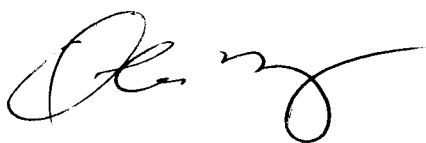


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE USO EM ALIMENTOS
DE HIDROLISADOS PROTÉICOS ÁCIDOS COM BAIXO
TEOR DE SAL**

Parou
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida
por Everardo Ferreira Praça e aprovada pela Comissão
Julgadora em 13.03.95.



EVERARDO FERREIRA PRAÇA

ORIENTADOR: PROF. DR. OLAVO RUSIG

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em
Tecnologia de Alimentos.

CAMPINAS - SP
1995



BC
1/01/95
24 849
433/95
11,00
09/06/95

CM-00070712-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P895o

Praça, Everardo Ferreira.

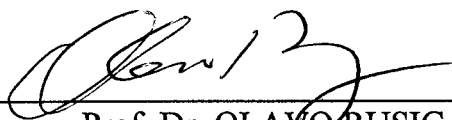
Obtenção e avaliação de uso em alimentos de hidrolisados protéicos ácidos com baixo teor de sal / Everardo Ferreira Praça -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Olavo Rusig

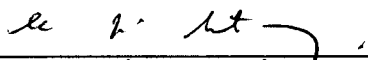
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Hidrolisados. 2. Dessalinização. 3.*Hidrolisados ácidos. 4.* Hidrolisados protéicos. I. Rusig, Olavo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

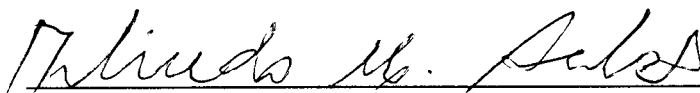
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. OLAVO RUSIG
ORIENTADOR



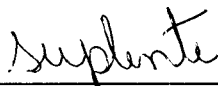
Prof. Dr. ALOÍSIO JOSÉ ANTUNES
MEMBRO



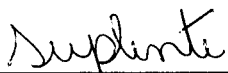
Dr. ARLINDO MOREIRA SALES
MEMBRO



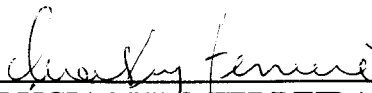
Profa. Dra. FLÁVIA MARIA NETTO
MEMBRO



Prof. Dr. JOSÉ DE ASSIS F. FARIA
MEMBRO



Profa. Dra. MARIA ANTONIA M. GALEAZZI
MEMBRO



Dra. VERA LÚCIA PUPO FERREIRA
MEMBRO

Ao silêncio da minha mãe,
Doninha,
e do meu irmão,
Mário,
que nos deixaram prematuramente.

À presença, sempre querida, da
minha esposa e amiga,
Dita,
e das nossas filhas,
Layla e
Luana.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Olavo Rusig pela orientação, amizade, compreensão, consideração e apoio que tornaram possível a execução deste trabalho. A minha gratidão.

Ao Departamento de Química e Tecnologia da Escola Superior de Agricultura de Mossoró-ESAM, pela liberação durante o período do curso e pelos incentivos.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA/UNICAMP e, em especial, ao Laboratório de Tecnologia Geral, pela concessão do espaço físico e do apoio técnico na realização deste trabalho.

À CAPES/PICD pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. José de Assis F. Faria, pela amizade e orientação na determinação da vida útil do produto final.

Ao Prof. Carlos Alberto Rodrigues Anjos e Eli Espinoza Atencia, amigos, companheiros das horas difíceis e alegres. A minha saudade.

Ao Prof. Dr. Gil Eduardo Serra, pelos bons momentos de uma grande amizade e pela paciência na orientação da revisão deste trabalho.

À Prof. Dra. Enny Therezinha Martucci, pela assistência na secagem do hidrolisado.

À querida amiga Kimie Alice Mizota Shiosawa, pela ajuda inestimável no decorrer de todo este trabalho.

À Ana Maria da Silva e Nelson Machado Magalhães, pela colaboração no laboratório e pela amizade.

Ao amigo Domingos Mucinhato Filho, sempre disponível para ouvir e ajudar. Obrigado.

Aos inesquecíveis amigos da ESAM e Mossoró, pela presença constante, incentivos e pelo desejo sincero de me verem concluir este curso.

Aos amigos, professores Euclides Alves de Moraes e Josivan Barbosa Menezes, pela valiosa colaboração na análise de aminoácidos.

Aos professores, funcionários, colegas de curso, amigos que direta ou indiretamente prestaram colaboração.

Ao Prof. José Espínola Sobrinho e sua esposa Magali, pelo conforto de uma amizade de muitos anos e por abrigar a minha família na minha ausência.

Em especial, ao meu irmão, amigo de todos os momentos, professor Otto Soares de Araújo Filho e sua esposa Catarina, por assumirem os meus problemas na minha ausência e, na presença, participar das minhas alegrias e tristezas. A minha gratidão.

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS -----	xi
ÍNDICE DE FIGURAS -----	xv
RESUMO -----	xviii
SUMMARY -----	xix
I. INTRODUÇÃO -----	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	4
1. Aspectos gerais -----	4
2. Avaliação dos métodos de hidrólise -----	4
3. Fatores que influenciam a hidrólise -----	6
4. Formação de huminas -----	9
5. Processos de produção de hidrolisados protéicos -----	10
6. Processos de dessalinização -----	16
6.1. Princípio da osmose reversa e ultrafiltração -----	16
6.2. Princípio da eletrodialise -----	17
6.3. Dessalinização de hidrolisados protéicos -----	20
7. Métodos de desidratação -----	21
7.1. Atividade de água -----	23
7.2. Isotermas de adsorção -----	25

7.2.1. Efeito da temperatura sobre a umidade relativa de equilíbrio-----	27
8. Determinação da vida-de-prateleira de produtos desidratados -----	30
8.1. Propriedades de barreira de embalagens plásticas ao vapor de água -----	31
9. Legislação brasileira para uso de hidrolisados protéicos -----	31
III. MATERIAL E MÉTODOS -----	33
1. MATERIAL -----	33
1.1. Experimento de hidrólise em laboratório -----	33
1.1.1. Matéria prima -----	33
1.1.2. Equipamentos -----	33
1.2. Experimento de hidrólise em escala piloto-----	34
1.2.1. Matéria prima -----	34
1.2.2. Equipamentos -----	34
1.3. Experimentos para obtenção de hidrolisados protéicos com baixos teores de sal -----	37
1.3.1. Matéria prima -----	37
1.3.2. Equipamentos -----	37
2. MÉTODOS -----	39
2.1. Métodos analíticos -----	39
2.1.1. Determinação de proteína bruta -----	39
2.1.1.1. Cálculo do rendimento de hidrólise -----	39
2.1.2. Determinação de aminoácidos -----	39
2.1.3. Determinação de nitrogênio amínico -----	40

2.1.3.1. Determinação do grau de hidrólise -----	40
2.1.4. Determinação de cloreto de sódio -----	41
2.1.5. Determinação de umidade -----	41
2.1.6. Determinação de extrato etéreo e cinzas -----	42
2.1.7. Análise sensorial dos hidrolisados protéicos -----	45
2.1.8. Determinação da isoterma de adsorção do hidrolisado de protenose -----	46
2.1.8.1. Obtenção da umidade relativa controlada -----	46
2.1.8.2. Absorção de umidade -----	46
2.1.8.3. Umidade crítica do produto -----	46
2.1.9. Determinação do coeficiente de eficiência protéica (PER) e do PER corrigido -----	48
2.1.10. Curva de crescimento dos ratos -----	48
2.1.11. Determinação da vida-de-prateleira do hidrolisado -----	48
2.2. Experimentos -----	51
2.2.1. Obtenção de hidrolisados em laboratório -----	51
2.2.1.1. Efeito da variação do teor de matéria prima na hidrólise -----	51
2.2.1.2. Efeito da variação da concentração de ácido clorídrico sobre a hidrólise -----	53
2.2.1.3. Efeito da variação da temperatura de 100 para 80°C sobre a hidrólise -----	53
2.2.2. Preparo de hidrolisado das diversas matérias primas -----	53
2.2.2.1. Avaliação dos hidrolisados preparados com tempos de hidrólise de 3 e 8 horas a partir das diversas matérias primas -----	54
2.2.2.2. Avaliação de caldo de carne contendo hidrolisados protéicos -----	54
2.2.3. Obtenção de hidrolisados em escala piloto -----	55

2.2.4. Avaliação do teor de aminoácidos em hidrolisados obtidos em laboratório e em escala piloto -----	56
2.2.5. Obtenção de hidrolisados protéicos com baixos teores de sal -----	56
2.2.5.1. Destilação a vácuo do ácido clorídrico sem injeção de vapor de água -----	56
2.2.5.2. Destilação a vácuo do ácido clorídrico com injeção de vapor de água -----	57
2.2.6. Secagem do hidrolisado de protenose com baixo teor de sal -----	58
2.2.7. Ensaio biológico -----	58
2.2.7.1. Avaliação da eficiência protéica (PER) do hidrolisado de protenose seco e com baixo teor de sal -----	58
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	62
4.1. Caracterização da matéria prima	62
4.2. Determinação das condições de hidrólise em laboratório -----	63
4.2.1. Rendimento de hidrólise -----	63
4.2.2. Preparo de hidrolisados das diversas matérias primas --	70
4.2.2.1. Avaliação das diversas matérias primas com tempo de hidrólise de 3 e 8 horas -----	73
4.2.2.2. Avaliação de hidrolisados selecionados para substituição do extrato de carne em caldo de carne -----	75
4.3. Obtenção de hidrolisado em escala piloto -----	78
4.4. Avaliação do teor de aminoácidos do hidrolisado de protenose -	78
4.5. Obtenção de hidrolisados protéicos ácidos com baixos teores de sal -----	86
4.5.1. Eliminação do ácido de hidrólise por destilação a vácuo -	86
4.5.2. Destilação a vácuo do ácido clorídrico com injeção de vapor de água -----	88

4.5.2.1. Otimização do método de destilação a vácuo com injeção de vapor de água -----	94
4.6. Secagem do hidrolisado de protenose -----	98
4.6.1. Isoterma de adsorção -----	98
4.6.2. Determinação da vida-útil do hidrolisado -----	105
4.7. Ensaio biológico -----	107
4.7.1. Avaliação da eficiência protéica (PER) do hidrolisado de protenose seco e com baixo teor de sal -----	107
V. CONCLUSÕES. -----	110
VI. TRABALHOS FUTUROS -----	112
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	113
IX. ANEXO -----	125

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Fatores que afetam a hidrólise enzimática de proteínas -----	2
Tabela 2 - Influência da concentração do ácido hidrolítico no rendimento de hidrólise -----	7
Tabela 3 - Redução do teor de cloreto de sódio de hidrolisados protéicos --	21
Tabela 4 - Soluções saturadas utilizadas na determinação das isotermas de adsorção -----	47
Tabela 5 - Características do material de embalagem utilizados nos cálculos da vida de prateleira do hidrolisado -----	50
Tabela 6 - Percentagem de substituição de extrato de carne por hidrolisado protéico na formulação de caldo de carne -----	55
Tabela 7 - Composição básica das dietas utilizadas no ensaio biológico-----	59
Tabela 8 - Composição da mistura salina usada nas dietas para o ensaio bilógico-----	60
Tabela 9 - Composição da mistura vitamínica usada nas dietas para o ensaio biológico -----	61
Tabela 10.- Proteína total das matérias primas utilizadas no preparo dos hidrolisados protéicos -----	62
Tabela 11 - Composição centesimal da protenose -----	62

Tabela 12 - Efeito da variação do teor de matéria prima (protenose) na hidrólise, quanto ao Brix, teor de proteína e rendimento dos hidrolisados utilizando ácido clorídrico a 15% (p/v) e temperatura de refluxo de 100°C -----	65
Tabela 13 - Efeito da variação do teor de ácido clorídrico na hidrólise de 30% de protenose quanto ao Brix, teor de proteína e rendimento dos hidrolisados. A temperatura de refluxo foi 100°C -----	68
Tabela 14 - Efeito da variação do teor de ácido clorídrico na hidrólise de 30% de Fermento Fleischmann Royal fresco (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) quanto ao teor de proteína e rendimento dos hidrolisados. A temperatura de refluxo foi 100°C	70
Tabela 15 - Efeito da variação do teor de ácido clorídrico na hidrólise de 30% de torta de soja quanto ao teor de proteína e rendimento dos hidrolisados. A temperatura de refluxo foi 100°C -----	71
Tabela 16 - Efeito da variação do teor de ácido clorídrico na hidrólise de 30% de grãos de soja moídos quanto ao teor de proteína e rendimento dos hidrolisados. A temperatura de refluxo foi 100°C -----	72
Tabela 17 - Estudo da matéria prima que melhor se prestou para obtenção do hidrolisado -----	74
Tabela 18 - Frequência das razões para aceitação ou rejeição dos hidrolisados -----	75
Tabela 19 - Avaliação sensorial de amostras com substituição de extrato de carne por hidrolisados, com 8 horas de hidrólise, nas formulações para caldo de carne -----	76

Tabela 20 - Frequência das razões para preferir ou rejeitar as formulações de caldo de carne com substituição de extrato de carne por hidrolisado -----	77
Tabela 21 - Efeito da variação do teor de ácido clorídrico na hidrólise de 30% de protenose na formulação quanto ao teor de proteína dos hidrolisados e rendimento de hidrólise. A temperatura de refluxo foi de 80°C -----	79
Tabela 22 - Composição de aminoácidos da matéria prima (protenose) utilizada na padronização dos métodos de hidrólise -----	82
Tabela 23 - Composição de aminoácidos de hidrolisado protéico de protenose hidrolisada durante 4 horas em temperatura de 100°C e destilada a vácuo com injeção de vapor de água seco -----	83
Tabela 24 - Composição de aminoácidos de hidrolisado protéico de protenose hidrolisada por 12 horas em temperatura de 80°C e destilada a vácuo com injeção de vapor de água úmido -----	84
Tabela 25 - Composição de aminoácidos de hidrolisado protéico de protenose hidrolisada por 12 horas em temperatura de 80°C e destilada a vácuo com injeção de vapor de água seco -----	85
Tabela 26 - Percentagem de cloreto de sódio eliminado na destilação de amostras de hidrolisado protéico de protenose preparado com diferentes concentrações de ácido clorídrico -----	92
Tabela 27 - Percentagem de cloreto de sódio eliminado na destilação de amostras de hidrolisado protéico de refinasil preparado com diferentes concentrações de ácido clorídrico -----	93

