



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS



DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA,
MICROENCAPSULAÇÃO E SECAGEM POR SPRAY
DRYER DA CARNE DE MEXILHÃO**

Vanessa Martins da Silva

Engenheira de Alimentos

Mestre em Engenharia de Alimentos

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Míriam Dupas Hubinger**

Co-Orientador: **Prof Dr. Kil Jin Park**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Campinas, fevereiro de 2011.

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

Si38e Silva, Vanessa Martins da
Estudo da hidrólise enzimática microencapsulação e secagem por spray dryer da carne de mexilhão / Vanessa Martins da Silva. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Miriam Dupas Hubinger
Co-orientador: Kil Jin Park
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Aroma de moluscos. 2. Hidrolisado protéico. 3. Secagem por atomização. 4. Agente carreador. 5. Estabilidade física. I. Hubinger, Miriam Dupas. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Study of enzymatic hydrolysis, microencapsulation and spray drying of mussel meat

Palavras-chave em inglês (Keywords): Mollusk flavor, Protein hydrolysate, Spray drying, Carrier agent, Physical stability

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Miriam Dupas Hubinger
Elisabete Maria Macedo Viegas
Flávia Maria Netto
Javier Telis Romero
Louise Emy Kurozawa

Data da Defesa: 24/02/2011

Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos

Essa tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS no Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, _____ de _____ de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Míriam Dupas Hubinger
(Orientadora – DEA / FEA / UNICAMP)

Prof^ª. Dr^ª. Elisabete Maria Macedo Viegas
(Membro Titular – FZEA / USP)

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

Prof. Dr. Javier Telis Romero
(Membro Titular – IBILCE / UNESP)

Prof^ª. Dr^ª. Louise Emy Kurozawa
(Membro Titular – DTA / UFRRJ)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Silvia Prata
(Membro Suplente – FCA / UNICAMP)

Prof^ª. Dr^ª. Carmen Sílvia Fávaro Trindade
(Membro Suplente – FZEA / USP)

Prof^ª. Dr^ª. Florência Cecília Menegalli
(Membro Suplente – DEA / FEA / UNICAMP)

“Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior. Estas atitudes se refletirão em mudanças positivas no seu ambiente familiar. Deste ponto em diante, as mudanças se expandirão em proporções cada vez maiores. Tudo o que fazemos produz efeito, causa algum impacto.”

(Dalai Lama)

Dedico este trabalho aos meus pais,

Roque e Eliete (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas bênçãos que sempre me concedeu em todos os momentos da minha vida.

À minha querida família, especialmente meu pai, minha mãe (*in memoriam*), meu irmão, minha irmã e minha sobrinha Júlia, que são as pessoas mais importantes desse mundo para mim.

Ao André pelo grande amor e companheirismo, em todos os momentos possíveis.

À Prof^a. Dr^a. Míriam Dupas Hubinger pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Agradeço pela paciência, apoio, confiança e todo o aprendizado que tive ao longo desses 3 anos de orientação.

Ao Prof. Dr. Kil Jin Park pela co-orientação e carinho ao longo dessa caminhada.

Ao Departamento de Engenharia de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela oportunidade da realização do doutorado e por toda a estrutura oferecida.

Aos membros dessa banca examinadora Prof^a. Dr^a. Ana Silvia Prata, Prof^a. Dr^a. Carmen Sílvia Fávoro Trindade, Prof^a. Dr^a. Elisabete Maria Macedo Viegas, Prof^a. Dr^a. Flávia Maria Netto, Prof. Dr. Javier Telis Romero, Prof^a. Dr^a. Louise Emy Kurozawa e Prof^a. Dr^a. Florência Cecília Menegalli pelas valiosas sugestões, importantes para a finalização desse trabalho.

À Fapesp, pela concessão da bolsa de doutorado e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Aos professores do DEA, em especial ao prof Dr. Eduardo Augusto Caldas Batista pela amizade e orientação durante o programa de estágio docente, importantes para a minha formação pessoal e profissional.

À profa Dra. Gláucia Maria Pastore pela concessão do uso do cromatógrafo gasoso, do Laboratório de Bioaromas, do Departamento de Ciência de Alimentos. Em especial, o meu

agradecimento ao Juliano, à Dani “gaúcha” e ao Gustavo Molina, por sempre me ajudarem e me acompanharem nas análises do laboratório.

Às técnicas Joyce (LEP/FEA) e Kelly (LRAC/FEQ) pela ajuda na realização de algumas análises ou na utilização de equipamentos. À Dona Ana por manter o laboratório sempre limpo e organizado.

À Marcela, Gláucia e Elen que sempre estiveram presentes nas alegrias e dúvidas durante a realização desse trabalho. A todos os amigos que fiz na Faculdade de Engenharia de Alimentos, que foram muito importantes nos momentos de alegria e de trabalho: Analia, Samira, Mariana, Cristiane, Júlio, Renata, Louise, Aninha, Fabi, Carol, Luiz, Nenis, Gustavo, Margarita, Cristina, Kelly, Nádia, Ângelo, Kátia, Patrícia Leal, Graziella, Márcia Simões, Cristina Takeiti, Irede, Márcia Souza, Lucielen, Raquel, Rosana, Ana Paula, Machadinhon e Bia. Alguns já não se encontram mais na FEA, pois já tomaram outros rumos na vida, espero encontrá-los um dia.

Agradeço a todos que contribuíram, diretamente ou indiretamente, para esse trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| RESUMO | XIII |
| ABSTRACT | XV |
| LISTA DE FIGURAS | XVII |
| LISTA DE TABELAS..... | XXII |
| NOMENCLATURA..... | XXVI |
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 1 |
| 2 OBJETIVOS..... | 6 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 7 |
| 3.1 MATÉRIA-PRIMA | 7 |
| 3.1.1 <i>Dados de produção</i> | 7 |
| 3.1.2 <i>Composição química dos mexilhões</i> | 8 |
| 3.2 HIDRÓLISE PROTÉICA | 9 |
| 3.2.1 <i>Cinética da hidrólise enzimática</i> | 13 |
| 3.2.2 <i>Enzimas proteolíticas</i> | 17 |
| 3.3 MICROENCAPSULAÇÃO ATRAVÉS DA SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO..... | 17 |
| 3.3.1 <i>Agentes carreadores</i> | 21 |
| 3.4 ESTRUTURA DAS MICROCÁPSULAS..... | 23 |
| 3.5 ESTABILIDADE FÍSICA DAS MICROCÁPSULAS | 24 |
| 3.6 ISOTERMAS DE SORÇÃO..... | 26 |
| 3.7 COMPOSIÇÃO DE VOLÁTEIS | 29 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 31 |
| 4.1 MATERIAL..... | 31 |
| 4.1.1 <i>Matéria-prima</i> | 31 |
| 4.1.2 <i>Enzima</i> | 31 |
| 4.1.3 <i>Agentes carreadores</i> | 31 |
| 4.2 MÉTODOS | 31 |
| 4.2.1 <i>Atividade enzimática</i> | 32 |
| 4.2.2 <i>Composição química</i> | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.3 Hidrólise enzimática..... | 33 |
| 4.2.4 Perfil de aminoácidos..... | 37 |
| 4.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida | 37 |
| 4.2.6 Composição dos voláteis | 38 |
| 4.2.7 Comportamento reológico do hidrolisado protéico usado na alimentação do secador spray dryer..... | 41 |
| 4.2.8 Secagem por atomização..... | 42 |
| 4.2.9 Análises físico-químicas dos pós | 44 |
| 4.2.10 Microestrutura das micropartículas..... | 45 |
| 4.2.11 Determinação das isotermas de adsorção..... | 46 |
| 4.2.12 Determinação da temperatura de transição vítrea dos hidrolisados protéicos de mexilhão em pó | 46 |
| 4.2.13 Estabilidade dos componentes voláteis do hidrolisado puro e das micropartículas durante a estocagem..... | 48 |
| 4.2.14 Análise estatística..... | 48 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 50 |
| 5.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA..... | 50 |
| 5.1.1 Cinética da hidrólise enzimática | 51 |
| 5.1.2 Modelagem matemática..... | 56 |
| 5.1.3 Planejamento experimental da hidrólise enzimática, avaliação dos parâmetros cinéticos da reação..... | 59 |
| 5.1.4 Planejamento experimental da hidrólise enzimática: Avaliação do grau de hidrólise e da recuperação de proteína..... | 74 |
| 5.1.5 Otimização do processo de hidrólise enzimática | 84 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO OBTIDO NA REGIÃO OTIMIZADA..... | 87 |
| 5.2.1 Composição química | 87 |
| 5.2.2 Perfil eletroforético | 88 |
| 5.2.3 Perfil dos aminoácidos | 90 |
| 5.2.4 Composição de voláteis do hidrolisado protéico de mexilhão..... | 92 |
| 5.3 COMPORTAMENTO REOLÓGICO DO HIDROLISADO USADO NA ALIMENTAÇÃO DO SECADOR | 100 |
| 5.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA SECAGEM | 106 |
| 5.4.1 Agente carreador maltodextrina | 106 |

| | |
|---|------------|
| 5.4.2 Otimização do processo de secagem para a maltodextrina | 118 |
| 5.4.3 Agente carreador goma arábica..... | 120 |
| 5.4.4 Otimização do processo de secagem para a goma arábica | 134 |
| 5.5 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS | 137 |
| 5.6 MICROESTRUTURA DO HIDROLISADO PURO E DAS MICROPARTÍCULAS | 139 |
| 5.7 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DO HIDROLISADO PURO E DAS MICROPARTÍCULAS..... | 145 |
| 5.8 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA | 153 |
| 5.9 ESTABILIDADE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO HIDROLISADO PURO EM PÓ E DAS MICROPARTÍCULAS DURANTE A ESTOCAGEM..... | 165 |
| 6 CONCLUSÕES | 173 |
| 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 175 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 176 |
| APÊNDICE A | 194 |
| APÊNDICE B | 196 |

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar as etapas de hidrólise enzimática da carne de mexilhão e posterior secagem por *spray dryer* para produção de aroma de mexilhão em pó, que poderá servir de ingrediente para produtos como sopas, molhos e bebidas. O desenvolvimento experimental foi iniciado pelo estudo da hidrólise enzimática da carne de mexilhão, usando a enzima ProtamexTM, em um delineamento composto central rotacional 2³, para avaliar os efeitos das variáveis pH (6,7 a 8,3), concentração enzima:substrato (0,48 a 5,52% p/p) e temperatura (46°C a 64°C) sobre o grau de hidrólise (% GH), a recuperação da proteína (% RP) e os parâmetros cinéticos do modelo empírico, que descreve a cinética de reação. A condição ótima de reação sugerida, com o objetivo de obter os maiores valores de grau de hidrólise e de recuperação de proteína, foi de pH 6,85, concentração enzima:substrato 4,5% e temperatura 51°C, onde se obteve 16,9% de grau de hidrólise e 64,4% de recuperação de proteína. O hidrolisado obtido na condição ótima foi caracterizado através da composição química, perfil de aminoácidos, perfil eletroforético e perfil de voláteis, sendo tentativamente identificados alguns álcoois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos. A etapa posterior foi a obtenção das curvas de escoamento do hidrolisado, obtido na melhor condição de hidrólise, adicionado de maltodextrina ou goma arábica, nas concentrações utilizadas na alimentação do secador de *spray dryer* (0, 5, 7, 10, 13, 15 e 30%); sendo que este fluido foi caracterizado como newtoniano. Na etapa seguinte, o hidrolisado foi produzido em tanque encamisado de 7 litros e levado à secagem por *spray dryer*. Um delineamento composto central rotacional 2³ foi utilizado para avaliar a influência da concentração de agente carreador (maltodextrina 10 DE ou goma arábica) de 5 a 15%, da vazão do líquido de alimentação de 0,4 a 1 L/h e da temperatura do ar de secagem de 140 a 190°C sobre algumas características físico-químicas dos pós como: atividade de água, umidade, higroscopicidade, densidade aparente, diâmetro das partículas e rendimento do processo de secagem. O ponto ótimo do processo de secagem, considerando os menores valores de higroscopicidade e umidade dos pós, foi obtido na concentração de 15% de agente carreador, maltodextrina ou goma arábica, 180°C e 0,8 L/h. Na próxima etapa do trabalho foram determinadas as condições críticas de estocagem do pó, com base na determinação das isotermas de adsorção e na temperatura de transição

vítrea das micropartículas. A temperatura de transição vítrea do hidrolisado protéico de mexilhão aumentou com a adição de agente carreador, aumentando a estabilidade física do pó. Na etapa final, foi estudada a estabilidade dos voláteis, durante a estocagem a 25°C, por 120 dias, sendo que o hidrolisado puro e as micropartículas produzidas com 15% e 30% de maltodextrina apresentaram grande perda dos compostos voláteis totais, em comparação com as micropartículas produzidas com 15 e 30% de goma arábica, os quais indicaram maior proteção desses compostos.

Palavras-chave: aroma de moluscos, hidrolisado protéico, secagem por atomização, agente carreador e estabilidade física.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the steps of enzymatic hydrolysis of mussel meat followed by spray drying, to obtain a powder mussel flavor that could be used as ingredient in products such as soups, sauces and drinks. The experimental plan was initiated by the study of enzymatic hydrolysis of mussel meat, using the enzyme ProtamexTM, in a central composite rotatable design 2^3 to evaluate the effects of the variables pH (6.7 to 8.3), enzyme to substrate ratio (0.48 to 5.52 %) and temperature (46 to 64 °C) on the degree of hydrolysis (% DH), the protein recovery (% PR) and the kinetics parameters of an empirical model, that describes the kinetics reaction. The optimal condition to obtain the maximum values of degree of hydrolysis and protein recovery was of pH of 6.85, enzyme to substrate ratio of 4.5 % and temperature of 51 °C, with 16.9 % of degree of hydrolysis and 64.4 % of protein recovery. The hydrolysate obtained at optimal condition was characterized by chemical composition, total amino acid, electrophoretic and volatiles profile, it was tentatively identified some alcohols, aldehydes, ketones and hydrocarbons. In the next step the flow curves of the hydrolysate, produced in the optimal condition of hydrolysis, added with maltodextrin or gum Arabic, in the feed concentration of spray dryer (0, 3, 5, 10, 15 e 30%) were determined; this fluid was characterized as Newtonian. Then, the hydrolysate was produced in 7 litres reactor and spray dried. A central composite rotatable design 2^3 was used to evaluate the influence of the carrier concentration (maltodextrin 10 DE or gum Arabic) from 5 to 15%, the feed flow rate from 0.4 to 1 L/h and the drying air temperature from 140 to 190 °C on some physico-chemical characteristics of powders as: water activity, moisture content, hygroscopicity, bulk density, particle diameter and yield drying process. The optimal condition of drying process, considering the minimum values of hygroscopicity and moisture content was of 15 % of carrier agent concentration, maltodextrin or gum Arabic, 180 °C and 0.8 L/h. The critical storage conditions were determined based on the adsorption isotherms and glass transition temperature of the microparticles. The glass transition temperature of the mussel hydrolysate increased with the addition of carrier agent, which increased powder physical stability. In the last step, the stability of volatiles was studied, during the storage at 25 °C for 120 days. The pure hydrolysate and produced with 15 % and 30 % of maltodextrin

presented higher volatile losses than microparticles produced with 15 and 30 % of gum Arabic, which indicated a more effective protection of those components.

Keywords: mollusk flavor, protein hydrolysate, spray drying, carrier agent and physical stability.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 3.1. Produção de mexilhões do Brasil e do Chile nos últimos dez anos (FAO, 2008). | 8 |
| Figura 3.2. Representação esquemática do <i>spray dryer</i> (adaptado de DZIEZAK, 1988)... | 18 |
| Figura 3.3. Estrutura molecular da goma arábica. A = arabinosil; Radicais baseados em R ₁ = ramnose, R ₂ = ácido glucurônico, R ₃ = arabinose (adaptado de ISLAM et al., 1997)..... | 23 |
| Figura 3.4. Estrutura das micropartículas (adaptado de JAFARI et al., 2008)..... | 24 |
| Figura 3.5. Tipos de isotermas de sorção (BRUNAUER; EMMET; TELLER, 1938)..... | 29 |
| Figura 4.1. Montagem experimental para a hidrólise enzimática da carne de mexilhão, reator de 250 mL..... | 34 |
| Figura 4.2. Montagem experimental para a hidrólise enzimática da carne de mexilhão, reator de 7 L..... | 34 |
| Figura 4.3. Montagem experimental utilizada para a extração dos compostos voláteis através da microextração por fase sólida (SPME)..... | 39 |
| Figura 4.4. <i>Spray dryer</i> laboratorial utilizado nos ensaios de secagem por atomização..... | 43 |
| Figura 5.1. Cinética de hidrólise enzimática de carne de mexilhão, pontos fatoriais (a), axiais (b) e centrais (c)..... | 52 |
| Figura 5.2. Taxa de hidrólise enzimática da carne de mexilhão (d(GH)/dt) em função do grau de hidrólise, pontos fatoriais (a), axiais (b) e centrais (c). | 56 |
| Figura 5.3. Ajuste da equação de cinética aos dados experimentais de hidrólise enzimática de carne de mexilhão, onde os pontos representam os dados observados e a curva, o modelo obtido, pontos fatoriais (a), axiais (b) e centrais (c). | 59 |
| Figura 5.4. Influência das variáveis independentes sobre o parâmetro “a”, onde: (a) pH = 7,5; (b) T = 55°C e (c) E/S = 3%..... | 62 |
| Figura 5.5. Influência das variáveis independentes sobre o parâmetro “b”, onde: (a) pH = 7,5; (b) T = 55°C e (c) E/S = 3%..... | 65 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.6. Influência da concentração inicial de enzima sobre o grau de hidrólise, a T = 55°C e pH = 7,5..... | 69 |
| Figura 5.7. Influência da concentração inicial de substrato sobre o grau de hidrólise, a T = 50°C e pH = 7,0..... | 70 |
| Figura 5.8. Influência da concentração inicial de enzima sobre a taxa de reação de hidrólise, a T = 55°C e pH = 7,5. | 70 |
| Figura 5.9. Influência da adição de substrato e enzima frescos sobre o grau de hidrólise, a T = 50°C, E/S = 1,5% e pH = 7,0..... | 71 |
| Figura 5.10. Influência da concentração inicial de enzima pelo tempo sobre o grau de hidrólise, a T = 55°C e pH = 7,5. | 71 |
| Figura 5.11. Influência da temperatura de reação sobre o grau de hidrólise, a 1,5% E/S e pH = 7,0..... | 72 |
| Figura 5.12. Curva ln a vs 1/T para determinação da Energia de Ativação da Hidrólise. .. | 73 |
| Figura 5.13. Curva ln (a.b) vs 1/T para determinação da Energia de Inativação Enzimática. | 74 |
| Figura 5.14. Influência das variáveis independentes sobre a resposta grau de hidrólise: (a) pH = 7,5, (b) T = 55°C e (c) E/S = 3%..... | 78 |
| Figura 5.15. Influência das variáveis independentes sobre a resposta recuperação de proteína: (a) pH = 7,5, (b) T = 55°C e (c) E/S = 3%. | 81 |
| Figura 5.16. Relação entre o grau de hidrólise da carne de mexilhão e a recuperação de proteína. | 83 |
| Figura 5.17. Sobreposição das curvas de nível de grau de hidrólise (% GH) e recuperação de proteína (% RP), na hidrólise enzimática da carne de mexilhão: pH = 7,5 (a); E/S = 3% (b) e T = 55°C (c). | 86 |
| Figura 5.18. Perfil eletroforético SDS-PAGE (a), gel 12% de acrilamida e Tricine-SDS-PAGE (b), gel 15,5% de acrilamida, da carne de mexilhão (colunas 2 e 5) e do hidrolisado | |

| | |
|---|-----|
| protéico de mexilhão (colunas 3 e 6). As colunas 1 e 4 representam os marcadores de massa molecular da Bio-Rad Laboratories (Hercules, EUA). | 89 |
| Figura 5.19. Perfis cromatográficos obtidos na etapa de otimização da extração por fase sólida, nas temperaturas de extração de 30 a 50°C e tempos de 15 a 45 min. | 95 |
| Figura 5.20. Perfis cromatográficos do hidrolisado protéico de mexilhão(a), do precipitado (b) e da carne de mexilhão (c) obtidos na condição otimizada de extração dos voláteis, tempo de dessorção de 0,75 min..... | 96 |
| Figura 5.21. Perfis cromatográficos do hidrolisado protéico de mexilhão (a), do precipitado (b) e da carne de mexilhão (c) obtidos na condição otimizada de extração dos voláteis, tempo de dessorção de 6 min..... | 97 |
| Figura 5.22. Curvas de escoamento do hidrolisado protéico de mexilhão adicionado de maltodextrina (a) ou goma arábica (b). | 101 |
| Figura 5.23. Viscosidade do hidrolisado protéico de mexilhão adicionado de maltodextrina (a) ou goma arábica (b)..... | 104 |
| Figura 5.24. Viscosidade do hidrolisado protéico de mexilhão adicionado de maltodextrina e goma arábica, calculada a taxa de deformação de 10^3 s^{-1} , em função da concentração dos agentes carreadores..... | 105 |
| Figura 5.25. Influência das variáveis independentes sobre a resposta umidade dos pós: (a) $V = 0,7 \text{ L/h}$ e (b) $C = 10\%$ | 109 |
| Figura 5.26. Influência das variáveis independentes sobre a higroscopicidade dos pós: (a) $T = 165^\circ\text{C}$, (b) $V = 0,7 \text{ L/h}$ e (c) $C = 10\%$ | 112 |
| Figura 5.27. Influência das variáveis independentes sobre a resposta diâmetro médio das partículas: (a) $T = 165^\circ\text{C}$, (b) $V = 0,7 \text{ L/h}$ e (c) $C = 10\%$ | 114 |
| Figura 5.28. Sobreposição das curvas de nível de conteúdo de umidade (%) e de higroscopicidade (g água/g sólidos) à concentração de maltodextrina de 10%, na secagem por <i>spray dryer</i> do hidrolisado protéico da carne de mexilhão: à temperatura de 165°C (a), à vazão de $0,7 \text{ L/h}$ (b) e à concentração de maltodextrina de 10% (c)..... | 119 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5.29. Influência das variáveis independentes sobre a resposta atividade de água: (a) T = 165°C, (b) V = 0,7 L/h e (c) C = 10%. | 123 |
| Figura 5.30. Influência das variáveis independentes sobre a resposta umidade: (a) T = 165°C, (b) V = 0,7 L/h e (c) C = 10%. | 125 |
| Figura 5.31. Influência das variáveis independentes sobre a resposta higroscopicidade: (a) T = 165°C, (b) V = 0,7 L/h e (c) C = 10%. | 128 |
| Figura 5.32. Influência das variáveis independentes sobre a resposta densidade aparente: (a) T = 165°C, (b) V = 0,7 L/h e (c) C = 10%. | 131 |
| Figura 5.33. Influência das variáveis independentes sobre a resposta rendimento do processo de secagem: (a) T = 165°C, (b) V = 0,7 L/h e (c) C = 10%. | 133 |
| Figura 5.34. Sobreposição das curvas de nível de conteúdo de umidade (%) e de higroscopicidade (g água/g sólidos): (a) temperatura de 165°C, (b) vazão de 0,7 L/h e (c) concentração de goma arábica de 10%, na secagem por <i>spray dryer</i> do hidrolisado protéico da carne de mexilhão. | 136 |
| Figura 5.35. Distribuição do tamanho das partículas do hidrolisado puro em pó, com 15% de maltodextrina, 15% de goma arábica, 30% de maltodextrina e 30% de goma arábica. | 137 |
| Figura 5.36. Imagens do hidrolisado puro em pó (a), 15% de maltodextrina (b), 30% de maltodextrina (c) 15% de goma arábica (d) e 30% de goma arábica (e), aumento de 2000 (1) e 5000x (2). | 141 |
| Figura 5.37. Distribuição do tamanho das micropartículas, do hidrolisado puro em pó (a), adicionado de 15% de maltodextrina (b), 30% de maltodextrina (c), 15% de goma arábica (d) e 30% de goma arábica (e) obtida através das imagens de microestrutura eletrônica de varredura. | 145 |
| Figura 5.38. Curvas de adsorção do hidrolisado de mexilhão puro e do hidrolisado protéico de mexilhão adicionado de maltodextrina (a) e goma arábica (b). | 151 |
| Figura 5.39. Alterações físicas ocorridas no hidrolisado puro, nos agentes carreadores puros e nas amostras formuladas com maltodextrina e goma arábica do hidrolisado protéico de mexilhão em pó. | 153 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5.40. Temperaturas de transição vítrea obtidas para o hidrolisado puro (a), adicionado de 15% de maltodextrina (b), 30% de maltodextrina (c), 15% de goma arábica (d) e 30% de goma arábica (e)..... | 157 |
| Figura 5.41. Efeito da fração de sólidos na temperatura de transição vítrea do hidrolisado protéico de mexilhão em pó formulado com: (a) maltodextrina e (b) goma arábica. | 159 |
| Figura 5.42. Variação da temperatura de transição vítrea e da umidade de equilíbrio com a atividade de água para o hidrolisado protéico de mexilhão em pó (a) puro e formulado com (b) 15% de maltodextrina, (c) 30% de maltodextrina, (d) 15% goma arábica e (e) 30% de goma arábica..... | 163 |
| Figura 5.43. Composição de voláteis do hidrolisado puro (A), produzido com 15% de maltodextrina (B), 30% de maltodextrina (C), 15% de goma arábica (D) e 30% de goma arábica (E), tempo zero e após 120 dias de armazenamento, a 25°C. Os seguintes compostos foram detectados: (4) 2-nonanona, (5) nonanal, (7) 2-penten-1-ol e (8) hexanal. Já os seguintes compostos foram tentativamente identificados: (1) estireno (2) 2-etil-1-hexanol, (3) dimetiletilbenzeno, (6) undecanol e (9) heptadecano..... | 167 |
| Figura 5.44. Comportamento do undecanol (A) e do heptadecano (B), no estudo da estabilidade durante a estocagem a 25°C. | 170 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1. Produção mundial de mexilhões em 2007..... | 8 |
| Tabela 3.2. Composição média da carne do mexilhão citada por diversos autores..... | 9 |
| Tabela 3.3. Expressão dos parâmetros cinéticos “a” e “b” para a equação exponencial de determinação do grau de hidrólise..... | 15 |
| Tabela 3.4. Características dos amidos e seus hidrolisados, de acordo com a sua dextrose equivalente (adaptado de MURRAY e LUFT, 1973)..... | 22 |
| Tabela 3.5. Modelos matemáticos utilizados para o ajuste de isotermas de sorção de alimentos..... | 28 |
| Tabela 4.1. Ensaios para o planejamento experimental, variando a temperatura, a razão enzima:substrato (E/S) e o pH nos experimentos. | 35 |
| Tabela 4.2. Tempos de retenção dos hidrocarbonetos usados como referência no cálculo do índice de retenção dos compostos. | 41 |
| Tabela 4.3. Ensaios para o planejamento experimental, variando a temperatura do ar de secagem (T), a vazão de alimentação (V) e a concentração do agente carreador (C). | 43 |
| Tabela 4.4. Valores de atividade de água relacionados às soluções salinas saturadas a 25°C. | 46 |
| Tabela 5.1. Composição química da carne de mexilhão, em base úmida. | 50 |
| Tabela 5.2. Parâmetros de cinética obtidos dos ensaios de hidrólise enzimática de carne de mexilhão. | 57 |
| Tabela 5.3. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator do modelo codificado para o parâmetro “a”. | 60 |
| Tabela 5.4. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta “a”. | 60 |
| Tabela 5.5. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para o parâmetro “b”. | 63 |
| Tabela 5.6. Análise de variância do modelo ajustado para o parâmetro “b”..... | 63 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 5.7. Resultados experimentais de grau de hidrólise (% GH) e de recuperação de proteína (% RP) de acordo com o planejamento experimental. | 75 |
| Tabela 5.8. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta grau de hidrólise. | 76 |
| Tabela 5.9. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta grau de hidrólise. | 76 |
| Tabela 5.10. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta recuperação de proteína. | 79 |
| Tabela 5.11. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta recuperação de proteína. | 80 |
| Tabela 5.12. Caracterização química do hidrolisado protéico e do resíduo, obtidos em menor escala, reator de 250 mL. | 87 |
| Tabela 5.13. Caracterização química do hidrolisado protéico e do resíduo, obtidos em maior escala, reator de 7 L. | 87 |
| Tabela 5.14. Composição de aminoácidos totais (em g/100 g de proteína) da carne de mexilhão e do hidrolisado obtido na condição ótima de hidrólise. | 91 |
| Tabela 5.15. Condições experimentais e respostas instrumentais obtidas na otimização das condições de extração dos voláteis do hidrolisado de mexilhão, por SPME. | 93 |
| Tabela 5.16. Compostos voláteis tentativamente identificados na carne de mexilhão e no hidrolisado protéico de mexilhão, índices de retenção (RI) e métodos de identificação. | 98 |
| Tabela 5.17. Valores dos parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo para fluidos newtonianos e ao modelo de lei da potência. | 102 |
| Tabela 5.18. Resultados do planejamento experimental da secagem por <i>spray dryer</i> do hidrolisado protéico de mexilhão, com maltodextrina. | 106 |
| Tabela 5.19. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta atividade de água. | 107 |
| Tabela 5.20. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta umidade (% , b.s.)..... | 108 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 5.21. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta umidade..... | 108 |
| Tabela 5.22. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta higroscopicidade (g água/g sólidos)..... | 110 |
| Tabela 5.23. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta higroscopicidade. | 110 |
| Tabela 5.24. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta diâmetro médio das partículas (μm)..... | 113 |
| Tabela 5.25. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta diâmetro médio das partículas..... | 113 |
| Tabela 5.26. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta densidade aparente (g/cm^3). | 116 |
| Tabela 5.27. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta rendimento do processo (%)...... | 117 |
| Tabela 5.28. Coeficientes de regressão obtidos para todas as respostas do planejamento experimental, para a maltodextrina ($p \leq 0,10$)..... | 118 |
| Tabela 5.29. Resultados do planejamento experimental da secagem por <i>spray dryer</i> do hidrolisado protéico de mexilhão, com goma arábica. | 121 |
| Tabela 5.30. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta atividade de água. | 121 |
| Tabela 5.31. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta atividade de água. | 122 |
| Tabela 5.32. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta umidade (% , b.s.)..... | 124 |
| Tabela 5.33. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta umidade..... | 124 |
| Tabela 5.34. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta higroscopicidade (g água/g sólidos)..... | 127 |
| Tabela 5.35. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta higroscopicidade. | 127 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 5.36. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta densidade aparente (g/cm^3). | 129 |
| Tabela 5.37. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta densidade aparente. | 130 |
| Tabela 5.38. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta rendimento de secagem. | 132 |
| Tabela 5.39. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta rendimento de secagem. | 132 |
| Tabela 5.40. Coeficientes de regressão obtidos para todas as respostas do planejamento experimental, para o agente carreador goma arábica ($p \leq 0,10$)..... | 134 |
| Tabela 5.41. Diâmetro das partículas do hidrolisado puro em pó e produzidas com os agentes carreadores, maltodextrina ou goma arábica. | 142 |
| Tabela 5.42. Umidade de equilíbrio do hidrolisado protéico em pó puro e formulado com maltodextrina e goma arábica..... | 146 |
| Tabela 5.43. Umidade de equilíbrio dos agentes encapsulantes puros, maltodextrina 10 DE e goma arábica..... | 146 |
| Tabela 5.44. Parâmetros estimados dos modelos de isotermas de adsorção do hidrolisado protéico em pó puro e formulado com maltodextrina e goma arábica. | 147 |
| Tabela 5.45. Parâmetros de ajuste da equação de Gordon-Taylor para o hidrolisado protéico em pó puro e formulado com maltodextrina e goma arábica. | 157 |
| Tabela 5.46. Valores críticos de atividade de água (a_w_c) e de conteúdo de umidade (X_c) para o hidrolisado protéico puro (0%) e para os encapsulados com maltodextrina (MD) ou goma arábica (GA). | 163 |
| Tabela 5.47. Compostos detectados no hidrolisado puro em pó e nas microcápsulas produzidas, no tempo zero e após 120 dias de estocagem (ng/g)..... | 169 |

NOMENCLATURA

| | |
|-----------|---|
| $ E $ | concentração de enzima livre (AU L ⁻¹) |
| $ ES $ | concentração do complexo enzima-substrato (AU L ⁻¹) |
| $ S $ | concentração de substrato (g L ⁻¹) |
| a | parâmetro cinético (min ⁻¹) |
| A_a | fator de frequência (adimensional) |
| A_d | fator de frequência (adimensional) |
| A_h | constante do modelo de Halsey (Equação 3.21) |
| A_o | constante do modelo de Oswin (Equação 3.22) |
| a_w | atividade de água |
| b | parâmetro cinético, adimensional |
| B | consume de base (mL) |
| B_h | constante do modelo de Halsey (Equação 3.21) |
| B_o | constante do modelo de Oswin (Equação 3.22) |
| C | concentração de agente carreador (%) |
| C_{BET} | constante do modelo de BET (Equação 3.19 e 3.20) |
| C_{GAB} | constante do modelo de GAB (Equação 3.18) |
| d_i | diâmetro médio das partículas (µm) |
| e | concentração total de enzima (AU L ⁻¹) |

| | |
|-----------------|--|
| E | enzima livre |
| E/S | razão enzima substrato (%) |
| e_0 | concentração inicial de enzima (AU L ⁻¹) |
| E_A | Energia de Ativação da Hidrólise (kJ/mol) |
| E_a | enzima na forma ativa |
| E_D | Energia de Inativação Enzimática (kJ/mol)] |
| E_i | enzima na forma inativa |
| EM | desvio relativo médio (%) |
| ES | complexo enzima-substrato |
| f | fugacidade da água na mistura |
| $F_{calculado}$ | valor de F calculado |
| f_o | fugacidade da água pura no estado padrão |
| $F_{tabelado}$ | valor de F tabelado |
| GH | grau de hidrólise (%) |
| h | número de ligações peptídicas hidrolisadas (eqv g ⁻¹) |
| h_{total} | número total de ligações peptídicas por unidade de massa de proteína no substrato (eqv g ⁻¹) |
| I^n | índice de retenção do marcador que eluiu antes do composto x |
| IR | índice de retenção do composto x |

| | |
|-----------|---|
| k | índice de consistência (Pa.s ⁿ) |
| k_{GT} | constante do modelo de Gordon Taylor (Equação 4.10) |
| k_{-1} | constante da taxa de reação de hidrólise (g AU ⁻¹ min ⁻¹) |
| k_1 | constante da taxa de reação de hidrólise (L AU ⁻¹ min ⁻¹) |
| k_2 | constante da taxa de reação de hidrólise (g AU ⁻¹ min ⁻¹) |
| k_3 | constante da taxa de reação de inativação (L AU ⁻¹ min ⁻¹) |
| K_a | constante do modelo de Peleg (Equação 3.24) |
| K_b | constante do modelo de Peleg (Equação 3.24) |
| K_{GAB} | constante do modelo de GAB (Equação 3.18) |
| K_h | constante do modelo de Henderson (Equação 3.23) |
| k_m | constante de Michaelis-Menten (g L ⁻¹) |
| K_p | constante da reação de inibição pelo produto (g L ⁻¹) |
| K_s | constante da reação de inibição pelo substrato (g L ⁻¹) |
| L | linear |
| $M_{líq}$ | massa de líquido (g) |
| M_p | massa do precipitado (g) |
| MP | massa de proteína no substrato original (g) |
| $M_{pó}$ | massa de pó (g) |
| MP_p | massa de proteína no precipitado (g) |

| | |
|-------------|---|
| MP_s | massa de proteína no sobrenadante (g) |
| M_s | massa do sobrenadante (g) |
| $M_{s,líq}$ | massa de sólidos no líquido (g) |
| $M_{s,pó}$ | massa de sólidos no pó (g) |
| n | índice de escoamento (adimensional) |
| N | número de camadas moleculares |
| n_a | constante do modelo de Peleg (Equação 3.24) |
| n_b | constante do modelo de Peleg (Equação 3.24) |
| N_b | normalidade da base (N) |
| n_h | constante do modelo de Henderson (Equação 3.23) |
| n_i | número de partículas |
| p | concentração do produto (g L^{-1}) |
| P | produto |
| pK | pK médio dos grupos α -amino liberados durante a hidrólise |
| P_o | pressão de vapor da água pura |
| P_w | pressão de vapor de água em equilíbrio no alimento |
| Q | quadrático |
| R | constante universal dos gases (J/mol K) |
| r | taxa de reação ($\text{g L}^{-1} \text{min}^{-1}$) |

| | |
|-----------|---|
| R^2 | coeficiente de determinação |
| RP | recuperação de proteína (%) |
| RS | rendimento do processo de secagem (%) |
| S | substrato livre |
| S_0 | concentração inicial de substrato (g L^{-1}) |
| t | tempo (min) |
| T | temperatura ($^{\circ}\text{C}$ or K) |
| T_g | temperatura de transição vítrea da mistura ($^{\circ}\text{C}$) |
| T_{gs} | temperature de transição vítrea do sólido puro ($^{\circ}\text{C}$) |
| T_{gw} | temperatura de transição vítrea da água ($^{\circ}\text{C}$) |
| t_n | tempo de retenção do marcador que eluiu antes do composto x |
| t_{n+1} | tempo de retenção do marcador que eluiu depois do composto x |
| t_x | tempo de retenção do composto x (min) |
| UR | umidade relativa do ambiente (%) |
| V | vazão do líquido de alimentação (L/h) |
| V_0 | valores experimentais |
| V_p | valores preditos |
| W_s | fração de sólidos (g sólido/g total) |
| W_w | fração de água (g água/g total) |

| | |
|-------------|---|
| X | conteúdo de umidade (g água/g sólidos secos) |
| X_e | umidade de equilíbrio (g água/g sólidos secos) |
| X_m | umidade na monocamada molecular (g água/g sólidos secos) |
| x_p | conteúdo de proteína no precipitado (g proteína/100g precipitado) |
| x_s | conteúdo de proteína no sobrenadante (g proteína/100g sobrenadante) |
| $X_{s,líq}$ | conteúdo de sólidos no líquido (g sólidos/g líquido) |
| $X_{s,pó}$ | conteúdo de sólidos no pó (g sólidos/g pó) |
| $X_{w,líq}$ | conteúdo de água no líquido (g água/g líquido) |
| $X_{w,pó}$ | conteúdo de água no pó (g água/g pó) |
| Z | número de amostras |

Letras gregas

| | |
|----------------|--|
| α | grau de dissociação dos grupos α -amino |
| σ | tensão (Pa) |
| $\dot{\gamma}$ | taxa de deformação (s^{-1}) |
| ρ | densidade (g/cm^3) |
| η | viscosidade (Pa.s) |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A maricultura, que envolve o cultivo de moluscos, crustáceos e peixes é uma atividade que tem adquirido importância em diversos países de vasto litoral, como fornecedora de proteína animal. Isso se dá em decorrência dos baixos custos de produção e pelo fato de proporcionar boa rentabilidade. Os países que ocupam posição de destaque nessa produção são China, Espanha, Nova Zelândia, Chile, França, Itália e Brasil. Observa-se um potencial mercado consumidor de peixes e frutos-do-mar em regiões como África, América Latina, oeste e sudoeste da Ásia, pois nestes lugares o consumo desse tipo de produto *per capita por ano* está muito abaixo da média mundial, que foi de 16,7 kg, em 2006, sendo que no Brasil o consumo foi de 6,87 kg *per capita*, em 2007 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2008).

O cultivo de moluscos marinhos, chamado de malacocultura, possui, no Brasil, maior representatividade através da produção de ostras e mexilhões (SOUZA FILHO, 2003). Segundo Brandini, Silva e Proença (2000), os moluscos de importância comercial, produzidos no Brasil são o mexilhão *Perna perna*, duas espécies de ostras, a nativa *Crassostrea rhizophorae*, a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*, espécie exótica introduzida na década de 80 e a vieira *Nodipecten nodosus*.

O Brasil destaca-se como o segundo maior produtor de mexilhões na América Latina com 12.002 ton em 2007 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2008). O estado de Santa Catarina é a maior região produtora de mexilhões, com 12.234 ton em 2005, apresentando redução da produção para 10.891 ton em 2008, devido ao excesso de chuvas na região, o que causou queda da salinidade da água do mar e conseqüentemente mortalidade dos mexilhões. Este estado é responsável por 95% da produção nacional de moluscos cultivados (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA/CENTRO DE DESENVOLVIMENTO EM AQUICULTURA E PESCA, 2009).

A comercialização dos mexilhões ocorre localmente, logo após a colheita nas formas *in natura* (na concha) ou desconchada, sendo processado pelos produtores através das cooperativas de beneficiamento do produto. Um estudo de mercado realizado em 3

capitais brasileiras constatou que os consumidores de mexilhão são minoria na população estudada, com cerca de 29% em São Paulo e Porto Alegre e 47% em Curitiba. O consumo ocorre principalmente em casa (ao redor de 50%) e nos restaurantes (cerca de 35%), poucas vezes no ano e principalmente nos meses de verão. Os principais atributos que afetam a decisão de compra do consumidor são: o sabor, a qualidade (avaliada pela aparência) e o prazo de validade (associada à segurança do produto) (BARNI et al., 2003).

A capacidade de armazenamento e estocagem dos moluscos cultivados ainda é muito limitada, pois uma parcela muito pequena da produção é beneficiada. A tendência é promover o crescimento da capacidade de armazenamento e estocagem desses produtos, buscando adequá-los aos processos de beneficiamento, garantindo a qualidade que o mercado exige. Isto pode ser realizado através da utilização de moluscos na elaboração de novos produtos, pela diversificação das formas de processamento, conferindo características sensoriais mais aceitáveis pelo consumidor. As novas tecnologias propostas permitem a elaboração de grande variedade de produtos, fazendo analogia àqueles elaborados com carne bovina/suína/aves, ou seja, produzidos na forma empanada, marinada, defumada dentre outras. Uma das grandes vantagens em processar esses produtos é poder apresentá-los de forma mais atrativa que a tradicional ao mercado institucional (cozinhas industriais, restaurantes, supermercados e etc.), além de permitir estoque por tempo mais prolongado, dando flexibilidade ao seu consumo (BEIRÃO; TEIXEIRA; MEINERT, 2000). Os mexilhões são fontes alimentares consideráveis de proteínas e minerais, como zinco, ferro e cobre, apresentando baixo teor lipídico e valor calórico (PEDROSA; COZZOLINO, 2001).

A escolha da utilização de mexilhões como matéria-prima se deve a algumas razões como propiciar novas formas de comercialização do mexilhão, além da *in natura* e congelada, que representam uma alternativa de processamento desse molusco para a produção de um pó com sabor e aroma característicos; existência de demanda das indústrias brasileiras por um tipo de extrato de mexilhão em pó, para adição a sucos de tomate e/ou outras bebidas ou sopas, uma vez que os EUA são os principais importadores desse tipo de extrato, produzido somente na China, além do aproveitamento do potencial de

comercialização dos mexilhões, já que o Brasil é o segundo maior produtor da América Latina.

Optou-se pelo estudo do processo de hidrólise enzimática da carne de mexilhão pois esse processo possui algumas vantagens em relação aos outros métodos de produção de aromas, a partir de animais marinhos. Dentre elas podem ser citadas o maior rendimento do processo e a alta qualidade do produto, com menor produção de *off-flavors*.

A hidrólise enzimática consiste na mistura de carne com água e enzimas proteolíticas. As enzimas são utilizadas na hidrólise de proteínas, sendo que os lipídeos e outros materiais indesejáveis são separados e removidos, resultando na formação de material protéico uniforme e com baixo teor de gordura, reduzindo a possibilidade de oxidação desse aroma.

O processo de hidrólise enzimática modifica o perfil e a concentração de aminoácidos da matéria-prima original, além de produzir peptídeos com diferentes massas moleculares. Esses aminoácidos e peptídeos poderão reagir com açúcares redutores ou outros aldeídos e grupos carbonílicos presentes na solução, produzindo novos compostos voláteis ao hidrolisado. Dessa forma, esse processo tem um efeito significativo no *flavor* do produto (LEE, 2007).

Os aromas de animais marinhos podem ser utilizados como ingredientes em sopas, molhos e patês (BJARNASON; BENEDIKTSSON, 2006). Além disso, através do controle das condições da hidrólise enzimática é possível produzir hidrolisados com diferentes solubilidades, características emulsificantes, propriedades de formação de espuma e devido à sua elevada digestibilidade e disponibilidade dos aminoácidos essenciais, os hidrolisados podem ainda ser adotados em dietas para pessoas com problemas digestivos ou má absorção de proteínas.

Contudo, os hidrolisados protéicos geralmente apresentam gosto amargo, resultante da liberação de aminoácidos hidrofóbicos, que se encontram no interior da proteína (ADLER-NISSEN, 1986). Muitas técnicas foram sugeridas para reduzir e mascarar o gosto amargo (LIN; CORDLE; THOMAS, 1997; MORAIS et al., 2003), e nesse sentido, o uso de agentes carreadores, como a maltodextrina e a goma arábica, no processo de secagem por

atomização pode disfarçar sabores indesejáveis, reduzir a volatilidade, higroscopicidade e reatividade do produto, além de possibilitar aumento de sua estabilidade, em condições ambientais adversas.

Os hidrolisados protéicos, por serem fonte rica de peptídeos e possuírem elevada atividade de água, são altamente susceptíveis à deterioração microbiana. Assim, há necessidade de preservá-los, visando aumentar sua vida de prateleira. Dentre os processos de conservação disponíveis, a secagem apresenta-se como o de maior interesse, devido à redução da atividade de água do produto, impedindo a multiplicação de microrganismos e a redução das reações físico-químicas responsáveis pela deterioração dos alimentos, além de facilitar a manipulação, transporte e armazenamento do produto final.

O processo mais utilizado para transformação de aromas no estado líquido para o estado sólido, na forma de pó, é a secagem por atomização ou *spray drying*. Consiste basicamente na atomização do líquido no compartimento que recebe o fluxo de ar quente, de modo que a rápida evaporação da água permite manter baixa a temperatura das partículas. Esta técnica permite a secagem de produtos sensíveis ao calor, sem afetar demasiadamente sua qualidade (RÉ, 1998).

Os estágios do processo de secagem por *spray drying* que influenciam as propriedades finais do pó são: a formação do *spray*, relacionada ao tipo de bico atomizador e condições de operação; a etapa de contato entre o ar de secagem e a gotas, que tem por objetivo a distribuição uniforme do ar de secagem dentro da câmara; a secagem e formação da partícula, influenciada pela geometria, tamanho da câmara de secagem e condições do ar de entrada; a coleta do produto final, controlada pelo posicionamento da tubulação do ar de exaustão, o tamanho e desenho dos ciclones e filtros (MASTERS, 2004).

Ao final do processo, é importante conhecer algumas propriedades do pó importantes para a comercialização e estocagem como a densidade, o volume aparente, a distribuição e o tamanho das partículas, o conteúdo de umidade e a higroscopicidade, de forma que seja possível avaliar a influência das variáveis de secagem sobre essas características e sobre a estabilidade do produto final.

Após a produção das microcápsulas, durante a sua estocagem e armazenamento, elas podem sofrer alterações físicas como cristalização, aglomeração, colapso e compactação, características de materiais amorfos. Essas alterações podem ser relacionadas à transição vítrea desses materiais, que consiste na transição de fase de segunda ordem do estado sólido-vítreo para o estado semi-líquido gomoso (ROOS, 1995). Dessa forma é interessante a determinação das condições críticas de estocagem dessas microcápsulas, que podem ser obtidas através da correlação dos dados de isothermas de adsorção e de temperatura de transição vítrea das microcápsulas, quando armazenadas em diferentes valores de umidade relativa ambiente.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo o estudo das etapas de hidrólise enzimática da carne de mexilhão, com vistas à produção de aroma de mexilhão e posterior secagem por *spray dryer*, para a produção de microcápsulas em pó contendo aroma de mexilhão, com alta qualidade e estabilidade física.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo das etapas de hidrólise enzimática da carne de mexilhão e posterior secagem por *spray dryer*, para produção de um aroma de mexilhão em pó.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- ✓ Avaliar a influência da temperatura, relação enzima: substrato e pH sobre o grau de hidrólise, a recuperação de proteína e os parâmetros cinéticos a e b, de um modelo empírico, na hidrólise enzimática da carne de mexilhão, por meio de um delineamento composto central rotacional 2^3 completo;
- ✓ Otimizar o processo de hidrólise enzimática da carne de mexilhão, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta, como forma de se obter os maiores valores de grau de hidrólise e de recuperação de proteína. Caracterizar o hidrolisado obtido, no ponto ótimo de processo, em relação à composição química, aminoacídica, perfil eletroforético e perfil de voláteis;
- ✓ Analisar a influência da temperatura do ar de secagem, da vazão do líquido de alimentação e da concentração dos agentes carreadores, maltodextrina 10 DE ou goma arábica, na secagem por *spray dryer*, sobre o rendimento do processo e sobre algumas características físico-químicas do produto em pó obtido como: umidade, atividade de água, higroscopicidade, densidade aparente e diâmetro médio de partículas, por meio de um delineamento composto central rotacional 2^3 , para cada agente carreador;
- ✓ Avaliar a microestrutura do hidrolisado puro e formulado com os agentes carreadores.
- ✓ Determinar as condições críticas de estocagem do hidrolisado puro em pó e das micropartículas produzidas com os agentes carreadores, por meio da determinação das isotermas de adsorção e da temperatura de transição vítrea, quando armazenadas em diferentes condições de umidade relativa.
- ✓ Avaliar a estabilidade do hidrolisado puro em pó e das micropartículas, em relação à perda de voláteis, durante a estocagem a 25°C, por 120 dias.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MATÉRIA-PRIMA

3.1.1 Dados de produção

A aquicultura envolve o cultivo de peixes, camarões, macroalgas, moluscos e rãs, tanto em água doce como em água salgada. A produção mundial da aquicultura está em contínuo crescimento; de 2003 a 2004 houve o aumento na produção de 4,4 milhões de toneladas, com o valor total de 54,9 milhões de toneladas, em 2004. Neste mesmo ano, na América do Sul, a produção da aquicultura foi de 1,1 milhão de toneladas, com cerca de 270 mil toneladas produzidas no Brasil (VAN ANROOY et al., 2006).

O governo brasileiro deseja incrementar a produção de pescado e uma das estratégias é incentivar a produção de peixes, crustáceos e moluscos. A maricultura, presente na costa litorânea com o cultivo de camarões, mexilhões e ostras, está provocando mudanças na economia de vários municípios e aumentando a renda de muitos pescadores. Atualmente o estado de Santa Catarina é responsável por mais de 95% da produção brasileira de ostras e mexilhões cultivados (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA/CENTRO DE DESENVOLVIMENTO EM AQUICULTURA E PESCA, 2009). A produção brasileira de moluscos está centrada nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina devido, principalmente, às características ambientais propícias ao desenvolvimento desses animais, que necessitam de águas de temperaturas amenas e ricas em nutrientes (BEIRÃO; TEIXEIRA; MEINERT, 2000).

Em 2007, a produção mundial de mexilhão foi de aproximadamente 1.631.000 toneladas. De acordo com a Tabela 3.1, o maior produtor foi a China (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2008).

Tabela 3.1. Produção mundial de mexilhões em 2007.

| País | Produção (toneladas) |
|---------------|----------------------|
| China | 448.667 |
| Tailândia | 259.000 |
| Espanha | 209.633 |
| Chile | 150.606 |
| Nova Zelândia | 99.500 |
| Koréia | 98.121 |
| França | 72.760 |
| Itália | 58.479 |

Fonte: FAO (2008).

Na Figura 3.1 encontra-se a produção de mexilhões dos principais países produtores da América do Sul. Em 2007, o Brasil destacou-se no segundo lugar com produção de 12.002 toneladas.

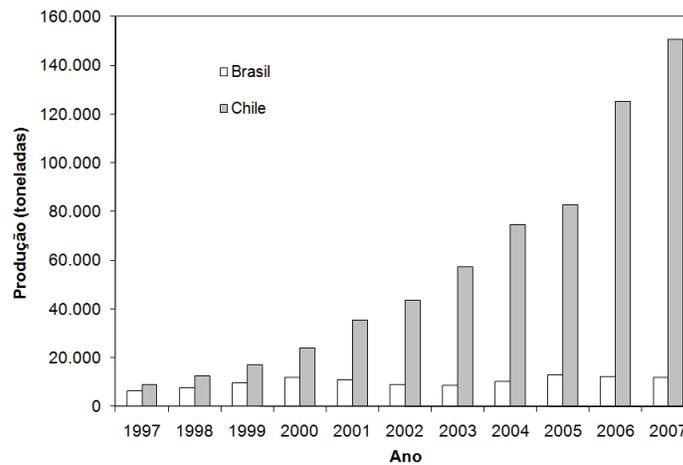


Figura 3.1. Produção de mexilhões do Brasil e do Chile nos últimos dez anos (FAO, 2008).

3.1.2 Composição química dos mexilhões

A classe *Bivalvia*, também chamada de *Pelecypoda* ou ainda *Lamellibranchia*, é formada por moluscos conhecidos por bivalves, tais como ostras e mexilhões, os quais são lateralmente comprimidos e possuem uma concha, com duas valvas dorsalmente articuladas (BEIRÃO; TEIXEIRA; MEINERT, 2000).

A carne dos mexilhões é importante fonte de proteína e de minerais, como zinco, ferro e cobre, contendo baixo teor de lipídeos e baixo valor calórico. A composição centesimal média da carne do mexilhão (*Anomalocardia brasiliiana*) *in natura* e cozida (tempo de cocção de 35 min com água e sal) encontra-se na Tabela 3.2 (PEDROSA; COZZOLINO, 2001). Já Tavares et al. (1998) apresentam a composição da carne do mexilhão (*Perna perna*) *in natura*. Em 2009, o mexilhão apresentou preço médio bruto quando vendido na concha de R\$ 1,25/kg, segundo o relatório apresentado pela Epagri/Cedap em 30 de junho de 2010, cujo preço do dólar era de R\$ 1,802 (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA, 2009).

Tabela 3.2. Composição média da carne do mexilhão citada por diversos autores.

| Componente | Unidade | 1 | 2 | 3 |
|---------------------|-----------|-------|-------|--------|
| Umidade | % | 81,58 | 83,59 | 72,12 |
| Proteína | g/100g | 12,67 | 11,24 | 20,50 |
| Lipídeos | g/100g | 1,10 | 0,92 | 3,24 |
| Cinzas | g/100g | 2,12 | 1,76 | 2,42 |
| Carboidratos Totais | g/100g | 2,53 | 2,19 | 1,70 |
| Energia | kcal/100g | 70,70 | 62,00 | 118,00 |
| Minerais | | | | |
| Cobre | mg/100g | 7,57 | 3,70 | - |
| Ferro | mg/100g | 40,10 | 37,80 | - |
| Zinco | mg/100g | 5,60 | 2,99 | - |

Fonte: 1 e 2 - *in natura* e cozida (PEDROSA; COZZOLINO, 2001), 3 - *in natura* (TAVARES et al., 1998).

3.2 HIDRÓLISE PROTÉICA

O processo de hidrólise protéica consiste na clivagem química ou enzimática de moléculas de proteínas em pequenos peptídeos de tamanhos diversos e, eventualmente, em aminoácidos (ADLER-NISSEN, 1986).

A hidrólise química das proteínas é realizada pela quebra das ligações peptídicas com ácido ou base. Contudo, existem algumas limitações para utilização desse processo, pela dificuldade de controle do processo de hidrólise, que origina produtos com variação na

composição química e nas propriedades funcionais. Além disso, é realizado a altas temperaturas e valores de pH extremos, formando produtos com baixa qualidade nutricional, pouca funcionalidade e de uso restrito como realçadores de sabor (KRISTINSSON; RASCO, 2000a).

O processo de hidrólise enzimática é mais vantajoso que o químico, porque permite o controle do grau de hidrólise e, conseqüentemente, das propriedades dos produtos resultantes (KRISTINSSON; RASCO, 2000a). A hidrólise das ligações peptídicas causa várias mudanças nas proteínas como: aumento do conteúdo de NH_3^+ e COO^- , redução do peso molecular da proteína/polipeptídeo, além da destruição da estrutura globular da proteína e conseqüente exposição dos grupos hidrofóbicos. Essas mudanças afetam drasticamente algumas propriedades funcionais das mesmas como solubilidade, propriedades emulsificantes e de formação de espuma, viscosidade e formação de gel (NIELSEN, 1997).

Na hidrólise enzimática, devido à exposição de aminoácidos hidrofóbicos como valina, isoleucina, fenilalanina, triptofano, leucina e tirosina, pode haver o aparecimento de sabor amargo; contudo, pode-se limitar a sua formação através do controle do grau de hidrólise, pelo uso de reação de plasteína ou de enzimas específicas como exopeptidases (PEDERSEN, 1994; ADLER-NISSEN, 1986).

A aplicação da tecnologia de hidrólise enzimática em carne de animais marinhos, para recuperação de proteína no processamento desses produtos, possibilita a produção de um amplo espectro de ingredientes alimentícios que incluem suplementos protéicos, estabilizantes de bebidas (ALASALVAR; SHAHIDI; QUANTICK, 2002), agentes antimicrobianos (LIU et al., 2007), emulsificantes em alimentos (WASSWA et al., 2007), nutrientes que previnem doenças do coração (WERGEDAHL et al., 2004), além da produção de *flavors* (IMM; LEE, 1999; NILSANG et al., 2005).

Aromas são considerados produtos de alto valor agregado e, especificamente, aromas de animais marinhos de alta qualidade possuem alta demanda. Estes podem ser utilizados como aromatizantes em produtos secos como sopas (contendo realçadores de sabor naturais ou sintéticos), vegetais secos, pimentas moídas e ervas; e, como

encapsulados, servem como base para misturas de aromas; em molhos que estão disponíveis na forma líquida ou seca; como aromatizantes em produtos à base de peixe como surimi, semi-secos, secos, fermentados, congelados e enlatados; em salgadinhos como *chips*, biscoitos, produtos extrusados, *pretzels* e também em bebidas como suco de tomate (REINECCIUS, 2006). Outros métodos para a produção de *flavors*, a partir de animais marinhos, são a extração aquosa e a fermentação. Contudo o método de hidrólise enzimática possui algumas vantagens em relação a esses, tais como maior rendimento do processo e a alta qualidade do produto, com menor produção de *off-flavors*, além do maior controle das características do aroma, através da variação das condições de reações enzimáticas.

Animais marinhos possuem um complexo sistema de *flavors* com importantes componentes ativos que conferem sabor e aroma característicos. Os componentes ativos de sabor são geralmente os compostos não voláteis, como os aminoácidos livres, os nucleotídeos, os açúcares e os sais minerais. Alguns autores produziram aromas naturais de mexilhão através da hidrólise enzimática da carne de mexilhão, usando a enzima Optimase[®] (CHA; KIM; JANG, 1998a; CHA; KIM; KIM, 1998b); os compostos ativos de sabor mais importantes foram o ácido glutâmico e o ácido aspártico, relatados por possuírem sabor azedo. As características do aroma desses animais podem ser divididas em componentes que contribuem para o aroma de animais marinhos frescos e/ou cozidos. O aroma do produto fresco é importante para a preservação da qualidade do produto *in natura*. Já após o cozimento, os aromas desses animais mudam drasticamente. As mudanças induzidas termicamente resultam em aromas de carne cozida, sendo que as principais reações no desenvolvimento desse tipo de aroma são a reação de Maillard e uma etapa da reação de Maillard denominada de reação de degradação de Strecker. Outras reações como a oxidação lipídica, são responsáveis por alguns importantes compostos de aroma desejáveis e indesejáveis (SHAHIDI; CADWALLADER, 1997).

Os defeitos dos aromas ou *off-flavors* são atributos sensoriais que não estão associados com o típico sabor e aroma dos alimentos e bebidas. A formação de *off-flavors* em alimentos podem ser resultado de reações de oxidação, escurecimento não enzimático,

reações químicas entre os constituintes do alimento, reações induzidas pela luz ou rotas enzimáticas (MCGORRIN, 2002).

A hidrólise enzimática de proteínas é o processo mais utilizado para a produção comercial da maioria dos aromas naturais de animais marinhos. A matéria-prima *in natura* é homogeneizada e pasteurizada, então a enzima é adicionada e a reação de hidrólise é conduzida até determinado grau de hidrólise, após essa etapa a enzima é inativada e a solução é filtrada e concentrada ou desidratada (LEE, 2007). A produção de aromas usando esse processo já foi reportada para os seguintes animais marinhos: lula (LIAN; LEE; PARK, 2001), caranguejo (KIM et al., 2006), camarão (SIMPSON et al., 1998), lagosta (VIEIRA et al., 2006) e lagostim (BAEK; CADWALLADER, 1995), e também de algumas espécies de peixe como atum (NILSANG et al., 2005), bonito (MAEHASHI et al. 1999), salmão (LIASET; JULSHAMN; ESPE, 2003) e pescada vermelha (IMM; LEE, 1999), além de moluscos como o mexilhão (CHA; KIM; JANG, 1998a, CHA; KIM; KIM, 1998b).

Entretanto, o uso de hidrolisados protéicos encontra algumas limitações como a possibilidade da presença de gosto amargo. Alguns estudos recentes mostram que o gosto amargo e os *off-flavors* podem não ser apenas devido aos peptídeos do hidrolisado protéico, mas também podem ser provenientes de produtos da oxidação lipídica (KRISTINSSON, 2008). Para reduzir o aparecimento do gosto amargo, o controle do grau de hidrólise pode, em parte, resolver o problema, contudo, a escolha da enzima, em alguns casos, pode ser mais importante. É recomendado o uso de uma preparação enzimática com um balanço de atividade de endo e exopeptidases. Há preparações comerciais disponíveis reportadas por produzirem hidrolisados com menor gosto amargo, como por exemplo, a Flavorzyme[®] (Novo Nordisk, EUA) que é uma exopeptidase e a Protamex[™] (Novo Nordisk, EUA), que, ao contrário da maioria das endoproteases, produzem hidrolisados sem gosto amargo (LEE, 2007). Existem ainda algumas etapas após o processo de hidrólise que podem ser realizadas para reduzir o aparecimento do gosto amargo e dos *off-flavors*. Incluem o tratamento com carbono ativado, a extração com álcool, a precipitação isoelétrica, a cromatografia em sílica gel, a cromatografia por interação hidrofóbica, a hidrólise enzimática dos peptídeos amargos e o mascaramento do gosto amargo, que pode ser realizado através da formação de microcápsulas (SAHA; HAYASHI, 2001).

3.2.1 Cinética da hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de proteínas é um processo complexo devido alguns fatores como: a alta diversidade dos componentes de reação, isto é, fragmentos de peptídeos são produtos, bem como reagentes da próxima reação; a multiplicidade dos tipos de reação onde um grande número de ligações peptídicas é clivado paralela e simultaneamente; a complexidade das reações pela existência de inibição do substrato, diversidade de produtos e desnaturação da enzima durante a hidrólise; múltiplas influências externas que incluem pH, temperatura, força iônica e pressão, sobre a taxa de reação; e a existência de diferentes ligações peptídicas e das diferentes acessibilidades a elas pelo ataque enzimático, que depende fortemente da concentração de proteínas utilizadas como substrato (WEI; ZHIMIN, 2006; MORENO; CUADRADO, 1993).

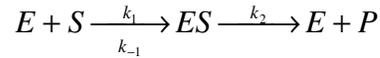
A hidrólise enzimática utilizando endoproteases conduz à produção de peptídeos de tamanhos variados, que por sua vez constituem o substrato para a hidrólise restante. Por esta razão, é difícil acompanhar a cinética de cada uma das diferentes substâncias formadas. Contudo, do ponto de vista prático, é interessante analisar a taxa global de hidrólise em termos do grau de hidrólise alcançado e das condições operacionais, concentração inicial de enzima e de substrato, pH e temperatura. O processo de hidrólise em escala industrial ocorre em batelada, utilizando grandes reatores que contêm a mistura de enzima e substrato. Por isso, para projetá-los, é importante predizer as taxas de cinética das reações enzimáticas (POSTOLACHE; ONCESCU, 1989; LAHL; BRAUN, 1994; MÁRQUEZ; VÁZQUEZ, 1999).

Uma equação empírica da variação do grau de hidrólise com o tempo, já utilizada para ajuste das curvas de hidrólise de hemoglobina (MÁRQUEZ; VÁSQUEZ, 1999), de proteína de ervilha (MORENO; CUADRADO, 1993), de soro de leite (GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994), de albumina de soro bovino (WEI; ZHIMIN, 2006) e de peito de frango (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009c), está apresentada na Equação 3.1.

$$d \frac{(GH)}{dt} = a \exp(-b \cdot GH) \quad (3.1)$$

Onde: GH é o grau de hidrólise (%); t é o tempo (min); a (min^{-1}) e b (adimensional) são parâmetros da cinética de hidrólise, sendo que os parâmetros a e b apresentam diferentes valores para os diversos experimentos.

