°C.

Como pode ser observado na Tabela 3.7, o termo linear da relação E/S foi o que teve maior efeito sobre a resposta “a”, sendo positivo. Efeitos menores foram observados para os termos lineares do pH (negativo) e da temperatura de processo (positivo). No caso do parâmetro “b”, a temperatura de processo foi a variável com maior influência sobre a resposta, seguido da relação E/S (negativo) e do termo de interação entre as duas variáveis (negativo).

Tabela 3.7. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para os parâmetros cinéticos “a” e “b”

FATORES	a				b			
	Coef. de Regressão*	Efeito Estimado	Erro Padrão	P	Coef. de Regressão*	Efeito Estimado	Erro Padrão	P
Média	1,97	1,87	0,11	<0,01	0,338	0,338	0,013	0,000
pH (L)	-0,41	-0,84	0,10	<0,01	---	-0,018	0,012	0,160
pH (Q)	0,12	0,29	0,11	0,04	-0,013	-0,026	0,013	0,085
E/S (L)	0,8	1,61	0,10	<0,01	-0,024	-0,048	0,012	0,005
E/S (Q)	---	0,17	0,11	0,18	0,020	0,039	0,013	0,019
T (L)	0,36	0,73	0,10	<0,01	0,035	0,070	0,012	0,001
T (Q)	-0,15	-0,25	0,11	0,06	0,014	0,028	0,013	0,067
pH(L) x E/S(L)	-0,24	-0,47	0,13	0,01	0,026	0,053	0,015	0,011
pH(L) x T(L)	---	-0,24	0,13	0,12	-0,020	-0,040	0,015	0,037
E/S(L) x T(L)	0,22	0,45	0,13	0,01	-0,030	-0,060	0,015	0,006

* Parâmetros significativos ($p \leq 0,10$)

A análise de variância (Tabela 3.8) mostrou significância estatística para ambos os modelos. No caso particular do “b”, o erro puro está próximo de zero e dado que, o valor de F é calculado pela divisão das médias quadráticas (MQ) dos termos da falta de ajuste e do erro puro, foi observado um valor de $F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado} . Os coeficientes de determinação R^2 dos dois modelos estiveram acima de 90%, indicando que podem ser usados para predizer os valores de “a” e “b” dentro da faixa estudada.

A influência positiva da relação E/S sobre o parâmetro “a”, mostrada nas superfícies de resposta da Figura 3.6(a) é reportada também por outros autores para a hidrólise protéica de farinha de grão de bico, soro de leite, hemoglobina bovina e peito de frango (MÁRQUEZ e FERNÁNDEZ, 1993; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994; MÁRQUEZ e VÁSQUEZ, 1999; KUROZAWA et al., 2009). Os autores atribuem essa influência ao fato que “a” é uma constante que depende diretamente do valor da razão e_0/s_0 , então, quanto

maior a quantidade de enzima empregada na hidrólise, maior será essa razão e conseqüentemente maior o valor de “a”.

Tabela 3.8. Análise de variância (ANOVA) para os modelos dos parâmetros cinéticos “a” e “b”

Fontes de variação	Modelo codificado para "a" (90% confiança)					Modelo codificado para "b" (90% confiança)				
	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado} *	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado} *
Regressão	14,48	7	2,07	42,10	2,51	0,05	8	0,01	11,44	2,59
Resíduos	0,44	9	0,05			0,00	8	0,00		
Falta de ajuste	0,42	7	0,06	5,35	9,35	0,00	6	0,00	12,20	9,33
Erro Puro	0,02	2	0,01			0,00	2	0,00		
Total	14,93	16				0,06	16			
R²	0,97					0,92				

*valores de F_{tabelado} para $p \leq 0,10$

SQ= soma de quadrados; GL= graus de liberdade; MQ = média quadrática

Pode-se observar também que a influência do pH e da temperatura de reação, sobre o valor de “a”, foi muito pequena se comparada com o efeito da relação E/S. Segundo Kurozawa (2009), a influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática pode ser entendida em duas fases distintas: no princípio, aumentos na temperatura levam a aumentos na velocidade de reação, por elevar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. Isso explicaria porque, mesmo para altas temperaturas, há um aumento da constante de hidrólise enzimática. No entanto, temperaturas elevadas acarretam perda de atividade e desnaturação da enzima. As pequenas mudanças provocadas pelo pH (efeito negativo) no valor de “a” poderiam ser explicadas pelos danos produzidos na estrutura da enzima à medida que pHs de reação mais altos são usados, provocando perda de atividade e mesmo desnaturação da mesma (WHITAKER, 1994), assim como interação com as outras variáveis de processo.

Por outro lado, dado que “b” é uma razão entre a constante de inativação (K_d) da enzima e a constante de hidrólise (K_h), é possível avaliar a taxa de reação total a partir do seu valor. Assim, quanto maior for o valor desse parâmetro maior será a predominância da reação de desnaturação da enzima. Observa-se na Figura 3.6(b), que os maiores valores de “b” são atingidos nas temperaturas mais altas de processo e nas concentrações mais baixas de enzima. Nessas condições observou-se que o pH teve um leve efeito negativo sobre o valor de “b”, registrando valores mais altos nos níveis mais baixos de pH. Nesse caso, pHs baixos poderiam estar ajudando na perda de atividade da enzima, porém, esse efeito é muito pequeno se comparado com o da temperatura.

Com relação às constantes de hidrólise (K_h) e inativação (K_d), apresentadas também na Tabela 3.6, a maior resposta para K_h foi obtida no ensaio 7 (pH=7,0; E/S= 4,2 g enzima/100g proteína; T= 61°C), atingindo um valor de 68,81 g proteína/ UA. min. No caso de K_d , o maior valor foi 34,47 g proteína/UA.min, obtido no ensaio 5 (pH=7,0; E/S= 1,8 g enzima/100g proteína; T= 61°C). As respostas mais baixas, para as duas constantes, foram registradas no ponto 13 (pH=7,4; E/S= 3,0 g enzima/100g proteína; T= 45°C) com valores de 24,18 e 7,60 g proteína/UA.min para K_h e K_d respectivamente.

A constante da hidrólise (K_h) foi fortemente influenciada pela temperatura e pelo pH da reação, indicando que maiores valores de K_h foram obtidos para pHs mais baixos e temperaturas mais altas. Comportamento similar foi observado para a constante da inativação, com a diferença de que a relação E/S teve influência significativa na resposta (Tabela 3.9).

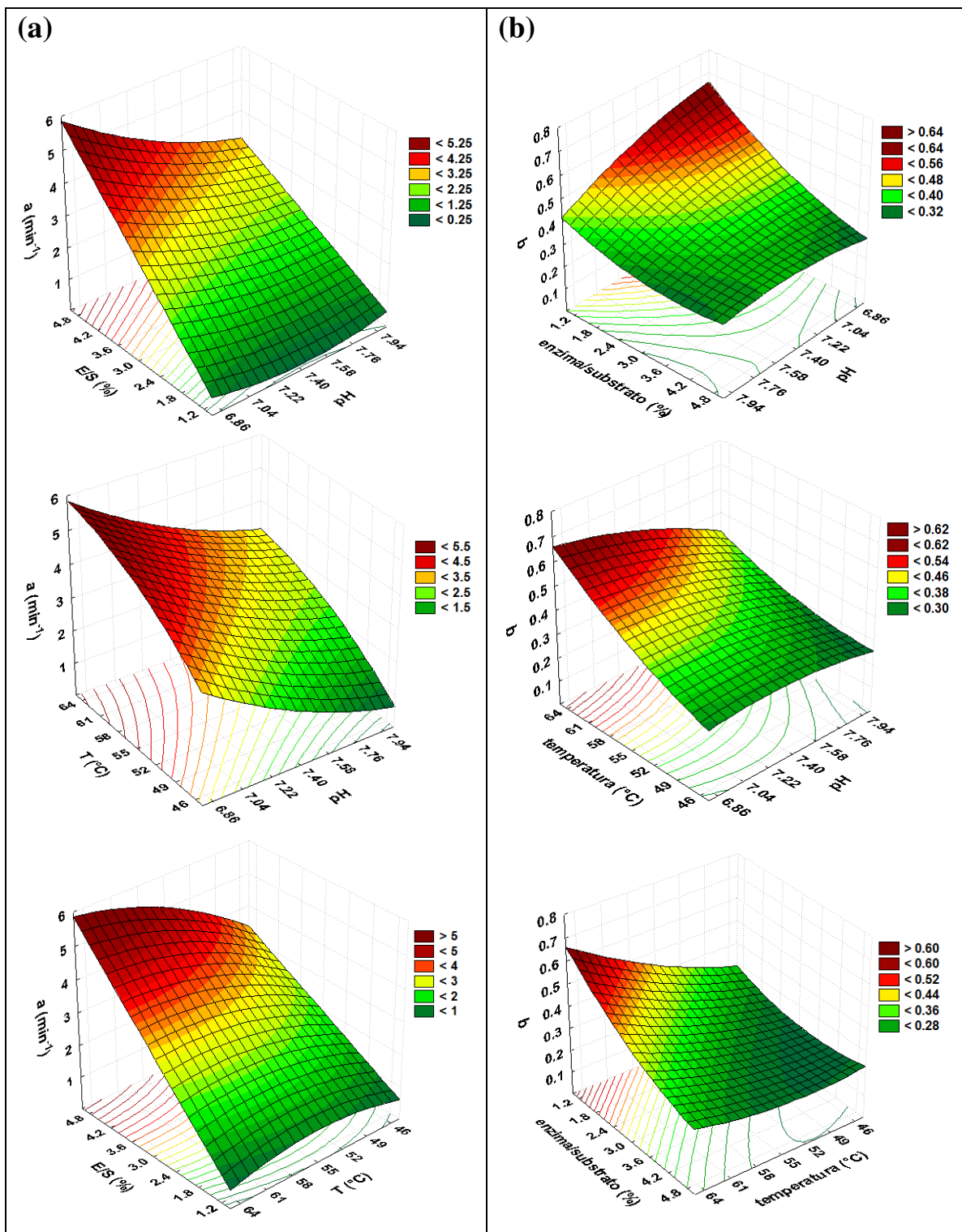


Figura 3.6. Superfícies de resposta para a influência das variáveis de processo sobre os parâmetros cinéticos: (a) “a”; (b) “b”

Tabela 3.9. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para constantes de hidrólise K_h e de inativação K_d

FATORES	K_h				K_d			
	Coef. de Regressão*	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor	Coef. de Regressão*	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor
Média	44,44	41,68	2,31	<0,01	14,29	14,04	1,66	<0,01
pH (L)	-9,05	-18,10	2,17	<0,01	-3,67	-7,36	1,56	<0,01
pH (Q)	2,45	6,20	2,39	0,04	---	1,05	1,72	0,56
E/S (L)	---	-0,56	2,17	0,80	-1,49	-2,99	1,56	0,10
E/S (Q)	---	4,40	2,39	0,11	1,75	3,62	1,72	0,07
T (L)	7,78	15,56	2,17	<0,01	4,41	8,82	1,56	<0,01
T (Q)	-3,62	-5,94	2,39	0,04	---	-0,57	1,72	0,75
pH(L) x E/S(L)	---	-1,99	2,84	0,51	---	2,49	2,04	0,26
pH(L) x T(L)	-3,05	-6,10	2,84	0,07	-2,55	-5,10	2,04	0,04
E/S(L) x T(L)	---	2,72	2,84	0,37	---	-2,38	2,04	0,28

* Parâmetros significativos ($p \leq 0,10$)

As análises de variância, apresentadas na Tabela 3.10, mostraram que tanto os modelos para a constante de hidrólise quanto para a constante de inativação tiveram significância estatística. Como no caso do parâmetro cinético “b”, o valor do erro puro dos dados da constante de inativação (K_d) é próximo de zero, o que significa que ambos os modelos podem ser usados para prever os valores das constantes de hidrólise e inativação dentro da faixa estudada.

Tabela 3.10. Análise de variância (ANOVA) para os modelos das constantes K_h e K_d

Fontes de variação	Modelo codificado para K_h (90% confiança)					Modelo codificado para K_d (90% confiança)				
	SQ	GL	MQ	F_{calc}	F_{tab}^*	SQ	GL	MQ	F_{calc}	F_{tab}^*
Regressão	2320,87	5	464,17	26,75	2,45	572,74	5	114,55	14,36	2,45
Resíduos	190,90	11	17,35			87,76	11	7,98		
Falta de ajuste	179,83	9	19,98	3,61	9,38	86,47	9	9,61	14,86	9,38
Erro Puro	11,06	2	5,53			1,29	2	0,65		
Total	2511,77	16				660,50	16			
R^2	0,92					0,87				

* valores de $F_{tabelado}$ para $p \leq 0,10$; SQ= soma de quadrados; GL= graus de liberdade; MQ = média quadrática

As superfícies de resposta para a constante de hidrólise são apresentadas na Figura 3.7. Observa-se que a constante de hidrólise atinge os valores máximos para condições de temperatura acima dos 55°C e pH inferiores a 7,0 (Figura 3.7a). Dessa forma, verifica-se o apresentado na Tabela 3.9, a qual mostra um forte efeito positivo da temperatura sobre o valor de K_h , e um efeito contrário do pH. A influência positiva da temperatura sobre o valor de K_h , está ligado ao acréscimo na energia cinética das moléculas componentes do sistema provocando um aumento na atividade da enzima. Por outro lado, para altos valores de pH, a estrutura da enzima pode estar sendo afetada negativamente e resultando em perda de atividade e desnaturação.

Como indicado anteriormente, a constante de inativação (K_d) foi influenciada por todas as variáveis estudadas, sendo a temperatura e o pH de reação os mais importantes. Como pode ser observado na Figura 3.7b, temperaturas de processo acima de 60°C causaram um incremento no valor de K_d , especialmente quando associado com valores baixos de pH (abaixo de 7,0), indicando que nessas condições é produzida uma maior inativação da enzima, tornando o processo ineficiente. Por outro lado, observou-se que concentrações de enzima inferiores a 2,0% favoreceram a inativação da mesma.

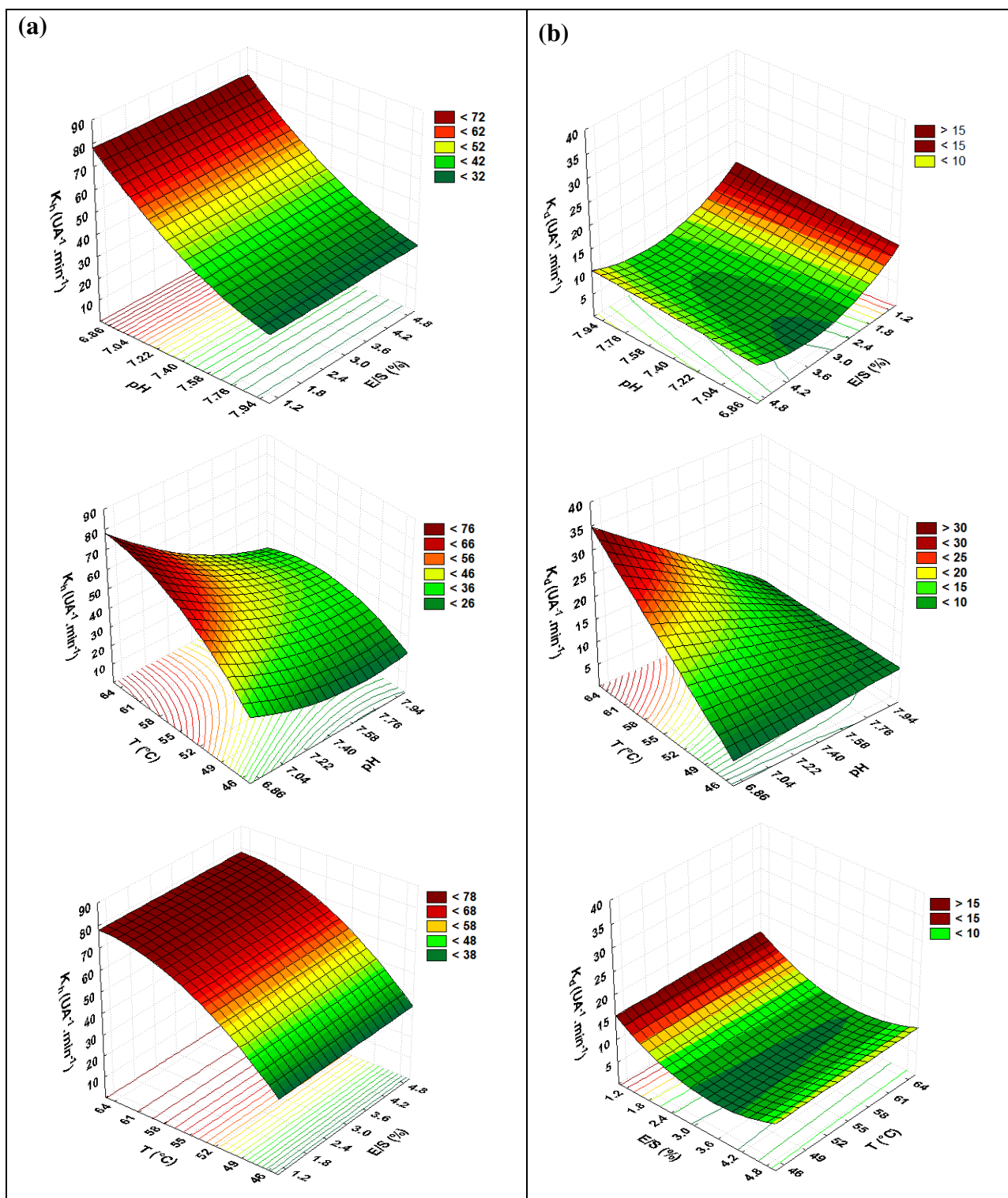


Figura 3.7. Superfícies de resposta para as constantes de reação: (a) hidrólise K_h ; (b) inativação K_d , no processo de hidrólise enzimática de pele de cação