Tabela 28 - Vida útil do hidrolisado protéico acondicionado em diferentes materiais de embalagem -----	106
Tabela 29 - Ganho de peso, consumo de proteína e coeficiente de eficiência protéica (PER) para a caseína, protenose e hidrolisado protéico de protenose -----	108

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Processo de produção de molho de soja por hidrólise ácida ----	11
Figura 2 - Produção comercial de hidrolisado protéico-----	12
Figura 3 - Processo de separação por membranas -----	18
Figura 4 - Sistema de eletrodialise -----	19
Figura 5 - Faixa de atividade de água de alguns alimentos e do crescimento de microorganismos -----	24
Figura 6 - Isoterma de sorção típica para alimentos -----	28
Figura 7 - Isoterma típica para alimentos com diferentes composições químicas-----	29
Figura 8 - Processo de produção do hidrolisado em laboratório-----	35
Figura 9 - Sistema piloto de produção de hidrolisado-----	36
Figura 10 - Sistema de destilação para evaporação a vácuo do ácido clorídrico utilizado na hidrólise-----	38
Figura 11 - Fluxograma da destilação e determinação do teor de cloreto de sódio-----	43
Figura 12 - Titulação potenciométrica do hidrolisado protéico sem tratamento prévio (DV-0) e destilado a vácuo com injeção de vapor de água durante 10 (DV-10), 30 (DV-30) e 60 (DV-60) minutos -----	44
Figura 13 - Fluxograma geral de produção de hidrolisado protéico -----	52

Figura 14 - Grau de hidrólise de 30% de protenose com variação na concentração de ácido clorídrico e da temperatura de hidrólise--	69
Figura 15 - Destilação a vácuo do hidrolisado protéico em evaporador rotativo -----	87
Figura 16 - Efeito do tempo de destilação e percentagem de ácido clorídrico no teor de cloreto de sódio remanescente no hidrolisado protéico de protenose -----	91
Figura 17 - Efeito do tempo de destilação e percentagem de ácido clorídrico no teor de cloreto de sódio remanescente no hidrolisado protéico de refinasil -----	90
Figura 18 - Influência da temperatura na eficiência do método de destilação do ácido clorídrico com injeção de vapor úmido-----	96
Figura 19 - Avaliação da eficiência do método de dessalinização com injeção de vapor seco utilizando hidrolisados preparados com diferentes matérias primas -----	97
Figura 20 - Isoterma de adsorção a 23 e 38°C de hidrolisado protéico de protenose secado em <i>spray drier</i> -----	100
Figura 21 - Amostras de hidrolisado de protenose colocadas em dessecadores com diferentes umidades relativas a 23°C -----	101
Figura 22 - Amostras de hidrolisado de protenose colocadas em dessecadores com diferentes umidades relativas a 38°C. O padrão foi mantido em sacos de polietileno colocado em dessecador com sílica -----	102

Figura 23 - Grau de absorção de água de hidrolisado protéico de protenose (seco em <i>spray drier</i>), em diferentes umidades relativas e temperatura de 23°C-----	103
Figura 24 - Grau de absorção de água de hidrolisado protéico de protenose (seco em <i>spray drier</i>), em diferentes umidades relativas e temperatura de 38°C-----	104
Figura 25 - Variação do peso médio de ratos wistar em relação ao tempo em dieta de caseína, protenose e hidrolisado protéico de protenose --	110

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método para obter hidrolisados protéicos com baixos teores de cloreto de sódio, utilizando o ácido clorídrico como meio hidrolítico.

Inicialmente foram utilizadas a torta de milho e soja, o farelo de milho, grãos de soja moídos, proteína texturizada de soja, fermento biológico fresco, caseína e gelatina, como matérias primas para a produção do hidrolisado. A hidrólise foi otimizada através da padronização dos parâmetros que influenciam o processo como a concentração da matéria prima, concentração do ácido hidrolítico, tempo e temperatura de hidrólise. A avaliação das condições de hidrólise foi feita, pela determinação do grau de hidrólise, de acordo com o método do ácido trinitro benzeno sulfônico (TNBS). O melhor rendimento de proteína solubilizada, foi obtido quando utilizou-se na formulação 30% de matéria prima, 20% de ácido clorídrico e tempo de hidrólise de 8 horas para a temperatura de refluxo de 100°C (95%) e de 12 horas para 80°C (90%).

Avaliou-se através da análise sensorial a substituição do extrato de carne por esses hidrolisados protéicos em formulações para caldo de carne. Para hidrolisados obtidos a partir da torta de soja e fermento biológico fresco, a substituição a nível de 100%, foi amplamente aceita pelos provadores.

Um método foi desenvolvido para obter hidrolisados protéicos, com baixos teores de cloreto de sódio, pela injeção de vapor de água no recipiente de destilação e aplicação de vácuo para eliminar o ácido clorídrico usado no processo. A eficiência do método foi medida pela determinação do teor de cloreto de sódio nas amostras após destilação e neutralização com hidróxido de sódio. Constatou-se que em 90 minutos de destilação ocorre uma redução de 88% da concentração original de cloreto de sódio quando o hidrolisado é preparado com 30% (v/v) de ácido.

A secagem do hidrolisado em *spray drier* deu origem a um pó fino, prontamente solúvel em água e com 0,8% de umidade. Por ser um produto bastante higroscópico, a sua vida útil foi determinada utilizando-se embalagens de filmes plásticos com propriedades de barreira à umidade.

SUMMARY

The objectives of this research were to develop a method to obtain protein hydrolysate with low sodium chloride levels, using hydrochloric acid as the hydrolyzing agent.

The basic raw material used to produce the hydrolysates were corn and soybean cakes (after oil extraction), corn bean,, ground soybeans, fresh yeast, casein and gelatine. The process of hydrolysis was optimized by standardizing the parameters which influence the process, such as concentration of raw material and hydrochloric acid, time and temperature. The hydrolysis conditions were evaluated by determining the degree of hydrolysis according to the trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) method. The best yields in terms of solubilized amino acid were obtained with the following conditions: 30% raw material, 20% hydrochloric acid and a hydrolysis time of 8 hours for a reflux temperature of 100°C (95%) or 12 hours at 80°C (90%).

The substitution of meat extract by the protein hydrolysate was evaluated sensorially in formulations for meat broth. In the case of hydrolysate from soybean cake and fresh yeast, substitution at the level of 100°C was well accepted by the panel members.

A method to obtain low sodium chlorid content protein hydrolysates was developed, which involved injecting water vapour into the distillation receiver and applying vacuum to eliminate the hydrochloric acid used in the process. The efficiency of the method was measured by determining the sodium chloride content of the samples after distillation and neutralization with sodium hydroxide. It was show that after 90 minutes of distillation the original sodium chloride concentration of hydrolysates prepared with 30% (v/v) acid, had been reduced by 88%.

After drying in spray dryer,, the hydrolysate produced a fine powder easily dissolved in water and containing 0,8% humidity. Since the product was highly hygroscopic, the shelf-life was determined by the use of plastic film packaging with moisture barriers properties.

I. INTRODUÇÃO

Os hidrolisados de proteínas são utilizados na alimentação, há muitos anos, para melhorar o sabor e a composição nutricional dos alimentos. Eles constituem a base para temperos, sopas e molhos. São também utilizados como acentuadores de sabor em produtos de milho, extrusados, "snacks", pescados, conservas, gelatinas e carnes tecnologicamente processadas. No sudeste asiático esses produtos têm servido não somente como condimentos, mas também como uma fonte de aminoácidos na dieta alimentar (FUGIMAKI *et al*, 1968; DAVIES & THOMAS, 1973; MURRAY, 1977; PHAN & ROSARIO, 1983).

Em princípio, toda matéria prima protéica pode ser submetida a uma hidrólise. Como critério de escolha pode-se citar a disponibilidade, pureza, custo, sabor dos hidrolisados resultantes e ausência de toxicidade tanto da matéria prima como do hidrolisado. Como na maioria dos casos as fontes de proteínas não são puras, outros componentes encontrados em sua composição como gorduras e carboidratos alteram o produto final que passam a conter além de aminoácidos, compostos orgânicos que, sem dúvida, contribuem no sabor (MAY, 1974; PRENDERGAST, 1974).

Em virtude da utilização precedente de matéria prima protéica vegetal, os hidrolisados são internacionalmente designados como HPV (Hydrolysed Vegetable Protein). As matérias primas comumente utilizadas são a farinha de soja desengordurada com 45 a 54% de proteína, trigo e outros produtos vegetais, entre os quais algas e cereais (MINOR, 1945; KONRAD & LIESKE, 1979; DZANIC *et al*, 1985). Os hidrolisados podem também ser elaborados de uma grande variedade de proteínas animais como as do leite, carnes, peixes e outros (WALTERS, 1912). JASWAL (1990) utilizou restos industriais de caranguejos para produzir hidrolisados protéicos com grande potencial de utilização na alimentação especializada de animais e em outros produtos. A sua produção baseia-se na quebra das ligações peptídicas das proteínas utilizando-se enzimas, ácidos ou álcalis (VICKERY, 1922; GRIFFIT LABORATORIES LIMITED Pat. 1,071,248, 1965; KONRAD & LIESKE, 1979).

A hidrólise enzimática foi minuciosamente descrita por ADLER-NISSEN (1985). Pode-se citar como vantagem da utilização de enzimas proteolíticas, a sua alta

especificidade e a quebra suave das ligações peptídicas onde nenhum aminoácido é destruído (FUGIMAKI, 1968; JASWAL, 1990). KILARA (1985) publicou que a degradação enzimática de proteínas é dependente de uma série de fatores, como é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Fatores que afetam a hidrólise enzimática de proteínas

Fatores	Justificativa
Especificidade enzimática	Uma única protease não hidrolisa completamente uma proteína. São utilizadas misturas de proteases.
Extensão da desnaturação das proteínas	Proteínas desnaturadas são mais susceptíveis a hidrólise
Concentração do substrato e enzima	Deverão ser controlados
pH	pH ótimo varia com a enzima
Substâncias inibidoras	Deverão estar ausentes

FONTE: KILARA (1985).

A hidrólise alcalina de proteínas é de uso limitado, uma vez que aminoácidos como a serina, treonina, arginina, cisteína e cistina são destruídos (KONRAD & LIESKE, 1979). Além disso, os hidrolisados obtidos por esse método apresentam um sabor amargo e desagradável o que inviabiliza a sua utilização em alimentos (FUGIMAKI *et al*, 1968).

A hidrólise ácida é o método mais utilizado industrialmente para produzir hidrolisados protéicos. Embora sejam descritas na literatura hidrólises ácidas com a utilização dos ácidos carbônico, acético, fórmico e fosfórico (NASSET & GREENBER; PENNEY, G. L.; SIDICOV, V. S. citados por KONRAD & LIESKE, 1979) ou ácido perclórico e p-tolueno sulfônico (DAVIES & THOMAS, 1973), esses tipos de hidrólise são praticamente irrelevantes na produção de hidrolisados protéicos. Os agentes hidrolíticos mais utilizados são os ácidos sulfúrico e clorídrico. Quando se utiliza o ácido sulfúrico, o produto final tem um sabor desagradável, e além disso, após a neutralização são filtradas grandes quantidades de sulfato fazendo com que o rendimento seja baixo, o que torna o produto muito caro. Devido esse custo elevado, esses hidrolisados protéicos isentos de sal são utilizados somente em produtos especiais e dietéticos. Comercialmente, o ácido clorídrico é o mais utilizado, embora tenha a desvantagem de formar grandes

quantidades de sal em consequência da neutralização (MURRAY, 1977; PRENDERGAST, 1974; SIMONS, 1982), uma vez que, segundo HAMPTON (Pat. 1.494.456, 1975) é necessário ser mantido o excesso de ácido para garantir a hidrólise de proteínas.

Tentativas para reduzir a concentração de ácido na mistura para hidrólise, tem conduzido a um baixo rendimento de α -aminoácidos no hidrolisado (HAMPTON, Pat. 1.494.856, 1975), o que, praticamente, determina que o produto final da hidrólise ácida contenha sempre elevadas concentrações de sal.

Visando solucionar esse problema, SIMONS (1982) mostrou que é possível separar o sal de hidrolisados protéicos pelo processo de eletrodialise. Contudo, HOULDSWORT (1980) estudando a desmineralização do soro do leite, observou que a eletrodialise tem um custo operacional muito elevado para níveis acima de 90% de dessalinização e que somente a troca iônica é praticável comercialmente.

Outros processos como a osmose reversa (BANFIELD, 1970; PODAL, 1971; SOURIRAJAN, 1978;) e ultrafiltração (REID & SPENCER, 1960) são largamente empregados em dessalinização, principalmente de água para consumo humano. Nesses processos existem particularidades que evidenciam as diferenças entre eles. Contudo, todos apresentam uma característica comum: a utilização de membranas filtrantes. Como o Brasil é totalmente dependente da importação desses tipos de membranas, a utilização desses processos na dessalinização de hidrolisados protéicos tornaria o custo inicial de operacionalização muito elevado. Em vista disso, é importante o desenvolvimento de processos alternativos que viabilizem a obtenção de hidrolisados protéicos com reduzido teor de sal.

O presente trabalho teve como objetivo, a produção de hidrolisados protéicos com baixo teor de sal, utilizando a destilação a vácuo com injeção de vapor de água ou a evaporação sob vácuo.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Aspectos gerais

Os métodos de hidrólise de proteínas são conhecidos desde 1820 quando BRACONNOT (citado por VICKERY, 1921, e por DAVIES & THOMAS, 1973) aqueceu gelatina, fibra de músculo e lã, na presença de ácido sulfúrico concentrado e isolou leucina da mistura resultante. Contudo, o primeiro produto comercial, o molho de soja *sho-yu*, foi desenvolvido por cientistas chineses que hidrolisaram trigo e soja mediante a ação de enzimas proteolíticas produzidas por fungos, entre os quais, *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *A. orizae*. Cada cultura era escolhida de acordo com as características desejadas do produto final. As primeiras patentes foram concedidas a IKEDA (citado por MURRAY, 1977; PRENDERGAST, 1974 e por DAVIES & THOMAS, 1973) no Japão em 1912.

Nos anos subsequentes, muitos outros trabalhos foram desenvolvidos e houve um grande impulso no desenvolvimento dos processos tecnológicos, tornando possível a produção de hidrolisados com características específicas para cada produto individualmente, apenas com variações nos processos de produção (MINOR, 1945; PRENDERGAST, 1974; MURRAY, 1977).