O mecanismo de reação da hidrólise enzimática pode ser simplificado como:

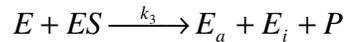


Onde a taxa de reação de hidrólise será determinada pelo estágio irreversível:

$$r = S_0 \frac{d(GH)}{dt} = k_2 |ES| \quad (3.2)$$

Onde: E é a enzima livre; S é o substrato livre; ES é o complexo enzima-substrato; P é o produto; r é a taxa de reação (g/L.min), S_0 é a concentração inicial de substrato (g/L); $|ES|$ é a concentração do complexo enzima-substrato (AU/L) e k_2 é a constante da hidrólise (g/AU.min).

O mecanismo de inativação enzimática durante a reação pode ser simplificado como:



Desse modo, a taxa da reação de inativação enzimática é dada por:

$$-\frac{de}{dt} = k_3 |E||ES| \quad (3.3)$$

Onde: E_a é a enzima na forma ativa; E_i é a enzima inativa; e é a concentração total de enzima (AU/L); k_3 é a constante da taxa de reação de inativação (L/AU.min) e $|E|$ é concentração de enzima livre (AU/L).

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

$$-S_0 \frac{d(GH)}{de} = \frac{k_2}{k_3 |E|} \quad (3.4)$$

Desse ponto em diante, deve-se considerar se há ou não inibição da reação pelo substrato, pelo produto ou por ambos. Na Tabela 3.3 estão apresentadas as representações

dos parâmetros cinéticos a e b para a equação exponencial 3.1. Embora a equação cinética proposta seja a mesma para diferentes substratos, o mecanismo de reação pode ser diferente, sem inibição, com inibição pelo substrato, com inibição pelo produto ou com inibição pelo produto e pelo substrato.

Tabela 3.3. Expressão dos parâmetros cinéticos “a” e “b” para a equação exponencial de determinação do grau de hidrólise.

| Mecanismo | Parâmetros cinéticos | |
|--|---|---|
| Não há inibição | $a = k_2 \frac{e_0}{S_0}$ | $b = \frac{k_3 \cdot k_m}{k_2}$ |
| Inibição pelo substrato | $a = \frac{k_2 \cdot K_s \cdot e_0}{S_0 \cdot K_s + S_0^2}$ | $b = \frac{k_3 \cdot k_m \cdot K_s}{k_2 (K_s + S_0)}$ |
| Inibição pelo produto | $a = \frac{k_2 \cdot e_0 \cdot K_p}{S_0 \cdot K_p + p \cdot k_m}$ | $b = \frac{k_3 \cdot k_m \cdot K_p \cdot S_0}{k_2 (S_0 \cdot K_p + p \cdot k_m)}$ |
| Inibição pelo substrato e pelo produto | $a = \frac{k_2 \cdot e_0 \cdot K_s \cdot K_p}{K_s \cdot K_p \cdot S_0 + K_p \cdot S_0^2 + k_m \cdot K_s \cdot p}$ | $b = \frac{k_3 \cdot k_m \cdot K_s \cdot K_p \cdot S_0}{k_2 (K_s \cdot K_p \cdot S_0 + K_p \cdot S_0^2 + k_m \cdot K_s \cdot p)}$ |

Fonte: WEI e ZHIMIN (2006). Onde: “a” e “b” = parâmetros cinéticos da Equação (3.1); k_2 = constante da taxa reação de hidrólise; k_3 = constante da taxa de reação de inativação enzimática; K_s = constante da reação de inibição pelo substrato (g/L); K_p = constante da reação de inibição pelo produto (g/L); k_m = constante de Michaelis-Menten (g/L); p = concentração do produto (g/L) e S_0 = concentração inicial de substrato (g/L).

Para o caso cujo mecanismo de reação não apresenta inibição durante a reação, considera-se que toda enzima presente está livre ou complexada. Então, a concentração total de enzima em determinado momento é representada pela forma:

$$e = |E| + |ES| \quad (3.5)$$

Em estado estacionário, o balanço de massa para o complexo ES resulta em:

$$|ES| = \frac{|E||S|}{k_m} \quad (3.6)$$

Onde k_m é a constante de Michaelis-Menten dada pela seguinte equação:

$$k_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3.7)$$

Substituindo a equação 3.6 na 3.7 e simplificando $|S| = S_0$, resulta na expressão para a concentração da enzima livre:

$$|E| = \frac{k_m \cdot e}{k_m + S_0} \quad (3.8)$$

Se $k_m \ll S_0$, a equação 3.8 pode ser reduzida para:

$$|E| = \frac{k_m \cdot e}{S_0} \quad (3.9)$$

A inserção da equação 3.9 na equação 3.4 resulta em:

$$-\frac{d(GH)}{de} = \frac{k_2}{k_3 \cdot k_m} \cdot \frac{1}{e} \quad (3.10)$$

Integrando a equação 3.10 entre a condição inicial e final da reação:

$$e = e_0 \exp\left[-\frac{k_3 \cdot k_m}{k_2} \cdot GH\right] \quad (3.11)$$

A combinação da equação 3.11 com as equações 3.2, 3.6 e 3.9 resulta em:

$$r = k_2 e_0 \exp\left[-\frac{k_3 \cdot k_m}{k_2} GH\right] \quad (3.12)$$

$$\frac{d(GH)}{dt} = \frac{k_2 e_0}{S_0} \exp\left[-\frac{k_3 \cdot k_m}{k_2} GH\right] \quad (3.13)$$

Rearranjando as equações, obtém-se a relação entre os parâmetros a e b com as constantes de reação de hidrólise e inativação da enzima:

$$a = k_2 \frac{e_0}{S_0} \quad (3.14)$$

$$b = \frac{k_3 \cdot k_m}{k_2} \quad (3.15)$$

Substituindo os parâmetros a e b e considerando que na condição inicial ($t = 0$) GH é igual à zero, integra-se a equação 3.13 e obtém-se a equação de grau de hidrólise em função do tempo:

$$GH = \frac{1}{b} \ln(1 + abt) \quad (3.16)$$

3.2.2 Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Algumas apresentam especificidade para ligações peptídicas nas quais participam determinados aminoácidos, enquanto outras agem mais amplamente. De acordo com o mecanismo de ação, as enzimas classificam-se em endo ou exopeptidases. As exopeptidases são enzimas que hidrolisam a proteína nas extremidades N-terminais e as endopeptidases hidrolisam a proteína no interior da molécula, geralmente em resíduos específicos. A natureza do sítio catalítico da enzima permite outra classificação: a) serina-proteases como a quimotripsina e tripsina; b) cisteína-proteases onde o grupamento é a sulfidril, como as enzimas de origem vegetal papaína, bromelina e ficina, de origem microbiana e animal; c) metaloproteases que contêm um metal, geralmente o zinco; d) proteases aspárticas, cujo sítio ativo apresenta o grupo carboxila do ácido aspártico, estando entre as principais enzimas deste grupo a renina e a pepsina (LOFFLER, 1986; ADLER-NISSEN, 1986; LAHL; BRAUN, 1994).

3.3 MICROENCAPSULAÇÃO ATRAVÉS DA SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO

A microencapsulação é o processo de empacotamento de pequenas partículas sólidas, gotas de líquidos ou compostos gasosos em cápsulas (filmes finos ou coberturas poliméricas) extremamente pequenas, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas. O material a ser encapsulado é designado por núcleo, recheio, material ativo ou fase interna, enquanto o material que forma o revestimento é chamado de material de parede, carreador, membrana ou casca. Várias técnicas têm sido empregadas na elaboração de microcápsulas, tais como: *spray drying*, *spray cooling*, coacervação, extrusão, recobrimento em leito fluidizado, lipossomas e

complexação por inclusão. Algumas vantagens da utilização dessa técnica consistem na possibilidade da mistura de ingredientes, suprimindo ou atenuando *flavors* indesejáveis, na redução da volatilidade e da reatividade do núcleo e no aumento da estabilidade do recheio em condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH extremos (GHARSALLAOUI et al., 2007; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

O processo de secagem por atomização ou *spray drying* é a operação unitária através da qual o produto líquido é atomizado na corrente de gás quente, e pela rápida vaporização da água é obtido um pó quase que instantaneamente. O gás geralmente utilizado é o ar ou mais raramente um gás inerte como o nitrogênio. O fluido de alimentação do secador *spray dryer* pode ser uma solução, emulsão ou suspensão e dependendo do tipo de alimentação utilizada e das condições de processo, pode produzir um pó muito fino (10 a 50 μm) ou partículas de tamanho maior (2 a 3 mm) (GHARSALLAOUI et al., 2007). A representação esquemática do secador por atomização (*spray dryer*) encontra-se na Figura 3.2.

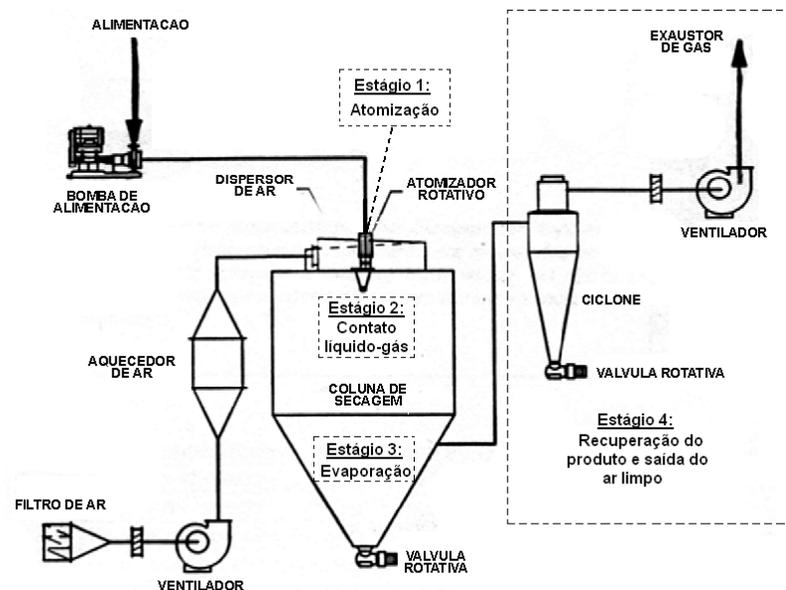


Figura 3.2. Representação esquemática do spray dryer (adaptado de DZIEZAK, 1988).

A atomização do fluido de alimentação em pequenas gotas pode ser feita utilizando pressão ou energia centrífuga. Os tipos de atomizadores incluem atomizadores pneumáticos, bico pressurizado, disco rotativo, do tipo duplo fluido e bico sônico. O objetivo dessa etapa é através da redução do tamanho da gota facilitar a transferência de calor entre a superfície das gotas e o ar de secagem, de modo a otimizar as taxas de transferência de massa. A escolha do tipo de configuração do atomizador dependerá da natureza e viscosidade da alimentação e das características finais do produto em pó. Em geral, quanto maior a energia empregada na atomização, menor o tamanho das gotas formadas. Além disso, para a mesma quantidade de energia, o tamanho das partículas é aumentado, com o aumento da vazão de alimentação. Contudo, o tamanho das partículas aumenta quando a viscosidade e a tensão superficial inicial do líquido são altas.

O contato do líquido com o gás pode ocorrer de duas formas, em co-corrente ou em contra-corrente. No primeiro processo, o líquido é atomizado no mesmo sentido do ar de secagem. A temperatura de entrada do ar é tipicamente de 150 a 220°C e a evaporação ocorre instantaneamente, sendo que dessa forma, os pós serão expostos a temperaturas moderadas (normalmente de 50 a 80°C), o que limitará a degradação térmica. No sentido contra-corrente há economia no consumo de energia, contudo o pó é submetido a altas temperaturas, o que limita essa aplicação para produtos termosensíveis (GHARSALLAOULI et al., 2007).

No momento em que há o contato entre as gotas e o ar de secagem são estabelecidos balanços de temperatura e pressão parcial de vapor entre a fase líquida e a gasosa. Dessa forma, a transferência de calor ocorre do ar de secagem para as gotas, como resultado da diferença de temperatura e a transferência de umidade ocorre na direção oposta, devido à diferença de pressão de vapor. Com base na teoria fundamental da secagem, três etapas podem ser distinguidas. Logo após o contato do ar quente com as gotas de líquido, a transferência de calor causa principalmente o aumento da temperatura das gotas, até um valor constante. Esta temperatura é definida como a temperatura de bulbo úmido do ar de secagem. Depois disso, a evaporação da água das gotas é realizada à temperatura e pressão parcial de vapor constantes. A taxa de difusão da água do centro para a superfície das gotas é normalmente considerada constante e igual à taxa de evaporação da superfície.

Finalmente, quando o conteúdo de água da gota atinge um valor crítico, uma crosta seca é formada na superfície da gota e a taxa de secagem diminui rapidamente, com a progressão da frente de secagem, e se torna dependente da taxa de difusão da água através da crosta. A secagem termina, teoricamente, quando a temperatura das partículas torna-se igual à temperatura do ar. Por último é feita a recuperação do pó, de forma que as partículas mais densas são recolhidas na base da câmara de secagem enquanto as mais finas são separadas do ar úmido, no ciclone (GHARSALLAOUI et al., 2007).

As características do material obtido ao final da secagem por atomização estão relacionadas às propriedades da solução utilizada na alimentação do secador (concentração de sólidos, viscosidade), bem como aos parâmetros operacionais adotados durante a secagem (vazão de alimentação, temperatura do ar de secagem) e ao tipo de bico atomizador. Produtos normalmente secos por *spray dryer* são: leite integral, leite desnatado, soro de leite, adoçantes, extrato de chá e de café, ovos, enzimas, microorganismos entre outros.

As propriedades dos alimentos em pó podem ser classificadas como físicas ou químicas. As principais propriedades físicas incluem: forma da partícula, densidade e porosidade, características da superfície, dureza, diâmetro e tamanho da partícula. Por outro lado, as propriedades químicas estão relacionadas à composição dos alimentos e às interações dos seus constituintes com os solventes ou outros componentes do alimento e são exemplificadas pelas propriedades de instantaneização e *stickiness*. As propriedades físicas normalmente são interdependentes, sendo assim, a modificação na distribuição do tamanho da partícula ou conteúdo de umidade pode resultar na mudança simultânea de densidade volumétrica e escoamento do alimento em pó. A medida da densidade volumétrica é fundamental nas operações de estocagem, processamento, embalagem e distribuição dos produtos em pó, pois quanto maior a densidade, menor o volume de embalagem e o espaço necessário para o armazenamento dos mesmos, além disso, implicam em menor quantidade de ar entre as partículas de pó, evitando a oxidação do produto ao longo da estocagem. O conteúdo de umidade é um aspecto crítico no transporte e estocagem porque essa propriedade é associada ao aumento da coesividade,

principalmente devido às pontes líquidas interpartículas que causam aglomeração do pó (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005).

3.3.1 Agentes carreadores

Os hidrolisados protéicos de peixe produzem pós amorfos que aglomeram rapidamente em condições de elevada temperatura e umidade relativa (AGUILERA; LEVI; KAREL, 1993). Isso se deve à sua composição de peptídeos de baixo peso molecular, que possuem baixas temperaturas de transição vítrea; para minimizar esse problema normalmente utilizam-se agentes carreadores, com elevada massa molecular, a fim de aumentar a temperatura de transição vítrea, melhorar o processo de secagem, diminuindo a aderência do produto na câmara de secagem e facilitar as operações de transporte e armazenamento do produto.

Na microencapsulação de *flavors*, através da secagem por atomização, o tipo de material de parede influenciará as propriedades da emulsão antes da secagem, a retenção de voláteis durante o processo e a vida de prateleira da microcápsula após a secagem. Alguns agentes carreadores bastante utilizados no processo de microencapsulação por *spray drying* são os carboidratos derivados do amido (como as maltodextrinas e os amidos modificados), as gomas (principalmente a goma arábica) e as ciclodextrinas, as proteínas (caseínatos, gelatina, isolados protéicos de soro de leite e de soja) e, mais recentemente, os novos biopolímeros, como os produtos da reação de Maillard, o polissacarídeo solúvel de soja, a quitosana, os alginatos, a celulose modificada e a gelatina (GHARSALLAOULI et al., 2007; JAFARI et al., 2008).

Para a escolha do material de parede para microencapsulação de *flavors* devem ser levados em consideração os seguintes aspectos: apresentar boas propriedades emulsificantes, baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos, ter uma baixa higroscopicidade, liberar o *flavor* nas condições desejadas, baixo custo, sabor neutro, além de oferecer proteção do recheio de condições ambientais adversas, como calor, luz e umidade (JAFARI et al., 2008).

As maltodextrinas são produtos parcialmente hidrolisados do amido, formadas de cadeias de D-glicose conectadas por ligações α -(1,4) (SHAHIDI; HAN, 1993). São produzidas por hidrólise ácida, enzimática ou ainda pela combinação de ambos os processos sobre o amido (CHRONAKIS, 1998). Os hidrolisados são descritos em relação a sua dextrose equivalente (DE), que é a medida do total do número de unidades de α -D-glicose anidro e está ligada a seu grau de polimerização (DP), de forma que $DE=100/DP$ (KENNEDY; KNILL; TAYLOR, 1995). Para serem chamadas de maltodextrinas, elas devem ter dextrose equivalente (DE) menor que 20. Se o DE é maior que 20, são chamadas de xarope de amido (SHAHIDI; HAN, 1993). Maltodextrinas de diferentes valores de DE têm diferentes propriedades físico-químicas, incluindo solubilidade, temperatura de congelamento e viscosidade (KLINKESORN et al., 2004).

De maneira geral, as maltodextrinas são produtos com baixa higroscopicidade, não apresentam doçura e são amplamente usadas para melhorar a consistência dos produtos alimentícios. Já os xaropes de milho apresentam leve doçura e maior capacidade de absorver umidade (BE MILLER; WHISTLER, 1996). Na Tabela 3.4 estão apresentadas algumas características dos hidrolisados de amidos.

Tabela 3.4. Características dos amidos e seus hidrolisados, de acordo com a sua dextrose equivalente (adaptado de MURRAY e LUFT, 1973).

| Propriedade | Dextrose Equivalente | | | | | | |
|------------------------------|----------------------|----|----|----|----|----|----|
| | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 36 | 42 |
| Escurecimento não enzimático | → | | | | | | |
| Higroscopicidade | → | | | | | | |
| Poder Edulcorante | → | | | | | | |
| Viscosidade | ← | | | | | | |
| Solubilidade | → | | | | | | |
| Retenção de voláteis | ← | | | | | | |

Obs: As setas indicam o aumento da propriedade.

As maltodextrinas são consideradas bons agentes encapsulantes porque exibem baixa viscosidade, mesmo em alta concentração de sólidos e alta solubilidade. Além disso, fornecem boa estabilidade ao *flavor* encapsulado, em relação à oxidação, contudo exibem baixa capacidade emulsificante e baixa retenção de *flavor* (GHARSALLAOULI et al., 2007; RÉ, 1998).

A goma arábica (ou goma acácia) é o exsudado da árvore do gênero *Acácia*, com várias espécies distribuídas nas regiões de clima tropical e subtropical. É o polímero que consiste primariamente de ácido D-glucurônico, L-ramnose, D-galactose, L-arabinose e 5% de proteína (Figura 3.3). Essa mistura de polissacarídeos e proteína lhe confere algumas características emulsificantes vantajosas para a secagem por *spray dryer*. Além disso, proporciona boa retenção de voláteis e confere proteção efetiva contra oxidação, contudo apresenta um custo elevado (SHAHIDI; HAN, 1993).

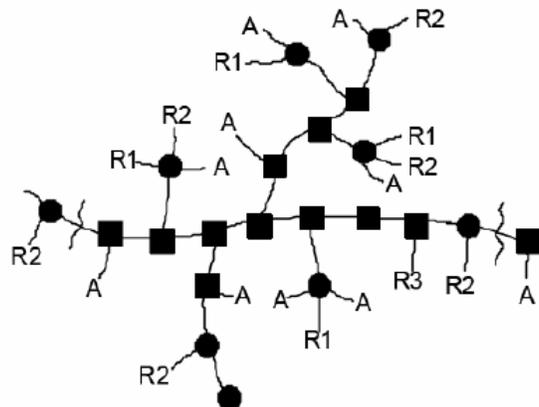


Figura 3.3. Estrutura molecular da goma arábica. A = arabinosil; Radicais baseados em R₁ = ramnose, R₂ = ácido glucurônico, R₃ = arabinose (adaptado de ISLAM et al., 1997).

3.4 ESTRUTURA DAS MICROCÁPSULAS

De acordo com o tamanho, as cápsulas podem ser classificadas em nano (< 1 µm), micro (1 a 5000 µm) ou macropartículas (> 5000 µm) (KING, 1995). Dependendo do processo de encapsulação empregado e, com relação ao formato, podem ser esféricas,

elípticas, monolíticas ou agregadas, com paredes simples ou múltiplas (KIRBY et al., 1991). Já em relação à estrutura física, as micropartículas podem ser classificadas como microcápsulas ou microesferas, como mostrado na Figura 3.4.

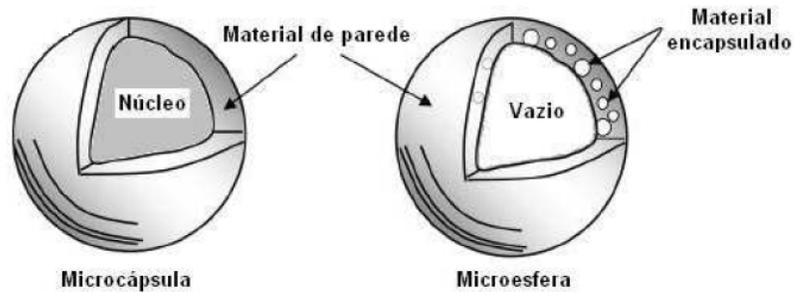


Figura 3.4. Estrutura das micropartículas (adaptado de JAFARI et al., 2008).

As microcápsulas consistem em micropartículas, onde o núcleo está envolvido por uma camada ou filme polimérico formando o sistema do tipo reservatório, e são tipicamente produzidas por coacervação complexa, secagem em leito fluidizado, co-extrusão e inclusão molecular. Já as microesferas, produzidas principalmente por *spray drying*, constituem o sistema matricial, no qual o polímero forma a rede tridimensional onde o material a ser microencapsulado pode estar adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à matriz polimérica, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos. Nestes sistemas, a área central consiste no vazio resultante da expansão das partículas durante os estágios finais da secagem (JAFARI et al., 2008). Tipicamente as cápsulas produzidas por spray dryer apresentam diâmetro entre 10 e 300 μm . As cápsulas tendem a apresentar estrutura irregular, contendo gotas do material de recheio ao longo da cápsula, ou seja, tendem a apresentar estrutura multinuclear (THIES, 1995).

3.5 ESTABILIDADE FÍSICA DAS MICROCÁPSULAS

Os materiais sólidos podem ser subdivididos em duas categorias: cristalinos e amorfos. A forma cristalina apresenta em sua estrutura um arranjo ordenado de moléculas alinhadas, enquanto no estado amorfo as moléculas apresentam um arranjo mais

desordenado e desalinhado. As moléculas no estado amorfo são emaranhadas, mais abertas e porosas e, portanto, estão mais susceptíveis a interações externas, como por exemplo, maior absorção de água (BHANDARI; HOWES, 2000).

A estrutura amorfa representa o estado de equilíbrio termodinamicamente metaestável. A formação dos materiais amorfos ocorre através de uma mudança no material, que deve ocorrer à velocidade suficientemente alta, de maneira que não haja tempo para que o produto se ajuste às mudanças que ocorreram na vizinhança e portanto, migre do estado de não-equilíbrio para o estado de equilíbrio (ROOS, 1995). Uma solução ou alimento sólido com alto teor de umidade, contendo sólidos ou líquido puro, são resfriados rapidamente, sendo ambos convertidos em sólidos amorfos. A secagem de alimentos também é um exemplo onde a umidade é removida rapidamente (como no caso do *spray drying*), resultando em materiais amorfos.

A mais importante mudança característica do estado amorfo, que envolve a transição do estado vítreo para o estado borrachento ou gomoso, é a chamada transição vítrea. A transição vítrea promove o aumento da mobilidade molecular e do volume livre, podendo resultar em mudanças físicas e físico-químicas significativas. A temperatura, à determinada umidade, na qual essa transição acontece é denominada temperatura de transição vítrea (T_g).

O conhecimento da temperatura de transição vítrea é fundamental para as indústrias alimentícias, principalmente aquelas que utilizam processos de conservação por desidratação (secagem e liofilização) ou pelo uso de baixas temperaturas (congelamento). De acordo com Slade e Levine (1991), os produtos alimentícios em pó que contêm carboidratos amorfos podem passar por mudanças físicas como cristalização, pegajosidade, colapso e compactação durante o processamento, manipulação e estocagem. Essas mudanças físicas em produtos desidratados estão diretamente relacionadas à sua temperatura de transição vítrea. Abaixo da T_g , espera-se que o alimento seja estável, enquanto que acima dessa temperatura, a diferença entre a temperatura de estocagem e a temperatura de transição vítrea é responsável por controlar a taxa das mudanças físicas, químicas e biológicas do produto (RAHMAN, 2006; SLADE; LEVINE, 1991).

De acordo com Roos (1995), a plasticização pela água é típica de carboidratos de baixo peso molecular, oligossacarídeos, polissacarídeos e proteínas. Leva ao aumento do espaço intermolecular ou volume livre, diminuindo a viscosidade local e, concomitantemente, aumentando a mobilidade molecular. A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é usada, portanto, para medir a quantidade de energia necessária para elevar a temperatura da amostra, representando a mudança de entalpia com relação à temperatura (calor específico). Na temperatura de transição vítrea, uma apreciável mudança no calor específico é observada quando o material passa do estado vítreo para um estado gomoso de maior mobilidade.

As características estruturais mais importantes induzidas pela secagem são: encolhimento, porosidade, colapso, endurecimento da superfície e fissuras (internas e externas), sendo que a forma da partícula influencia fatores como o escoamento dos pós, embalagem, interação com fluidos dentre outras características.

A eficiência do processo de microencapsulação de *flavors* depende fortemente da formação da estrutura amorfa metaestável com baixa permeabilidade destes compostos microencapsulados. A microscopia eletrônica de varredura é particularmente adequada para determinação da habilidade de encapsulação de vários polímeros. Se a superfície externa das partículas é muito porosa ou com fissuras pode ocorrer a perda de voláteis ou a oxidação do recheio. O colapso da parede da matriz pode expor o material encapsulado ao ambiente e promover reações de deterioração como a oxidação lipídica. Já a presença de rugosidades na superfície externa tem efeito adverso nas propriedades de escoamento do pó (AGUILERA; STANLEY, 1999).

3.6 ISOTERMAS DE SORÇÃO

A estabilidade química, microbiológica e a vida de prateleira dos alimentos não estão diretamente relacionadas à umidade, mas sim à propriedade chamada atividade de água, que é a medida do grau em que a água está ligada ao alimento e está indisponível para a atividade química e microbiológica (RAHMAN; LABUZA, 2007).

A atividade de água (a_w) é uma função termodinâmica, definida como a razão entre a fugacidade da água na mistura (f) e a fugacidade da água pura no estado padrão (f_o), ambos à mesma temperatura. Essa grandeza pode ser interpretada como a tendência da água migrar para o estado gasoso. A comparação entre a atividade de água e a umidade relativa de equilíbrio (definida como a relação entre a pressão parcial da água no sistema e pressão de vapor da água pura) apresenta uma diferença de 0,2% com a temperatura ambiente, à mesma pressão (GAL, 1975). No equilíbrio, a atividade de água está relacionada com a umidade relativa (UR) do ambiente, através da Equação 3.17, que relaciona a pressão de vapor de água em equilíbrio no alimento (P) com a pressão de vapor da água pura (P_o), a mesma temperatura:

$$a_w = \frac{P}{P_o} = \frac{UR}{100} \quad (3.17)$$

A relação entre a atividade de água e a umidade para a maioria dos alimentos, à determinada temperatura, é uma curva do tipo sigmoideal, chamada de isoterma de sorção (CYBULSKA; DOE, 2007). As isotermas de sorção podem ser obtidas em duas direções: durante a hidratação do material (adsorção) e durante a sua secagem (dessorção). A diferença entre as isotermas de sorção e dessorção é chamada de histerese.

As isotermas de sorção podem ser divididas em três regiões, dependendo do estado físico da água presente. A primeira região está relacionada à faixa de atividade de água entre zero e 0,35 e representa a adsorção de um filme de água monomolecular. A segunda região corresponde à faixa entre 0,35 e 0,60 de atividade de água e representa a adsorção das camadas adicionais de água acima da monocamada. A terceira região, acima de 0,60, representa a água condensada nos poros do material seguida de dissolução dos materiais solúveis presentes (LABUZA, 1968).

Várias tentativas têm sido realizadas no sentido de descrever as isotermas de sorção matematicamente. Enquanto que alguns modelos são derivados diretamente de conceitos teóricos da termodinâmica, outros são a forma de extensão ou modificação desses modelos (BASU; SHIVHARE; MUJUMDAR, 2006). Alguns modelos são amplamente usados para descrever a sorção de água por materiais alimentícios, particularmente o modelo de Guggenheim-Anderson-De-Boer (GAB). Outro modelo muito utilizado é o Brunauer-

Emmet-Teller (BET) para obter o valor do conteúdo de água da monocamada BET de alimentos, que representa a quantidade de água que está fortemente adsorvida aos sítios específicos na superfície do alimento e é considerado como o valor ótimo para assegurar sua estabilidade. A equação de Halsey representa o modelo semi-empírico que considera a condensação da multicamada a uma distância relativamente grande da superfície. Já as equações de Oswin, Henderson e Peleg representam modelos puramente empíricos.

Na Tabela 3.5 estão apresentados alguns modelos que são mais usados para prever isotermas de sorção em alimentos.

Tabela 3.5. Modelos matemáticos utilizados para o ajuste de isotermas de sorção de alimentos

| Modelo | Equação | |
|-----------------------|--|--------|
| GAB | $X_e = \frac{X_m C_{GAB} K_{GAB} a_w}{[(1 - K_{GAB} a_w)(1 + K_{GAB}(C_{GAB} - 1)a_w)]}$ | (3.18) |
| BET (2 parâmetros) | $X_e = \frac{X_m C_{BET} a_w}{(1 - a_w)(1 + (C_{BET} - 1)a_w)}$ | (3.19) |
| BET (3 parâmetros) | $X_e = \frac{X_m C_{BET} a_w [1 - (N + 1)(a_w)^N + N(a_w)^{N+1}]}{(1 - a_w)[1 - (1 - C_{BET})a_w - C_{BET}(a_w)^{N+1}]}$ | (3.20) |
| HALSEY | $a_w = \exp\left[\frac{-A_h}{X_e^{B_h}}\right]$ | (3.21) |
| OSWIN | $X_e = A_0 \left(\frac{a_w}{1 - a_w}\right)^{B_0}$ | (3.22) |
| HENDERSON | $1 - a_w = \exp(-K_h X_e^{n_h})$ | (3.23) |
| PELEG | $X_e = K_a a_w^{n_a} + K_b a_w^{n_b}$ | (3.24) |

Onde: X_e é a umidade de equilíbrio (g de água/g sólidos secos); X_m é a umidade na monocamada molecular (g de água/g de sólidos secos); N é o número de camadas moleculares e C_{GAB} , K_{GAB} , C_{BET} , A_h , B_h , A_0 , B_0 , K_h , n_h , K_a , K_b , n_a , n_b são constantes das equações.

Além disso, as isotermas podem ser classificadas pelos seus formatos, que podem ser de cinco tipos (Figura 3.5). Para alimentos, as isotermas de maior interesse são do tipo II e III (BRUNAUER; EMMET; TELLER, 1938).

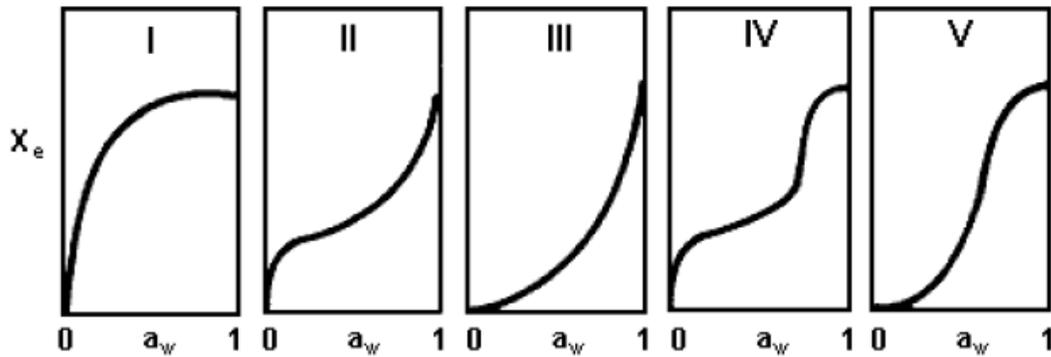


Figura 3.5. Tipos de isotermas de sorção (BRUNAUER; EMMET; TELLER, 1938).

A determinação das isotermas de sorção para alimentos é necessária para a determinação da estabilidade em várias condições de armazenamento e do tipo de material de embalagem para garantir maior vida útil. O método mais comum para a obtenção das isotermas de sorção é a determinação do conteúdo de umidade para materiais alimentícios em condições constantes de umidade relativa, como, por exemplo, com o equilíbrio das amostras em soluções de sais saturadas, em dessecadores.

3.7 COMPOSIÇÃO DE VOLÁTEIS

O odor ou aroma é um aspecto muito importante para os alimentos, devido à alta sensibilidade dos receptores nasais aos numerosos compostos voláteis liberados durante a mastigação e ingestão. Uma técnica analítica aplicada para a extração de voláteis responsáveis pelo *flavor* é a Microextração por Fase Sólida (SPME). É o método de preparação de amostras baseada na adsorção, e tem sido amplamente usado para análise de traços de substâncias, tanto na pré-concentração destes compostos quanto na separação de analitos da matriz (YANG; PEPPARD, 1994). O método envolve extração e pré-

concentração, utilizando uma fibra de sílica fundida, revestida com o material adsorvente (polímero de fase estacionária) que está protegida dentro da agulha do dispositivo da SPME. Os compostos adsorvidos podem ser desorvidos termicamente no injetor do cromatógrafo. A extração pode ser feita pelo contato direto com a amostra ou por meio de *headspace*, e vários analitos de interesse podem ser concentrados, simultaneamente. A SPME permite determinações em níveis de detecção da ordem de ng/L, ou seja, níveis de concentração muito baixos (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Existem alguns trabalhos na literatura que estudaram o perfil de voláteis da carne de mexilhão. Yasuhara e Morita (1987) estudaram os componentes orgânicos voláteis de mexilhões e identificaram mais de 100 compostos, dentre eles muitos ésteres, ácidos carboxílicos, fenilalcanos e alguns alquilbenzenos. Guen, Prost e Demaimay (2000) identificaram 85 compostos voláteis por cromatografia gasosa com espectrometria de massa, e através da cromatografia gasosa com olfatometria, observaram que apenas 33 dos compostos contribuíram para o aroma característico dos mexilhões. Os autores concluíram que 10 compostos principais caracterizam o aroma de mexilhões cozidos: 2,3-butanodiona (odor de manteiga, odor de caramelo), 2 compostos não identificados com odor de alho, (Z)-4-heptenal (odor de batata cozida), (E)-2-penten-1-ol (odor de cogumelos), etilpirazina (odor de castanha), dimetiltrisulfeto (odor de mar), metional (odor de batata cozida), 1-acetilpirazina (odor de castanha) e 2-acetil-2-tiazolina (odor de avelã torrada). Não foram encontrados trabalhos na literatura que tenham utilizado a técnica de SPME para extração dos voláteis da carne de mexilhão.

Cha, Kim e Kim (1998b) detectaram 84 compostos voláteis no hidrolisado protéico de mexilhão, produzido com a enzima Optimase, dentre estes aldeídos, cetonas, alcoóis, compostos nitrogenados, hidrocarbonetos aromáticos e terpenos. Os autores observaram que a concentração de aldeídos e cetonas do hidrolisado aumentou em relação à da carne, sendo que as cetonas podem ser resultado da degradação térmica de ácidos graxos poliinsaturados. A concentração de alcoóis diminuiu após a hidrólise e além disso, 6 pirazinas foram detectadas somente no hidrolisado, que podem ter sido formadas através da reação de Maillard e pirólise, durante a hidrólise e subsequente tratamento térmico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização das etapas apresentadas, foram utilizados o material e as metodologias descritas a seguir.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria-prima

Para a realização desse trabalho, foram utilizados mexilhões da espécie *Perna perna*, em lotes de 10 kg, descascados e refrigerados, da empresa Marepesca Indústria de Exportação e Importação Ltda, Imaruí, estado de Santa Catarina, os quais foram posteriormente congelados e armazenados a -18°C.

4.1.2 Enzima

No processo de hidrólise enzimática da carne de mexilhão, foi utilizada a ProtamexTM, uma mistura de serina e metalo endopeptidases, da empresa Novozymes (NovoNordisk, Bagsvaerd, Denmark) produzida pelas bactérias *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade enzimática declarada de 1,5 UA/g e densidade de 1.100 kg/m³.

4.1.3 Agentes carreadores

Para o processo de secagem por *spray dryer*, foram utilizadas maltodextrina 10 DE, da empresa Corn Products (Mogi-Guaçu, Brasil), e goma arábica, do tipo Instantaneum BB, da empresa Colloides Naturels Brasil (São Paulo, Brasil), como agentes carreadores.

4.2 MÉTODOS

Inicialmente, foi determinada a atividade enzimática real da enzima e a composição química da carne de mexilhão. Então, foram realizados os experimentos de hidrólise

enzimática conforme a Tabela 4.1 do planejamento experimental. Dessa forma, foram obtidas as curvas de cinética da reação e a otimização do processo de hidrólise, através da metodologia de superfície de resposta, com o objetivo de obter os maiores valores de grau de hidrólise e de recuperação de proteína. Além disso, avaliou-se a influência das variáveis independentes sobre os parâmetros cinéticos a e b do modelo empírico utilizado, para ajuste das curvas de cinética de hidrólise, apresentado pela Equação 3.16. O hidrolisado protéico obtido na condição ótima de reação de hidrólise foi caracterizado através da composição química, do perfil eletroforético, aminoacídico e de voláteis. Na etapa seguinte foi feito o estudo do comportamento reológico do hidrolisado, obtido na condição ótima, adicionado de agente carreador, maltodextrina 10 DE ou goma arábica, nas concentrações utilizadas na alimentação do secador de *spray dryer*. No estudo da secagem por atomização, foi avaliada a influência das variáveis de processo, através de um planejamento experimental, para cada agente carreador, sendo analisadas as respostas: rendimento do processo de secagem, atividade de água, umidade, higroscopicidade, densidade aparente e tamanho médio das partículas. A otimização do processo de secagem foi realizada com o objetivo de obter os menores valores de umidade e higroscopicidade dos pós. O hidrolisado puro e formulado com os agentes carreadores foram produzidos nas melhores condições de secagem e sua microestrutura foi observada através da microscopia eletrônica de varredura. Após essa etapa, foram determinadas as condições críticas de estocagem do hidrolisado puro e adicionado de 15 e 30% de agente carreador, através da determinação das isothermas de adsorção e da temperatura de transição vítrea, quando armazenadas em ambientes com diferentes umidades relativas. A última etapa foi a avaliação da perda de voláteis, durante a estocagem, do hidrolisado puro e produzido com 15 e 30% de agente carreador, a 25°C pelo período de 120 dias.

4.2.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática real foi determinada pelo método de Anson (1938) utilizando caseína como substrato. Essa análise consiste na reação de resíduos ácidos solúveis com o reativo de Folin-Ciocalteu para formação do complexo colorido, que pode

ser lido a 650 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em UA (Unidade de Anson/g).

4.2.2 Composição química

Foi obtida através das análises de umidade, cinzas, proteínas, segundo metodologia da AOAC (1997) e lipídeos (BLIGH; DYER, 1959), realizadas em triplicata.

4.2.3 Hidrólise enzimática

Inicialmente, a carne de mexilhão foi descongelada, triturada e, em seguida, misturada com água destilada na proporção carne:água de 1:2 (p/p). A solução foi transferida para o béquer encamisado de 250 mL, com agitação, aquecida até determinada temperatura (46 a 64°C) e o pH ajustado com solução de NaOH 1 N (6,7 a 8,3). Em seguida, a enzima foi adicionada (0,48 a 5,52%) e a reação monitorada, através do método pH-stat, utilizando o titulador automático, modelo T50, Mettler Toledo (Schwerzenbach, Switzerland). Os ensaios experimentais foram conduzidos de acordo com o delineamento composto central rotacional 2^3 , apresentado na Tabela 4.1. O tempo total de hidrólise foi de 3 horas. A seguir a enzima foi inativada por aquecimento da mistura (85°C / 10 minutos), com posterior resfriamento à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada utilizando a centrífuga Beckman Coulter, modelo Allegra 25-R (Esalab, São Paulo, Brasil) a 3500 rpm por 20 min para separar o resíduo (lipídeos e material não hidrolisado) do sobrenadante, contendo o hidrolisado protéico. A massa e o conteúdo de proteína do precipitado e do sobrenadante foram determinados para o cálculo da recuperação de proteína. Nas Figuras 4.1 e 4.2 estão apresentadas as montagens experimentais utilizadas para a hidrólise enzimática da carne de mexilhão, no reator de 250 mL e de 7 L, respectivamente.

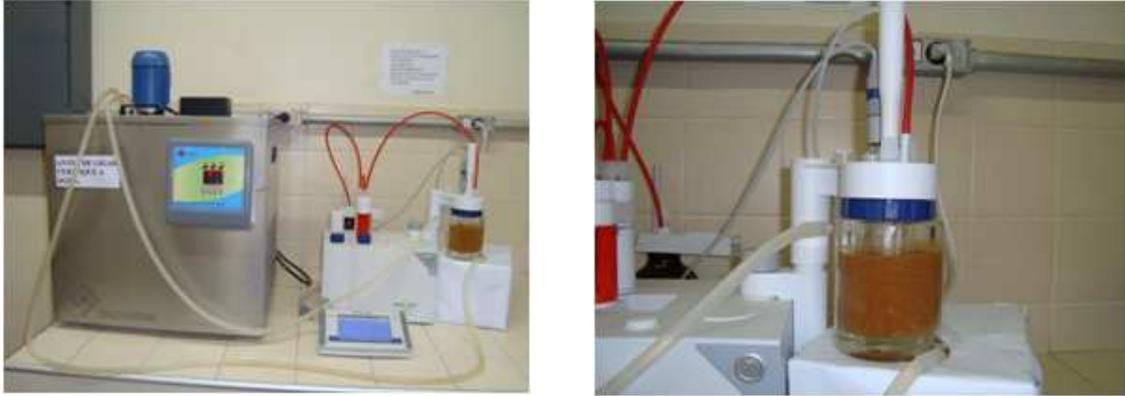


Figura 4.1. Montagem experimental para a hidrólise enzimática da carne de mexilhão, reator de 250 mL.



Figura 4.2. Montagem experimental para a hidrólise enzimática da carne de mexilhão, reator de 7 L.

O delineamento composto central rotacional, apresentado na Tabela 4.1, foi utilizado para estudar os efeitos das variáveis temperatura T , relação enzima:substrato E/S e pH , sobre as respostas grau de hidrólise GH (%), recuperação da proteína RP (%) e os parâmetros cinéticos a e b apresentados pela Equação 3.16.

Tabela 4.1. Ensaios para o planejamento experimental, variando a temperatura, a razão enzima:substrato (E/S) e o pH nos experimentos.

| Ensaio | Variáveis Independentes | | | | | |
|--------|-------------------------|---------|-----|------------|-------|-------|
| | Real | | | Codificado | | |
| | T (°C) | E/S (%) | pH | T | E/S | pH |
| 1 | 50 | 1,5 | 7,0 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 60 | 1,5 | 7,0 | 1 | -1 | -1 |
| 3 | 50 | 4,5 | 7,0 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | 60 | 4,5 | 7,0 | 1 | 1 | -1 |
| 5 | 50 | 1,5 | 8,0 | -1 | -1 | 1 |
| 6 | 60 | 1,5 | 8,0 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | 50 | 4,5 | 8,0 | -1 | 1 | 1 |
| 8 | 60 | 4,5 | 8,0 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 46 | 3,0 | 7,5 | -1,68 | 0 | 0 |
| 10 | 64 | 3,0 | 7,5 | 1,68 | 0 | 0 |
| 11 | 55 | 0,48 | 7,5 | 0 | -1,68 | 0 |
| 12 | 55 | 5,52 | 7,5 | 0 | 1,68 | 0 |
| 13 | 55 | 3,0 | 6,7 | 0 | 0 | -1,68 |
| 14 | 55 | 3,0 | 8,3 | 0 | 0 | 1,68 |
| 15 | 55 | 3,0 | 7,5 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 55 | 3,0 | 7,5 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 55 | 3,0 | 7,5 | 0 | 0 | 0 |

(a) *Grau de hidrólise.* A determinação do grau de hidrólise foi realizada através do método pH-stat ou método de titulação de grupos α -amino, liberados em pH e temperatura constantes. O grau de hidrólise foi definido por Adler-Nissen (1986) como sendo o número de ligações peptídicas hidrolisadas, expresso em equivalentes de hidrólise (h), em relação ao número total de ligações peptídicas antes da reação (h_{total}).

$$GH(\%) = \frac{h}{h_{total}} \times 100 = \frac{B \times N_b}{M \times \alpha \times h_{total}} \times 100 \quad (4.1)$$

Onde: GH é o grau de hidrólise (%); B é o volume da base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (ml); N_b é a normalidade da base; M é a massa de proteína (g, determinado em $N \times$ fator de Kjeldahl) e α é o grau de dissociação.

Quando uma ligação peptídica é hidrolisada a pH superior a 6,5, o grupo carboxi terminal formado, contribui para o abaixamento do pH. O consumo de base (medido por titulação), necessário para manter o pH constante ao longo da reação, é utilizado no cálculo

do grau de hidrólise. Considerando que o pK médio dos grupos amino seja constante, deverá existir a proporcionalidade entre a liberação de prótons (igual ao consumo de base) e a quantidade de ligações peptídicas clivadas. O fator de proporcionalidade é o grau de dissociação dos grupos α -amino (α):

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} \quad (4.2)$$

Onde: pH é constante e pK varia com a temperatura na qual a reação é conduzida.

O valor de pK , de acordo com Steinhart e Beychok (1964¹, apud KRISTINSSON e RASCO, 2000a), pode ser estimado através da Equação 4.3:

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400 \quad (4.3)$$

Onde: T é a temperatura em Kelvin.

(b) *Recuperação de proteína.* A recuperação de proteína foi utilizada como um índice de dissolução de proteína, definida pela razão entre a massa de proteína no hidrolisado e a massa inicial de proteína no substrato original (DINIZ; MARTIN, 1998), calculada pela Equação 4.4:

$$RP (\%) = \frac{MP_s}{MP} = \frac{MP_s}{MP_s + MP_p} = \frac{x_s M_s}{x_s M_s + x_p M_p} \times 100 \quad (4.4)$$

Onde: RP é a recuperação de proteína (%); M é a massa inicial de proteína no substrato original (g); MP_s é a massa de proteína presente no sobrenadante (g); MP_p é a massa de proteína presente no precipitado (g); x_s é o conteúdo de proteína no sobrenadante (g proteína/g sobrenadante); x_p é o conteúdo de proteína no precipitado (g proteína/g precipitado); M_s é a massa de sobrenadante (g) e M_p é a massa de precipitado (g). A proteína no sobrenadante e no resíduo foi determinada pelo método micro-Kjeldahl (AOAC, 1997).

¹ STEINHARDT, H.; BEYCHOK, S. Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules. In: H. Neurath (Ed). The proteins, v. 2. New York: Academic Press, 1964. p. 139-304.

4.2.4 Perfil de aminoácidos

A composição de aminoácidos totais foi determinada após hidrólise ácida das amostras, carne ou hidrolisado protéico liofilizados, com HCl 6 N/0,1% de fenol, a 110°C, por 24 horas, de acordo com o método de Pico-Tag descrito por White, Hart e Fry (1986). Depois da hidrólise ácida, a derivatização da amostra foi iniciada pela adição de 20 µL de solução de etanol:água:triethylamina:fenilisotilcianato (7:1:1:1, v/v) que foi misturada utilizando o agitador do tipo vórtex, e deixada em repouso por 20 min à temperatura ambiente. Os aminoácidos foram separados por HPLC (Thermo Separation Products, Waltham, Massachusetts, EUA), a 50°C por 38 min, utilizando uma coluna em fase reversa (modelo PCX 3100, Pickering Laboratories, Mountain View, EUA), e quantificados pela absorvidade UV a 254 nm. A quantificação foi feita por calibração interna multinível com auxílio do ácido alfa-aminobutírico (AAAB) como padrão interno.

O conteúdo de triptofano foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Spies (1967), através da hidrólise enzimática da amostra, carne ou hidrolisado protéico liofilizados, utilizando pancreatina em tampão fosfato (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) a 40°C, por 24 h, seguida pela reação colorimétrica com p-dimetilaminobenzaldeído e 21,2 N de ácido sulfúrico a 25°C por 6 h, no escuro. Após essa etapa 0,045% de nitrito de sódio foram adicionados e a absorbância lida a 590 nm, depois de 30 min, utilizando o espectrofotômetro (modelo DU 640, Beckman Coulter).

4.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A determinação do perfil eletroforético foi realizada em gel de poliacrilamida, de acordo com Schagger e Jagow (1987), para peptídeos com massa molecular menor do que 26,6 kDa. Já para a proteína intacta, cujas moléculas possuem massa molecular acima de 14,4 kDa, o perfil eletroforético foi determinado segundo Laemmli (1970). Um gel de empilhamento com 4% e gel de resolução com 15,5% e 12% de acrilamida foram utilizados, respectivamente, para cada método. A análise foi realizada a 70V e 120V, respectivamente para cada método, no sistema Mini-protein III. A massa molecular média de cada banda foi estimada através do uso dos seguintes padrões de marcadores de massa

molecular: triosefosfato isomerase (26,6 kDa), mioglobina (17,0 kDa), α -lactoalbumina (14,4 kDa), aprotinina (6,5 kDa), número de catálogo 161-0326, fosforilase b (97,4 kDa), albumina de soro (66,2 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa), número de catálogo 161-0304 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA).

4.2.6 Composição dos voláteis

Esta etapa do trabalho foi dividida em 2 partes. A primeira está relacionada à otimização do processo de extração dos voláteis, do hidrolisado protéico de mexilhão, tendo como variáveis o tempo e a temperatura de extração dos compostos pela técnica de microextração por fase sólida, sendo que foram fixados a quantidade de amostra, o volume de headspace, o tempo de equilíbrio e o tipo de revestimento de fibra. Para isso foi utilizado o CG-DIC (cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama). A segunda parte dessa etapa do trabalho foi a identificação de alguns dos compostos voláteis da carne de mexilhão e do hidrolisado protéico de mexilhão; para isso foi utilizado o CG-MS (cromatógrafo gasoso acoplado com espectrômetro de massas).

(a) Otimização do processo de extração dos voláteis e separação dos compostos por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC)

A otimização do processo de extração dos analitos foi realizada no hidrolisado protéico, utilizando o cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC). O método utilizado para extração dos voláteis foi a microextração por fase sólida (SPME) e consistiu em expor a fibra ótica revestida do material adsorvente bi-polar, o PDMS-DVB (polidimetilsiloxano-divinilbenzeno), sobre o headspace do *vial* contendo a amostra, durante determinado intervalo de tempo, para a adsorção dos analitos e posterior exposição no cromatógrafo gasoso para a dessorção dos mesmos. Na Figura 4.3 está apresentada a montagem experimental usada para a extração dos voláteis por microextração por fase sólida (SPME).



Figura 4.3. Montagem experimental utilizada para a extração dos compostos voláteis através da microextração por fase sólida (SPME).

Para a separação dos compostos voláteis, foi utilizado o cromatógrafo gasoso Agilent 7890 (EUA), com injetor manual e detector de ionização de chama (CG-DIC), equipado com uma coluna de 30 m por 0,32 mm de diâmetro interno, com espessura de filme de 0,25 μm de fase estacionária HP-5, da J&W (Folsom, EUA). O volume de injeção foi de 1 μL em modo *splitless* e o fluxo do gás de arraste (hélio) de 1 mL/min. As temperaturas do detector e do injetor foram de 250°C. A temperatura da coluna foi mantida inicialmente a 40°C por 2 min, depois programada com rampa de 5°C/min até 60°C, depois outra rampa de 2°C/min até 90°C e por último rampa de 5°C/min até 200°C e mantida a 200°C por 7 min, condições obtidas após testes preliminares.

Para a etapa de extração através da microextração por fase sólida (SPME) foi empregada a fibra de revestimento polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), de 65 μm de espessura de filme e 10 mm de comprimento (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). A fibra de SPME foi pré-condicionada a 250°C por 40 min no injetor do cromatógrafo gasoso antes da realização dos experimentos. Pesaram-se 5,00 gramas do hidrolisado em *vials* de 40 mL fechados com tampa rosqueada com septo de silicone/PTFE (Politetrafluoretileno). Antes da extração, cada frasco foi colocado em banho-maria por 15 min, na mesma temperatura empregada no experimento (tempo de equilíbrio).

Em seguida, a fibra de SPME foi introduzida no *vial* através do septo e exposta ao *headspace*, para extração dos compostos voláteis. Avaliaram-se as seguintes condições de extração: tempo de 15, 30 e 45 min e temperatura de 30, 40 e 50°C. Foram fixados a quantidade de amostra, o volume de headspace, o tempo de equilíbrio e o tipo de revestimento de fibra. Após o término do tempo de exposição da fibra, a mesma foi removida do frasco e inserida no injetor do cromatógrafo gasoso (CG-DIC) para dessorção térmica dos analitos por 0,75 min, depois esse tempo foi aumentado para 6 min. Após a exposição da fibra no injetor do cromatógrafo, a mesma foi mantida no injetor por 10 min para eliminar o efeito de memória, isto é, eliminar a presença dos compostos, provenientes do experimento anterior, que possam estar adsorvidos na fibra. Obtiveram-se nessa etapa de otimização como respostas o perfil cromatográfico e a soma das áreas dos picos. Após a otimização do método de extração, utilizando o hidrolisado protéico de mexilhão, foram obtidos o perfil cromatográfico da carne de mexilhão e do precipitado, nas mesmas condições.

(b) *Identificação dos componentes voláteis da carne de mexilhão e do hidrolisado protéico através da cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-MS)*

A identificação dos compostos voláteis do hidrolisado protéico de mexilhão e da carne de mexilhão foi feita após a extração dos voláteis, por microextração por fase sólida com a mesma fibra de PDMS-DVB (Supelco, Bellefont, EUA) pelo tempo de extração de 45 min, a 50°C. Nessa etapa, foi utilizado o cromatógrafo gasoso Varian Star 3600 CX acoplado ao espectrômetro de massas MS Saturn 2000 equipado com uma coluna VP-5 de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Varian, Walnut Creek, EUA). A linha de transferência para o espectrômetro de massas foi mantida a 280°C. Os espectros de massa foram obtidos usando o detector seletivo de massa por impacto eletrônico, a 70 eV e a coleta de dados foi feita à taxa de 1 scan s⁻¹ na faixa de m/z (massa/carga) de 20 a 650. Os compostos foram tentativamente identificados pela comparação dos espectros de massa e pelos índices de retenção (IR), calculados segundo a equação de Van den Dool e Kratz (1963), apresentada na Equação 4.5, com aqueles presentes na biblioteca do National Institute of Standards and Technology (NIST05). As injeções de 1 µL foram realizadas no modo *splitless*. As

condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas utilizadas para o CG-DIC: temperaturas do injetor e do detector mantidas a 250°C, temperatura da coluna programada com temperatura inicial de 40°C por 2 min, então elevada à taxa de 5 °C/min até 60°C, depois elevada a 2 °C/min até 90°C, e finalmente a 5 °C/min até 200°C, e a 200°C mantida por 7 min. Hélio foi utilizado como gás de arraste à vazão de 1 mL/min.

$$IR_{\text{calculado}} = I^n + \left(\frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right) \cdot 100 \quad (4.5)$$

Onde: I^n é o índice de retenção do marcador que eluiu antes do composto x (apresentado na Tabela 4.2); t_n é o tempo de retenção do marcador que eluiu antes do composto x; t_{n+1} é o tempo de retenção do marcador que eluiu depois do composto x e t_x é o tempo de retenção do composto x.

Tabela 4.2. Tempos de retenção dos hidrocarbonetos usados como referência no cálculo do índice de retenção dos compostos.

| | Índice de retenção | Tempo de retenção (min) |
|-------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Octano (C8) | 800 | 7,25 |
| Nonato (C9) | 900 | 8,55 |
| Decano (C10) | 1000 | 13,12 |
| Undecano (C11) | 1100 | 18,92 |
| Dodecano (C12) | 1200 | 24,55 |
| Tridecano (C13) | 1300 | 28,59 |
| Tetradecano (C14) | 1400 | 31,79 |
| Pentadecano (C15) | 1500 | 34,64 |
| Hexadecano (C16) | 1600 | 37,10 |
| Heptadecano (C17) | 1700 | 39,47 |

Obs: tempos de retenção obtidos experimentalmente.

4.2.7 Comportamento reológico do hidrolisado protéico usado na alimentação do secador spray dryer

O hidrolisado protéico de mexilhão obtido na condição ótima da hidrólise enzimática quando adicionado de goma arábica ou maltodextrina nas concentrações de 5, 7, 10, 13, 15 e 30%, valores utilizados na alimentação do secador de *spray dryer*, foi avaliado

em relação ao seu comportamento reológico, através da determinação das curvas de escoamento. As curvas de escoamento foram determinadas utilizando o reômetro de tensão controlada Physica MCR 301 Rheometer (Anton Paar, Alemanha), utilizando a geometria de placas planas paralelas, de aço inox, com diâmetro de 74,96 mm, sendo que as medidas foram realizadas com o *gap* de 500 μm , a 25°C. Cada análise reológica foi executada em três etapas consecutivas, fazendo-se primeiro a varredura de taxa sendo a primeira subida de 0 a 300 s^{-1} , a volta de 300 a 0 s^{-1} e a segunda subida de 0 a 300 s^{-1} , para garantir que fossem eliminados efeitos tixotrópicos. Os reogramas obtidos foram avaliados de acordo com os modelos para fluidos newtonianos e pseudoplásticos, apresentados nas Equações 4.6 e 4.7. A viscosidade (η) das amostras foi calculada como a relação entre a tensão (σ) e a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) obtidas. Os dados experimentais foram ajustados através do software Statistica 5.0, utilizando-se regressão não-linear e o método Quasi-Newton.

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (4.6)$$

$$\sigma = k \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (4.7)$$

4.2.8 Secagem por atomização

Para a secagem do hidrolisado protéico da carne de mexilhão foi utilizado o secador laboratorial com sistema de atomização (mini *spray dryer*) marca LABMAQ, modelo MSD1 (Ribeirão Preto, Brasil). A alimentação do secador foi realizada através da bomba peristáltica, com vazão máxima de 1 L/h. A temperatura de saída do ar foi monitorada, para observar sua variação em função das condições estabelecidas na alimentação do secador e das características do produto final. As dimensões da câmara de secagem foram de 500 mm x 150 mm, o bico atomizador utilizado foi do tipo duplo fluido com orifício de 1,2 mm de diâmetro. A vazão do ar de secagem foi de 36 m^3/h , a pressão do ar comprimido de 0,25 MPa e a vazão do ar comprimido de 2,4 m^3/h . Os experimentos foram realizados segundo o delineamento composto central rotacional, apresentado na Tabela 4.3 cujas variáveis independentes estudadas foram a temperatura do ar de secagem de 140 a 190°C, a vazão da alimentação de 0,4 a 1 L/h e a concentração de agente carreador de 5 a 15%.

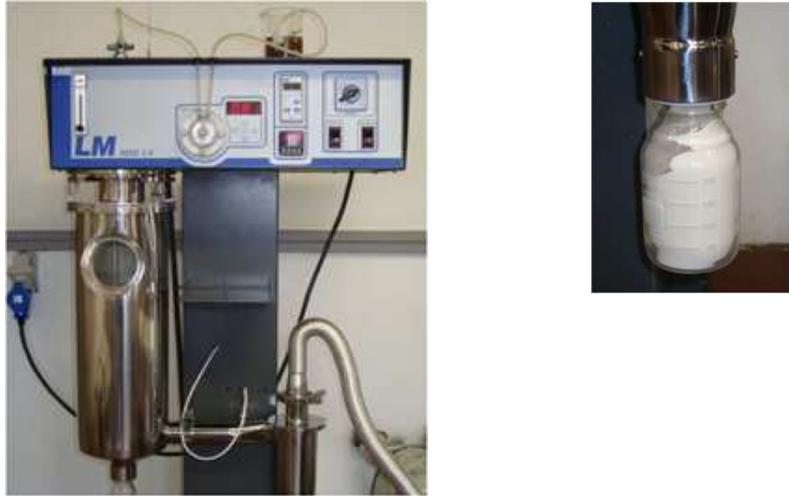


Figura 4.4. *Spray dryer* laboratorial utilizado nos ensaios de secagem por atomização.

Tabela 4.3. Ensaios para o planejamento experimental, variando a temperatura do ar de secagem (T), a vazão de alimentação (V) e a concentração do agente carreador (C).

| Ensaio | Variáveis Independentes | | | | | |
|--------|-------------------------|---------|-------|------------|-------|-------|
| | Real | | | Codificado | | |
| | T (°C) | V (L/h) | C (%) | T | V | C |
| 1 | 150 | 0,5 | 7 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 180 | 0,5 | 7 | 1 | -1 | -1 |
| 3 | 150 | 0,9 | 7 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | 180 | 0,9 | 7 | 1 | 1 | -1 |
| 5 | 150 | 0,5 | 13 | -1 | -1 | 1 |
| 6 | 180 | 0,5 | 13 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | 150 | 0,9 | 13 | -1 | 1 | 1 |
| 8 | 180 | 0,9 | 13 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 140 | 0,7 | 10 | -1,68 | 0 | 0 |
| 10 | 190 | 0,7 | 10 | 1,68 | 0 | 0 |
| 11 | 165 | 0,4 | 10 | 0 | -1,68 | 0 |
| 12 | 165 | 1,0 | 10 | 0 | 1,68 | 0 |
| 13 | 165 | 0,7 | 5 | 0 | 0 | -1,68 |
| 14 | 165 | 0,7 | 15 | 0 | 0 | 1,68 |
| 15 | 165 | 0,7 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 165 | 0,7 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 165 | 0,7 | 10 | 0 | 0 | 0 |

4.2.9 Análises físico-químicas dos pós

(a) *Atividade de água*. Foi determinada por medida direta no equipamento Aqualab, Series 3 TE, a 25°C (Decagon, Devices Inc., Pulman, EUA), em triplicata.

(b) *Conteúdo de umidade*. Para a determinação do conteúdo de umidade, 1 g de hidrolisado em pó, em triplicata, foi levado à estufa a vácuo na temperatura de 70°C, pelo período de 48 horas (AOAC, 1997).

(c) *Higroscopicidade*. A higroscopicidade foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Cai e Corke (2000), com algumas modificações. 1 g de hidrolisado em pó, em triplicata, foi acondicionado em recipiente hermético contendo solução saturada de NaCl (umidade relativa de 75,3%). Após uma semana, as amostras foram pesadas e a higroscopicidade foi expressa em g de umidade absorvida por g de sólidos.

(c) *Distribuição do tamanho das partículas*. A distribuição do tamanho das partículas do hidrolisado protéico em pó foi determinada pelo analisador de tamanho de partículas por difração à laser Mastersizer S, modelo S-MAM 5005 (Malvern Instruments Ltda, Malvern, Reino Unido). O diâmetro médio foi determinado baseando-se no diâmetro médio da esfera de mesmo volume, o diâmetro de De Brouckere $D_{4,3}$, apresentado na Equação 4.8. As amostras foram analisadas em quintuplicata, por via úmida, com dispersão em etanol 99,5%.

$$D_{4,3} = \frac{\sum_{i=1}^n n.d_i^4}{\sum_{i=1}^n n.d_i^3} \quad (4.8)$$

Onde: d_i é o diâmetro das partículas e n é o número de partículas.

(e) *Densidade volumétrica*. A determinação da densidade volumétrica foi realizada de acordo com o método descrito por Beristain, Garcia e Vernon-Carter (2001), com algumas modificações. Um grama de pó foi colocado na proveta graduada de 25 mL ($\pm 0,5$ mL), e após a compactação do pó depois de 10 batidas manuais, o volume foi medido e a densidade expressa em g/cm³.

(f) *Rendimento do processo de secagem*. Em cada um dos experimentos de secagem, o rendimento do processo foi calculado como a razão entre a massa de sólidos no produto em pó e a massa de sólidos no hidrolisado utilizado na alimentação do secador, de acordo com a Equação 4.9.

$$RS(\%) = \frac{M_{s,pó}}{M_{s,líq}} \times 100 = \frac{M_{pó} \cdot X_{s,pó}}{M_{líq} \cdot X_{s,líq}} \times 100 = \frac{M_{pó} \cdot (100 - X_{w,pó})}{M_{líq} \cdot (100 - X_{w,líq})} \times 100 \quad (4.9)$$

Onde: M é a massa (g); M_S é a massa de sólidos (g); X_S é o conteúdo de sólidos (g sólidos/g pó ou líquido) e X_W é o conteúdo de água (g água/g pó ou líquido). Os subscritos pó e líq são referentes ao produto em pó obtido e ao líquido utilizado na alimentação do secador.