3.3.3.3. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE PROTÉICA

De acordo com as superfícies de resposta apresentadas na Figura 3.5, as máximas respostas para o grau de hidrólise foram obtidas nas seguintes condições: pH menor que 7,2, relação enzima/substrato maior que 4,0% e temperaturas de reação entre 48 e 58°C. Por outro lado, os altos rendimentos obtidos para os diferentes ensaios do planejamento (acima de 90% para a maioria dos casos) e a não significância estatística do modelo obtido para a recuperação de proteína fez com que a recuperação de proteína fosse irrelevante para a otimização do processo. No caso das constantes de hidrólise temos que para pH na faixa de 6,8 e 7,2, razões de enzima/substrato entre 3,0 e 4,2% e temperaturas de reação entre 48 e 52 °C, tanto a constante de hidrólise (K_h) quanto a constante de inativação (K_d) apresentam os melhores resultados. Devido ao alto custo de ProtamexTM, devem ser utilizadas apenas as quantidades mínimas de enzima necessárias para garantir o desenvolvimento do processo sem afetar o seu rendimento. Assim, as condições ótimas de processo foram fixadas em um pH de 7,1, uma relação E/S de 4,0% e uma temperatura de reação de 51°C. Condições ótimas similares foram encontradas por Silva et al. (2010) para a hidrólise enzimática de carne de mexilhão usando ProtamexTM (pH = 6,85; relação E/S = 4,5% e T = 51°C). Em outro trabalho, Liaset et al. (2002) estabeleceu as condições ótimas de reação em um pH entre 6,5 e 7,6 e uma temperatura de reação entre 50 e 56 °C, para a hidrólise enzimática de espinhas de salmão usando a mesma enzima

O processo de hidrólise enzimática de pele de cação foi validado em triplicata nas condições de reação ótimas e os resultados são mostrados na Figura 3.8. O valor predito pelo modelo para o grau de hidrólise (17,3%) foi próximo do valor médio dos ensaios de validação ($19,3 \pm 0,2\%$) com um erro relativo de 11%. Considerando a complexidade do

processo de hidrólise enzimática e variação sazonal da matéria-prima o valor do erro relativo resulta adequado e o modelo válido para prever o grau de hidrólise dentro da faixa estudada. Observou-se pouca variação entre o valor da recuperação da proteína da primeira hora e o valor da quarta hora de processo (83,7 e 90,4% respectivamente), pelo que se pode afirmar que a taxa de solubilização da proteína foi muito maior na primeira hora de processo, a partir da qual ocorreu uma diminuição na taxa de recuperação de proteína e tal como mostrado nos análises posteriores, uma diminuição no peso molecular dos polipeptídios já solubilizados.

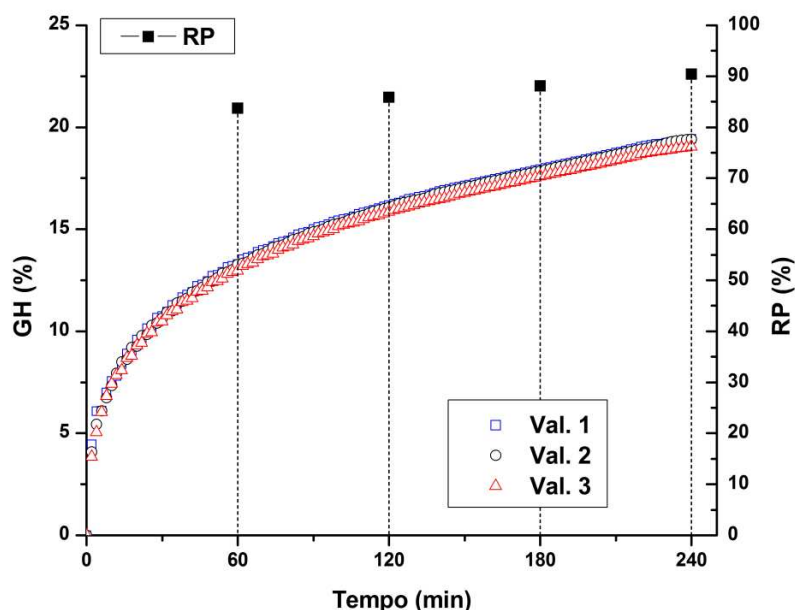


Figura 3.8. Grau de hidrólise e recuperação de proteína para os ensaios de validação do processo de hidrólise enzimática de pele de cação nas condições otimizadas.

3.3.4. CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO PROTÉICO

3.3.4.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A caracterização do hidrolisado protéico de pele de cação, obtido na condição otimizada, é apresentada na Tabela 3.11. O alto conteúdo de umidade se deve à proporção

de água adicionada para a homogeneização da amostra (proporção pele:água de 1:4 p/p). Esse hidrolisado caracterizou-se por possuir um alto conteúdo de proteína (aproximadamente 77% do total de sólidos) produto da clivagem ocorrida durante a hidrólise enzimática. O conteúdo de lipídeos foi muito baixo, ao ponto de não ser detectado na análise, o que poderia contribuir na minimização da taxa de oxidação lipídica, e, conseqüentemente, na manutenção da estabilidade e da qualidade sensorial do produto. Finalmente pode ser observado um elevado conteúdo de cinzas no hidrolisado que poderia estar associado à quantidade de NaOH adicionado para manter o pH constante durante a hidrólise.

Tabela 3.11. Composição centesimal do hidrolisado protéico de pele de cação obtido em condições ótimas.

Análise	Média ± desvio	
	b.u.	b.s.
Umidade (b.u.)	94,8 ± 0,3	
Proteína (b.u.)	4,0 ± 0,1	76,9 ± 1,9
Lipídeos (b.u.)	N.D.	N.D.
Cinzas (b.u.)	0,7 ± 0,1	13,5 ± 1,9

b.u. = base úmida, %; b.s. = base seca, %; N.D. = Não Detectado

Os resultados obtidos são próximos aos encontrados por outros autores para a composição centesimal de hidrolisados protéicos produzidos com ProtamexTM. Silva et al. (2010) reportaram teores de proteína e cinzas similares aos encontrados no presente trabalho (72,97 e 11,14% em base seca, respectivamente) para a composição centesimal de um hidrolisado protéico de mexilhão. Em outro trabalho, Liaset et al. (2003) obtiveram 82,9% de proteína e 10,3% de cinzas, em base seca, para a composição centesimal de um hidrolisado protéico de resíduos de salmão. Finalmente Ovissipour et al. (2009)

encontraram um teor de proteína de 71,6% (base seca) para o hidrolisado de vísceras de esturjão persa produzido com a mesma enzima.

3.3.4.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS

Como pode ser observado na Tabela 3.12, o perfil de aminoácidos tanto da pele de cação quanto do seu hidrolisado protéico foram bastante similares. Pequenas perdas de alguns aminoácidos podem ter ocorrido na etapa da centrifugação, onde é separada a fração solúvel de peptídeos. O hidrolisado exibiu maiores teores de glicina (15,32 g/100g de proteína) e ácido glutâmico (12,64 g/100g de proteína), sendo que, o resto de aminoácidos encontrou-se em proporções variadas na faixa de 1,52 e 8,81 g/100g de proteína. Não foi determinada a quantidade de triptofano, considerando a natureza da matéria-prima (aminoácido pouco presente em peles de animais).

Wasswa et al. (2008) reportaram os perfis de aminoácidos correspondentes a hidrolisados protéicos obtidos a partir de peles de perca do Nilo, carpa capim e tilápia do Nilo, destacando o conteúdo de glicina (17,86; 17,11 e 18,40 g/100g de proteína respectivamente) e alanina (17,42; 15,59; 17,03 g/100g proteína respectivamente) e não sendo reportados os teores de hidroxiprolina nem triptofano. Em geral, a quantidade de aminoácidos presente no hidrolisado protéico de pele de cação foi similar quando comparada com as quantidades obtidas para os diferentes hidrolisados mencionados, contudo, o teor de aminoácidos essenciais, com exceção da histidina, foi levemente superior, indicando que o hidrolisado protéico de pele de cação pode aportar maior quantidade de aminoácidos essenciais.

Tabela 3.12. Perfil de aminoácidos para a pele e o hidrolisado protéico de pele de cação obtido nas condições ótimas (g/100g de proteína).

Aminoácido	FAO/WHO		Pele de cação	Hidrolisado protéico	EA _{pele}		EA _{hidrolisado}	
	Criança ₁	Adulto ²			Criança ₁	Adulto ²	Criança ₁	Adulto ²
<u>Não essenciais</u>								
Ác. aspártico			7,01 ± 0,07 ^a	7,24 ± 0,07 ^a				
Ác. glutâmico			12,40 ± 0,07 ^a	12,64 ± 0,06 ^a				
Alanina			8,38 ± 0,01 ^a	8,81 ± 0,09 ^b				
Arginina			4,31 ± 0,04 ^a	5,11 ± 0,05 ^b				
Cisteína			1,37 ± 0,06 ^a	1,52 ± 0,02 ^a				
Glicina			16,20 ± 0,01 ^a	15,32 ± 0,17 ^b				
Hidroxiprolina			5,48 ± 0,09 ^a	4,98 ± 0,04 ^b				
Prolina			8,67 ± 0,09 ^a	8,01 ± 0,05 ^b				
Serina			4,08 ± 0,06 ^a	3,93 ± 0,02 ^a				
Tirosina			2,18 ± 0,09 ^a	2,02 ± 0,08 ^a				
<u>Essenciais</u>								
Fenilalanina	6,33 ³	1,90 ³	3,39 ± 0,04 ^a	3,13 ± 0,04 ^b	0,88 ³	2,93 ³	0,81 ³	2,71 ³
Histidina	1,90	1,60	1,88 ± 0,04 ^a	2,02 ± 0,04 ^a	0,99	1,18	1,06	1,26
Isoleucina	2,80	1,30	4,03 ± 0,07 ^a	4,34 ± 0,00 ^b	1,44	3,10	1,55	3,34
Leucina	6,60	1,90	5,42 ± 0,02 ^a	5,24 ± 0,01 ^b	0,82	2,85	0,79	2,76
Lisina	5,80	1,60	5,87 ± 0,10 ^a	6,37 ± 0,10 ^b	1,01	3,67	1,10	3,98
Metionina	2,52 ⁴	1,70 ⁴	2,11 ± 0,01 ^a	1,91 ± 0,00 ^b	1,38 ⁴	2,04 ⁴	1,36 ⁴	2,02 ⁴
Treonina	3,40	0,90	3,51 ± 0,09 ^a	3,74 ± 0,02 ^a	1,03	3,90	1,10	4,15
Valina	3,50	1,30	3,71 ± 0,09 ^a	3,68 ± 0,01 ^a	1,06	2,86	1,05	2,83
AAE			29,92	30,42				
PER ₇			2,16	2,19				
PER ₁₀			2,01	2,09				

Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre a pele de cação e o seu hidrolisado protéico.

AAE: Teor total de aminoácidos essenciais.

EA: Escore de aminoácidos essenciais = teor de aminoácido na amostra/padrão de referência da FAO/WHO (1991).

¹ Padrão de referência sugerido pela FAO/WHO (1991) (aminoácidos indispensáveis para crianças de 2 a 5 anos de idade).

² Padrão de referência sugerido pela FAO/WHO (1991) (aminoácidos indispensáveis para adultos);

³ Fenilalanina + tirosina.

⁴ Metionina + cisteína.

Os padrões de referência para crianças (2-5 anos) e adultos (FAO/WHO, 1991), assim como os escores de aminoácidos essenciais (EA) tanto para a pele de cação quanto para o seu hidrolisado protéico são também mostrados na Tabela 3.12. Pode-se observar que, para as crianças, os aminoácidos mais limitantes foram a leucina e a fenilalanina (EA = 0,79 e 0,81 respectivamente). No caso dos adultos, todos os aminoácidos cobriram as necessidades diárias requeridas. Com base nesses resultados, pode-se concluir que o hidrolisado protéico de pele de cação representa uma boa fonte de aminoácidos essenciais e que o seu consumo poderia ser mais bem indicado para pessoas adultas. No entanto, o consumo por crianças e adolescentes pode ser feito, sempre que seja em maior quantidade ou complementado com outro tipo de fontes protéicas que possam aportar os aminoácidos faltantes (em especial o triptofano).

Os valores da razão da eficiência protéica PER_7 e PER_{10} , também apresentados na Tabela 3.12, foram calculados considerando o conteúdo de sete e dez aminoácidos, segundo as equações 3.9 e 3.10, respectivamente. Tanto o valor de PER_7 quanto o PER_{10} apresentaram valores similares tanto para o hidrolisado de pele de cação quanto para a matéria-prima. Muitos autores reportaram valores estimados de PER, usando as mesmas equações, para hidrolisados protéicos obtidos a partir de diferentes fontes protéicas marinhas, como por exemplo: resíduos de atum (2,85 - 3,33), resíduos de bacalhau (1,60 – 2,27), carne de capelim (2,61 - 3,11), (OVISSIPOUR et al., 2010; ŠLIŽYTĖ et al., 2005; SHAHIDI et al., 1995). Como mostrado, a razão de eficiência protéica dos hidrolisados protéicos de pele de cação encontram-se perto dos valores reportados na literatura para outros tipos de matéria-prima. As pequenas diferenças observadas são produto de variações na composição de aminoácidos de cada matéria-prima.

3.3.4.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Os perfis eletroforéticos das proteínas e peptídeos presentes na pele de cação homogeneizada e no seu hidrolisado protéico são apresentados na Figura 3.9. Como pode ser observado na coluna 6, o peso molecular da maior parte das proteínas e peptídeos presentes na amostra homogeneizada, antes da adição da enzima, foi superior a 26,6 kDa, e estes peptídeos ficaram retidos no gel de empilhamento. Por outro lado, observou-se o desaparecimento total das bandas correspondentes aos peptídeos com pesos moleculares acima de 10 kDa e o aparecimento de bandas difusas abaixo de 6,5 kDa na primeira hora de hidrólise (coluna 2). A intensidade dessa banda foi diminuindo gradualmente (colunas 3, 4 e 5) conforme maiores graus de hidrólise foram atingidos, passando de 6,5 kDa (GH $\approx$ 13,0%) até menos de 3,5 kDa (GH $\approx$ 19,0%). Esses resultados associados aos altos rendimentos atingidos indicam que o processo foi efetivo para a recuperação de peptídeos de baixo peso molecular.