2. Avaliação dos métodos de hidrólise

Quando uma proteína é hidrolisada, as ligações peptídicas são rompidas em diferentes pontos ao longo da cadeia protéica, originando componentes com diferentes pesos moleculares. Pode-se dizer que a hidrólise de uma proteína ocorre do seguinte modo:

$$\text{PROTEÍNA} \Rightarrow \text{POLIPEPTÍDIOS} \Rightarrow \text{PEPTÍDIOS} \Rightarrow \text{AMINOÁCIDOS}$$

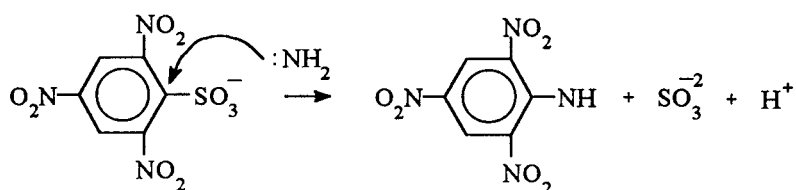
Considerando-se uma hidrólise total, os aminoácidos constituem a base dos hidrolisados juntamente com outros produtos não protéicos provenientes da hidrólise de outros componentes da matéria prima (VICKERY, 1922; PRENDERGAST, 1974; MURRAY, 1977).

É óbvio que o progresso dos estudos da hidrólise de proteínas dependia, sobretudo, do desenvolvimento de métodos analíticos que fossem capazes de detectar os grupamentos amino e carboxílicos dos aminoácidos na mistura hidrolítica. O primeiro método puramente químico foi desenvolvido por SIEGFRIED (1905) (citado por VICKERY, 1922), que verificou que aminoácidos poderiam reagir a frio com o hidróxido de cálcio e dióxido de carbono para formar seus sais que, aquecidos, precipitavam uma quantidade de carbonato de cálcio que era equivalente ao nitrogênio amínico presente. SORENSEN (1908) (citado por VICKERY, 1922) introduziu o método de titulação com formol, pelo qual eram quantificados os grupamentos carboxílicos liberados pela hidrólise de ligações peptídicas. VAN SLIKE (1911) publicou o método do ácido nitroso para estimar nitrogênio amínico livre.

Aparentemente estes estudos se limitaram a determinar a taxa de hidrólise, definida como sendo a percentagem de ligações peptídicas hidrolisadas. VAN SLIKE, utilizou o método do ácido nitroso, introduzido por ele mesmo em 1911, para estudar o grau de hidrólise da albumina do ovo aquecida a 60°C na presença de hidróxido de sódio, com o único objetivo de demonstrar a aplicabilidade do seu método. PITOM (1914) (citado por VICKERY, 1922) utilizou o método da titulação com formol para determinar a taxa de hidrólise da caseína e albumina do ovo aquecida até ebulição com ácido clorídrico a 20%.

Nos anos seguintes muitos outros pesquisadores utilizaram, principalmente, os métodos de SORENSEN (1908) (citado por VICKERY, 1922), e VAN SLIKE (1911) para determinar o grau de hidrólise de misturas provenientes tanto da hidrólise ácida como da enzimática (WALTERS, 1912).

Um dos métodos mais utilizados atualmente para determinar a percentagem de ligações peptídicas hidrolisadas, foi introduzido em 1979 por ADLER-NISSEN, que tomou como base a medida espectrofotométrica do cromóforo formado quando o ácido trinitro benzeno sulfônico (TNBS) reage, especificamente, com os grupamentos α -amino dos aminoácidos:



Esta reação ocorre em meio fracamente alcalino e é terminada pelo abaixamento do pH.

3. Fatores que influenciam a hidrólise

Com o advento do desenvolvimento dos métodos analíticos, foi possível estabelecer a influência de alguns parâmetros essenciais ao processo de hidrólise como:

- concentração do ácido hidrolítico
- concentração da proteína a ser hidrolisada
- concentração da matéria prima
- pressão, temperatura e tempo de hidrólise

A influência de cada um desses parâmetros é, geralmente, verificada com base na determinação do grau de hidrólise que representa, excluindo algumas restrições, uma medida aproximada da produção de aminoácidos (KONRAD & LIESKE, 1979).

Por motivos sensoriais é dada a preferência à hidrólise total das proteínas para evitar o aparecimento de peptídios e de aminoácidos de sabor amargo liberados durante o processo hidrolítico. Em relação a isso, representa exceção o procedimento patenteado no Canadá por GRIFFIT LABORATORIES LIMITED (Pat. 1,071,248, 1965) segundo o qual produtos com sabor característico de carne podem ser produzidos interrompendo a hidrólise em uma taxa de 38 a 58% de hidrolisado. Já FUGIMAKI *et al* (1968) mostraram que além da hidrólise da proteína de soja pela pepsina, o uso de uma proteinase bacteriana ou uma exopeptidase, reduz o amargor.

Outros pesquisadores mostraram que o sabor amargo pode ser reduzido com a diminuição de peptídios hidrofóbicos. Assim, AYHUM (Pat. 2,416,956, 1947) mostrou que o carvão ativado poderia absorver os aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina). Mais tarde, ROLAND *et al.* (1978) desenvolveram um processo

cromatográfico para eliminar o sabor amargo dos hidrolisados utilizando uma resina de fenol formaldeído que possuía afinidade pelos aminoácidos aromáticos.

A influência da concentração do ácido sobre o processo hidrolítico é fundamental. Segundo MAY (1974), a destruição de aminoácidos diminui com o aumento da força do ácido e o sabor do hidrolisado se torna melhor, ainda que altas concentrações de ácido tenha o inconveniente de produzir elevadas concentrações de sal no produto final após a neutralização. HAMPTON (Pat. 1 494 856, 1975) publicou que o excesso de ácido é necessário para garantir a complementação da reação, embora certos produtos possam ser produzidos pela restrição deliberada do grau de hidrólise, reduzindo a taxa de ácido em relação à de proteína ou pela diminuição do tempo de reação (GRIFFIT LABORATORIES LIMITED Pat. 1,071,248, 1965).

Tentativas para reduzir o consumo de ácido têm conduzido a um baixo rendimento e também a uma baixa taxa de α -amino nitrogênio no produto final, em relação ao nitrogênio total da matéria prima, como é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Influência da concentração do ácido hidrolítico no rendimento de hidrólise

Ingredientes	Formulações			
Proteína de soja (70%)em gramas	99,6	99,6	99,6	99,6
Ácido clorídrico (ml)*	250	200	150	100
Água (ml)	180	230	280	330
Rendimento de hidrólise (%)	67	63,5	57,7	36,8

* - 37%, d = 1,8888

FONTE: GRIFFIT LABORATORIES LIMITED Pat. 1,071,248 (1965).

Existe uma série de fatores que podem influenciar a liberação de aminoácidos em uma hidrólise. SINGE (1944 e 1945) e CRISTENSEN (1954) mostraram que em alguns peptídios a resistência a hidrólise com HCl 10 N a 37°C é aumentada quando os grupos carboxílicos da valina e leucina estão envolvidos. LAWRENCE & MOORE (1951) determinaram que a valina e isoleucina são liberados mais lentamente que outros aminoácidos durante a hidrólise da insulina quando é utilizado o ácido clorídrico como agente hidrolítico em normalidades crescentes.

Outro fator que tem sido levado em conta é a destruição de aminoácidos durante a hidrólise. A glutamina é convertida quantitativamente em ácido glutâmico e asparagina em ácido aspártico (REES, 1946). O triptofano é destruído por ácidos, embora uma parte considerável possa ser conservada se o oxigênio for rigidamente excluído (OLCOTT & FRANKEL-KONRAT, 1947). O aquecimento de 100 a 125°C, em ácido clorídrico 6 a 7 N, ou ácido sulfúrico, sob vácuo, não destrói extensivamente o triptofano, mas a degradação ocorre na presença de oxigênio e metais pesados (CANFIELD, 1963a, 1963b). Treonina e serina são destruídos progressivamente quando hidrolisados (OLCOTT & FRANKEL-KONRAT, 1947). Extensiva destruição da cistina e cisteína ocorre em hidrólise ácida, especialmente quando carboidratos estão presentes (GUNDLACH *et al*, 1958; MAHOWALD *et al*, 1962; KONRAD & LIESKE, 1979).

DAVIES & THOMAS (1973) comparando o efeito de vários tratamentos ácidos sobre o rendimento dos aminoácidos, concluíram que a treonina, serina e ácido glutâmico são liberados, rapidamente, em hidrólise com os ácidos sulfúrico e perclórico. Contudo, a treonina e a serina são progressivamente destruídos com o tempo. Valina, isoleucina e leucina são liberados lentamente, mas altos valores são obtidos em menor tempo quando se utiliza ácido sulfúrico em vez de ácido clorídrico. Altas concentrações de ácido sulfúrico provocam pronunciada destruição da tirosina e metionina.

Segundo PHAN & ROSARIO (1983), o efeito da variação da temperatura, tempo e concentração de ácido sobre a taxa de hidrólise de extrato desengordurado de côco e farinha de soja, estão interrelacionados. A taxa de hidrólise aumenta com o aumento da concentração de ácido clorídrico, contudo, a amplitude da reação é determinada pela temperatura, ou seja, em temperaturas baixas a hidrólise não se completa, mesmo em altas concentrações de ácido. Além dessas condições, um tempo mínimo é necessário para completar a reação.

BIRD & MINOR (1948) estudando a influência da temperatura, concentração do íon hidrogênio e proteína sobre a hidrólise, concluíram que o conteúdo de nitrogênio é diretamente proporcional às concentrações de proteína e íons hidrogênio e que o produto final dos hidrolisados preparados em temperaturas baixas, apresentam importantes vantagens sobre aqueles preparados em temperaturas mais elevadas.

Segundo HALL (1949), uma hidrólise realizada com temperatura abaixo de 100° C só se completa após vários dias, enquanto que acima de 120°C alguns aminoácidos são

destruídos. Já KRAMPITZ (citado por KONRAD & LIESKE, 1979) demonstrou que a maioria dos aminoácidos são estáveis em temperaturas em torno de 100°C. De acordo com SCHEIN & BERG (citados por KONRAD & LIESKE, 1979) os aminoácidos são destruídos em maior proporção pelas temperaturas elevadas do que pela hidrólise prolongada ou altas concentrações de ácido.

KONRAD & LIESKE (1979) citam que o tempo de hidrólise pode ser diminuído quando o hidrolisado é produzido sob pressão que pode variar de 2 a 7 atmosferas. Em relação a esse aspecto, HALL (1949) publicou que obteve hidrolisado com excelente aroma quando utilizou ácido clorídrico como meio hidrolítico sob pressão na hidrólise.

4. Formação de huminas

As huminas são materiais insolúveis de coloração negra, formadas durante a hidrólise. Segundo PRENDERGAST (1974), a exata estrutura desse material é ainda desconhecida, mas sabe-se ser um produto polimérico resultante da condensação do triptofano e componentes aldeídicos. De acordo com KONRAD & LIESKE (1979), as huminas representam em primeira linha, produto de condensação de aminoácidos e carboidratos com a participação de triptofano e outros aminoácidos como a tirosina, cisteína, fenilalanina, metionina e arginina.

As huminas ocorrem principalmente em altas concentrações de íon hidrogênio e sua percentagem aumenta com o prolongamento do processo de hidrólise. A percentagem de huminas formadas varia de acordo com a pureza e o tipo de proteína utilizada no processo. Compostos redutores como o cloreto de estanho, cloreto de zinco, cloreto de titânio e dióxido de enxôfre, podem reduzir a sua formação, mas na prática, a maioria dos fabricantes preferem simplesmente filtrar o hidrolisado várias vezes para remover a maior percentagem possível do material humínico e descartá-lo (PRENDERGAST, 1974).

5. Processos de produção de hidrolisados protéicos ácidos

Os primeiros hidrolisados eram produzidos por dois métodos. O primeiro, denominado "*método chinês*", utilizava enzimas proteolíticas de fungos. Cada cultura de fungo induzia a produção de um aroma e dava uma característica específica ao produto final. Esse método tinha a desvantagem de ser muito demorado. DISSON (citado por MINOR, 1945) descreveu com detalhes um processo que requeria dois anos para produzir um "*sho-yu*" de qualidade. No entanto, em 1945, MINOR publicou que duas empresas nos Estados Unidos da América, com a modernização do processo anterior, produziam um produto de qualidade similar em um período de 6 a 8 semanas.

O segundo método consistia em hidrolisar as proteínas em uma solução aquosa de ácido clorídrico a 20%. Comumente eram utilizados na mistura, uma parte de proteína para 3 a 5 partes da solução ácida. Nessa proporção, a mistura era mantida em ebulição em um tanque vitrificado internamente e equipado com um sistema de aquecimento (camisa de vapor) e um condensador de refluxo, até que a concentração máxima de nitrogênio amínico fosse obtida (Figura 1). O nitrogênio era determinado pelo método de VAN SLIKE (1911), e a reação se completava em 12 a 16 horas. Após a reação o hidrolisado era neutralizado com uma solução de hidróxido de sódio a 50% até pH 2-3, filtrado a vácuo em funil de Buchner com papel de filtro e o pH final era ajustado para 4 a 5. A concentração de sal no produto final era em torno de 18%.

PRENDERGAST (1974) e MURRAY (1977) publicaram um processo geral de produção comercial de hidrolisados protéicos ácidos (Figura 2). Segundo esse método, a proteína e o ácido clorídrico são misturados no recipiente de reação e aquecidos. Quando a hidrólise se completa, a mistura é bombeada para um segundo recipiente onde é neutralizada com hidróxido ou carbonato de sódio a um pH que varia entre 4,8 e 6,0. Nesse estágio do processo, as huminas que foram formadas durante a hidrólise são separadas do hidrolisado por filtração ou centrifugação e desprezadas. O filtrado é bombeado para um recipiente de descoloração onde poderá ser feita a eliminação do sabor amargo. O líquido descolorido, após uma segunda filtração, é estocado ou concentrado a vácuo até formar uma pasta ou desidratado em atomizador. Alguns fabricantes produzem pó a partir da pasta utilizando forno a vácuo para eliminar o excesso de umidade, e moendo o produto, em seguida, para reduzir o tamanho das partículas. O processo do forno geralmente apresenta hidrolisados com granulação maior do que os obtidos pelo processo de atomização.