4.2.10 Microestrutura das micropartículas

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por Rosemberg e Young (1993). O hidrolisado puro em pó e as micropartículas produzidas com os agentes carreadores foram fixadas em porta-espécimes metálicos (*stubs*) de 12 mm de diâmetro e 10 mm de altura, através do uso de fita adesiva de dupla face convencional. Uma vez que as amostras em pó analisadas não eram metálicas, foi necessário realizar a metalização (*sputtering*), cobrindo-as com uma fina camada de liga metálica de ouro/paládio para evitar o efeito de agitação (*charging up*) durante a observação no microscópio eletrônico. Assim, o hidrolisado puro em pó e as micropartículas produzidas com os agentes carreadores foram recobertas utilizando-se o processo de evaporação de ouro a vácuo no aparelho metalizador Polaron SC7620 Sputter

Coater (Ringmer, U.K.) à taxa de recobrimento de $0,51 \text{ \AA/s}$, por 180 segundos, com corrente de 3-5 mA, 1 Volt e $2 \times 10^{-2} \text{ Pa}$. As amostras metalizadas foram mantidas em suporte fechado, dentro do dessecador, até o momento da observação no microscópio eletrônico de varredura LEO 440i (LEICA Electron Microscopy Ltd., Cambridge, U.K.), operando com 5 kV. A aquisição das imagens foi realizada pelo LEO software, versão 3.01.

4.2.11 Determinação das isotermas de adsorção

As curvas de adsorção do hidrolisado de mexilhão em pó foram determinadas pelo método gravimétrico estático, utilizando soluções salinas saturadas, na temperatura de 25°C , apresentadas na Tabela 4.4. O tempo necessário para atingir o equilíbrio variou de 3 a 4 semanas.

Tabela 4.4. Valores de atividade de água relacionados às soluções salinas saturadas a 25°C .

| Sal | a_w |
|-----------------------------------|-------|
| LiCl | 0,113 |
| CH ₃ COOK | 0,225 |
| MgCl ₂ | 0,328 |
| K ₂ CO ₃ | 0,432 |
| Mg(NO ₃) ₂ | 0,529 |
| KI | 0,689 |
| NaCl | 0,753 |
| KCl | 0,843 |

Fonte: GREENSPAN (1977).

4.2.12 Determinação da temperatura de transição vítrea dos hidrolisados protéicos de mexilhão em pó

A temperatura de transição vítrea do hidrolisado de mexilhão em pó foi obtida por calorimetria diferencial de varredura, conforme metodologia descrita por Baroni, Sereno e Hubinger (2003).

O calorímetro empregado foi o TA-MDSC-2920 (TA Instruments, New Castle, EUA) com resfriamento controlado pelo resfriador mecânico RCS (Refrigerated Cooling Accessory), operando com gás nitrogênio a 150 mL/min. A calibração do equipamento foi feita com índio ($T_{\text{fusão}} = 156,6^{\circ}\text{C}$) e ainda foi feita a verificação com azobenzol ($T_{\text{fusão}} = 68,0^{\circ}\text{C}$), utilizando hélio como gás de purga, com vazão constante de 25 mL/min.

As amostras de pó de cerca de 3 a 5 mg, foram colocadas em cápsulas de alumínio (20 μL) e equilibradas a diferentes condições de umidade relativa, em dessecadores, com diferentes soluções salinas saturadas, a 25°C . Após o equilíbrio, as cápsulas foram lacradas hermeticamente e analisadas, utilizando a cápsula vazia como referência. Inicialmente, a amostra foi resfriada até -70°C , e em seguida, aquecida até 120°C , à taxa constante de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Duas corridas foram realizadas, uma vez que dessa forma a entalpia de relaxação dos pós amorfos é reduzida. As análises foram realizadas em triplicata e os dados foram analisados utilizando o software Universal Analysis 2.6 (TA Instruments, New Castle, EUA). A transição vítrea de pós amorfos produz uma mudança no fluxo de calor devido a mudanças na capacidade calorífica, a temperatura de transição de fase, sendo que a temperatura de transição vítrea foi determinada como o ponto médio da transição vítrea. O efeito plasticizante da água na transição vítrea foi descrito pelo modelo de Gordon Taylor (GORDON; TAYLOR, 1952), apresentado na Equação 4.10.

$$T_g = \frac{w_s T_{gs} + k w_w T_{gw}}{w_s + k w_w} \quad (4.10)$$

Onde: T_g , T_{gs} e T_{gw} são as temperaturas de transição vítrea da mistura, do sólido puro e da água ($^{\circ}\text{C}$), respectivamente; w_s e w_w são as frações mássicas de sólido e de água na mistura (g água ou g sólidos/g total); e k_{GT} é a constante do modelo de Gordon-Taylor. A T_{gw} foi considerada como sendo -135°C (JOHARI; HALLBRUCKER; MAYER, 1987).

Os parâmetros da equação (4.10) foram obtidos através da regressão não-linear dos dados experimentais, utilizando o Solver do Excel (Microsoft, Redmond, EUA) e o ajuste foi avaliado em relação aos valores de coeficiente de determinação (R^2) e módulo do desvio relativo médio (EM).

4.2.13 Estabilidade dos componentes voláteis do hidrolisado puro e das micropartículas durante a estocagem

Amostras de hidrolisado puro em pó e das micropartículas produzidas com maltodextrina ou goma arábica, nas concentrações de 15 e 30% foram armazenadas em potes plásticos a 25°C e avaliadas, de 15 em 15 dias, em relação ao perfil cromatográfico dos voláteis, ao longo de 120 dias de armazenamento. As amostras foram avaliadas qualitativamente em relação ao perfil de voláteis e, para isso, as micropartículas foram pesadas em *vials* de 40 mL, em quantidades pré-estabelecidas, 0,25 g de hidrolisado puro, 0,78 g das microcápsulas produzidas com 15% de agente carreador e 1,32 g das microcápsulas produzidas com 30% de agente carreador, de modo a manter a mesma quantidade de recheio a ser analisada em todos os *vials*. Após isso, as micropartículas foram suspensas em 5 mL de água destilada e colocadas em ultrasson por 15 minutos para liberação do recheio. Então foi realizada a adsorção dos analitos de cada *vial*, através da microextração por fase sólida, nas condições determinadas no item 4.2.6 a, 50°C por 45 min usando uma fibra com revestimento PDMS-DVB e a dessorção dos analitos foi feita no mesmo cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC), com a mesma coluna e nas condições analíticas anteriores.

Foram adquiridos 4 padrões cromatográficos dos seguintes compostos: 2-penten-1-ol, 2-nonanone, nonanal e hexanal (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), para detecção nas amostras avaliadas. Os padrões cromatográficos foram adicionados na matriz e submetidos às mesmas condições analíticas, de extração e separação, para a construção da curva padrão para cada composto, relacionando a concentração com a área de cada pico.

4.2.14 Análise estatística

A otimização do processo de hidrólise enzimática foi realizada através da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), que permitiu a predição de modelos avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo conceito de p-valor, ao nível de significância de 5%, através do software Statística 5.0, de modo a obter os maiores valores de grau de hidrólise (% GH) e de recuperação da proteína (% RP). Já os modelos obtidos

para os parâmetros cinéticos a e b, do modelo empírico, foram avaliados pela Análise de Variância e pelo conceito de p-valor, ao nível de significância de 10%.

A modelagem dos dados experimentais de grau de hidrólise pelo tempo foi conduzida de modo a prever a cinética de hidrólise da carne de mexilhão. Os parâmetros a e b foram obtidos através da Equação 3.16 e pela regressão não linear dos dados de grau de hidrólise com o tempo, usando o método Quasi-Newton e o software Statistica 5.0 (Statsoft, Tulsa, EUA). O coeficiente de determinação e o desvio relativo médio foram utilizados para avaliar o ajuste dos dados experimentais.

$$EM = \frac{100}{Z} \sum_{i=1}^Z \frac{|V_P - V_0|}{V_0} \quad (4.11)$$

Onde: *EM* é o desvio relativo médio (%); *V_p* são os valores preditos; *V₀* são os valores experimentais e *Z* = número de amostras.

Os resultados das análises de aminoácidos foram avaliados através de um teste de comparação de médias (t de Student), ao nível de significância de 5%. Para isso, foi utilizado o software Statistica 5.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

A otimização do processo de secagem por spray dryer foi realizada através da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), que permitiu a predição de modelos avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo conceito de p-valor, ao nível de significância de 10%, através do software Statistica 5.0, de modo a obter os menores valores de higroscopicidade e de conteúdo de umidade dos pós.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química da carne de mexilhão foi feita de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.2 e está apresentada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Composição química da carne de mexilhão, em base úmida.

| Análise (base úmida, %) | Valor médio \pm desvio padrão |
|-------------------------|---------------------------------|
| Umidade | 75,23 \pm 0,15 |
| Proteínas | 15,69 \pm 0,14 |
| Lipídeos | 3,21 \pm 0,15 |
| Cinzas | 1,71 \pm 0,01 |

Carboidratos totais foram obtidos por diferença (100g - gramas totais de umidade, proteína, lipídeos e cinzas) resultando em 4,16%. Observou-se reduzido conteúdo de gordura e elevado conteúdo de proteína na carne de mexilhão. Comparando os resultados da Tabela 5.1, do mexilhão cultivado em Santa Catarina, aos fornecidos por Tavares et al. (1998), apresentada na Tabela 3.2, do mexilhão *Perna Perna* cultivado em São Paulo, observou-se semelhança em relação ao conteúdo de lipídeos e algumas diferenças como menores conteúdos de proteínas e de cinzas. A variabilidade na composição centesimal da carne de mexilhão pode ser explicada por alguns fatores como temperatura e salinidade da água, disponibilidade de alimento, ciclo reprodutivo do animal e época do ano (TAVARES et al., 1998).

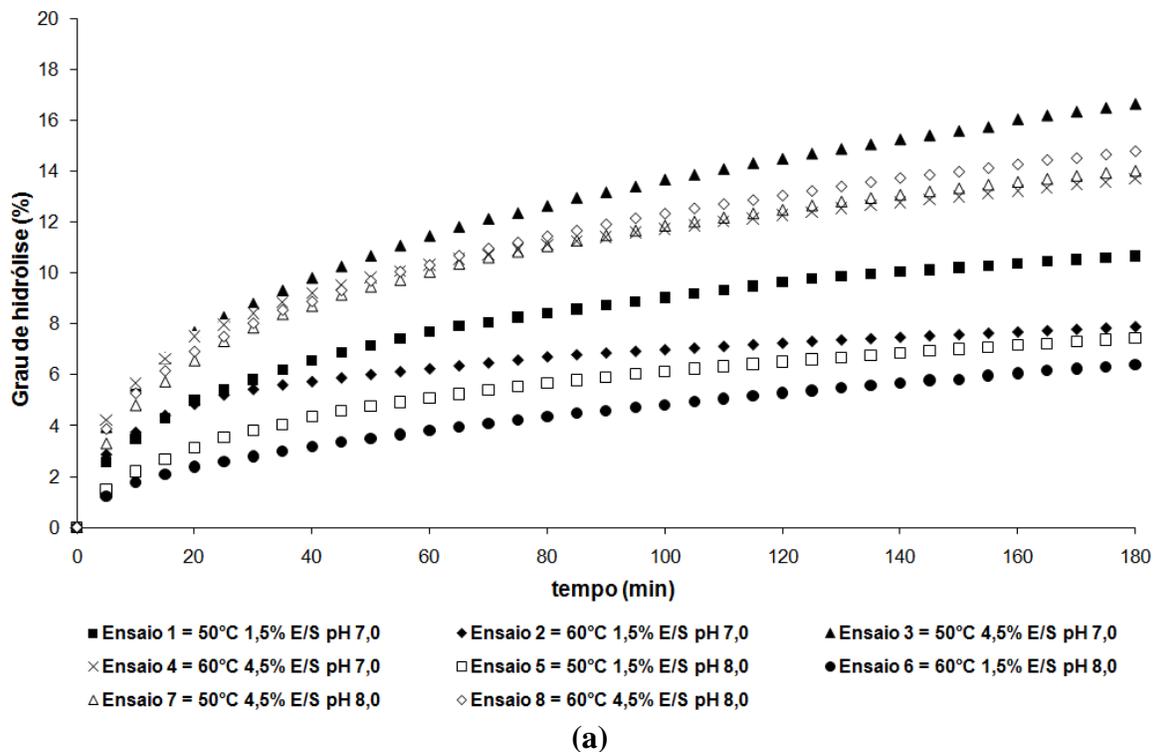
5.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

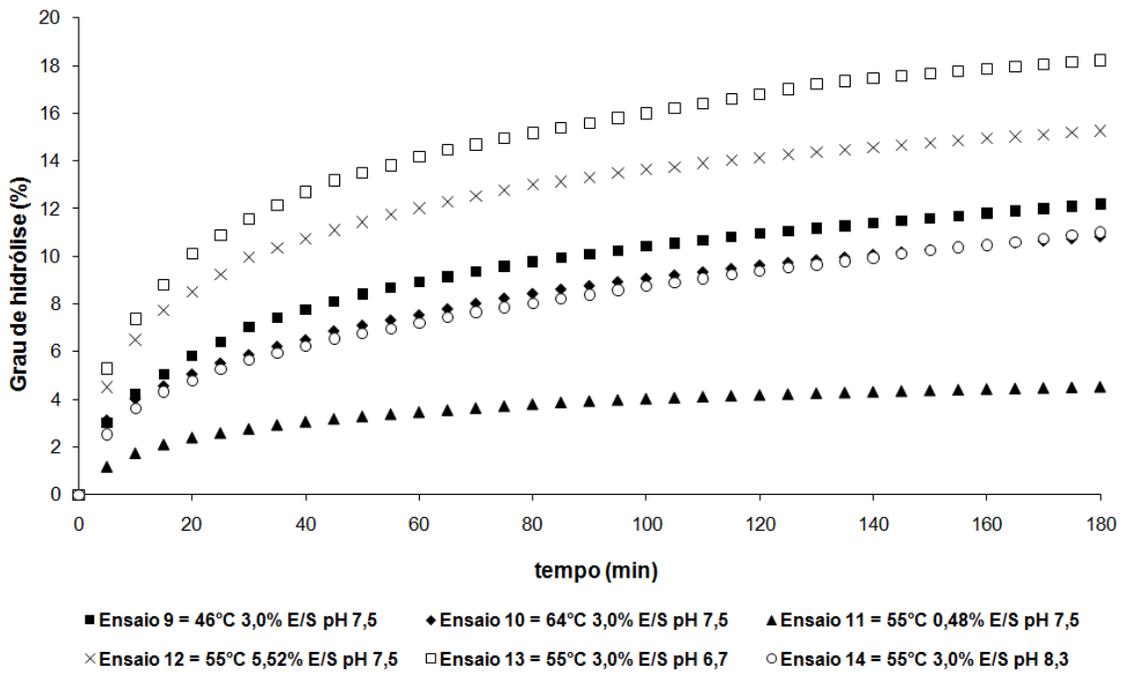
O valor encontrado da atividade enzimática real da ProtamexTM foi de 1,18 \pm 0,04 UA/g. O valor de atividade declarada é o valor nominal de atividade da preparação enzimática, que é garantida pelo fabricante. A atividade enzimática real é o valor de atividade medido na amostra, em particular para os estudos de cinética onde a atividade real é importante (ADLER-NISSEN, 1986).

Nos itens a seguir, são apresentados os resultados experimentais da cinética de hidrólise enzimática, da modelagem matemática e do planejamento experimental, para avaliar os parâmetros cinéticos do modelo empírico utilizado, o grau de hidrólise e a recuperação de proteína, além da otimização da reação enzimática de hidrólise da carne de mexilhão usando a enzima ProtamexTM.

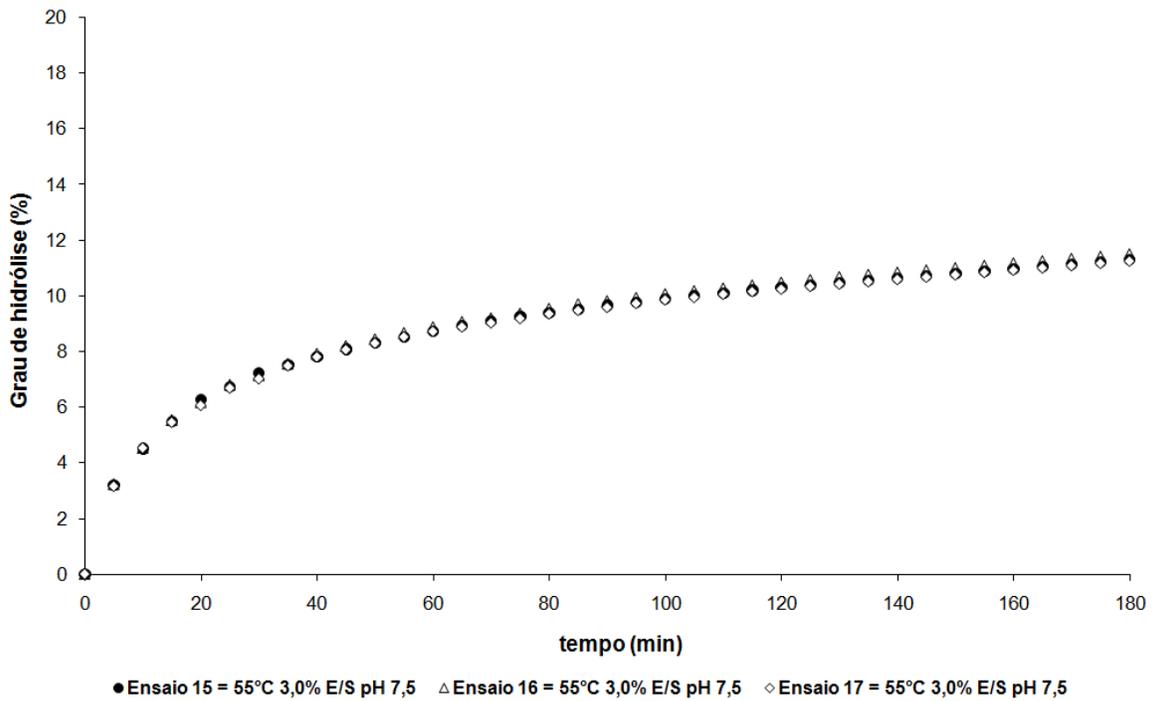
5.1.1 Cinética da hidrólise enzimática

Para o estudo da cinética de hidrólise enzimática de carne de mexilhão foram realizados 17 ensaios a diferentes temperaturas, concentração enzima:substrato e pH, descrito no item 4.2.3. As curvas de cinética de hidrólise estão apresentadas na Figura 5.1.





(b)



(c)

Figura 5.1. Cinética de hidrólise enzimática de carne de mexilhão, pontos fatoriais (a), axiais (b) e centrais (c).

Na Figura 5.1, observou-se que as curvas apresentam elevada taxa inicial de reação, onde um grande número de ligações é clivado, seguida pela diminuição da taxa até alcançar uma fase estacionária. Curvas de hidrólise similares foram encontradas para salmão, resíduos de camarão, resíduos de lagosta, soro de leite, resíduos de atum, hemoglobina e capelím (KRISTINSSON; RASCO, 2000b; HOLANDA; NETTO, 2006; BAEK; CADWALLADER, 1995; CAMACHO; GONZÁLEZ-TELLO; GUADIX, 1998; GUERARD; GUIMAS; BINET, 2002; MÁRQUEZ; VÁZQUEZ, 1999; SHAHIDI; HAN; SYNOWIECKI, 1995).

Esse perfil da curva de hidrólise enzimática pode estar associado a diversos fatores, tais como: diminuição da concentração de ligações peptídicas disponíveis para clivagem; competição entre o substrato original e os peptídeos formados durante a reação e diminuição da atividade enzimática devido à desnaturação da enzima (GUERARD; GUIMAS; BINET, 2002; ADLER-NISSEN, 1986; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994).

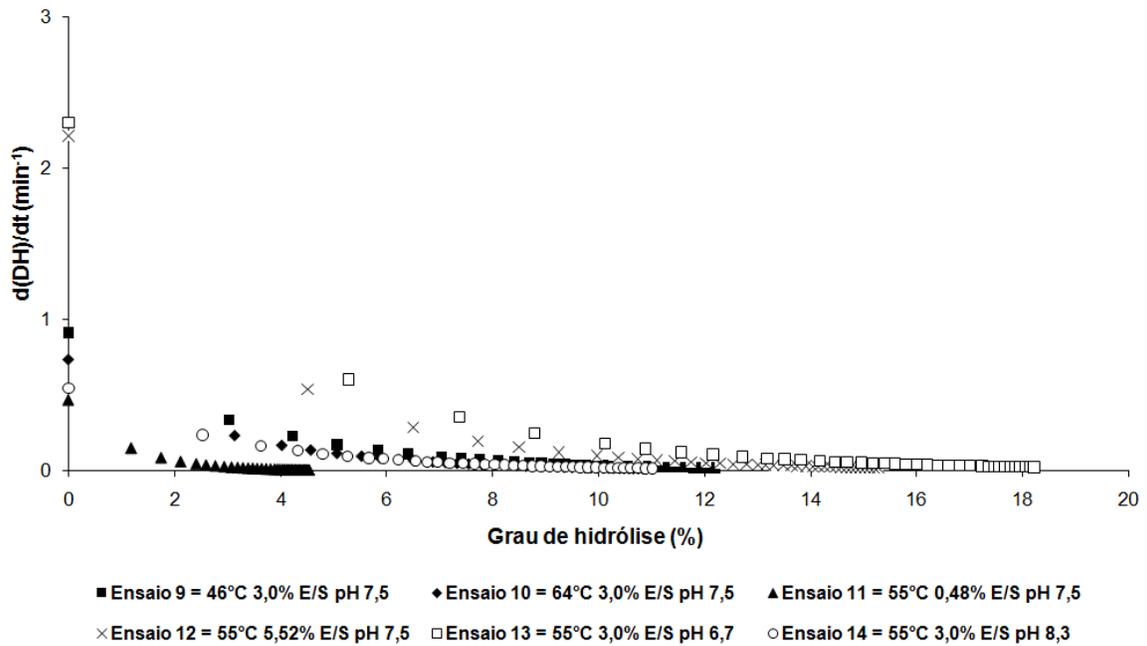
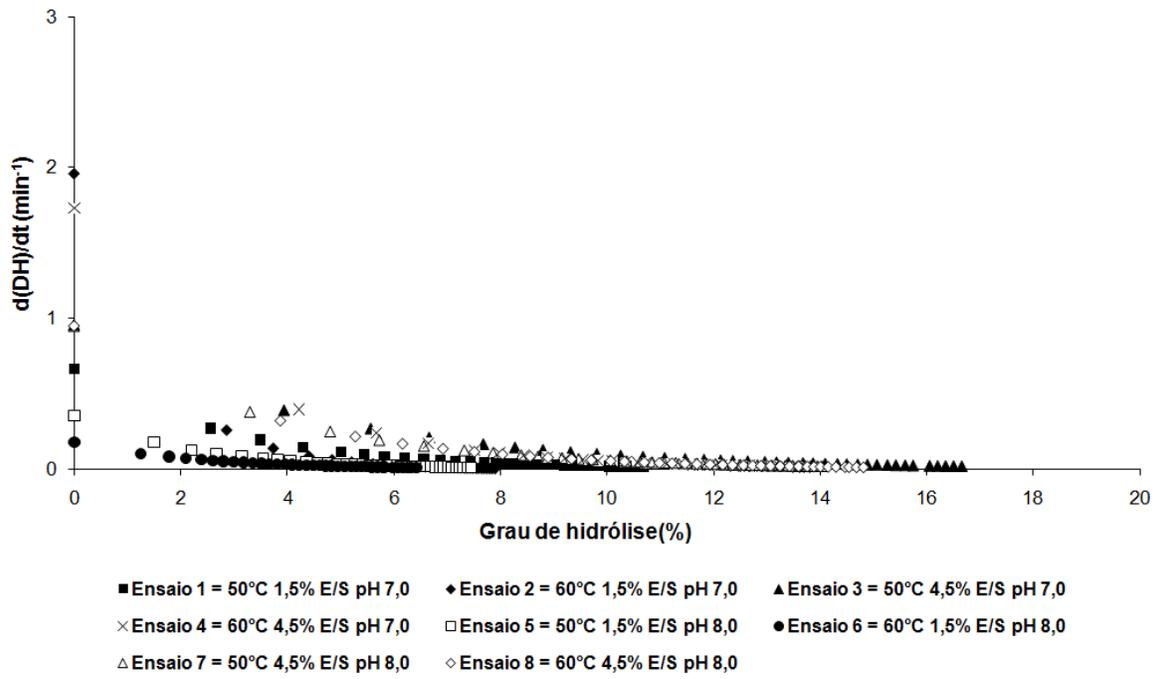
As Figuras 5.1 (a) e (b) mostram que o ensaio 3 (50°C, 4,5% E/S e pH = 7) apresentou o maior de valor de grau de hidrólise, entre os pontos fatoriais e o ensaio 13 (55°C, 3,0% E/S e pH = 6,7), entre os pontos axiais. Os ensaios 4 (60°C, 4,5% E/S e pH = 7), 7 (50°C, 4,5% E/S e pH = 8) e 8 (60°C, 4,5% E/S e pH = 8) apresentaram valores de grau de hidrólise muito próximos entre si. Comparando os ensaios 4 e 8, a similaridade dos valores de grau de hidrólise pode ser explicada devido ao efeito do pH na cinética da reação, uma vez que em baixos valores de pH, a atividade enzimática da ProtamexTM é maior. Comparando os ensaios 7 e 8, os resultados similares podem ser explicados devido ao efeito da temperatura na cinética de reação, pois em baixos valores de temperatura a atividade enzimática da ProtamexTM é maior. O ensaio 1 (50°C, 1,5% E/S e pH = 7) apresentou valor de grau de hidrólise maior do que os ensaios 2 (60°C, 1,5% E/S e pH = 7,0) e 5 (50°C, 1,5% E/ e pH = 8,0), indicando novamente que entre os ensaios 1 e 2 a diferença foi causada pelo efeito da temperatura na cinética de reação e entre os ensaios 1 e 5, a diferença pode ser explicada devido ao efeito do pH na cinética da reação. O ensaio 6 (60°C, 1,5% E/S e pH = 8,0) apresentou o menor valor de grau de hidrólise, entre os pontos fatoriais.

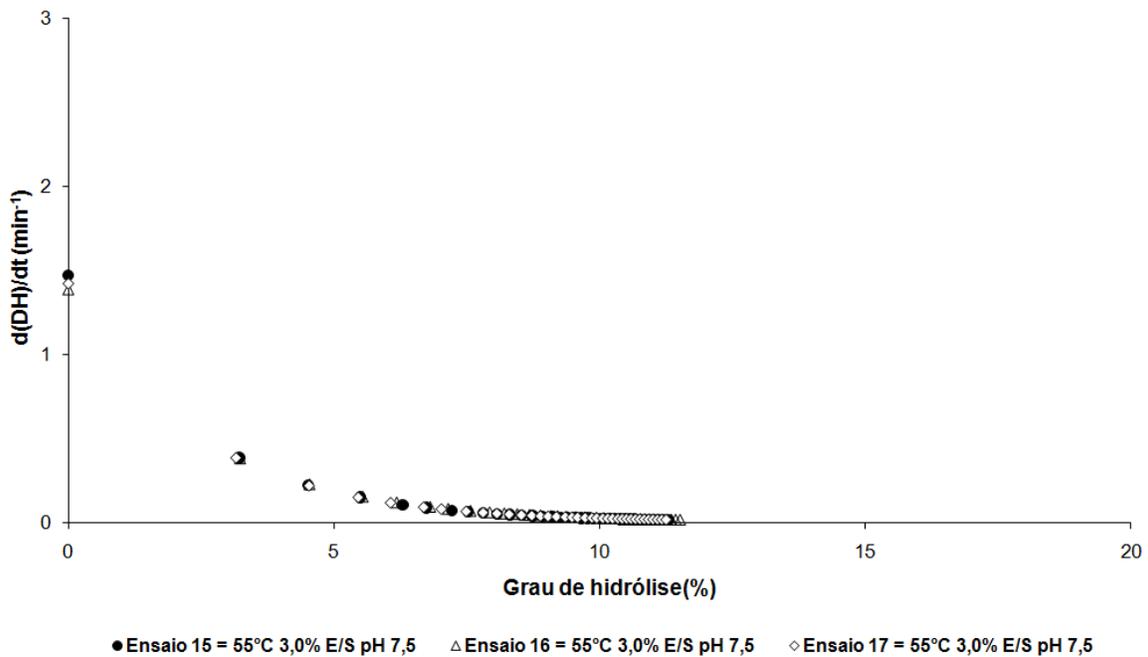
Observou-se que o ponto 13 (55°C, 3% E/S e pH = 7,5), mesmo com menor concentração de enzima, em relação ao ensaio 12 (55°C, 5,52% E/S e pH = 6,7), apresentou maior valor de grau de hidrólise, devido à influência do pH na cinética de reação. Além disso, a sobreposição das curvas de cinética de hidrólise dos pontos centrais, mostrada na Figura 5.1 (c), indica boa reprodutibilidade do processo.

Analisando-se os pontos axiais, o ensaio 9 (46°C, 3,0% E/S e pH = 7,5) apresentou maior valor de grau de hidrólise quando comparado aos ensaios 10 (64°C, 3,0% E/S e pH = 7,5) e 14 (55°C, 3,0% E/S e pH = 8,3). Observando os ensaios 9 e 10, a diferença pode ser explicada devido ao efeito da temperatura na cinética de reação, isto é, um aumento da temperatura levou ao aumento da atividade enzimática da ProtamexTM. Já quando se compara os ensaios 9 e 14, a diferença pode ser atribuída aos efeitos conjuntos do pH e da temperatura na cinética da reação. Já o menor valor de grau de hidrólise foi obtido no ensaio 11 (55°C, 0,48% E/S e pH = 7,5), devido à menor concentração de enzima:substrato de todos os ensaios.

A Figura 5.2, 5.5 e 5.6 apresenta as taxas de reação de hidrólise em função do grau de hidrólise da carne de mexilhão.

Observa-se através da Figura 5.2 que altas taxas de reação foram obtidas no início da proteólise, quando o grau de hidrólise da mistura era menor, ou seja, quando havia maior número de ligações peptídicas disponíveis para a hidrólise, menor concentração de peptídeos solúveis no hidrolisado, competindo com o substrato e ainda não havia inativação da enzima. Já nos estágios intermediários e finais da proteólise, observou-se que a taxa de reação diminuiu com o tempo devido aos fatores citados anteriormente.





(c)

Figura 5.2. Taxa de hidrólise enzimática da carne de mexilhão ($d(GH)/dt$) em função do grau de hidrólise, pontos fatoriais (a), axiais (b) e centrais (c).

5.1.2 Modelagem matemática

A modelagem matemática foi realizada a fim de se predizer a cinética de hidrólise enzimática da carne de mexilhão, utilizando a protease ProtamexTM. Para a obtenção dos parâmetros “a” e “b”, foi feita regressão não-linear na equação cinética (Equação 3.16), usando como método de ajuste o modelo Quasi-Newton, dos dados experimentais de grau de hidrólise com o tempo.

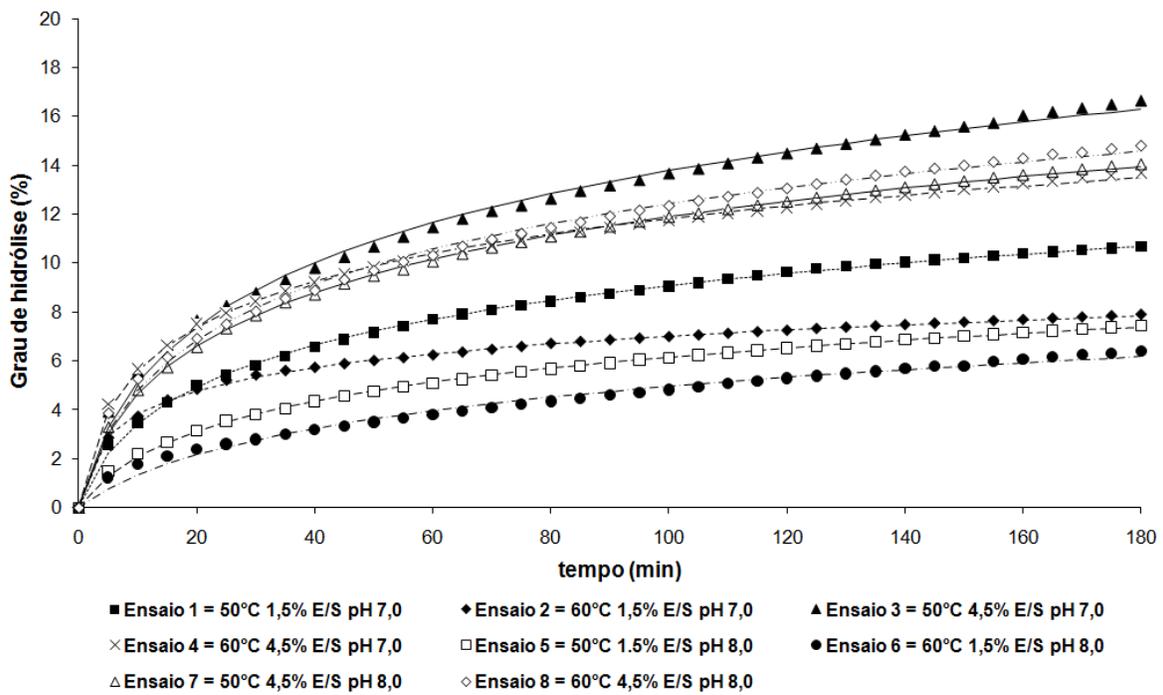
A Tabela 5.2 apresenta os parâmetros “a” e “b” obtidos, bem como os coeficientes de determinação (R^2) e os desvios relativos médios (EM).

Tabela 5.2. Parâmetros de cinética obtidos dos ensaios de hidrólise enzimática de carne de mexilhão.

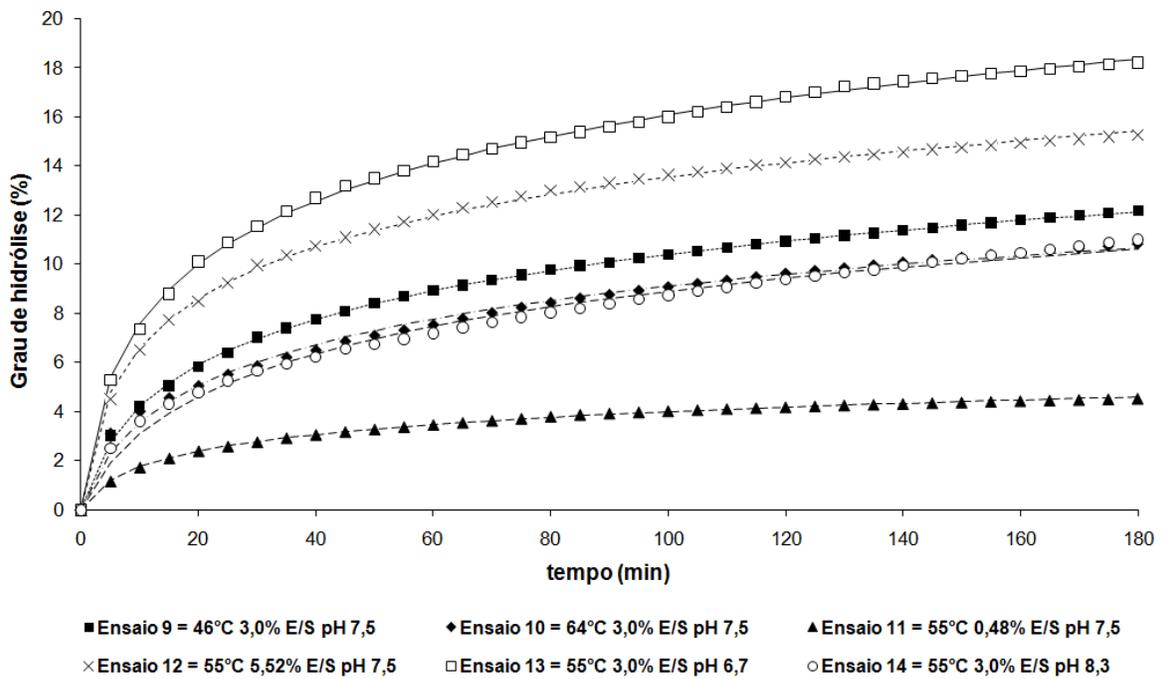
| Ensaio | T (°C) | E/S (%) | pH | a (min ⁻¹) | b | R ² | EM (%) |
|--------|--------|---------|-----|------------------------|------|----------------|--------|
| 1 | 50 | 1,5 | 7,0 | 0,35 | 0,67 | 0,9990 | 1,0 |
| 2 | 60 | 1,5 | 7,0 | 1,96 | 0,70 | 0,9992 | 0,6 |
| 3 | 50 | 4,5 | 7,0 | 0,96 | 0,23 | 0,9964 | 2,0 |
| 4 | 60 | 4,5 | 7,0 | 1,73 | 0,35 | 0,9991 | 0,8 |
| 5 | 50 | 1,5 | 8,0 | 0,35 | 0,46 | 0,9992 | 1,0 |
| 6 | 60 | 1,5 | 8,0 | 0,18 | 0,44 | 0,9875 | 3,7 |
| 7 | 50 | 4,5 | 8,0 | 0,95 | 0,28 | 0,9995 | 0,7 |
| 8 | 60 | 4,5 | 8,0 | 0,96 | 0,26 | 0,9963 | 1,9 |
| 9 | 46 | 3,0 | 7,5 | 0,91 | 0,33 | 0,9997 | 0,5 |
| 10 | 64 | 3,0 | 7,5 | 0,74 | 0,37 | 0,9937 | 2,3 |
| 11 | 55 | 0,48 | 7,5 | 0,47 | 0,96 | 0,9991 | 0,7 |
| 12 | 55 | 5,52 | 7,5 | 2,21 | 0,31 | 0,9992 | 0,7 |
| 13 | 55 | 3,0 | 6,7 | 2,31 | 0,25 | 0,9995 | 0,6 |
| 14 | 55 | 3,0 | 8,3 | 0,54 | 0,33 | 0,9916 | 3,2 |
| 15 | 55 | 3,0 | 7,5 | 1,47 | 0,42 | 0,9994 | 0,7 |
| 16 | 55 | 3,0 | 7,5 | 1,39 | 0,40 | 0,9996 | 0,5 |
| 17 | 55 | 3,0 | 7,5 | 1,42 | 0,42 | 0,9995 | 0,7 |

Onde: T = temperatura da reação; E/S = concentração enzima:substrato; a, b = parâmetros cinéticos da reação; R² = coeficientes de determinação e EM = desvio relativo médio.

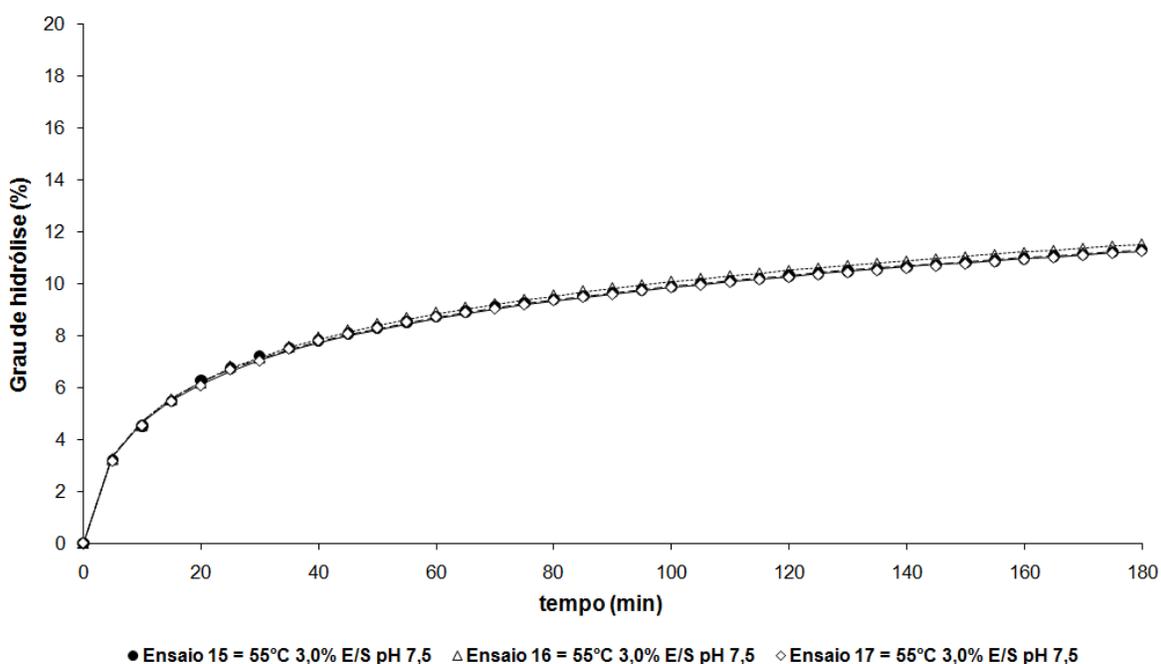
Observando-se os coeficientes de determinação, juntamente com os valores dos desvios relativos médios mostrados na Tabela 5.2, conclui-se que os dados experimentais apresentaram bons ajustes ao modelo cinético de hidrólise utilizado, com valores de R² superiores a 0,994 e de desvio relativo médio inferior a 4%, valores aceitáveis para fins preditivos. Verifica-se que o valor do parâmetro “a” variou de 0,18 a 2,31 e do parâmetro “b” de 0,23 a 0,96. Na Figura 5.3 estão apresentados os resultados experimentais dos pontos fatoriais, axiais e centrais, respectivamente, e as curvas do modelo obtido. Pode-se observar excelente ajuste dos dados de cinética de hidrólise ao modelo empírico utilizado, que como já dito anteriormente, pode ser utilizado para diferentes tipos de substratos, enzimas, condições e mecanismos de reação de hidrólise.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.3. Ajuste da equação de cinética aos dados experimentais de hidrólise enzimática de carne de mexilhão, onde os pontos representam os dados observados e a curva, o modelo obtido, pontos fatoriais (a), axiais (b) e centrais (c).

5.1.3 Planejamento experimental da hidrólise enzimática, avaliação dos parâmetros cinéticos da reação

Para avaliar a influência da temperatura (T), da concentração enzima:substrato (E/S) e do pH sobre os parâmetros cinéticos da hidrólise enzimática da carne de mexilhão, foi utilizado um delineamento composto central rotacional 2^3 , com 3 pontos centrais (nível 0), além dos pontos axiais (níveis $\pm \alpha$), como apresentado no item 4.2.3.

(a) Parâmetro cinético “a”

Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e das interações sobre o parâmetro “a” estão apresentados na Tabela 5.3, onde os valores em negrito são significativos a 90% de confiança ($p \leq 0,10$).

Tabela 5.3. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator do modelo codificado para o parâmetro “a”.

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|----------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| Média | 1,443 | 0,231 | 6,244 | <0,0001 |
| T (L) | 0,284 | 0,217 | 1,305 | 0,233 |
| T (Q) | -0,539 | 0,239 | -2,252 | 0,059 |
| E/S (L) | 0,686 | 0,217 | 3,160 | 0,016 |
| E/S (Q) | -0,174 | 0,239 | -0,727 | 0,491 |
| pH (L) | -0,811 | 0,217 | -3,734 | 0,007 |
| pH (Q) | -0,114 | 0,239 | -0,475 | 0,649 |
| T x E/S | -0,165 | 0,284 | -0,582 | 0,579 |
| T x pH | -0,635 | 0,284 | -2,238 | 0,060 |
| E/S x pH | 0,250 | 0,284 | 0,881 | 0,407 |

Analisando-se a Tabela 5.3 observou-se efeito positivo dos fatores T (Q), E/S (L), pH (L) e T x pH sobre o parâmetro “a”, ao nível de confiança de 90%. Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 90%, através de análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F.

Tabela 5.4. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta “a”.

| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F_{calculado} | F_{tabelado} |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Regressão | 5,39 | 4 | 1,35 | 9,63 | 2,48 |
| Resíduos | 1,68 | 12 | 0,14 | | |
| Falta de Ajuste | 1,67 | 10 | 0,17 | 59,72 | 9,39 |
| Erro Puro | 0,003 | 2 | 0,002 | | |
| Total | 7,06 | 16 | | | |
| R ² | 0,762 | | | | |

O coeficiente de determinação para o modelo ajustado foi de 0,762 para o parâmetro “a”, indicando que o modelo obtido explica 76,2% da variação dos dados observados.

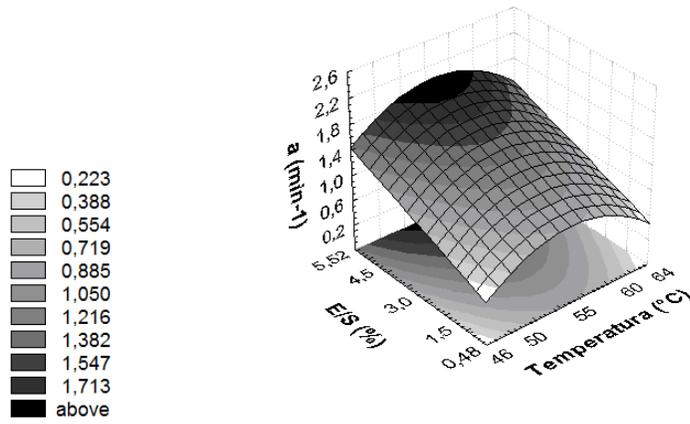
Sendo assim, o modelo codificado ajustado para o parâmetro “a” é dado por:

$$a(\text{min}^{-1}) = 1,302 - 0,237 \cdot T^2 + 0,343 \cdot E/S - 0,406 \cdot pH - 0,318 \cdot T \cdot pH \quad (5.1)$$

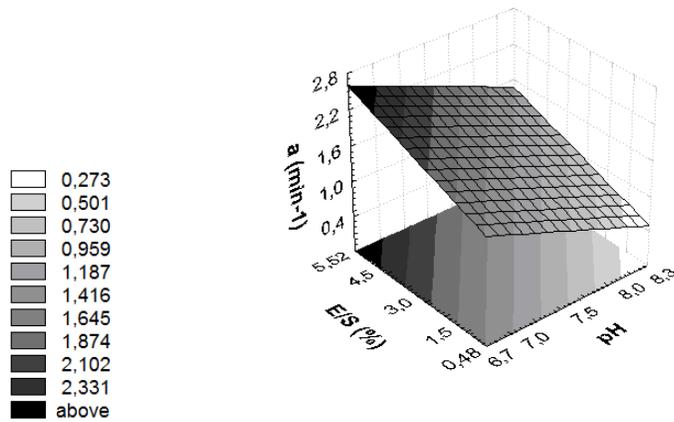
Onde: “a” (min^{-1}) parâmetro do modelo cinético; E/S é a concentração enzima:substrato (codificada); pH é o pH (codificado) e T é a temperatura (codificada).

Na Figura 5.4, são mostradas as superfícies de resposta geradas através do modelo proposto para o parâmetro “a”. Essas figuras expressam a interação entre duas variáveis independentes sobre a resposta, sendo que a terceira variável foi mantida no ponto central do planejamento.

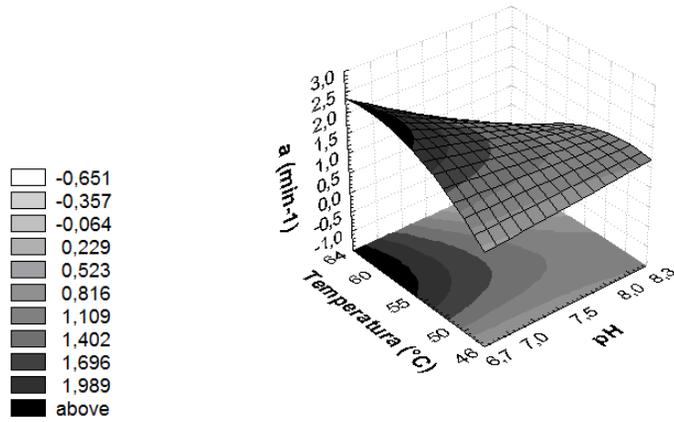
A Figura 5.4 mostra que o aumento na concentração enzima:substrato, em baixos valores de pH, levou ao aumento no parâmetro “a”, isso por ser ele dependente da quantidade inicial de enzima (e_0), como apresentado na Equação 3.14. Pode-se observar também a influência da temperatura sobre a reação de proteólise, onde é observado o aumento do parâmetro “a” com o aumento da temperatura, em baixos valores de pH, sendo o parâmetro diretamente proporcional à taxa de reação constante para a proteólise, de acordo com a Tabela 3.3. A influência da temperatura pode ser explicada pelas condições iniciais de reação, onde altas temperaturas aumentam a taxa de hidrólise, devido ao aumento da energia cinética do sistema. Márquez e Vázquez (1999), estudando a hidrólise enzimática de hemoglobina, com Alcalase[®], também observaram aumento do parâmetro “a”, com o aumento da temperatura. Além disso, observou-se o efeito do pH sobre a reação de proteólise, isto é, maiores valores do parâmetro “a” foram obtidos nos menores valores de pH, devido à faixa ótima de atividade da enzima ProtamexTM, que se situa entre 6,0 e 7,5.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.4. Influência das variáveis independentes sobre o parâmetro “a”, onde: (a) pH = 7,5; (b) T = 55°C e (c) E/S = 3%.

(b) *Parâmetro cinético b*

Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e das interações sobre o parâmetro “b” estão apresentados na Tabela 5.5, onde os valores em negrito são significativos a 90% de confiança ($p \leq 0,10$).

Tabela 5.5. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para o parâmetro “b”.

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|----------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| Média | 0,413 | 0,041 | 10,171 | < 0,0001 |
| T (L) | 0,026 | 0,038 | 0,680 | 0,518 |
| T (Q) | -0,046 | 0,042 | -1,087 | 0,313 |
| E/S (L) | -0,329 | 0,038 | -8,602 | < 0,0001 |
| E/S (Q) | 0,156 | 0,042 | 3,711 | 0,008 |
| pH (L) | -0,055 | 0,038 | -1,441 | 0,193 |
| pH (Q) | -0,088 | 0,042 | -2,098 | 0,074 |
| T x E/S | 0,023 | 0,050 | 0,451 | 0,666 |
| T x pH | -0,048 | 0,050 | -0,952 | 0,373 |
| E/S x pH | 0,108 | 0,050 | 2,155 | 0,068 |

O fator E/S (Q) apresentou efeito positivo enquanto os fatores E/S (L), pH (Q) e a interação T x pH apresentaram efeito negativo sobre o parâmetro “b”, ao nível de confiança de 90%. Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 90%, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F.

Tabela 5.6. Análise de variância do modelo ajustado para o parâmetro “b”.

| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F_{calculado} | F_{tabelado} |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Regressão | 0,522 | 4 | 0,130 | 26,58 | 2,49 |
| Resíduos | 0,059 | 12 | 0,005 | | |
| Falta de Ajuste | 0,059 | 10 | 0,006 | 1705,40 | 9,39 |
| Erro Puro | 0,0003 | 2 | 0,0001 | | |
| Total | 0,581 | 16 | | | |
| R ² | 0,899 | | | | |

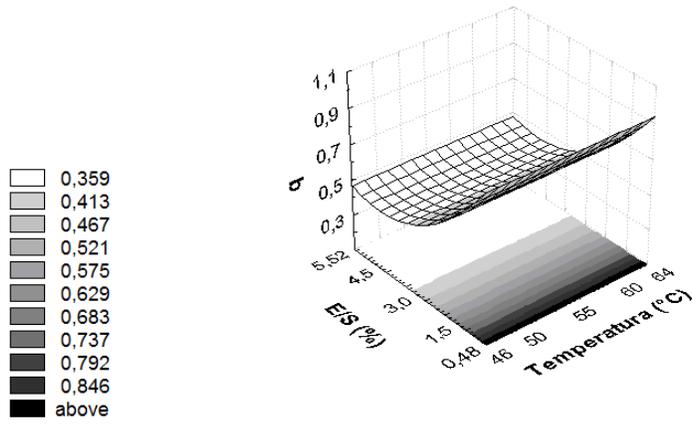
O coeficiente de determinação para o modelo ajustado foi de 0,899 para o parâmetro b , indicando que o modelo obtido explica 89,9% da variação dos dados observados para o parâmetro “ b ”. Sendo assim, o modelo codificado ajustado para o parâmetro “ b ” é dado por:

$$b = 0,384 - 0,164 \cdot E/S + 0,085 \cdot E/S^2 - 0,037 \cdot pH^2 + 0,054 \cdot T \cdot pH \quad (5.2)$$

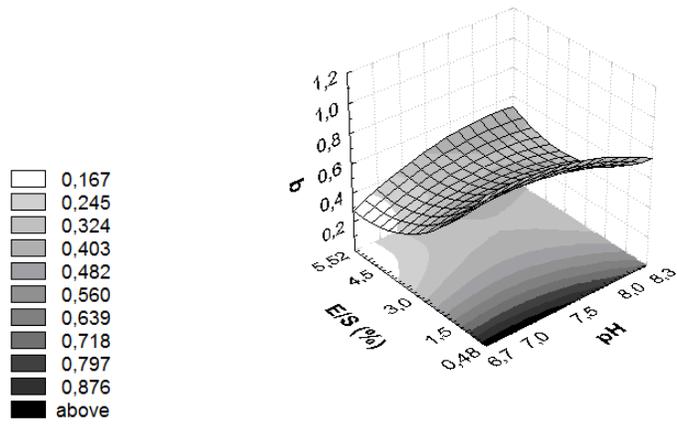
Onde: “ b ” (adimensional) é o parâmetro do modelo cinético; E/S é a concentração enzima:substrato (codificada); pH é o pH (codificado) e T é a temperatura (codificada).

Na Figura 5.5 estão apresentadas as superfícies de resposta geradas através do modelo proposto para o parâmetro “ b ”. Essas figuras expressam a interação entre duas variáveis independentes sobre a resposta, sendo que a terceira variável foi mantida no ponto central do planejamento.

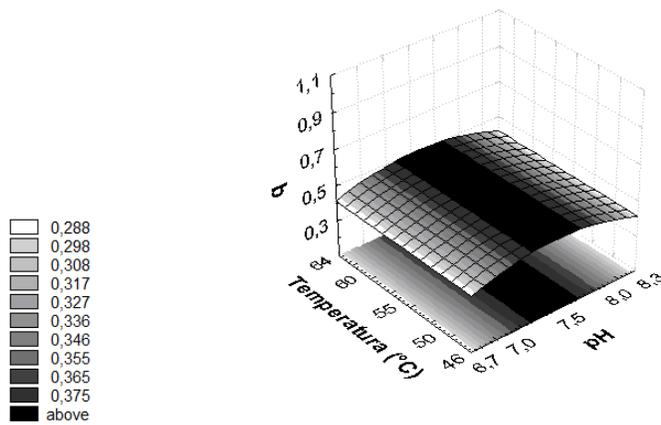
Na Figura 5.5 pode ser observado comportamento oposto ao encontrado para o parâmetro “ a ” em relação à concentração enzima:substrato. Quando há o aumento da concentração enzima:substrato, ocorrerá o aumento da constante da taxa de reação de proteólise porque há mais sítios ativos disponíveis para o substrato reagir. A constante da taxa de reação de proteólise é diretamente proporcional ao parâmetro “ a ” e inversamente proporcional ao parâmetro “ b ”, de acordo com a Tabela 3.3, o que indica que o aumento da concentração enzima:substrato diminui o valor do parâmetro “ b ”. Pode ser ainda observado o aumento nos valores de “ b ” na faixa de pH de 7,0 a 7,5. Esse resultado estaria relacionado com as condições ótimas de atividade da ProtamexTM, fornecidas pelo fabricante, de 6,0 a 7,5 para o pH e de 50 a 55°C para a temperatura. Márquez e Vázquez (1999) estudando a hidrólise enzimática de hemoglobina, com Alcalase[®], observaram que não houve influência da variação da quantidade inicial de enzima ou de substrato no valor do parâmetro “ b ”, o qual apresentou um valor constante, contudo, houve uma diminuição desse parâmetro com o aumento da temperatura.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.5. Influência das variáveis independentes sobre o parâmetro “b”, onde: (a) pH = 7,5; (b) T = 55°C e (c) E/S = 3%.

No presente estudo, o valor de “a” variou de 0,18 a 2,31 min⁻¹ e o de “b” de 0,23 a 0,96. González-Tello et al. (1994) estudaram a hidrólise enzimática de lactoalbumina, com proteases de origem bacteriana e uma de origem animal, a 50°C e pH de 8,0. Os valores de “b” se mantiveram constantes, com valores médios de 0,26, 0,33 e 0,49, para as duas proteases de origem bacteriana MKC Protease 660 L e para a protease de origem animal PEM 2500 S. Por outro lado, observaram o aumento do parâmetro “a” com a elevação da concentração inicial de enzima e com a diminuição da concentração inicial de substrato, obtendo valores de “a” de 0,58 a 2,86 min⁻¹.

Márquez e Vásquez (1999), estudando a cinética enzimática de hemoglobina, utilizando Alcalase[®], a 55°C e pH 7,0, observaram que parâmetro “b” apresentou-se constante nas condições de reação utilizadas, com o valor médio de 0,12. O parâmetro “a” diminuiu com o aumento da concentração inicial de substrato, variando de 0,27 a 1,70 min⁻¹. Com o aumento da concentração inicial da enzima, o parâmetro “a” variou de 0,46 a 1,59 min⁻¹. Em relação à temperatura, o aumento dessa variável levou à diminuição do parâmetro “b” (0,22 a 0,12) e ao aumento do valor de “a” (0,56 a 0,63 min⁻¹).

Moreno e Cuadrado (1993) estudaram a cinética da hidrólise enzimática de farinha de grão de bico, utilizando Alcalase[®], 50°C e pH 8,0. O parâmetro “a” apresentou forte dependência da concentração inicial da enzima e da concentração inicial de substrato; o parâmetro “b” foi considerado constante nas condições operacionais, com valor médio de 0,22.

Kurozawa, Park e Hubinger (2008) estudaram a hidrólise enzimática de peito de frango, com Alcalase[®], usando um planejamento experimental e considerando como variáveis independentes a temperatura (43 a 77°C), a razão enzima:substrato (0,8 a 4,2%) e o pH (7,16 a 8,84). O parâmetro “a” aumentou com a elevação da temperatura e da concentração enzima:substrato, variando de 77 a 26.914,4 min⁻¹; já o parâmetro “b” aumentou somente com o aumento da temperatura e os valores variaram de 0,12 a 3,22, sendo que o pH influenciou ambos os parâmetros.

Embora a equação da cinética proposta seja a mesma para todos os casos, o mecanismo de reação pode ser diferente quando algum substrato ou produto de inibição é

formado, como para o grão de bico e a proteína de soro de leite (MÁRQUEZ; FERNÁNDEZ, 1993; TARDIOLI et al., 2005).

Do ponto de vista de projeto e operação de reatores, a principal vantagem do uso de enzimas livres, nos processos de hidrólise de proteínas, é que elas são solúveis em solução aquosa ou no meio de reação. A configuração deste tipo de equipamento é de um reator homogêneo operando em batelada, com tanque de agitação provido de controles de pH e temperatura. A agitação auxilia a dissolução inicial das enzimas e reduz qualquer variação na concentração, temperatura e pH dentro do reator. Na ausência do volume do reator, todo o processo é baseado na taxa de reação e a relação entre os parâmetros cinéticos e a velocidade de reação pode ser expressa pela Equação 5.3, que estima a taxa de reação para concentração inicial de substrato de 50 g de proteína / L e faixa de valores de concentração enzima:substrato de 0,48 a 5,52%.

$$r = S_0 \cdot a \cdot \exp(-b \cdot DH) \quad (5.3)$$

Onde: r é a velocidade da reação ($\text{g L}^{-1} \text{min}^{-1}$); DH é o grau de hidrólise (%); a (min^{-1}) and b são os parâmetros cinéticos e S_0 é a concentração inicial de substrato (g L^{-1}).

(c) Estudo do mecanismo de reação

Para estudar o mecanismo de reação da hidrólise enzimática da carne de mexilhão, usando a enzima ProtamexTM, foram realizados alguns experimentos adicionais, usando diferentes concentrações iniciais de substrato ($S_0 = 12,5, 25$ e 50 g/L), de enzima ($e_0 = 0,48, 1, 1,5, 3$ e $5,52\%$) e temperaturas de reação ($45, 50, 55, 60$ e 65°C), respectivamente, apresentados nas Figuras 5.6 a 5.11.

Analisando-se as Figuras 5.6, 5.7 e 5.8, observou-se que o valor de grau de hidrólise aumenta com o tempo, nos estágios iniciais da reação e então tende a um valor constante, que é diretamente proporcional à concentração inicial de enzima e_0 e à concentração inicial de substrato S_0 , sendo que a taxa de reação ($d \text{ GH}/dt$) diminui com o tempo, especificamente após 20 min de reação. Como na maioria dos processos enzimáticos,

existem 3 causas possíveis: diminuição da concentração das ligações peptídicas, inibição pelo produto ou pelo substrato e inativação da enzima.

Analisando as possíveis causas, observou-se que houve diminuição da concentração das ligações peptídicas, uma vez que os valores de grau de hidrólise, na mesma concentração inicial de substrato a diferentes concentrações iniciais de enzima, tenderam a limites diferentes, atingindo o valor máximo de 15%, para a maior concentração inicial de enzima:substrato (Figura 5.6), sendo que existe correlação linear entre a concentração enzima:substrato e o grau de hidrólise final ($R^2 = 0,958$). Além disso, a adição de substrato *in natura*, correspondente ao valor de 20% da massa inicial de substrato, depois de 40 min de reação, aumentou o valor do grau de hidrólise instantaneamente, indicando a existência de enzima ativa, o que elevou o grau de hidrólise final para 12,5% (Figura 5.9). Dessa forma, pode-se considerar a concentração de ligações peptídicas um fator importante na taxa de reação.

Nas concentrações de substrato avaliadas (12,5, 25 e 50 g/L) não foi observada inibição pelo substrato, uma vez que o aumento na concentração de substrato levou ao aumento na taxa de reação (Figura 5.7); contudo, existe um valor de concentração de substrato limitante na taxa de reação de hidrólise e a partir desse valor ótimo, o substrato irá combinar irreversivelmente com a enzima, apresentando efeito de inibição.

Para avaliar a possibilidade de inativação da enzima, foi adicionada enzima nova, em quantidade de 100% do valor inicial, após 40 min de reação, o que levou ao aumento imediato do valor do grau de hidrólise, atingindo o valor final de 14% (Figura 5.17). Esse aumento do valor do grau de hidrólise pode ser atribuído a inativação enzimática anterior, além de demonstrar que há suficiente substrato no sistema. Além disso, de modo a determinar a ordem da reação de inativação enzimática, é necessário examinar a relação entre $e_0 \times t$ (concentração inicial de enzima \times tempo) e o grau de hidrólise (Figura 5.10). Observou-se que as curvas que apresentaram a mesma concentração inicial de substrato (S_0), porém com diferentes concentrações iniciais de enzima (e_0) seguiram diferentes relações com o tempo, para concentrações de enzima:substrato acima de 1%. Abaixo da concentração inicial de enzima: substrato de 1%, as curvas se sobrepuseram e isso pode ser devido a inativação de segunda ordem da enzima. Na Figura 5.11, observou-se ainda que

houve mudança na curvatura da curva de cinética de grau de hidrólise, nas temperaturas de 60 e 65°C, o que indica desnaturação enzimática acima de 55°C, em conformidade, com a faixa de temperatura de atividade ótima da ProtamexTM, fornecida pelo fabricante, que é de 50 a 55°C.

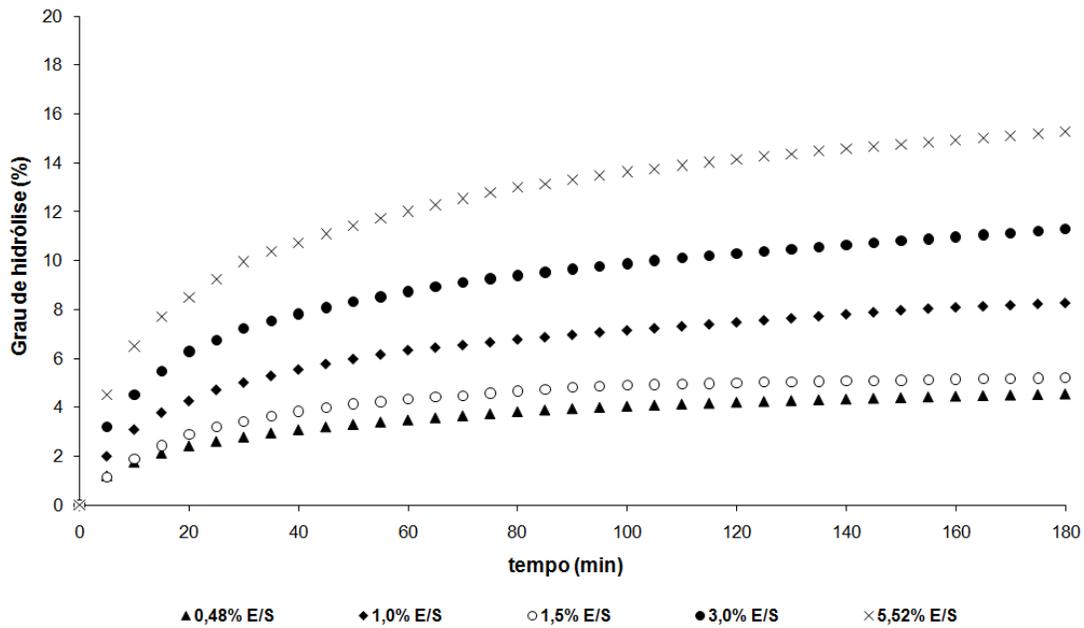


Figura 5.6. Influência da concentração inicial de enzima sobre o grau de hidrólise, a T = 55°C e pH = 7,5.