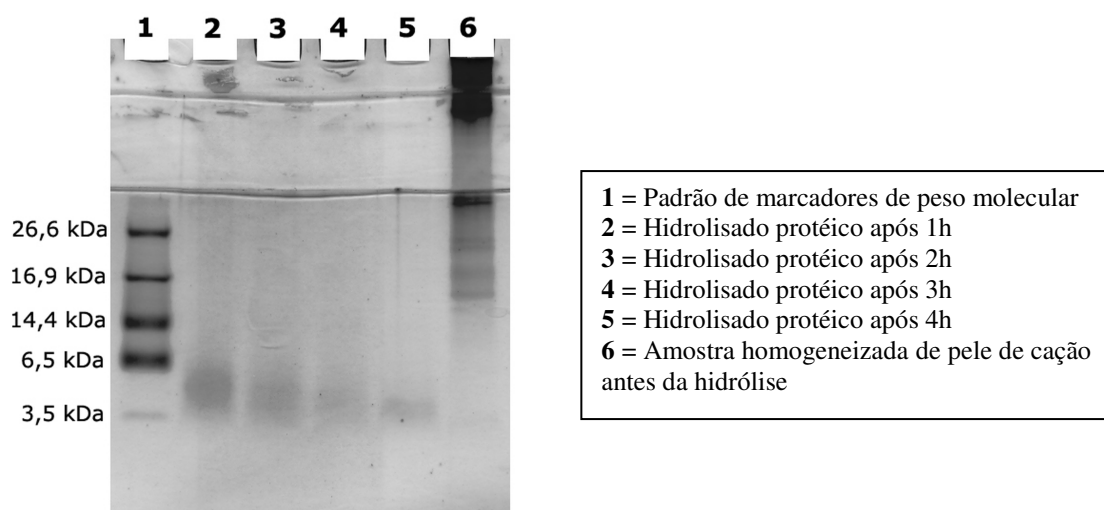


Figura 3.9. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de pele de cação e hidrolisado protéico produzido em diferentes tempos de reação comparados com o padrão de peso molecular

3.3.4.4. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

A Figura 3.10 mostra os perfis cromatográficos obtidos por cromatografia de exclusão molecular para o hidrolisado protéico de pele de cação produzido nas condições ótimas em diferentes tempos de hidrólise, assim como os pesos moleculares aparentes estimados para os peptídeos presentes no hidrolisado. Pelos cromatogramas observa-se que o peso molecular dos hidrolisados protéicos de pele de cação variou entre 21,7 kDa e 1,1 kDa. Em geral, a distribuição de peso molecular dos hidrolisados foi similar, com um pico característico em torno de 8 minutos de retenção (peso molecular aproximado de 22 kDa) e picos sucessivos entre 11 e 20 minutos de retenção para todas as amostras. Um aumento na área do pico correspondente a 1,9 kDa (aproximadamente 18 minutos de eluição) foi observado nas duas primeiras horas de hidrólise (Figura 3.10A e B). Na terceira hora de hidrólise (Figura 3.10C) houve um incremento na área dos picos correspondentes ao peso molecular aproximado de 22,5; 5,6 e 3,3 kDa, uma redução da área dos picos em torno de 9 kDa e a formação de um pico em torno dos 20 minutos de retenção. Finalmente na quarta hora de hidrólise (Figura 3.10D) observou-se uma redução importante na área dos picos em torno de 3,5 kDa e um aumento nos picos entre 1,8 e 1,1 kDa.

Wasswa et al. (2007) obteve um comportamento similar para a hidrólise enzimática de pele de carpa capim usando Alcalase®. No trabalho os autores mostram que o peso molecular dos peptídeos presentes nos hidrolisados variou entre 0,15 kDa e 3,5 kDa para 14,9% e 5,0% de grau de hidrólise respectivamente. Por outro lado, You et al. (2009) mostraram que os hidrolisados de carne de botia produzidos com ProtamexTM, estiveram compostos por peptídeos com peso molecular inferior a 3 kDa e a fração correspondente a

0,5 kDa aumentou gradualmente na medida que maiores graus de hidrólise foram atingidos (de 18 a 33% para 2 e 20 horas de processo, respectivamente).

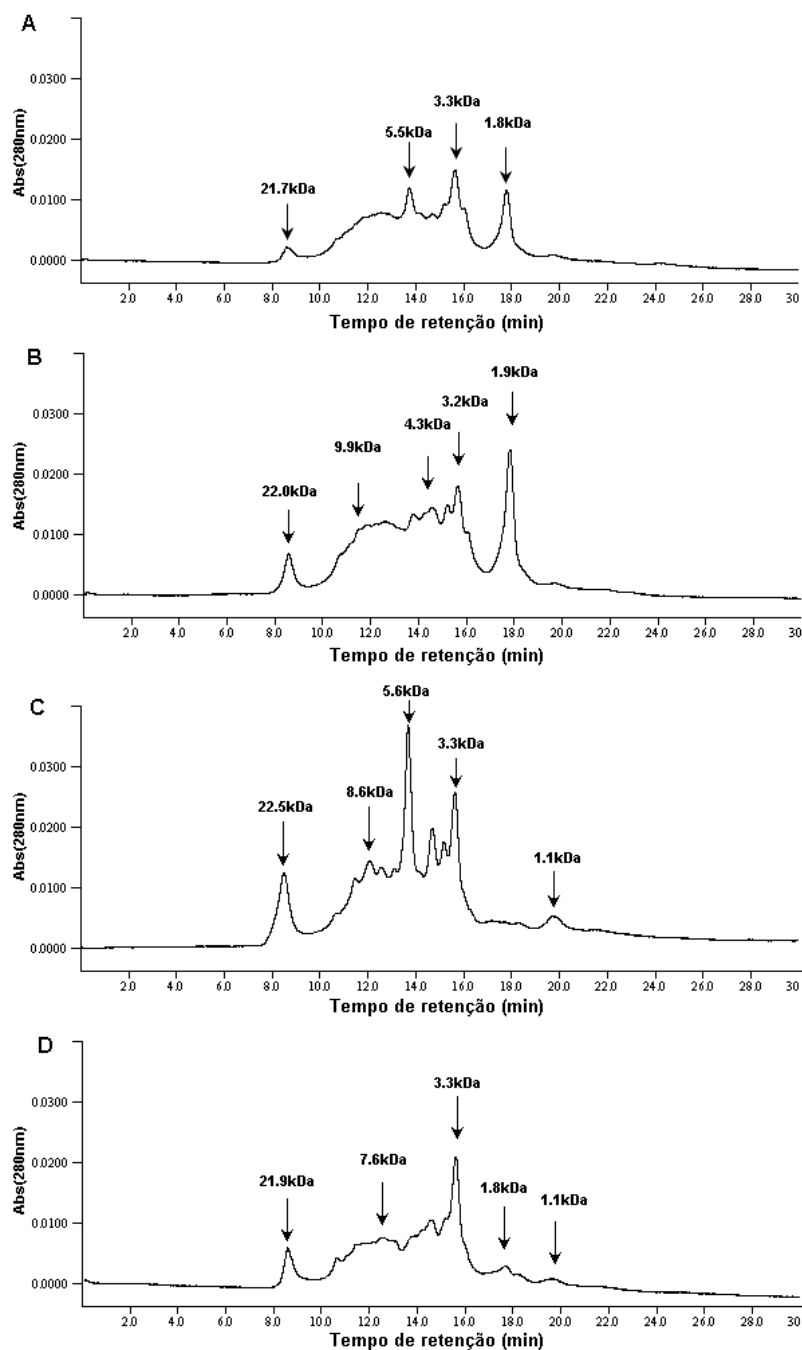


Figura 3.10. Perfis cromatográficos obtidos por SE-HPLC para os hidrolisados protéicos de pele de cação produzidos em diferentes tempos de hidrólise. (A) 1h; (B) 2h; (C) 3h; (D) 4h.

A variação nos perfis cromatográficos apresentados pode ser associada ao mecanismo de reação da enzima (especificidade) e à possibilidade de formação de agregados. Segundo Irvine (1997), peptídeos muito pequenos, com poucos resíduos de aminoácidos, não possuem estruturas estáveis, podendo existir em conformações diversas. Polipeptídios podem associar-se com outras moléculas ou com eles mesmos formando moléculas de maior tamanho. Além disso, a cromatografia de exclusão molecular é um método que permite a análise de peptídeos e polipeptídios na sua estrutura real (incluindo agregados e aglomerados), portanto, só podem ser estimados pesos moleculares aparentes. No entanto, a eletroforese permite a avaliação de peptídeos em estruturas lineares, permitindo a obtenção dos pesos moleculares reais. A presença de peptídeos agregados explicaria a formação de picos em torno dos 22 kDa em todos os cromatogramas e a ausência das bandas correspondentes no perfil eletroforético.

3.4.CONCLUSÕES

A cinética da hidrólise enzimática de pele de cação caracterizou-se por uma alta taxa inicial de reação seguida de uma fase estacionária. A equação cinética aplicada por outros autores para o ajuste dos valores experimentais de grau de hidrólise em função do tempo resultou adequada para a modelagem da hidrólise protéica de pele de cação. Foi avaliada a influência das variáveis de processo sobre os parâmetros cinéticos desta equação e sobre as constantes de hidrólise e inativação.

Todas as variáveis estudadas tiveram influência significativa sobre o grau de hidrólise sendo a mais importante a relação enzima/substrato. Por outro lado a recuperação de proteína não mostrou diferença significativa entre os diferentes ensaios, reportando

valores acima de 90% para a maioria dos casos. A condição ótima de processo foi fixada em 51°C; E/S de 4,0% (p/p) e pH de 7,1. Nessas condições o grau de hidrólise foi de 19,3% e a recuperação de proteína foi de 90,3%.

O perfil de aminoácidos mostrou que o hidrolisado obtido em condições otimizadas representa uma boa fonte de aminoácidos essenciais cobrindo os requerimentos diários de consumo em adultos, no entanto, o hidrolisado foi limitante em dois aminoácidos (leucina e fenilalanina) no caso de crianças.

O perfil eletroforético e os cromatogramas de exclusão molecular revelaram a eficiência do processo para a obtenção de peptídeos de baixo peso molecular. As frações peptídicas presentes no hidrolisado apresentaram pesos moleculares inferiores a 6,5 kDa. Além disso, foi observada a formação de agregados de peptídeos com peso molecular aparente de 22 kDa.

3.5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G.H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**, v. 78, p. 69-74, 2002.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985. 427p.

AOAC. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists** (16th ed.). Washington, D.C., USA, 1997.

ARASAKI, L.H. **Otimização do processo de obtenção de hidrolisado protéico de carne escura de atum**. Campinas, 2000. 86p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ASPMO, S.I.; HORN, S.J.; EIJSINK, V.G.H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1957-1966, 2005.

ÁVILA-DA-SILVA, A.O.; CARNEIRO, M.H.; MENDONÇA, J.T.; SERVO, G.J.M.; BASTOS, G.C.C.; BATISTA, P.A. Produção pesqueira marinha do estado de São Paulo no ano 2005. **Série de Relatórios Técnicos, São Paulo**, n. 26, p. 1-44, 2007.

BEAULIEU, L.; THIBODEAU, J.; BRYL, P.; CARBONNEAU, M.E. Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab, (*Chionoecetes opilio*) by-product fractions: A source of high-valued biomolecules. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3332-3342, 2009.

BLIGH, E.G.; DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v. 118, p. 559-565, 2010.

CHABANON, G.; CHEVALOT, I.; FRAMBOISIER, X.; CHENU, S.; MARC, I. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1419-1428, 2007.

CHABEAUD, A.; DUTOURNIÉ, P.; GUÉRARD, F.; VANDAJON, L.; BOURSEAU, P. Application of response surface methodology to optimize the antioxidant activity of a Saithe (*Pollachius virens*) hydrolysate. **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 445-455, 2009.

CHOI, Y.J.; HUR, S.; CHOI, B.D.; KONNO, K.; PARK, J.W. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. C17-C24, 2009.

CORDLE, C.T. Control of food allergies using protein hydrolysates. **Food Technology**, v. 48, No 10, p. 72-76, 1994.

CUI, C.; ZHOU, X.; ZHAO, M.; YANG, B. Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 37-41, 2009.

DI BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A.N.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1296-1307, 2011

DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 419-426, 1996.

FAO/WHO. **Energy and protein requirements**. Report of joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, n. 724, 1991.

FRIEDMAN, F. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 6-29, 1996.

GONZALEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 523-528, 1994.

GUERARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 489-498, 2002.

GUERARD, F.; SEILOS, D.; LE GAL, Y. Fish and shellfish upgrading, traceability. **Advance in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 96, p. 127-163, 2005.

HENSE, H. **Avaliação dos parâmetros termofísicos e cinética de congelamento de cação**. Campinas, 1990. 167p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

HOLANDA, H.D. **Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos**. Campinas, 2004. 137p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

HSU, K.C. Purification and antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. **Food Chemistry**, v. 122, p. 42-48, 2010.

IBAMA. **Estatística da pesca 2007 Brasil grandes regiões e unidades da federação**. Brasília: Coordenação de Estatística e Informação Pesqueira, 2007. p. viii – 98.

IRVINE, G.B. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 352, p. 387-397, 1997.

JE, J.; LEE, K.; LEE, M.H.; AHN, C. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 42, p. 1266-1272, 2009.

KECHAOU, E.S.; DUMAY, J.; DONNAR-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J.P.; BERGÉ J.P.; AMAR, R.B. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardine pichardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 158-164, 2009.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 792-800, 2010.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Kinetics of the hydrolysis of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 131-139, 2000.

KUROZAWA, L.E. **Estudos dos processos de hidrólise enzimática e secagem por atomização para obtenção de hidrolisado protéico de frango em pó**. Campinas, 2009. 148p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KUROZAWA, L.E.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Influência das condições de processo na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 557-566, 2009.

KUROZAWA, L.E.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, p. C405-C412, 2008.

LEE, S.; QIAN, Z.; KIM, S. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 118, p. 96-102, 2010.

LIASET, B.; NORTVEDT, R.; LIED, E.; ESPE, M. Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by ProtamexTM protease. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1263-1269, 2002.

LIASET, B.; JULSHAMN, K.; ESPE, M. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymatic hydrolysis of salmon frames with ProtamexTM. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1747-1759, 2003.

LIN, L.; LI, B. Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii Steenstrup*) skin gelatin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2290-2295, 2006.

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 89-113, 1994.

MÁRQUEZ, M.C.; VÁZQUEZ, M.A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 111-117, 1999.

MARQUEZ, M.C.; FERNANDEZ, V. Enzymatic hydrolysis of vegetable proteins: Mechanism and kinetics. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 481-490, 1993.

NAKADE, K.; HANEKO, H.; OKA, T.; AHHMED, A.M. A cattle heart protein hydrolysate ameliorates hypercholesterolemia accompanied by suppression of the cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.73, p. 607-612, 2009.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 571-578, 2005.

OVISSIPOUR, M.; ABEDIAN, A.K.; MOTAMEDZADEGAN, A.; NAZARI, R.M. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacores*). **Food and Bioprocess Technology**, DOI 10.1007/s11947-010-0357-x, 2010.

OVISSIPOUR, M.; SAFARI, R.; MOTAMEDZADEGAN, A.; SHABANPOUR, B. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. **Food and Bioprocess Technology**, DOI 10.1007/s11947-009-0284-x, 2009.

SCHAGGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v.166, n.2, p.368-379, 1987.

SHAHIDI, F.; HAN, X.Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, p. 285-293, 1995.

SHEIH, I.; FANG, T.; WU, T.; LIN, P. Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1202-1207, 2010.

SICHERER, S.H.; SAMPSON, H.A. Food allergy: Recent advances in pathophysiology and treatment. **Annual Review of Medicine**, v. 60, p. 261-277, 2009.

SILVA, V.M.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of mussel meat. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. C36-C42, 2010.

SIMPSON, B.K.; NAYERI, G.; VAYLAYAN, V.; ASHIE, I.N.A. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1/2, p. 131-138, 1998.

ŠLIŽYTĖ, R.; DAUKŠAS, E.; FALCH, E.; STORRØ, I.; RUSTAD, T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2021-2033, 2005.

SMACCHI, E.; GOBBETTI, M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. **Food Microbiology**, v. 17, p. 129-141, 2000.

TANG, C.; PENG, J.; ZHEN, D.; CHEN, Z. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 115, p. 672-678, 2009.

VENUGOPAL, V. Seafood proteins: nutritional value, bioactive peptides, marine and cold-adapted enzymes. In: VENUGOPAL, V. **Marine Products for Healthcare. Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds From the Ocean**. London: CRC Press, 2009. p. 103-142.

VERCRUYSSSE, L.; VAN CAMP, J.; SMAGGHE, G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8106-8115, 2005.

WASSWA, J.; TANG, J.; GU, X. Functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), Nile perch (*Lates niloticus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin hydrolysates. **International Journal of Food Properties**, v. 11, n. 2, p. 339-350, 2008.

WASSWA, J.; TANG, J.; GU, X.; YUAN, X. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1698-1704, 2007.

WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**, New York: Marcel Dekker, 1994.

WHITE, J.A.; HART, R.J.; FRY, J.C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

YOU, L.; ZHAO, M.; CUI, C.; ZHAO, H.; YANG, B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 235-240, 2009.

ZHANG, W.; XIAO, S.; SAMARAWEERA, H.; LEE, E.J.; AHN, D.U. Review improving functional value of meat products. **Meat Science**, v. 86, p. 15-31, 2010.