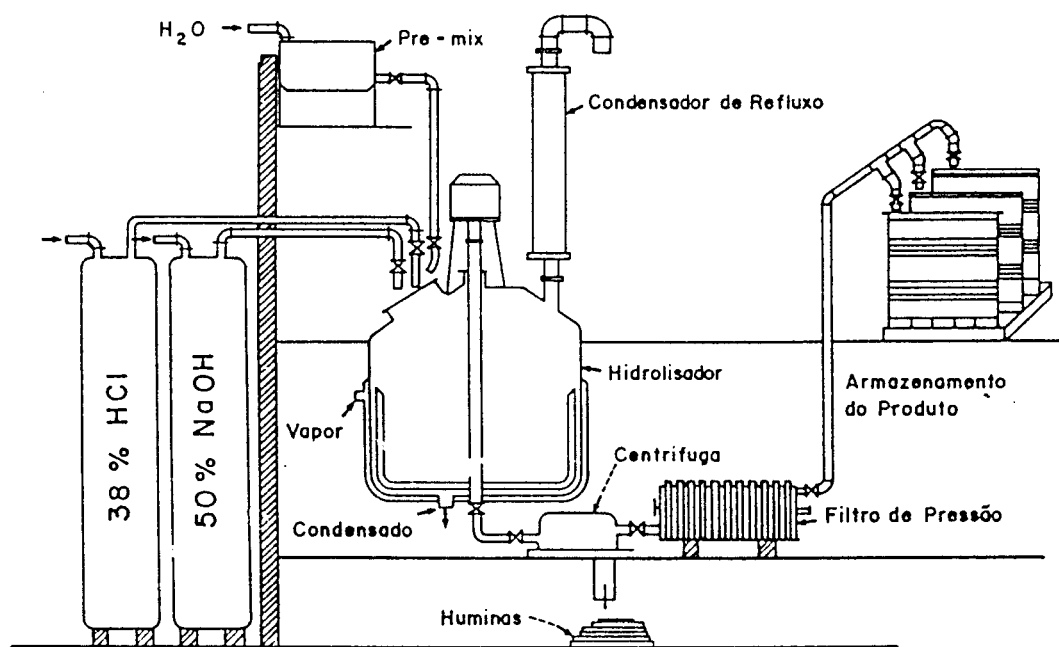


Figura 1 - Processo de produção de molho de soja por hidrólise ácida

FONTE: MINOR (1945)

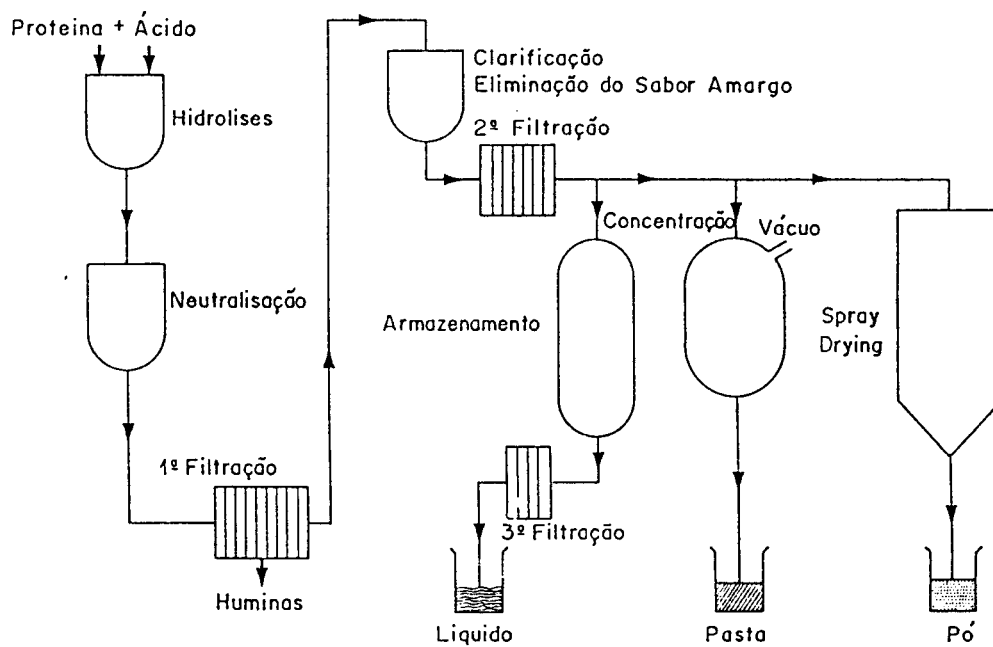


Figura 2 - Produção comercial de hidrolisado protéico

FONTE: PRENDERGAST (1977)

Outros pesquisadores desenvolveram métodos de produção com o objetivo de obter hidrolisados com características específicas. Assim, muitos processos de manufatura de hidrolisados foram patenteados.

BUCK & LESUCK (Pat. 2,685,601, 1954) patentearam um processo com o objetivo de minimizar a quantidade de huminas formadas durante a hidrólise ácida, e sobretudo as perdas de aminoácidos acarretadas pela remoção desse sedimento e a destruição do triptofano. O processo compreende o aquecimento da proteína com uma mistura aquosa de ácido hidrofosfórico e um ácido mineral forte como os ácidos clorídrico, sulfúrico e fosfórico a uma temperatura de 100 a 170°C por um período de tempo que varia de 6 a 22 horas. O hidrolisado protéico obtido é parcial ou completamente livre de huminas e, todo ou uma pequena porção do triptofano original é preservado.

O hidrolisado protéico produzido por esse método pode ser utilizado de maneira convencional como uma fonte de aminoácidos ou para preparação de misturas com fins nutricionais. Para a última proposta, o ácido mineral deve ser substancialmente removido do hidrolisado através de métodos conhecidos, como o uso de uma resina de troca iônica por exemplo.

Uma variação desse método consiste no aquecimento da proteína somente com o ácido hidrofosfórico por poucas horas para obter uma mistura parcialmente hidrolisada; então o segundo ácido é adicionado à mistura por um tempo suficiente para que seja obtido o grau de hidrólise desejado. Em geral, é utilizado de 10 a 12% de ácido hidrofosfórico e 80 a 90% de ácido clorídrico ou outro ácido forte para hidrolisar completamente a proteína dentro de 48 horas a uma temperatura de 100 a 130°C.

Em 1965, GRIFFIT LABORATORIES LIMITED (Pat. 1,071,248) registrou um método de produção de hidrolisado em solução ácida no qual a hidrólise é suspensa quando o hidrolisado tem um conteúdo de α -amino nitrogênio variando entre 35 e 58% do nitrogênio total.

Uma variação desse método pode ser feita usando uma quantidade menor de ácido e, do mesmo modo, suspender a hidrólise no tempo determinado. Essa variação é preferida quando o ácido clorídrico é usado. Nesse caso, o cloreto de sódio formado na neutralização é minimizado.

O procedimento empregado nesses processos é o refluxo por 11 horas da solução aquosa de proteína e ácido hidrolítico, neutralização com hidróxido de sódio a pH 5,5 e o hidrolisado neutralizado é transformado em pó em por atomização. A extensão da hidrólise é medida pela determinação da taxa de nitrogênio no hidrolisado em pó.

Em 1973, PFISTER patenteou um processo que permite a obtenção de um hidrolisado de cor clara, na forma de pó, para uso em gêneros alimentícios. Esse processo consiste no aquecimento durante 18 a 20 horas de uma mistura de água, ácido clorídrico de densidade 1,17 e proteína na proporção em peso de 9:13:10. Em seguida ao período de aquecimento, a mistura é resfriada a uma temperatura de 18 a 32°C, neutralizada com hidróxido de sódio até pH 6,5 a 6,7. Durante a neutralização a temperatura de resfriamento é mantida. Logo após, a mistura é resfriada a 15-25°C, filtrada ou centrifugada. O hidrolisado obtido é, preferencialmente, seco em uma torre de secagem pela introdução de ar aquecido a uma temperatura de 205-214°C para obter um pó prontamente solúvel em água. Pelo ajuste da temperatura do ar seco introduzido na torre de secagem, é possível ajustar a umidade do produto final.

Em 1977, a VEB BERLIN-CHEMIE (Pat. 1 595 499) com o objetivo de melhorar as propriedades dos hidrolisados protéicos para utilização em dietas balanceadas, soluções para infusões, tabletes de aminoácidos para tratamento de insuficiência renal crônica, patenteou o processo que consiste em aquecer um hidrolisado em pó, com no máximo 8% de umidade, obtido por qualquer processo de produção, com um álcool alifático como metanol, etanol, n-propanol iso-propanol ou com uma mistura desses álcoois. O álcool ou a mistura de álcoois pode, se desejado, conter pelo menos um outro solvente miscível tal como um éster de um álcool alifático com um ácido carboxílico alifático ou acetato de etila. O hidrolisado e o álcool na proporção de 1:2 (p/v) é aquecido sob refluxo até ebulição durante 10 minutos. O material insolúvel é filtrado por sucção ou centrifugado, lavado duas vezes com 1/4 do solvente utilizado e seco, por exemplo, no ar. O hidrolisado então obtido, é inodoro, não tem gosto e não contém qualquer amina, sal de amônia ou ceto ácidos. O valor biológico do produto é aumentado correspondendo à soma dos produtos removidos, porque a proporção de aminoácidos essenciais aumenta em relação ao material inicial.

VILLA *et al* (Pat. 2 103 221 A, 1982), descreveram um processo para reduzir o conteúdo de ácido aspártico e glutâmico nos hidrolisados protéicos tendo como princípio

a passagem da solução hidrolisada através de uma coluna de troca iônica do tipo *amberlite*, *IRA 400*, *relite* ou *dowex* com fortes propriedades aniônicas e na forma de -OH. A eluição dos aminoácidos é realizada com os tampões amônia/cloreto de amônia e amônia acetato de amônia com pH maior ou igual a 7,0. Como os ácidos aspártico e glutâmico têm maior afinidade pela resina do que os outros aminoácidos, serão eluídos com um tempo de retenção maior. Após a eluição, a solução de amônia e parte da água é eliminada por evaporação sob pressão reduzida. Esse método proporciona uma recuperação entre 85 e 90% dos aminoácidos em relação aos aminoácidos da matéria prima.

LEE (Pat. 0 183 004 A1, 1985) introduziu um método para controlar a viscosidade dos hidrolisados protéicos pelo ajuste de seu conteúdo de magnésio e cálcio. Segundo esse método, a viscosidade pode ser reduzida pela adição de pirofosfato ou outro agente precipitante em solução ou na forma de pó.

Convencionalmente, adiciona-se ortofosfato aos hidrolisados protéicos para atuar como estabilizador ou tampão. Contudo, esse composto, principalmente o dissódico, aumenta a viscosidade do hidrolisado com o tempo porque o ortofosfato tem somente um sítio de reação, assim a quantidade de íons cálcio e/ou magnésio complexada é insignificante e a maioria do ortofosfato permanece na sua forma original, interagindo com os constituintes remanescentes causando um aumento na viscosidade. Em contraposição, o pirofosfato tem pelo menos três sítios de reação para complexar com os íons cálcio e/ou magnésio. Além disso, os pirofosfatos tem a vantagem adicional de não afetar o perfil organoléptico, não causar efeito adverso sobre a composição de aminoácidos e não ter o sabor típico do hidrolisado quando é tratado com ortofosfato.

A viscosidade do hidrolisado aumenta com o tempo em função das interações que ocorrem entre os íons magnésio e/ou cálcio com os grupamentos carboxílicos (presentes no hidrolisado em torno de 30% em peso para um hidrolisado com 45% de sólidos solúveis), com os ácidos orgânicos (7%) e os fosfatos que também estão presentes em torno de 2%. Como resultado da interação é formado um produto de baixa solubilidade e, conseqüentemente, um meio altamente viscoso com o tempo. Outros agentes precipitantes que são fisiologicamente aceitáveis como os sais de amônia, carbonatos, silicatos e outros, podem ser usados. Contudo, quando são utilizados esses precipitantes em lugar do pirofosfato, o pH do hidrolisado fica alcalino sendo necessário um ajuste após a remoção de precipitado. O pirofosfato pode ser adicionado em qualquer

etapa da hidrólise a partir do momento que o agente hidrolítico é adicionado. Entretanto é necessário levar em consideração que como a viscosidade aumenta com o tempo após o final da hidrólise, é preferível que o pirofosfato seja adicionado antes do término da hidrólise (LEE, 1985).

6. Processos de dessalinização

Os processos de dessalinização mais conhecidos, são aqueles empregados no tratamento de água salina para consumo humano, como a osmose reversa (BANFIELD, 1970; PODAL, 1971; EVANS & GLOVER, 1974; SOURIRAJAN, 1978; TRAGARD, 1991), eletrodialise (YOUNG, 1974) e ultrafiltração (REID & SPENCER, 1960). Basicamente, esses processos utilizam membranas seletivas que têm a propriedade de separar componentes de uma solução. O princípio da separação baseia-se no fato de que a membrana é mais permeável a alguns componentes da solução do que a outros (LACEY, 1972)

Existem dois tipos fundamentais de membranas que são utilizadas nos processos de separação. O primeiro é baseado na diferença de pressão e compreendem as membranas utilizadas em osmose reversa e ultrafiltração, entre outros processos. O segundo é baseado na diferença de potencial elétrico e são utilizadas nos processos que envolvem a difusão de íons, como a eletrodialise.

O fluxo de solução e o arranjo mecânico dos processos de osmose reversa e ultrafiltração são similares. A diferença está no tamanho dos poros da membrana utilizada. Na osmose reversa, solventes podem ser separados de solutos de baixo peso molecular; na ultrafiltração, somente solutos de alto peso molecular podem ser separados de uma solução (LACEY, 1972, EVANS & GLOVER, 1974).

6.1. Princípio da osmose reversa e ultrafiltração

Na osmose reversa e ultrafiltração a força propulsora para fazer a permeação de componentes da solução através da membrana, é a diferença de pressão entre os dois lados da membrana. A osmose reversa, geralmente, requer uma pressão maior em função da pressão osmótica que deve ser vencida e dos menores poros da membrana (LACEY, 1972).

Nesses processos, a membrana é montada em um sistema de modo que dois compartimentos de solução são formados (Figura 3). A solução a ser tratada é pressurizada e circula através do compartimento de alta pressão. Uma parte do solvente é forçada através da membrana para o compartimento de baixa pressão. O material que foi permeado através da membrana é retirado do compartimento de baixa pressão sendo utilizado como produto ou descartado. Do mesmo modo, o material concentrado do lado da alta pressão, pode também ser utilizado como produto ou descartado como material indesejável (EVANS & GLOVER, 1974).