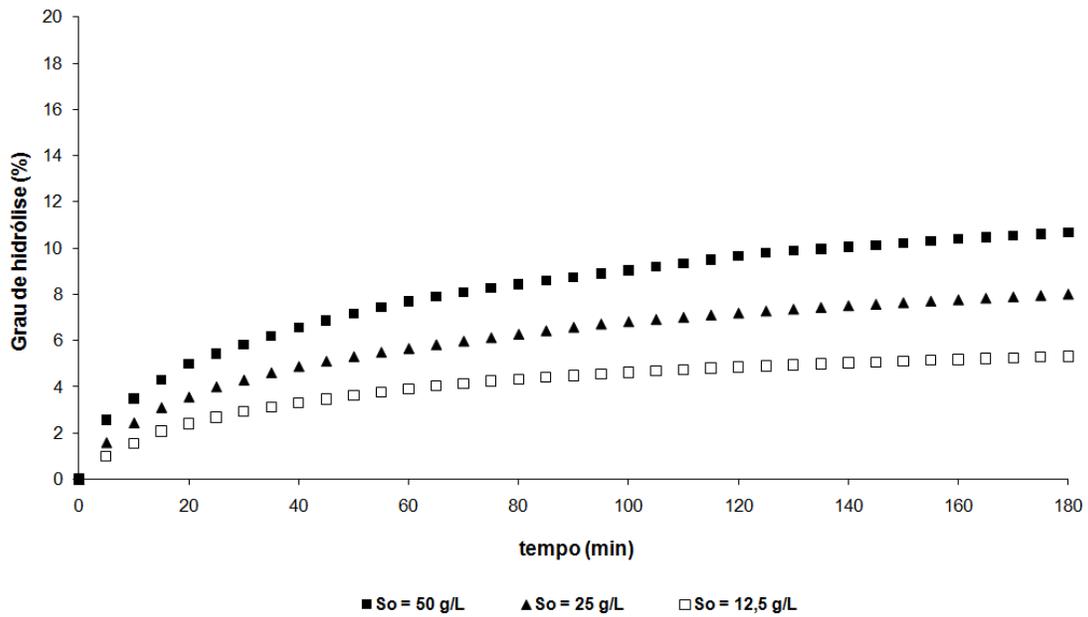


Figura 5.7. Influência da concentração inicial de substrato sobre o grau de hidrólise, a $T = 50^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 7,0$.

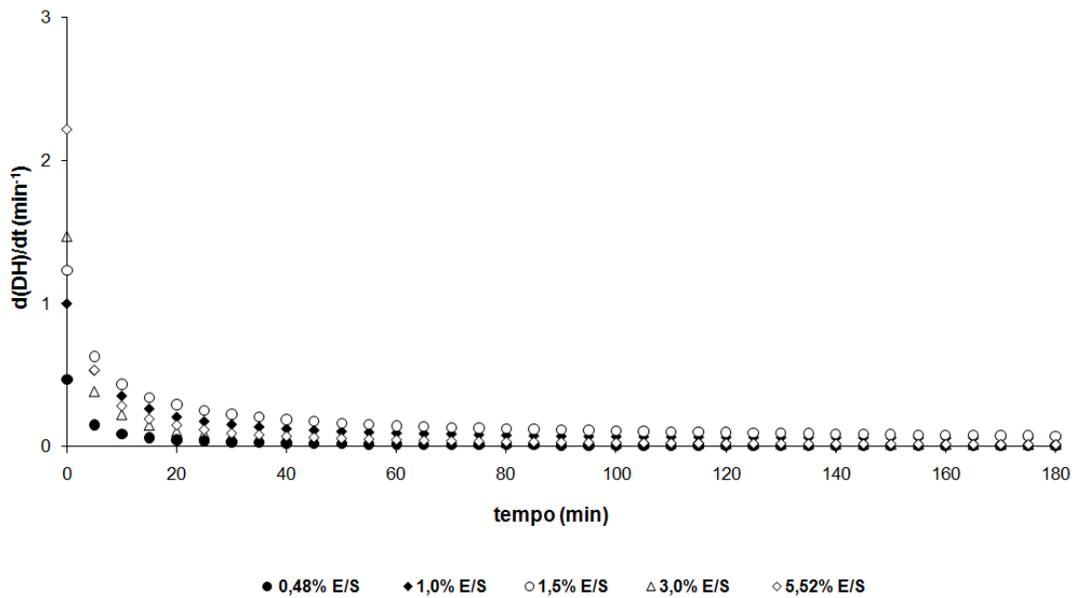


Figura 5.8. Influência da concentração inicial de enzima sobre a taxa de reação de hidrólise, a $T = 55^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 7,5$.

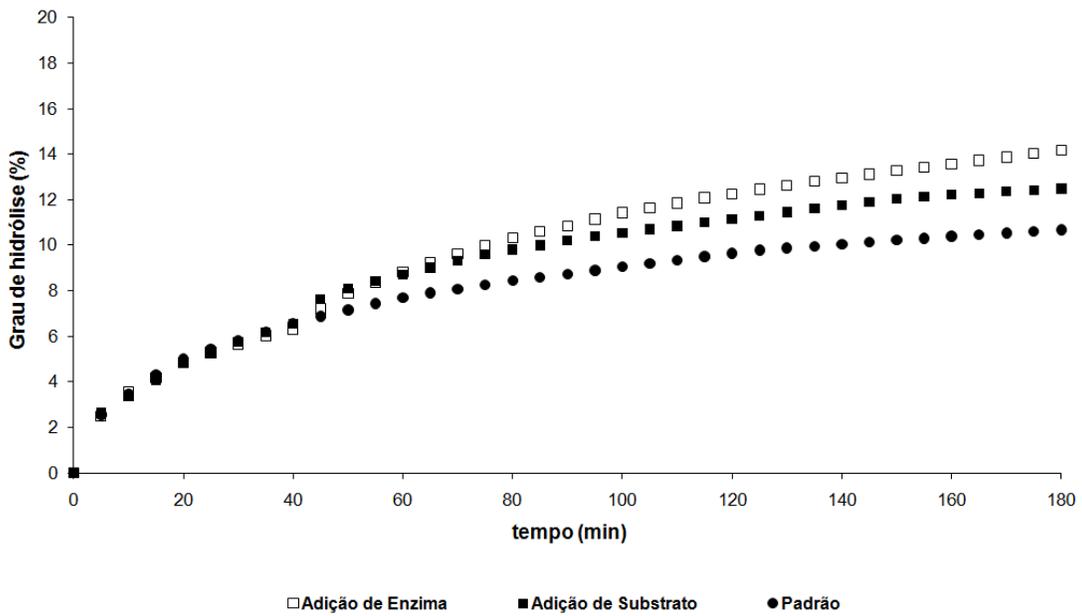


Figura 5.9. Influência da adição de substrato e enzima frescos sobre o grau de hidrólise, a $T = 50^{\circ}\text{C}$, $E/S = 1,5\%$ e $\text{pH} = 7,0$.

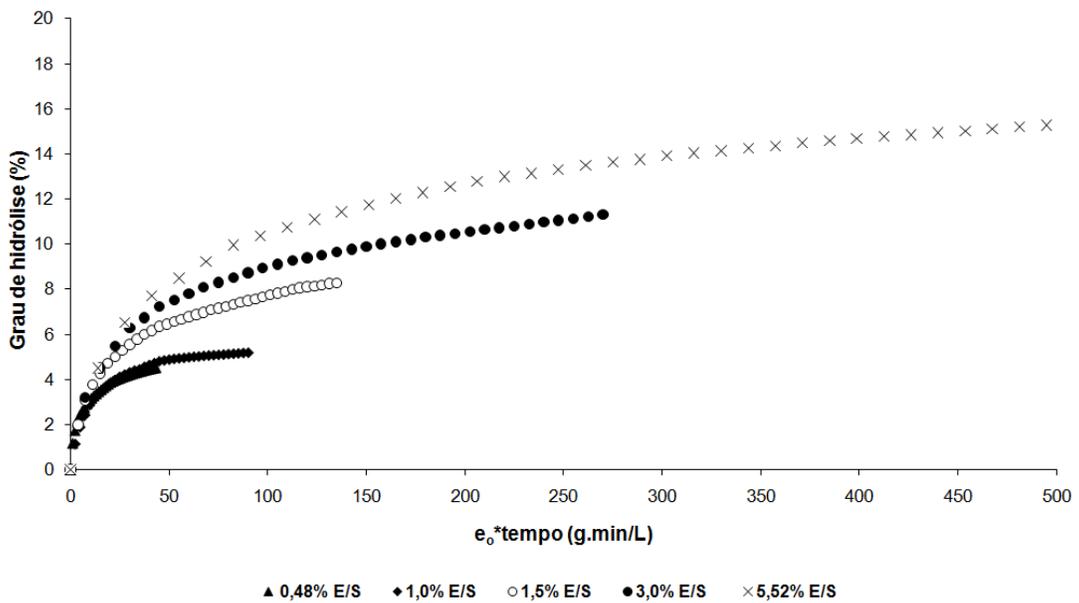


Figura 5.10. Influência da concentração inicial de enzima pelo tempo sobre o grau de hidrólise, a $T = 55^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 7,5$.

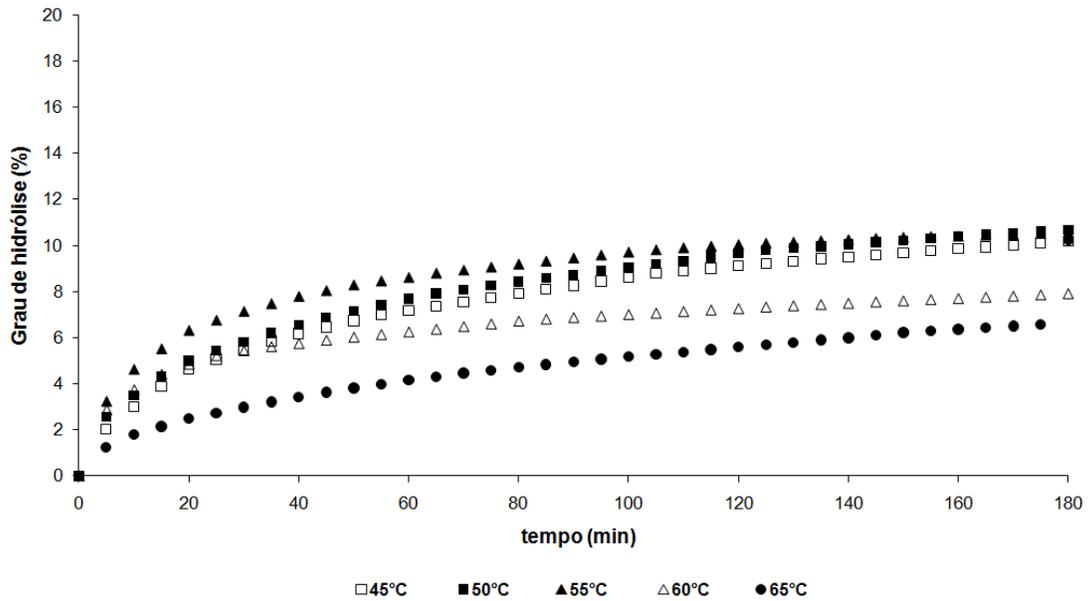


Figura 5.11. Influência da temperatura de reação sobre o grau de hidrólise, a 1,5% E/S e pH = 7,0.

Foram ainda calculadas as constantes termodinâmicas: Energia de Ativação da Hidrólise (E_A) e a Energia de Inativação Enzimática (E_D). O conhecimento dessas constantes facilita o cálculo, em termos de quantidade de energia, para que ocorra uma transformação enzimática que resulte no rendimento desejado de um produto, ou para diminuir ou inibir uma transformação indesejável. Para isso foram fixadas as condições de reação de concentração inicial de substrato, concentração inicial de enzima:substrato e pH em, 50 g/L, 1,5% E/S e pH = 7,0, respectivamente. As mudanças nos parâmetros “a” e “b” devido a variação da temperatura seguem a Equação de Arrhenius dada por:

$$\ln a = -\frac{E_A}{RT} + A_a \quad (5.4)$$

$$\ln(a \cdot b) = -\frac{E_D}{RT} + A_d \quad (5.5)$$

Onde: “a” (min^{-1}) e “b” = parâmetros cinéticos; E_A = Energia de Ativação da Hidrólise (kJ/mol); E_D = Energia de Inativação Enzimática (kJ/mol); R = Constante

universal dos gases (8,314 J/mol K); T = Temperatura (K); A_a = fator de frequência (adimensional) e A_d = fator de frequência (adimensional).

Os valores de E_A e E_D foram obtidos através da inclinação das curvas de $\ln a$ vs $1/T$ e $\ln(ab)$ vs $1/T$ (Figuras 5.12 e 5.13), com coeficientes de determinação de 0,648 e 0,920, respectivamente. Os valores de E_A e de E_D foram de 95.760 J/mol e de 126.340 J/mol, respectivamente. Márquez e Vásquez (1999) encontraram valores de E_A de 4.938 J/mol e de E_D de 25.353 J/mol, para a hidrólise enzimática de hemoglobina usando como enzima a Alcalase[®]. Wei e Zhimin (2006) encontraram valores de E_A de 64.826 J/mol e de E_D de 80.031 J/mol, para a hidrólise enzimática de albumina de soro bovino usando a tripsina, como enzima. Adler-Nissen (1986) cita valores médios de 50.000 J/mol e de 270.000 J/mol para E_A e E_D , respectivamente, para a hidrólise enzimática de caseína e de isolado protéico de soja, usando como enzima a Alcalase[®]. As diferenças entre as constantes termodinâmicas obtidas para a hidrólise enzimática da caseína e do isolado protéico de soja e dos outros trabalhos podem ser explicadas por algumas diferenças experimentais como tipo de substrato, saturação da enzima com o substrato ($S_0 = 8\%$), uso de pH elevado (pH > 8,0), além da suposição de possível reação de inativação de primeira ordem.

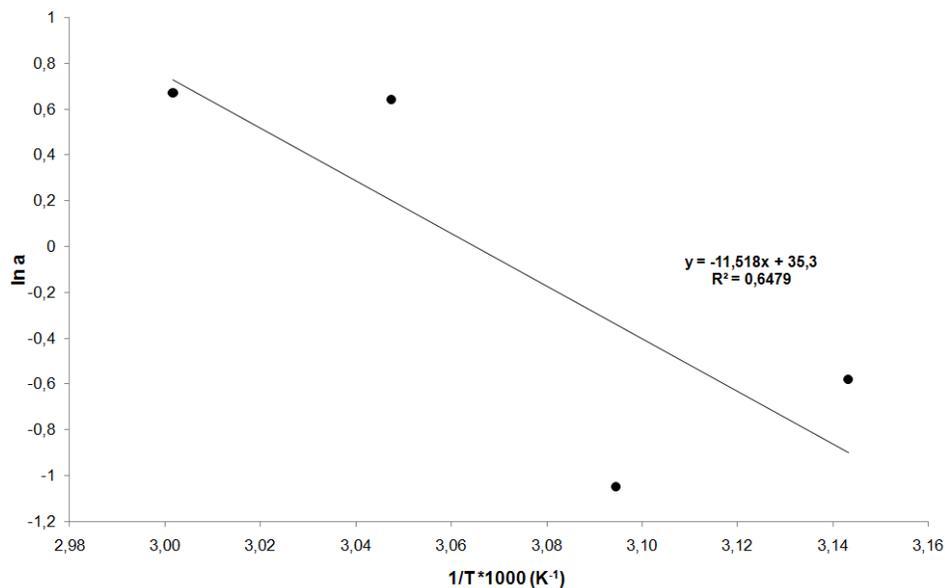


Figura 5.12. Curva $\ln a$ vs $1/T$ para determinação da Energia de Ativação da Hidrólise.

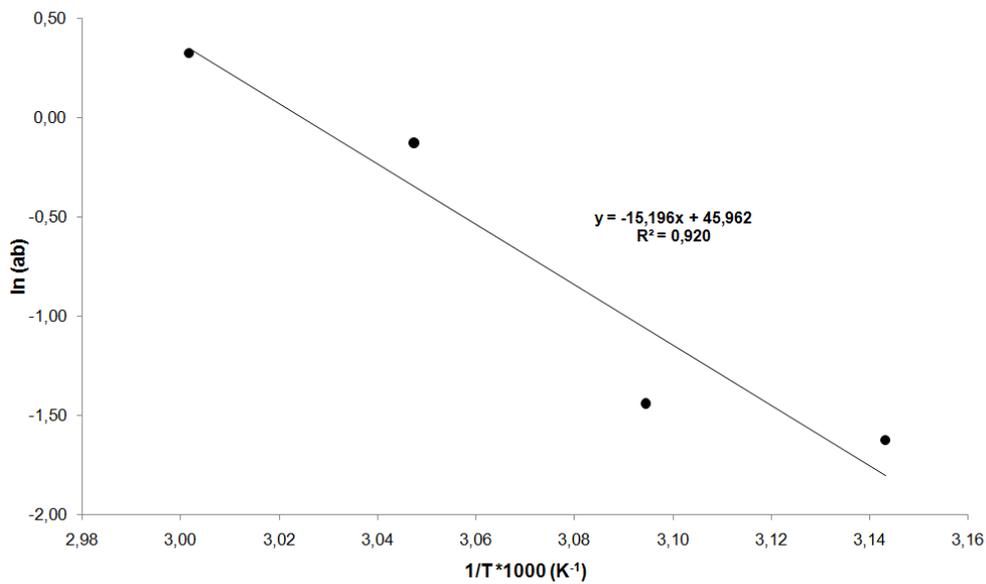


Figura 5.13. Curva $\ln(a.b)$ vs $1/T$ para determinação da Energia de Inativação Enzimática.

5.1.4 Planejamento experimental da hidrólise enzimática: Avaliação do grau de hidrólise e da recuperação de proteína

Na Tabela 5.7, estão apresentados os resultados experimentais encontrados para o grau de hidrólise e para a recuperação de proteína.

Conforme as condições utilizadas no processo apresentadas na Tabela 5.7, os valores do grau de hidrólise variaram de 4,54 a 18,22% e de recuperação de proteína de 35,47 a 68,83%. Os pontos centrais para todas as respostas apresentaram variação menor do que 9%, indicando boa reprodutibilidade do processo.

Tabela 5.7. Resultados experimentais de grau de hidrólise (% GH) e de recuperação de proteína (% RP) de acordo com o planejamento experimental.

| Ensaio | Variáveis Independentes | | | | | | Respostas | |
|--------|-------------------------|---------|-----|------------|-------|-------|-----------|-------|
| | Real | | | Codificado | | | GH (%) | RP(%) |
| | T (°C) | E/S (%) | pH | T | E/S | pH | | |
| 1 | 50 | 1,5 | 7 | -1 | -1 | -1 | 10,68 | 47,31 |
| 2 | 60 | 1,5 | 7 | 1 | -1 | -1 | 7,89 | 43,25 |
| 3 | 50 | 4,5 | 7 | -1 | 1 | -1 | 16,65 | 66,47 |
| 4 | 60 | 4,5 | 7 | 1 | 1 | -1 | 13,71 | 62,6 |
| 5 | 50 | 1,5 | 8 | -1 | -1 | 1 | 7,45 | 50,24 |
| 6 | 60 | 1,5 | 8 | 1 | -1 | 1 | 6,42 | 49,89 |
| 7 | 50 | 4,5 | 8 | -1 | 1 | 1 | 14,04 | 65,85 |
| 8 | 60 | 4,5 | 8 | 1 | 1 | 1 | 14,81 | 65,67 |
| 9 | 46 | 3 | 7,5 | -1,68 | 0 | 0 | 12,19 | 59,21 |
| 10 | 64 | 3 | 7,5 | 1,68 | 0 | 0 | 10,83 | 58,28 |
| 11 | 55 | 0,48 | 7,5 | 0 | -1,68 | 0 | 4,54 | 35,47 |
| 12 | 55 | 5,52 | 7,5 | 0 | 1,68 | 0 | 15,28 | 68,83 |
| 13 | 55 | 3 | 6,7 | 0 | 0 | -1,68 | 18,22 | 58,58 |
| 14 | 55 | 3 | 8,3 | 0 | 0 | 1,68 | 11,01 | 61,34 |
| 15 | 55 | 3 | 7,5 | 0 | 0 | 0 | 11,30 | 53,34 |
| 16 | 55 | 3 | 7,5 | 0 | 0 | 0 | 11,52 | 58,04 |
| 17 | 55 | 3 | 7,5 | 0 | 0 | 0 | 11,26 | 55,07 |

Onde: T = temperatura da reação; E/S = concentração enzima:substrato; GH = grau de hidrólise e RP = recuperação de proteína.

(a) *Grau de hidrólise*

Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e das interações sobre o grau de hidrólise estão apresentados na Tabela 5.8, onde os valores em negrito são significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Através da Tabela 5.8, para a resposta grau de hidrólise, observa-se que os fatores E/S (L) e pH (Q) apresentaram efeito positivo no grau de hidrólise, ou seja, o aumento de E/S elevou o valor do grau de hidrólise. O fator pH (L) apresentou efeito negativo sobre a resposta, ou seja, aumento nesse fator causou diminuição no grau de hidrólise. Observou-se ainda que os fatores T (L), T (Q) e E/S (Q), e as interações entre as variáveis T x E/S, T x pH e E/S x pH foram consideradas como não estatisticamente significativas na resposta grau de hidrólise, ao nível de significância de 5%.

Tabela 5.8. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta grau de hidrólise.

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|----------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| Média | 11,400 | 0,628 | 18,150 | < 0,0001 |
| T (L) | -1,213 | 0,590 | -2,055 | 0,079 |
| T (Q) | -0,160 | 0,650 | -0,246 | 0,813 |
| E/S (L) | 6,569 | 0,590 | 11,128 | < 0,0001 |
| E/S (Q) | -1,294 | 0,650 | -1,989 | 0,087 |
| pH (L) | -2,686 | 0,590 | -4,550 | 0,003 |
| pH (Q) | 2,040 | 0,650 | 3,138 | 0,016 |
| T x E/S | 0,413 | 0,771 | 0,535 | 0,609 |
| T x pH | 1,368 | 0,771 | 1,774 | 0,119 |
| E/S x pH | 0,798 | 0,771 | 1,035 | 0,335 |

Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 95%, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F. Na Tabela 5.9 encontram-se os valores calculados e tabelados de F.

Tabela 5.9. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta grau de hidrólise.

| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F_{calculado} | F_{tabelado} |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Regressão | 190,02 | 3 | 63,34 | 34,98 | 3,41 |
| Resíduos | 23,54 | 13 | 1,81 | | |
| Falta de Ajuste | 23,50 | 11 | 2,14 | 5,15 | 19,40 |
| Erro Puro | 0,04 | 2 | 0,02 | | |
| Total | 213,57 | 16 | | | |
| R ² | 0,890 | | | | |

O coeficiente de determinação para o modelo ajustado foi de 0,890 para o grau de hidrólise, indicando que o modelo obtido explica 89% da variação dos dados observados para o grau de hidrólise.

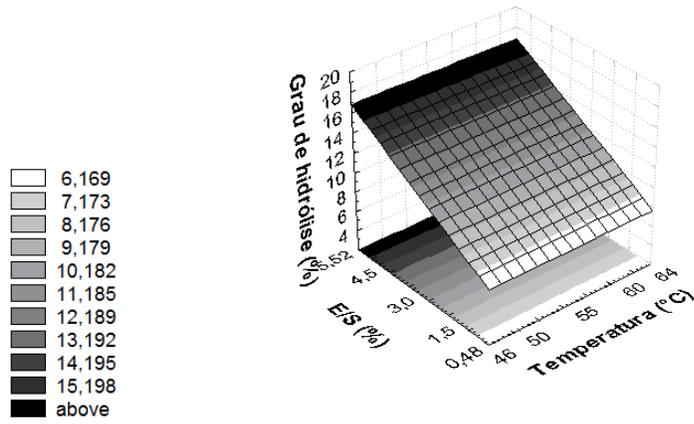
Sendo assim, o modelo codificado ajustado para a resposta grau de hidrólise, na hidrólise enzimática da carne de mexilhão, é:

$$GH(\%) = 10,68 + 3,28 \cdot E/S - 1,34 \cdot pH + 1,19 \cdot pH^2 \quad (5.6)$$

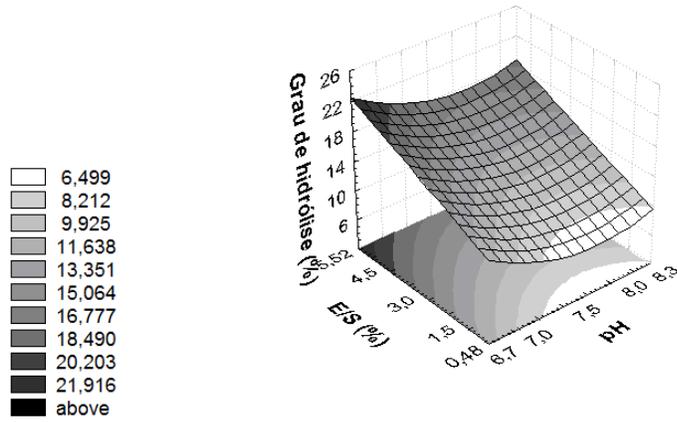
Onde: GH é o grau de hidrólise (%); E/S é a concentração enzima:substrato (codificada); pH é o pH (codificado) e T é a temperatura (codificada).

Na Figura 5.14 estão apresentadas as superfícies de resposta e as curvas de nível geradas através dos modelos propostos. Essas figuras expressam a interação entre duas variáveis independentes sobre a resposta, sendo que a terceira variável foi mantida no ponto central do planejamento.

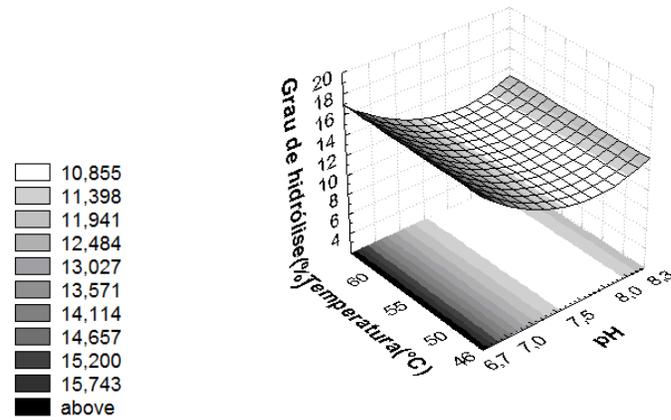
Pela Figura 5.14 observou-se o aumento linear do grau de hidrólise com o aumento da concentração enzima:substrato. O aumento da concentração enzima:substrato leva ao aumento dos sítios ativos disponíveis para o substrato ser hidrolisado, com isso ocorre maior clivagem das ligações peptídicas presentes no substrato e conseqüentemente elevação do grau de hidrólise. Observou-se efeito conjunto do pH com a concentração enzima:substrato, indicando que os maiores valores de grau de hidrólise foram obtidos nos valores extremos de pH e alta concentração de enzima:substrato. Os maiores valores de grau de hidrólise foram obtidos na faixa de pH de 6,7 a 7,0, este resultado pode ser relacionado à faixa de pH ótimo de ação da enzima, que se situa entre 6,0 e 7,5, de acordo com o fabricante. Fora dessa faixa, a estabilidade da enzima é diminuída, podendo ocorrer desnaturação irreversível de sua estrutura conformacional (secundária, terciária e quaternária) e conseqüente perda de atividade (WHITAKER, 1994). Observou-se ainda uma tendência de aumento do grau de hidrólise no pH de 8,3. Não houve efeito da temperatura sobre o grau de hidrólise, na faixa estudada.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.14. Influência das variáveis independentes sobre a resposta grau de hidrólise: (a) pH = 7,5, (b) T = 55°C e (c) E/S = 3%.

(b) *Recuperação de proteína*

Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e das interações sobre o grau de hidrólise e a recuperação de proteína estão apresentados na Tabela 5.10, onde os valores em negrito são significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Tabela 5.10. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta recuperação de proteína.

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|----------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| Média | 55,526 | 0,994 | 55,873 | < 0,0001 |
| T (L) | -1,469 | 0,934 | -1,573 | 0,160 |
| T (Q) | 2,028 | 1,029 | 1,971 | 0,089 |
| E/S (L) | 18,460 | 0,934 | 19,767 | < 0,0001 |
| E/S (Q) | -2,645 | 1,029 | -2,571 | 0,037 |
| pH (L) | 2,441 | 0,934 | 2,614 | 0,035 |
| pH (Q) | 2,889 | 1,029 | 2,808 | 0,026 |
| T x E/S | 0,090 | 1,220 | 0,074 | 0,943 |
| T x pH | 1,850 | 1,220 | 1,517 | 0,173 |
| E/S x pH | -1,780 | 1,220 | -1,459 | 0,188 |

Na Tabela 5.10, para a resposta recuperação de proteína, observou-se que o fator E/S (L) apresentou efeito positivo na recuperação de proteína, isto é, o aumento de E/S levou ao aumento na recuperação de proteína, enquanto o fator E/S (Q) apresentou efeito negativo, indicando um ponto de máximo na superfície. Os fatores pH (L) e pH (Q) apresentaram efeito positivo sobre a resposta recuperação de proteína, isto é, o aumento do pH causou aumento da recuperação de proteína; já o fator quadrático do pH indicou um ponto de mínimo na superfície. Os fatores T (L), T (Q), E/S (Q) e as interações entre as variáveis, T x E/S, T x pH e E/S x pH, foram consideradas como não estatisticamente significativas na resposta recuperação de proteína, ao nível de significância de 5%.

Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 95%, através de análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F. Na Tabela 5.11 encontram-se os valores calculados e tabelados de F.

Tabela 5.11. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta recuperação de proteína.

| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F _{calculado} | F _{tabelado} |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 1244,96 | 4 | 311,24 | 70,54 | 3,41 |
| Resíduos | 52,95 | 12 | 4,41 | | |
| Falta de Ajuste | 41,65 | 10 | 4,16 | 2,40 | 19,40 |
| Erro Puro | 11,30 | 2 | 5,65 | | |
| Total | 1297,91 | 16 | | | |
| R ² | 0,959 | | | | |

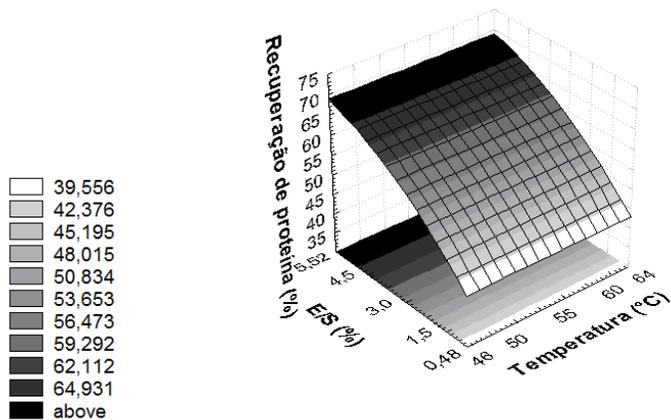
O coeficiente de determinação para o modelo ajustado foi de 0,959 para a recuperação de proteína, indicando que o modelo obtido explica 95,9% da variação dos dados observados para a recuperação de proteína.

$$RP(\%) = 55,53 + 9,23 \cdot E/S - 1,32 \cdot E/S^2 + 1,22 \cdot pH + 1,44 \cdot pH^2 \quad (5.7)$$

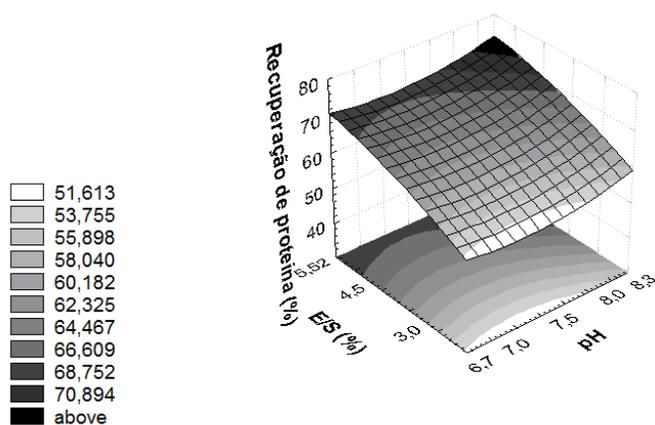
Onde: RP é a recuperação de proteína (%); E/S é a concentração enzima:substrato (codificada); pH é o pH (codificado) e T é a temperatura (codificada).

Na Figura 5.15 são mostradas as superfícies de resposta e as curvas de nível geradas através dos modelos propostos. Essas figuras expressam a interação entre duas variáveis independentes sobre a resposta, sendo que a terceira variável foi mantida no ponto central do planejamento.

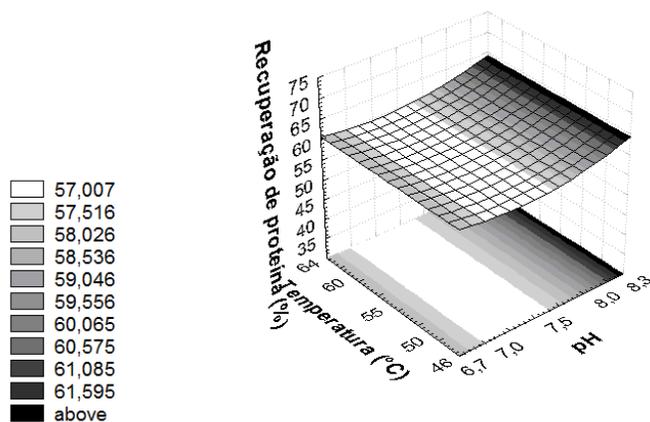
Pela Figura 5.15 observou-se o aumento quadrático da recuperação de proteína com o aumento da concentração enzima:substrato; isto pode ser explicado pelo aumento dos sítios ativos disponíveis para o substrato ser hidrolisado, ocorrendo assim maior clivagem das ligações peptídicas presentes no substrato, e conseqüentemente, maior solubilização das proteínas no hidrolisado. Observou-se também efeito conjunto do pH com a concentração enzima:substrato, com altos valores da recuperação de proteína em valores extremos de pH e altas concentrações de enzima:substrato. Em elevados pH's provavelmente foi devido pela maior solubilização das proteínas em pH alcalino. Não houve efeito da temperatura sobre a recuperação de proteína, na faixa estudada.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.15. Influência das variáveis independentes sobre a resposta recuperação de proteína: (a) pH = 7,5, (b) T = 55°C e (c) E/S = 3%.

Liasset et al. (2002), estudando a hidrólise enzimática de salmão com a enzima ProtamexTM, verificaram o efeito do pH de 5,4 a 7,7, da temperatura de 36 a 50°C, da razão carne:água de 0,71 a 1,21 (p/p) e da concentração enzima:substrato de 30 a 90 AU/kg de proteína, na recuperação de proteína. Como resultado, os autores obtiveram um modelo com parâmetros lineares, sendo que as variáveis que tiveram maior efeito sobre a resposta foram a concentração enzima:substrato, a razão carne:água e a temperatura. Já a variável pH apresentou pequena influência positiva sobre a resposta, devido provavelmente a pequena faixa estudada.

Holanda (2004), através de um planejamento experimental, verificou o efeito das variáveis: temperatura de 45,9 a 74,1°C e concentração enzima:substrato de 0,18 a 5,83% (p/p) na recuperação de proteína e no grau de hidrólise na hidrólise enzimática de resíduos de camarão, utilizando como enzima a Alcalase[®]. Os parâmetros temperatura (Q) e concentração enzima:substrato (L) foram os que tiveram maior efeito sobre as respostas estudadas, recuperação de proteína e grau de hidrólise, respectivamente. Através da Metodologia de Superfície de Resposta, obteve-se a região ótima do processo que foi de concentração enzima:substrato de 2,5 a 5,5% e temperatura de 55 a 65°C.

A influência das variáveis de processo sobre o grau de hidrólise e recuperação de proteína, quando se utiliza o planejamento experimental, depende das faixas de variáveis estudadas, uma vez que dentro da faixa de atividade ótima da enzima a reação será favorecida.

A Figura 5.16 apresenta a relação entre o grau de hidrólise e a recuperação de proteína, para todas as condições estudadas.

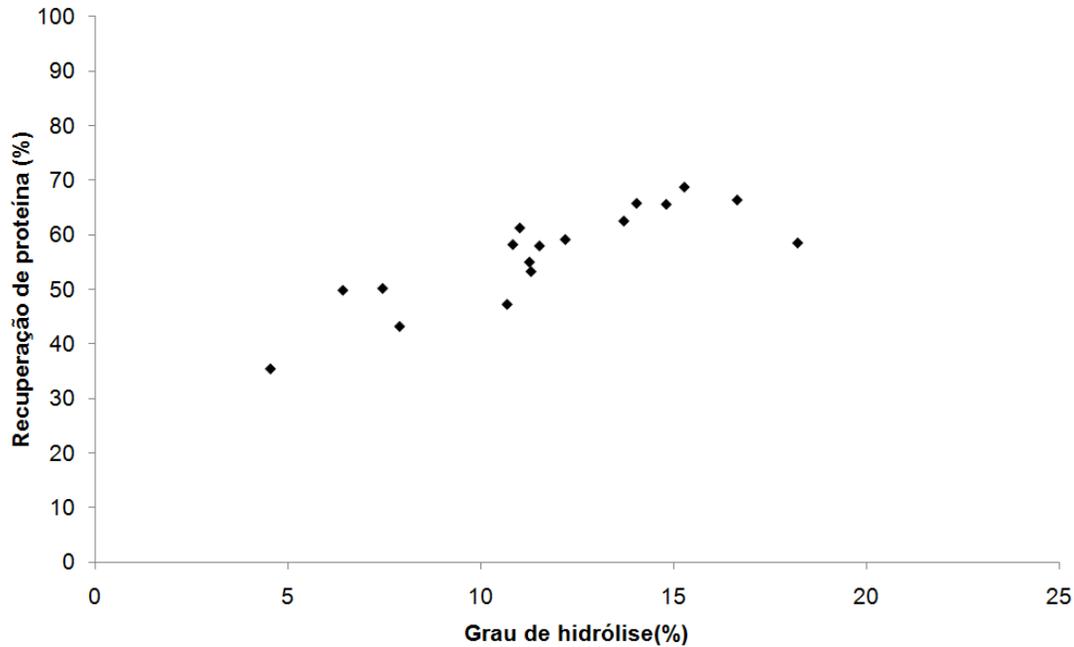


Figura 5.16. Relação entre o grau de hidrólise da carne de mexilhão e a recuperação de proteína.

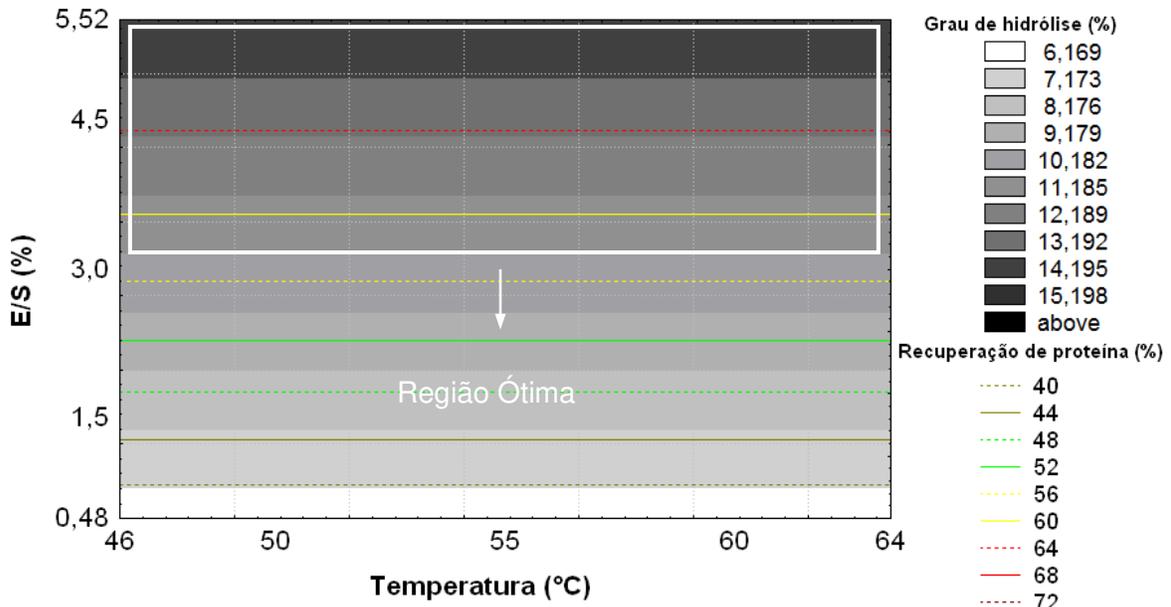
De acordo com a Figura 5.16, o aumento na recuperação de proteína foi obtido até o grau de hidrólise de aproximadamente 15%. Acima desse valor, a recuperação de proteína foi estabilizada, mostrando que nenhuma solubilização adicional da proteína da carne ocorreu, mas sim, maior quebra das ligações peptídicas solúveis, como pode ser observado no perfil eletroforético do hidrolisado protéico, com a predominância de peptídeos com tamanho menor do que 6,5 kDa (Figura 5.18).

Resultado semelhante foi obtido por Kurozawa, Park e Hubinger (2008), que estudaram a hidrólise enzimática da carne de peito de frango, através da metodologia de superfície de resposta, onde o aumento da recuperação de proteína foi alcançado até a elevação do grau de hidrólise para 30%, utilizando a enzima Alcalase[®]. Os autores obtiveram valores de 4,52 a 37,80% para o grau de hidrólise e de 34,56 a 91,82% de recuperação de proteína. Diniz e Martin (1998) também observaram aumento da recuperação de proteína na hidrólise de músculo de tubarão, utilizando a Alcalase[®]. Os autores obtiveram valores de grau de hidrólise de 0, 15, 17,9, 18,6 e 18,9 e de recuperação de proteína de 15,1, 58,2, 71,1, 76,1 e 77%, respectivamente.

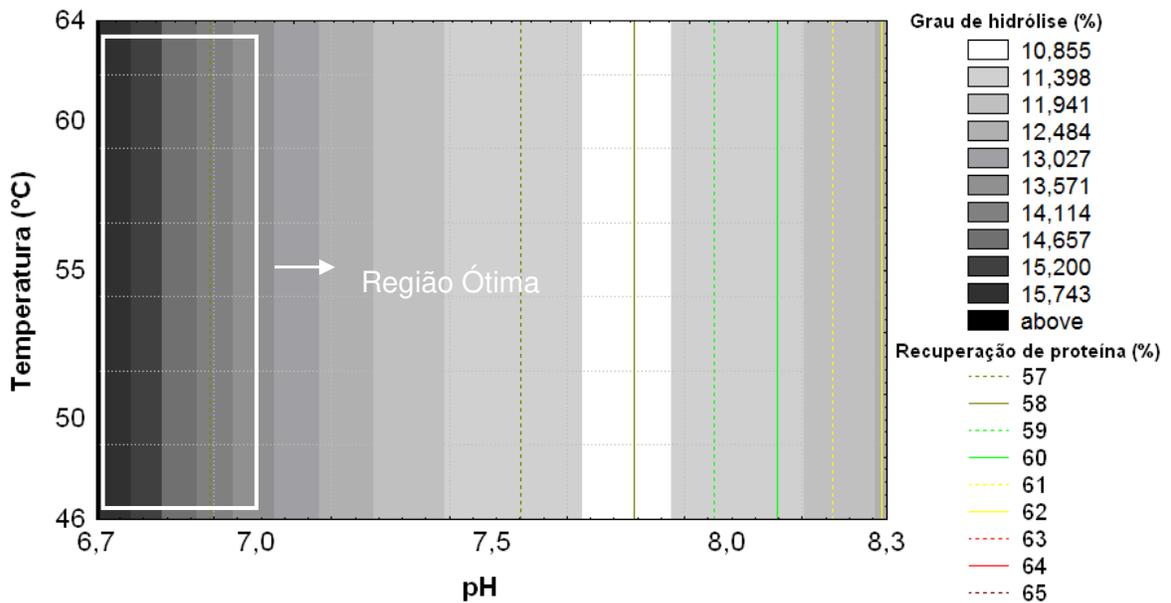
Synowiecki e Al-Khateeb (2000) observaram o grau de hidrólise e a recuperação de nitrogênio no estudo da hidrólise enzimática de resíduos de camarão, utilizando Alcalase[®]. Para a condição de hidrólise de 4 horas, a 55°C, pH de 8,5 e concentração de enzima de 20 AU/kg proteína, os autores obtiveram recuperação de nitrogênio de 69,2% para grau de hidrólise de 30%. Entretanto, verificaram que para grau de hidrólise de 19%, a recuperação de proteína diminuiu para 64,6%. Holanda e Netto (2006) estudaram a recuperação de componentes do resíduo de camarão (proteína, quitina e astaxantina) através da hidrólise enzimática com Alcalase[®] e Pancreatina. Os autores relacionaram os valores de grau de hidrólise e recuperação de proteína e verificaram que aumentando o grau de hidrólise de 6% para 12%, houve aumento na recuperação de proteína de 20% e 28%, para a Alcalase[®] e pancreatina, respectivamente. Entretanto, Holanda e Netto verificaram que para grau de hidrólise superior a 12%, não houve aumento significativo da recuperação de proteína solúvel. Diniz e Martin (1998), ao avaliarem o efeito do tempo de reação de 0 a 150 minutos na hidrólise enzimática de cação utilizando a protease Alcalase[®], obtiveram uma relação linear entre o grau de hidrólise e a recuperação de proteína solúvel, com coeficiente de determinação de 0,99.

5.1.5 Otimização do processo de hidrólise enzimática

A otimização do processo de hidrólise enzimática da carne de mexilhão teve por objetivo maximizar os valores de grau de hidrólise e de recuperação de proteína. Para isso fez-se a sobreposição das curvas de nível encontradas para as duas respostas analisadas. O gráfico do grau de hidrólise está representado através de áreas, enquanto que o da recuperação de proteína, através de linhas na Figura 5.17.



(a)



(b)

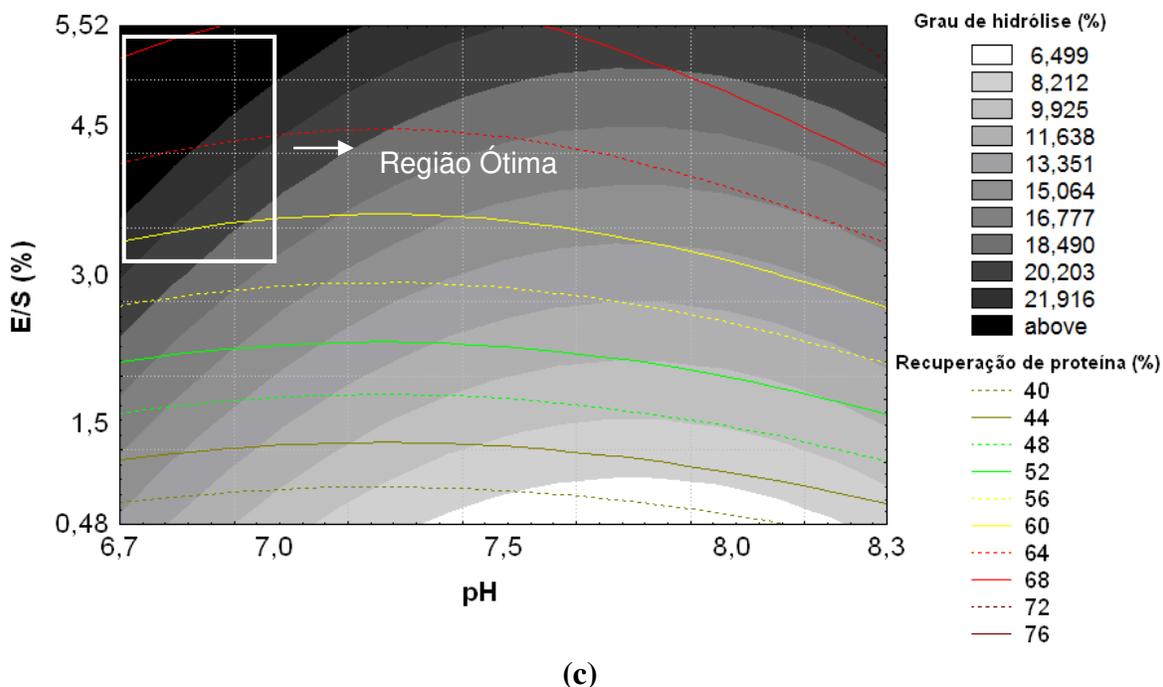


Figura 5.17. Sobreposição das curvas de nível de grau de hidrólise (% GH) e recuperação de proteína (% RP), na hidrólise enzimática da carne de mexilhão: pH = 7,5 (a); E/S = 3% (b) e T = 55°C (c).

Pela Figura 5.17 (a), observa-se no pH 7,5, os maiores valores de grau de hidrólise e recuperação de proteína coincidem na mesma região, ou seja, para a relação enzima:substrato superior a 3% e temperaturas entre 46 e 64°C. Analisando as Figuras 5.17 (b) e 5.17 (c) que a região com os maiores valores das respostas estudadas encontram-se na faixa de temperatura entre 46 e 64°C e pH de 6,7 a 7,0 para o grau de hidrólise e recuperação de proteína. Assim, o pH ótimo, de modo a obter maiores valores das duas respostas, encontra-se entre 6,7 e 7,0. Já a Figura 5.17 (c) mostra que a região ótima encontra-se em valores de relação enzima:substrato de 3,0 a 5,52 e valores de pH de 6,7 a 7,0.

Analisando-se de forma conjunta as Figuras 5.17 (a), (b) e (c) como condição ótima para a hidrólise enzimática da carne de mexilhão, a seguinte combinação das variáveis de reação é sugerida: temperatura de 51°C, concentração enzima: substrato de 4,5% p/p e pH

6,85, condições em que o grau de hidrólise obtido foi de 16,9% e a recuperação de proteína de 64,4%.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO OBTIDO NA REGIÃO OTIMIZADA

5.2.1 Composição química

A caracterização do hidrolisado protéico e do resíduo (lipídeos e material não hidrolisado que foram separados na etapa de centrifugação), obtidos na condição otimizada, em béquer encamisado de 250 mL, foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.2 e é apresentada na Tabela 5.12.

Tabela 5.12. Caracterização química do hidrolisado protéico e do resíduo, obtidos em menor escala, reator de 250 mL.

| Análise (base úmida, %) | Valor médio ± Desvio padrão | |
|-------------------------|-----------------------------|--------------|
| | Hidrolisado | Resíduo |
| Umidade | 92,01 ± 0,02 | 78,08 ± 0,34 |
| Cinzas | 0,89 ± 0,07 | 2,22 ± 0,11 |
| Proteínas | 5,83 ± 0,03 | 12,48 ± 0,13 |
| Lipídeos | 0,36 ± 0,03 | 6,25 ± 0,09 |

Após a determinação do ponto ótimo de processo, realizou-se a hidrólise enzimática nessa condição no tanque de aço inox encamisado de 7 L, e a caracterização do hidrolisado é apresentada na Tabela 5.13.

Tabela 5.13. Caracterização química do hidrolisado protéico e do resíduo, obtidos em maior escala, reator de 7 L.

| Análise (base úmida, %) | Valor médio ± Desvio padrão | |
|-------------------------|-----------------------------|--------------|
| | Hidrolisado | Resíduo |
| Umidade | 93,26 ± 0,01 | 76,97 ± 0,07 |
| Cinzas | 0,75 ± 0,05 | 2,39 ± 0,01 |
| Proteínas | 4,97 ± 0,11 | 14,78 ± 0,11 |
| Lipídeos | 0,39 ± 0,01 | 5,41 ± 0,06 |

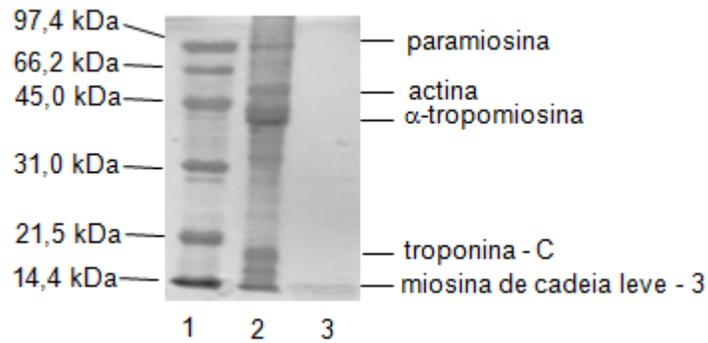
Analisando-se as Tabelas 5.12 e 5.13 verifica-se a viabilidade de mudança de escala, devido à proximidade das características do hidrolisado produzido em béquer encamisado de 250 mL àquele produzido em tanque de aço inox encamisado de 7 L, para produção de maior quantidade, que foi utilizada nas etapas subsequentes do trabalho.

5.2.2 Perfil eletroforético

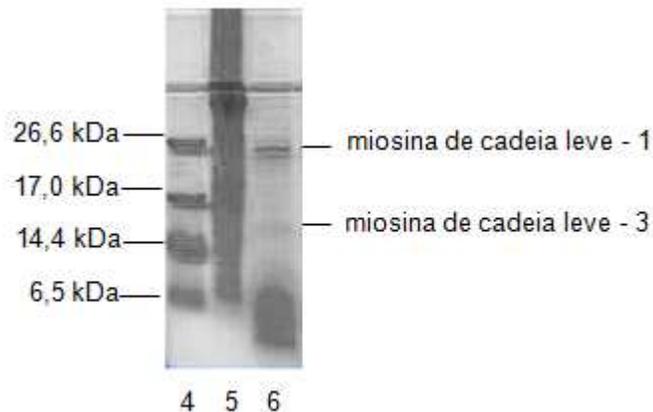
Mexilhões apresentam um sistema muscular estriado confinado aos músculos adutores ou retratores das valvas. Existem muitos estudos sobre o músculo adutor de bivalves, responsável por manter o estado de turgor por longos períodos, devido à função especial da paramiosina, que é uma proteína miofibrilar. O músculo adutor é o principal tecido dos moluscos, e nas ostras e mexilhões sua função é manter as valvas fechadas. As fibras musculares de moluscos classificam-se em: músculo estriado, estriado oblíquo, liso helicoidal e liso-paramiosina. O músculo adutor de vieira é um músculo estriado representativo, o estriado oblíquo encontra-se no músculo adutor semi-transparente de ostras, o liso helicoidal se encontra presente no músculo da manta de cefalópodes e o liso-paramiosina no músculo adutor de bivalves, que mostra o estado de turgescência (BERTULLO, 1975; OGAWA; MAIA, 1999).

A paramiosina é uma proteína encontrada no músculo estriado dos invertebrados e está relacionada à capacidade de contração dos bivalves, como o mexilhão. O conteúdo de paramiosina em vieiras, lulas e ostras é de 3, 14 e 19%, respectivamente. No músculo adutor branco, de algumas ostras e moluscos, 38-40% das miofibrilas são paramiosina, que forma um recheio com a superfície da camada de miosina. A paramiosina tem massa molecular de 200–258 kDa, consistindo de duas subunidades de 95–125 kDa, com alto conteúdo de ácido glutâmico de 20 a 23% (VENUGOPAL, 2009).

Os perfis eletroforéticos das proteínas da carne de mexilhão e do hidrolisado protéico estão apresentados na Figura 5.18. As colunas 1 e 4 representam os marcadores de peso molecular; as colunas 2 e 5 a carne de mexilhão (75 µg de proteína e 150 µg de proteína, respectivamente) e as colunas 3 e 6 o hidrolisado protéico obtido (150 µg e 500 µg de proteína, respectivamente).



(a)



(b)

Figura 5.18. Perfil eletroforético SDS-PAGE (a), gel 12% de acrilamida e Tricine-SDS-PAGE (b), gel 15,5% de acrilamida, da carne de mexilhão (colunas 2 e 5) e do hidrolisado protéico de mexilhão (colunas 3 e 6). As colunas 1 e 4 representam os marcadores de massa molecular da Bio-Rad Laboratories (Hercules, EUA).

Na Figura 5.18 (a), a coluna 2 correspondente à carne de mexilhão, gel de separação com 12% de acrilamida, entre as frações protéicas, foram identificadas as que caracterizam as proteínas miofibrilares, isto é, as proteínas contrácteis actina e miosina através de seus pesos moleculares: paramiosina (105 kDa), actina (45 kDa), α -tropomiosina (35 kDa), troponina - C (20 kDa) e miosina de baixo peso - 3 (15 kDa) (PORZIO; PERSON, 1977). Esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Margulis e Pinaev (1976), como componentes principais das miofibrilas dos moluscos, miosina de cadeia pesada (200 kDa), paramiosina (105 kDa), actina (45 kDa), tropomiosina (30 a 39 kDa) e miosina de cadeia leve (16 kDa). O hidrolisado protéico (coluna 3) não apresentou bandas visíveis,

indicando elevada proteólise. Na Figura 5.18 (b), gel de separação com 15,5% de acrilamida, a carne de mexilhão, representada pela coluna 5, não apresentou boa separação das frações protéicas nessa concentração de gel. Já no hidrolisado protéico, representado pela coluna 6, foram identificadas miosina de baixo peso – 1 (25 kDa), miosina de baixo peso – 3 (15 kDa) e peptídeos com peso molecular menor do que 6,5 kDa. Pode-se concluir que houve diminuição na intensidade das bandas; o desaparecimento de frações entre 31,0 e 97,4 kDa; a presença de duas bandas uma de miosina de baixo peso – 1 (25 kDa) e outra de miosina de baixo peso – 3 (15 kDa), além do aparecimento de uma banda difusa com peso molecular inferior a 6,5 kDa, resultados da hidrólise das proteínas presentes na carne de mexilhão pela enzima ProtamexTM.

5.2.3 Perfil dos aminoácidos

A Tabela 5.14 apresenta a composição de aminoácidos totais da carne de mexilhão e do hidrolisado obtido. O valor de h_{total} , número total de ligações peptídicas antes da reação, utilizado para o cálculo do grau de hidrólise, apresentado no item 4.2.3, foi estimado a partir da composição de aminoácidos totais da carne do mexilhão que foi de 97,37 g/100g de proteína, obtido a partir da Tabela 5.14. Considerando que a massa molecular média dos aminoácidos é cerca de 125 g/mol, obteve-se o valor de h_{total} de 7,8 meq/g de proteína. O valor do número total de ligações peptídicas disponíveis para a hidrólise (h_{tot}) foi determinado através da composição aminoacídica da proteína, simplificada, como a soma de mmols de aminoácidos individuais por grama de proteína. De acordo com Adler-Nissen (1986), em uma cadeia polipeptídica há uma ligação a menos que o número de aminoácidos, mas essa diferença pode ser desprezada, a menos que a proteína possua muitos aminoácidos livres e pequenos peptídeos.

Tabela 5.14. Composição de aminoácidos totais (em g/100 g de proteína) da carne de mexilhão e do hidrolisado obtido na condição ótima de hidrólise.

| Aminoácido | Composição Carne (g/100g de proteína)* | Composição Hidrolisado (g/100g de proteína)* | AS hid | AS carne | Padrão/FAO ¹ (1991) |
|---------------------------|---|--|-----------|-------------|-----------------------------------|
| <i>Não Essenciais</i> | | | | | |
| Ácido Aspártico | 9,85 ± 0,00a | 10,06 ± 0,16a | | | |
| Ácido Glutâmico | 12,21 ± 0,12a | 12,99 ± 0,05b | | | |
| Alanina | 4,77 ± 0,04a | 4,74 ± 0,06a | | | |
| Arginina | 7,85 ± 0,04a | 7,26 ± 0,03b | | | |
| Cisteína | 1,33 ± 0,05a | 1,60 ± 0,31b | | | |
| Glicina | 7,11 ± 0,07a | 7,79 ± 0,00b | | | |
| Prolina | 4,02 ± 0,04a | 3,92 ± 0,05a | | | |
| Serina | 4,77 ± 0,12a | 4,60 ± 0,04a | | | |
| Tirosina | 3,67 ± 0,01a | 3,45 ± 0,04a | | | |
| <i>Essenciais</i> | | | | | |
| Fenilalanina ³ | 3,54 ± 0,04a | 3,36 ± 0,04a | 1,15 | 1,08 | 6,3 |
| Histidina | 1,80 ± 0,02a | 1,81 ± 0,05a | 0,95 | 0,95 | 1,9 |
| Isoleucina | 3,82 ± 0,02a | 3,62 ± 0,05a | 1,36 | 1,29 | 2,8 |
| Leucina | 6,43 ± 0,01a | 6,38 ± 0,12a | 0,97 | 0,97 | 6,6 |
| Lisina | 6,63 ± 0,08a | 6,71 ± 0,04a | 1,14 | 1,16 | 5,8 |
| Metionina ² | 3,46 ± 0,07a | 3,54 ± 0,10a | 1,92 | 2,06 | 2,5 |
| Treonina | 4,31 ± 0,02a | 4,35 ± 0,07a | 1,27 | 1,28 | 3,4 |
| Triptofano | 7,54 ± 0,20a | 9,95 ± 0,42b | 6,85 | 9,05 | 1,1 |
| Valina | 4,24 ± 0,08a | 4,05 ± 0,02a | 1,21 | 1,16 | 3,5 |
| AAE | 41,77 | 43,77 | | | |

Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre as amostras para $p \leq 0,05$.

AAE: Teor total de aminoácidos essenciais.

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

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

² metionina + cisteína

³ fenilalanina + tirosina

O perfil de aminoácidos da carne de mexilhão mostrou como constituintes principais: o ácido glutâmico, o ácido aspártico, arginina e triptofano (12,21, 9,85, 7,85, 7,54 g/100g de proteína, respectivamente). O perfil teórico de aminoácidos essenciais indica a composição que a proteína deve apresentar, para ser considerada de bom valor nutritivo (SGARBIERI, 1996). Em relação ao score de aminoácidos essenciais (AS), que compara o teor de aminoácidos da carne de mexilhão com o padrão recomendado pela FAO/WHO (1991) de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos, a Tabela 5.14 mostra que a histidina e a leucina são aminoácidos limitantes (AS < 1). Escolheu-se a comparação do teor de aminoácidos da carne de mexilhão com o padrão recomendado pela

FAO/WHO (1991) de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos, uma vez que esses indivíduos necessitam de um aporte maior de aminoácidos essenciais, em comparação com os adultos, indispensáveis para o seu crescimento e desenvolvimento. Para se conhecer o valor nutritivo da proteína, além da composição de aminoácidos, deve-se considerar ainda o valor biológico relacionado ao crescimento e/ou manutenção de peso corporal realizado pelo teste de digestibilidade *in vivo*.

O perfil de aminoácidos do hidrolisado protéico obtido é bem próximo ao da carne de mexilhão. O hidrolisado apresentou como constituintes principais: ácido glutâmico, ácido aspártico, arginina e triptofano (12,99, 10,06, 9,95 e 7,26 g/100g de proteína respectivamente). Para verificar a diferença de composição de aminoácidos da carne de mexilhão e do hidrolisado protéico, foi realizado um teste de comparação de médias (t de Student), ao nível de significância de 5%, apresentado na Tabela 5.14, que mostra que houve diferença significativa, somente na quantidade de ácido glutâmico, arginina, cisteína, glicina e triptofano, na maioria dos casos, com teor maior no hidrolisado protéico de mexilhão, em comparação com a carne de mexilhão. O ácido glutâmico é um melhorador de sabor, encontrado em abundância em alguns tipos de hidrolisados protéicos produzidos a partir de proteína vegetal de soja e de carne de mexilhão (WEIR, 1986; CHA; KIM; JANG, 1998a). Vários aminoácidos, especialmente os básicos, são importantes precursores de aroma, pois reagem com outros compostos na reação de Maillard, sendo importantes no desenvolvimento das características do *flavor* dos hidrolisados protéicos.

5.2.4 Composição de voláteis do hidrolisado protéico de mexilhão

O estudo da composição de voláteis da carne de mexilhão foi realizado com o objetivo de caracterizar o aroma do hidrolisado protéico de mexilhão, produzido a partir do mexilhão *Perna perna*, além de produzir microcápsulas que possam proteger esses componentes voláteis de condições ambientais adversas. Para o estudo da composição de voláteis em matriz sólida como a carne de mexilhão e em matriz aquosa como o hidrolisado protéico de mexilhão, escolheu-se a metodologia de extração dos componentes voláteis

através da microextração por fase sólida, por meio do *headspace*, de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.6.