CAPÍTULO 4. SECAGEM DE HIDROLISADO PROTÉICO DE PELE DE CAÇÃO POR ATOMIZAÇÃO

RESUMO

Neste capítulo, foi avaliada a influência das variáveis do processo de secagem por atomização sobre as propriedades físico-químicas e antioxidantes do hidrolisado protéico de pele de cação em pó, usando maltodextrina 10DE como agente carreador. O estudo foi realizado em um *spray drier* de escala laboratorial, onde a temperatura do ar de secagem (150 – 190°C) e a concentração de agente carreador (5 – 20%) foram variadas de acordo com um delineamento composto central rotacional. As respostas analisadas foram a umidade final, a atividade de água, a densidade aparente, a higroscopicidade, o tamanho de partícula e a capacidade antioxidante, determinada pelos métodos de redução do íon férrico (*FRAP*) e captura do radical catiônico ABTS⁺⁰ (*TEAC*). Os resultados mostraram que a adição de maltodextrina contribuiu significativamente para obtenção de partículas com menor umidade e higroscopicidade e maiores tamanhos de partícula e densidade aparente. Além disso, quanto maior foi a concentração de maltodextrina adicionada, maiores foram os valores de capacidade antioxidante determinadas por ambos os métodos, possivelmente pela formação de compostos de Maillard entre os peptídeos do hidrolisado e a maltodextrina. Finalmente, as micropartículas apresentaram estruturas esféricas e irregulares, e com superfície rugosa, ficando maiores conforme maiores temperaturas e concentrações de agente carreador foram utilizadas.

4.1.INTRODUÇÃO

Como descrito no capítulo 3, o hidrolisado protéico de pele de cação é uma fonte potencial de peptídeos de baixo peso molecular. No entanto, um dos maiores problemas tecnológicos dos hidrolisados protéicos é a sua alta perecibilidade, devido seu alto teor de umidade e à sua grande concentração de peptídeos (ADLER-NISSEN, 1985), motivo pelo qual tratamentos posteriores são requeridos para garantir a sua conservação.

A secagem por atomização, ou *spray drying*, é o método mais usado para a redução da umidade de materiais líquidos e tem sido aplicada na conservação de hidrolisados protéicos. Consiste na atomização de um produto líquido para a criação de gotículas que são secas e transformadas em partículas individuais, na forma de pó, grânulos ou aglomerados, quando conduzidas através de um meio gasoso quente, na maioria dos casos ar. O material alimentado ao atomizador pode ser uma solução, uma suspensão ou uma pasta (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005; GHARSALLAOUI et al., 2007). Dentre as principais vantagens desse método de secagem está a eficiência, a manutenção das propriedades nutricionais originais e a simplicidade de operação em forma contínua e a baixo custo (XIN e MUJUMDAR, 2010).

Os hidrolisados protéicos desidratados por atomização são altamente higroscópicos devido à sua grande área superficial interna (produto da sua estrutura amorfa). Ademais, possuem baixa estabilidade devido à sua baixa temperatura de transição vítrea (T_g), a qual é responsável por alterações estruturais como aglomeração, adesividade, colapso e cristalização. Como a T_g aumenta com o aumento do peso molecular, a adição de agentes carreadores, em especial a maltodextrina, tem sido sugerida para elevar a temperatura de

transição vítrea de alguns hidrolisados de proteínas, tais como, proteína de carne de frango e caseína (KUROZAWA et al., 2009b, c; ROCHA et al., 2009; ROOS e KAREL, 1991). Nestes trabalhos, os hidrolisados protéicos se mostraram menos higroscópicos e menos amargos, indicando que a adição de agentes carreadores melhora a estabilidade e as características sensoriais dos hidrolisados.

As propriedades físico-químicas de pós obtidos por *spray drying* dependem das características tanto do material de alimentação (viscosidade, tamanho de partícula, vazão de alimentação) quanto do ar de secagem (temperatura, vazão). Uma das propriedades mais interessantes nos pós é o tamanho de partícula, pois dele dependem algumas outras características importantes para o manuseio do produto, entre elas a facilidade para o fluxo, mistura com outros componentes, compactação e segregação. Além disso, o tamanho de partícula influencia algumas propriedades físico-químicas e sensoriais dos pós, tais como: características de reconstituição, taxa de dissolução, solubilidade, densidade, sabor, aroma, textura, entre outras (O'HAGAN et al., 2005).

Embora a quantidade de trabalhos relacionados ao estudo das características antioxidantes dos hidrolisados de proteínas seja grande, poucos estudos foram realizados com respeito à influência das variáveis de processo e da adição de agentes carreadores nas propriedades antioxidantes dos hidrolisados protéicos em pó.

Portanto, o presente capítulo tem como objetivo principal estudar o efeito da temperatura do ar de entrada e da adição de maltodextrina, como agente carreador, sobre as características físico-químicas, morfológicas e antioxidantes do pó de hidrolisado protéico

de pele de cação obtido por *spray drying*, nas condições ótimas de hidrólise, estabelecidas no capítulo 3 da presente dissertação.

4.2.MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. MATERIAL

4.2.1.1. MATÉRIA-PRIMA

Para a realização desse trabalho, foi utilizada a pele de cação congelada (resíduo gerado na indústria no preparo de filés de cação) fornecidos pela empresa BOM PEIXE S.A. (Pirassununga, Brasil).

4.2.1.2. ENZIMA

No processo de hidrólise enzimática da pele de cação, foi utilizada a ProtamexTM, uma mistura comercial de serina e metaloendopeptidases do tipo alcalina, produzida pelas bactérias *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade enzimática declarada de 1,5 UA/g. A enzima foi fornecida pela NOVOZYMES (Bagsvaerd, Dinamarca), sendo as condições ótimas de atividade: temperatura entre 50 e 55 °C e pH entre 6,0 e 7,5.

4.2.1.3. AGENTE CARREADOR

Para o processo de secagem do hidrolisado protéico, foi utilizada a maltodextrina Mor-rex® 1910 com DE 10 produzida pela CORN PRODUCTS (Mogi-Guaçu, Brasil).

4.2.1.4. REAGENTES

Para a realização dos análises deste capítulo foram utilizados os seguintes reagentes:

TPTZ (2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine), ABTS (2,2'-AZINO - BIS (3-ethylbenzo - thiazoline - 6 - sulfonic acid) diammonium salt), persulfato de potássio, Trolox, FeSO₄.7H₂O (SIGMA-ALDRICH, Alemanha), FeCl₃.6H₂O (SYNTH, Brasil), ácido gálico e ácido ascórbico (ECIBRA, Brasil)

4.2.2. MÉTODOS

4.2.2.1. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A produção de hidrolisado protéico de pele cação em escala maior foi realizada seguindo os passos descritos no capítulo 3 da presente dissertação (item 3.2.2.2, Figura 3.1). Foi utilizado um reator de 10L de capacidade, com sistema de agitação e aquecimento utilizando o método pH-estático proposto por Adler-Nissen (1985) . A pele de cação previamente congelada foi cortada em cubos e misturada com água destilada (proporção pele:água de 1:4 p/p). A mistura foi aquecida até 90 °C durante 5 minutos para facilitar a homogeneização. A mistura, homogeneizada mediante um triturador manual, foi transferida para tacho encamisado conectado a um sistema de agitação mecânica com hélice. A temperatura e o pH (ajustado com NaOH 2N), foram estabilizados nas condições ótimas de hidrólise determinadas no capítulo anterior (pH = 7,1; T = 51°C). Em seguida, a enzima foi adicionada (relação E/S = 4,0%; g enzima/100g proteína) e a reação foi monitorada durante 4 horas com ajuda de um titulador automático (METTLER TOLEDO T50, Schwerzenbach, Suíça), sendo usado NaOH 2N como titulante. Finalizado o tempo a enzima foi inativada por aquecimento da mistura (90°C durante 10 minutos) e seguidamente a mistura foi resfriada a temperatura ambiente. Finalmente o hidrolisado protéico foi centrifugado a 4000g por 15 minutos (BECKMAN COULTER, modelo Allegra 25R, Fullerton,

California, Estados Unidos), com objetivo de separar a fração insolúvel. A fração solúvel de hidrolisado protéico foi congelada e armazenada até seu uso nas secagens.

4.2.2.2. SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO

Os experimentos de secagem do hidrolisado protéico de pele de cação foram realizados em um mini secador com sistema de atomização (*spray dryer* escala laboratorial LABMAQ, modelo MSD 1.0, Ribeirão Preto, Brasil) mostrado na Figura 4.1, e disponível no Laboratório de Engenharia de Processos (Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP). O equipamento foi operado usando um bico atomizador tipo duplo fluido com um orifício de 1,2mm de diâmetro. As dimensões da câmara de secagem foram de 500 mm x 150 mm. A vazão do ar de secagem foi de 36 m³/h, a pressão do ar comprimido de 0,25 MPa e a vazão do ar comprimido de 2,4 m³/h. A alimentação do secador foi realizada através de uma bomba peristáltica, cuja vazão foi fixada em 0,7 L/h.



Figura 4.1. Mini *spray dryer* usado para a produção de hidrolisado protéico de pele de cação em pó.

4.2.2.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para o estudo da influência das variáveis de processo na secagem por atomização do hidrolisado protéico de pele de cação foi utilizado um planejamento experimental 2^2 completo, com três pontos centrais (nível 0) e quatro pontos axiais (níveis $\pm \alpha$) totalizando 11 ensaios onde as variáveis independentes foram a temperatura do ar de entrada ao secador (T_{ar}) e a concentração de agente carreador (C). As respostas foram: umidade (X), atividade de água (a_w), densidade aparente (ρ_{ap}), higroscopicidade (H), diâmetro médio volumétrico de partícula ($D_{[4,3]}$), capacidade antioxidante para redução do íon férrico (FRAP) e capacidade antioxidante para captura de radical catiónico ABTS⁺⁰ (TEAC). O delineamento experimental assim como as faixas de cada variável estudada estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Planejamento experimental para o estudo da secagem por atomização do hidrolisado protéico de pele de cação.

ENSAIO	VARIÁVEIS CODIFICADAS		VARIÁVEIS DECODIFICADAS	
	T_{ar}	C	T_{ar} (°C)	C (%)
1	-1	-1	156	7,2
2	1	-1	184	7,2
3	-1	1	156	17,8
4	1	1	184	17,8
5 (a)	-1,41	0	150	12,5
6 (a)	1,41	0	190	12,5
7 (a)	0	-1,41	170	5,0
8 (a)	0	1,41	170	20,0
9 (C)	0	0	170	12,5
10 (C)	0	0	170	12,5
11 (C)	0	0	170	12,5

T_{ar} = temperatura do ar de entrada; C = concentração de agente carreador

4.2.2.4. UMIDADE

A umidade das amostras foi determinada em triplicata seguindo a metodologia sugerida pela A.O.A.C (1997). Para isso 2 gramas de amostra foram pesados em cadinhos com peso conhecido e foram colocados em estufa a 103 - 104 °C por 4 horas aproximadamente, até atingir peso constante.

4.2.2.5. ATIVIDADE DE ÁGUA

A atividade de água das amostras foi determinada a 25 °C, utilizando-se um higrômetro digital AQUALAB, modelo Series 3TE (Decagon Devices Inc., Pullman, WA). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.2.6. DENSIDADE APARENTE

Para a determinação da densidade aparente, foram tomados os pesos de pó correspondentes a 10 mL de uma proveta graduada. Os resultados foram expressos em kg/m³.

4.2.2.7. HIGROSCOPICIDADE

A determinação da higroscopicidade foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cai e Corke (2000), com algumas modificações. Foi colocado 1 g de amostra e colocada em um recipiente hermético contendo uma solução saturada de NaCl (umidade relativa de 75.29%). Após uma semana, as amostras foram pesadas e a higroscopicidade foi expressa como g de umidade absorvida por 100 g de amostra (g/100g). As mudanças

aparentes nas amostras foram acompanhadas mediante inspeção visual durante todos os dias da análise e capturadas mediante fotografias.

4.2.2.8. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA

A análise da distribuição de tamanho de partículas do hidrolisado protéico em pó foi determinada por difração a laser em um Laser Scattering Spectrometer Mastersizer (modelo MAM 5005, marca Malvern Instruments LTD, Worcestershire, Reino Unido). O diâmetro médio foi determinado baseado no diâmetro médio de uma esfera de mesmo volume (diâmetro de De Brouckere $D_{[4,3]}$), geralmente utilizado para caracterizar uma partícula. Para essa análise, uma pequena quantidade do produto em pó foi dispersa em etanol 99,5% e submetida a 5 leituras de distribuição de tamanho de partículas.

4.2.2.9. MICROESTRUTURA DA PARTÍCULA

Para análise da microestrutura do hidrolisado protéico em pó, uma pequena porção do material foi observada em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo JSM5800LV, Tokio, Japão). As amostras foram fixadas em porta-espécimens metálicos (*stubs*) através do uso de uma fita adesiva de dupla face convencional. Foi realizada uma metalização da amostra utilizando-se o processo de evaporação de ouro a vácuo em um *sputter coater* (BALZERS, modelo SCD050, Liechtenstein, Reino Unido). Para esse processo, foi aplicada uma corrente de 40mA durante 180 segundos, tendo como gás de arraste o argônio a um vácuo de 0,1 mbar. As amostras metalizadas foram mantidas em um suporte fechado, dentro de um dessecador, até o momento da análise no microscópio eletrônico de varredura.

4.2.2.10. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PARA A REDUÇÃO DO ÍON FÉRRICO

(Método FRAP)

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método *FRAP* foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. Foram preparadas soluções estoque de *TPTZ* (2,4,6-tripiryridyl-*s*-triazine) 10 mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mM e tampão acetato (300mM; pH 3,6). O reagente de trabalho *FRAP* foi preparado no momento da análise misturando 25 mL de tampão acetato (300 mM; pH 3,6), 2,5 mL de solução estoque de *TPTZ* (2,4,6-tripiryridyl-*s*-triazine; 10 mM) e 2,5 mL de solução estoque de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM). Para o preparo das amostras, 2 gramas de cada pó de hidrolisado protéico formulado com maltodextrina foram diluídos em 10 mL de água. No caso do hidrolisado puro em pó e da maltodextrina pura, foram utilizadas soluções com uma concentração aproximada de 50 mg de proteína/mL e 20 mg de maltodextrina/mL de solução, respectivamente. O hidrolisado puro na forma líquida foi diluído até atingir uma concentração de 20 mg de proteína/mL solução. Posteriormente, 250 μL de amostra diluída foram adicionados a cinco mililitros de reagente *FRAP* recentemente preparado e a reação da mistura foi feita na escuridão mantendo a temperatura em 37 °C durante 30 minutos. Terminado o tempo de reação, leituras de absorbância foram feitas a 593 nm em um espectrofotômetro UV-visível (UNICO, modelo SQ-2800 *Single Beam*, *United Products & Instruments Inc*, Dayton, Estados Unidos), usando uma cubeta de vidro com 1 cm de caminho ótico. Foram preparadas curvas padrão deixando reagir 250 μL de soluções de sulfato ferroso, Trolox, ácido gálico e ácido ascórbico em diferentes concentrações (100 – 2000 μM) com o reagente *FRAP* recentemente preparado. Tampão acetato foi utilizado como branco para a calibração do equipamento.

4.2.2.11. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE POR CAPTURA DO RADICAL CATIONICO
ABTS⁺⁰ (Método TEAC)

A capacidade de captura do radical catiônico ABTS⁺⁰ foi determinada pelo método proposto por Re et al. (1999) com algumas modificações. Foram preparadas soluções estoque de ABTS (2,2'-AZINO - BIS (3-ethylbenzo - thiazoline - 6 - sulfonic acid) diammonium salt) 7 mM, persulfato de potássio 150 mM e tampão fosfato salino (PBS - Phosphate Buffered Saline) (pH = 7,4). A solução de trabalho, contendo o radical livre ABTS⁰⁺, foi preparada misturando-se 83 µL de solução estoque de persulfato e 5 mL de solução estoque de ABTS, deixando reagir à temperatura ambiente e na escuridão durante 16 - 24 horas. Posteriormente, uma alíquota de 0,5mL de solução de trabalho foi diluída com PBS até atingir uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ em um comprimento de onda de 734 nm. O espectrofotômetro UV-visível (UNICO, modelo SQ-2800 *Single Beam*, United Products & Instruments Inc, Dayton, Estados Unidos) foi previamente zerado com PBS. Para o preparo das amostras, 0,2 g de cada pó de hidrolisado protéico formulado com maltodextrina foram diluídas em 10 mL de água. No caso do hidrolisado puro em pó e da maltodextrina pura, foram utilizadas soluções com uma concentração aproximada de 5 mg de proteína/mL e 20 mg de maltodextrina/mL de solução, respectivamente. A amostra de hidrolisado puro líquido foi diluído até atingir uma concentração aproximada de 2 mg de proteína/mL de solução. Para a determinação da capacidade antioxidante, 100 µL de amostra diluída foram adicionados a 10mL de solução de trabalho, diluída na hora da análise. A absorbância ($\lambda = 734$ nm) da mistura foi medida após 6 min de reação, a qual foi desenvolvida em condições ambientais e na escuridão. A mudança na absorbância provocada pela amostra foi quantificada, com base em curvas padrão de diferentes

substâncias antioxidantes conhecidas (Trolox, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ácido gálico e ácido ascórbico), e expressas em μmol equivalente da substância padrão por grama de proteína.