TRAGARD (1991), relacionou as principais aplicações da tecnologia de membranas na indústria de alimentos e mostrou que, basicamente, a ultrafiltração convencional não seria eficiente na separação de misturas salinas. Contudo, REID & SPENCER (1960) modificaram a estrutura básica da ultrafiltração e utilizaram membranas de exclusão e seletiva de íons para fazer a desmineralização de soluções salinas.

6.2. Princípio da eletrodialise

A eletrodialise tem sua maior aplicação na mudança da concentração de íons em uma solução. Para isso utiliza membranas de troca iônica, que são filmes finos de resinas de troca de cátions ou de ânions, comumente reforçados com material sintético para dar maior resistência mecânica. A membrana de maior aceitação comercial tem poros efetivos que variam na ordem de 7 a 20 ângstrons, os quais são ligeiramente maiores que as dimensões atômicas, portanto impermeáveis ao fluxo de líquidos, sólidos e a difusão de grandes moléculas (LACEY, 1974).

Em um sistema de eletrodialise (Figura 4), as membranas de troca de cátions © são alternadas com as membranas de troca de ânions (A) em um arranjo paralelo

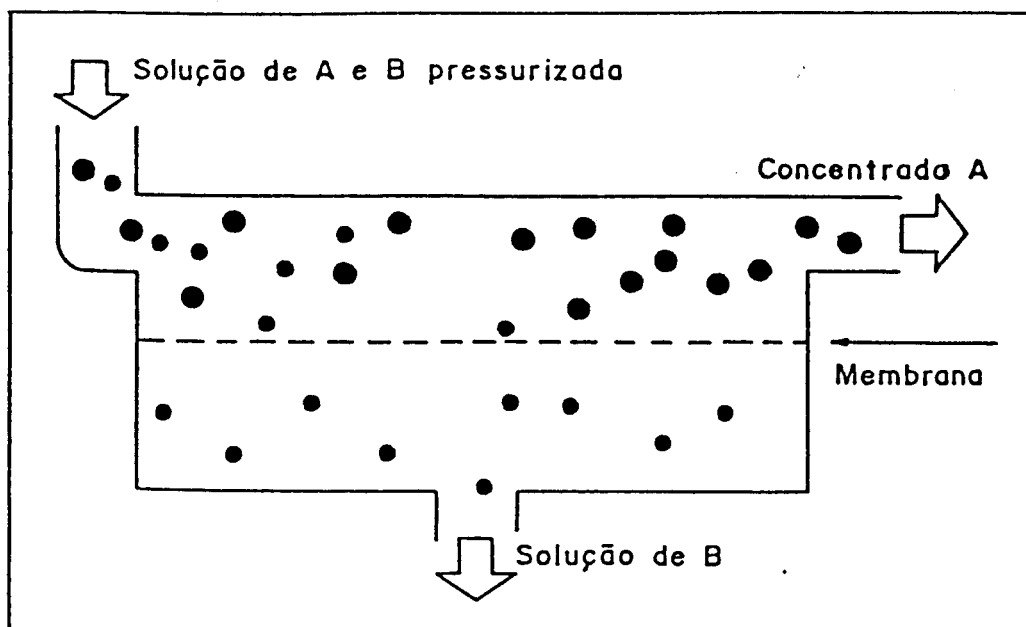


Figura 3 - Processo de separação por membranas

FONTE: LACEY (1972)

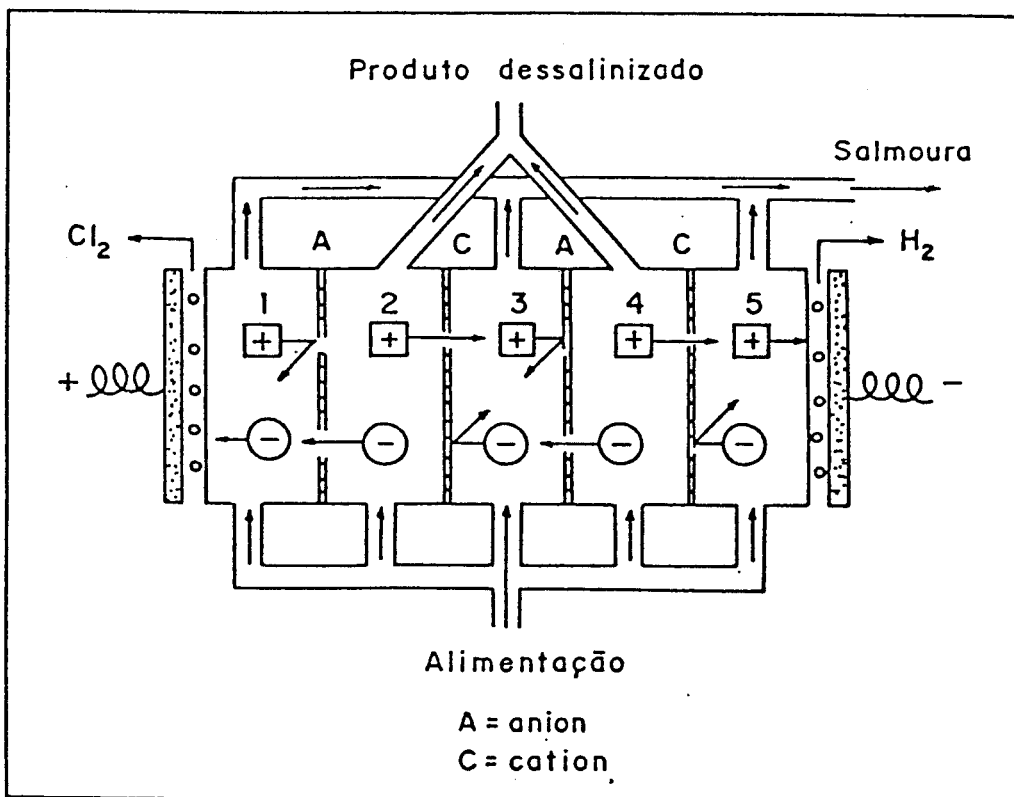


Figura 4 - Sistema de eletrodiálise

FONTE: LACEY (1972)

para formar compartimentos. O conjunto de membranas fica contido entre dois eletrodos que são responsáveis pelo potencial elétrico necessário para a permeação dos íons. Sob a influência de uma força eletromotiva, cátions migram para o cátodo e ânions para o ânodo. Assim, a solução de alimentação contendo os íons é dividida em fluxos desionizados e concentrados em íons.

6.3. Dessalinização de hidrolisados protéicos

Geralmente os hidrolisados protéicos sem sal são produzidos por métodos enzimáticos ou utilizando o ácido sulfúrico como meio hidrolítico. Em nenhum desses dois casos se faz necessária a dessalinização, uma vez que os hidrolisados já são produzidos sem sal. Entretanto, como o ácido clorídrico é o agente hidrolítico mais utilizado comercialmente para produzir hidrolisados (PRENDERGAST, 1974; MURRAY, 1977), uma grande percentagem desse produto é constituído de cloreto de sódio ou potássio, formado durante a sua neutralização. Em função disso, têm sido feitas algumas tentativas para produzir hidrolisados ácidos sem sal utilizando os métodos convencionais de dessalinização ou desenvolvendo novos métodos. Assim, SIMONS (1982) utilizou a eletrodialise para dessalinizar hidrolisados ácidos de soja.

BARNETT (Pat 1,990,769, 1935) introduziu um método de obtenção de aminoácidos a partir de hidrolisados protéicos, em que os aminoácidos eram isolados na forma de cristais, ajustando o pH do hidrolisado para corresponder ao ponto isoelétrico de cada aminoácido especificamente. Nos seus pontos isoelétricos, os aminoácidos são insolúveis e precipitam. Como cada aminoácido tem pH isoelétrico diferente, cada precipitado removido corresponde a um aminoácido purificado, totalmente isento de sal.

HAMPTON (Pat. 1 494 856, 1975) patenteou um processo para produção de hidrolisado que consiste em misturar o material protéico e ácido em excesso, para converter toda proteína em seus aminoácidos constituintes. Em seguida, a mistura é aquecida com agitação, à pressão atmosférica, filtrada para remover parcial ou totalmente o material insolúvel, e finalmente, o ácido hidrolítico é recuperado por destilação e reciclado para ser utilizado no preparo de novo hidrolisado.

Após a etapa de destilação o hidrolisado é neutralizado, e descolorido se necessário; então é transferido para um concentrador a vácuo ou para um secador. O teor de cloreto de sódio presente nos hidrolisados por esse método é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Redução do teor de cloreto de sódio de hidrolisados protéicos

Produto	% de cloreto de sódio	
	Pasta (16% de umidade)	Pó (5% de umidade)
Comercial	40	45
Patenteado	25 - 28	29 - 32

FONTE: HAMPTON (Pat. 1 494 856, 1975)

KOYAMA (Pat. 3,937,844, 1976) reduziu o conteúdo de cloreto de sódio de 13 para menos de 10%, em uma pasta produzida principalmente com soja fermentada, de grande utilização como condimento e em sopas japonesas. Esse resultado foi conseguido reduzindo o pH no início da fermentação pela adição de ácido láctico, e concluiu que esse ácido previne mais a deterioração do produto do que o cloreto de sódio.

7. Métodos de desidratação

Os métodos de desidratação podem ser divididos em quatro grupos:

- por contato com o ar quente (ao sol, em bandejas, em leitos fluidizados e por atomização ou *spray*);
- por contato com superfícies quentes;
- por liofilização;
- por adição de agentes osmóticos.

Todos esses processos têm como objetivo básico a redução da atividade de água dos produtos até níveis próximos a 0,6, tornando-os suceptíveis apenas à ação de alguns fungos e leveduras (Figura 5). No caso de alimentos de umidade intermediária a conservação também é feita pela diminuição da atividade de água, contudo, isso não pode ser viabilizado através dos processos de desidratação que tornam a textura dos produtos muito seca para o consumo direto, e sim pela adição de humectantes que diminuem a atividade de água e permitem manter a umidade dos produtos (TAOUKIS *et al.*, 1988).

Dentre os métodos de secagem, a atomização ou *spray drier* tem sido usado com muito sucesso em uma grande variedade de processos na indústria de alimentos, sobretudo quando a amostra é líquida. PILEGARD-HANSEN (1964) citado por SADIR (1972), define a secagem por atomização como a transformação de uma solução ou suspensão em pó seco, pela pulverização fina do material e imediato contato com uma corrente de ar quente. As vantagens mais importantes que oferece em relação aos outros métodos são:

1. O material a ser secado é suspenso livremente no ar e não adere à superfície metálica quente o que poderia ser prejudicial ao produto;
2. A secagem realiza-se instantaneamente devido a grande superfície de transferência de calor obtida pela pulverização;
3. A secagem tem lugar a baixas temperaturas, ainda que o ar empregado para evaporar, esteja a elevadas temperaturas;
4. A forma da partícula seca é aproximadamente a de uma esfera, geralmente oca, dando ao produto a característica de um pó leve e de fácil fluidez. Este tipo de partícula não é obtido por outro método de secagem;
5. O tamanho das partículas e a densidade do produto podem ser controlados e modificados em uma certa extensão variando as condições operacionais.
6. À medida que a umidade é eliminada da gotícula, a temperatura da mesma se aproxima da temperatura de saturação adiabática do ar que a envolve. Assim, a possibilidade de um super aquecimento é diminuída. Convém acrescentar que a maioria das substâncias sensíveis ao calor em condições úmidas, suportam perfeitamente temperaturas mais elevadas quando estão secas (SADIR, 1972).

A atomização envolve uma série de operações além da secagem propriamente dita, sendo as mais importantes:

- 1) atomização;
- 2) mistura do ar quente com o líquido atomizado;
- 3) secagem das gotas;

4) coleta do produto seco.

Como as três primeiras operações ocorrem quase simultaneamente, é necessário um controle global para evitar influências do processo na qualidade final do produto. Por exemplo: em uma atomização não uniforme, as partículas maiores controlarão o tempo de secagem e, conseqüentemente, as menores sofrerão um super aquecimento devido a evaporação mais rápida. SADIR, em 1972, fez uma revisão sobre a influência das variações desses parâmetros no processo de atomização.

7.1. Atividade de água

O principal fator relacionado com a conservação de alimentos desidratados é a umidade. Variações no seu conteúdo podem alterar os produtos prontos para comercialização (LABUZA, 1972). A melhor medida da concentração de água de um alimento é a sua atividade de água, que é definida como sendo a relação entre a pressão de vapor da água presente em um produto e a pressão de vapor saturado da água pura, na mesma temperatura. A equação que define esta relação representa a umidade relativa de equilíbrio do produto em percentagem (BONE, 1973; KAREL, 1975), assim:

$$A_w = \frac{P}{P_o} = \frac{URE}{100}$$

onde,

A_w = atividade de água

P = pressão de vapor exercida pela água contida no alimento (mmHg)

P_o = pressão de vapor da água para a mesma temperatura (mmHg)

URE = umidade relativa de equilíbrio

A Figura 5 mostra que o crescimento microbiano nos alimentos depende da atividade de água, além de outros fatores como o tipo de flora presente, temperatura, presença de agentes conservantes e a própria composição do alimento (KAREL, 1975).