(a) *Otimização do processo de extração dos voláteis e separação dos compostos por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC).*

Para a otimização do processo de extração dos voláteis utilizou-se como amostra o hidrolisado protéico de mexilhão. As análises de extração por microextração por fase sólida (SPME) foram realizadas em tempos curtos (máximo de 45 min) visando à padronização de um método eficiente e rápido para análise do produto, sendo que o fator temperatura foi estudado no nível máximo de 50°C, para evitar a degradação térmica dos lipídeos presentes na carne (BRUNTON et al., 2000). A Tabela 5.15 mostra os resultados da soma das áreas dos picos, obtidos da otimização da microextração por fase sólida, utilizando o cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC).

Tabela 5.15. Condições experimentais e respostas instrumentais obtidas na otimização das condições de extração dos voláteis do hidrolisado de mexilhão, por SPME.

| Experimento | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Área Total (pA.s) |
|-------------|------------------|-------------|-------------------|
| 1 | 30 | 15 | 9,3 |
| 2 | 30 | 30 | 55,3 |
| 3 | 30 | 45 | 118,9 |
| 4 | 40 | 15 | 38,3 |
| 5 | 40 | 30 | 71,7 |
| 6 | 40 | 45 | 116,4 |
| 7 | 50 | 15 | 55,7 |
| 8 | 50 | 30 | 217,0 |
| 9 | 50 | 45 | 327,7 |

Os perfis cromatográficos obtidos para o hidrolisado protéico de mexilhão estão apresentados na Figura 5.28. Analisando-se a Tabela 5.15 e Figura 5.19, observa-se o acréscimo no número e nas áreas dos picos, conforme aumentam os fatores tempo e temperatura de extração. Quanto maior a área dos picos, maior é a quantidade do analito, dessa forma, a condição ótima de temperatura e tempo sugerida foi de 50°C por 45 min.

A Figura 5.20 ilustram os perfis cromatográficos dos compostos voláteis do hidrolisado (área total de 327,7 pA.s), do precipitado (área total de 530,7 pA.s) e da carne de mexilhão (área total de 2916,8 pA.s) obtidos na condição otimizada de 50°C por 45 min.

O perfil cromatográfico do hidrolisado protéico de mexilhão apresentou 8 picos, do precipitado 14 picos e da carne de mexilhão 17 picos. Mantendo-se o método de extração e aumentando-se o tempo de dessorção no cromatógrafo gasoso de 0,75 para 6 minutos obtiveram-se os seguintes cromatogramas, apresentados na Figura 5.21, para o hidrolisado protéico (área total de 572,9 pA.s com 20 picos), para o precipitado (área total de 1143,5 pA.s com 19 picos) e para a carne de mexilhão (área total de 3694,9 pA.s com 23 picos), respectivamente. O aumento do número e da área dos picos indica uma melhoria dos resultados das análises cromatográficas. O tempo de dessorção no cromatógrafo foi aumentado, pois como o tempo de adsorção dos analitos no revestimento da fibra de SPME, por meio do headspace, é longo (50 min), haverá a necessidade de um tempo maior para a dessorção dos analitos no injetor do cromatógrafo.

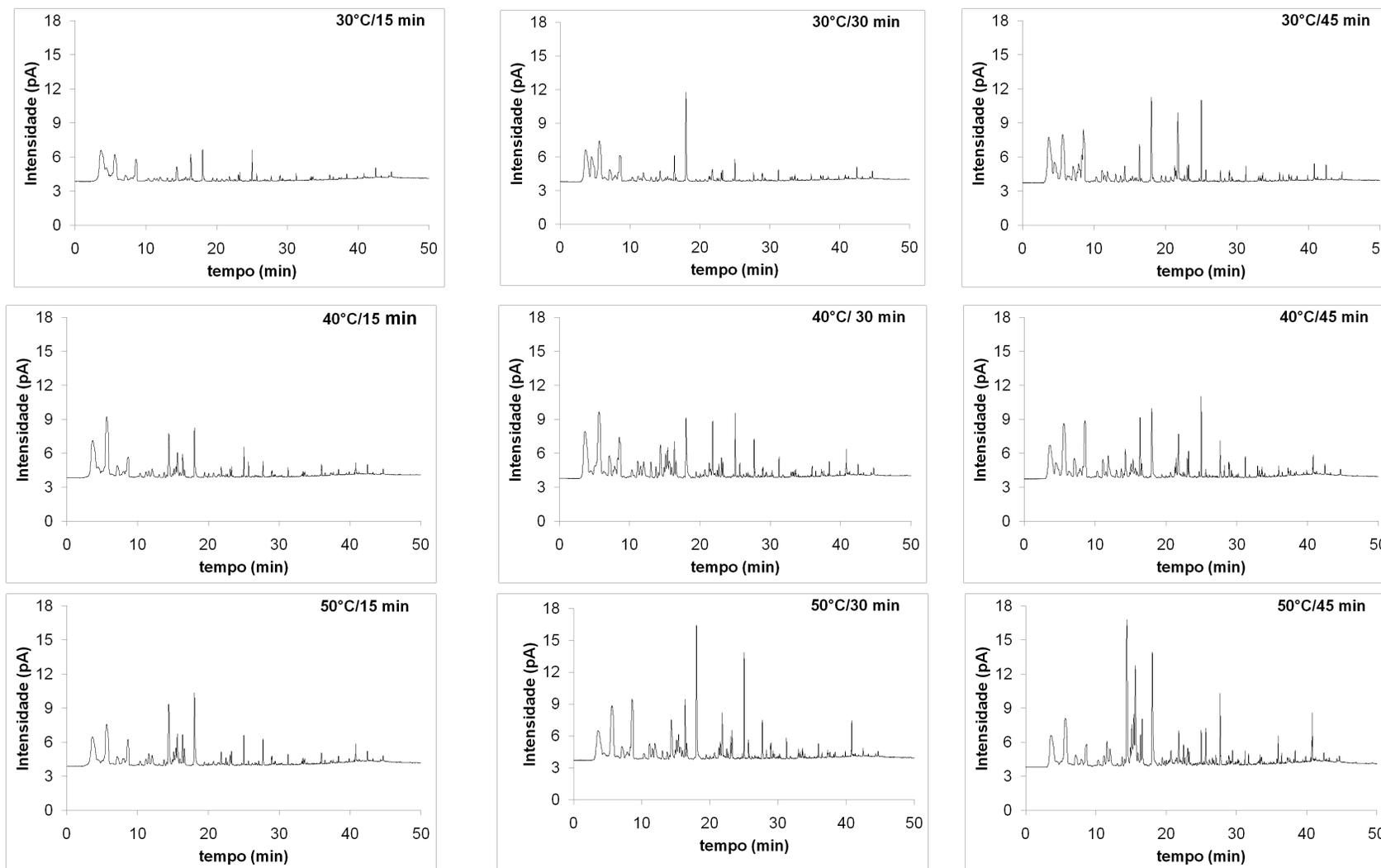
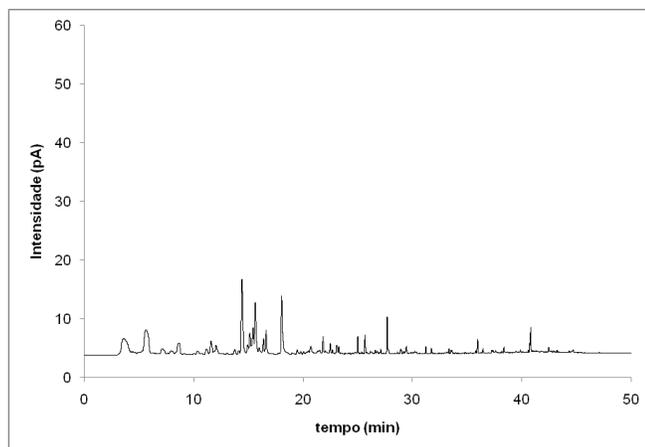
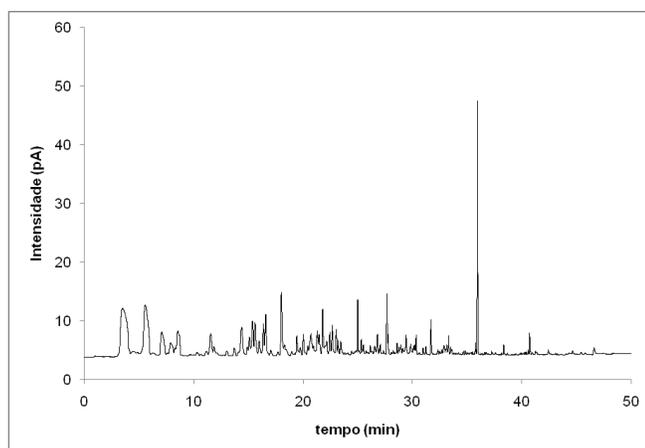


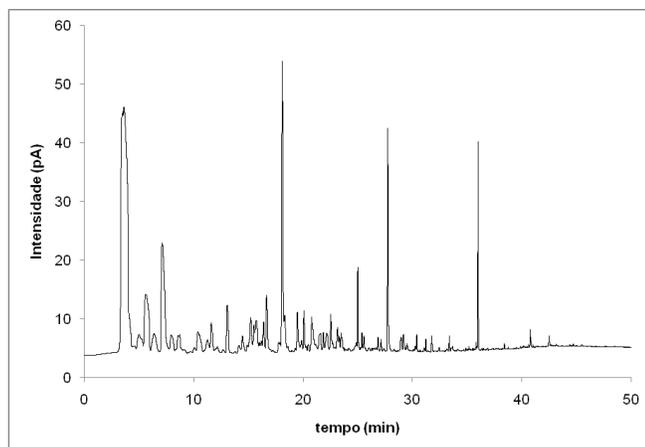
Figura 5.19. Perfis cromatográficos obtidos na etapa de otimização da extração por fase sólida, nas temperaturas de extração de 30 a 50°C e tempos de 15 a 45 min.



(a)

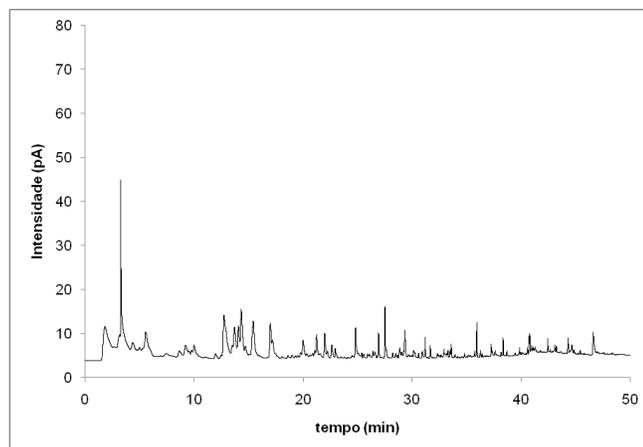


(b)

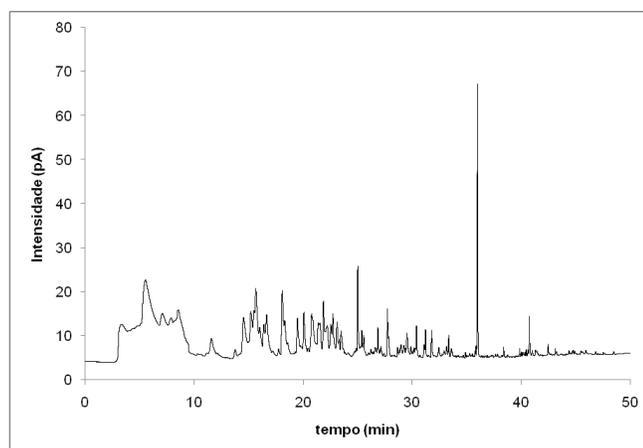


(c)

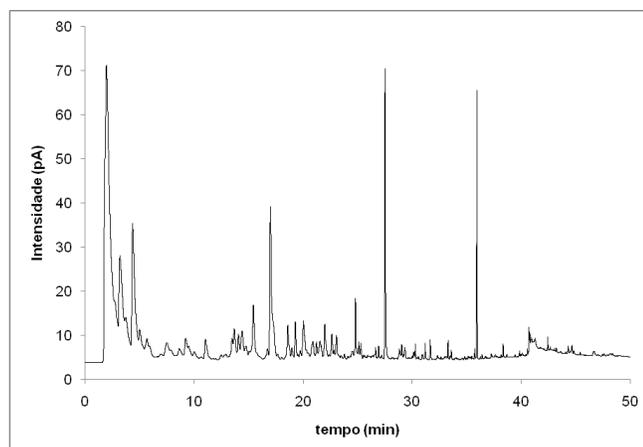
Figura 5.20. Perfis cromatográficos do hidrolisado protéico de mexilhão(a), do precipitado (b) e da carne de mexilhão (c) obtidos na condição otimizada de extração dos voláteis, tempo de dessorção de 0,75 min.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.21. Perfis cromatográficos do hidrolisado protéico de mexilhão (a), do precipitado (b) e da carne de mexilhão (c) obtidos na condição otimizada de extração dos voláteis, tempo de dessorção de 6 min.

(b) *Identificação dos componentes voláteis da carne de mexilhão e do hidrolisado protéico através da cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-MS)*

Na Tabela 5.16, estão apresentados os 12 compostos tentativamente identificados para o hidrolisado protéico de mexilhão e para a carne de mexilhão, utilizando o cromatógrafo gasoso acoplado com espectrômetro de massas (CG-MS), os cromatogramas estão apresentados no Apêndice A, esclarecendo-se que muitos picos não puderam ser identificados. Dentre os compostos identificados encontram-se 4 alcoóis, 2 aldeídos, 1 cetona, 3 hidrocarbonetos e 2 hidrocarbonetos aromáticos. Esses compostos são os mesmos encontrados em outros estudos de fração de voláteis da carne de mexilhão (YASUHARA; MORITA 1987; CHA; KIM; JANG, 1998a; GUEN; PROST; DEMAIMAY, 2000; CROS et al., 2005; FUENTES et al., 2008).

Tabela 5.16. Compostos voláteis tentativamente identificados na carne de mexilhão e no hidrolisado protéico de mexilhão, índices de retenção (RI) e métodos de identificação.

| Composto | IR _{carne} | IR _{hidrolisado} | Método de Identificação |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>Alcoóis</i> | | | |
| 1-Pentanol | ND | ND | MS |
| 2-Etil-1-hexanol | 969 | 969 | MS, RI |
| 2-Penten-1-ol | ND | ND | MS |
| Undecanol | 1338 | 1338 | MS, RI |
| <i>Cetonas</i> | | | |
| 2-Nonanona | 1086 | 1086 | MS, RI |
| <i>Aldeídos</i> | | | |
| Nonanal | 1101 | 1100 | MS, RI |
| Hexanal | ND | ND | MS |
| <i>Hidrocarbonetos</i> | | | |
| Tetradecano | 1399 | 1401 | MS, RI |
| Pentadecano | 1498 | 1498 | MS, RI |
| Heptadecano | 1708 | 1707 | MS, RI |
| <i>Hidrocarbonetos aromáticos</i> | | | |
| Dimetiletilbenzeno | 1020 | 1024 | MS, RI |
| Estireno | 869 | 869 | MS, RI |

Onde: MS = espectro de massa; IR = índice de retenção e ND: Não determinado.

Yasuhara e Morita (1987) identificaram 60 compostos voláteis em mexilhões cozidos. Já Guen, Prost e Demaimay (2000) identificaram 85 compostos voláteis em

extratos de mexilhão cozidos, entre eles 22 hidrocarbonetos aromáticos, 14 álcoois, 14 aldeídos, 12 cetonas, 8 compostos sulfurosos, 6 alcanos, 6 pirazinas e 3 piridinas. Entre os dois estudos somente 11 compostos foram comuns: o hexanal, o undecano, o 2-metil-2-butenal, o etilbenzeno, o o-, m- e p-xileno, o 1,3,5-trimetiletilbenzeno, o 2-penten-1-ol, o octadienal e o benzaldeído. Cha, Kim e Jang (1998a) identificaram 84 compostos voláteis no hidrolisado protéico de mexilhão, produzido com a enzima Optimase® e 75 compostos voláteis na carne de mexilhão. Desses compostos 25 eram aldeídos, 16 cetonas, 17 álcoois, 8 compostos nitrogenados, 11 hidrocarbonetos aromáticos, 8 terpenos e 15 compostos heterogêneos.

Álcoois e hidrocarbonetos normalmente não contribuem para o *flavor* global devido aos seus altos valores de *threshold* (concentração mínima percebida pelo olfato humano). Contudo, Guen, Prost e Demaimay (2000) observaram através da cromatografia gasosa com olfatometria que 3 álcoois, o 1-propanol, o 2-nonanol e o 2-penten-1-ol, identificados no extrato de mexilhão cozido são odoríferos, entre eles, o 2-penten-1-ol, identificado nesse trabalho, que contribui ativamente com um odor descrito como o de cogumelos. Cha, Kim e Jang (1998a) observaram que as concentrações de álcoois no hidrolisado protéico de mexilhão diminuiriam após a hidrólise e os compostos em maior quantidade em ambos os produtos, carne de mexilhão e hidrolisado protéico, foram o etanol, o 1-penten-3-ol, o 2-penten-1-ol e o 2-etil-1-hexanol, sendo estes dois últimos compostos identificados neste trabalho.

Guen, Prost e Demaimay (2000) observaram também através da cromatografia gasosa com olfatometria que apenas 1 cetona, a 2,3-butanodiona, identificada no extrato de mexilhão cozido tinha poder odorífero, com odor de caramelo. Outros tipos de cetonas, como a 2-nonanona, encontrada neste trabalho, podem ser resultado da degradação/oxidação térmica de ácidos graxos polinsaturados, contudo, não são compostos impactantes no aroma de mexilhão. Cha, Kim e Jang (1998a) observaram o aumento de 2,8 vezes na concentração de 2-nonanona no hidrolisado protéico de mexilhão, quando comparado à carne de mexilhão.

Já os aldeídos são os compostos mais importantes em muitos alimentos e impactantes no aroma de mexilhão, devido aos seus baixos valores de *threshold*. Guen,

Prost e Demaimay (2000) observaram através da cromatografia gasosa com olfatométrica que 8 aldeídos identificados no extrato de mexilhão cozido são odoríferos, entre eles, o hexanal, identificado neste trabalho, que pode ser descrito como um odor verde e/ou de cítricos. O hexanal é produto da oxidação de ácidos graxos polinsaturados e juntamente com o heptanal e o octanal são considerados como *off-flavors* de produtos marinhos (GUEN; PROST; DEMAIMAY, 2000). Geralmente, tanto os compostos pertencentes às classes dos aldeídos como dos alcoóis são originados nos produtos cárneos a partir da oxidação lipídica de ácidos graxos polinsaturados (GROSCH, 1982; JOSEPHSON; LINDSAY; STUIBER, 1991).

Hidrocarbonetos aromáticos possuem altos valores de *threshold* mas geralmente não contribuem para o aroma global dos mexilhões, mas sim com um odor indesejável; sua presença pode ser devido à contaminação por petróleo uma vez que os mesmos já foram relatados em peixes e mariscos (GUEN; PROST; DEMAIMAY, 2000; OGATA; MYIAKE, 1980).

Duas pirazinas identificadas no extrato de mexilhão cozido foram caracterizadas por possuírem um odor de castanha, a etilpirazina e a acetilpirazina, que contribuem para o aroma desejável de mexilhões cozidos. Elas podem ser formadas através da reação de Maillard e as reações de pirólise através da degradação de Strecker em processos de aquecimento de várias fontes de aminoácidos (GUEN; PROST; DEMAIMAY, 2000). Contudo, não foi possível a identificação desses e outros compostos nesse trabalho, provavelmente devido à alguma dessas razões: alguns compostos não foram adsorvidos por esse tipo de revestimento de fibra de SPME ou pela utilização do modo SCAN no detector do cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas, que dessa forma faz a varredura de massa/carga de 20 a 650 (m/z) e não procura um espectro específico.

5.3 COMPORTAMENTO REOLÓGICO DO HIDROLISADO USADO NA ALIMENTAÇÃO DO SECADOR

O comportamento reológico do hidrolisado puro e adicionado de maltodextrina ou goma arábica, nas concentrações utilizadas na alimentação do secador de *spray dryer*, foi

avaliado através da determinação das curvas de escoamento a 25°C. A Figura 5.22 apresenta os dados experimentais das curvas obtidas, que foram ajustados pelo modelo newtoniano (Equação 4.6) e o de Lei da Potência (Equação 4.7). Os valores dos parâmetros obtidos pelo ajuste dos modelos aos dados experimentais, além dos valores de coeficiente de determinação (R^2), estão apresentados na Tabela 5.17.

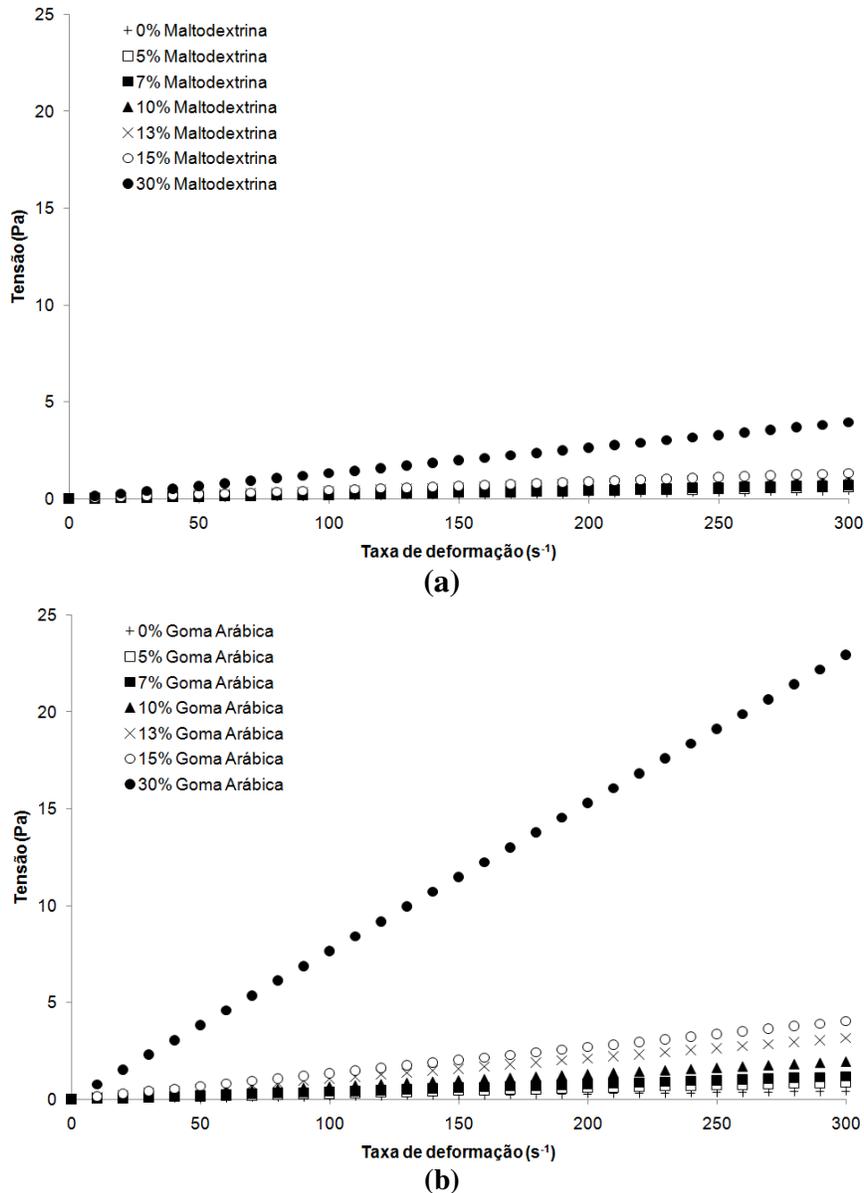


Figura 5.22. Curvas de escoamento do hidrolisado protéico de mexilhão adicionado de maltodextrina (a) ou goma arábica (b).

Tabela 5.17. Valores dos parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo para fluidos newtonianos e ao modelo de lei da potência.

| C (%) | Newtoniano | | | | Lei da Potência | | | | | |
|-------|------------------|----------------|------------------|----------------|---------------------------|-------|----------------|---------------------------|-------|----------------|
| | Maltodextrina | | Goma Arábica | | Maltodextrina | | | Goma Arábica | | |
| | η (Pa.s) | R ² | η (Pa.s) | R ² | k (Pa.s ⁿ) | n | R ² | k (Pa.s ⁿ) | n | R ² |
| 0 | 0,0013 | 0,9940 | 0,0013 | 0,994 | 0,0014 | 0,987 | 0,9995 | 0,0014 | 0,987 | 0,9995 |
| 5 | 0,0020 | 0,9996 | 0,0029 | 0,9997 | 0,0022 | 0,984 | 0,9997 | 0,0033 | 0,978 | 0,9999 |
| 7 | 0,0023 | 0,9998 | 0,0039 | 0,9999 | 0,0024 | 0,987 | 0,9998 | 0,0041 | 0,991 | 0,9999 |
| 10 | 0,0029 | 0,9998 | 0,0064 | 0,9999 | 0,0031 | 0,986 | 0,9999 | 0,0068 | 0,991 | 0,9999 |
| 13 | 0,0038 | 0,9999 | 0,0105 | 0,9999 | 0,0040 | 0,990 | 0,9999 | 0,0101 | 1,008 | 0,9999 |
| 15 | 0,0044 | 0,9998 | 0,0135 | 0,9999 | 0,0047 | 0,988 | 0,9999 | 0,0143 | 0,989 | 0,9999 |
| 30 | 0,0131 | 0,9999 | 0,0765 | 0,9995 | 0,0141 | 0,989 | 0,9999 | 0,0640 | 1,033 | 0,9997 |

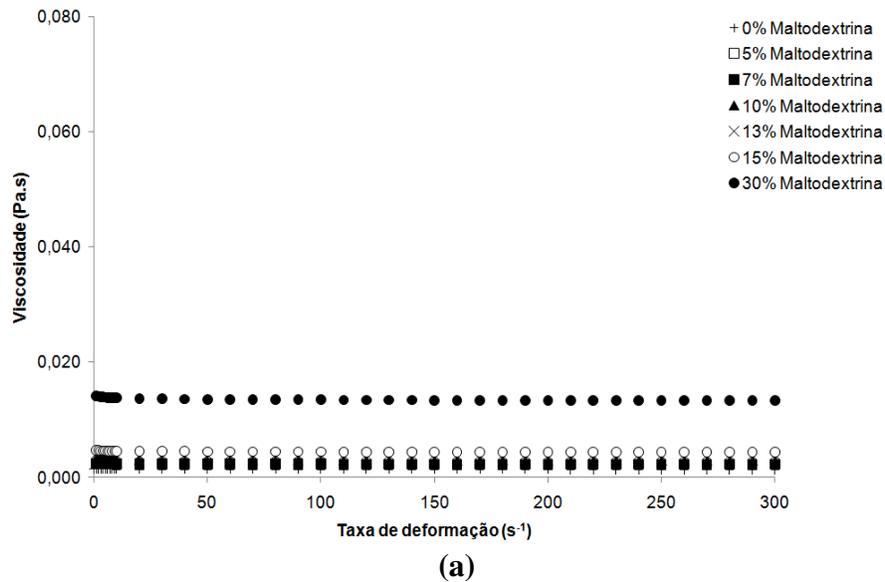
Onde: C = concentração de agente carreador; η = viscosidade (Pa.s); k = índice consistência (Pa.sⁿ) e n = índice de comportamento.

Analisando-se a Figura 5.22 (a) e (b), observa-se que as soluções preparadas com goma arábica apresentaram maiores tensões de cisalhamento em comparação com aquelas produzidas com maltodextrina. Conforme os resultados apresentados na Tabela 5.17, tanto o modelo para fluidos newtonianos como o modelo de Lei da Potência apresentaram bons ajustes aos dados experimentais, com valores de coeficiente de determinação maiores do que 0,9940. Como os valores do índice de comportamento (n) foram muito próximos de 1, o hidrolisado puro e adicionado de agentes carreadores foram considerados fluidos newtonianos. Os gases e a maioria dos líquidos compostos por moléculas relativamente simples, de baixo peso molecular, apresentam comportamento newtoniano. Exemplos de produtos newtonianos são: leite, óleos, chá, cerveja, vinho e sucos de frutas clarificados (BARBOSA-CÁNOVAS; IBARZ; PELEG, 1993; BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; STEFFE, 1996). Observou-se também o aumento do valor do índice de consistência à medida que a concentração de agente carreador foi aumentada. Uma vez que o índice de consistência pode ser relacionado com a viscosidade aparente, à medida que a quantidade de sólidos da solução aumentou, verificou-se o aumento da viscosidade e do valor desse parâmetro.

Lamsal, Jung e Johnson (2007) determinaram a viscosidade aparente do hidrolisado protéico de soja, obtido pela hidrólise enzimática, usando a enzima bromelina. O modelo de Lei da Potência apresentou bons ajustes aos dados experimentais de curva de escoamento,

das dispersões contendo 10% de hidrolisado protéico de soja. Os autores observaram que após a hidrólise, tanto a viscosidade, como o índice de consistência (k) diminuíram, resultando em dispersões menos viscosas. Essa diminuição da viscosidade pode ser, em parte, atribuída ao aumento da solubilidade da proteína, devido a hidrólise enzimática. Além disso, os autores observaram que o aumento do grau de hidrólise levou a valores de índice de comportamento (n) mais próximos de 1 e conseqüentemente ao comportamento newtoniano dos hidrolisados protéicos. Esses resultados estão de acordo com os obtidos no presente estudo, pois o hidrolisado protéico de mexilhão puro apresentou comportamento tipicamente newtoniano, devido ao extensivo processo de hidrólise enzimática da carne de mexilhão, que levou à elevada quebra das proteínas e formação de peptídeos de baixo peso molecular.

A Figura 5.23 apresenta as curvas de viscosidade aparente versus a taxa de deformação para o hidrolisado puro e adicionado de maltodextrina ou goma arábica nas concentrações que variaram de 5 a 30%.



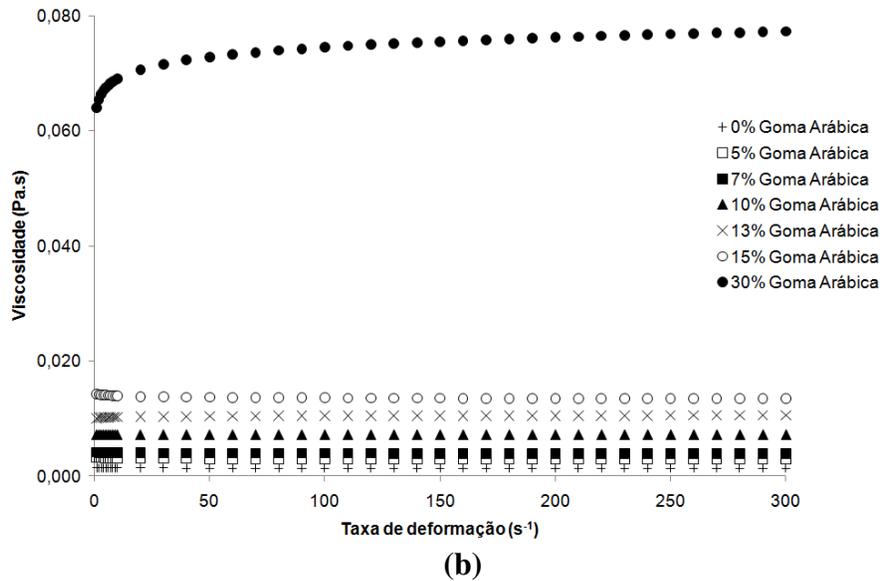


Figura 5.23. Viscosidade do hidrolisado protéico de mexilhão adicionado de maltodextrina (a) ou goma arábica (b).

Analisando-se a Figura 5.23, observa-se que para baixas taxas de deformação a viscosidade aparente das amostras diminuiu, com o aumento da taxa de deformação, com exceção da solução contendo 30% de goma arábica, cuja viscosidade aumentou com o aumento da taxa de deformação, indicando comportamento dilatante, nessa condição. Além disso, a viscosidade não variou com a taxa de deformação, para valores acima de 50 s^{-1} , em todas as soluções, que é o comportamento característico de fluidos newtonianos. Como era esperada, a viscosidade das soluções aumentou com o aumento da quantidade de sólidos. Os valores de viscosidade (μ) aumentaram de 0,0013 para 0,0131 Pa.s e de 0,0013 para 0,0765 Pa.s à medida que se aumentou a concentração de maltodextrina ou goma arábica de 0 para 30%, respectivamente.

A Figura 5.24 apresenta a relação entre a viscosidade das soluções, calculada à taxa de deformação de 10^3 s^{-1} e a concentração de maltodextrina ou de goma arábica.

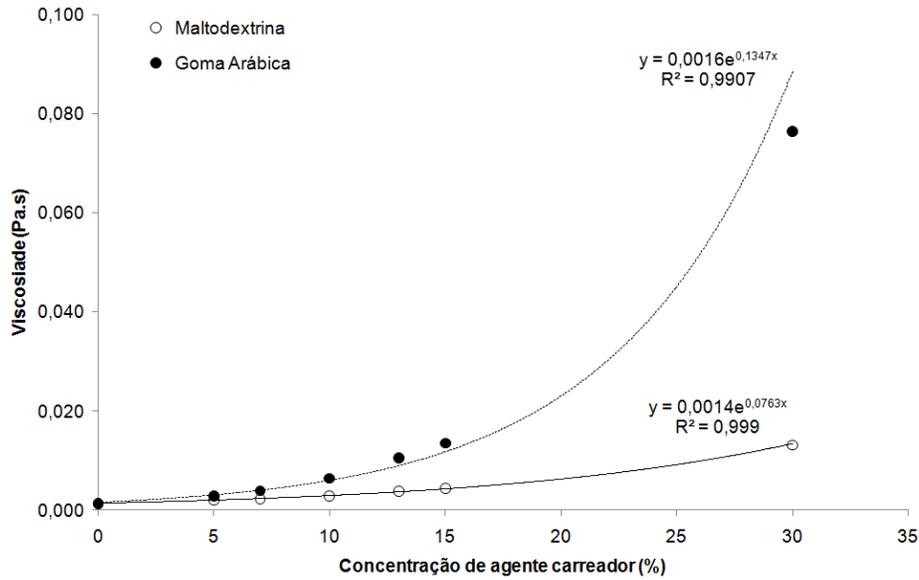


Figura 5.24. Viscosidade do hidrolisado protéico de mexilhão adicionado de maltodextrina e goma arábica, calculada a taxa de deformação de 10^3 s^{-1} , em função da concentração dos agentes carreadores.

Analisando-se a Figura 5.24 observa-se que a viscosidade aparente aumenta exponencialmente com a concentração de agente carreador, maltodextrina ou goma arábica, sendo que as soluções contendo goma arábica apresentaram valores de viscosidade aparente maiores do que aqueles observados para a maltodextrina, a partir da concentração de agente carreador acima de 10%. Contudo, a solução contendo 30% de goma arábica, mesmo apresentando maior viscosidade do que a solução produzida com maltodextrina, ainda apresenta baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos, em comparação, com outras gomas; por exemplo, uma solução 1,5% de goma xantana apresenta a mesma viscosidade de uma solução 50% de goma arábica (ISLAM et al., 2007).

Além disso, os valores de viscosidade das soluções de alimentação (hidrolisado adicionado de agentes carreadores) foram relacionados às características de tamanho e microestrutura das partículas após a secagem por *spray drying*, sendo apresentados posteriormente.

No item 5.4 estão apresentados os resultados obtidos de propriedades físicas e físico-químicas dos hidrolisados protéicos de mexilhão em pó obtidos através do planejamento experimental realizado, para cada agente carreador, maltodextrina 10 DE ou goma arábica.

5.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA SECAGEM

5.4.1 Agente carreador maltodextrina

Os resultados experimentais, apresentados na Tabela 5.18, foram obtidos através da combinação das variáveis: temperatura do ar de entrada, vazão da alimentação e concentração de maltodextrina, conforme Tabela 4.3 do planejamento experimental.

Tabela 5.18. Resultados do planejamento experimental da secagem por *spray dryer* do hidrolisado protéico de mexilhão, com maltodextrina.

| Ensaio | A _w | X (%, b.s.) | H (g água/g sólidos) | D _{4,3} (µm) | ρ (g/cm ³) | RS (%) | T _s (°C) |
|--------|----------------|----------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|-----------|---------------------|
| 1 | 0,133 ± 0,011 | 1,31 ± 0,22 | 0,233 ± 0,001 | 5,77 ± 0,02 | 0,290 ± 0,010 | 32,87 | 99 ± 1 |
| 2 | 0,199 ± 0,009 | 0,77 ± 0,17 | 0,240 ± 0,002 | 5,42 ± 0,04 | 0,299 ± 0,014 | 42,29 | 98 ± 1 |
| 3 | 0,154 ± 0,003 | 0,97 ± 0,04 | 0,232 ± 0,001 | 5,45 ± 0,01 | 0,300 ± 0,011 | 23,94 | 85 ± 1 |
| 4 | 0,151 ± 0,005 | 0,84 ± 0,07 | 0,229 ± 0,004 | 6,88 ± 0,06 | 0,254 ± 0,008 | 24,38 | 110 ± 1 |
| 5 | 0,202 ± 0,001 | 1,07 ± 0,12 | 0,229 ± 0,003 | 7,70 ± 0,12 | 0,305 ± 0,025 | 28,60 | 96 ± 2 |
| 6 | 0,187 ± 0,011 | 0,46 ± 0,05 | 0,196 ± 0,002 | 8,88 ± 0,15 | 0,264 ± 0,014 | 30,86 | 114 ± 1 |
| 7 | 0,142 ± 0,011 | 1,45 ± 0,26 | 0,174 ± 0,001 | 5,51 ± 0,01 | 0,293 ± 0,004 | 28,02 | 79 ± 3 |
| 8 | 0,131 ± 0,004 | 0,49 ± 0,12 | 0,182 ± 0,002 | 6,48 ± 0,08 | 0,262 ± 0,001 | 34,50 | 101 ± 1 |
| 9 | 0,233 ± 0,005 | 1,18 ± 0,08 | 0,205 ± 0,003 | 6,37 ± 0,04 | 0,321 ± 0,011 | 31,23 | 83 ± 1 |
| 10 | 0,159 ± 0,018 | 0,69 ± 0,44 | 0,204 ± 0,023 | 7,69 ± 0,02 | 0,269 ± 0,009 | 34,08 | 108 ± 1 |
| 11 | 0,121 ± 0,001 | 0,53 ± 0,22 | 0,209 ± 0,001 | 6,15 ± 0,03 | 0,273 ± 0,009 | 47,27 | 106 ± 1 |
| 12 | 0,132 ± 0,002 | 0,74 ± 0,05 | 0,176 ± 0,007 | 5,66 ± 0,01 | 0,314 ± 0,019 | 31,12 | 75 ± 2 |
| 13 | 0,192 ± 0,015 | 1,00 ± 0,01 | 0,255 ± 0,001 | 5,96 ± 0,04 | 0,317 ± 0,011 | 33,23 | 94 ± 1 |
| 14 | 0,111 ± 0,001 | 0,83 ± 0,38 | 0,165 ± 0,001 | 10,32 ± 0,12 | 0,290 ± 0,005 | 33,74 | 100 ± 2 |
| 15 | 0,160 ± 0,016 | 0,69 ± 0,21 | 0,202 ± 0,002 | 6,83 ± 0,07 | 0,313 ± 0,001 | 35,53 | 97 ± 1 |
| 16 | 0,160 ± 0,012 | 0,76 ± 0,09 | 0,192 ± 0,001 | 6,86 ± 0,06 | 0,302 ± 0,010 | 35,18 | 96 ± 1 |
| 17 | 0,161 ± 0,008 | 0,77 ± 0,17 | 0,183 ± 0,005 | 6,89 ± 0,03 | 0,320 ± 0,011 | 34,11 | 101 ± 2 |

A_w: atividade de água; X: conteúdo de umidade; H: higroscopicidade; D_{4,3}: diâmetro médio das partículas; ρ: densidade; RS: rendimento do processo de secagem e T_s: temperatura do ar de saída (°C).

(a) Atividade de água

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de atividade de água obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na

Tabela 5.19. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Tabela 5.19. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta atividade de água.

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------------|--------------|-------------------|
| Média | 0,160 | 0,018 | 8,773 | <0,0001 |
| T (L) | -0,013 | 0,017 | -0,748 | 0,479 |
| T (Q) | 0,027 | 0,019 | 1,444 | 0,192 |
| V (L) | -0,018 | 0,017 | -1,064 | 0,323 |
| V (Q) | -0,022 | 0,019 | -1,162 | 0,283 |
| C (L) | -0,016 | 0,017 | -0,951 | 0,373 |
| C (Q) | -0,004 | 0,019 | -0,225 | 0,828 |
| T x V | -0,016 | 0,022 | -0,726 | 0,491 |
| T x C | -0,022 | 0,022 | -0,994 | 0,353 |
| V x C | -0,022 | 0,022 | -0,994 | 0,353 |

A resposta atividade de água não apresentou variáveis significativas, por isso não foi possível a obtenção do modelo. Alimentos com valores de atividade de água menores do que 0,6 são considerados microbiologicamente estáveis. Os valores obtidos de atividade de água para os hidrolisados protéicos de mexilhão em pó variaram na faixa de 0,111 a 0,233. Em geral, pela Tabela 5.18, o valor da atividade de água diminuiu com o aumento da concentração de maltodextrina, uma vez que o aumento do conteúdo de sólidos reduziu a quantidade de água livre; este mesmo comportamento foi observado por Quek, Chok e Swedlund (2007) para melão em pó obtido por *spray dryer*.

(b) *Conteúdo de umidade*

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de conteúdo de umidade obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na Tabela 5.20. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Tabela 5.20. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta umidade (% , b.s.).

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| Média | 0,734 | 0,089 | 8,280 | <0,0001 |
| T (L) | -0,449 | 0,083 | -5,387 | 0,001 |
| T (Q) | 0,177 | 0,092 | 1,923 | 0,096 |
| V (L) | 0,072 | 0,083 | 0,867 | 0,415 |
| V (Q) | -0,036 | 0,092 | -0,392 | 0,707 |
| C (L) | -0,103 | 0,083 | -1,241 | 0,255 |
| C (Q) | 0,162 | 0,092 | 1,769 | 0,120 |
| T x V | 0,015 | 0,109 | 0,138 | 0,894 |
| T x C | -0,225 | 0,109 | -2,067 | 0,078 |
| V x C | 0,170 | 0,109 | 1,562 | 0,162 |

Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 90%, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F.

Tabela 5.21. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta umidade.

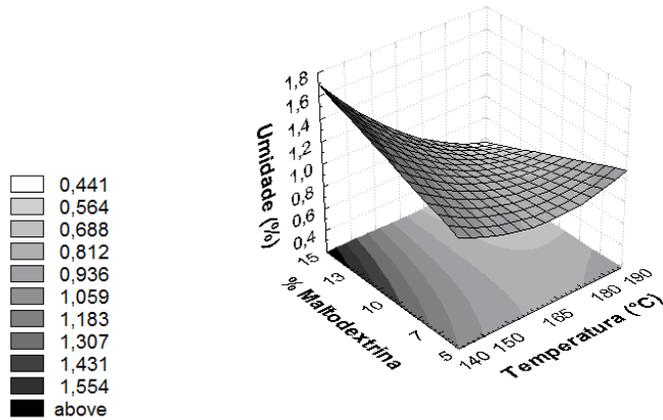
| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F_{calculado} | F_{tabelado} |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Regressão | 0,8599 | 3 | 0,287 | 9,96 | 2,56 |
| Resíduos | 0,3742 | 13 | 0,029 | | |
| Falta de Ajuste | 0,3704 | 11 | 0,034 | 326,72 | 9,38 |
| Erro Puro | 0,0038 | 2 | 0,002 | | |
| Total | 1,2340 | 16 | | | |

$$R^2 = 0,697$$

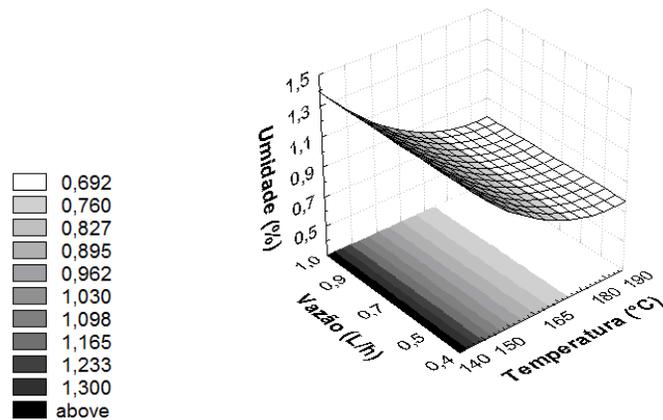
Na Figura 5.25, são mostradas as superfícies de resposta geradas através do modelo proposto para a resposta umidade.

Através da Figura 5.25, observa-se que os menores valores de conteúdo de umidade são obtidos nos maiores valores de temperatura do ar de secagem. Isso pode ser explicado pelo maior gradiente de temperatura entre o produto atomizado e o ar de secagem, acarretando em maior transferência de calor, maior evaporação de água do produto e por conseqüência, resultando em menores valores de umidade. Já com o aumento da concentração de agente, há o aumento da concentração de sólidos, diminuindo a quantidade

de água que precisa ser evaporada, reduzindo a umidade final do pó. Resultados similares foram obtidos para a secagem por *spray dryer* de polpa de açaí (TONON; BRABET; HUBINGER, 2008) e de melão (QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007). Grabowski, Truong e Daubert (2006), trabalhando com secagem de purê de batata doce, também observaram diminuição da umidade das partículas, com o aumento da temperatura do ar de secagem.



(a)



(b)

Figura 5.25. Influência das variáveis independentes sobre a resposta umidade dos pós: (a) $V = 0,7$ L/h e (b) $C = 10\%$.

Além disso, pode-se dizer que há o efeito de interação entre a temperatura do ar de secagem e a concentração de agente carreador, onde os extremos de temperatura do ar e

baixas concentrações de agente levam a baixos valores de umidade. Isso se deve à maior facilidade das moléculas de água em passar por uma quantidade menor de moléculas de maltodextrina, que são maiores.

(c) *Higroscopicidade*

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de higroscopicidade obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na Tabela 5.22. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Tabela 5.22. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta higroscopicidade (g água/g sólidos).

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| Média | 0,192 | 0,007 | 26,145 | <0,0001 |
| T (L) | -0,003 | 0,007 | -0,483 | 0,644 |
| T (Q) | 0,014 | 0,008 | 1,808 | 0,114 |
| V (L) | -0,020 | 0,007 | -2,904 | 0,023 |
| V (Q) | 0,005 | 0,008 | 0,687 | 0,514 |
| C (L) | -0,045 | 0,007 | -6,475 | <0,0001 |
| C (Q) | 0,018 | 0,008 | 2,322 | 0,053 |
| T x V | 0,008 | 0,009 | 0,862 | 0,417 |
| T x C | -0,007 | 0,009 | -0,806 | 0,447 |
| V x C | -0,014 | 0,009 | -1,585 | 0,157 |

Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 90%, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F.

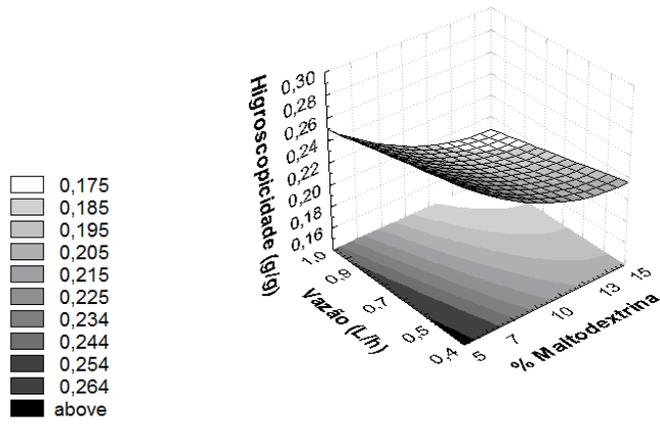
Tabela 5.23. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta higroscopicidade.

| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F _{calculado} | F _{tabelado} |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 0,0090 | 3 | 0,0030 | 16,19 | 2,56 |
| Resíduos | 0,0020 | 13 | 0,0002 | | |
| Falta de Ajuste | 0,0022 | 11 | 0,0002 | 56188,05 | 9,38 |
| Erro Puro | 0,0002 | 2 | 0,0001 | | |
| Total | 0,0111 | 16 | | | |

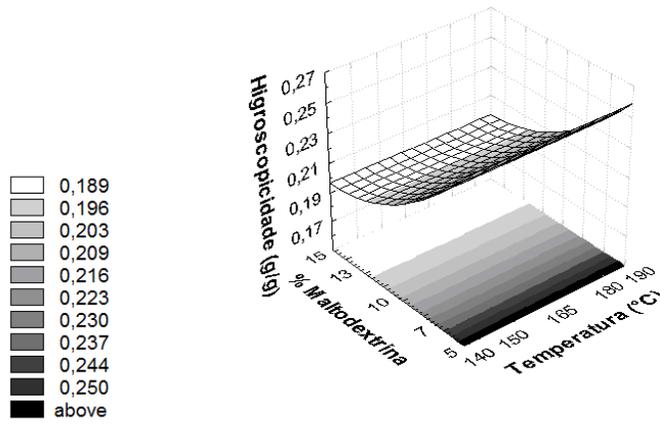
$R^2 = 0,789$

Na Figura 5.26, são mostradas as superfícies de resposta geradas através do modelo proposto para a resposta higroscopicidade.

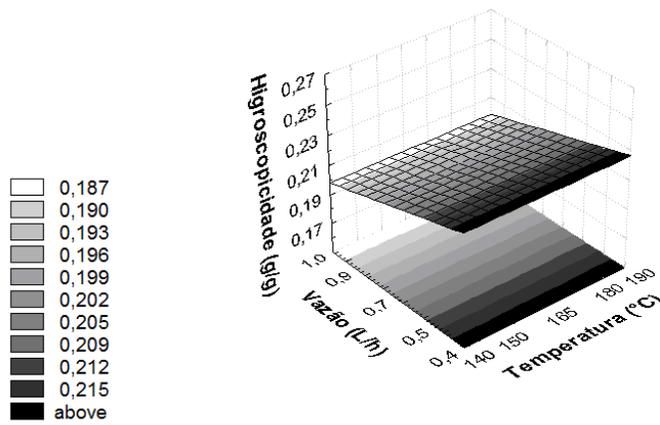
O hidrolisado protéico puro, por possuir peptídeos de baixo peso molecular, apresenta alta higroscopicidade, isto é, quando em contato com o ar ambiente adsorve umidade tornando a superfície do partícula pegajosa e podendo ocorrer aglomeração do pó. Através da Figura 5.26, observa-se que os menores valores de higroscopicidade são obtidos nas maiores concentrações de maltodextrina e nos maiores valores de vazão de alimentação. Essa redução da higroscopicidade pode ser explicada pelo fato que a adição do agente carreador com elevada massa molecular, como a maltodextrina, na solução de alimentação, aumenta a temperatura de transição vítrea do pó, reduzindo a adesividade e a higroscopicidade do pó, aumentando a sua estabilidade durante o armazenamento (ROOS; KAREL, 1991; BHANDARI; DATTA; HOWEST, 1997). O aumento da concentração de agente carreador e a conseqüente diminuição da higroscopicidade foi observada também por Tonon, Brabet e Hubinger (2008) para o pó de açaí e por Rodríguez-Hernández et al. (2005) para o pó de figo da Índia (*Opuntia streptacantha*), produzidos por *spray dryer*.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.26. Influência das variáveis independentes sobre a higroscopicidade dos pós: (a) $T = 165^{\circ}\text{C}$, (b) $V = 0,7 \text{ L/h}$ e (c) $C = 10\%$.

(d) *Diâmetro médio das partículas*

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de diâmetro médio das partículas obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na Tabela 5.24. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Tabela 5.24. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta diâmetro médio das partículas (μm).

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| Média | 6,895 | 0,384 | 17,956 | <0,0001 |
| T (L) | 0,798 | 0,361 | 2,213 | 0,063 |
| T (Q) | -0,113 | 0,398 | -0,285 | 0,784 |
| V (L) | -0,626 | 0,361 | -1,736 | 0,126 |
| V (Q) | -0,911 | 0,398 | -2,291 | 0,056 |
| C (L) | 1,814 | 0,361 | 5,026 | 0,002 |
| C (Q) | 0,673 | 0,398 | 1,693 | 0,134 |
| T x V | 0,393 | 0,471 | 0,833 | 0,432 |
| T x C | 0,268 | 0,471 | 0,568 | 0,588 |
| V x C | -1,433 | 0,471 | -3,040 | 0,019 |

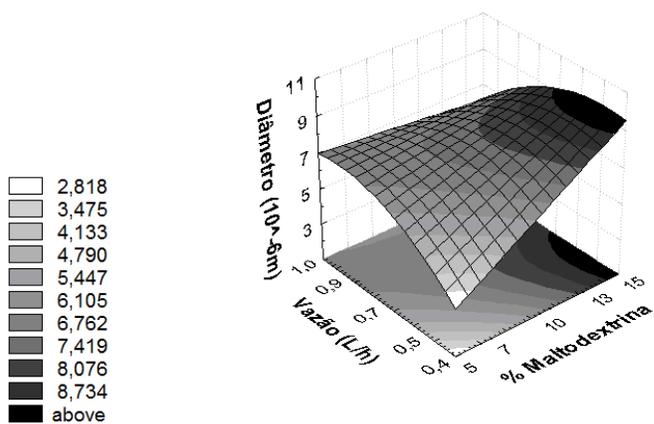
Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 90%, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F (Tabela 5.25).

Tabela 5.25. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta diâmetro médio das partículas.

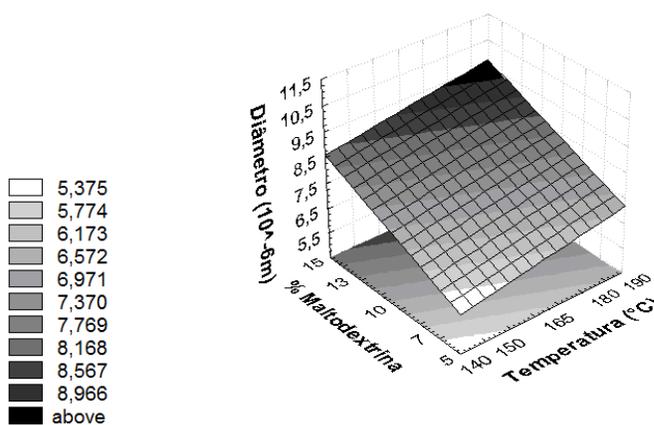
| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F_{calculado} | F_{tabelado} |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Regressão | 20,998 | 4 | 5,249 | 9,73 | 2,48 |
| Resíduos | 6,471 | 12 | 0,539 | | |
| Falta de Ajuste | 6,469 | 10 | 0,647 | 15,46 | 9,39 |
| Erro Puro | 0,002 | 2 | 0,001 | | |
| Total | 27,469 | 16 | | | |

$$R^2 = 0,764$$

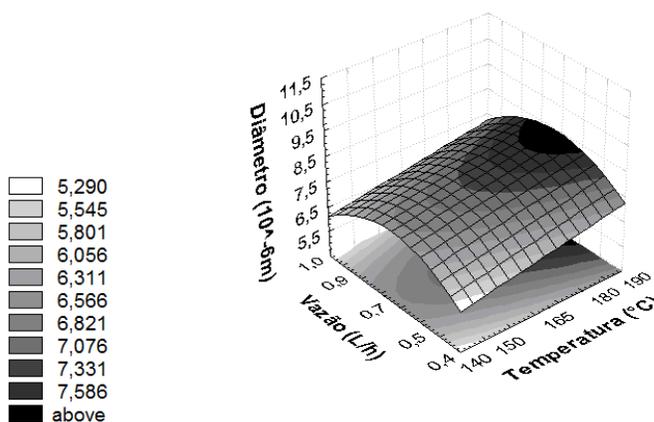
Na Figura 5.27, são mostradas as superfícies de resposta geradas através do modelo proposto para a resposta diâmetro médio das partículas.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.27. Influência das variáveis independentes sobre a resposta diâmetro médio das partículas: (a) $T = 165^{\circ}\text{C}$, (b) $V = 0,7 \text{ L/h}$ e (c) $C = 10\%$.

De acordo com a Figura 5.27, quanto maior a temperatura do ar de secagem do *spray dryer*, maiores são os diâmetros médios das partículas formadas. Isso ocorre porque, segundo Reineccius (2001), o menor tempo de secagem implica na rápida formação da superfície das partículas, evitando que haja encolhimento das partículas ao longo da secagem e permitindo que ao fim do processo as partículas possuam maiores diâmetros. Este mesmo comportamento foi observado por Tonon, Brabet e Hubinger (2008), Nidjam e Langrish (2006), Chegini e Chobadian (2005), Kurozawa et al. (2009a), para açaí, leite, suco de laranja e hidrolisado protéico de frango em pó, respectivamente, obtidos através da secagem por atomização.

As concentrações mais elevadas de agente carreador geraram partículas com diâmetros médio maiores, sendo que, o maior diâmetro médio encontrado (10,32 μm) correspondeu à maior concentração de maltodextrina do planejamento experimental (15%). No processo de secagem por atomização, o tamanho das partículas depende do tamanho das gotas atomizadas, que por sua vez é afetada pelo tipo de bico atomizador, pelas propriedades físicas e pela concentração de sólidos da solução de alimentação. A viscosidade da mistura se elevou de 0,0020 para 0,0044 Pa.s, com o aumento da concentração de maltodextrina, de 0 para 15%. De acordo com Masters (1979), para atomizadores rotativos, o tamanho médio da gota atomizada varia diretamente com a viscosidade do líquido, a uma velocidade de atomização constante. Quanto maior a viscosidade do líquido, maiores são as gotas formadas durante a atomização e, portanto, maiores as partículas de pó obtidas. Resultados similares foram obtidos por Goula e Adamopoulos (2004), Grabowski, Truong e Daubert (2006), Tonon, Brabet e Hubinger (2008) e Kurozawa et al. (2009a), para a secagem por atomização de polpa de tomate, purê de batata doce, polpa de açaí e hidrolisado protéico de peito de frango.

Pode ser observado ainda o efeito de interação, onde baixas vazões e altas concentrações de maltodextrina levaram a altos valores de diâmetro médio das partículas.

(e) *Densidade volumétrica*

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de densidade volumétrica obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na Tabela 5.26. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Tabela 5.26. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta densidade aparente (g/cm^3).

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------------|--------------|-------------------|
| Média | 0,313 | 0,011 | 28,89 | <0,0001 |
| T (L) | -0,029 | 0,010 | -2,83 | 0,025 |
| T (Q) | -0,018 | 0,011 | -1,57 | 0,160 |
| V (L) | 0,003 | 0,010 | 0,29 | 0,782 |
| V (Q) | -0,019 | 0,011 | -1,67 | 0,139 |
| C (L) | -0,009 | 0,010 | -0,93 | 0,384 |
| C (Q) | -0,012 | 0,011 | -1,04 | 0,335 |
| T x V | -0,011 | 0,013 | -0,85 | 0,425 |
| T x C | -0,009 | 0,013 | -0,66 | 0,531 |
| V x C | 0,005 | 0,013 | 0,40 | 0,704 |

A resposta densidade volumétrica das partículas apresentou um coeficiente de determinação menor do que 70%, por isso não foi possível a obtenção do modelo. Entretanto, comparando-se os experimentos de mesma vazão de alimentação e concentração de agente carreador (1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8) observou-se, de maneira geral, que o aumento da temperatura do ar secagem provocou diminuição da densidade aparente dos pós, sendo que a maior densidade aparente obtida correspondeu ao ensaio de menor temperatura do ar de secagem. Isso ocorre, segundo Goula, Adamopoulos e Kazakis (2004), porque altas temperaturas do ar de secagem levam a baixos conteúdos de umidade e adicionalmente ao aumento no tamanho da partícula, e conseqüentemente aumento do volume aparente, o que leva à redução da densidade do pó.

(f) *Rendimento do processo de secagem*

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de rendimento do processo de secagem obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na Tabela 5.27. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Tabela 5.27. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta rendimento do processo (%).

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| Média | 35,226 | 2,225 | 15,830 | <0,0001 |
| T (L) | 3,426 | 2,090 | 1,639 | 0,145 |
| T (Q) | -3,587 | 2,300 | -1,559 | 0,163 |
| V (L) | -7,460 | 2,090 | -3,569 | 0,009 |
| V (Q) | 1,038 | 2,300 | 0,451 | 0,666 |
| C (L) | -0,094 | 2,090 | -0,045 | 0,965 |
| C (Q) | -3,000 | 2,300 | -1,304 | 0,233 |
| T x V | -1,190 | 2,731 | -0,436 | 0,676 |
| T x C | -0,280 | 2,731 | -0,103 | 0,921 |
| V x C | 7,475 | 2,731 | 2,737 | 0,029 |

A resposta rendimento do processo de secagem apresentou um coeficiente de determinação menor do que 70%, por isso não foi possível a obtenção do modelo. Analisando-se os resultados obtidos, em geral, observou-se que baixas vazões de alimentação causaram o aumento no rendimento do processo, além disso, foi observado um efeito de interação da concentração de maltodextrina com a vazão de alimentação. Toneli (2006), em seu trabalho com secagem de inulina em *spray dryer*, observou que o processo de transferência de calor e massa é mais eficiente quando realizado sob maiores temperaturas do ar de secagem e menores vazões mássicas de produto, aumentando o rendimento do processo; resultados similares foram também obtidos por Cai e Corke (2000) na secagem por *spray dryer* de pigmentos de betacianinas.

Em resumo, os coeficientes de regressão dos modelos codificados, ajustados para as respostas, estão apresentados na Tabela 5.28.

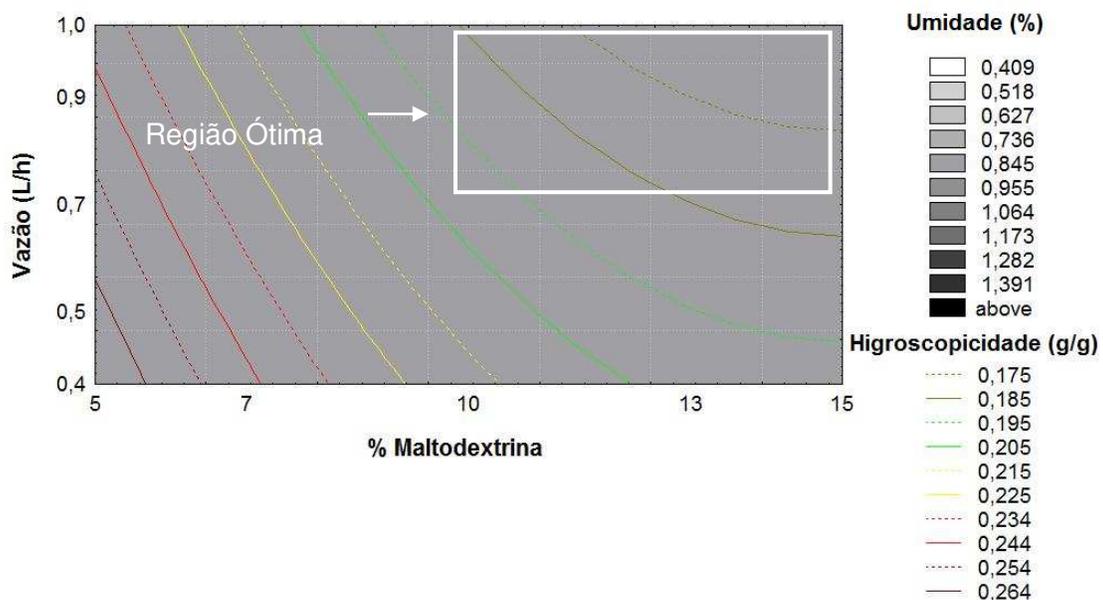
Tabela 5.28. Coeficientes de regressão obtidos para todas as respostas do planejamento experimental, para a maltodextrina ($p \leq 0,10$).

| Coefficientes de Regressão | X (% b.s.) | H | D_{4,3} (µm) |
|-----------------------------------|-------------------|----------|-----------------------------|
| Média | 0,797 | 0,201 | 7,171 |
| T (L) | -0,224 | - | 0,399 |
| T (Q) | 0,074 | - | - |
| V (L) | - | -0,010 | - |
| V (Q) | - | - | -0,519 |
| C (L) | - | -0,022 | 0,907 |
| C (Q) | - | 0,007 | - |
| T x V | - | - | - |
| T x C | -0,113 | - | - |
| V x C | - | - | -0,716 |
| R ² | 0,697 | 0,789 | 0,764 |

X: Umidade; H: higroscopicidade; D_{4,3}: diâmetro médio das partículas.

5.4.2 Otimização do processo de secagem para a maltodextrina

A otimização do processo de secagem por *spray dryer*, para a maltodextrina, teve por objetivo minimizar os valores de umidade e higroscopicidade do pó. Para isso fez-se a sobreposição das curvas de nível encontradas para as duas respostas analisadas. O gráfico de umidade está representado através de áreas, enquanto que o da higroscopicidade, através de linhas na Figura 5.28.