Para o cálculo dos modelos matemáticos e a discussão dos resultados de ambos os métodos de determinação de capacidade antioxidante, foram considerados os resultados expressos em equivalentes em $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para o *FRAP*, e equivalentes em Trolox para o *TEAC*, por serem as substâncias padrão utilizadas nas metodologias originais.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais para as diferentes respostas estudadas, com exceção da atividade antioxidante, são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Resultados experimentais da umidade e da atividade de água, densidade aparente, higroscopicidade e diâmetro volumétrico médio de partícula para o hidrolisado protéico de pele de cação em pó.

ENSAIO	VARIÁVEIS		RESPOSTAS AO PLANEJAMENTO				
	T_{ar}	C	X	a_w	ρ_{ap}	H	$D_{[4,3]}$
1	156	7,2	$3,40 \pm 0,10$	$0,11 \pm 0,01$	$330,3 \pm 1,2$	$23,63 \pm 0,08$	$7,19 \pm 0,27$
2	184	7,2	$3,26 \pm 0,10$	$0,13 \pm 0,00$	$301,5 \pm 9,2$	$23,29 \pm 0,37$	$7,31 \pm 0,07$
3	156	17,8	$2,62 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,00$	$374,5 \pm 11,8$	$16,98 \pm 0,17$	$9,75 \pm 0,08$
4	184	17,8	$2,43 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,00$	$323,0 \pm 6,6$	$18,20 \pm 0,17$	$11,28 \pm 0,10$
5 (a)	150	12,5	$3,53 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$	$340,3 \pm 5,8$	$18,05 \pm 0,32$	$5,81 \pm 0,30$
6 (a)	190	12,5	$3,18 \pm 0,16$	$0,13 \pm 0,00$	$293,1 \pm 1,2$	$19,50 \pm 0,21$	$8,95 \pm 0,22$
7 (a)	170	5,0	$3,33 \pm 0,12$	$0,13 \pm 0,00$	$320,5 \pm 24,4$	$26,68 \pm 0,21$	$5,39 \pm 0,04$
8 (a)	170	20,0	$1,83 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,00$	$350,4 \pm 7,6$	$16,26 \pm 0,25$	$10,72 \pm 0,13$
9 (c)	170	12,5	$2,65 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,01$	$333,6 \pm 21,1$	$19,49 \pm 0,22$	$6,03 \pm 0,02$
10 (c)	170	12,5	$2,81 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,00$	$322,5 \pm 9,1$	$19,14 \pm 0,69$	$8,59 \pm 0,14$
11 (c)	170	12,5	$2,51 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,00$	$338,6 \pm 4,6$	$19,08 \pm 0,35$	$9,12 \pm 0,08$

T_{ar} = temperatura do ar de secagem ($^{\circ}\text{C}$); C = concentração de maltodextrina (g/100g hidrolisado); X = umidade (g/100g amostra); ρ_{ap} = densidade aparente (kg/m^3); H = higroscopicidade (g/100g sólidos totais); $D_{[4,3]}$ = diâmetro médio volumétrico de partícula (μm).

4.3.1. UMIDADE E ATIVIDADE DE ÁGUA

Como pode ser observado na Tabela 4.2 a umidade final variou entre 1,83% e 3,53% (em base seca). Esses valores são próximos aos reportados por outros autores para pós obtidos por atomização a partir de hidrolisado de tilápia, hidrolisado de peito de frango, polpa de açaí, suco de uva e purê de batata doce, usando maltodextrina (DE=10) como agente carreador (ABDUL-HAMID et al., 2002; KUROSZAWA et al., 2009a; TONON et al., 2008; PAPADAKIS et al., 2006; GRABOWSKY et al., 2006). No caso da atividade de água, o valor variou entre 0,094 e 0,131 correspondentes aos pontos 8 e 7 do planejamento (pontos axiais da concentração) respectivamente, indicando que a atividade água foi dependente da concentração de agente carreador usada para a secagem. As respostas mínimas, tanto para a umidade quanto para a atividade de água, foram observadas no ensaio 8, onde foi usada a máxima concentração de maltodextrina (20,0 g/100 g hidrolisado).

Como mostrado na Tabela 4.3, a umidade final do pó foi influenciada pelas duas variáveis estudadas (T_{ar} e C), sendo o termo linear da concentração de agente carreador a mais importante.

No caso da atividade de água, apesar da significância estatística do fator linear de concentração de agente carreador e da interação ($p \leq 0,10$), as variações entre os resultados experimentais foram muito pequenas (a_w próximas a 0,1) pelo que foi considerado que não houve efeito significativo das variáveis de processo sobre a a_w dentro da faixa estudada.

Tabela 4.3. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para a umidade e a atividade de água do hidrolisado os protéicos de pele de cação em pó.

FATORES	X				a _w			
	Coef. de Regressão*	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor	Coef. de Regressão*	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor
Média	2,61	2,66	0,08	<0,01	---	0,12	0,00	<0,01
T _{ar} (L)	-0,10	-0,21	0,09	0,08	---	0,00	0,01	0,52
T _{ar} (Q)	0,36	0,68	0,11	<0,01	---	0,00	0,01	0,70
C (L)	-0,46	-0,93	0,09	<0,01	---	-0,02	0,01	<0,04
C (Q)	---	-0,10	0,11	0,42	---	0,00	0,01	0,69
T _{ar} (L) x C (L)	---	-0,02	0,13	0,88	---	-0,02	0,01	0,09

* Parâmetros significativos ($p \leq 0,10$)

O modelo proposto para a predição da umidade do pó de hidrolisado de pele de cação apresentou significância estatística (Tabela 4.4), e um coeficiente de determinação (R^2) de 0,96, indicando que o modelo explica 96,2% dos dados experimentais.

Tabela 4.4. Análise de variância (ANOVA) para o modelo ajustado da umidade

Fontes de variação	Modelo codificado – Parâmetros significativos (90% confiança)				
	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado} [*]
Regressão	2,58	3	0,86	59,51	3,07
Resíduos	0,10	7	0,01		
Falta de ajuste	0,05	5	0,01	0,46	9,29
Erro Puro	0,05	2	0,02		
Total	2,68	10			
R²	0,96				

*valores de F_{tab} para $p \leq 0,10$

SQ= soma de quadrados; GL= graus de liberdade; MQ = média quadrática

De acordo com a Figura 4.2, umidades mais baixas foram obtidas para concentrações de agente carreador acima de 15%. De acordo com Goula e Adamopoulos (2004), o conteúdo de sólidos totais da solução de alimentação influi diretamente na

umidade final do pó. Conteúdos de umidade mais baixos no pó podem ser atingidos quando se aumenta a concentração de sólidos totais na solução inicial, pela redução da água livre para evaporação. Além disso, por ter maior peso molecular, a adição de maltodextrina reduz a higroscopicidade do pó (item 4.3.2) e partículas com menor umidade final podem ser obtidas.

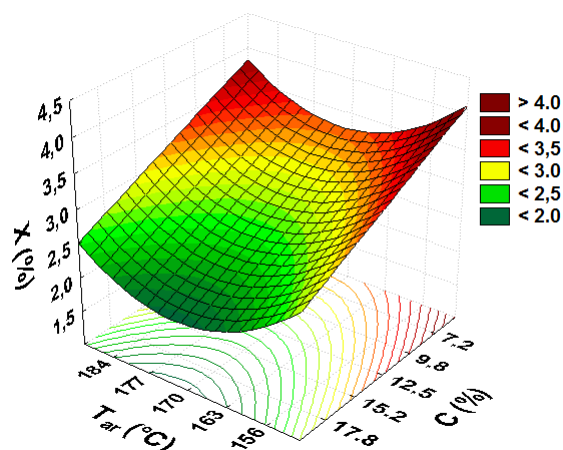


Figura 4.2. Superfície de resposta para a umidade do hidrolisado protéico de pele de cação obtido por *spray drying*.

No caso da temperatura, pesquisas mostram que temperaturas maiores de secagem produzem produtos com menor umidade devido ao maior gradiente de temperatura entre o ar de secagem e a solução a secar. No entanto, neste caso as umidades mais baixas foram registradas em torno de 170°C (ponto central do planejamento experimental), provavelmente pela diminuição na taxa de difusão da água da partícula.

Segundo Goula e Adamopoulos (2008), Seydel et al. (2006) e Zandoni et al. (1999), o incremento na temperatura de secagem aumenta não só a difusão de vapor de água, mas também a contração da estrutura da partícula, que dá origem a uma superfície de maior espessura, a qual dificulta a difusão do vapor de água contido no interior da partícula. Além

disso, como a taxa de evaporação é maior conforme aumenta o gradiente de temperatura, uma atmosfera saturada de vapor de água é criada ao redor da partícula, o que dificulta também a difusão da água localizada no interior da partícula para o ar de secagem, conseqüentemente, partículas mais úmidas podem ser obtidas à temperaturas mais altas de secagem.

4.3.2. DENSIDADE APARENTE E HIGROSCOPICIDADE

Os resultados experimentais tanto para a densidade aparente quanto para a higroscopicidade do hidrolisado de pele de cação em pó encontram-se apresentados na Tabela 4.2. Os valores experimentais da densidade aparente oscilaram entre 293,1 e 374,5 kg/m³, que correspondem aos ensaios 6 ($T_{ar} = 190\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C = 12,5\%$) e 3 ($T_{ar} = 156\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C = 17,8\%$) do planejamento experimental. A higroscopicidade dos pós variou entre 16,26 e 26,68 g/100g sólidos, correspondentes aos ensaios 8 ($T_{ar} = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C = 20\%$) e 7 ($T_{ar} = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C = 5,0\%$), respectivamente. Esses valores foram muito inferiores se comparados com a higroscopicidade do hidrolisado puro seco à $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ (173,0 g/100g sólidos).

A densidade aparente foi positivamente influenciada pela concentração de agente carreador, mas negativamente influenciada pela temperatura de processo, indicando que maiores valores de densidade aparente foram obtidos quando utilizadas temperaturas baixas de secagem e concentrações altas de agente carreador. Já para a higroscopicidade, apenas a concentração de maltodextrina teve impacto significativo sobre a resposta, ou seja, quanto maior foi a quantidade de agente carreador utilizado, menor foi quantidade de água adsorvida pelo pó produzido e portanto, menor o valor da higroscopicidade (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para a densidade aparente (ρ_{ap}) e a higroscopicidade (H) do hidrolisado protéico de pele de cação em pó.

FATORES	ρ_{ap}				H			
	Coef. de Regressão*	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor	Coef. de Regressão*	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor
Média	329,84	331,50	4,51	<0,01	19,11	19,24	0,34	<0,01
T _{ar} (L)	-18,42	-36,84	5,53	<0,01	---	0,74	0,42	0,14
T _{ar} (Q)	---	-11,70	6,60	0,14	---	-0,27	0,50	0,62
C (L)	13,53	27,05	5,53	<0,01	-3,32	-6,63	0,42	<0,01
C (Q)	---	7,14	6,60	0,33	1,26	2,45	0,50	<0,01
T _{ar} (L) x C (L)	---	-11,32	7,81	0,21	---	0,78	0,59	0,24

* Parâmetros significativos ($p \leq 0,10$)

A Tabela 4.6 apresenta a análise de variância dos modelos obtidos para a densidade aparente da partícula e a higroscopicidade dos pós de hidrolisado de pele de cação. Ambos os modelos mostraram significância estatística para prever os valores das duas respostas dentro da faixa estudada.

Tabela 4.6. Análise de variância (ANOVA) para os modelos da densidade aparente e da higroscopicidade do hidrolisado protéico de pele de cação em pó

Fontes de variação	Modelo codificado para ρ_{AP} (90% confiança)					Modelo codificado para H (90% confiança)				
	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab} *	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab} *
Regressão	4166,0	2	2082,9	20,93	3,11	97,41	2	48,71	110,38	3,11
Resíduos	795,4	8	99,4			3,53	8	0,44		
Falta de ajuste	659,5	6	109,9	1,61	9,33	3,43	6	0,57	11,36	9,33
Erro Puro	135,9	2	67,9			0,10	2	0,05		
Total	4961,4	10				100,94	10			
R²	0,84					0,98				

*valores de F_{tab} para $p \leq 0,10$

A superfície de resposta apresentada na Figura 4.3a, mostrou que densidades mais baixas foram obtidas para concentrações de maltodextrina abaixo de 10% e temperaturas acima de 170°C. A redução da densidade aparente devido ao acréscimo da temperatura do

ar foi também observada por outros autores para secagem de hidrolisado de peito de frango, polpa de tomate e extratos de betacianina de amarantho por atomização (KUROSZAWA, et al. 2009a; GOULA e ADAMOPOULOS, 2005; CAI e CORKE, 2000).

Segundo Walton (2000), o aumento da temperatura de secagem provocou um incremento na taxa de transferência de massa tanto da gotícula quanto da partícula. No caso de morfologias cristalinas, mencionado incremento resulta em uma secagem mais violenta e rápida, produzindo partículas com grande tendência a inchar (aumento no volume), enrugar e, em casos extremos, a colapsar. Este aumento no volume acarreta em uma redução da densidade aparente.

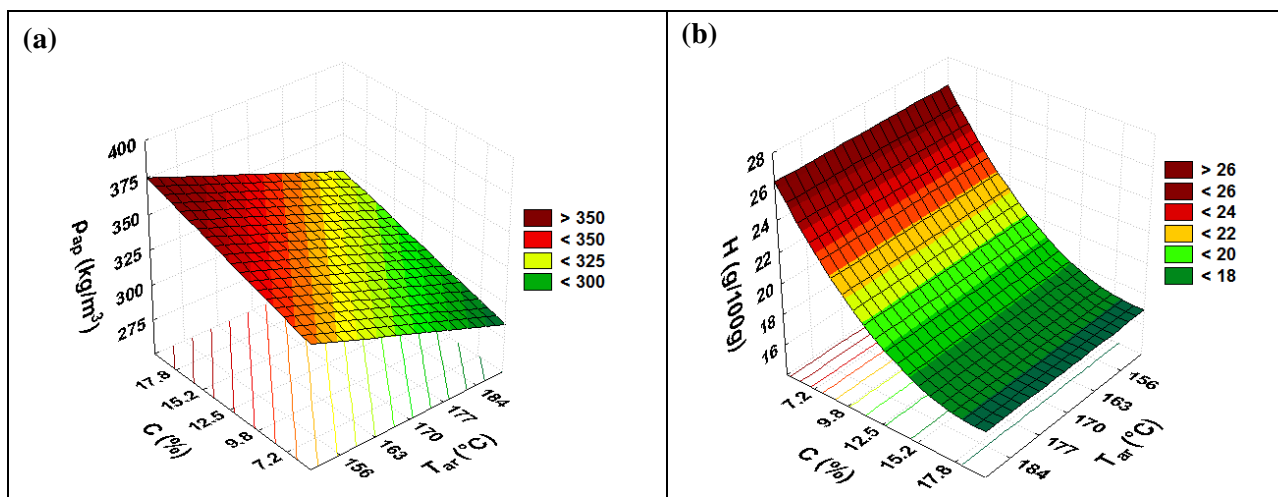


Figura 4.3. Superfícies de resposta para: (a) densidade aparente (ρ_{ap}) e (b) higroscopicidade (H) do hidrolisado protéico de pele de cação em pó.

No caso do aumento da densidade aparente pela adição de maiores quantidades de maltodextrina, a presença de maior quantidade de sólidos na solução de alimentação poderia ter reduzido a quantidade de bolhas de ar dentro da gotícula, resultando na formação de partículas mais pesadas. De acordo com Walton (2000), um aumento na concentração de alimentação de 15% a 30% resultou na redução da deformação, quebra de

superfície e nucleação interna (formação de bolhas de ar) de partículas de leite desnatado feitas por *spray drying*, conseqüentemente, a densidade do produto final foi aumentada.