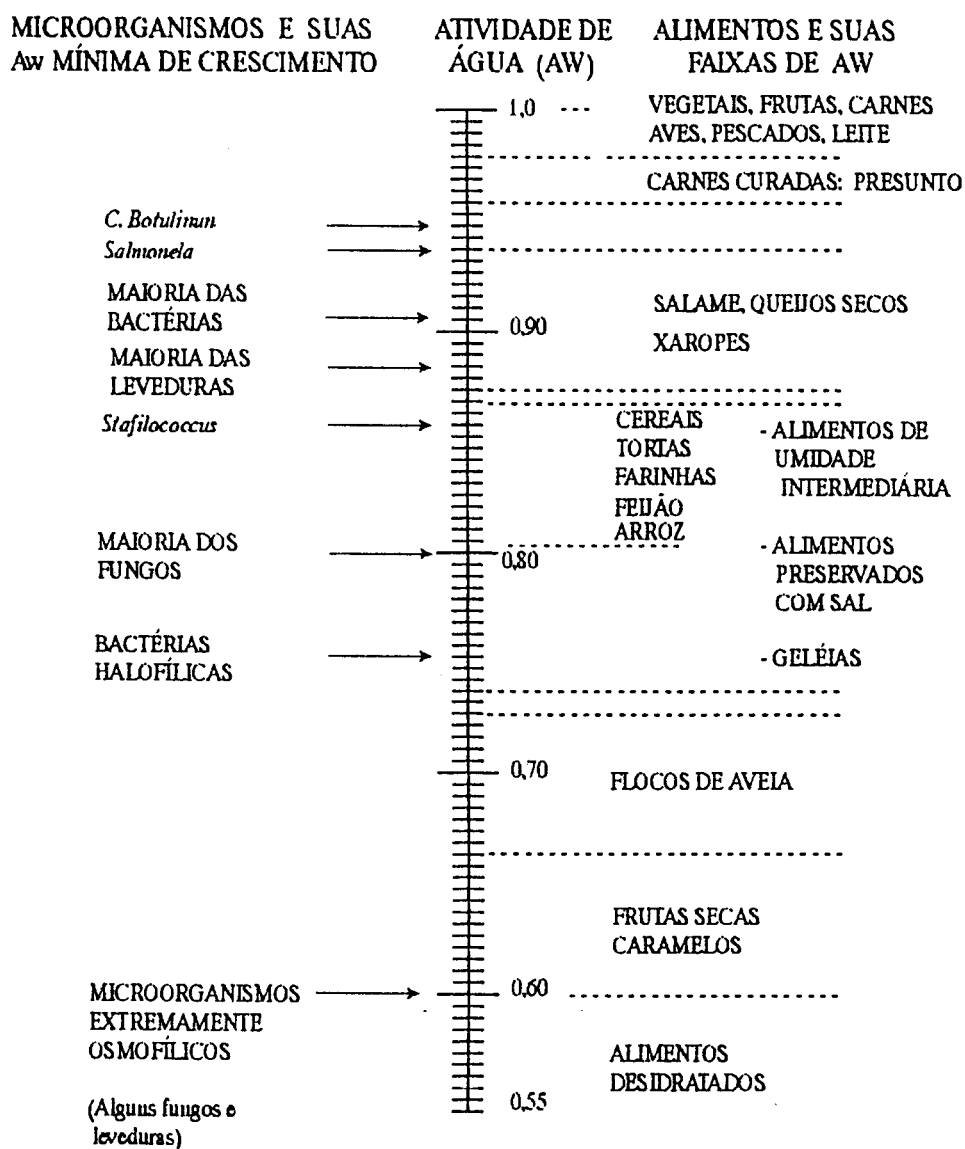


Figura 5 - Faixa de atividade de água de alguns alimentos e do crescimento de microorganismos
 FONTE: LABUZA *et al.* (1972)

7.2. Isotermas de adsorção

Atualmente, com o crescimento da demanda de alimentos com baixo teor de água, torna-se cada vez mais necessário o estudo da preservação desses alimentos através da determinação da sua umidade de equilíbrio. Segundo GAL (1975) citado por GÓIS (1981), o interesse crescente pelo assunto decorre principalmente do fato, amplamente aceito, de que a melhor forma de se avaliar a presença de água em alimentos, não é através de sua percentagem, mas por meio de sua atividade de água. A adsorção de água por alimentos desidratados é determinado através das isotermas.

As isotermas podem ser definidas como sendo "curvas" que relacionam a pressão parcial do vapor de água nos alimentos com seu conteúdo de umidade a uma determinada temperatura, ou seja, as isotermas representam a relação quantitativa entre a atividade de água de um alimento e seu teor de umidade (KAREL, 1975). Elas podem ser de dessorção quando o sólido perde umidade até atingir a umidade de equilíbrio, e de sorção quando o sólido ganha umidade. Segundo PARRY (1985), o termo sorção compreende a adsorção, que se refere às moléculas de vapor de água aderidas à superfície do material, e absorção, quando o vapor de água entra nas moléculas do material.

As isotermas de sorção podem ser obtidas de duas maneiras: por secagem ou retirada de água do alimento (dessorção) ou por hidratação de amostras previamente secas (adsorção). A isoterma de adsorção para um produto alimentício é obtida em ambientes com umidades relativas crescentes até as amostras atingirem a umidade de equilíbrio. A de dessorção é obtida pelo processo inverso, isto é, partindo de amostras completamente úmidas colocadas em ambientes com umidades relativas decrescentes, até atingir a umidade de equilíbrio. Embora as isotermas de adsorção e dessorção tenham a mesma condição final de equilíbrio, não coincidem e apresentam valores diferenciados para algumas faixas de atividade de água, indicando diferentes associações de água com o soluto nos dois processos, ou seja, diferentes intensidades de associação. A diferença na umidade de equilíbrio entre a dessorção e adsorção é denominada *histerese* e é um fenômeno que não está totalmente esclarecido (LABUZA, 1968). Entretanto, diversas teorias têm sido formuladas para explicar o fenômeno; GÓIS (1981) fez uma revisão das teorias existentes.

Uma isoterma de sorção típica, encontrada na maioria dos alimentos desidratados, é mostrada na Figura 6. A configuração sigmóide pode variar de acordo com a composição química do alimento e dá uma indicação de como a água está ligada (ACKER, 1969).

Neste tipo de isoterma, a água ligada ao alimento pode ser caracterizada em três regiões (ACKER, 1969; WOLF *et al.*, 1972; LABUZA, 1968):

- 1) Região monomolecular, com atividade de água em torno de 0,3, onde aparece a primeira inflexão. Neste caso a água está ligada a sítios polares de energia relativamente elevada como os grupos carboxílicos e amínicos. A remoção dessa água requer energia bem superior ao calor latente de vaporização.
- 2) Região multimolecular, com atividade de água entre 0,3 e 0,7. A água está ligada por pontes de hidrogênio a grupos hidroxílicos e amídicos.
- 3) Região de condensação, onde a água é considerada livre e se condensa na estrutura porosa dos alimentos, onde as forças capilares e sólidos solúveis (açúcares, aminoácidos e sais) provocam a diminuição da pressão de vapor. Nesta região a água atua como solvente para diversos solutos.

SARAVACOS & STINCHFIELD (1965) publicaram que o comportamento das isotermas podem ser interpretados a partir do conhecimento dos constituintes básicos dos alimentos. Segundo esses autores, em faixa de menor umidade relativa, a absorção é devida, principalmente, aos polímeros (proteínas, amidos, pectina) uma vez que os sólidos solúveis (açúcares e ácidos orgânicos) absorvem muito pouca água nessas umidades. De acordo com SAWLIN (1959), estas diferenças de absorção se refletem na forma da isoterma (Figura 7). Enquanto produtos ricos em proteínas ou amido apresentam uma isoterma com forma sigmóide, mostrando uma convexidade em relação ao eixo da ordenada na região de baixa atividade de água, outros ricos em açúcares, como os frutos, apresentam convexidade para o eixo da abcissa até níveis intermediários de atividade de água, passando a uma forma quase exponencial em regiões de alta atividade de água. Tentando explicar a capacidade de absorção de água dos alimentos ricos em açúcares quando expostos em alimentos com umidade relativa alta, IGLESIAS & CHIRIFE (1976) propuseram uma teoria, segundo a qual à medida que os produtos vão absorvendo

umidade, são criados novos sítios de absorção num processo cooperativo típico, isto é, as moléculas já absorvidas facilitariam a absorção de novas moléculas de água.

7.2.1. Efeito da temperatura sobre a umidade relativa de equilíbrio

A variação na temperatura de um produto quase sempre resulta em uma modificação inversa na sua umidade de equilíbrio. De acordo com RASEKH *et al.* (1971), isso acontece por que a pressão de vapor da água absorvida é alterada sempre que ocorrem modificações na temperatura, o que, consequentemente, estabelece um novo equilíbrio na umidade relativa. Para MAKOWER & DEHORITY (1943), esse deslocamento do equilíbrio em temperaturas mais elevadas pode estar ligado às mudanças físicas e químicas que ocorrem no produto. Segundo AYREST (1965), dependendo do produto, o efeito da temperatura é diferente quando analisado em diferentes regiões da isoterma, sendo que na faixa de umidade relativa de 40 a 90%, a elevação ou redução de 10°C na temperatura provoca um deslocamento do equilíbrio na ordem de 3%. SARAVACOS & STINCHFIELD (1965) estudando a influência da temperatura sobre a absorção de água de alimentos desidratados, verificaram que a absorção máxima de água ocorre na faixa de temperatura de 10 a 30°C.

Estudando o efeito da temperatura sobre a absorção de água do leite em pó, BERLIN *et al.* (1970), também observaram que o ganho de água varia com a temperatura, dependendo da região da isoterma, sendo que, em níveis de atividade de água de até 0,2, a variação da temperatura foi inversamente proporcional à absorção de água, ou seja, a elevação da temperatura diminuiu o valor da umidade de equilíbrio. Para valores entre 0,2 e 0,5, o efeito foi inverso e a elevação da temperatura deslocou para cima o equilíbrio da absorção de água; acima de 0,5, praticamente não houve influência da temperatura. AUDU *et al.* (1978) e SMITH *et al.* (1981), também verificaram que a temperatura tem grande influência sobre a absorção de água de diversos açúcares em todas as faixas de atividade de água estudada.

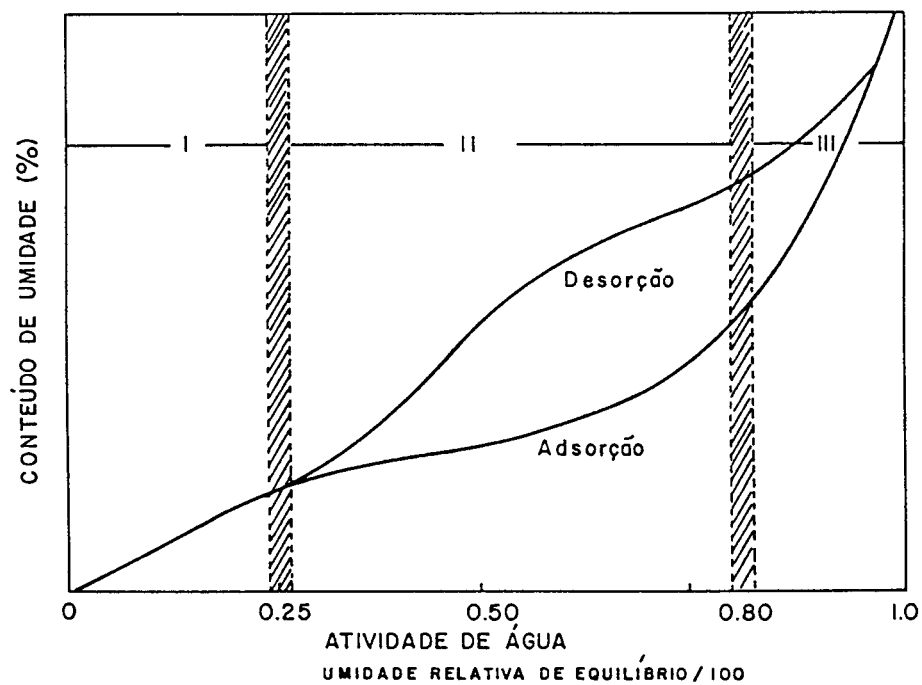


Figura 6 - Isotherma de sorção típica para alimentos

FONTE: ROMERO (1988)

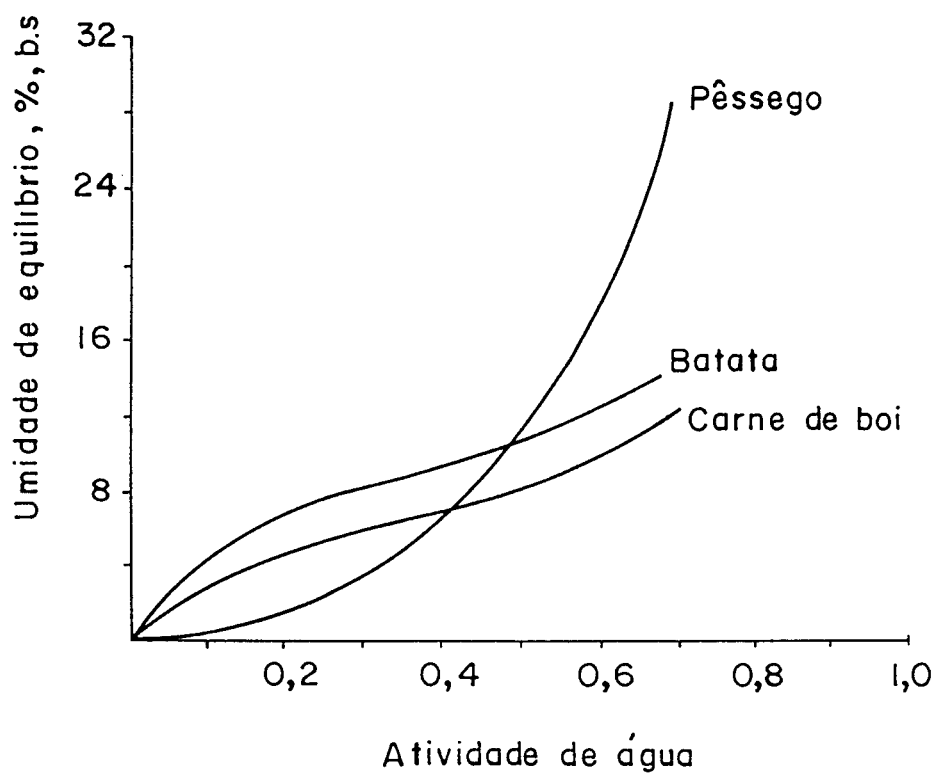


Figura 7 - Isoterma típica para alimentos com diferentes composições químicas

FONTE: SAWLIN (1959)

8. Determinação da vida de prateleira de produtos desidratados

PASSY & MANNHEIN (1977) definem a vida-de-prateleira como o período de tempo em que é mantida a aceitabilidade do produto pelo consumidor, utilizando como critério um determinado indicador de qualidade, como assimilação de metais, alteração de cor, sabor e textura, ou perda de valores nutritivos. Definição mais completa é apresentada pelo INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS - IFT (1974), para o qual a vida-de-prateleira é o período de tempo decorrido entre a produção e o consumo de um produto alimentício, durante o qual este se caracteriza pelo nível satisfatório de qualidade avaliado pelo valor nutritivo, sabor, textura e aparência. As interações entre alimento e materiais de embalagem, caso existam, devem permanecer em níveis considerados aceitáveis.

De acordo com MAKINDE (1976), a estabilidade dos alimentos embalados depende de vários fatores, tais como: qualidade e tipo dos alimentos, método de processamento, tipo de embalagem, manuseio dos produtos embalados e, principalmente, temperatura e umidade relativa de estocagem.