(a)

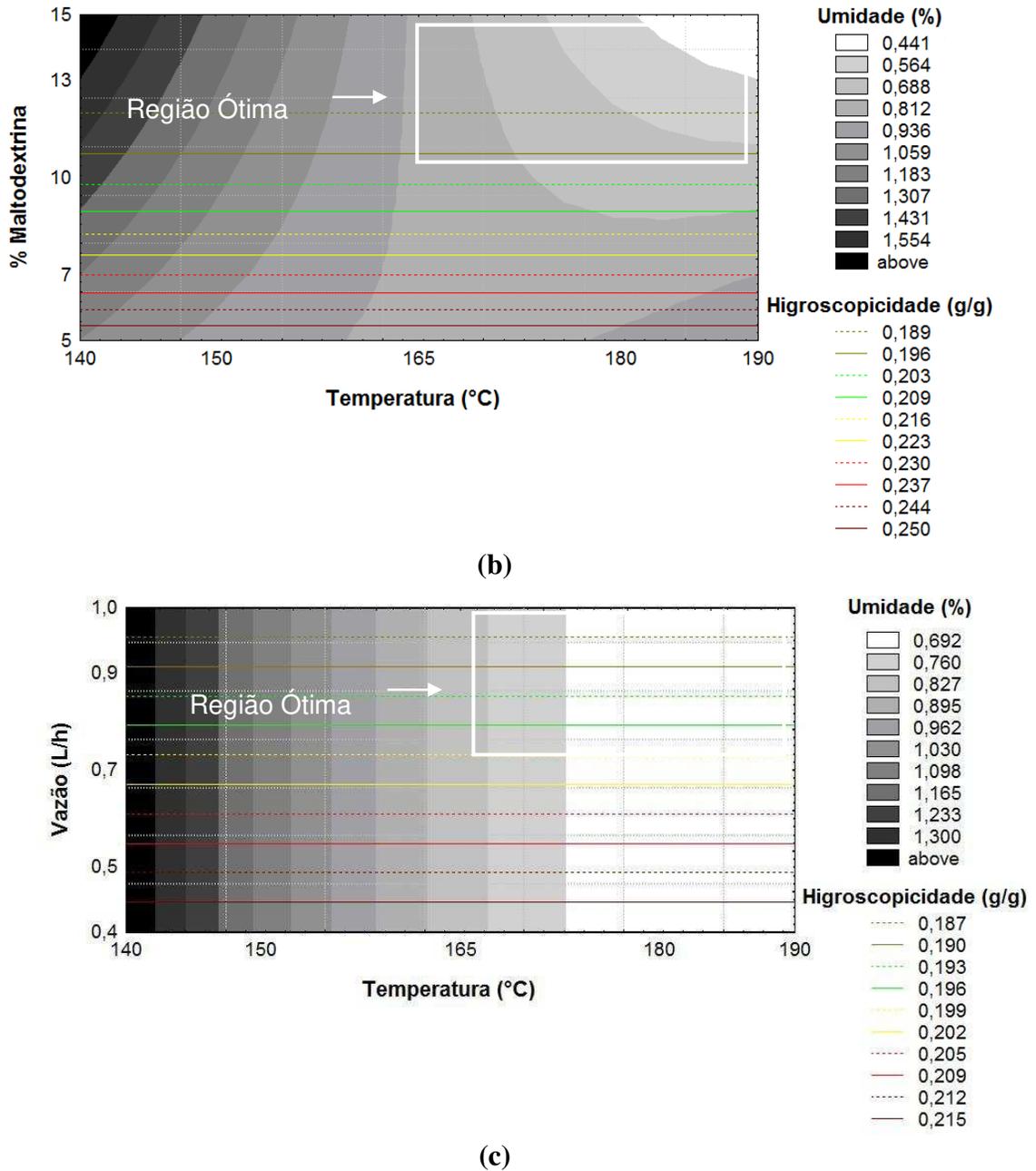


Figura 5.28. Sobreposição das curvas de nível de conteúdo de umidade (%) e de higroscopticidade (g água/g sólidos) à concentração de maltodextrina de 10%, na secagem por *spray dryer* do hidrolisado protéico da carne de mexilhão: à temperatura de 165°C (a), à vazão de 0,7 L/h (b) e à concentração de maltodextrina de 10% (c).

Pela Figura 5.28 (a), percebe-se que, à temperatura de 165°C, os menores valores de umidade e de higroscopticidade coincidem na mesma região, ou seja, à concentração

superior a 10% e valores de vazão de 0,7 a 1 L/h. Analisando-se as Figuras 5.28 (b) e (c) percebe-se que a região com os menores valores das respostas estudadas encontra-se na faixa de temperatura entre 165 e 190°C e concentração de maltodextrina superior a 10%. Assim, a faixa de temperatura ótima, de modo a obter os menores valores das duas respostas, encontra-se entre 165 e 190°C. Já a Figura 5.28 (c) mostra que a região ótima encontra-se em valores de vazão de 0,7 a 1 L/h.

Analisando de forma conjunta as Figuras 5.28 (a), (b) e (c) como condição ótima para a secagem por *spray dryer* do hidrolisado protéico da carne de mexilhão, a seguinte combinação das variáveis é sugerida: temperatura do ar de 180°C, concentração de maltodextrina de 15% e vazão de alimentação de 0,8 L/h, condições em que o conteúdo de umidade foi de $1,16 \pm 0,01$ %, em base seca, a higroscopicidade de $0,186 \pm 0,001$ g água/g sólidos, o diâmetro médio das partículas de $11,75 \pm 0,09$ μm e a densidade de $0,285 \pm 0,001$ g/cm³.

5.4.3 Agente carreador goma arábica

Os resultados experimentais, apresentados na Tabela 5.29, foram obtidos através da combinação das variáveis: temperatura do ar de secagem, vazão da alimentação e concentração de goma arábica, conforme Tabela 4.3.

Tabela 5.29. Resultados do planejamento experimental da secagem por *spray dryer* do hidrolisado protéico de mexilhão, com goma arábica.

| Ensaio | A _w | X (% b.s.) | H (g água/g sólidos) | ρ (g/cm ³) | RS (%) | T _s (°C) |
|--------|----------------|-------------|----------------------|------------------------|--------|---------------------|
| 1 | 0,144 ± 0,004 | 2,40 ± 0,54 | 0,288 ± 0,003 | 0,286 ± 0,001 | 27,60 | 94 ± 1 |
| 2 | 0,098 ± 0,001 | 1,19 ± 0,19 | 0,304 ± 0,004 | 0,251 ± 0,001 | 40,86 | 112 ± 1 |
| 3 | 0,163 ± 0,004 | 3,89 ± 0,08 | 0,267 ± 0,005 | 0,333 ± 0,001 | 25,86 | 78 ± 1 |
| 4 | 0,103 ± 0,001 | 2,69 ± 0,11 | 0,282 ± 0,007 | 0,333 ± 0,001 | 33,46 | 92 ± 2 |
| 5 | 0,110 ± 0,004 | 1,37 ± 0,12 | 0,242 ± 0,003 | 0,330 ± 0,001 | 40,85 | 93 ± 1 |
| 6 | 0,094 ± 0,004 | 0,65 ± 0,11 | 0,247 ± 0,002 | 0,286 ± 0,003 | 43,55 | 109 ± 1 |
| 7 | 0,142 ± 0,011 | 2,32 ± 0,22 | 0,226 ± 0,002 | 0,334 ± 0,002 | 29,05 | 79 ± 1 |
| 8 | 0,137 ± 0,002 | 0,70 ± 0,43 | 0,241 ± 0,001 | 0,331 ± 0,002 | 36,80 | 93 ± 1 |
| 9 | 0,182 ± 0,005 | 3,05 ± 0,18 | 0,249 ± 0,006 | 0,335 ± 0,002 | 34,47 | 78 ± 1 |
| 10 | 0,104 ± 0,005 | 0,50 ± 0,27 | 0,272 ± 0,001 | 0,285 ± 0,002 | 46,20 | 113 ± 1 |
| 11 | 0,107 ± 0,001 | 0,72 ± 0,25 | 0,264 ± 0,001 | 0,287 ± 0,002 | 36,28 | 104 ± 1 |
| 12 | 0,140 ± 0,004 | 2,16 ± 0,28 | 0,257 ± 0,001 | 0,334 ± 0,001 | 33,91 | 83 ± 1 |
| 13 | 0,136 ± 0,006 | 1,33 ± 0,45 | 0,301 ± 0,002 | 0,286 ± 0,001 | 27,31 | 96 ± 1 |
| 14 | 0,099 ± 0,003 | 1,18 ± 0,45 | 0,257 ± 0,002 | 0,286 ± 0,002 | 44,03 | 100 ± 1 |
| 15 | 0,108 ± 0,001 | 0,45 ± 0,21 | 0,276 ± 0,002 | 0,285 ± 0,001 | 49,01 | 106 ± 1 |
| 16 | 0,112 ± 0,001 | 0,69 ± 0,12 | 0,261 ± 0,003 | 0,284 ± 0,002 | 45,57 | 96 ± 1 |
| 17 | 0,117 ± 0,001 | 0,60 ± 0,15 | 0,260 ± 0,001 | 0,291 ± 0,001 | 42,60 | 101 ± 1 |

A_w: atividade de água; X: conteúdo de umidade; H: higroscopicidade; ρ: densidade aparente; RS: rendimento do processo de secagem; T_s: temperatura do ar de saída (°C).

(a) *Atividade de água*

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de atividade de água obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na Tabela 5.30. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança (p < 0,10).

Tabela 5.30. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta atividade de água.

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------|---------------|-------------------|
| Média | 0,113 | 0,005 | 20,992 | <0,0001 |
| T (L) | -0,038 | 0,005 | -7,498 | <0,0001 |
| T (Q) | 0,019 | 0,006 | 3,500 | 0,010 |
| V (L) | 0,023 | 0,005 | 4,488 | 0,003 |
| V (Q) | 0,006 | 0,006 | 1,014 | 0,345 |
| C (L) | -0,013 | 0,005 | -2,533 | 0,039 |
| C (Q) | 0,001 | 0,006 | 0,248 | 0,811 |
| T x V | -0,001 | 0,007 | -0,114 | 0,913 |
| T x C | 0,021 | 0,007 | 3,226 | 0,015 |
| V x C | 0,013 | 0,007 | 1,935 | 0,094 |

Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 90%, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F (Tabela 5.31).

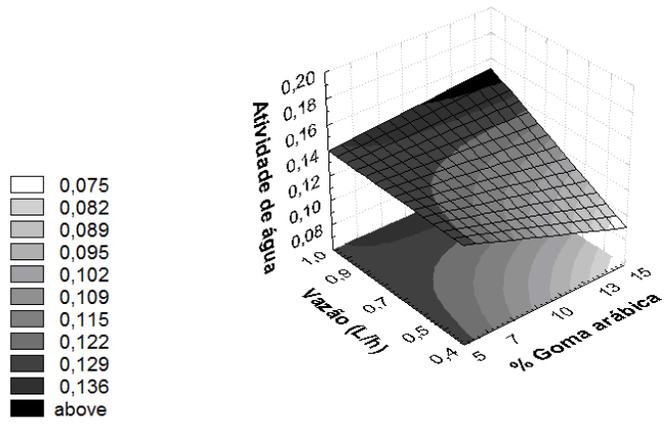
Tabela 5.31. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta atividade de água.

| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F _{calculado} | F _{tabelado} |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 0,00945 | 6 | 0,00157 | 22,56 | 2,46 |
| Resíduos | 0,00070 | 10 | 0,00007 | | |
| Falta de Ajuste | 0,00066 | 8 | 0,00008 | 97355,71 | 9,37 |
| Erro Puro | 0,00004 | 2 | 0,00002 | | |
| Total | 0,01015 | 16 | | | |

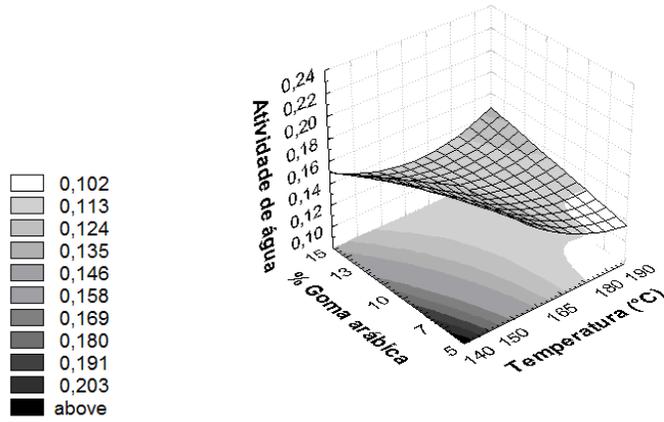
$$R^2 = 0,931$$

Na Figura 5.29, são mostradas as superfícies de resposta geradas através do modelo proposto para a resposta atividade de água, para a goma arábica.

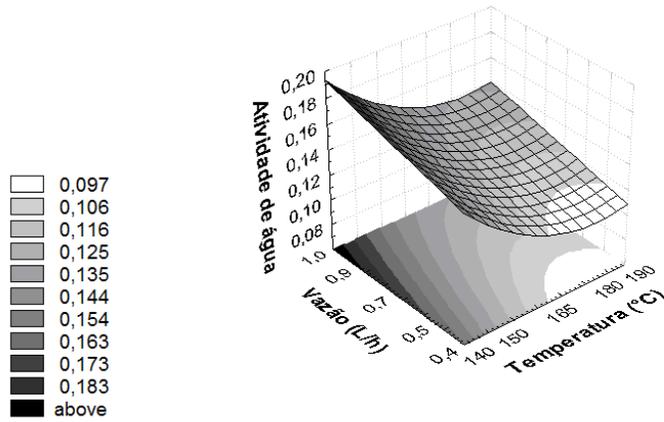
Observa-se através da Figura 5.29, diminuição da atividade de água como efeito conjunto de baixas vazões e altas concentrações de goma arábica. A atividade de água diminuiu com o aumento da concentração de goma arábica, uma vez que o aumento do conteúdo de sólidos reduziu a quantidade de água livre. A combinação de altas temperaturas e baixas vazões também diminuiu o valor da atividade de água. Além disso, altas temperaturas e baixas concentrações de agente carreador, também levaram à diminuição dessa propriedade.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.29. Influência das variáveis independentes sobre a resposta atividade de água: (a) $T = 165^{\circ}\text{C}$, (b) $V = 0,7 \text{ L/h}$ e (c) $C = 10\%$.

(b) *Conteúdo de umidade*

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de conteúdo de umidade obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na Tabela 5.32. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Tabela 5.32. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta umidade (% , b.s.).

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------------|---------------|----------------|
| Média | 0,556 | 0,293 | 1,971 | 0,099 |
| T (L) | -1,324 | 0,275 | -4,790 | 0,002 |
| T (Q) | 1,005 | 0,304 | 3,304 | 0,013 |
| V (L) | 0,939 | 0,276 | 3,400 | 0,011 |
| V (Q) | 0,767 | 0,304 | 2,529 | 0,039 |
| C (L) | -0,789 | 0,276 | -2,839 | 0,025 |
| C (Q) | 0,636 | 0,304 | 2,118 | 0,075 |
| T x V | -0,222 | 0,360 | -0,598 | 0,556 |
| T x C | 0,0175 | 0,360 | 0,007 | 0,963 |
| V x C | -0,497 | 0,360 | -1,347 | 0,210 |

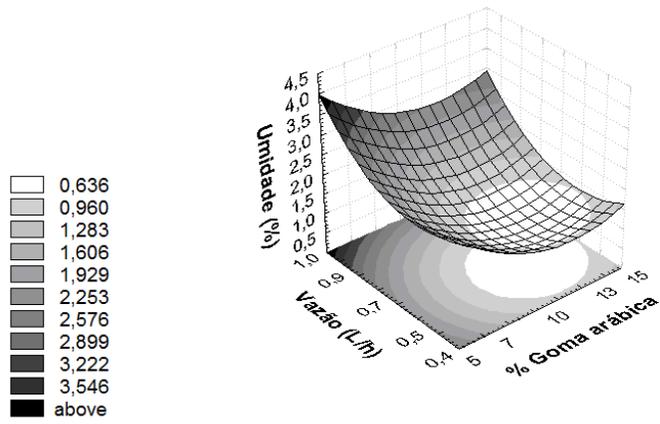
Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 90%, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F (Tabela 5.33).

Tabela 5.33. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta umidade.

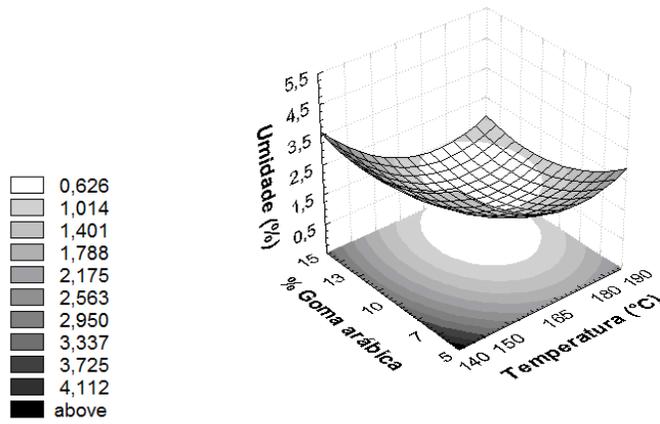
| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F_{calculado} | F_{tabelado} |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Regressão | 14,813 | 6 | 2,47 | 10,24 | 2,46 |
| Resíduos | 2,410 | 10 | 0,24 | | |
| Falta de Ajuste | 2,381 | 8 | 0,30 | 26,88 | 9,37 |
| Erro Puro | 0,029 | 2 | 0,01 | | |
| Total | 17,224 | 16 | | | |

$R^2 = 0,860$

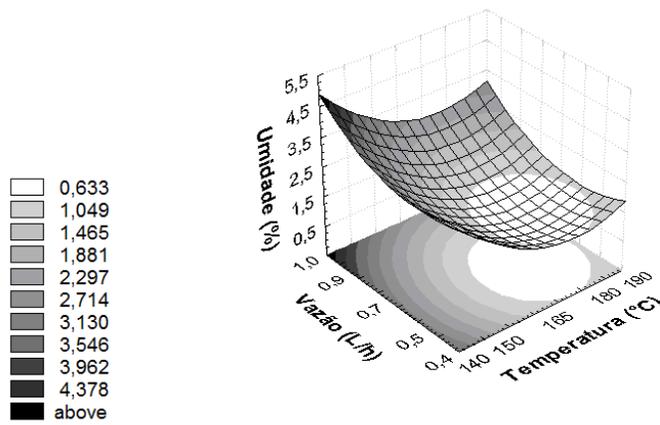
Na Figura 5.30, são mostradas as superfícies de resposta geradas através do modelo proposto para a resposta conteúdo de umidade.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.30. Influência das variáveis independentes sobre a resposta umidade: (a) $T = 165^{\circ}\text{C}$, (b) $V = 0,7 \text{ L/h}$ e (c) $C = 10\%$.

A Figura 5.30 mostrou efeito quadrático da concentração de goma arábica sobre o conteúdo de umidade dos pós, onde o aumento da concentração até 10% levou à diminuição do conteúdo de umidade. A adição de goma arábica na alimentação aumentou o conteúdo de sólidos, diminuindo a quantidade de água a ser evaporada e conseqüentemente reduzindo a umidade final do pó. Essa mesma tendência foi observada para melão em pó e suco de abacaxi em pó, quando a concentração de maltodextrina foi aumentada (QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007; ABADIO et al., 2004).

Além disso, observou-se efeito quadrático da temperatura do ar até 180°C sobre o conteúdo de umidade, onde o aumento da temperatura do ar levou à diminuição do conteúdo de umidade. Aumentando-se a temperatura do ar de secagem houve um maior gradiente de temperatura entre o produto atomizado e o ar de secagem, acarretando em maior transferência de calor, e conseqüentemente, maior evaporação de água do produto, resultando em umidades mais baixas. Este mesmo comportamento foi observado para a secagem por *spray dryer* para polpa de açaí, purê de batata doce, polpa de tomate e hidrolisado protéico de frango (TONON; BRABET; HUBINGER, 2008; GRABOWSKI; TRUONG; DAUBERT, 2006; GOULA; ADAMOPOULOS; KAZAKIS, 2004; KUROZAWA et al. 2009a).

Finalmente, a vazão de alimentação apresentou efeito quadrático sobre o conteúdo de umidade, onde o aumento da vazão de alimentação levou ao aumento do conteúdo de umidade. Aumentando-se a vazão, o tempo de contato das gotículas de produto com o ar de secagem é reduzido, diminuindo a eficiência da transferência de calor, levando ao aumento da umidade final do pó. Resultados similares foram encontrados por Chegini e Ghobadian (2005) e por Kurozawa et al. (2009a) para suco de laranja em pó e hidrolisado protéico de peito de frango em pó, respectivamente.

(c) *Higroscopicidade*

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de conteúdo de umidade obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na Tabela 5.34. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Tabela 5.34. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta higroscopicidade (g água/g sólidos).

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| Média | 0,266 | 0,006 | 46,243 | <0,0001 |
| T (L) | 0,013 | 0,005 | 2,431 | 0,045 |
| T (Q) | -0,006 | 0,006 | -0,960 | 0,369 |
| V (L) | -0,011 | 0,005 | -2,082 | 0,076 |
| V (Q) | -0,006 | 0,006 | -0,960 | 0,369 |
| C (L) | -0,038 | 0,005 | -7,021 | <0,0001 |
| C (Q) | 0,007 | 0,006 | 1,242 | 0,254 |
| T x V | 0,002 | 0,007 | 0,319 | 0,759 |
| T x C | -0,003 | 0,007 | -0,390 | 0,708 |
| V x C | 0,005 | 0,007 | 0,744 | 0,481 |

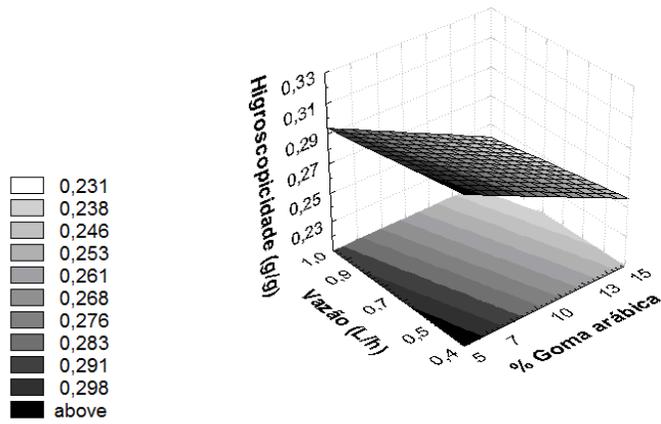
Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 90%, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F (Tabela 5.35).

Tabela 5.35. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta higroscopicidade.

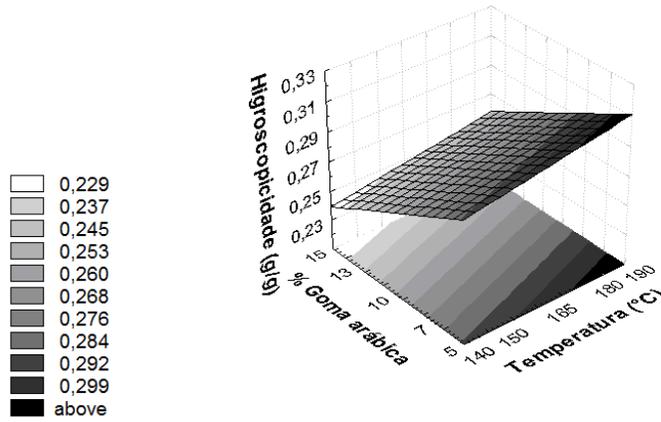
| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F_{calculado} | F_{tabelado} |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Regressão | 0,01 | 3 | 0,0020 | 20,67 | 2,56 |
| Resíduos | 0,001 | 13 | 0,0001 | | |
| Falta de Ajuste | 0,0011 | 11 | 0,0001 | 111695,00 | 9,40 |
| Erro Puro | 0,0002 | 2 | 0,0001 | | |
| Total | 0,0072 | 16 | | | |

$$R^2 = 0,827$$

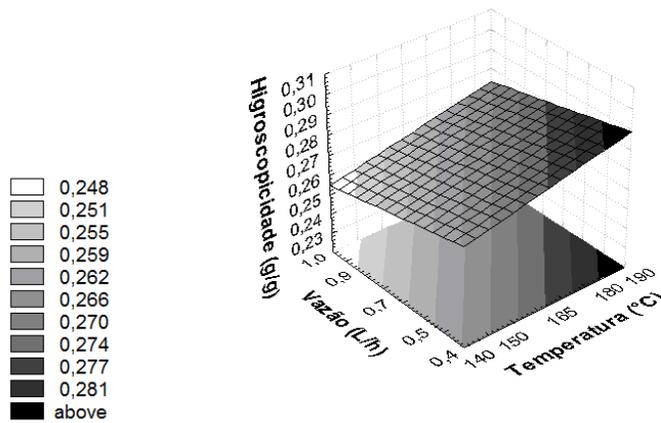
Na Figura 5.31, são mostradas as superfícies de resposta geradas através do modelo proposto para a resposta higroscopicidade.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.31. Influência das variáveis independentes sobre a resposta higroscopicidade: (a) $T = 165^{\circ}\text{C}$, (b) $V = 0,7 \text{ L/h}$ e (c) $C = 10\%$.

Analisando-se a Figura 5.31, conclui-se que ao aumentar a concentração de goma arábica, reduziu-se a adesividade do pó e consequentemente a higroscopicidade. Além disso, quando a vazão de alimentação é aumentada, utilizando altas concentrações de goma arábica ou baixas temperaturas do ar de secagem, observou-se diminuição da higroscopicidade. De acordo com Goula e Adamopoulos (2004), a higroscopicidade do tomate em pó aumentou inversamente com o conteúdo de umidade dos pós, como observado no presente estudo. Além disso, o efeito das variáveis de processo na higroscopicidade dos pós depende do efeito das mesmas na T_g (GOULA; ADAMOPOULOS, 2008).

(d) *Densidade aparente*

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de densidade volumétrica obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na Tabela 5.36. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Tabela 5.36. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta densidade aparente (g/cm^3).

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| Média | 0,286 | 0,006 | 45,985 | <0,0001 |
| T (L) | -0,024 | 0,006 | -4,160 | 0,004 |
| T (Q) | 0,020 | 0,006 | 3,076 | 0,018 |
| V (L) | 0,038 | 0,006 | 6,440 | <0,0001 |
| V (Q) | 0,020 | 0,006 | 3,131 | 0,017 |
| C (L) | 0,011 | 0,006 | 1,955 | 0,092 |
| C (Q) | 0,003 | 0,006 | 0,436 | 0,676 |
| T x V | 0,019 | 0,008 | 2,488 | 0,042 |
| T x C | -0,003 | 0,008 | -0,393 | 0,706 |
| V x C | -0,020 | 0,008 | -2,618 | 0,034 |

Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 90%, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F (Tabela 5.37).

Tabela 5.37. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta densidade aparente.

| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F _{calculado} | F _{tabelado} |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 0,01067 | 7 | 0,00152 | 15,94 | 2,51 |
| Resíduos | 0,00086 | 9 | 0,00010 | | |
| Falta de Ajuste | 0,00083 | 7 | 0,00012 | 58923,21 | 9,35 |
| Erro Puro | 0,00003 | 2 | 0,00001 | | |
| Total | 0,01153 | 16 | | | |

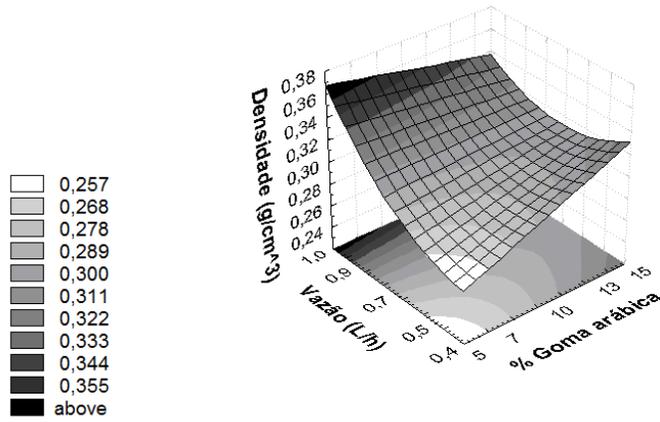
R² = 0,925

Na Figura 5.32, são mostradas as superfícies de resposta geradas através do modelo proposto para a resposta densidade aparente.

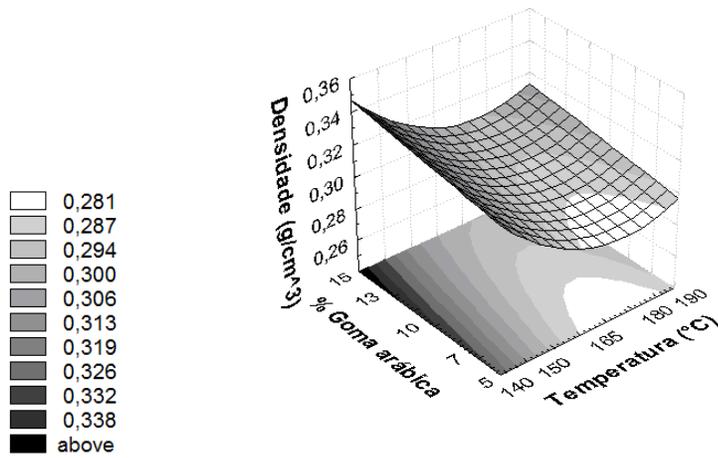
Os resultados apresentados na Figura 5.32 mostram que o aumento na temperatura do ar provoca maiores taxas de evaporação, em baixas concentrações de agente carreador ou em baixas vazões, levando à redução da densidade do pó. De acordo com Walton e Mumford (1999), em elevados valores de temperatura do ar de secagem, ocorre a rápida formação de uma camada seca superficial e formação de vacúlos no interior das partículas, em decorrência do *puffing* das partículas, aumentando o tamanho e resultando na diminuição da densidade do pó. Resultados similares foram observados por Goula e Adamopoulos (2004) e Cai e Corke (2000), para polpa de tomate e pigmentos de betacianina em pó.

Observa-se também que o aumento na concentração de goma arábica, em baixas temperaturas e baixas vazões, levou ao aumento da densidade do pó. Para Walton e Mumford (1999) e Nath e Satpathy (1998) geralmente a densidade do pó aumenta com o aumento da concentração de sólidos da alimentação do secador de *spray dryer*.

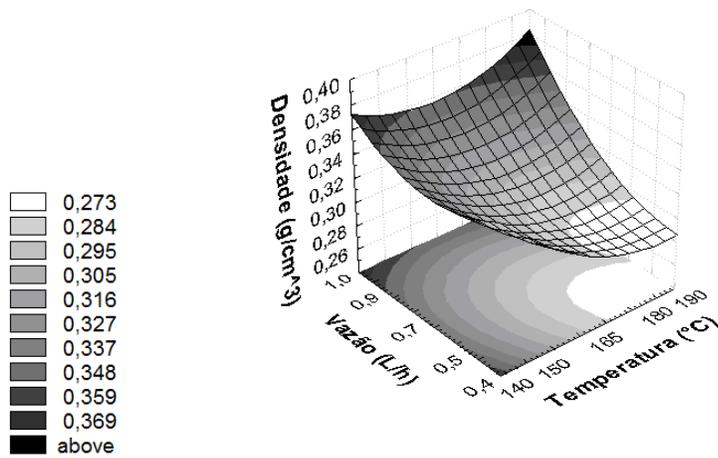
Foi verificado também que quando a vazão de alimentação foi aumentada, em baixas concentrações de agente carreador e baixas temperaturas do ar, resultou em menor taxa de transferência de calor, portanto em maior conteúdo de umidade residual, aumentando-se a densidade do pó (MASTERS, 1979).



(a)



(b)



(c)

Figura 5.32. Influência das variáveis independentes sobre a resposta densidade aparente: (a) $T = 165^{\circ}\text{C}$, (b) $V = 0,7 \text{ L/h}$ e (c) $C = 10\%$.

(e) *Rendimento do processo de secagem*

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de rendimento do processo de secagem obtidos na secagem do hidrolisado protéico de mexilhão, são apresentados na Tabela 5.38. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$).

Tabela 5.38. Efeito estimado, erro padrão, coeficiente t e significância estatística para cada fator no modelo codificado para a resposta rendimento de secagem.

| | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p-valor |
|--------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| Média | 45,842 | 2,016 | 22,736 | <0,0001 |
| T (L) | 7,478 | 1,895 | 3,946 | 0,006 |
| T (Q) | -4,594 | 2,088 | -2,201 | 0,064 |
| V (L) | -4,642 | 1,895 | -2,450 | 0,044 |
| V (Q) | -8,307 | 2,088 | -3,979 | 0,005 |
| C (L) | 7,411 | 1,895 | 3,911 | 0,006 |
| C (Q) | -7,899 | 2,088 | -3,784 | 0,007 |
| T x V | -0,153 | 2,475 | -0,062 | 0,953 |
| T x C | -2,603 | 2,475 | -1,052 | 0,328 |
| V x C | -2,353 | 2,475 | -0,951 | 0,373 |

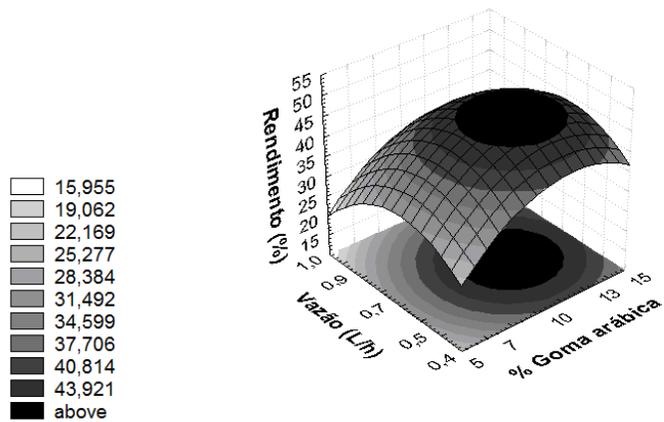
Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de confiança de 90%, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste-F (Tabela 5.39).

Tabela 5.39. Análise de variância do modelo ajustado para a resposta rendimento de secagem.

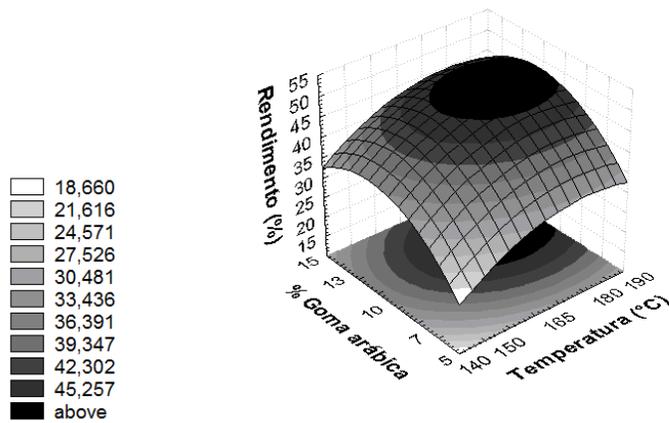
| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F_{calculado} | F_{tabelado} |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Regressão | 739,772 | 6 | 123,295 | 11,17 | 2,46 |
| Resíduos | 110,396 | 10 | 11,040 | | |
| Falta de Ajuste | 89,815 | 8 | 11,227 | 0,71 | 9,37 |
| Erro Puro | 20,581 | 2 | 10,290 | | |
| Total | 850,167 | 16 | | | |

$R^2 = 0,870$

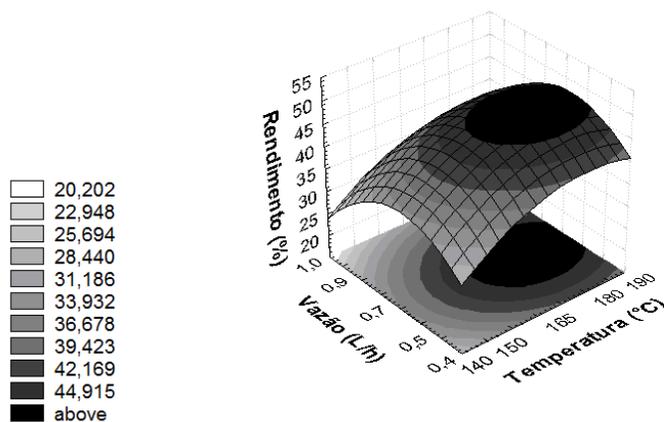
Na Figura 5.33, são mostradas as superfícies de resposta geradas através do modelo proposto para a resposta rendimento do processo de secagem.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.33. Influência das variáveis independentes sobre a resposta rendimento do processo de secagem: (a) $T = 165^{\circ}\text{C}$, (b) $V = 0,7 \text{ L/h}$ e (c) $C = 10\%$.

Analisando-se a Figura 5.33 observou-se efeito quadrático da temperatura do ar de secagem sobre o rendimento do processo de secagem, onde altas temperaturas do ar de secagem levaram ao aumento no rendimento do processo, pois aumentou-se a taxa de transferência de calor e massa do sistema. Além disso, observou-se que o aumento da concentração de goma arábica, usando altas temperaturas do ar de secagem, levaram ao aumento do rendimento do processo, devido à maior concentração de sólidos da alimentação.

Em resumo, os coeficientes de regressão dos modelos codificados, ajustados para as respostas, estão apresentados na Tabela 5.40.

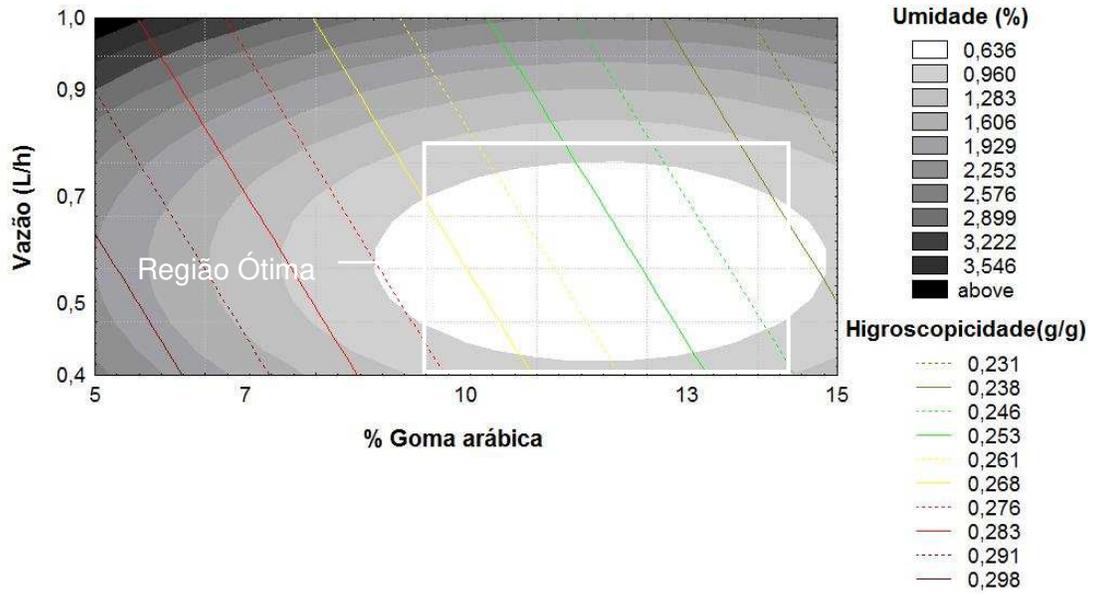
Tabela 5.40. Coeficientes de regressão obtidos para todas as respostas do planejamento experimental, para o agente carreador goma arábica ($p \leq 0,10$).

| Coeficientes de Regressão | A_w | X (% b.s.) | H (g água/g sólidos) | ρ (g/cm³) | RS (%) |
|----------------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------------|---|---------------|
| Média | 0,116 | 0,556 | 0,264 | 0,288 | 45,84 |
| T (L) | -0,019 | -0,663 | 0,007 | -0,012 | 3,74 |
| T (Q) | 0,009 | 0,502 | - | 0,009 | -2,30 |
| V (L) | 0,011 | 0,470 | -0,006 | 0,019 | -2,32 |
| V (Q) | - | 0,384 | - | 0,010 | -4,15 |
| C (L) | -0,006 | -0,394 | -0,019 | 0,006 | 3,71 |
| C (Q) | - | 0,318 | - | - | -3,95 |
| T x V | - | - | - | 0,010 | - |
| T x C | 0,011 | - | - | - | - |
| V x C | 0,006 | - | - | -0,010 | - |
| R ² | 0,931 | 0,860 | 0,827 | 0,925 | 0,870 |

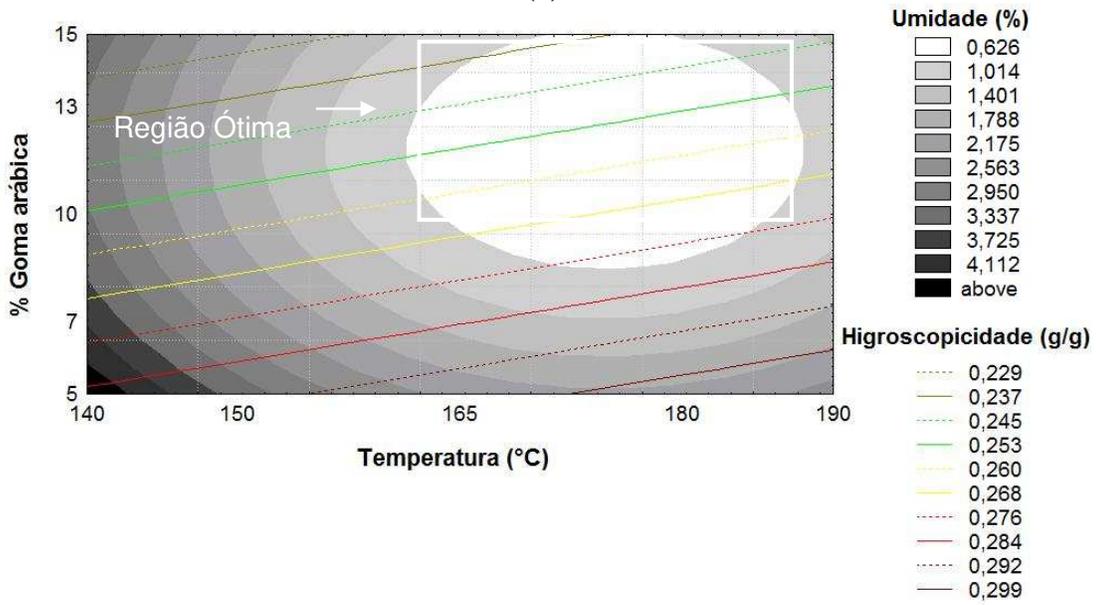
A_w: atividade de água, X: conteúdo de umidade, H: higroscopicidade, RS: rendimento do processo de secagem, ρ : densidade.

5.4.4 Otimização do processo de secagem para a goma arábica

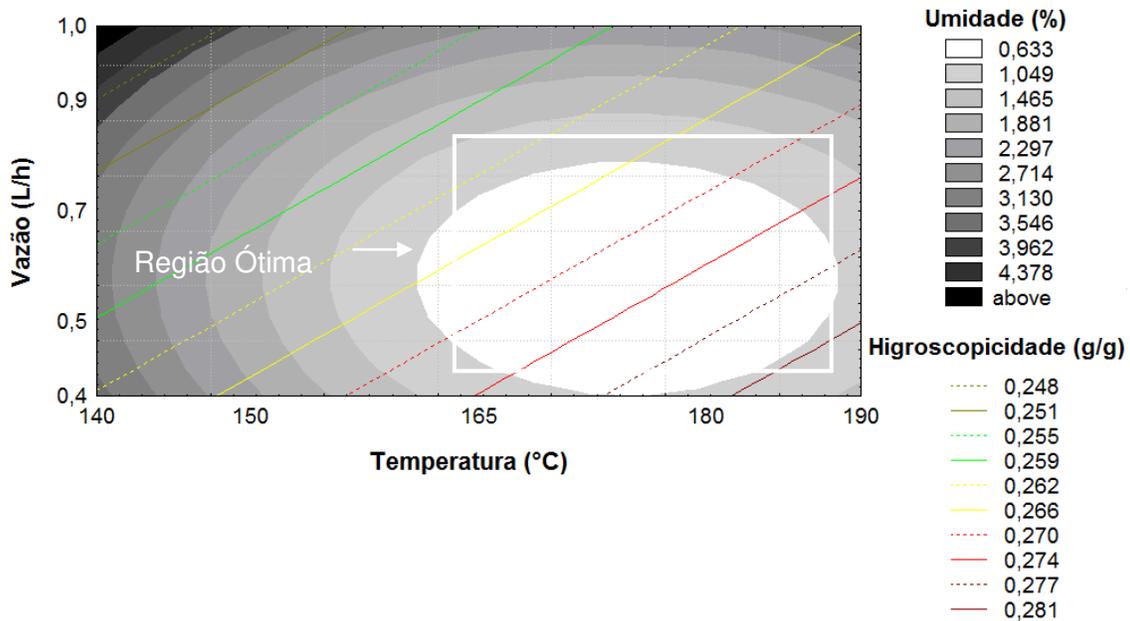
A otimização do processo de secagem por *spray dryer*, para a goma arábica, teve por objetivo minimizar os valores de umidade e higroscopicidade do pó. Para isso fez-se a sobreposição das curvas de nível encontradas para as duas respostas analisadas. O gráfico de umidade está representado através de áreas, enquanto que o da higroscopicidade, através de linhas nas Figuras 5.34



(a)



(b)



(c)

Figura 5.34. Sobreposição das curvas de nível de conteúdo de umidade (%) e de higroscopicidade (g água/g sólidos): (a) temperatura de 165°C, (b) vazão de 0,7 L/h e (c) concentração de goma arábica de 10%, na secagem por *spray dryer* do hidrolisado protéico da carne de mexilhão.

Pela Figura 5.34 (a), percebe-se que, à temperatura de 165°C, os menores valores de umidade e de higroscopicidade coincidem na mesma região, ou seja, à concentração superior a 10% e valores de vazão de 0,4 a 0,9 L/h. Analisando-se as Figuras 5.34 (b) e (c) percebe-se que a região com os menores valores das respostas estudadas encontra-se na faixa de temperatura entre 165 e 190°C e concentração de goma arábica superior a 10%. Assim, a faixa de temperatura ótima, de modo a obter os menores valores das duas respostas, encontra-se entre 165 e 190°C. Já a Figura 5.34 (c) mostra que a região ótima encontra-se em valores de vazão de 0,5 a 0,9 L/h.

Analisando de forma conjunta as Figuras 5.34 (a), (b) e (c), como condição ótima para a secagem por *spray dryer* do hidrolisado protéico da carne de mexilhão, a seguinte combinação das variáveis é sugerida: temperatura do ar de 180°C, concentração de goma arábica de 15% e vazão de alimentação de 0,8 L/h, condições em que o conteúdo de

umidade foi de $1,44 \pm 0,01$ %, em base seca, a higroscopicidade de $0,239 \pm 0,001$ g água/g sólidos, o diâmetro médio das partículas de $11,78 \pm 0,07$ μm e a densidade de $0,287 \pm 0,001$ g/cm³.

5.5 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS

Utilizando-se a condição de processo otimizada, de 180°C e vazão de alimentação de 0,8 L/h, adicionou-se ao estudo a concentração de agente carreador de 30%, muito utilizada para produção de micropartículas por *spray drying* (FUCHS et al., 2006; BARANAUSKIENÉ et al., 2007). O conteúdo de umidade das micropartículas produzidas com 30% de maltodextrina foi de $1,76 \pm 0,06$ %, em base seca, e a higroscopicidade de $0,171 \pm 0,002$ g água/g sólidos e das produzidas com 30% de goma arábica foi de $1,91 \pm 0,09$ %, em base seca, e a higroscopicidade de $0,235 \pm 0,003$ g água/g sólidos.

A Figura 5.35 apresenta a distribuição do tamanho das partículas do hidrolisado puro e dos pós obtidos com 15 e 30% de maltodextrina ou goma arábica.

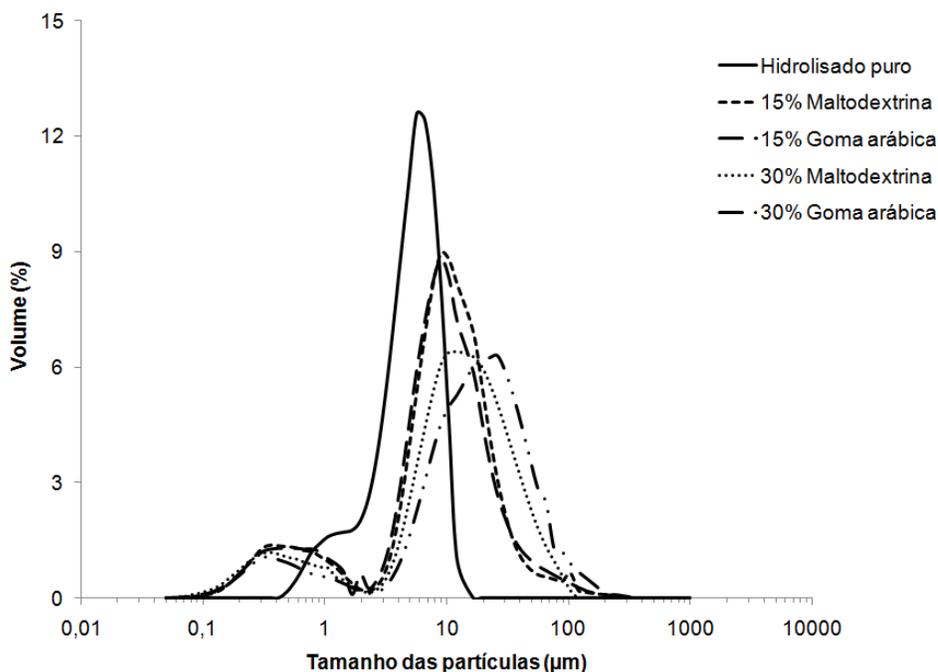


Figura 5.35. Distribuição do tamanho das partículas do hidrolisado puro em pó, com 15% de maltodextrina, 15% de goma arábica, 30% de maltodextrina e 30% de goma arábica.

O hidrolisado puro em pó, produzido à temperatura de 180°C e vazão de alimentação de 0,8 L/h, apresentou diâmetro médio de partícula de $4,79 \pm 0,02 \mu\text{m}$; o hidrolisado com 15% de maltodextrina de $11,75 \pm 0,09 \mu\text{m}$ e com 15% de goma arábica de $11,78 \pm 0,07 \mu\text{m}$. As micropartículas com 30% de maltodextrina apresentaram diâmetro médio de $16,50 \pm 0,44 \mu\text{m}$ e as produzidas com 30% de goma arábica de $22,53 \pm 0,35 \mu\text{m}$. Kurozawa, Park e Hubinger (2009b) obtiveram valores de tamanho de partícula para hidrolisado protéico de frango em pó variando de 5,9 a 15,6 μm , faixa de resultados próxima a obtida no presente estudo.

Os hidrolisados protéicos de mexilhão em pó obtidos utilizando agentes carreadores apresentaram distribuição do tamanho da partícula bi-modal. Com 15% de maltodextrina e 15% de goma arábica os dois tamanhos predominantes foram de 0,6 e 10 μm , já para os pós com 30% de maltodextrina e 30% de goma arábica os dois tamanhos predominantes foram de 0,6 e 10 μm e 0,6 e 20 μm , respectivamente. Já a distribuição do tamanho das partículas do hidrolisado puro não apresentou dois picos, mas sim um ombro (tamanho predominante de 1,5 μm), no pico principal de 6 μm , provavelmente devido a alta adesividade do pó, que formou pontes líquidas entre as partículas menores, aglomerando-as, aumentando o tamanho das partículas. Resultados similares foram obtidos por Kurozawa, Park e Hubinger (2009b) para os pós obtidos de hidrolisado protéico de peito de frango. O hidrolisado protéico de peito de frango puro em pó apresentou diâmetro médio de partícula de 5,8 μm e a distribuição apresentou um pico principal de 6 μm de tamanho e um ombro, com tamanho predominante de 1,5 μm . Os pós produzidos com os agentes carreadores apresentaram distribuição bi-modal, sendo que para aqueles produzidos 10, 20 e 30% de maltodextrina os diâmetros médios foram de 8,9, 8,9 e 13,4 μm , respectivamente, e para os pós produzidos com 10, 20 e 30% de goma arábica os diâmetros médios foram de 7,1, 7,7 e 19,2 μm , respectivamente.

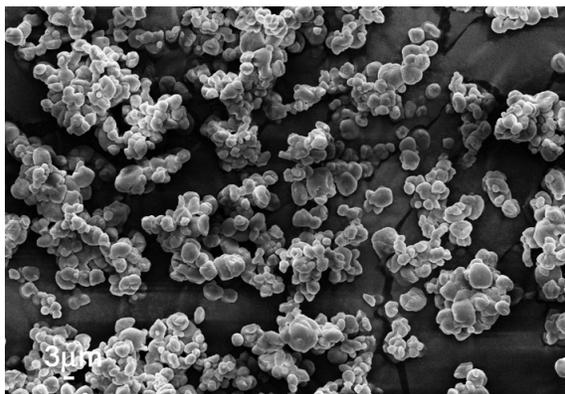
No sistema de secagem por *spray drying*, o tamanho das partículas de pó depende do tamanho das gotas atomizadas, que são afetadas pelo tipo de bico atomizador (rotativo ou do tipo duplo fluido), pelas propriedades físicas e concentração de sólidos da alimentação. O tamanho das gotas atomizadas normalmente aumenta com o aumento da concentração de sólidos da alimentação ou quando a viscosidade é aumentada e quando a

energia disponível para a atomização diminui, resultando na formação de partículas maiores (GOULA; ADAMOPOULOS, 2004).

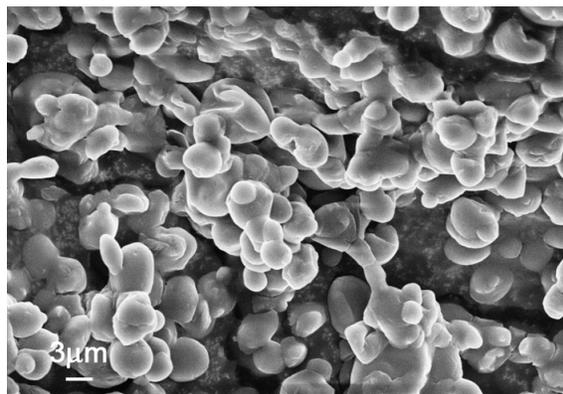
Como apresentado anteriormente, as micropartículas produzidas com 15% de maltodextrina, 30% de maltodextrina, 15% de goma arábica e 30% de goma arábica, apresentaram diâmetros médios de partícula de 11,75, 16,50, 11,78 e 22,53 μm , respectivamente, cujos valores de viscosidade da solução de alimentação foram de 0,0044, 0,0131, 0,0135 e 0,0765 Pa.s, respectivamente. Esse resultado mostra que a partir da concentração de 15% de goma arábica a solução de alimentação tem sua viscosidade elevada, já para o agente carreador maltodextrina o valor equivalente de viscosidade é obtido somente a partir da concentração de 30%.

5.6 MICROESTRUTURA DO HIDROLISADO PURO E DAS MICROPARTÍCULAS

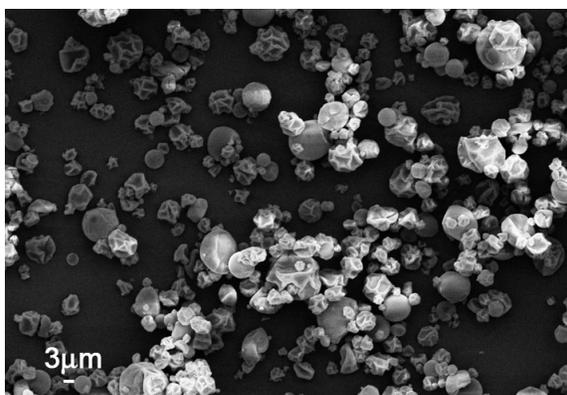
Na Figura 5.36, estão apresentadas as imagens obtidas do hidrolisado puro em pó e das micropartículas produzidas com maltodextrina 10 DE e goma arábica, observadas com o aumento de 2000 (1) e 5000x (2).



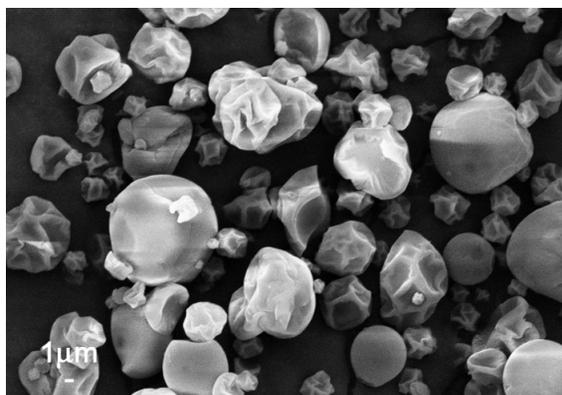
(a₁)



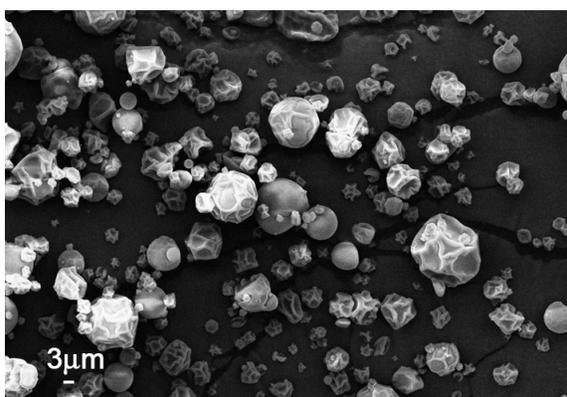
(a₂)



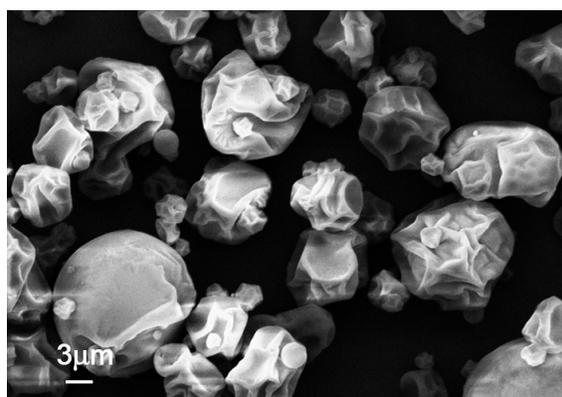
(b₁)



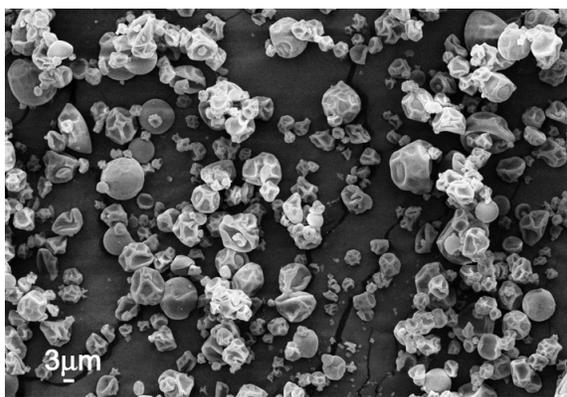
(b₂)



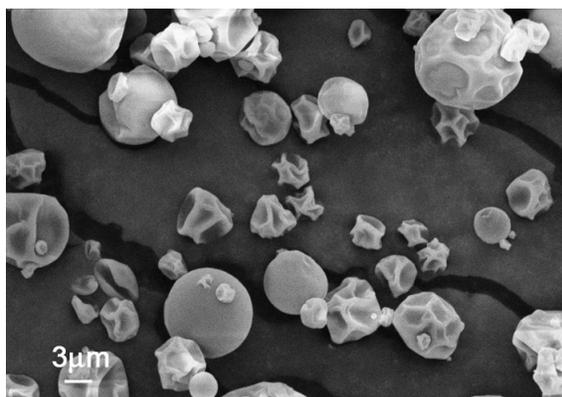
(c₁)



(c₂)



(d₁)



(d₂)

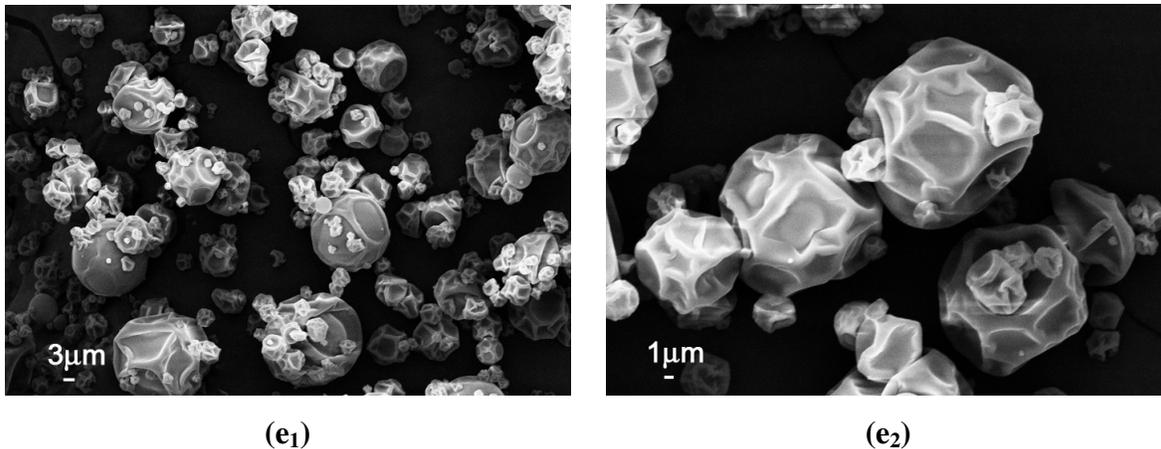


Figura 5.36. Imagens do hidrolisado puro em pó (a), 15% de maltodextrina (b), 30% de maltodextrina (c) 15% de goma arábica (d) e 30% de goma arábica (e), aumento de 2000 (₁) e 5000x (₂).

De acordo com a Figura 5.36, o hidrolisado protéico de mexilhão em pó puro apresentou partículas esféricas, com superfícies lisas, com tendência à aglomeração. Devido à elevada higroscopicidade do hidrolisado puro em pó, pode ter ocorrido absorção de umidade, provocando aglomeração do material e formação de pontes entre as partículas. Já as partículas produzidas com os agentes carreadores apresentaram-se menos higroscópicas, com as superfícies predominantemente rugosas, características de pós produzidos por *spray dryer*, sendo que as produzidas com 30% de agente carreador apresentaram-se maiores, esféricas e com superfície mais enrugada quando comparadas àquelas produzidas com a concentração de agente de 15%. Maior quantidade de dentes foi observada nas partículas produzidas com 30% de maltodextrina, 15% de goma arábica e 30% de goma arábica (Figura 5.36 c, d, e), sendo que essas amostras apresentaram os maiores valores de viscosidade da solução de alimentação, que foram de 0,0131, 0,0135 e 0,0765 Pa.s, respectivamente e conseqüentemente, o processo mais lento de formação do filme durante a secagem das gotículas atomizadas. As depressões presentes nas superfícies das micropartículas são resultantes da contração das partículas durante a secagem e o resfriamento (THIES, 2001). Ré (1998) afirma que as imperfeições superficiais, tais como rugosidade, fissuras ou colapsos, ocorrem quando há o lento processo de formação do filme durante a secagem das gotículas atomizadas, associando a presença de depressões

superficiais ao colapso sofrido pelas gotículas nos estágios iniciais do processo de secagem. Resultados similares foram observados por Kurozawa, Park e Hubinger (2009b) na microestrutura do hidrolisado protéico de peito de frango em pó, produzido com Alcalase[®]. As micropartículas produzidas com 10% de maltodextrina ou goma arábica, apresentaram-se esféricas, com a superfície lisa. Quando a concentração de agente carreador foi aumentada para 20 ou 30%, de maltodextrina ou goma arábica, a maioria partículas apresentou forma esférica com a superfície predominantemente rugosa e houve também a presença de partículas esféricas e ocas, onde o hidrolisado apresenta-se dissolvido em sua parede. Essa formação de esferas ocas foi relacionada a alguns fenômenos ocorridos na atomização e no processo de secagem por *spray drying*, como a dessorção de gases dissolvidos na solução, durante a secagem e subsequente expansão, formação de bolhas de vapor no interior das gotículas ou pela incorporação de ar nas gotículas de líquido durante a atomização.

Além disso, foi utilizado o software de análise de imagens Image J 1.36b ([HTTP://rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/)) para avaliar a relação entre o diâmetro e a distribuição das partículas, apresentadas no item 5.5, com os valores de diâmetro e distribuição das micropartículas obtidos pela análise das imagens de microestrutura eletrônica de varredura, onde foram avaliadas 500 micropartículas para cada tipo de pó. Na Tabela 5.41 estão apresentados os valores de diâmetros calculados por ambos os métodos, usando a Equação 4.9.