No caso da higroscopicidade (Figura 4.3b), esta resposta dependeu exclusivamente da quantidade de maltodextrina adicionada, sendo que os valores mais baixos foram observados para concentrações acima de 15% de agente carreador. Os hidrolisados protéicos em geral possuem peptídeos de baixo peso molecular, os quais são altamente higroscópicos, mesmo em umidades relativas baixas. A adição de maltodextrina, um carboidrato com maior peso molecular e baixa higroscopicidade, ajuda a melhorar a estabilidade do pó pelo incremento da temperatura de transição vítrea e pela diminuição da taxa de adsorção de água durante a estocagem. A capacidade da maltodextrina para a redução da higroscopicidade de pós produzidos por *spray dryer* tem sido comprovada por outros autores para diferentes matérias primas, entre outras: hidrolisado de peito de frango, polpa de açaí e extratos de pigmentos de amarantho (KUROZAWA, 2009; TONON, 2009; CAI e CORKE, 2000).

Para se ter uma melhor idéia da influência que teve a concentração de maltodextrina sobre a higroscopicidade do hidrolisado de pele de cação em pó, a Figura 4.4 apresenta as mudanças percebidas visualmente no hidrolisado puro seco à 170°C, na maltodextrina e nos pós produzidos com adição de 5,0; 12,5 e 20,0% de maltodextrina secos à mesma temperatura (170 °C), durante o tempo de análise (7 dias). Como mostrado, o hidrolisado de pele de cação é altamente higroscópico sofrendo uma forte alteração já no segundo dia da análise, passando de uma consistência sólida e particulada de cor marrom clara e opaca para um estado líquido e pegajoso de cor marrom intensa e brilhante. A maltodextrina, como esperado, manteve a sua consistência e cor ao longo da análise. Já as amostras

preparadas com adição de agente carreador mostraram maior resistência à adsorção de água principalmente na condição onde foi adicionada 20,0% de maltodextrina, mostrando alteração visual só a partir do quarto dia de análise.

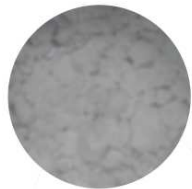
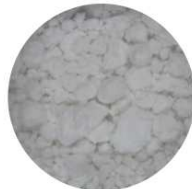
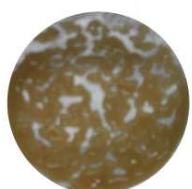
AMOSTRA	DIA DE ANÁLISE			
	1°	2°	4°	7°
PURO				
MD 10				
5,0%				
12,5%				
20,0%				

Figura 4.4. Mudanças visuais causadas pela adsorção de água ao longo do tempo no hidrolisado de pele de cação seco, na maltodextrina e nos pós obtidos a partir do hidrolisado protéico com 5, 12,5 e 20% de maltodextrina. (temperatura ambiente, UR $\approx$ 75,29%). MD10 = maltodextrina pura.

4.3.3. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA E MICROESTRUTURA

O diâmetro médio de partícula do hidrolisado de pele de cação em pó oscilou na faixa de $5,39 \pm 0,04$ até $11,28 \pm 0,10$ μm (Tabela 4.2). Estes valores foram similares àqueles obtidos por Kurozawa et al. (2009b) para o pó produzido por *spray drying* a partir do hidrolisado protéico de peito de frango. Ambas as variáveis tiveram efeito sobre o diâmetro de partícula médio, mas só a concentração de maltodextrina teve efeito estatisticamente significativo (Tabela 4.7), sendo esse efeito positivo, o que significa que partículas maiores foram obtidas quando foram utilizadas concentrações maiores de agente carreador. De acordo com Goula e Adamopoulos (2004), o tamanho das partículas secas depende do tamanho das gotículas atomizadas e o tamanho dessas gotículas é dependente da forma como foi feita a atomização e das propriedades físicas e concentração de sólidos da solução de alimentação. O tamanho de gotícula usualmente aumenta conforme a concentração ou a viscosidade da solução de alimentação é incrementada, e a energia disponível para a atomização (por exemplo, velocidade de rotação no bico rotativo, pressão no bico) diminui.

Tabela 4.7. Efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para o diâmetro médio de partícula do hidrolisado protéico de pele de cação em pó.

FATORES	D _[4,3]		
	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor
Média	7,91	0,78	<0,01
T _{ar} (L)	0,76	0,48	0,17
T _{ar} (Q)	0,03	0,57	0,97
C (L)	1,76	0,48	<0,01
C (Q)	0,37	0,57	0,55
T _{ar} (L) x C (L)	0,35	0,68	0,63

Por outro lado, o efeito positivo da temperatura sobre o diâmetro médio volumétrico de partícula está diretamente relacionado com a dilatação da mesma, causada a altas temperaturas de secagem. Segundo Reiniccius (2001), grandes gradientes de temperatura (taxas de evaporação altas) produzem partículas maiores, comparadas com aquelas produzidas em condições menos severas. Secagens muito rápidas criam rapidamente uma estrutura firme e não permitem o encolhimento da partícula durante a secagem.

As distribuições de tamanho de partícula para os ensaios axiais das duas variáveis estudadas, apresentadas na Figura 4.5a, mostram um formato bimodal, com picos característicos em torno de 0,8 – 1,0 μm e 9,0 - 10 μm aproximadamente. Este tipo de distribuição de tamanho de partícula foi também reportado por outros autores para pós obtidos por atomização, usando maltodextrina (DE = 10) como agente carreador, a partir de hidrolisado de carne de peito de frango e suco de açaí (KUROSZAWA et al., 2009a, TONON et al., 2009; TONON et al., 2008).

O efeito do aumento da temperatura no tamanho de partícula pode ser observado nos ensaios 5 e 6 ($T_{\text{ar}} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$; $C = 12,5\%$ e $T_{\text{ar}} = 190^{\circ}\text{C}$; $C = 12,5\%$ respectivamente), onde o acréscimo da temperatura provocou um deslocamento do pico maior (em torno de 8 μm) para a região de maior diâmetro de partícula. Por outro lado, o incremento da temperatura causou maior fragmentação das partículas, refletido na diminuição do pico correspondente a 1,0 μm por uma faixa de 0,3 – 0,9 μm . Segundo Walton e Mumford (1999), em condições de alta temperatura, a superfície da gotícula a secar é instantaneamente coberta por uma casca seguida rapidamente de formação de bolhas de vapor no interior da mesma. Essas bolhas expandem violentamente deformando e eventualmente quebrando a parede, provocando o colapso da partícula.

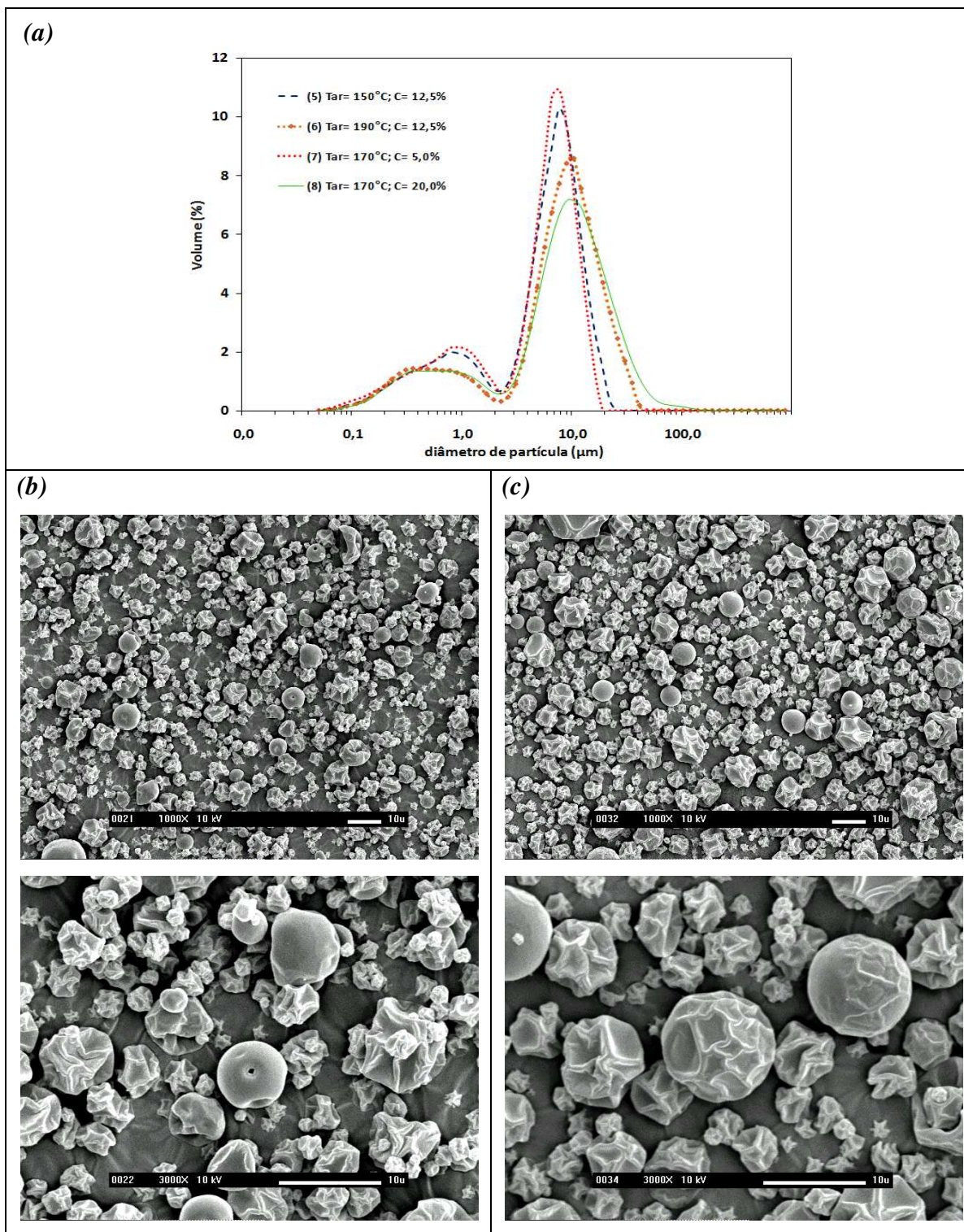


Figura 4.5. (a) Distribuição de tamanho de partícula para os ensaios axiais do planejamento, onde os números entre parênteses indicam o número de ensaio. Microestrutura do hidrolisado em pó seco a 170°C (b) com 5% de maltodextrina (c) com 20% de maltodextrina, aumentos de 1000 e 3000x

Comportamento similar foi observado para as distribuições de tamanho de partícula dos ensaios axiais das concentrações de agente carreador (ensaio 7: $T_{ar} = 170^{\circ}\text{C}$; $C = 5,0\%$ e ensaio 8: $T_{ar} = 170^{\circ}\text{C}$; $C = 20,0\%$), onde o incremento da quantidade de maltodextrina provocou o deslocamento do pico em torno de $8\text{ }\mu\text{m}$ para um área de maior diâmetro volumétrico.

De acordo com a Figura 4.5b, o hidrolisado protéico formulado com 5% de maltodextrina apresenta uma estrutura com paredes rugosas e predominância de formatos irregulares, embora estruturas esféricas estejam presentes em menor quantidade. Essas partículas possuíram menor tamanho se comparadas com as partículas produzidas com 20% de maltodextrina na formulação (Figura 4.5c), confirmando os resultados mostrados para o diâmetro médio volumétrico de partícula. Nas imagens obtidas para esta última condição, foi observada uma maior proporção de partículas com estrutura esférica, se comparada com a condição onde foi utilizada menor quantidade de agente carreador. Apesar das imagens não mostrarem partículas quebradas, é típico das partículas produzidas por *spray drying* possuir uma estrutura oca. Durante a evaporação, a partícula diminui gradualmente o seu tamanho e a espessura da superfície torna-se maior, formando partículas sólidas ou ocas dependendo do material. As partículas ocas são formadas pela expansão dos gases dissolvidos na solução durante a secagem, a formação de bolhas de vapor no interior das gotículas ou a incorporação de ar nas gotículas durante a atomização (ROSEMBERG et al., 1985; WALTON e MUMFORD, 1999; SEYDEL et al., 2006). A superfície rugosa pode ser provocada pela contração da partícula quando diminui a pressão interna dos gases de evaporação.

Finalmente, de acordo com Jafari et al. (2008), as micropartículas obtidas a partir do hidrolisado protéico de pele de cação podem ser classificadas dentro do grupo das microcápsulas tipo matriz, ou também chamadas microesferas, onde o material de recheio, neste caso os peptídeos de baixo peso molecular presentes no hidrolisado, estão uniformemente incorporados e distribuídos no material de parede (maltodextrina). Ambos os materiais estão localizados próximos à superfície da microesfera, formando uma “casca”. Microesferas de morfologia similar foram obtidas por outros autores para hidrolisados de caseína e carne de peito de frango usando maltodextrina (DE = 10) como material de parede (ROCHA et al., 2009; KUROSZAWA et al., 2009b).

4.3.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados experimentais para a capacidade antioxidante determinadas pelos métodos *FRAP* e *TEAC* são apresentados nas Tabelas 4.8 e 4.9, respectivamente. Os valores estão expressos, tanto por grama de amostra quanto por grama de proteína. A diferença entre os valores de capacidade antioxidante obtidos pelos métodos *FRAP* e *TEAC* pode ser associada aos diferentes mecanismos de reação envolvidos. O método *FRAP* detecta compostos que só podem atuar mediante um mecanismo de transferência simples de elétrons, enquanto o método *TEAC* detecta os compostos que podem atuar tanto por redução direta, via transferência de elétrons, quanto por captura de radicais via transferência de átomos de hidrogênio (PRIOR et al., 2005).

Devido a que os valores reportados na literatura, para a capacidade antioxidante de hidrolisados protéicos de diversas fontes, diferem em valores, formas de cálculo e formas de expressar os resultados, a comparação com os resultados obtidos no presente trabalho foi

bastante difícil. Não obstante, alguns dados interessantes foram encontrados para a discussão dos resultados.

A respeito do hidrolisado de pele de cação puro e no estado líquido (HPL), tanto para o método *FRAP* quanto para o *TEAC*, foram encontrados valores de 12,02 μmol equivalente em $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /g proteína e de 225,3 μmol equivalente em Trolox/g proteína, respectivamente. Estes resultados não foram muito diferentes aos encontrados para o hidrolisado puro seco por atomização (HPA) onde foram registrados valores de 11,61 μmol equivalente em $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /g proteína para o *FRAP* e de 206,1 μmol equivalente em Trolox/g proteína para o *TEAC*, observando-se uma leve diminuição no valor da capacidade antioxidante. Essa diminuição foi mais pronunciada no valor do *TEAC*.

Considerando que a atividade antioxidante dos hidrolisados protéicos é inerente às características da sequência de aminoácidos presentes nos peptídeos ou fragmentos protéicos (PIHLANTO, 2006), a diminuição no valor de capacidade antioxidante observada pode ter sido resultado de uma alteração na estrutura dos peptídeos e/ou aminoácidos responsáveis por conferir capacidade antioxidante ao hidrolisado, durante o processo de secagem. De acordo com Arnoldi (2002), durante o tratamento térmico (neste caso a secagem), podem ocorrer diversas reações envolvendo aminoácidos livres e peptídeos. Dentre elas temos: clivagem e/ou recombinação das pontes dissulfetos intramoleculares e intermoleculares, reações envolvendo as cadeias laterais de aminoácidos, ocorrendo a formação de ligações entre aminoácidos cruzados e reações dos aminoácidos básicos e ácidos das cadeias laterais resultando na formação de ligações isopeptídicas.

Tabela 4.8. Capacidade antioxidante pela redução do íon férrico (FRAP), expresso em μmol equivalente em $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Trolox, ácido gálico e ácido ascórbico por grama de proteína e por grama de amostra, para o hidrolisado de pele de cação puro líquido, puro em pó, e formulado com diferentes concentrações de maltodextrina (DE = 10).