Segundo MADI *et al.* (1979), para se fazer a estimativa da vida-de-prateleira de um alimento desidratado em função do ganho de umidade, é necessário assumir como verdadeira, sob o ponto de vista prático, as seguintes afirmações:

- as condições de temperatura e umidade relativa permanecem constantes durante o armazenamento;
- nos cálculos não são consideradas as transferências de umidade do interior da embalagem para a superfície do produto, e nem a difusão dessa umidade pelo produto;
- é possível se fazer uma aproximação linear da isoterma entre os pontos que correspondem a umidade inicial e a crítica.

A vida útil de um produto pode ser estimada teoricamente utilizando-se o modelo matemático proposto LABUZA *et al.* (1972), considerando-se que a umidade transferida do exterior para o interior da embalagem é absorvida pelo alimento desidratado, aumentando sua umidade.

8.1. Propriedades de barreira de embalagens plásticas ao vapor de água

Além de outras atribuições, a embalagem tem como função básica proteger os alimentos. Essa proteção geralmente está associada a danos físicos e mecânicos, causados pela movimentação, transporte e distribuição, ou à proteção contra a ação de fatores ambientais, como gases, luz, vapor de água e odores. Desse modo, a embalagem deve se constituir em uma barreira que impeça ou dificulte o contato entre o ambiente externo e o produto em seu interior (GARCIA *et al.*, 1989).

Segundo esses mesmos autores, a vida útil dos produtos alimentícios está intimamente ligada às propriedades de barreira da embalagem que devem ser definidas para cada alimento, considerando-se a composição do produto, a forma de apresentação, o sistema de acondicionamento, o canal de distribuição e a vida útil desejada. De acordo com ALLISON (1985), a barreira à umidade é medida como taxa de permeabilidade ao vapor de água, que é a quantidade de água que passa através de uma unidade de área da embalagem por unidade de tempo, a determinada temperatura e umidade relativa. Normalmente essa taxa é expressa em gramas de água/(m².dia), a 25°C e 75% de umidade relativa, ou 38°C e 90% de umidade relativa. Um material de embalagem pode ser considerado como de alta barreira ao vapor de água, quando apresentar uma taxa de permeabilidade menor que 8 gramas/(m².dia) e altíssima barreira, quando menor que 0,8 gramas/(m².dia).

9. Legislação brasileira para uso de hidrolisados protéicos

A Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos através da resolução nº 15/78 estabeleceu o padrão de identidade e qualidade para hidrolisados protéicos vegetais. De acordo com essa resolução, "hidrolisado protéico vegetal é o produto obtido a partir de fontes protéicas vegetais tais como o milho, amendoim, soja, trigo, isolado ou combinado, por hidrólise, total ou parcial, com ácido clorídrico e subsequente neutralização com hidróxido de sódio ou carbonato de sódio, podendo ser utilizada como ingrediente de alimentos com o objetivo de lhes conferir sabor".

Segundo essa mesma resolução, a composição dos hidrolisados protéicos vegetais deverá ter como ingredientes obrigatórios, as partes comestíveis dos vegetais utilizados na sua produção, e como opcionais, no máximo 20% (base seca) de glutamato

monossódico e 2% de gorduras vegetais. Deverão ter, ainda, as seguintes características químicas:

- proteína (N x 6,25) - mínimo de 25% (base seca)
- cloreto de sódio - máximo de 52% (base seca)
- cinzas - máximo de 8% (base seca)
- pH da solução a 10% - 3,5 a 7,0

Finalmente, o produto não deverá apresentar matérias estranhas, como fragmentos de vegetais e outras, e deverá ser acondicionado de modo a assegurar sua proteção, não devendo o material empregado interferir nas características de sua qualidade.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Experimento de hidrólise em laboratório

Foram realizados no Laboratório de Tecnologia Geral da Faculdade de Engenharia de alimentos (FEA), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

1.1.1. Matéria prima

As matérias primas utilizadas na preparação dos hidrolisados protéicos foram: a torta de extração do óleo de milho (protenose) e farelo de milho cedidos pela RMB-Refinações de Milho Brasil Ltda., a torta de soja e proteína texturizada de soja do Moinho da Lapa, soja em grãos moídos, fermento biológico fresco (levedura *Saccharomyces cerevisiae*) da Fleischmann Royal, caseína e gelatina da Nutrícia S.A.

A protenose foi utilizada como matéria prima, nos ensaios preliminares, para estabelecimento das condições de hidrólise e também na análise sensorial, sendo que nesse experimento, também foram avaliados sensorialmente os hidrolisados obtidos a partir da torta de soja, proteína texturizada de soja e fermento biológico fresco.

Os hidrolisados produzidos a partir das demais matérias primas, foram utilizados no ensaio realizado para avaliar a eficiência do método de produção de hidrolisados com baixo teor de sal, utilizando diferentes tipos de hidrolisados.

1.1.2. Equipamentos

No laboratório, os hidrolisados foram preparados em balão de fundo redondo de dois litros de capacidade, com três saídas. Em uma saída lateral foi colocado um termômetro para medir a temperatura até 150°C, na outra foi adaptado um condensador para refluxar a mistura hidrolítica, e na saída central, foi instalado um agitador elétrico para permitir a agitação, homogeneizando a mistura continuamente. A temperatura de

preparação do hidrolisado foi mantida constante por meio de um termostato adaptado a uma manta de aquecimento (Figura 8).

1.2. Experimento de hidrólise em escala piloto

1.2.1. Matéria prima

Em função da disponibilidade, fácil acesso e teor de proteína, a protenose foi também, utilizada como matéria prima no preparo do hidrolisado em escala piloto. O hidrolisado preparado por esse método foi utilizado nos experimentos de produção de hidrolisado com baixos teores de sal, secagem e determinação da vida-de-prateleira do produto desidratado.

1.2.2. Equipamentos

O hidrolisado foi produzido em um tambor de polipropileno de alta densidade, com capacidade para 50 litros. Nesse recipiente foi instalada uma resistência elétrica industrial, para aquecer a mistura hidrolítica, e um termostato para controlar a temperatura, sendo que, tanto a resistência como o sensor do termostato, foram colocados dentro de tubos de vidro termo-resistentes para evitar o contato direto com o ácido utilizado na hidrólise. A agitação da mistura para hidrólise, foi feita por uma haste de policloreto de vinila (PVC) em forma de pá e com aleta superior, adaptada a um motor elétrico com redução de rotação, de modo que a velocidade fosse 60 rotações por minuto (Figura 9).

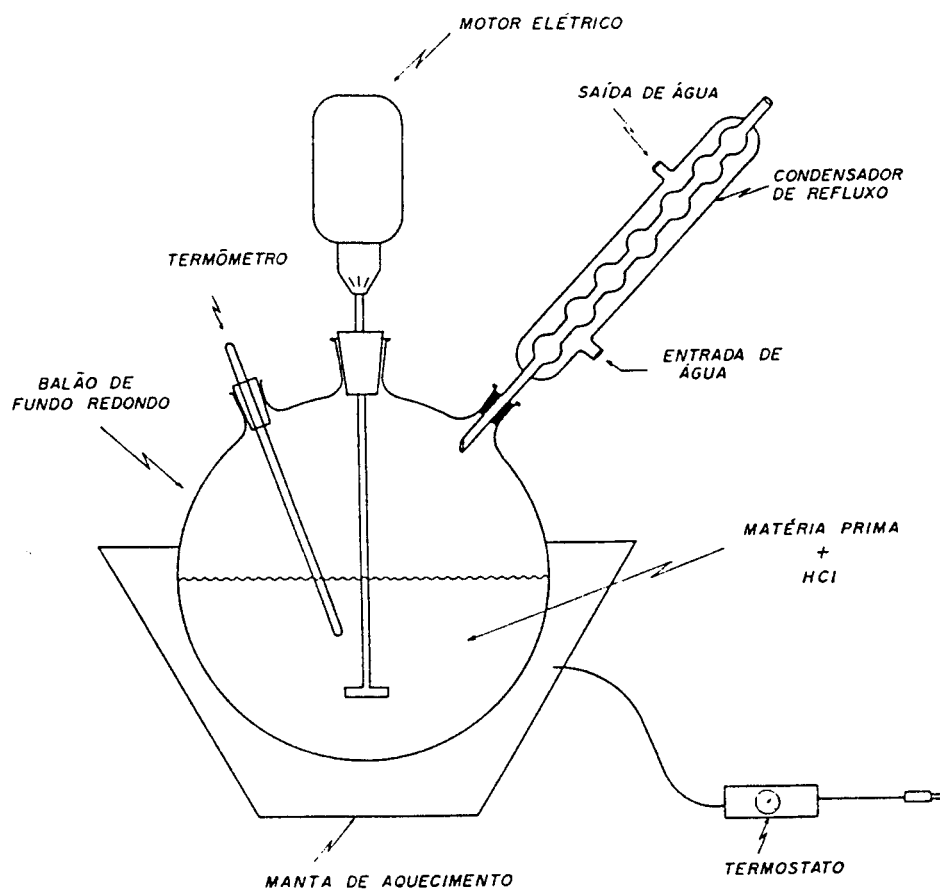


Figura 8 - Processo de produção do hidrolisado em laboratório

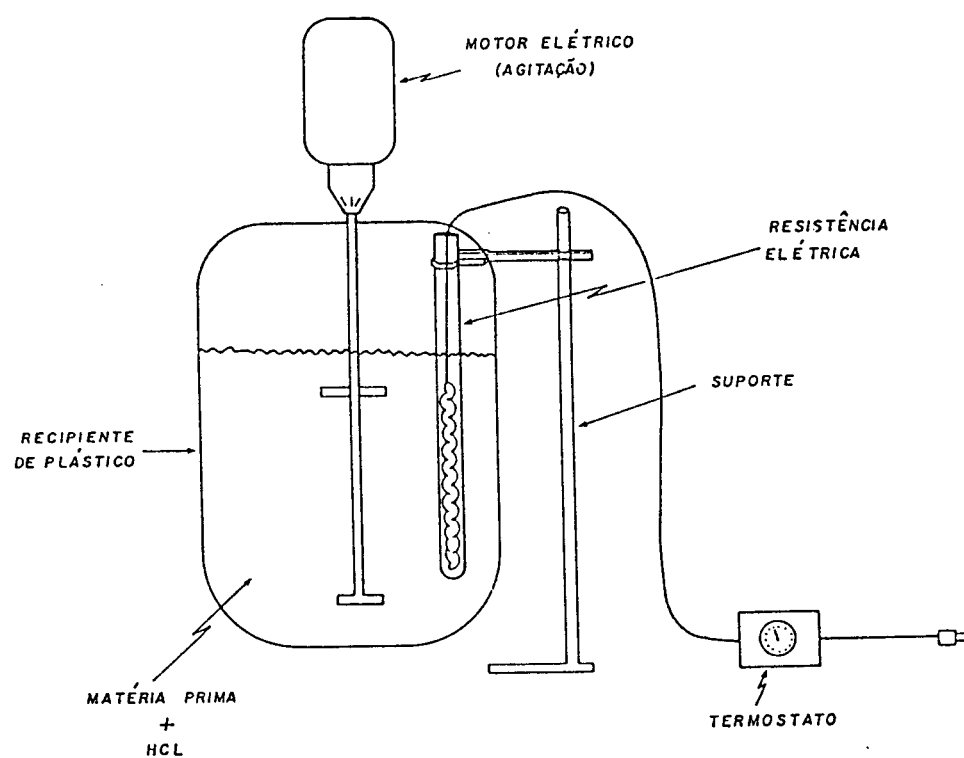


Figura 9 - Sistema piloto de produção do hidrolisado

1.3. Experimentos para obtenção de hidrolisados protéicos com baixos teores de sal

O método para obtenção de hidrolisados protéicos com baixos teores de sal, baseou-se no fato de que quanto maior a concentração do ácido hidrolítico, maior a percentagem de sal no produto final, devido a neutralização do ácido com hidróxido de sódio. Assim foram desenvolvidos estudos para a eliminação do ácido utilizado na hidrólise, segundo os processos a seguir.

1.3.1. Matéria prima

A matéria prima, nesse caso, foi o hidrolisado protéico de protenose produzido pelo processo em escala piloto (item 1.2.)

1.3.2. Equipamentos

A evaporação a vácuo do ácido clorídrico foi feita em evaporador rotativo e a destilação a vácuo com injeção de vapor de água, foi realizada em um sistema de destilação que era constituído por uma caldeira (balão de fundo redondo de 2 litros aquecido por uma manta de aquecimento), um sistema de injeção de vapor, um balão de 250, 500 ou 1000 mL onde ficava contida a amostra (balão de destilação), um condensador de serpentina e um sistema para medir vácuo (Figura 10).

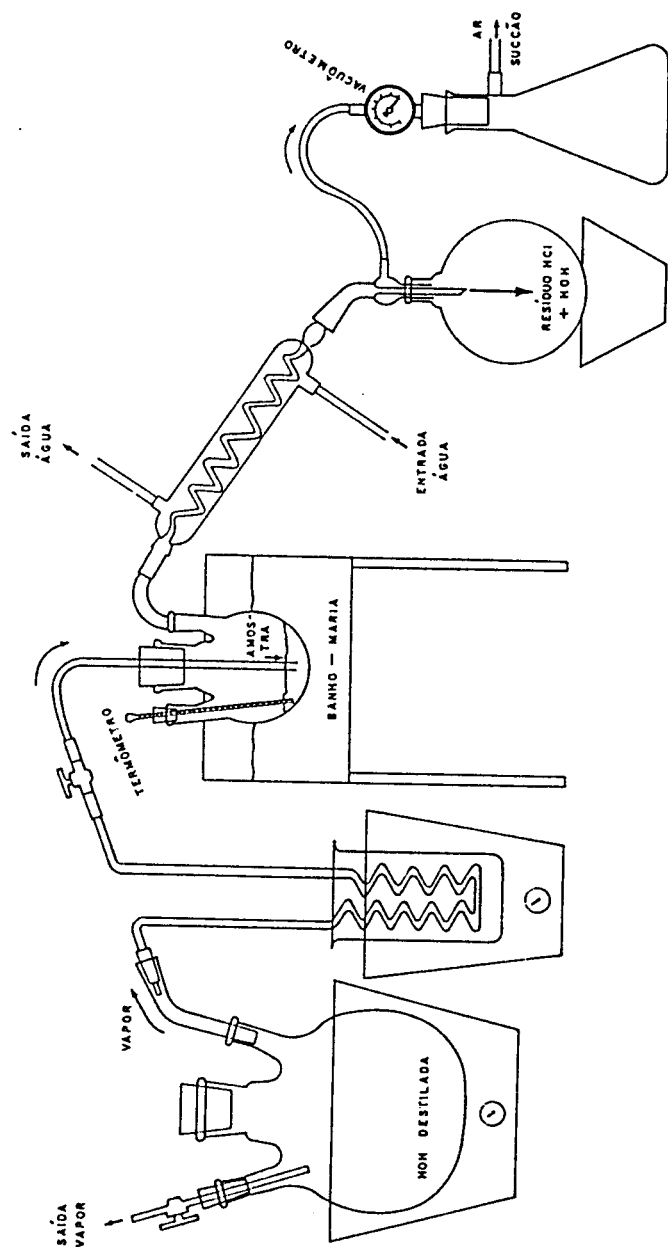


Figura 10 - Sistema de destilação para evaporação a vácuo do ácido clorídrico utilizado na hidrólise

2. MÉTODOS

2.1. Métodos analíticos

2.1.1. Determinação de proteína bruta

Nas matérias primas a proteína bruta foi determinada através do método semi-micro Kjeldahl. Para o cálculo da proteína o teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator de correção 6,25 de acordo com a AOAC (1975).