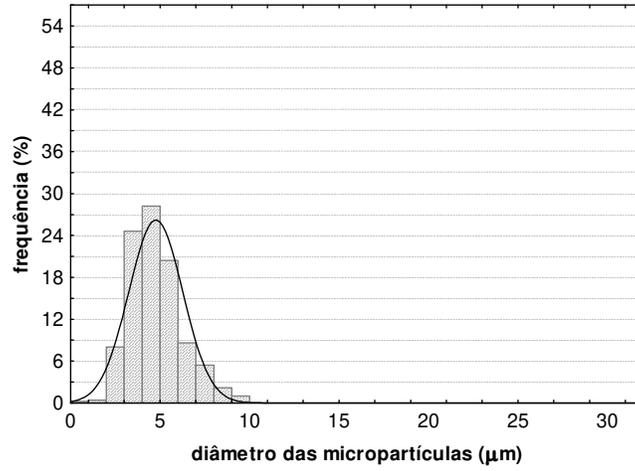
Tabela 5.41. Diâmetro das partículas do hidrolisado puro em pó e produzidas com os agentes carreadores, maltodextrina ou goma arábica.

| Amostra | Diâmetro – Equipamento com difração a laser (µm) | Diâmetro – Análise das imagens de MEV (µm) |
|------------------|--|--|
| Hidrolisado puro | 4,79 ± 0,02 | 6,02 ± 0,75 |
| 15% MD | 11,75 ± 0,09 | 11,59 ± 0,88 |
| 30% MD | 16,50 ± 0,44 | 13,10 ± 0,39 |
| 15% GA | 11,78 ± 0,07 | 11,23 ± 0,85 |
| 30% GA | 22,53 ± 0,35 | 17,46 ± 0,81 |

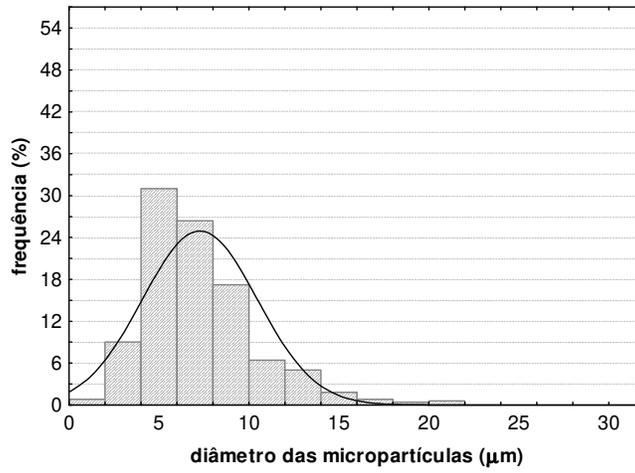
Onde: MD = maltodextrina 10 DE e GA = Goma arábica.

Através dos resultados apresentados na Tabela 5.41, pode-se dizer que há boa correspondência entre os valores de diâmetro das partículas obtidos por ambos os métodos. Pode-se dizer que os desvios obtidos, através da medida dos diâmetros das micropartículas, usando as imagens de microestrutura dos pós, foram maiores do que aqueles obtidos usando o equipamento com difração a laser. Além disso, foram obtidos valores maiores para o hidrolisado puro e menores para as microcápsulas produzidas com 30% de agente carreador, maltodextrina ou goma arábica; essas diferenças podem ter ocorrido devido algumas dificuldades de analisar as imagens, pois algumas partículas não eram perfeitamente esféricas, pela superposição e/ou aglomeração de outras, além de não terem sido observadas partículas finas de pó ($< 1 \mu\text{m}$), apresentadas na Figura 5.52, que podem ter sido perdidas nas etapas de fixação da amostra nos suportes metálicos e posterior metalização. A Figura 5.37 apresenta a distribuição do tamanho das micropartículas, determinadas através da análise das imagens das microestruturas, para isso considerou-se as partículas esféricas, mediu-se o diâmetro e calculou-se o $D_{4,3}$.

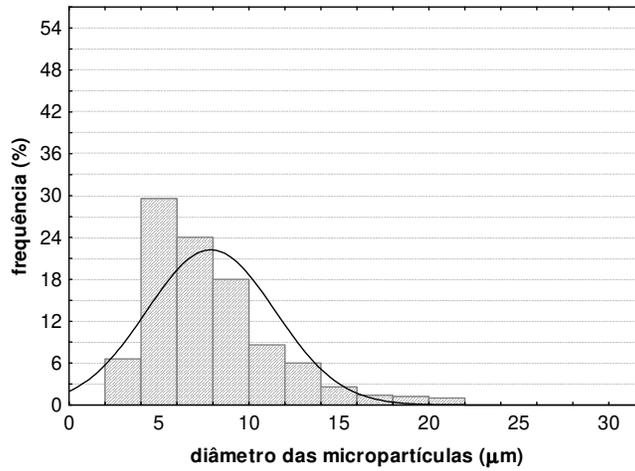
Através da Figura 5.37, observou-se distribuição monomodal das micropartículas e faixa de variação menor de tamanho das partículas do hidrolisado puro, quando comparado com as outras amostras. Contudo, a distribuição do tamanho das partículas, determinada utilizando o equipamento com difração a laser, apresentou-se bimodal (Figura 5.35) e essa diferença, em relação à análise feita pelas imagens de microestrutura, pode ser relacionada à maior dificuldade de determinação do diâmetro das partículas, através das imagens, como já foi explicado.



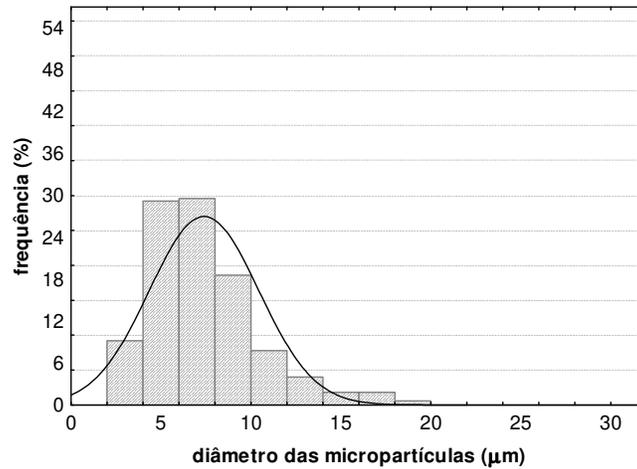
(a)



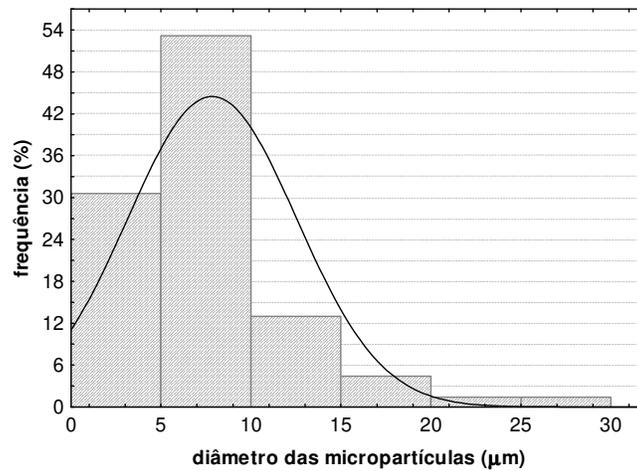
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 5.37. Distribuição do tamanho das micropartículas, do hidrolisado puro em pó (a), adicionado de 15% de maltodextrina (b), 30% de maltodextrina (c), 15% de goma arábica (d) e 30% de goma arábica (e) obtida através das imagens de microestrutura eletrônica de varredura.

5.7 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DO HIDROLISADO PURO E DAS MICROPARTÍCULAS

Os hidrolisados protéicos em pó puro e encapsulados com maltodextrina e goma arábica foram armazenados à temperatura de 25°C, em ambientes com diferentes umidades relativas, por um intervalo de tempo suficiente para que fosse atingido o equilíbrio. Uma vez que os produtos apresentavam baixa atividade de água, houve adsorção de água pelos pós em todas as condições. As Tabelas 5.42 e 5.43 apresentam os valores de umidade

relativa de equilíbrio do hidrolisado protéico em pó puro, formulado com maltodextrina e goma arábica e os agentes encapsulantes puros, para cada valor de atividade de água, respectivamente.

Tabela 5.42. Umidade de equilíbrio do hidrolisado protéico em pó puro e formulado com maltodextrina e goma arábica.

| Solução salina | Aw | Xe ± desvio (g água/g massa seca) | | | | |
|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 0% | 15% MD | 30% MD | 15% GA | 30% GA |
| LiCl | 0,113 | 0,0346 ± 0,0009 | 0,0235 ± 0,0016 | 0,0268 ± 0,0020 | 0,0099 ± 0,0013 | 0,0158 ± 0,0009 |
| CH ₃ COOK | 0,225 | 0,0625 ± 0,0082 | 0,0414 ± 0,0070 | 0,0435 ± 0,0032 | 0,0330 ± 0,0048 | 0,0328 ± 0,0005 |
| MgCl ₂ | 0,328 | 0,0853 ± 0,0022 | 0,0602 ± 0,0018 | 0,0567 ± 0,0017 | 0,0473 ± 0,0005 | 0,0516 ± 0,0017 |
| K ₂ CO ₃ | 0,432 | 0,1145 ± 0,0003 | 0,0865 ± 0,0078 | 0,0738 ± 0,0024 | 0,0704 ± 0,0012 | 0,0777 ± 0,0001 |
| Mg(NO ₃) ₂ | 0,529 | 0,1621 ± 0,0031 | 0,1105 ± 0,0060 | 0,0956 ± 0,0038 | 0,0952 ± 0,0050 | 0,1007 ± 0,0050 |
| KI | 0,689 | 0,3297 ± 0,0017 | 0,1842 ± 0,0169 | 0,1499 ± 0,0056 | 0,1702 ± 0,0038 | 0,1697 ± 0,0007 |
| NaCl | 0,753 | 0,4243 ± 0,0124 | 0,2590 ± 0,0066 | 0,1912 ± 0,0049 | 0,2577 ± 0,0032 | 0,1954 ± 0,0056 |
| KCl | 0,843 | 0,5727 ± 0,0102 | 0,3317 ± 0,0196 | 0,2476 ± 0,0034 | 0,3312 ± 0,0165 | 0,2560 ± 0,0046 |

Onde: MD = maltodextrina 10 DE e GA = Goma arábica.

Tabela 5.43. Umidade de equilíbrio dos agentes encapsulantes puros, maltodextrina 10 DE e goma arábica.

| Solução salina | Aw | Xe ± desvio (g água/g massa seca) | |
|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-----------------|
| | | Maltodextrina 10 DE | Goma arábica |
| LiCl | 0,113 | 0,0369 ± 0,0009 | 0,0538 ± 0,0014 |
| CH ₃ COOK | 0,225 | 0,0534 ± 0,0027 | 0,0727 ± 0,0014 |
| MgCl ₂ | 0,328 | 0,0553 ± 0,0010 | 0,0710 ± 0,0001 |
| K ₂ CO ₃ | 0,432 | 0,0695 ± 0,0011 | 0,0778 ± 0,0001 |
| Mg(NO ₃) ₂ | 0,529 | 0,0870 ± 0,0001 | 0,1126 ± 0,0020 |
| KI | 0,689 | 0,1251 ± 0,0001 | 0,1669 ± 0,0018 |
| NaCl | 0,753 | 0,1446 ± 0,0011 | 0,2096 ± 0,0028 |
| KCl | 0,843 | 0,1624 ± 0,0016 | 0,2541 ± 0,0068 |

Na Tabela 5.44 estão apresentados os parâmetros estimados dos modelos de isotermas de adsorção do hidrolisado protéico em pó puro, formulado com maltodextrina ou goma arábica e os agentes encapsulantes puros, bem como os respectivos coeficientes de determinação (R²) e desvios relativos médios (EM).

Tabela 5.44. Parâmetros estimados dos modelos de isotermas de adsorção do hidrolisado protéico em pó puro e formulado com maltodextrina e goma arábica.

| Modelos | Concentração (%) | Parâmetros de ajuste | | | R ² | EM (%) |
|------------------------|------------------|----------------------|-----------|-----------|----------------|--------|
| | | X_m | C_{GAB} | K_{GAB} | | |
| GAB | 0% | 0,137 | 2,27 | 0,94 | 0,990 | 10,00 |
| | 15% MD | 0,092 | 2,27 | 0,90 | 0,993 | 5,44 |
| | 30% MD | 0,070 | 3,54 | 0,88 | 0,997 | 5,30 |
| | 15% GA | 0,096 | 1,43 | 0,91 | 0,989 | 12,95 |
| | 30% GA | 0,095 | 1,96 | 0,83 | 0,998 | 4,80 |
| | MD pura | 0,059 | 10,54 | 0,79 | 0,983 | 6,97 |
| | GA pura | 0,060 | 23,69 | 0,93 | 0,984 | 8,39 |
| BET 2 parâmetros | | X_m | C_{BET} | | | |
| | 0% | 0,101 | 3,77 | | 0,975 | 10,38 |
| | 15% MD | 0,058 | 6,54 | | 0,971 | 10,74 |
| | 30% MD | 0,043 | 18,70 | | 0,966 | 10,10 |
| | 15% GA | 0,059 | 3,22 | | 0,971 | 19,02 |
| | 30% GA | 0,046 | 9,33 | | 0,950 | 23,40 |
| | MD pura | 0,031 | 2978852 | | 0,888 | 17,71 |
| GA pura | 0,047 | 2121123 | | 0,977 | 8,29 | |
| BET 3 parâmetros | | X_m | C_{BET} | N | | |
| | 0% | 0,139 | 1,35 | 12,99 | 0,997 | 9,87 |
| | 15% MD | 0,074 | 2,51 | 13,79 | 0,996 | 4,57 |
| | 30% MD | 0,052 | 5,82 | 13,68 | 0,999 | 2,18 |
| | 15% GA | 0,083 | 1,16 | 12,80 | 0,993 | 8,81 |
| | 30% GA | 0,069 | 2,15 | 9,78 | 0,999 | 2,15 |
| | MD pura | 0,044 | 22,98 | 8,70 | 0,994 | 4,17 |
| GA pura | 0,054 | 51,97 | 13,18 | 0,989 | 6,45 | |
| Halsey | | A_h | B_h | | | |
| | 0% | 0,132 | 0,862 | | 0,995 | 4,49 |
| | 15% MD | 0,080 | 0,926 | | 0,990 | 7,00 |
| | 30% MD | 0,045 | 1,115 | | 0,995 | 5,32 |
| | 15% GA | 0,091 | 0,813 | | 0,976 | 12,69 |
| | 30% GA | 0,075 | 0,894 | | 0,971 | 12,80 |
| | MD pura | 0,013 | 1,577 | | 0,986 | 7,72 |
| GA pura | 0,025 | 1,472 | | 0,960 | 14,12 | |
| Oswin | | A_o | B_o | | | |
| | 0% | 0,167 | 0,755 | | 0,987 | 10,82 |
| | 15% MD | 0,108 | 0,691 | | 0,989 | 6,68 |
| | 30% MD | 0,092 | 0,604 | | 0,995 | 3,01 |
| | 15% GA | 0,094 | 0,775 | | 0,982 | 8,46 |
| | 30% GA | 0,093 | 0,628 | | 0,986 | 9,28 |
| | MD pura | 0,084 | 0,418 | | 0,979 | 6,28 |
| GA pura | 0,112 | 0,500 | | 0,972 | 5,82 | |

| Modelos | Concentração (%) | Parâmetros de ajuste | | | | R ² | EM (%) |
|-----------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------|--------|
| | | <i>K_h</i> | <i>n_h</i> | | | | |
| Henderson | 0% | 3,065 | 0,841 | | | 0,983 | 10,82 |
| | 15% MD | 5,438 | 0,938 | | | 0,992 | 7,01 |
| | 30% MD | 9,363 | 1,111 | | | 0,989 | 8,62 |
| | 15% GA | 4,490 | 0,792 | | | 0,993 | 4,23 |
| | 30% GA | 6,634 | 0,957 | | | 0,999 | 1,64 |
| | MD pura | 30,54 | 1,552 | | | 0,977 | 13,13 |
| | GA pura | 12,88 | 1,361 | | | 0,933 | 21,96 |
| Peleg | | <i>K_a</i> | <i>K_b</i> | <i>n_a</i> | <i>n_b</i> | | |
| | 0% | 0,420 | 2,382 | 0,420 | 2,382 | 0,985 | 16,37 |
| | 15% MD | 0,226 | 2,047 | 0,226 | 2,047 | 0,977 | 15,68 |
| | 30% MD | 0,155 | 1,664 | 0,155 | 1,664 | 0,968 | 12,65 |
| | 15% GA | 0,247 | 2,453 | 0,247 | 2,453 | 0,981 | 19,40 |
| | 30% GA | 0,167 | 1,756 | 0,167 | 1,756 | 0,993 | 7,72 |
| | MD pura | 0,093 | 0,093 | 1,003 | 1,003 | 0,953 | 9,75 |
| GA pura | 0,147 | 0,147 | 1,278 | 1,278 | 0,933 | 12,43 | |

Onde: MD = maltodextrina 10 DE e GA = Goma arábica.

Os resultados experimentais apresentados na Tabela 5.44 e Figura 5.38 (a) e (b) mostram o aumento no conteúdo de umidade de equilíbrio com o aumento da atividade de água, a 25°C. Os dados experimentais de adsorção do hidrolisado puro em pó e formulado com agentes carreadores, apresentaram bons ajustes ao modelo de BET modificado ou com 3 parâmetros ($R^2 > 0,993$ e $E < 9,87$) e de GAB ($R^2 > 0,989$ e $E < 13\%$), sendo que as curvas obtidas apresentaram formato tipo III, de acordo com a classificação de Brunauer (BRUNAUER; EMMET; TELLER, 1938), as quais adsorvem pequena quantidade de água em baixos valores de atividade de água e elevada quantidade de água em altas umidades relativas; esse mesmo tipo de curva foi observado para hidrolisado protéico de peixe liofilizado e para hidrolisado protéico de peito de frango encapsulado com maltodextrina 10 DE e goma arábica (AGUILERA; LEVI; KAREL, 1993; KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009d).

O valor de X_m (umidade na monocamada molecular) calculado pelos modelos de BET (com 2 ou 3 parâmetros) e de GAB é de particular interesse, uma vez que indica a quantidade de água que está fortemente adsorvida aos sítios específicos na superfície do alimento e é considerado como o valor ótimo para assegurar sua estabilidade (FENNEMA, 1996). Os valores de X_m obtidos para o hidrolisado protéico de mexilhão em pó variaram

de 0,052 a 0,083 g água/g sólidos, utilizando agentes carreadores, e de 0,139 g água/g sólidos para o hidrolisado puro em pó, de acordo com o modelo de BET modificado; e de 0,070 a 0,096 g água/g sólidos, utilizando agentes carreadores, e de 0,137 g água/g sólidos para o hidrolisado puro em pó, de acordo com o modelo de GAB.

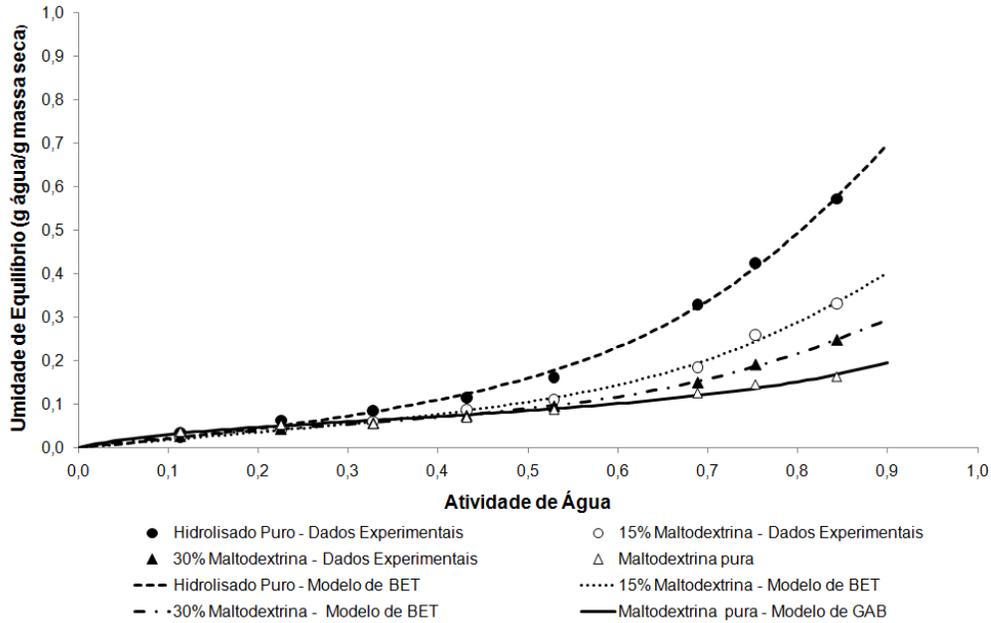
Existem alguns trabalhos que determinaram as isotermas de adsorção de hidrolisados protéicos em pó, utilizando diferentes substratos. Kurozawa, Park e Hubinger (2009d) determinaram as isotermas de adsorção do hidrolisado protéico de peito de frango puro, obtido por *spray drying*, cujo valor de X_m obtido pelo modelo de BET modificado foi de 0,153 g água/g sólidos. Já Aguilera, Levi e Karel (1993) encontraram valores de X_m de 0,062 g água/g sólidos para hidrolisado protéico de peixe liofilizado. Essa diferença entre os valores de X_m encontrada para o hidrolisado protéico de carne de mexilhão e aqueles obtidos em outros estudos pode ser atribuída à diferença na composição dos substratos utilizados para a produção do hidrolisado, o tipo de enzima utilizada e o grau de hidrólise alcançado na reação enzimática.

Pode-se ainda avaliar o tipo de agente carreador e o efeito da concentração de agente carreador sobre X_m . As micropartículas produzidas com maltodextrina 10 DE apresentaram menores valores de X_m do que as micropartículas produzidas com goma arábica, sendo que o valor de X_m das micropartículas produzidas com 15% e 30% de maltodextrina foram iguais a 0,074 g água/g sólidos e 0,052 g água/g sólidos, respectivamente. Já o valor de X_m para as micropartículas produzidas com 15% e 30% de goma arábica foram iguais a 0,083 g água/g sólidos e 0,069 g água/g sólidos, respectivamente. Resultados similares foram obtidos em outros trabalhos, Kurozawa, Park e Hubinger al. (2009d) observaram que com a adição de maltodextrina ou goma arábica ao hidrolisado protéico de peito de frango, houve diminuição de X_m (0,067 a 0,038 e 0,081 a 0,057 g água/g sólidos, respectivamente) com o aumento da concentração do agente carreador (maltodextrina ou goma arábica de 10 para 30%). Gabas et al. (2007) e Silva, Sobral e Kieckbusch (2006) verificaram esse comportamento ao compararem a sorção de umidade entre a polpa de abacaxi liofilizada pura (X_m de 0,166 g água/g massa seca, a 20°C) e encapsulada com maltodextrina (0,060 g água/g massa seca) ou goma arábica (0,072 g água/g massa seca); e polpa de camu-camu em pó pura (0,158 g água/g massa

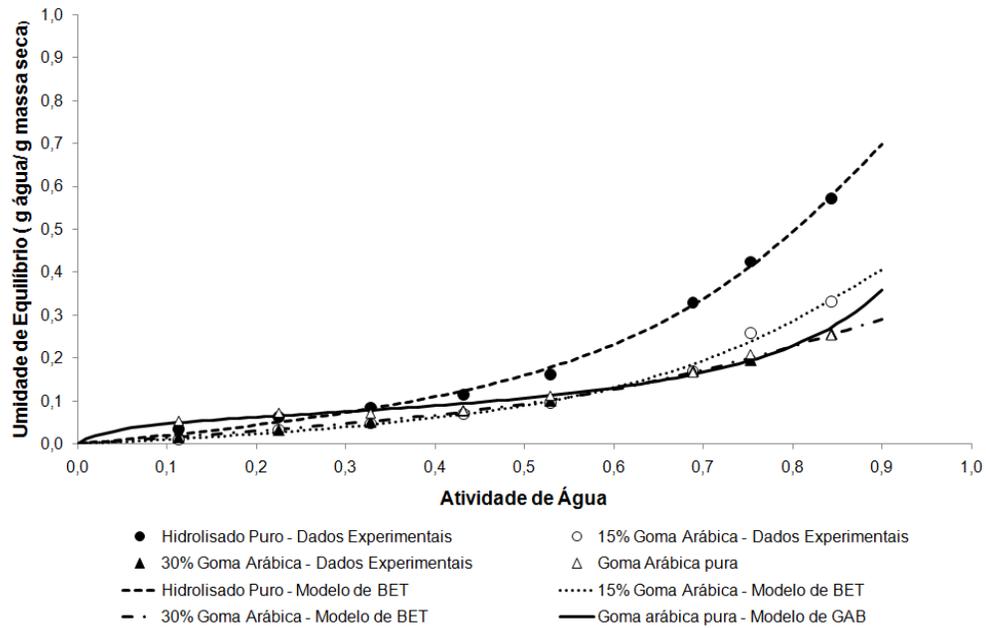
seca) e formulada com maltodextrina (0,064 g água/g massa seca). Pérez-Alonso et al. (2006) obtiveram valores de X_m entre 0,0696 e 0,0735 g água/g massa seca para a maltodextrina 10 DE e de 0,0811 e 0,1100 g água/g massa seca para a goma arábica, na faixa de 25 a 40°C. No presente trabalho obteve-se valores de X_m para a maltodextrina pura de 0,059 g água/ g massa seca e de 0,060 g água/ g massa seca para a goma arábica pura.

O modelo de GAB apresentou bom ajuste dos dados experimentais e é amplamente utilizado na literatura, por descrever bem as curvas de sorção de diversos alimentos. Através da análise matemática, Lewicki (1997) sugeriu que as constantes deveriam assumir valores na faixa de $0,24 \leq K_{GAB} \leq 1$ e $5,67 \leq C_{GAB} \leq \infty$, de modo a garantir boa descrição da curva sigmoideal e preencher os requisitos do modelo de BET, bem como assegurar que os valores da umidade na monocamada não diferenciem $\pm 15,5\%$ da real umidade. Entretanto, analisando a Tabela 5.44, observa-se que a constante C_{GAB} encontra-se fora do intervalo sugerido pelo autor, para o hidrolisado puro e produzido com os agentes encapsulantes. Já ao observar os valores de K_{GAB} e C_{GAB} para os agentes puros, maltodextrina 10 DE e goma arábica, verifica-se que estes valores estão de acordo com a análise matemática de Lewicki (1997). Dessa forma, o modelo de GAB é o mais adequado para os ajustes de dados das isotermas de adsorção de ambos os agentes encapsulantes, apresentando isoterma de adsorção com formato do tipo II, de acordo com a classificação de Brunauer, Emmet e Teller (1938).

A diferença na adsorção de água também pode estar relacionada ao tamanho das partículas produzidas com cada agente carreador. Quanto maior o tamanho das partículas menor é a área de superfície exposta e, conseqüentemente, menor a taxa de transferência de massa entre a partícula e o ambiente. Isso explica a maior adsorção de água apresentada pelas amostras produzidas com 15% de maltodextrina e 15% goma arábica que possuem diâmetros médios de 11,75 e 11,78 μm e valores de higroscopicidade de 0,186 e 0,239 g/g sólidos, respectivamente. Menor adsorção de umidade foi observada pelas partículas produzidas com 30% de maltodextrina e 30% de goma arábica, que possuem diâmetros de 16,50 e 22,53 μm e higroscopicidade de 0,171 e de 0,235 g/g sólidos, respectivamente.



(a)



(b)

Figura 5.38. Curvas de adsorção do hidrolisado de mexilhão puro e do hidrolisado protéico de mexilhão adicionado de maltodextrina (a) e goma arábica (b).

A Figura 5.39 mostra as alterações físicas ocorridas no hidrolisado puro e formulado com maltodextrina e goma arábica, armazenados em diferentes condições de umidade

relativa. Observa-se que o hidrolisado puro em pó é mais higroscópico do que as amostras formuladas com os agentes carreadores, as quais apresentaram maior estabilidade. Para o hidrolisado puro, o colapso ocorreu a partir do valor de atividade de água de 0,432, já para os hidrolisados contendo 15% e 30% maltodextrina, o colapso ocorreu a partir dos valores de atividades de água de 0,689 e 0,753, respectivamente, enquanto que para as amostras com goma arábica, o colapso ocorreu a partir do valor de atividade de água de 0,689 (nas concentrações de 15% e 30%).

O colapso (ou *caking*) é o fenômeno indesejável no qual o pó totalmente solto e com baixo teor de umidade começa a aglomerar, com conseqüente formação de torrões que, por fim, transformam-se em material adesivo e de baixa qualidade. A formação de pontes é o estágio inicial do colapso, e ocorre como resultado da deformação da superfície, estabelecendo-se pontos de contato entre as partículas, sem diminuição mensurável da porosidade. No início do colapso, essas pequenas pontes entre as partículas podem ser desintegradas com leve agitação. O estágio seguinte é aglomeração, que envolve a consolidação irreversível das pontes, mas a porosidade do sistema é mantida, resultando em grupos de partículas com integridade estrutural. A compactação é o estágio ainda mais avançado e está associada à perda pronunciada da integridade do sistema, como resultado do espessamento das pontes interpartículas devido à redução dos espaços entre as partículas e à deformação dos agrupamentos sob pressão. No estágio final do colapso, as pontes desaparecem, como resultado da liquefação da amostra, devido ao alto conteúdo de umidade, acarretando em solubilização das frações de baixo peso molecular (AGUILERA; DEL VALLE; KAREL, 1995).

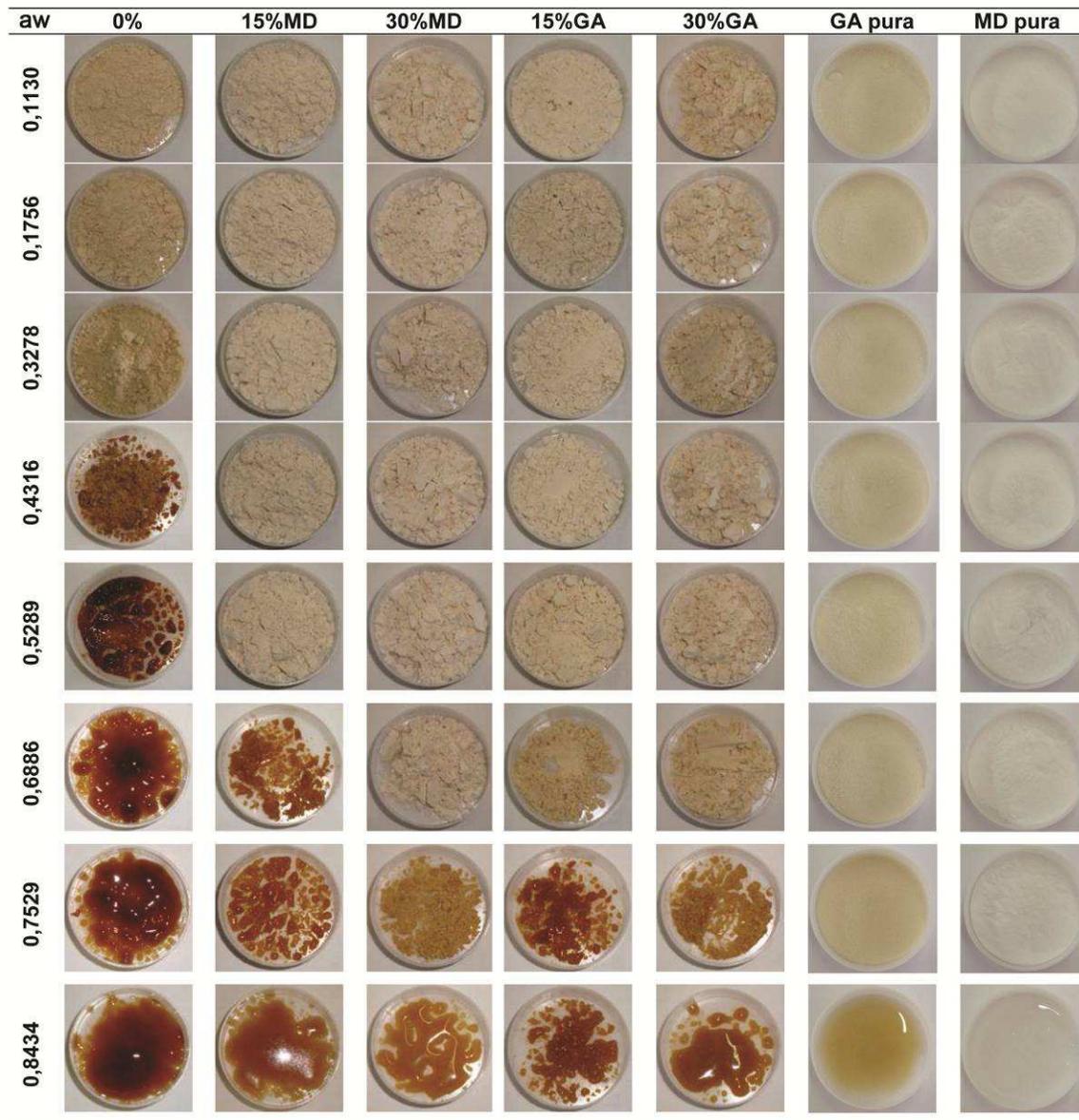
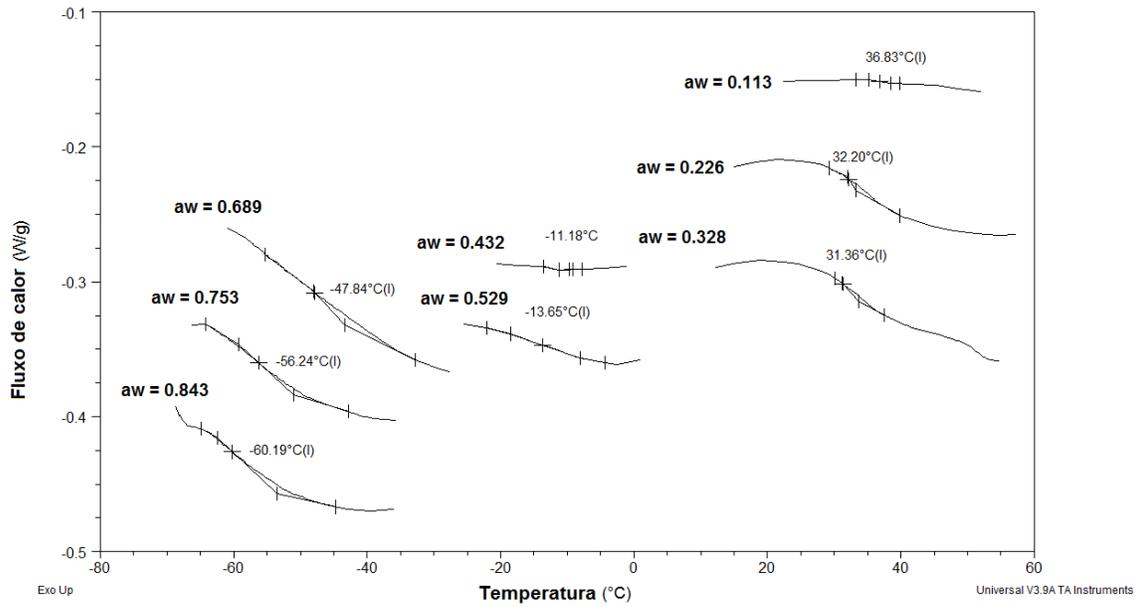


Figura 5.39. Alterações físicas ocorridas no hidrolisado puro, nos agentes carreadores puros e nas amostras formuladas com maltodextrina e goma arábica do hidrolisado protéico de mexilhão em pó.

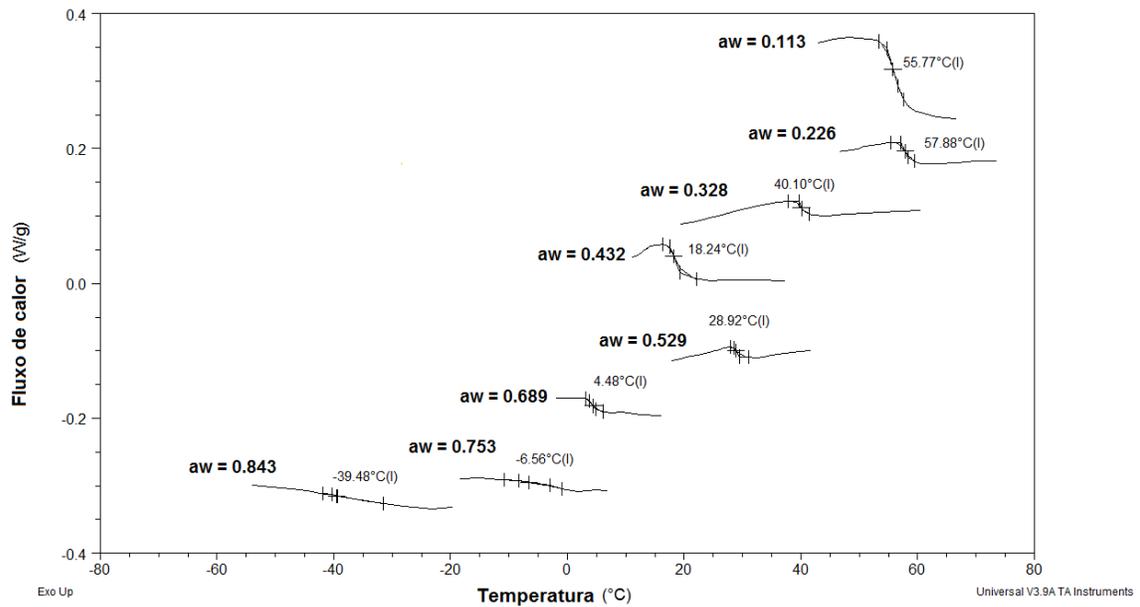
5.8 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA

A Figura 5.40 apresenta os valores obtidos de temperatura de transição vítrea para o hidrolisado puro em pó e adicionado de agentes carreadores, acondicionados em diferentes condições de umidade relativa do ambiente, a 25°C.

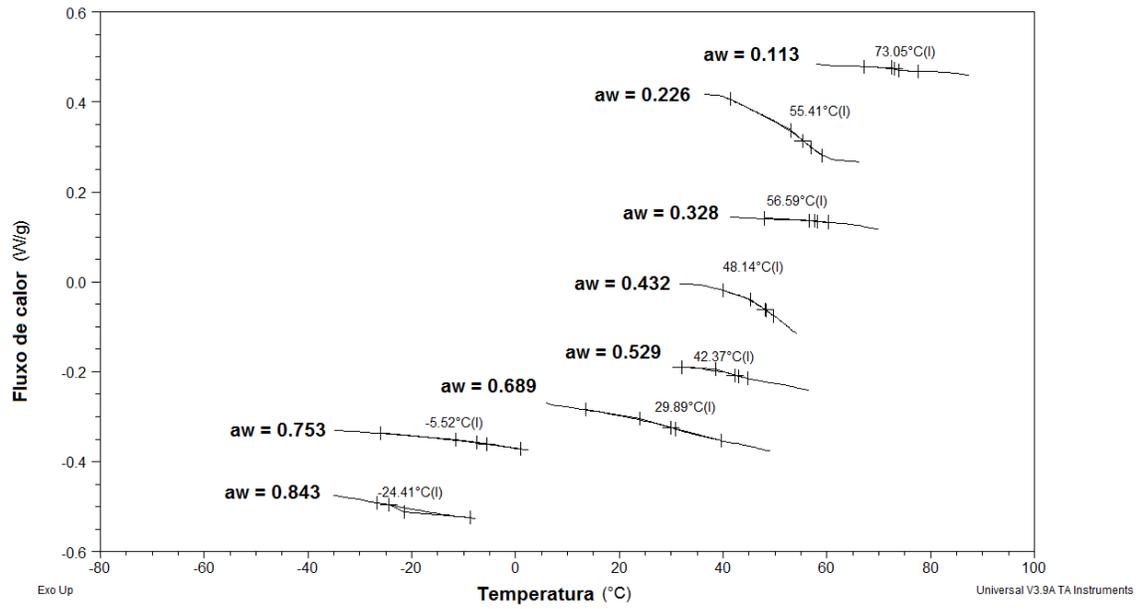
O forte efeito plasticizante da água na temperatura de transição vítrea foi verificado, com grande redução da T_g com o aumento da atividade de água, como era esperado. Para o hidrolisado puro, com o aumento da atividade de água de 0,113 para 0,843 houve redução no valor da T_g de 36,8°C para -60,2°C. Os valores encontrados de temperatura de transição vítrea estão de acordo com aqueles reportados para o hidrolisado protéico de peixe liofilizado, onde o aumento da atividade de água de 0,12 para 0,64 diminuiu a T_g de 23,9 para -42,8°C, respectivamente (AGUILERA; LEVI; KAREL, 1993). Os baixos valores de T_g encontrados para o hidrolisado de mexilhão puro podem ser explicados devido à presença de peptídeos de baixo peso molecular, resultantes da hidrólise enzimática das proteínas miofibrilares da carne de mexilhão. Hashimoto et al. (2004) observaram maiores valores de T_g para músculos de bonito, após tratamento térmico e liofilização (atividade de água de 0,11 até 0,01, T_g de 60 até 140°C, respectivamente) e Medina-Vivanco et al. (2007) também observaram maiores valores de T_g para filés de tilápia liofilizados (atividade de água de 0,11 até 0,85, T_g de 52,3 até -58,7°C, respectivamente), provavelmente pela presença de polímeros de alto peso molecular, como as proteínas miofibrilares actina e a miosina. Sablani et al. (2004) também observaram o efeito plasticizante da água em molusco seco por *spray drying* (atividade de água de 0,2 até 1,0, T_g de 90 até -30°C, respectivamente).



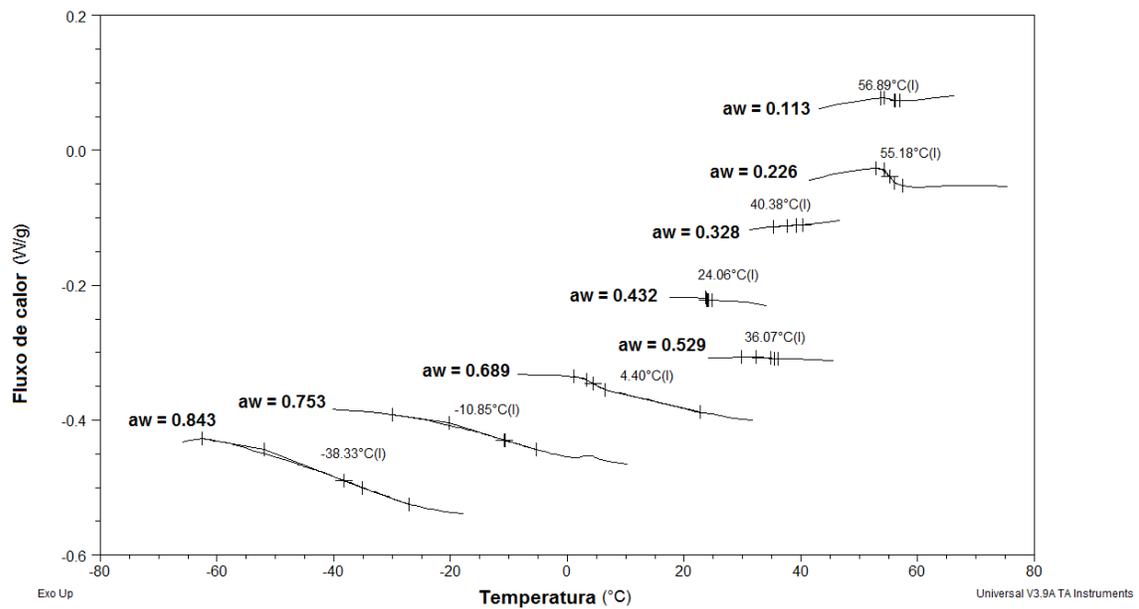
(a)



(b)



(c)



(d)

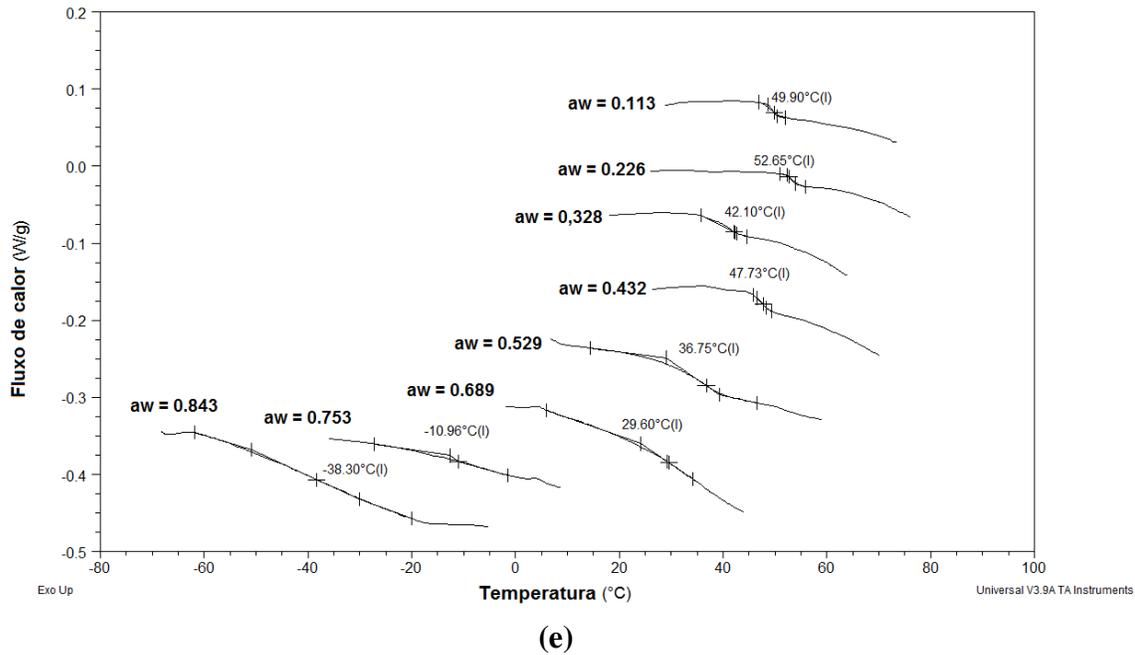


Figura 5.40. Temperaturas de transição vítrea obtidas para o hidrolisado puro (a), adicionado de 15% de maltodextrina (b), 30% de maltodextrina (c), 15% de goma arábica (d) e 30% de goma arábica (e).

Na Tabela 5.45 estão apresentados os valores dos parâmetros de ajuste da equação de Gordon-Taylor obtidos para o hidrolisado puro em pó e adicionado de agentes carreadores. Os dados experimentais apresentaram bons ajustes ao modelo de Gordon-Taylor com $R^2 > 0,948$ e desvios relativos menores que 2,70%.

Tabela 5.45. Parâmetros de ajuste da equação de Gordon-Taylor para o hidrolisado protéico em pó puro e formulado com maltodextrina e goma arábica.

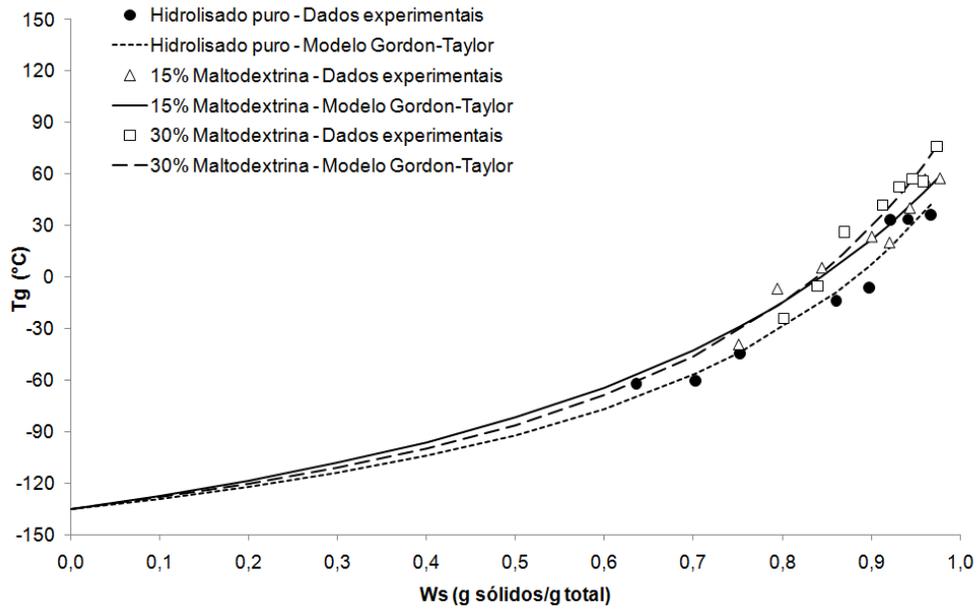
| Amostras em pó | T_{gs} (°C) | k_{GT} | R^2 | EM (%) |
|----------------|---------------|----------|-------|--------|
| 0% | 64,4 | 3,60 | 0,954 | 2,69 |
| 15% MD | 71,9 | 2,89 | 0,949 | 2,10 |
| 30% MD | 97,9 | 3,78 | 0,948 | 2,35 |
| 15% GA | 69,3 | 2,62 | 0,952 | 1,98 |
| 30% GA | 77,7 | 3,42 | 0,959 | 1,79 |

Onde: T_{gs} é a temperaturas de transição vítrea do sólido puro e k_{GT} é a constante de Gordon-Taylor; MD = maltodextrina 10 DE e GA = Goma arábica.

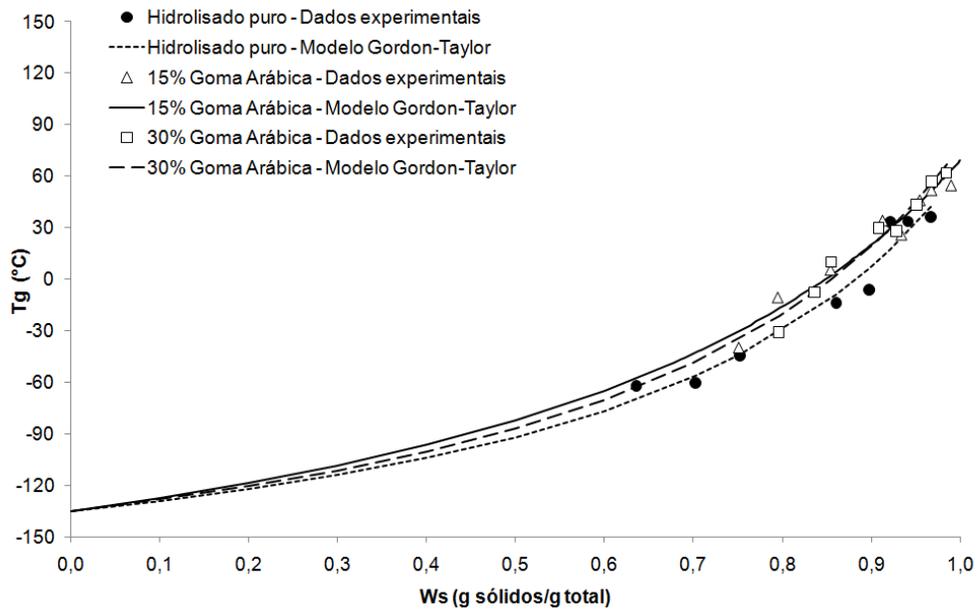
Na Tabela 5.45 pode ser observado o efeito dos agentes carreadores maltodextrina ou goma arábica, na temperatura de transição vítrea do hidrolisado protéico de mexilhão em pó. O uso de agentes carreadores levou ao aumento no valor de T_{gs} , que era de 64,4°C para o hidrolisado puro em pó, para valores acima de 69,3°C, quando adicionado de maltodextrina ou goma arábica, conseqüentemente aumentando a estabilidade dos pós. Resultados similares foram obtidos para o hidrolisado de peito de frango em pó que tinha valor de T_{gs} de 44,4°C, para o hidrolisado puro, e quando adicionado de 10% de maltodextrina ou goma arábica apresentou valores de T_{gs} de 91,90 e 94,70°C, respectivamente (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009d).

O valor de k_{GT} variou de 2,62 a 3,78. De acordo com Gordon e Taylor (1952), esse parâmetro controla o grau de curvatura da dependência da T_g em relação ao conteúdo de água (em sistema binário) e pode ser relacionado à força de interação entre os componentes do sistema. O valor do parâmetro k_{GT} para o hidrolisado protéico de peito de frango em pó puro e para o peixe liofilizado foi de 2,59 e 6,8, respectivamente (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009d; AGUILERA; LEVI; KAREL, 1993).

A Figura 5.41 apresenta os dados experimentais ajustados pelo modelo de Gordon-Taylor, bem como o efeito da concentração de maltodextrina ou goma arábica na temperatura de transição vítrea do hidrolisado protéico de mexilhão em pó. A T_g aumenta com o aumento da massa molecular, com isso, a adição de agentes carreadores como a maltodextrina 10 DE, que possui massa molecular de 1800g e T_g de 160°C (BHANDARI; HOWES, 2000), contribuiu para o aumento na estabilidade do sistema, aumentando a T_g . Observou-se maior elevação nos valores de T_g do pó puro quando adicionado de 15% de maltodextrina ou goma arábica, e menor aumento quando se eleva a concentração de agente carreador de 15 para 30%. Kurozawa, Park e Hubinger (2009d) observaram aumento da T_g utilizando 10% de maltodextrina ou goma arábica, na secagem por *spray dryer* do hidrolisado protéico de peito de frango, contudo, o aumento da concentração de 20 para 30% também apresentou pouca influência no valor de T_g .



(a)



(b)

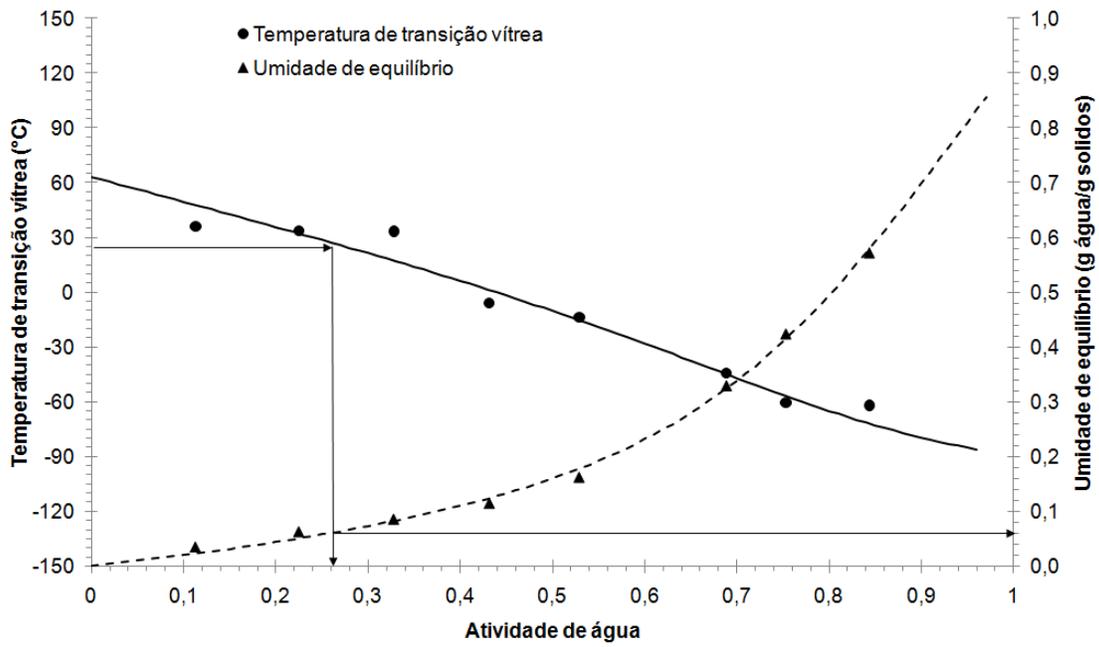
Figura 5.41. Efeito da fração de sólidos na temperatura de transição vítrea do hidrolisado protéico de mexilhão em pó formulado com: (a) maltodextrina e (b) goma arábica.

O conteúdo de água crítico e a atividade de água crítica são os valores obtidos quando a temperatura de transição vítrea do produto é igual à temperatura ambiente. Acima

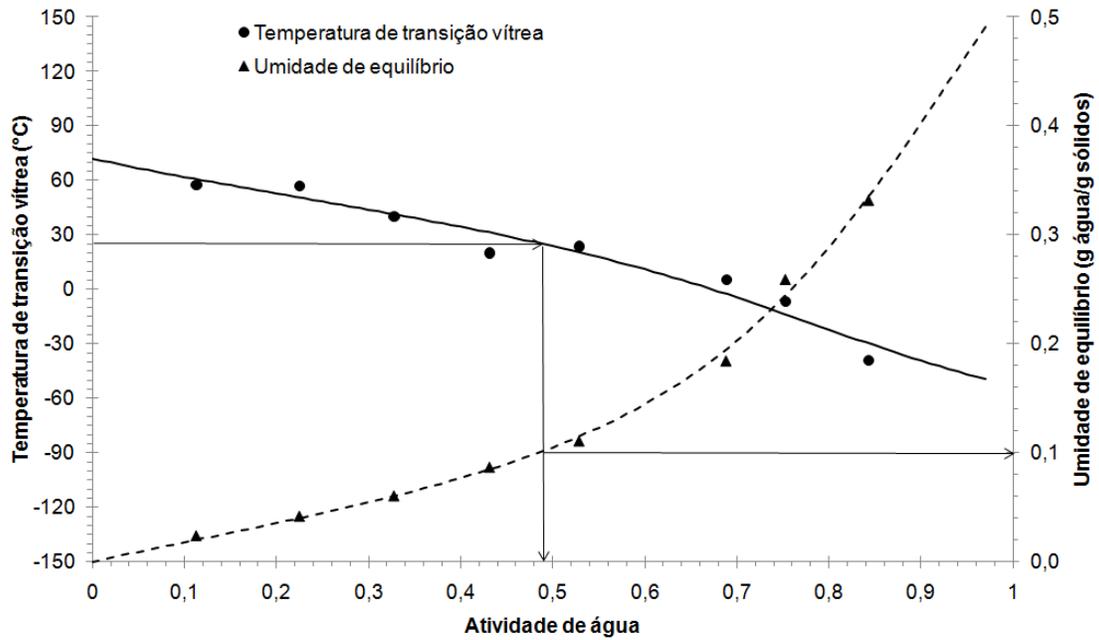
desse valor, os pós amorfos são suscetíveis a alterações indesejáveis como colapso, pegajosidade e caking, que levam à perda de qualidade. A estabilidade do produto amorfo é fortemente relacionada à T_g , que depende das condições de estocagem (atividade de água, umidade e temperatura). Os produtos amorfos são metaestáveis e estão sujeitos à aglomeração e a cristalização durante seu armazenamento (ROOS; KAREL, 1990).

De acordo com Roos (1995), a plasticização de sólidos é resultado combinado da umidade e da temperatura. Segundo o autor, a predição da estabilidade dos alimentos com base apenas nas isotermas de sorção não é suficiente uma vez que alterações físico-químicas e estruturais, bem como as taxas de escurecimento não-enzimático, não estão relacionados a um valor de umidade da monocamada, sendo melhor representados pela temperatura de transição vítrea.

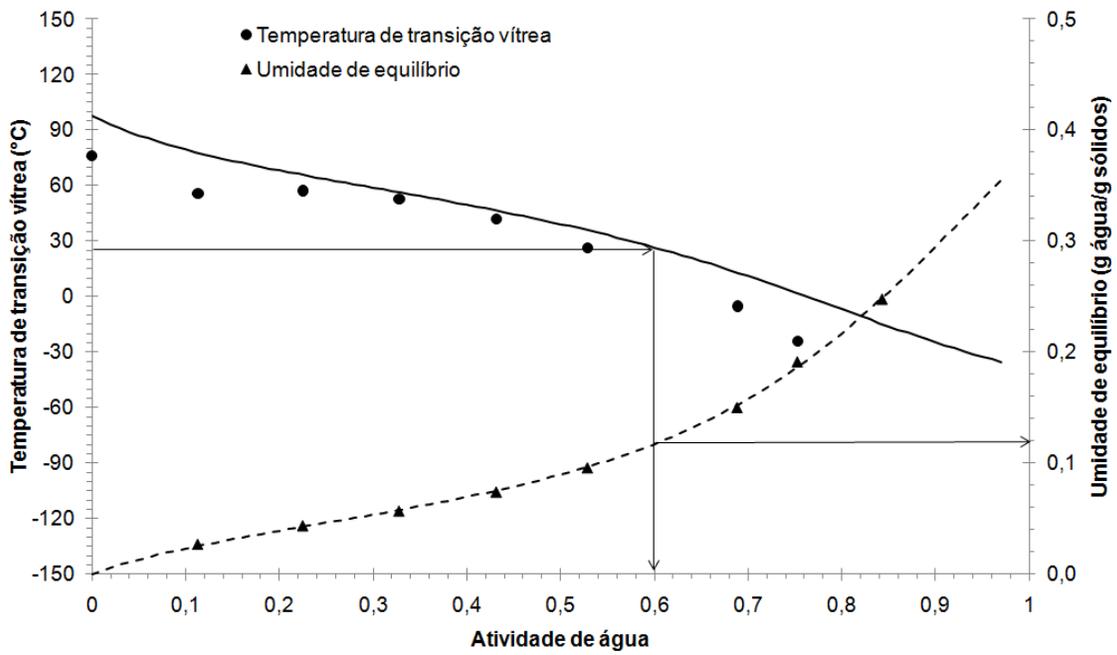
Roos (1993) sugeriu o uso combinado da equação de Gordon-Taylor e dos modelos matemáticos de isotermas de sorção para descrever o efeito plasticizante da água e avaliar a estabilidade dos alimentos. Assim, para determinar as condições críticas de estocagem do hidrolisado protéico de mexilhão em pó puro e produzido com os agentes carreadores, foram plotadas as isotermas de sorção e as temperaturas de transição vítrea, em função da atividade de água. Os valores críticos de atividade de água e umidade foram obtidos considerando temperatura ambiente de 25° C (linhas retas na Figura 5.42). Os valores de T_g e os valores de umidade, em determinados valores de atividade de água, foram preditos pelos modelos de Gordon-Taylor e BET modificado, respectivamente.



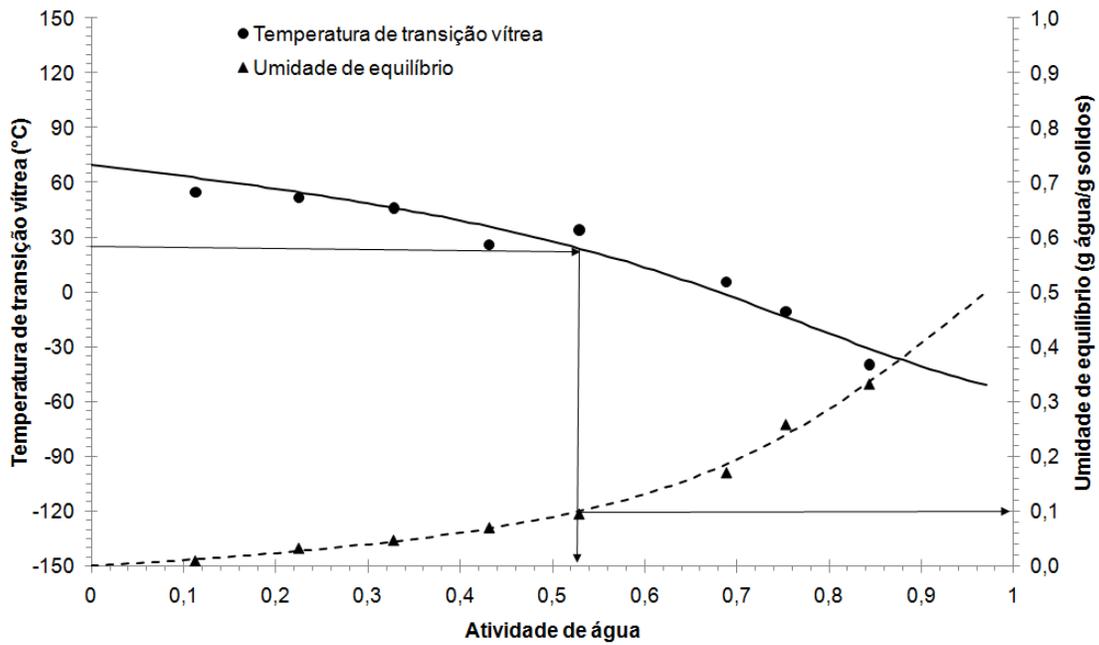
(a)



(b)



(c)



(d)

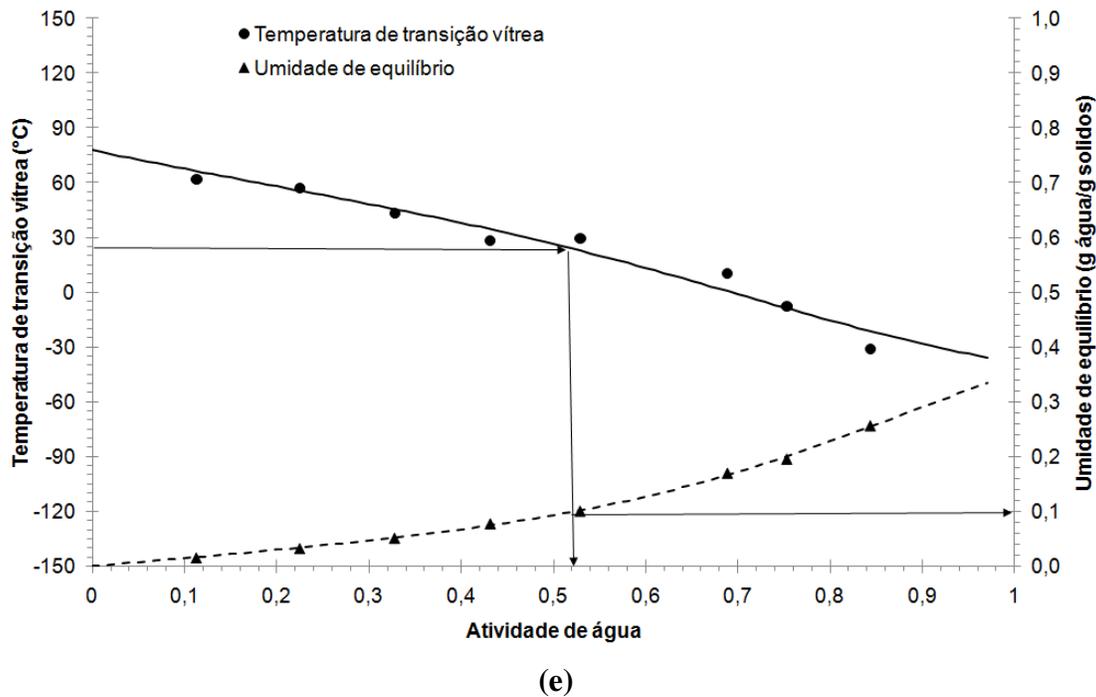


Figura 5.42. Variação da temperatura de transição vítrea e da umidade de equilíbrio com a atividade de água para o hidrolisado protéico de mexilhão em pó (a) puro e formulado com (b) 15% de maltodextrina, (c) 30% de maltodextrina, (d) 15% goma arábica e (e) 30% de goma arábica.