ENSAIO	VARIÁVEIS		Teor de proteína (g/100g amostra)	PODER REDUTOR ÍON FÉRRICO (FRAP)							
	T _{ar} °C	C %		μmol equivalente em / g proteína				μmol equivalente em / g amostra			
				FeSO ₄ ·7H ₂ O	Trolox	Ac. Gálico	Ac. Ascórbico	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Trolox	Ac. Gálico	Ac. Ascórbico
1	156	7,2	35,04 ± 0,38	14,28 ± 0,03	7,62 ± 0,01	1,85 ± 0,00	5,51 ± 0,01	5,00 ± 0,01	2,67 ± 0,00	0,65 ± 0,00	1,93 ± 0,00
2	184	7,2	34,79 ± 0,47	12,62 ± 0,11	6,70 ± 0,06	1,64 ± 0,01	4,77 ± 0,05	4,39 ± 0,04	2,33 ± 0,02	0,57 ± 0,00	1,66 ± 0,02
3	156	17,8	15,97 ± 0,37	16,97 ± 0,18	9,08 ± 0,10	2,19 ± 0,02	6,59 ± 0,08	2,71 ± 0,03	1,45 ± 0,02	0,35 ± 0,00	1,05 ± 0,01
4	184	17,8	16,76 ± 0,17	15,09 ± 0,16	8,06 ± 0,09	1,95 ± 0,02	5,82 ± 0,07	2,53 ± 0,03	1,35 ± 0,02	0,33 ± 0,00	0,98 ± 0,01
5 (a)	150	12,5	22,15 ± 0,39	13,22 ± 0,06	7,09 ± 0,03	1,71 ± 0,01	5,17 ± 0,02	2,93 ± 0,01	1,57 ± 0,01	0,38 ± 0,00	1,15 ± 0,01
6 (a)	190	12,5	23,03 ± 0,26	13,62 ± 0,08	7,31 ± 0,04	1,76 ± 0,01	5,36 ± 0,03	3,14 ± 0,02	1,68 ± 0,01	0,40 ± 0,00	1,23 ± 0,01
7 (a)	170	5,0	43,53 ± 0,47	12,03 ± 0,03	6,43 ± 0,02	1,55 ± 0,00	4,66 ± 0,01	5,23 ± 0,01	2,80 ± 0,01	0,68 ± 0,00	2,03 ± 0,01
8 (a)	170	20,0	14,37 ± 0,36	17,44 ± 0,00	9,31 ± 0,00	2,26 ± 0,00	6,73 ± 0,00	2,51 ± 0,00	1,34 ± 0,00	0,32 ± 0,00	0,97 ± 0,00
9 (c)	170	12,5	22,82 ± 0,36	14,78 ± 0,08	7,96 ± 0,05	1,91 ± 0,01	5,85 ± 0,04	3,33 ± 0,02	1,79 ± 0,01	0,43 ± 0,00	1,31 ± 0,01
10 (c)	170	12,5	22,21 ± 0,10	14,30 ± 0,14	7,68 ± 0,08	1,84 ± 0,02	5,63 ± 0,06	3,19 ± 0,02	1,72 ± 0,01	0,41 ± 0,00	1,26 ± 0,01
11 (c)	170	12,5	22,92 ± 0,10	13,93 ± 0,07	7,49 ± 0,04	1,80 ± 0,01	5,49 ± 0,03	3,18 ± 0,03	1,71 ± 0,02	0,41 ± 0,00	1,25 ± 0,01
HPL	-	-	4,0 ± 0,10	12,02 ± 0,14	6,21 ± 0,08	1,57 ± 0,02	4,15 ± 0,06	---	---	---	---
HPA	170	-	94,40 ± 0,23	11,61 ± 0,00	6,21 ± 0,00	1,50 ± 0,00	4,51 ± 0,00	---	---	---	---
MPA*	170	20,0	----	1,18 ± 0,02	0,61 ± 0,01	0,15 ± 0,00	1,18 ± 0,02	---	---	---	---

HPL = Hidrolisado Puro Líquido; HPA = Hidrolisado Puro seco por Atomização (T: 170°C; Vazão: 0,7 L/h); MPA (Maltodextrina Pura secada por Atomização (T: 170°C; Vazão: 0,7 L/h).

* valores expressos em μmol equiv./g maltodextrina.

Tabela 4.9. Capacidade antioxidante pela captura de radical ABTS⁺⁰ (TEAC), expresso em μmol equivalente em Trolox, FeSO₄.7H₂O, ácido gálico e ácido ascórbico por grama de proteína e por grama de amostra, para o hidrolisado de pele de cação puro líquido, puro em pó, e formulado com diferentes concentrações de maltodextrina (DE = 10).

ENSAIO	VARIÁVEIS		Teor de proteína (g/100g amostra)	CAPTURA RADICAL CATIÔNICO ABTS ⁺⁰ (TEAC)							
	T _{ar} °C	C %		μmol equivalente em / g proteína				μmol equivalente em / g amostra			
				Trolox	FeSO ₄ .7H ₂ O	Ac. Gálico	Ac. Ascórbico	Trolox	FeSO ₄ .7H ₂ O	Ac. Gálico	Ac. Ascórbico
1	156	7,2	35,04 ± 0,38	189,9 ± 0,0	559,0 ± 0,0	37,7 ± 0,0	286,8 ± 0,0	66,5 ± 0,0	195,9 ± 0,0	13,2 ± 0,0	100,5 ± 0,0
2	184	7,2	34,79 ± 0,47	183,0 ± 2,9	538,3 ± 8,7	36,3 ± 0,6	276,6 ± 4,3	64,2 ± 0,6	188,9 ± 1,8	12,7 ± 0,1	97,0 ± 0,9
3	156	17,8	15,97 ± 0,37	230,3 ± 0,7	667,3 ± 2,2	45,4 ± 0,1	349,8 ± 1,1	36,8 ± 0,1	106,6 ± 0,4	7,3 ± 0,0	55,9 ± 0,2
4	184	17,8	16,76 ± 0,17	221,4 ± 3,5	641,7 ± 10,5	43,7 ± 0,7	336,2 ± 5,2	37,1 ± 0,6	107,5 ± 1,8	7,3 ± 0,1	56,3 ± 0,9
5 (a)	150	12,5	22,15 ± 0,39	199,2 ± 2,7	580,7 ± 8,0	39,4 ± 0,5	302,0 ± 4,0	44,1 ± 0,6	128,6 ± 1,8	8,7 ± 0,1	66,9 ± 0,9
6 (a)	190	12,5	23,03 ± 0,26	205,9 ± 5,8	601,4 ± 17,4	40,7 ± 1,2	311,9 ± 8,7	47,4 ± 1,3	138,5 ± 4,0	9,4 ± 0,3	71,8 ± 2,0
7 (a)	170	5,0	43,53 ± 0,47	168,2 ± 0,3	495,9 ± 0,8	33,4 ± 0,1	253,8 ± 0,4	73,2 ± 0,1	215,9 ± 0,4	14,5 ± 0,0	110,5 ± 0,2
8 (a)	170	20,0	14,37 ± 0,36	226,4 ± 7,4	653,1 ± 22,1	44,6 ± 1,5	344,5 ± 11,1	32,5 ± 1,1	93,9 ± 3,2	6,4 ± 0,2	49,5 ± 1,6
9 (c)	170	12,5	22,82 ± 0,36	213,1 ± 1,5	622,8 ± 4,6	42,2 ± 0,3	322,7 ± 2,3	48,6 ± 0,4	142,1 ± 1,1	9,6 ± 0,1	73,6 ± 0,5
10 (c)	170	12,5	22,21 ± 0,10	213,7 ± 3,4	624,3 ± 10,1	42,3 ± 0,7	323,8 ± 5,1	47,5 ± 0,8	138,7 ± 2,3	9,4 ± 0,2	71,9 ± 1,1
11 (c)	170	12,5	22,92 ± 0,10	212,2 ± 7,3	620,4 ± 21,9	42,0 ± 1,5	321,4 ± 10,9	48,6 ± 1,7	142,2 ± 5,0	9,6 ± 0,3	73,7 ± 2,5
HPL	-	-	4,0 ± 0,10	225,3 ± 1,2	638,5 ± 3,5	44,1 ± 0,2	345,0 ± 1,8	---	---	---	---
HPA	170	-	94,4 ± 0,23	206,1 ± 1,5	602,8 ± 4,4	40,8 ± 0,3	312,1 ± 2,2	---	---	---	---
MPA*	170	20,0	----	1,7 ± 0,0	4,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	2,7 ± 0,0	---	---	---	---

HPL = Hidrolisado Puro Líquido; HPA = Hidrolisado Puro seco por Atomização (T: 170°C; Vazão: 0,7 L/h); MPA (Maltodextrina Pura secada por Atomização (T: 170°C; Vazão: 0,7 L/h)

* valores expressos em μmol equiv./g maltodextrina

Giménez et al. (2009) determinaram a capacidade antioxidante de hidrolisados de gelatina extraída de peles de linguado e lula. Os autores encontraram valores de *FRAP* de 4,0 e 16,5 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ de amostra respectivamente, e de 86,8 e 184,5 μmol de ácido ascórbico equivalente/g amostra para a capacidade antioxidante pela captura do radical livre ABTS^{+0} , respectivamente. Com exceção do valor *FRAP* do hidrolisado de gelatina de lula, os valores de capacidade antioxidante encontrados para o hidrolisado de pele de cação foram superiores.

Phanturat et al. (2010), estudaram a eficiência de diferentes proteases para obtenção de um hidrolisado de gelatina com máximo potencial antioxidante, para diferentes graus de hidrólise, e observaram que os valores da capacidade antioxidante determinada pelo método *FRAP* variaram entre 0,12 e 0,62 $\mu\text{mol TE/mg}$ de proteína, entanto que, para o *TEAC* os valores oscilaram entre 1900 e 2000 $\mu\text{mol equiv. TE/mg}$ de proteína. Esses valores foram superiores aos obtidos no presente trabalho.

Em outro trabalho, Kantaphant e Benjakul (2008) fizeram um estudo comparativo sobre a eficiência do uso de proteases extraídas do ceco pilórico de três espécies de peixe, para a produção de um hidrolisado de gelatina com alta atividade antioxidante, obtendo valores entre 1,6 e 2,4 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ de proteína para o *FRAP*, e, entre 1350 e 1600 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ proteína para o *TEAC*, valores também superiores aos apresentados no presente trabalho.

No caso das microesferas produzidas a partir do hidrolisado de pele de cação misturados com maltodextrina, os resultados de *FRAP* e *TEAC*, expressos por grama de

amostra (Tabelas 4.8 e 4.9) mostraram que o valor da capacidade antioxidante diminuiu na medida em que maiores concentrações de agente carreador foram usados para produzir as partículas. No entanto, a temperatura não provocou maiores mudanças nas duas respostas. Tanto para o *FRAP* quanto para o *TEAC*, os maiores valores de capacidade antioxidante, 5,23 μmol equivalente em $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ de amostra e 73,2 μmol equivalente em Trolox/g amostra, respectivamente, foram registrados no ensaio 7 ($T_{\text{ar}} = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$; $C = 5,0\%$). As capacidades antioxidantes mais baixas foram encontrados no ensaio 8 ($T_{\text{ar}} = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$; $C = 20,0\%$) com valores de 2,51 μmol equivalente em $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ de amostra para o *FRAP* e de 32,5 μmol equivalente em Trolox/g amostra para o *TEAC*.

Tendo em consideração que as frações peptídicas do hidrolisado aportam a maior parte da capacidade antioxidante das micropartículas, é esperado que os valores de *FRAP* e *TEAC* diminuam conforme menores proporções de proteína estejam presentes na composição global das mesmas. Não obstante, estes resultados não indicam se a capacidade antioxidante destas frações protéicas está sendo afetada pelas condições do processo de secagem. Neste caso, os resultados expressos por grama de proteína resultam melhores para avaliar este aspecto.

Pode-se observar na Tabela 4.8 que os ensaios 8 ($T_{\text{ar}} = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$; $C = 20,0\%$) e 3 ($T_{\text{ar}} = 156\text{ }^{\circ}\text{C}$; $C = 17,8\%$) apresentaram os maiores valores de capacidade antioxidante pelo método *FRAP* (17,44 e 16,97 μmol equiv. em $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} / \text{g}$ proteína, respectivamente), sendo que nessas condições foram adicionadas as maiores concentrações de material de parede. Esses valores foram superiores aos registrados para o hidrolisado na forma pura. Já para a capacidade antioxidante pelo método *TEAC* (Tabela 4.9), os resultados de capacidade antioxidante só foram levemente superiores para os mesmos ensaios (226,4 e

230,3 μmol equivalente em Trolox/g proteína para os ensaios 8 e 3, respectivamente), sendo o resto de valores inferiores aos do hidrolisado puro na forma líquida. Não foram encontrados trabalhos que determinassem a capacidade antioxidante de hidrolisados protéicos em pó com adição de agentes carreadores, pelos métodos *FRAP* e *TEAC*.

Especial ênfase merecem os resultados encontrados para a capacidade antioxidante da maltodextrina pura, apresentando um valor *FRAP* de 1,18 μmol equiv. em FeSO_4/g maltodextrina, e um valor *TEAC* de 1,70 μmol equiv. em Trolox/g maltodextrina que equivale a 9,81% e 0,75% em relação à capacidade antioxidante do hidrolisado puro líquido calculada pelo método *FRAP* e *TEAC*, respectivamente. Esses resultados indicam que a maltodextrina poderia estar interferindo nos valores de *FRAP* através de um mecanismo de reação não reportado na bibliografia consultada, mas que poderia ser objeto de futuras pesquisas. Uma hipótese para explicar este comportamento estaria no poder redutor da maltodextrina, usado para calcular o equivalente de dextrose (DE) das mesmas. Segundo Blanchard e Katz (2006), conforme o amido é progressivamente hidrolisado, grupos redutores terminais adicionais são expostos junto com o monossacarídeo reduzido dextrose (D-glicose), o qual seria o produto final, em teoria. Esses grupos redutores gerados pela hidrólise do amido, durante o processo de fabricação da maltodextrina, poderiam estar provocando a redução do íon Fe^{+3} do reagente *FRAP* e, portanto, a mudança na absorbância observada na análise.

Os coeficientes de regressão e os efeitos das variáveis de processo (temperatura de ar de entrada e concentração de maltodextrina) sobre a capacidade antioxidante do hidrolisado de pele de cação em pó, estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Coeficiente de regressão, efeito estimado, erro padrão e p-valor para cada fator no modelo matemático codificado para as capacidades antioxidantes pelos métodos *FRAP* e *TEAC*, do hidrolisado protéico de pele de cação em pó.

FATORES	<i>FRAP</i>				<i>TEAC</i>			
	Coef. de Regressão*	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor	Coef. de Regressão*	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor
Média	14,39	14,34	0,52	<0,01	209,56	212,99	3,28	<0,01
T _{ar} (L)	---	-0,75	0,64	0,30	---	-1,59	4,03	0,71
T _{ar} (Q)	---	-0,59	0,77	0,48	---	-7,34	4,81	0,19
C (L)	1,60	3,21	0,64	<0,01	20,16	40,33	4,03	<0,01
C (Q)	---	0,73	0,77	0,38	5,25	-12,63	4,81	0,05
T _{ar} (L) x C (L)	---	-0,11	0,91	0,91	---	-1,02	5,69	0,86

* Parâmetros significativos ($p \leq 0,10$)

Como mostrado, a única variável que exerceu influência significativa ($p \leq 0,10$) sobre a capacidade antioxidante determinada pelos dois métodos, foi a concentração de maltodextrina, sendo esse efeito positivo. A análise de variância (ANOVA) mostrada na Tabela 4.11 para os dois modelos propostos indicou que ambos os modelos têm significância estatística a um nível de confiança de 90%, e que os modelos matemáticos obtidos podem ser usados para predizer o valor da capacidade antioxidante do hidrolisado de pele de cação em pó dentro da faixa de estudo.

Tabela 4.11. Análise de variância para os modelos das capacidades antioxidantes, pelos métodos *FRAP* e *TEAC*, do hidrolisado protéico de pele de cação em pó

Fontes de variação	Modelo codificado para <i>FRAP</i> (90% confiança)					Modelo codificado para <i>TEAC</i> (90% confiança)				
	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab} *	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab} *
Regressão	20.53	1	20.53	26.41	3.29	3411.4	2	1705.7	56.11	3.11
Resíduos	7.00	9	0.78			243.2	8	30.4		
Falta de ajuste	6.63	7	0.95	5.18	9.35	242.1	6	40.3	72.38	9.33
Erro Puro	0.37	2	0.18			1.1	2	0.6		
Total	27.52	10				3654.6	10			
R²	0.746					0.933				

As superfícies de resposta geradas a partir dos modelos propostos mostram o efeito de ambas as variáveis estudadas sobre a capacidade antioxidante determinada pelos métodos *FRAP* e *TEAC* (Figura 4. 6 (a) e (b)). A temperatura do ar de entrada no secador não teve influência significativa sobre as respostas dentro da faixa estudada (150 – 190°C).

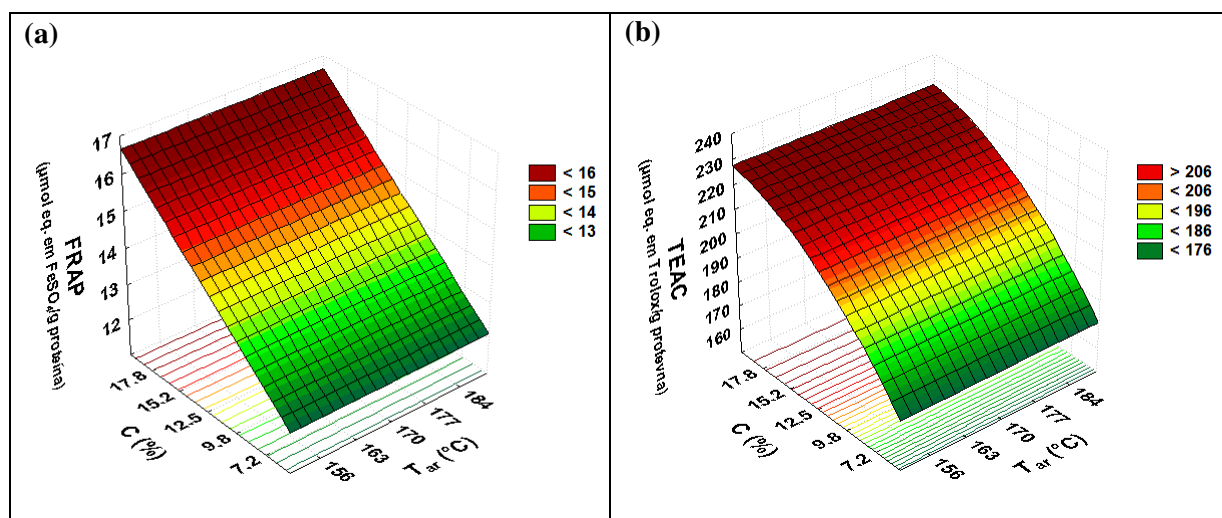


Figura 4. 6. Superfícies de resposta para a capacidade antioxidante: (a) método FRAP e (b) método TEAC, do hidrolisado protéico de pele de cão em pó

Como mostrado anteriormente, o processo de secagem por *spray dryer* provocou uma diminuição na capacidade antioxidante do hidrolisado protéico puro. O uso de maltodextrina como material de parede teve influência positiva significativa sobre as duas respostas analisadas, indicando que a adição de maltodextrina favoreceu a conservação, e em alguns casos, a melhora das propriedades antioxidantes do hidrolisado, principalmente para concentrações de agente carreador acima de 15% (g/100g de hidrolisado) para as duas análises efetuadas (Figura 4. 6 (a) e (b)). Assim, a maltodextrina poderia ter agido de duas formas para a conservação da capacidade antioxidante: primeiro pela proteção dos peptídeos responsáveis pelas características antioxidantes do hidrolisado contra danos

térmicos provocados pelo processo de secagem, e segundo, pela formação de produtos decorrentes da reação de Maillard.

Os Produtos da Reação de Maillard (PRM's) são formados pela reação entre os grupos carbonila dos açúcares redutores e grupo amino dos aminoácidos, e têm sido associados com a formação de compostos com forte capacidade antioxidante (KIM e LEE, 2009b). Os compostos responsáveis pela capacidade redutora dos PRM's são formados durante a termólise dos produtos de Amadori na primeira fase das reações de Maillard, ou pelos produtos heterocíclicos formados na caramelização do açúcar. Além disso, o comprimento da cadeia peptídica é um dos fatores mais determinantes sobre o poder redutor dos PRM's (HWANG et al., 2001; CHARURIN et al., 2002; KIM e LEE, 2009a). Liu et al. (2010) compararam a eficiência de algumas frações de peptídeos, com diferentes pesos moleculares, para a obtenção de PRM's com atividade antioxidante misturando hidrolisado de soja com xilose. Em todos os casos, a capacidade antioxidante foi potencializada pela formação dos PRM's, e a mistura entre a fração de aminoácidos simples e xilose apresentou a maior atividade antioxidante.

Tendo em consideração que o hidrolisado de pele de cação é composto por peptídeos de baixo peso molecular ($< 6,5$ kDa) e que a maltodextrina apresenta propriedades redutoras, a probabilidade de formação de PRM's com capacidade antioxidante durante o processo de secagem por atomização é elevada. No entanto, permanece a incógnita sobre os resultados obtidos pelo método *TEAC*. A adição de maltodextrina, em concentrações inferiores a 10%, provocou uma diminuição maior no valor da capacidade antioxidante, do que o provocado na amostra de hidrolisado puro seco sem adição de agente carreador, o que deve ser motivo de estudos mais aprofundados.

4.4.CONCLUSÕES

O uso de maltodextrina como agente carreador melhorou a maioria das características estudadas do hidrolisado de pele de cação em pó. Quanto maior foi a concentração de maltodextrina adicionada, menores foram os teores de umidade e higroscopicidade, e maiores foram os valores de densidade aparente, diâmetro médio volumétrico de partícula e de capacidade antioxidante dos pós.

A temperatura de ar de secagem teve influencia significativa sobre quase todas as variáveis estudadas, com exceção da higroscopicidade e da capacidade antioxidante. Temperaturas altas de secagem provocaram a diminuição da densidade aparente e o aumento no diâmetro médio volumétrico de partícula, contudo, o teor mais baixo de umidade foi conseguido para uma temperatura de ar em torno de 170°C.

A distribuição de tamanho de partícula caracterizou-se por apresentar um arranjo bimodal com picos característicos em torno de 1µm e 8µm. A análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou que o hidrolisado protéico de pele de cação foi encapsulado e uniformemente distribuído na parede da microesfera. As partículas apresentaram estruturas esféricas e irregulares com superfície rugosa.

A capacidade antioxidante do hidrolisado de pele de cação foi conservada e em alguns casos favorecida pela presença de maltodextrina, principalmente para concentrações acima de 15%, provavelmente pela formação de produtos decorrente da reação de Maillard com atividade antioxidante

A presença dos açúcares redutores da maltodextrina poderia ter causado interferência nos resultados de capacidade antioxidante determinados pelo método *FRAP* pelo que maiores estudos são requeridos.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G.H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**, v. 78, p. 69-74, 2002.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985. 427p.

AOAC. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists** (16th ed.). Washington, D.C., USA, 1997.

ARNOLDI, A. Thermal processing and nutritional quality. In: HENRY, C.J.K.; CHAPMAN, C. (Eds.). **The nutrition hanbook for food processors**. Boca Raton: CRC Press, 2002. cap. 11.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, P. **Food Powders Physical Properties, Processing, and Functionality**. New York: Kluwer Academic, 2005. 372p.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BLANCHARD, P.; KATZ, F. Starch hydrolysates. In: STEPHEN, A.; PHILIPS, G.; WILLIAMS, P. **Food Polysaccharides and Their Applications**, 2. ed. London: CRC Press, 2006. p. 119-145.

CAI, Y.Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. **Journal of Food Science**, v.65, n.6, p.1248-1252, 2000.

CHARURIN, P.; AMES, J.M.; CASTIELLO, M.D. Antioxidant activity of coffee model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3751–3756, 2002.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GIMÉNEZ, B.; ALEMÁN, A.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. **Food Chemistry**, v. 114, p. 976-983, 2009.

GOULA, A.M.; ADAMOPOULOS, G. Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: I. Drying kinetics and product recovery. **Drying Technology**, 26, 714-725, 2008.

GOULA, A.M.; ADAMOPOULOS, K.G. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 35-42, 2005.

GOULA, G.M.; ADAMOPOULOS, K.G. Spray drying of tomato pulp: Effect of feed concentration. **Drying Technology**, v. 22, p. 2309-2330, 2004.

GRABOWSKY, J.A.; TRUONG, V.-D.; DAUBERT, C.R. Spray-drying of amylase hydrolyzed sweetpotato puree and physicochemical properties of powder. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. E209-E217, 2006.

HWANG, J.Y.; SHUE, Y.S.; CHANG, H.M. Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels. **Food Research International**, v. 34, p. 639-647, 2001.

JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816 – 835, 2008.

KANTAPHANT, S.; BENJAKUL, S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidant activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 151, p. 410-419, 2008.

KIM, J.S.; LEE, Y.S. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time. **Food Chemistry**, v. 116, p. 227-232, 2009a.

KIM, J.S.; LEE, Y.S. Study of Maillard reaction products derived from aqueous model systems with different peptide chain lengths. **Food Chemistry**, v. 116, p. 846-853, 2009b.

KUROZAWA, L.E. Estudos dos processos de hidrólise enzimática e secagem por atomização para obtenção de hidrolisado protéico de frango em pó. Campinas, 2009.

148p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KUROZAWA, L.E.; MORASSI, A.G.; VANZO, A.A.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Influence of spray drying conditions on physicochemical properties of chicken meat powder. **Drying Technology**, 27, 1248-1257, 2009a.

KUROZAWA, L.E.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. **Journal of Food Engineering**, 94, 326-333, 2009b.

KUROZAWA, L.E.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Effect of maltodextrin and gum Arabic on water sorption and glass transition temperature of spray dried chicken meat hydrolysate protein. **Journal of Food Engineering**, 91, 287-296, 2009c.

LIU, P.; HUANG, M.; SONG, S.; HAYAT, K.; ZHANG, X.; XIA, S.; JIA, C. Sensory characteristics and antioxidant activities of maillard reaction products from soy protein hydrolysates with different molecular weight distribution. **Food Bioprocess and Technology**, *In press*: DOI 10.1007/s11947-010-0440-3, 2010.

O'HAGAN, P.; HASAPIDIS, K.; CODER, A.; HELSING, H.; POKRAJAC, G. Particle size analysis of food powders. In: ONWULATA, C. **Encapsulated and Powdered Foods**. London: CRC Press, 2005, p. 215-245.

PAPADAKIS, S.; GARDELI, C.; TZIA, C. Spray drying of raisin juice concentrate. **Drying Technology**, v. 24, n. 2, p. 173-180, 2006.

PHANTURAT, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; ROYTRAKUL, S. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 86-97, 2010.

PIHLANTO, A. Review: Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1306-1314, 2006.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized method for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REINICCIUS, G.A. Multiple-core encapsulation – the spray drying of food ingredients. In: VILSTRUP, P. **Microencapsulation of food ingredients**. Surrey: Leatherhead Publishing, 2001, p. 151-185.

ROCHA, G.; TRINDADE, M.; NETTO, F.; FAVARO-TRINDADE, C. Microcapsules of a casein hydrolysate: Production, characterization and application in protein bars. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 4, p. 407-413, 2009.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. **Journal of Food Science**, v.50, n.1, p.139-144, 1985.

ROOS, Y.; KAREL, M. Applying state diagrams to food processing and development. **Food Technology**, v.45, n.12, p.66-71. 1991.

SEYDEL, P.; BLÖMER, J.; BERTLING, J. Modeling particle formation at spray drying using population balances. **Drying Technology**, v. 24, n. 2, p. 137-146, 2006.

TONON, R.V. **Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto**. Campinas, 2009. 212p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influence of process conditions on the physical properties of açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v.88, p.411-418, 2008.

TONON, R.V.; BRABET, C.; PALLET, D.; BRAT, P.; HUBINGER, M.D. Physicochemical and morphological characterization of açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1950 – 1958, 2009.

WALTON, D.E. The morphology of spray dried particles- A qualitative view. **Drying Technology**, v. 19, p. 1943-1986, 2000.

WALTON, D.E.; MUMFORD, J. The morphology of spray-dried particles the effect of process variables upon the morphology of spray-dried particles. **Trans IChemE**, v. 77, partA, p. 442-460, 1999.

XIN, H.; MUJUMDAR, A. Spray drying and its application in food processing. In: PASSOS, M.; RIBEIRO, C. **Innovation in Food Engineering New Techniques and Products**. London: CRC Press, 2010. p. 303-329.

ZANONI, B.; PERI, C.; NANI, R.; LAVELLI, V. Oxidative heat damage of tomato halves as affected by drying. **Food Research International**, v. 31, n. 5, p. 395-401, 1999.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS

As curvas de cinética de reação enzimática obtidas seguiram o padrão estabelecido para clivagem protéica, caracterizado por uma alta taxa de reação inicial e a sua diminuição gradual até atingir uma fase estacionária. Os dados experimentais apresentaram um ótimo ajuste a uma equação de cinética enzimática reportada na literatura, para processos de hidrólise protéica.

O estudo da influência das variáveis de processo sobre a reação de hidrólise enzimática de pele de cação mostrou que a relação enzima/substrato foi a variável mais importante, onde maiores quantidades de enzima favoreceram a obtenção de graus de hidrólise mais elevados.

Na maioria de ensaios de hidrólise realizados, a recuperação de proteína foi superior a 90%, demonstrando a eficiência da ProtamexTM e do processo para a clivagem das proteínas presentes na pele de cação.

As condições ótimas, no processo de hidrólise protéica de pele de cação, foram estabelecidas em: temperatura de 51°C, relação enzima/substrato de 4,0% (p/p) e pH de 7,1. Nestas condições atingiu-se um grau de hidrólise de 19,3% e foi recuperada o 90,3% da proteína presente na matéria-prima.

O hidrolisado, obtido nas condições otimizadas, caracterizou-se por apresentar peptídeos de baixo peso molecular (menor que 6,5 kDa) e fornecer a quantidade mínima diária de aminoácidos requeridos por um adulto, evidenciando potencial aplicação na elaboração de suplementos nutricionais e alimentos funcionais.

No processo de secagem por atomização as duas variáveis estudadas exerceram diferentes efeitos sobre as respostas avaliadas.

A temperatura de secagem não teve influência significativa sobre a higroscopicidade e capacidade antioxidante, porém, teve influência sobre a densidade aparente e o tamanho de partícula. Temperaturas altas de secagem provocaram a diminuição da densidade aparente e o aumento no diâmetro médio volumétrico de partícula.

A concentração de maltodextrina teve influência sobre todas as variáveis estudadas. Quanto maior foi a concentração de maltodextrina adicionada, menores foram os teores de umidade e higroscopicidade, e maiores foram os valores de densidade aparente, diâmetro médio volumétrico de partícula e de capacidade antioxidante dos pós.

A distribuição de tamanho de partícula apresentou um formato bimodal com picos em torno de 1 e 8 μm .

As partículas do hidrolisado protéico de pele de cação com maltodextrina apresentaram estruturas esféricas, irregulares e com superfície rugosa, sendo classificadas como microesferas.

Finalmente, a capacidade antioxidante do hidrolisado foi conservada e em alguns casos favorecida pela presença da maltodextrina, provavelmente pela formação de produtos decorrentes da reação de Maillard, atingindo valores máximos de 17,44 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ de proteína para o ensaio *FRAP* e 230,3 μmol equivalente em Trolox/g amostra para o ensaio *TEAC*.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o processo de hidrólise enzimática a partir de diversas fontes protéicas visando a obtenção de peptídeos com atividade antioxidante, ação anti-hipertensiva e alta assimilação pelo organismo.
- Testar a atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos pelo uso de outros métodos *in vitro* como, por exemplo, o método *ORAC*, inibição da autooxidação do ácido linoléico, assim como métodos *in vivo*.
- Avaliar sensorialmente o uso da maltodextrina e outros materiais de parede na produção de hidrolisados protéicos em pó, visando a redução do sabor amargo e salgado característico dos hidrolisados produzidos pelo método pH-estático.
- Estudar a influência da presença de diferentes tipos agentes carreadores nas propriedades antioxidantes dos hidrolisados protéicos secos por *spray dryer*, avaliando a sua interação com peptídeos de baixo peso molecular, assim como a interação desses materiais com os mecanismos de reação dos métodos de determinação de atividade antioxidante.
- Fazer um estudo da estabilidade do hidrolisado protéico em pó através da determinação da temperatura de transição vítrea, isothermas de sorção e vida-de-prateleira.

APÊNDICE A

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

ARTIGOS SUBMETIDOS PARA REVISTA

RODRÍGUEZ-DÍAZ, J.C.; KUROZAWA, L.E.; NETTO, F.M.; HUBINGER, M.D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of Blue shark skin for recovery of low molecular weight peptides. Artigo submetido para o **Journal of Food Science**.

TRABALHOS COMPLETOS EM ANAIS DE CONGRESSO

RODRÍGUEZ-DÍAZ, J.C.; HUBINGER, M.D. Physicochemical properties of blue shark skin protein hydrolysate powders. In: **17th International Drying Symposium (IDS)**, Magdeburg, Alemanha, 2010.

RESUMOS EM ANAIS DE CONGRESSO

RODRÍGUEZ-DÍAZ, J.C.; HUBINGER, M.D. Influence of process conditions on the kinetic parameters of the enzymatic hydrolysis of Blue shark (*Prionace glauca*) skin. In: **IFT Annual Meeting and Food Expo**, Chicago, Estados Unidos, 2010.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, J.C.; NETTO, F.M.; HUBINGER, M.D. Characterization of blue shark skin protein hydrolysate by SE-HPLC, SDS-PAGE electrophoresis and aminoacid composition. In: **4th International Congress on Bioprocess in Food Industries**, Curitiba, Brasil, 2010.