Na Tabela 5.46 estão apresentados os valores críticos de atividade de água e de conteúdo de umidade de equilíbrio, para o hidrolisado puro em pó e adicionado de agentes carreadores, a 25°C, obtidos a partir da Figura 5.42.

Tabela 5.46. Valores críticos de atividade de água (a_w_c) e de conteúdo de umidade (X_c) para o hidrolisado protéico puro (0%) e para os encapsulados com maltodextrina (MD) ou goma arábica (GA).

| Amostras em pó | a_w_c | X_c (g água/g sólidos) |
|----------------|---------|--------------------------|
| 0% | 0,24 | 0,05 |
| 15% MD | 0,49 | 0,10 |
| 30% MD | 0,60 | 0,12 |
| 15% GA | 0,51 | 0,09 |
| 30% GA | 0,50 | 0,10 |

Onde: MD = maltodextrina 10 DE e GA = Goma arábica.

Os valores de atividade de água e umidade de água críticas foram de $a_{w_c} = 0,24$ e $X_c = 0,05$ g/g de sólidos para o hidrolisado puro e de $a_{w_c} = 0,49-0,60$ e $X_c = 0,09-0,12$ g/g de sólidos para os pós adicionados de agentes carreadores. Isso significa que para o pó, estocado a 25°C, a máxima umidade relativa ao qual ele poderá estar exposto é de 24 e 49-60%, sendo seu conteúdo de umidade de 5 e 9-12%, em base seca, para o hidrolisado puro e encapsulado com agentes carreadores, respectivamente. O uso de agentes carreadores resultou no efetivo aumento na estabilidade dos pós.

Kurozawa (2009) avaliou a estabilidade de micropartículas de hidrolisado protéico de peito de frango, produzido com maltodextrina e goma arábica, através da determinação das isotermas de adsorção e da temperatura de transição vítrea das micropartículas, quando estocadas em ambientes com diferentes umidades relativas. Nesse trabalho, os valores de atividade de água e umidade de água críticas foram de $a_{w_c} = 0,10$ e $X_c = 0,04$ g/g de sólidos para o hidrolisado puro e de $a_{w_c} = 0,42$ a $0,70$ e $X_c = 0,10$ a $0,12$ g/g de sólidos, para os pós adicionados de agentes carreadores; sendo que o hidrolisado protéico de peito de frango puro apresentou boa estabilidade física somente à atividade de água de 0,113. O hidrolisado protéico de mexilhão puro apresentou o valor de X_m de 0,139 g água/g sólidos, menor do que o do hidrolisado de peito de frango que foi de X_m de 0,153 g água/g sólidos, contudo, apresentou estabilidade física um pouco maior, até o valor de atividade de água de 0,529, apresentada pela Figura 5.39, além do maior valor de $a_{w_c} = 0,24$ e $X_c = 0,05$ g/g de sólidos. A maior estabilidade física do hidrolisado protéico de mexilhão puro em pó, em relação ao hidrolisado de peito de frango puro em pó, pode estar relacionada à diferença de composição do substrato utilizado e, conseqüentemente, de composição do hidrolisado obtido, devido à utilização de outro tipo de enzima e do grau de hidrólise alcançado na reação enzimática, além das diferentes condições de secagem utilizadas para a produção das micropartículas, que podem ter influenciado nas características finais dos pós.

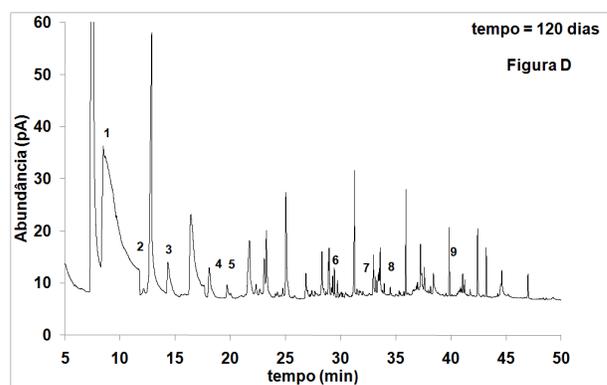
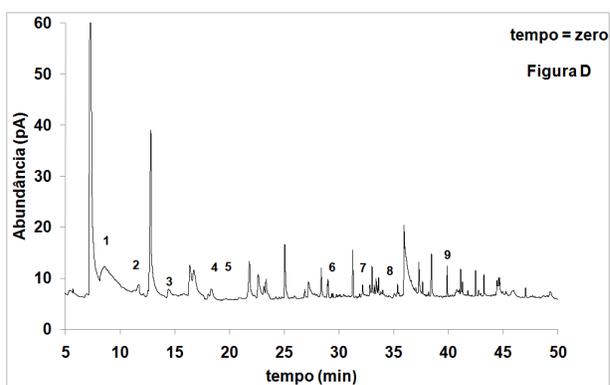
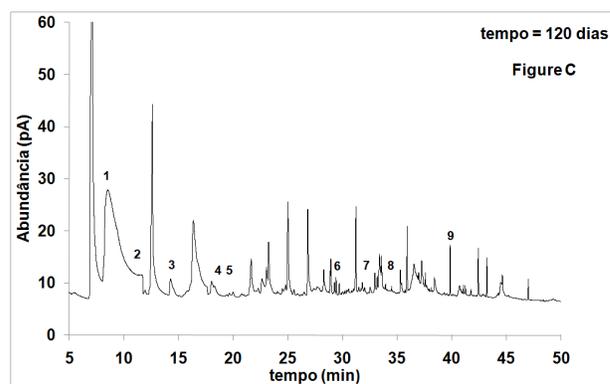
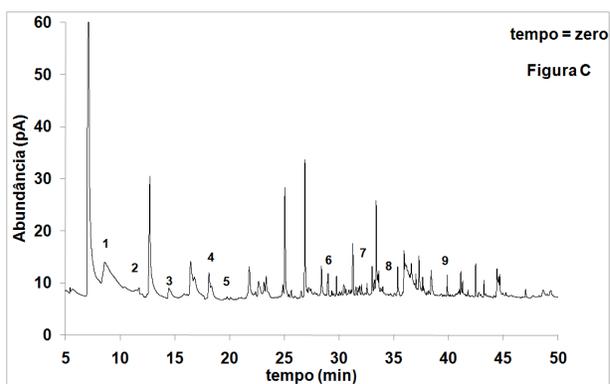
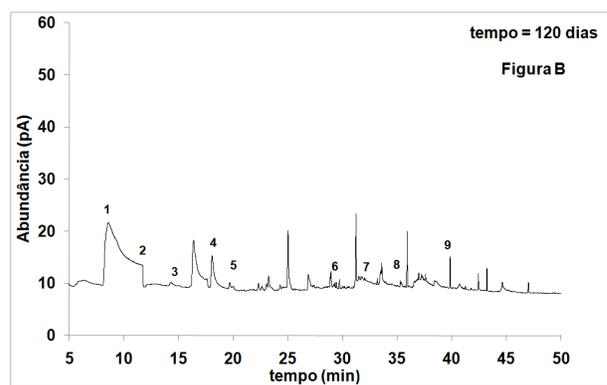
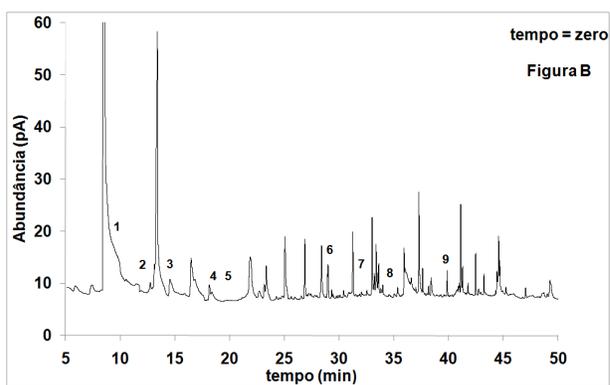
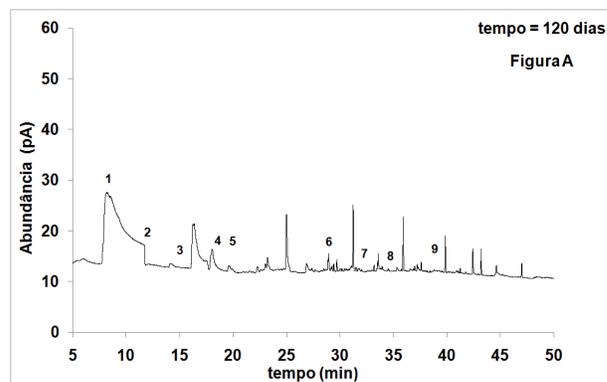
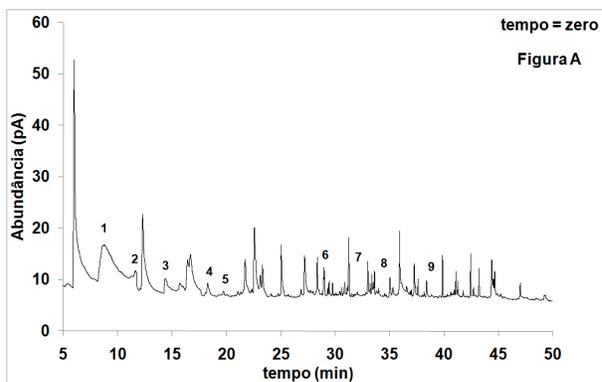
O baixo valor de a_w crítica encontrada para o hidrolisado protéico de mexilhão puro indica a sua vulnerabilidade durante o processamento, manipulação e estocagem, especialmente quando as condições de saída do equipamento encontram-se próximas ou acima das condições críticas. O baixo valor de temperatura de transição vítrea de um produto pode afetar o processo de secagem, uma vez que as condições de saída do

equipamento (umidade do ar e temperatura) podem ser superiores às condições críticas do pó. Quanto maior a diferença de temperatura ($\Delta T = T_{\text{sai}} - T_g$), maior é o grau de adesividade do produto. A temperatura de saída do secador ($T_{\text{sai}} = 115^\circ\text{C}$, valor máximo) foi maior do que a T_g do hidrolisado protéico anidro ($T_{g,\text{sól}} = 64,4^\circ\text{C}$, de acordo com a Tabela 5.45). Uma vez que a T_g da maltodextrina 10 DE, 160°C , de acordo com Roos e Karel (1991) é alta, a adição desta substância aumentou a T_g do produto em pó, reduzindo o ΔT e, conseqüentemente, diminuindo o comportamento adesivo do pó. Através da inspeção visual, foi possível observar maior aderência do pó na câmara e no ciclone do secador de spray dryer, para o hidrolisado puro, em relação às micropartículas produzidas com os agentes carreadores.

5.9 ESTABILIDADE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO HIDROLISADO PURO EM PÓ E DAS MICROPARTÍCULAS DURANTE A ESTOCAGEM

Nessa etapa do estudo, avaliou-se a estabilidade dos compostos voláteis do hidrolisado puro em pó e das micropartículas produzidas com maltodextrina e goma arábica, nas concentrações de 15 e 30%, durante o armazenamento, em potes plásticos, por 120 dias a 25°C . As amostras foram analisadas a cada 15 dias, em duplicata, utilizando a técnica de microextração por fase sólida (SPME) e posterior dessorção no cromatógrafo gasoso (CG-DIC).

O perfil qualitativo da composição de voláteis do hidrolisado puro em pó e das micropartículas produzidas com os agentes carreadores, no tempo 0 e após 120 dias de estocagem, estão apresentadas na Figura 5.43.



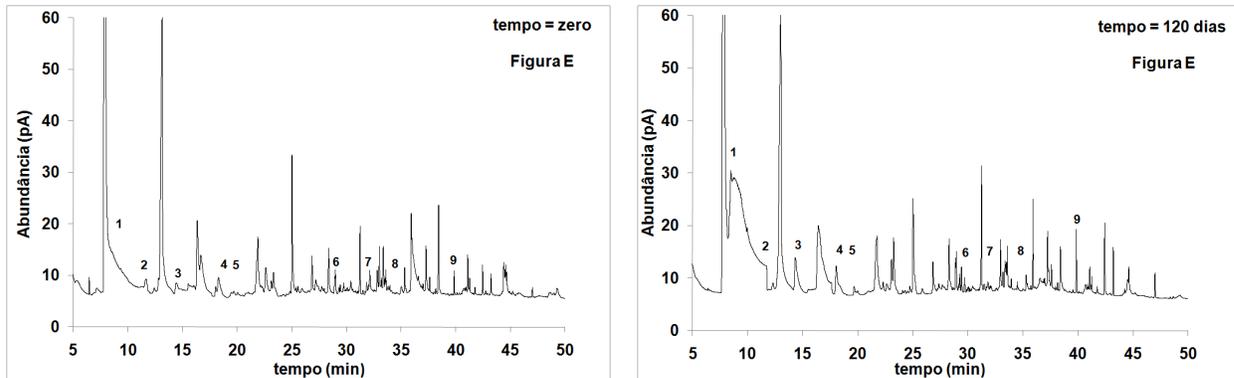


Figura 5.43. Composição de voláteis do hidrolisado puro (A), produzido com 15% de maltodextrina (B), 30% de maltodextrina (C), 15% de goma arábica (D) e 30% de goma arábica (E), tempo zero e após 120 dias de armazenamento, a 25°C. Os seguintes compostos foram detectados: (4) 2-nonanona, (5) nonanal, (7) 2-penten-1-ol e (8) hexanal. Já os seguintes compostos foram tentativamente identificados: (1) estireno (2) 2-etil-1-hexanol, (3) dimetiletilbenzeno, (6) undecanol e (9) heptadecano.

Comparando o perfil de voláteis das amostras, no tempo zero e após 120 dias de armazenamento, observou-se que houve maior perda total dos compostos voláteis do hidrolisado puro e nas micropartículas produzidas com 15% de maltodextrina e 30% de maltodextrina, em comparação às micropartículas produzidas com 15 e 30% de goma arábica, indicando maior proteção dos componentes voláteis dessas últimas, provavelmente pela capacidade emulsificante da goma arábica, que é importante para a retenção de voláteis lipofílicos, além da maior viscosidade da solução de alimentação, que melhora a retenção de voláteis. Outros fatores que afetam a retenção são a massa molecular e pressão de vapor dos compostos de *flavor* (REINECCIUS, 2004). Além disso, através da observação visual, foi possível observar o colapso do hidrolisado puro em pó, após 90 dias de armazenamento, à 25°C, sendo que as micropartículas produzidas com maltodextrina e goma arábica mantiveram a estabilidade física até o final do período de armazenamento.

Os seguintes compostos, que podem ser identificados na Figura 5.43, (4) 2-nonanona, (5) nonanal, (7) 2-penten-1-ol e (8) hexanal foram detectados nas amostras de hidrolisado puro e nas microcápsulas produzidas, devido à injeção do padrão externo na matriz e extração dos componentes voláteis pela técnica de microextração por fase sólida. Estes compostos foram quantificados nas amostras em pó, no tempo zero e após 120 dias de

estocagem e estão apresentados na Tabela 5.47. Em relação à quantidade desses compostos nas microcápsulas em pó produzidas com os agentes carreadores, observou-se o aumento, com o tempo, nas microcápsulas produzidas com 30% de maltodextrina e 15 e 30% de goma arábica. O aumento da quantidade desses compostos é devido às reações que podem ocorrer durante a estocagem como a oxidação lipídica e a reação de Maillard, sendo que foi observada maior proteção desses voláteis nas microcápsulas produzidas com 30% de maltodextrina e 15 e 30% de goma arábica. A maltodextrina não possui capacidade emulsificante, contudo, essa retenção dos voláteis pode ser atribuída à interação da maltodextrina com os peptídeos do hidrolisado protéico de mexilhão.

O desenvolvimento do aroma em produtos marinhos obtidos a partir de processos como defumação, salga, secagem e hidrólise é resultado de complexas reações proteolíticas e lipolíticas induzidas pelas diferentes condições de processo, como as enzimas e a temperatura. A reação de Maillard, incluindo a degradação de Strecker, a degradação térmica e a oxidação lipídica são as principais reações envolvidas na formação desses aromas (ÓLAFSDÓTTIR; JÓNSDÓTTIR, 2010). Guen, Prost e Demaimay (2000), em geral, encontraram valores inferiores aos do presente trabalho de 0,9 a 1,4 ng/g de 2-nonanona, de 1,2 a 1,6 ng/g de nonanal, de traços a 0,1 ng/g de 2-penten-1-ol e de 1,3 a 1,4 ng/g de hexanal, para dois tipos de mexilhões. Já Cha, Kim e Jang et al. (1998a) encontraram valores bem superiores ao presente trabalho de 25,7 a 86,29 ng/g de 2-nonanona, de 16,52 a 53,24 ng/g de nonanal, de 45,90 a 71,60 ng/g de 2-penten-1-ol e de 18,36 a 29,38 ng/g de hexanal, para a carne de mexilhão e para o hidrolisado protéico de mexilhão, respectivamente, sendo que a hidrólise enzimática foi realizada usando a enzima Optimase®. Entretanto, deve-se levar em consideração que esses trabalhos analisaram o extrato aquoso da carne de mexilhão cozida ou o hidrolisado protéico de mexilhão na sua forma líquida e no presente trabalho tanto o hidrolisado puro como as micropartículas foram obtidas através da secagem por atomização, etapa que pode ter reduzido a presença de voláteis nas amostras.

Além disso, na Figura 5.44 está apresentado o comportamento de outros dois compostos, tentativamente identificados, através do espectro de massas e do índice de retenção dos compostos. Essa segunda análise qualitativa evidencia, novamente, a maior

perda desses compostos no hidrolisado puro e produzido com 15 e 30% de maltodextrina e maior proteção dos mesmos nas microcápsulas produzidas com 15 e 30% de goma arábica.

Tabela 5.47. Compostos detectados no hidrolisado puro em pó e nas microcápsulas produzidas, no tempo zero e após 120 dias de estocagem (ng/g).

| Amostras | (4) 2-nonanona | (5) nonanal | (7) 2-penten-1-ol | (8) hexanal |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| Hidrolisado Puro (zero) | 3,66 | 2,24 | 2,18 | 0,92 |
| Hidrolisado Puro (120 d) | * | * | 4,80 | 0,98 |
| 15% MD (zero) | 1,98 | 3,02 | 4,02 | 1,28 |
| 15% MD (120 d) | * | * | 4,98 | 0,98 |
| 30% MD (zero) | 1,92 | 2,20 | 3,88 | 0,9 |
| 30% MD (120 d) | 2,70 | 2,24 | 6,74 | 1,34 |
| 15% GA (zero) | 2,40 | 2,34 | 2,56 | 0,94 |
| 15% GA (120 d) | 3,62 | 3,32 | 11,32 | 1,56 |
| 30% GA (zero) | 1,74 | 3,08 | 5,04 | 1,22 |
| 30% GA (120 d) | 4,04 | 3,58 | 11,14 | 1,48 |

Onde: MD = maltodextrina 10 DE e GA = Goma arábica e * traços, abaixo do limite de quantificação pelo CG-DIC.

Em geral, a maioria dos compostos apresentou perfil oscilante, sendo que as variações individuais das áreas, através do desvio de duas replicatas, encontraram-se abaixo dos 10%. Dessa forma, as variações observadas podem ser associadas ao material utilizado para o recheio da microcápsulas e não propriamente à técnica analítica empregada. Comportamento similar, com oscilação nos valores de concentração dos componentes voláteis, foi observado por Rodrigues (2004) e por Soper e Reineccius (2001), avaliando o perfil de voláteis de café, o que comprova que o estudo do perfil de voláteis é muito complexo.

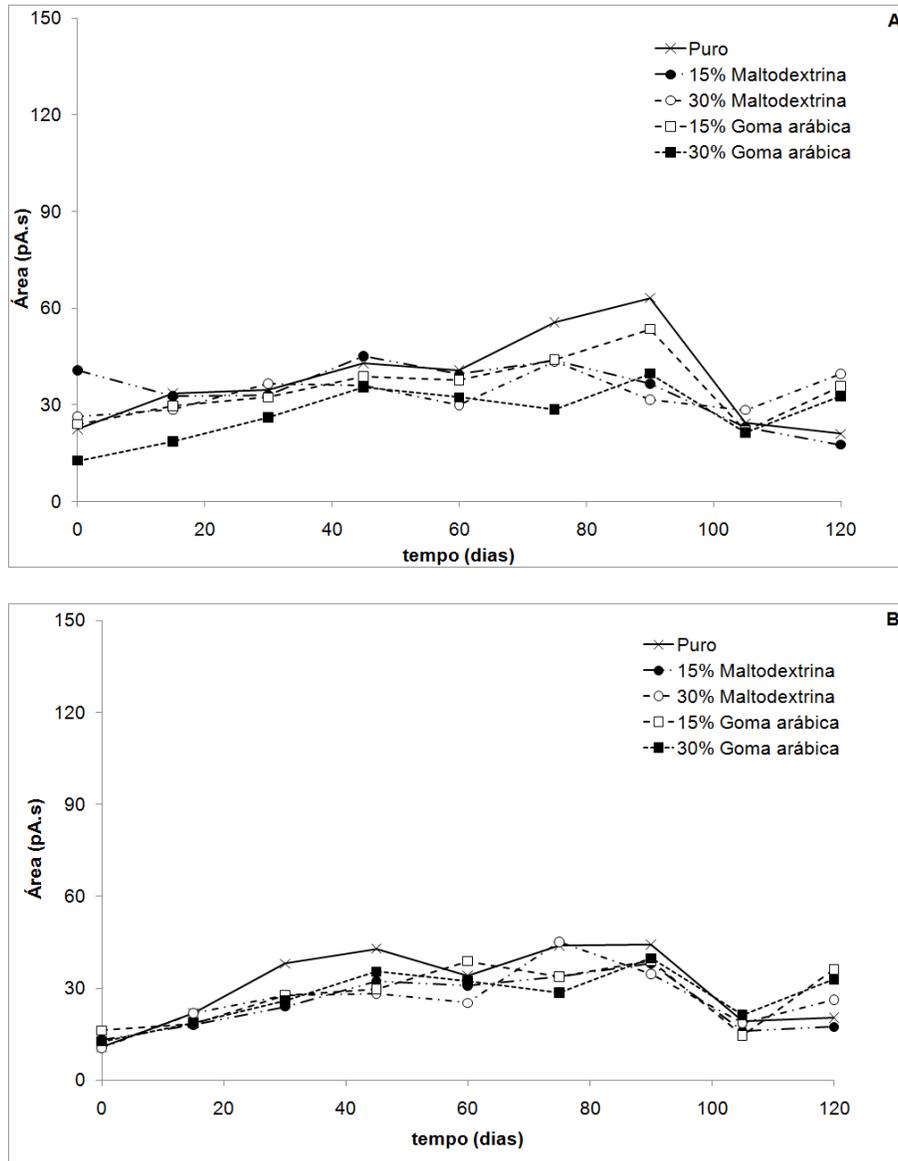


Figura 5.44. Comportamento do undecanol (A) e do heptadecano (B), no estudo da estabilidade durante a estocagem a 25°C.

Resultados similares, em relação à maior proteção dos voláteis de micropartículas, produzidas através da secagem por atomização, utilizando como material de parede a goma arábica, são apresentados a seguir.

Rodrigues e Grosso (2008) produziram microcápsulas de extrato aquoso de café crioconcentrado, através da secagem por atomização, usando como materiais de parede

goma arábica e goma de cajueiro. Os autores avaliaram a perda de voláteis durante a estocagem das microcápsulas em duas temperaturas, 25 e 40°C e duas condições diferentes de umidade relativa ambiente, 11 e 44%. O recheio das microcápsulas foi extraído por microondas e os aromas foram avaliados usando o cromatógrafo gasoso acoplado com espectrômetro de massas (CG-MS). A análise sensorial realizada revelou aprovação maior das microcápsulas produzidas com goma arábica em relação aos atributos sabor e aroma, uma vez que a goma de cajueiro apresenta em sua composição um monossacarídeo, a manose, responsável pelo sabor amargo percebido por alguns julgadores. Contudo, as amostras não apresentaram diferença significativa do perfil de voláteis, revelando a possibilidade de substituição da goma arábica pela goma de cajueiro, como material de parede de menor custo e de similar proteção do recheio.

Microcápsulas de óleo resina de canela, produzidas por spray dryer, utilizando como material de parede a mistura, em diferentes proporções, de maltodextrina (MD), goma arábica (GA) e amido modificado (AM) foram avaliadas em relação à retenção de cinamaldeído, voláteis totais e não voláteis, durante o tempo de armazenamento de 42 dias, a 25°C. Nenhuma das microcápsulas produzidas com as misturas de goma arábica e maltodextrina ou goma arábica e amido modificado apresentaram a mesma retenção de voláteis do que as microcápsulas produzidas somente com goma arábica. Já as microcápsulas produzidas com a mistura de GA:MD:AM na proporção (4:1:1) apresentaram melhor retenção de voláteis do que aquelas produzidas somente com a goma arábica (VAIDYA; BHOSALE; SINGHAL, 2006).

No estudo de estabilidade de microcápsulas de óleo resina de pimenta preta, produzida por spray dryer, durante o período de estocagem de 42 dias a 25°C, foi utilizado como material de parede goma arábica ou amido modificado. Foram avaliados o conteúdo e a estabilidade dos voláteis, não voláteis, piperina total e piperina microencapsulada, sendo que a goma arábica proporcionou maior proteção da piperina do que o amido modificado (SHAIKH; BHOSALE; SINGHAL, 2006).

Em outro estudo de estabilidade de microcápsulas de óleo resina de cardamomo, usando goma arábica e amido modificado, como materiais de parede, durante o período de estocagem de 42 dias, a 25°C, as microcápsulas foram avaliadas em relação ao conteúdo e

estabilidade dos voláteis, não voláteis, 1,8-cineol encapsulado e acetato de α -terpinil encapsulado. Dos materiais de parede utilizados, a goma arábica foi a que proporcionou maior proteção ao óleo resina de cardamomo (KRISHNAN; KRISHIRSAGAR; SINGHAL, 2005).

Kanakdande, Bhosale e Singhal (2007) produziram microcápsulas de óleo resina de cominho, usando diferentes combinações de goma arábica, maltodextrina e amido modificado que foram avaliadas em relação ao conteúdo e estabilidade dos voláteis, cuminaldeído total, γ -terpineno, p-cimene, durante o armazenamento das microcápsulas por 42 dias, a 25°C. A mistura 4/6:1/6:1/6 de goma arábica:maltodextrina:amido modificado ofereceu maior proteção ao recheio do que somente a goma arábica.

6 CONCLUSÕES

Os dados experimentais de cinética de hidrólise apresentaram bons ajustes ao modelo cinético utilizado, com isso, os modelos obtidos para o grau de hidrólise e a recuperação de proteína podem ser utilizados para prever experimentos de hidrólise enzimática da carne de mexilhão, usando a enzima ProtamexTM. A condição ótima sugerida para o processo de hidrólise enzimática, utilizando a metodologia de superfície de resposta, foi de: 51°C, concentração enzima:substrato de 4,5% (p/p) e pH de 6,85.

O hidrolisado obtido nas condições otimizadas apresentou em sua composição eletroforética cadeias leves de miosina 1 e 3 e peptídeos de massa molecular abaixo de 6,5 kDa, como resultado da elevada quebra das frações protéicas pela hidrólise enzimática. Os principais constituintes da fração protéica foram: ácido glutâmico, ácido aspártico, arginina e triptofano; a histidina e a leucina apresentaram-se como aminoácidos limitantes, contudo o hidrolisado protéico de mexilhão apresentou a maioria dos aminoácidos essenciais em quantidades adequadas e/ou em excesso, o que indica um elevado potencial de uso do hidrolisado protéico de mexilhão como suplemento protéico em alimentos.

No perfil de voláteis da carne do mexilhão *Perna perna* e do seu hidrolisado foram tentativamente identificados alguns alcoóis, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos, já encontrados na carne de mexilhão de outras espécies, indicando potencial aplicação como *flavor*.

O hidrolisado protéico de mexilhão, obtido na condição ótima de reação de hidrólise enzimática, quando adicionado de agentes carreadores, nas concentrações de 5 a 30%, de maltodextrina ou goma arábica, para ser utilizado na alimentação do secador de spray dryer, apresentou comportamento newtoniano, em altas taxas de deformação, além de apresentar baixa viscosidade em altas concentrações, características importantes para a produção de micropartículas de *flavors* em pó, obtidos por *spray drying*.

As condições sugeridas para a produção das micropartículas com maltodextrina ou goma arábica foram de: temperatura do ar de secagem de 180°C, vazão da solução de alimentação de 0,8 L/h e concentração de agente carreador de 15%, condições escolhidas com o objetivo

de obter os menores valores de umidade e higroscopicidade dos pós, importantes para as etapas subsequentes do processo de secagem, manipulação e estocagem.

A adição de agente carreador, maltodextrina ou goma arábica ao hidrolisado protéico de mexilhão proporcionou o aumento da estabilidade física do pó devido ao aumento dos valores críticos de atividade de água e conteúdo de umidade. Os baixos valores críticos de atividade de água (0,24) e conteúdo de umidade (0,05 g água/g sólidos) do hidrolisado protéico de mexilhão puro indicaram alta higroscopicidade e baixa estabilidade física desse pó, dessa forma, podendo ocorrer aglomeração e colapso nas fases de processamento, tais como na secagem por *spray drying*, manipulação e durante a estocagem do produto.

Na avaliação da vida de prateleira das micropartículas, ao longo da estocagem a 25°C, aquelas produzidas com 15 e 30% de goma arábica ofereceram maior proteção aos componentes voláteis, em relação aquelas produzidas com maltodextrina, além de apresentarem elevada estabilidade física, em relação ao hidrolisado puro em pó. Esse resultado indica a goma arábica como um bom material de parede, para a produção de microcápsulas em pó de aroma de mexilhão.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar outros tipos de substratos como resíduos do processamento de pescado, tais como de sardinha e tilápia, para o aproveitamento desses resíduos de baixo valor comercial, para produção de aromas;

Avaliar a adição de agentes carreadores em diferentes proporções (maltodextrina, goma arábica, amidos modificados e proteínas) sobre a estabilidade e retenção de voláteis nas microcápsulas; que possam resultar em produtos com alta qualidade e de baixo custo;

Avaliar outras fibras de SPME (microextração por fase sólida), com diferentes revestimentos, em relação à quantidade e tipos de compostos voláteis extraídos.

Estudar a aplicabilidade das microcápsulas em alguns produtos como arroz, sopas desidratadas, molhos e bebidas à base de tomate, através de testes de aceitação e análises descritivas qualitativas, para avaliar os seguintes atributos: gosto amargo, sabor e aroma de mexilhão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIO, F. D. B.; DOMINGUES, A. M.; BORGES, S. V.; OLIVEIRA, V. M. Physical properties of powdered pineapple (*Ananas comosus*) juice – Effect of maltodextrin concentration and atomization speed. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 285-287, 2004.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 427 p.

AGUILERA, M.J.; DEL VALLE, J.M.; KAREL, M. Caking phenomena in amorphous food powder. **Trends in Food Science and Technology**, Londres, v. 6, n. 5, p. 149-155, 1995.

AGUILERA, J. M.; LEVI, G.; KAREL, M. Effect of water content on the glass transition and caking of fish protein hydrolysates. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 9, p. 651-654, 1993.

AGUILERA, J. M.; STANLEY, D. W. **Microstructural Principles of Food Processing & Engineering**. 2. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999. 432p.

ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F.; QUANTICK, P. Food and health applications of marine nutraceuticals: a review. In: ALASALVAR, C.; TAYLOR, T. editor. **Seafoods: quality, technology and nutraceutical applications**. Berlin: Springer, 2002. p. 175-195.

ANSON, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. **The Journal of General Physiology**, New York, v. 22, n. 1, p. 79-89, 1938.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16. ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1997.

BAEK, H. H.; CADWALLADER, K. R. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. **Journal of Food Science**, Malden, v. 60, n. 5, p. 929-935, 1995.

BARANAUSKIENÉ, R.; BYLAITÉ, E.; ZUKAUSKAITÉ, J.; VENSKUTONIS, R. Flavor retention of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 3027-3036, 2007.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; IBARZ, A.; PELEG, M. Propriedades reológicas de alimentos e fluidos. Revisión. **Alimentaria**, Madri, p. 39-89, 1993.

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

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989. 199 p.

BARNI, E. J.; SILVA, M. C. da; ROSA, R. de C. C.; OGLIARI, R. A. Perfil, hábitos de consumo e preferências dos consumidores finais de mexilhões. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 16, n. 3, p. 39-43, 2003.

BARONI, A. F.; SERENO, A. M.; HUBINGER, M. D. Thermal transitions of osmotically dehydrated tomato by modulated temperature differential scanning calorimetry. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 395, n. 1-2, p. 237-249, 2003.

BASU, S.; SHIVHARE, U. S.; MUJUMDAR, A. S. Models for sorption isotherms for foods: A Review. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 24, p. 917-930, 2006.

BE MILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 157-224.

BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M. Processamento e Industrialização de Moluscos. In: **Seminário e Workshop Tecnologias para Aproveitamento Integral do Pescado**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos - Centro de Tecnologia de Carnes, 2000. p. 38-84.

BERISTAIN, C. I., GARCIA, H. S., VERNON-CARTER, E. J. Spray-dried encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juli-ora*) gum. **Food Science and Technology - LWT**, Amsterdam, v. 34, p. 398-401, 2001.

BERTULLO, V. H. **Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos**. 1. ed. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1975. 538p.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; HOWEST, T. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 671-684, 1997.

BHANDARI, B. R.; HOWES, T. Drying of sticky materials – Relevance to glass transition temperature. In: **Proceedings of the International Food Dehydration Conference – 2000 and Beyond**. Melbourne: Food Science Australia, 2000. p. 8.2-8.12.

BJARNASON, J. B.; BENEDIKTSSON, B. **Protein hydrolysates produced with the use of cod proteases**. Int PC A23J 3/00. US patent 7,070,953. Julho. 2006.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, p. 911-17, 1959.

BRANDINI, F. P.; SILVA, A. S.; PROENÇA, L. A. O. Oceanografia e Maricultura. In: VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGETTI, J. R. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPQ, 2000. p. 107-141.

BRUNAUER, S.; EMMET, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of American Chemistry's Society**, Washington, v. 60, p. 309-319, 1938.

BRUNTON, N. P.; CRONIN, D. A.; MONAHAN, F. J.; DURCAN, R. A. A comparison of solid-phase (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. **Food Chemistry**, Oxford, v. 68, p. 339-345, 2000.

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

CAMACHO, F.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; GUADIX, E. M. Influence of enzymes, pH and temperature on the kinetics of whey protein hydrolysis. **Food Science and Technology International**, Londres, v. 4, n. 2, p. 79-84, 1998.

CHA, Y.; KIM, H.; JANG, S. Flavor and taste-active compounds in blue mussel hydrolysate produced by protease. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 3, p. 15-21, 1998a.

CHA, Y.; KIM, H.; KIM, E. Development of blue mussel hydrolysates as a flavouring. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 3, p. 10-14, 1998b.

CHEGINI, G. R.; GHOBADIAN, B. Effect of spray-drying conditions on physical properties of orange juice powder. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 23, n. 3, p. 657-668, 2005.

CHRONAKIS, I. S. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 38, n. 7, p. 599-637, 1998.

CROS, S.; LIGNOT, B.; BOURSEAU, P.; JAOUEN, P.; PROST, C. Desalination of mussel cooking juices by eletrodialysis: effect on the aroma profile. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 69, p. 425-36, 2005.

CYBULSKA, E. B.; DOE, P. E. Water and Food Quality. In: SIKORSKI, Z.E. **Chemical and Functional Properties of Food Components**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 25-50.

DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein. **Food Science and Technology International**, Londres, v.4, p.91-98, 1998.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p.136-148, 1988.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **Síntese Informativa da Maricultura: Mexilhões, Ostras e Vieira 2009**. Disponível em: <<http://www.epagri.sc.gov.br>>. Acesso em: 15 out. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Fisheries and Aquaculture Department: World Review of Fisheries and Aquaculture 2008**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations /World Health Organization. **Evaluation of Protein Quality**. Joint FAO/WHO report. Rome: FAO Food Nutrition, 1991.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1996. 1067 p.

FUCHS, M.; TURCHIULI, C.; BOHIN, M.; CUVELIER, M. E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; DUMOULIN, E. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 75, p. 27–35, 2006.

FUENTES, A.; FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I.; ESCRICHE, I.; SERRA, J. A. Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins. **Food Chemistry**, Oxford, v. 112, p. 295-302, 2008.

GABAS, A. L.; TELIS, V. R. N.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS-ROMERO, J. Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 82, n. 2, p. 246-252, 2007.

GAL, S. Recent advances in techniques for the determination of adsorption isotherms. In: DUCKWORTH, R. B. **Water Relations of Foods**. London: Academic Press, 1975. p. 139-154.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDART, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, Amsterdam, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E., PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic Models. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 44, n. 4, p. 523-528, 1994.

GORDON, M.; TAYLOR, J. S. Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. I. Non-crystalline copolymers. **Journal of Applied Chemistry**, v. 2, n. 9, p. 493-500, 1952.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G.; KAZAKIS, N. A. Influence of spray drying conditions on tomato powder properties. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 22, n. 5, p. 1129-1151, 2004.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Spray drying of tomato pulp: effect of feed concentration. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 22, n. 10, p. 2309–2330, 2004.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Effect of Maltodextrin Addition during Spray Drying of Tomato Pulp in Dehumidified Air: II. Powder Properties. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 26, p. 726–737, 2008.

GRABOWSKI, J. A.; TRUONG, V. D.; DAUBERT, C. R. Spray-drying of amylase hydrolyzed sweetpotato puree and physicochemical properties of powder. **Journal of Food Science**, Malden, v. 71, n. 5, p. 209-217, 2006.

GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **Journal of Research of the National Bureau of Standards – Physics and Chemistry**, Washington, v. 81, n. 1, p. 89-96, 1977.

GROSCH, W. Lipid degradation products and flavor. In: MORTON I. D.; MCLEOD, A. J. **Food Flavors: part A. Introduction**. Amsterdam: Elsevier, 1982. p. 325-398.

GUEN, S. L.; PROST, C.; DEMAIMAY, M. Characterization of odorant compounds of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 896, p. 361-371, 2000.

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

HASHIMOTO, T.; SUZUKI, T.; HAGIWARA, T.; TAKAY, R. Study on the glass transition for several processed fish muscles and its protein fractions using differential scanning calorimetry. **Fisheries Science**, Tóquio, v. 70, p. 1144-1152, 2004.

HOLANDA, H. D. **Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos**. 2004. 137 f. Tese (Doutorado

em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

HOLANDA, H. D.; NETTO, F. M. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, Malden, v. 71, n. 5, p. 298-303, 2006.

IMM, J. Y.; LEE, C. M. Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 47, p. 2360-2366, 1999.

ISLAM, A. M.; PHILLIPS, G. O.; SLJIVO, A.; SNOWDEN, M. J.; WILLIAMS, P. A. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum Arabic. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 493-505, 1997.

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

JOHARI, G. P.; HALLBRUCKER, A. MAYER, E. The glass-liquid transition of hyperquenched water. **Nature**, Londres, v. 330, n. 10, p. 552-553, 1987.

JOSEPHSON, D. B.; LINDSAY, R. C.; STUIBER, D. A. Volatile carotenoid-related oxidation compounds contributing to cooked salmon flavor. **Food Science and Technology - LWT**, Amsterdam, v. 24, p. 424-432, 1991.

KANAKDANDE, D.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum Arabic, maltodextrin and modified starch. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 67, p. 536-541, 2007.

KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J.; TAYLOR, D. W. Maltodextrins. In: KEARSLEY, M. W.; DZIEDZIC, S. Z. **Handbook of Starch Hydrolysis Products and Their Derivatives**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 65-82.

KIM, H. R.; BAEK, H. H.; MEYERS, S. P.; CADWALLADER, K. R.; GODBER, J. S. Crayfish Hepatopancreatic Extract Improves Flavor Extractability from a Crab Processing By-product. **Journal of Food Science**, Malden, v. 59, n. 1, p. 91-95, 2006.

- KING, A. H. Encapsulation of Food Ingredients – a Review of Available Technology, Focusing on Hydrocolloids. In: **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. v. 590, 1995. p. 26–39.
- KIRBY, C. J.; WHITTLE, C. J.; RIGBY, N.; COXON, D. T.; LAW, B. A. Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. **Journal of Food Technology**, Chicago, v. 26, n. 5, p. 437-439, 1991.
- KLINKESORN, U.; SOPHANODORA, P.; CHINACHOTI, P.; MCCLEMENTS, D. J. Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrin. **Food Research International**, Amsterdam, v. 37, p. 851-859, 2004.
- KRISHNAN, S.; KRISHIRSAGAR, A. C.; SINGHAL, S. The use of gum Arabic and modified starch in the microencapsulation of food flavor agent. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 62, p. 309-315, 2005.
- KRISTINSSON, H. G. In: BARROW, C. J.; SHAHIDI, F. **Marine Nutraceuticals and Functional Foods**. New York: CRC Press, 2008. p. 229-241.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000a.
- 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**, Oxford, v. 36, p. 131-139, 2000b.
- KUROZAWA, L. E. **Estudos dos processos de hidrólise enzimática e secagem por atomização para obtenção de hidrolisado protéico de frango em pó**. 2009. 148 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- 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**, Philadelphia, v. 27, p. 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**, Oxford, v. 94, p. 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**, Oxford, v. 91, p. 287-296, 2009d.

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**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 557-566, 2009c.

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**, Malden, v. 73, p. C405-C412, 2008.

LABUZA, T. P. Sorption phenomena in foods. **Food Technology**, Chicago, v. 22, n. 3, p. 263-272, 1968.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v. 227, n. 15, p. 685-689, 1970.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

LAMSAL, B. P.; JUNG, S.; JOHNSON, L. A. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. **Food Science and Technology - LWT**, Amsterdam, v. 40, p. 1215-1223, 2007.

LEE, C. M. In: SHAHIDI, F. **Maximising the value of marine by-products**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2007. p. 304–327.

LEWICKI, P. P. The application of the GAB model to food water sorption isotherms. **International Journal of Food Science and Technology**, Malden, v. 32, n. 6, p. 553-557, 1997.

- LIAN, P.; LEE, C. H.; PARK, E. Optimization of Enzyme-Assisted Squid Flavor Production Using an Orthogonal Array Method. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, Binghamton, v. 10, n. 1, p. 19-32, 2001.
- LIASET, B.; JULSHAMN, K.; ESPE, M. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with ProtamexTM. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1747-1759, 2003.
- LIASET, B.; NORTVEDT, R.; LIED, E.; ESPE, M. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by ProtamexTM protease. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1263-1269, 2002.
- LIN, S. B.; CORDLE, C. T.; THOMAS, R. L. Debittering casein hydrolysates with octadecyl-siloxane (C18) columns. **Journal of Food Science**, Malden, v. 62, n. 4, p. 665-670, 1997.
- LIU, Z.; ZENG, M.; DONG, S.; XU, J.; SON, G. H; ZHAO, Y. Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of Gray mold (*Botrytis cinerea*) on harvest strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 46, p. 95-98, 2007.
- LOFFLER, A. Proteolytic enzymes: Sources and applications. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 1, p. 63-70, 1986.
- MAEHASHI, K.; MATSUZAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; UDAKA, S. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 63, n. 3, p. 555-559, 1999.
- MARGULIS, B. A.; PINAEV, G. P. The species specificity of the contractile protein composition of the bivalve molluscs. **Comparative Biochemistry Physiology**, Ottawa, v. 5B, p. 189-194, 1976.
- MÁRQUEZ, M. C.; FERNÁNDEZ, V. Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 481-490, 1993.
- MÁRQUEZ, M. C.; VÁZQUEZ, M. A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 111-117, 1999.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1979. 687 p.

MASTERS, K. Current market-driven spray drying development activities. **Drying Technology**, Philadelphia v. 22, n. 6, p. 1351-1370, 2004.

MCGORRIN, R. J. Character Impact Compounds: Flavors and Off-Flavors in Food. In: MARSILI, R. **Flavor, Fragrance and Odor Analysis**. New York: Marcel Dekker: New York, 2002. p. 375-413.

MEDINA-VIVANCO, M.; SOBRAL, P. J. A.; SERENO, A. M.; HUBINGER, M. D. Denaturation and the glass transition temperatures of myofibrillar proteins from osmotically dehydrated tilapia: effect of sodium chloride and sucrose. **International Journal of Food Properties**, Philadelphia, v. 10, n. 4, p. 791–805, 2007.

MORAIS, H. A.; BARBOSA, C. M. S.; DELVIVO, F. M.; SILVA, V. D. M.; MANSUR, H. S.; OLIVEIRA, M. C. O.; SILVESTRE, M. P. C. Estabilidade e avaliação sensorial de lipossomas contendo hidrolisados de caseína. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 213-220, 2003.

MORENO, M. C. M.; CUADRADO, V. F. Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. **Process Biochemistry**, Oxford, n. 8, p. 481-490, 1993.

MURRAY, D. G.; LUFT, L. R. Low-DE corn starches hydrolysates. Multi-functional carbohydrates aid in food formulation. **Food Technology**, Chicago, v. 27, n. 3, p. 32-40, 1973.

NATH, S.; SATPATHY, G. R. A systematic approach for investigation of spray drying process. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 16, n. 6, p. 1173-1193, 1998.

NIDJAM, J. J.; LANGRISH, T. A. J. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 77, n. 4, p. 919-925, 2006.

NIELSEN, P. M. Functionality of Protein Hydrolysates. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. **Food Protein and Their Applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 443-472.

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

OGATA, M.; MIYAKE, Y. Gas chromatography combined with mass spectrometry for the identification of organic sulfur compounds in shellfish and fish. **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 18, p. 594-605, 1980.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de Pesca**. Ciência e Tecnologia do Pescado. v. 1. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 430 p.

ÓLAFSDÓTTIR, G; JÓNSDÓTTIR, R. Volatile aroma compounds in fish. In. NOLLET, L. M. L.; TOLDRA, F. **Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis**. New York: Taylor & Francis Group, 2010. p. 97-117.

PEDERSEN, B. Removing of bitterness from protein hydrolysates. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 96-98, 1994.

PEDROSA, L. F. C.; COZZOLINO, S. M. F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 154-157, 2001.

PÉREZ-ALONSO, C.; BERISTAIN, C. I.; LOBATO-CALLEROS, C.; RODRIGUEZ-HUEZO, M. E.; VERNON-CARTER, E. J. Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 77, n. 4, p. 753-760, 2006.

PORZIO, M. A.; PERSON, A. M. Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Biochimica et Biophysica Acta** (BBA) - Protein Structure, Amsterdam, v. 490, n. 1, p. 27-34, 1977.

POSTOLACHE, C.; ONCESCU, T. Kinetics of hemoglobin and casein hydrolysis catalized by Alcalase[®]. **Revue Roumaine Chimie**, v. 34, p. 581-584, 1989.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray dried watermelon powder. **Chemical Engineering and Processing**, Lausanne, v. 46, n. 5, p. 386-392, 2007.

RAHMAN, M. S. State diagram of foods: Its potential use in food processing and product stability. **Trends in Food Science and Technology**, Londres, v. 17, n. 3, p. 129-141, 2006.

RAHMAN, M. S.; LABUZA, T. P. Water activity and food preservation. In: RAHMAN, M.S. **Handbook of Food Preservation**. 2. ed. New York: CRC Press, 2007. p. 447-476.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 16, n. 3, p. 1195-1236, 1998.

REINECCIUS, G. A. The spray drying of food flavors. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 22, n. 6, p. 1289-1324, 2004.

REINECCIUS, G. A. **Flavor Chemistry and Technology**. Cap 14. Flavor Applications. 2. ed. New York: CRC Press, 2006. p. 391-417.

REINECCIUS, 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.

RODRIGUES, R. A. F.; GROSSO, C. R. F. Cashew gum microencapsulation protects the aroma of coffee extracts. **Journal of Microencapsulation**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2008.

RODRIGUES, R. A. F. **Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de café crioconcentrado** 2004. 258 f. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, G. R.; GONZÁLEZ-GARCIA, R.; GRAJALES-LAGUNES, A.; RUIZ-CABRERA, M. A. Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 955–973, 2005.

ROOS, Y.; KAREL, M. Differential scanning calorimetry study of phase transition affecting the quality of dehydrated materials. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 6, n. 2, p. 15-163, 1990.

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

ROOS, Y. H. **Phase Transition in Foods**. San Diego: Academic Press, 1995.

ROOS, Y. H. Water activity and physical state effects on amorphous food stability. **Journal of Food Processing and Preservation**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 433-447, 1993.

ROSEMBERG, M.; YOUNG, S. L. Whey protein as microencapsulation agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. **Food Structure**, Chicago, v. 12, n. 1, p. 31-41, 1993.

SABLANI, S. S.; KASAPIS, S.; RAHMAN, M. S.; AL-JABRI, A.; AL-HABSI, N. Sorption isotherm and the state diagram for evaluating stability criteria of abalone. **Food Research International**, Amsterdam, v. 37, n. 10, p. 915-924, 2004.

SAHA, B. C.; HAYASHI, K. Debittering of protein hydrolyzates. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 19, p. 355-370, 2001.

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**, San Diego, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades – degradações – modificações**. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

SHAHIDI, F.; CADWALLADER, K. R. Flavor and lipid chemistry of seafoods: An overview. In: SHAHIDI, F., CADWALLADER, K. R. **Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods**. ACS Symposium Series 674. Washington: American Chemical Society, 1997. p. 1-8.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

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

SHAIKH, J.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. **Food Chemistry**, Oxford, v. 94, p. 105-110, 2006.

SILVA, M. A.; SOBRAL, P. J. A.; KIECKBUSCH, T. G. State diagrams of freeze-dried camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh) pulp with and without maltodextrin addition. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 426-432, 2006.

SIMPSON, B. K.; NAYERI, G.; YAYLAYAN, V.; ASHIE, I. N. A. **Food Chemistry**, Oxford, v. 61, p. 131-138, 1998.

SLADE, L.; LEVINE, H. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 30, n. 2-3, p. 115-360, 1991.

SOPER, C.; REINECCIUS, G. Lecture. **Workshop Reaction of Flavors, Encapsulation and Analysis**. Department of Food Science and Nutrition. University of Minnesota, 2001. p. 16-18.

SOUZA FILHO, J. **Custo de produção da ostra cultivada**. Florianópolis: Instituto Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola/SC, 2003. 23p.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, San Diego, v. 39, n. 12, p. 1412-1445, 1967.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. 2. ed. East Lansing: Freeman Press. 1996. 418 p.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. **Food Chemistry**, Oxford, v. 68, p. 147-152, 2000.

TARDIOLI, P. W.; SOUSA Jr., R.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by Alcalase[®] immobilized on 10% glyoxyl-agarose. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 36, p. 555–564, 2005.

TAVARES, M.; MELLO, M. R. P. A.; CAMPOS, N. C.; de MORAIS, C.; OSTINI, S. Proximate composition and caloric value of the mussel *Perna perna*, cultivated in Ubatuba, São Paulo State, Brazil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 473-475, 1998.

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

THIES, C. **How to make microcapsules**: combined lecture and laboratory manual. St. Louis: Thies Technology, 1995.

THIES, C. Microencapsulation: what it is and purpose. In: VILSTRUP, P. **Microencapsulation of food ingredients**. Surrey: Leatherhead Publishing, 2001. p. 1-30.

TONELI, J. T. C. L. **Processos de separação física e secagem de inulina obtida a partir de raízes de chicória (*Cichorium Intybus L.*)**. 2006. 208 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

VAIDYA, S.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. S. Microencapsulation of Cinnamon Oleoresin by Spray Drying Using Different Wall Materials. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 24, p. 983-992, 2006.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VAN ANROOY, R.; SECRETAN, P. A. D.; LOU, Y.; ROBERTS, R.; UPARE, M. **Review of the current state of world aquaculture insurance**. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, n. 493, 2006. 92 p.

van den DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperatura programmed gas liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-71, 1963.

VENUGOPAL, V. Seafood Proteins: Functional Properties and Protein Supplements. In: **Marine Products for Health Care: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009. p. 51-101.

VIEIRA, G. H. F.; MARTIN, A. M.; SAMPAIO, S. S.; OMAR, S.; GONÇALVES, R. C. F. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus* spp) processing wastes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 69, n. 1, p. 61-65, 2006.

WALTON, D. E.; MUMFORD, C. J. The morphology of spray-dried particles. The effect of process variables upon the morphology of spray-dried particles. **Chemical Engineering Research and Design**, London, v. 77, n. 5, p. 442-460, 1999.

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**, Oxford, v. 104, p. 1698-1704, 2007.

WEI, Q.; ZHIMIM, H. Enzymatic hydrolysis of protein: mechanism and kinetic model. **Frontiers of Chemistry in China**, Shanghai, v. 3, p. 308–314, 2006.

WEIR, G. S. D. Protein Hydrolysates as Flavourings. In: HUDSON, B. J. F. **Developments in Food Proteins**. New York: Elsevier Applied Science Publishers. 1986. 175 p.

WERGEDAHL, H.; LIASET, B.; GUDBRANDSEN, O. A.; LIED, E.; ESPE, M.; MUNA, Z.; MORK, S.; BERGE, R. K. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL-cholesterol and lowers Acyl-CoA-Cholesterol Acyltransferase activity in liver of zucker rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, p. 1320-1327, 2004.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. 625 p.

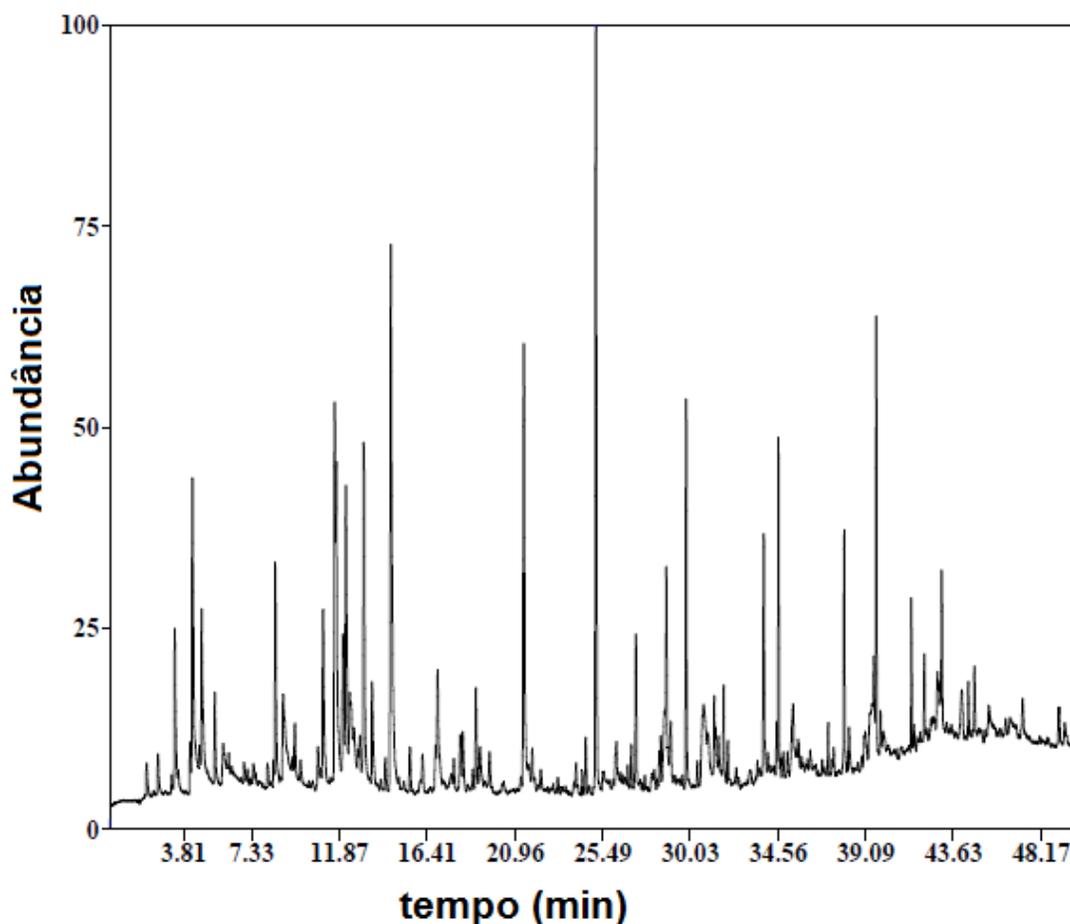
WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, Londres, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

YANG, X.; PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Chicago, v. 42, p. 1925-1930, 1994.

YASUHARA, A.; MORITA, M. Identification of volatile organic components in mussel. **Chemosphere**, Oxford, n. 16, p. 2559-2565, 1987.

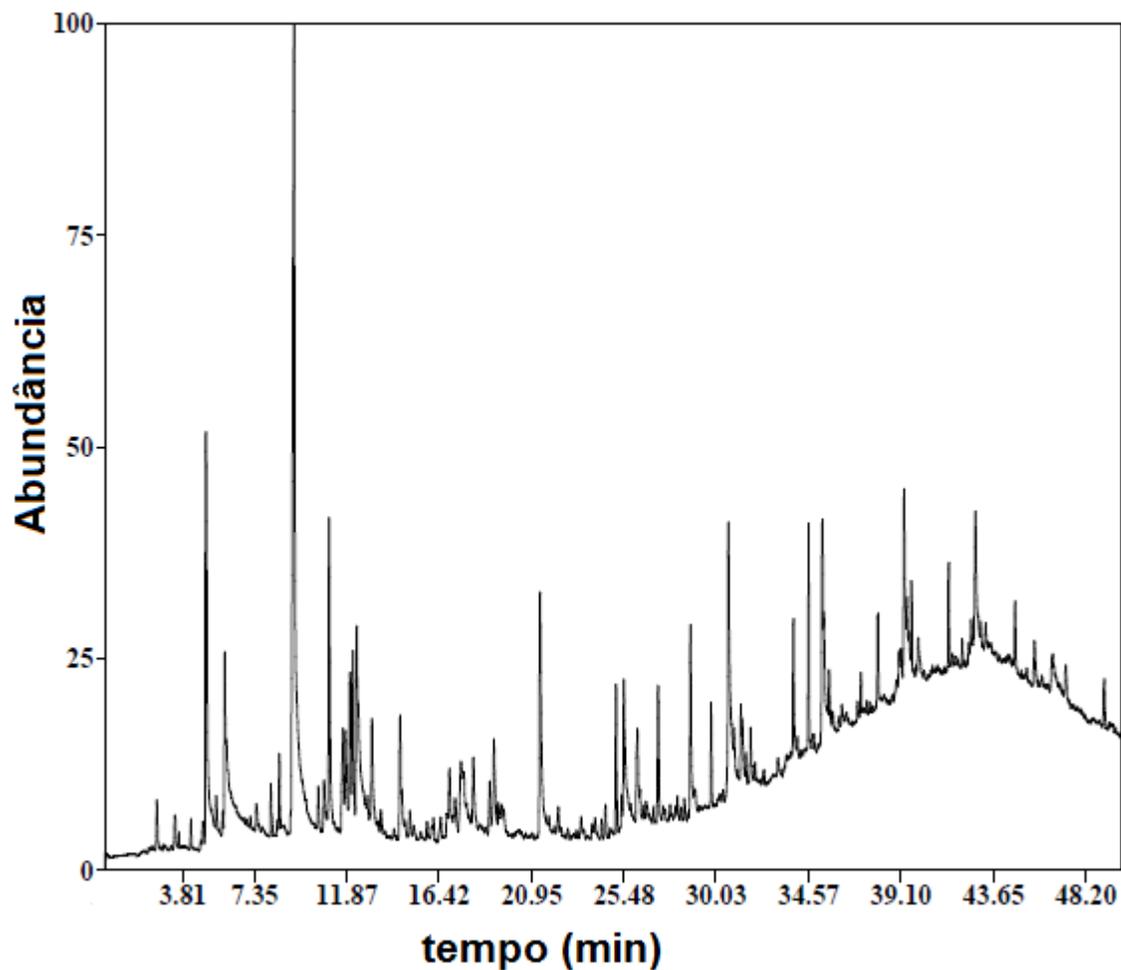
APÊNDICE A

Cromatogramas obtidos da carne de mexilhão e do hidrolisado protéico de mexilhão líquido, utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado com espectrômetro de massas, para identificação dos componentes voláteis.



(a) Cromatograma obtido por CG-EM para a carne de mexilhão, analitos extraídos por SPME.

Condições cromatográficas: Cromatógrafo gasoso Varian Star 3600 CX, detector seletivo de massas MS Saturn 2000, coluna cromatográfica VP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), programação de temperatura da coluna: 40°C/2 min, 5 °C/min até 60°C, 2 °C/min até 90°C e 5 °C/min até 200°C e 200°C/7min, temperaturas do injetor e do detector de 250°C, hélio (1 mL/min), volume injetado 1 μ L.



(b) Cromatograma obtido por CG-EM para o hidrolisado protéico de mexilhão, analitos extraídos por SPME.

Condições cromatográficas: Cromatógrafo gasoso Varian Star 3600 CX, detector seletivo de massas MS Saturn 2000, coluna cromatográfica VP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), programação de temperatura da coluna: 40°C/2 min, 5 °C/min até 60°C, 2 °C/min até 90°C e 5 °C/min até 200°C e 200°C/7min, temperaturas do injetor e do detector de 250°C, hélio (1 mL/min), volume injetado 1 μ L.

APÊNDICE B

LISTA DE PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO

Artigos completos publicados, aceitos para publicação ou submetidos para análise em periódicos:

SILVA, V.M.; PARK, K.J., HUBINGER, M.D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of mussel meat. *Journal of Food Science*, v.75, C36-42, 2010.

SILVA, V.M.; PARK, K.J., HUBINGER, M.D. Kinetics of enzymatic hydrolysis of mussel meat using response surface methodology. Artigo submetido para análise na revista *Journal of Food Science*.

Capítulo de livro:

SILVA, V.M.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Production and Shelf Life of Mussel Meat Powder Flavor. In: MCGEVIN, L.E. (Ed.). *Mussels: Anatomy, Habitat and Environmental Impact*. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, ISBN 978-1-61761-763-8, 2011.

Trabalhos completos publicados em Anais de Congressos:

SILVA, V.M.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Influence of carrier agents on the physical properties of mussel meat protein hydrolysate powder. In: 17th International Drying Symposium (IDS), 2010, Magdeburg, Alemanha, p.1799-1806.

SILVA, V.M.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Mussel meat flavor: study of enzymatic hydrolysis kinetics. In: VII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA), 2009, Bogotá, Colômbia. *Proceedings of CIBIA, 2009*, seção B2, p.1-5.

SILVA, V.M.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Glass transition and water sorption of spray dried mussel meat hydrolysate. In: XVIIth International Conference on Bioencapsulation, 2009, Groningen, Holanda. *Proceedings of the International Conference on Bioencapsulation, 2009*, p.124-125.

Resumos expandidos publicados em Anais de Congressos:

SILVA, V.M.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Otimização da Hidrólise Enzimática da Carne de Mexilhão. In: XXI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2008, Belo Horizonte, Brasil. Anais do XXI CBCTA, 2008, p.1-3.

Resumos publicados em Anais de Congressos:

SILVA, V.M.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D. Optimization of spray drying of mussel protein hydrolysate. In: IFT Annual Meeting and Food Expo, Chicago, Estados Unidos, 2010, p.92.

DELES, S.S., SILVA, V.M.; HUBINGER, M.D. Influência das variáveis de processo na secagem por *spray dryer* de um hidrolisado protéico de mexilhão. In: XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp (PIBIC), 2009, Campinas, Brasil. Anais do PIBIC, 2009, p.295.