Nos hidrolisados protéicos a proteína total foi determinada pelo método do biureto (WEST, 1984).

2.1.1.1. Cálculo do rendimento de hidrólise

O rendimento de hidrólise foi calculado determinando-se o conteúdo de proteína solubilizada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100$$

onde,

P1 = percentagem de proteína no material a ser hidrolisado

P2 = percentagem de proteína no hidrolisado

Os erros absolutos para avaliação de diferenças estatísticas entre as médias, foram calculados através do tratamento estatístico da propagação de erros, de acordo com BACCAN *et al* (1979).

2.1.2. Determinação de aminoácidos

O padrão de aminoácidos (System 7.300/6.300 - STD), fornecido pela Beckman, continha 2,5 µmol/mL de cada aminoácido, exceto a L-cisteína que continha 1,5

$\mu\text{mol/mL}$. Essa solução foi diluída, com tampão citrato de sódio pH 2,2, para a concentração de 1 $\mu\text{mol/mL}$. Dessa solução foram injetados 30 μL em analisador de aminoácidos Aminochrom II.

Para cada análise, tomou-se uma alíquota de 5 mL de hidrolisado que foi evaporada até eliminar toda fase líquida. A matéria seca foi diluída em 25 mL de tampão citrato de sódio pH 2,2 e filtrada em papel de filtro quantitativo Famex (389¹ faixa preta). Dessa amostra, foi injetado no analisador, volume igual ao utilizado na análise do padrão de aminoácidos (30 μL).

2.1.3. Determinação de nitrogênio amínico

A determinação do nitrogênio amínico foi realizada por método espectrofotométrico conforme procedimento descrito por ADLER-NISSEN (1979), utilizando o ácido trinitro benzeno sulfônico (TNBS).

2.1.3.1. Determinação do grau de hidrólise

O grau de hidrólise, definido como a percentagem de ligações peptídicas clivadas ou o número de grupos α -amino livres, formados durante o processo de hidrólise, foi calculado pela determinação do nitrogênio amínico, após a hidrólise, obedecendo a seguinte expressão:

$$\% \text{ GH} = \frac{\text{número de ligações peptídicas quebradas}}{\text{número total de ligações peptídicas}} \times 100$$

Para esse experimento, alíquotas de 20 mL foram retiradas de 30 em 30 minutos, filtradas em papel de filtro e imediatamente após a filtração, determinou-se a percentagem de ligações peptídicas clivadas. Foram mantidas todas as condições de hidrólise durante a coleta das alíquotas.

Após a homogeneização da formulação, antes do início da hidrólise, retirou-se uma alíquota obedecendo ao mesmo procedimento, para ser medida a percentagem de aminoácidos livres no tempo zero.

2.1.4. Determinação de cloreto de sódio.

A percentagem de cloreto de sódio no hidrolisado foi determinada por potenciometria, utilizando-se potenciômetro Micronal B-374 e eletrodo combinado de prata 6.0404.100 (OF)-Metrohm.

Nessa análise mediu-se 10 mL de hidrolisado, com pipeta volumétrica, neutralizou-se a pH 7,0 com hidróxido de sódio e completou-se o volume para 500 mL com água destilada (diluição 1:50). Em seguida foi tomada uma amostra de 20 mL de hidrolisado diluído e titulou-se com nitrato de prata 0,1 N com auxílio do eletrodo combinado de prata (Figura 11). O ponto de viragem da titulação foi determinada pela maior diferença de milivolts (mV) entre dois volumes subsequentes de nitrato de prata adicionado (Figura 12).

A percentagem em miligramas de cloreto de sódio por 100 mL de hidrolisado protéico foi calculada como segue:

$$\% \text{ de NaCl} = \frac{V_2 \times N_2 \times f_2 \times E_1 \times d}{\text{volume da alíquota titulada}} \times 100$$

onde:

V_2 = volume de AgNO_3 , em mL, gastos na titulação

N_2 = normalidade do AgNO_3

f_2 = fator de correção da normalidade do AgNO_3

E_1 = equivalente grama do cloreto de sódio

d = diluição do hidrolisado

2.1.5. Determinação de umidade

Foi realizada através da secagem do material em estufa a vácuo com circulação de ar seco em sílica, nas seguintes condições: vácuo de 20 mmHg, temperatura de 70°C durante 24 horas (MADI *et al*, 1980).

2.1.6. Determinação de extrato etéreo e cinzas.

Foram determinados de acordo com a AOAC (1975) e AOAC (1980), respectivamente.

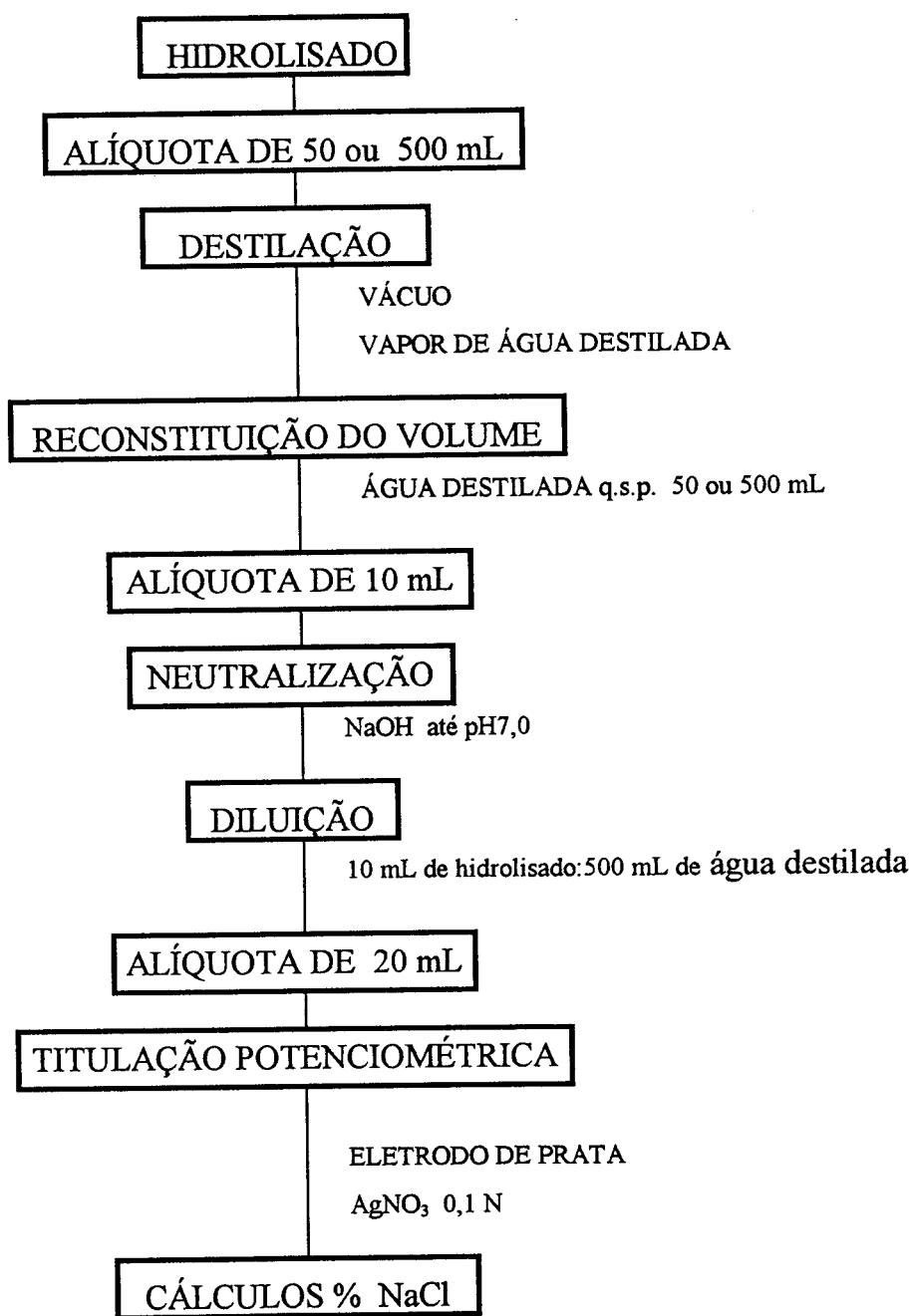


Figura 11 - Fluxograma da destilação e determinação do teor de cloreto de sódio

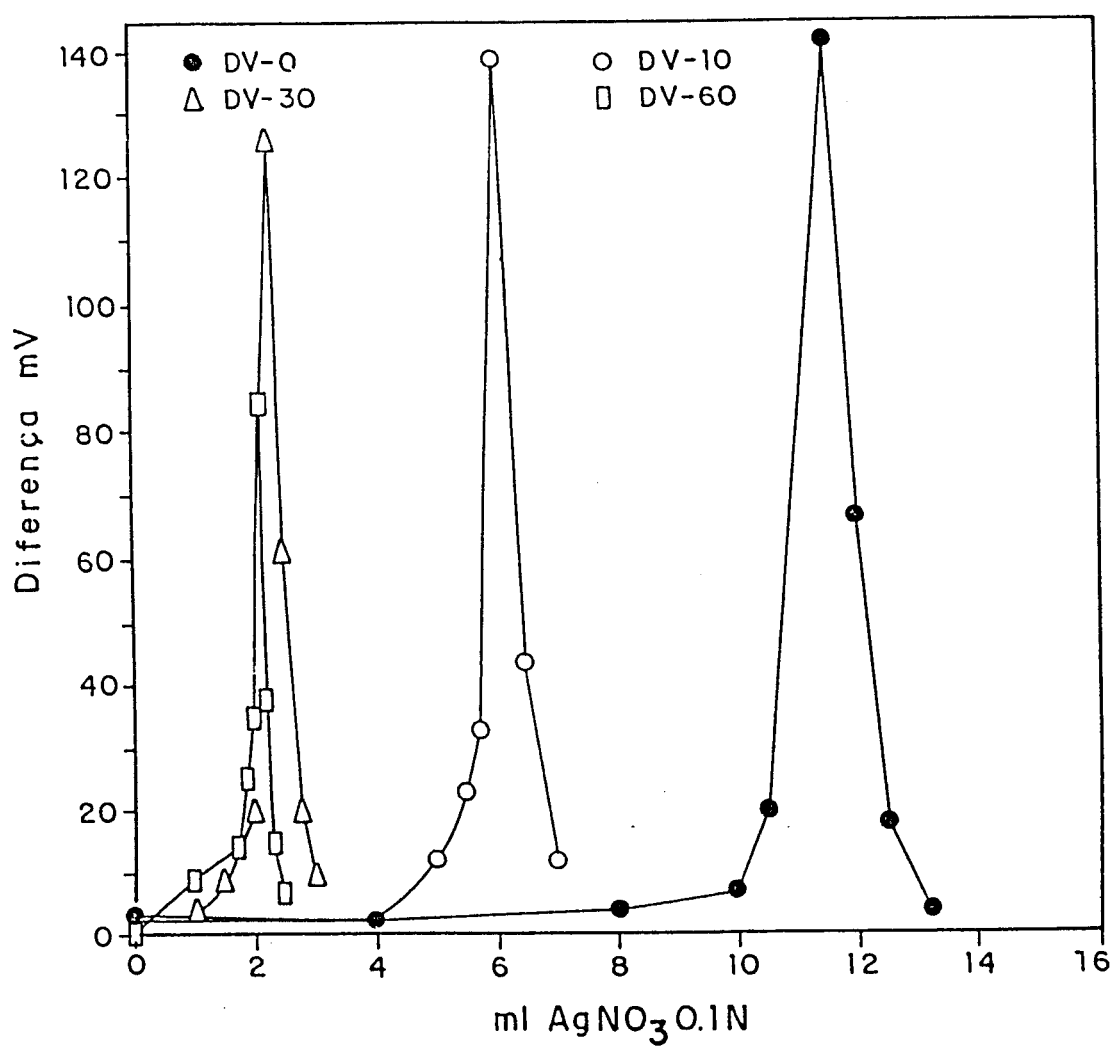


Figura 12 - Titulação potenciométrica do hidrolisado protéico sem tratamento prévio (DV-0) e destilado a vácuo com injeção de vapor de água durante 10 (DV-10), 30 (DV-30) e 60 (DV-60) minutos.

2.1.7. Análise sensorial dos hidrolisados protéicos

Para análise sensorial dos hidrolisados, utilizou-se cabines individuais sob luz vermelha para que a cor não interferisse na avaliação. Os testes foram realizados nos períodos da manhã e da tarde, excluindo-se o intervalo de uma hora antes e duas depois do almoço. Utilizou-se 25 provadores de ambos os sexos, de idade entre 20 e 40 anos e com experiência anterior em testes sensoriais. As amostras foram apresentadas aos provadores à temperatura de 60°C, em bequers de 50 mL codificados com números de três dígitos e colocados em aquecedor elétrico apropriado para manter a temperatura.

Os testes foram conduzidos comparando-se as quatro amostras de hidrolisado obtidas, pelo método laboratorial, a partir de 30% de matéria prima (protenose, torta de soja, proteína texturizada de soja e fermento biológico), 20% (p/v) de ácido clorídrico, nos tempos de hidrólise de 3 e 8 horas, visando selecionar os hidrolisados mais preferidos e que se prestassem à continuação do trabalho. Os hidrolisados foram diluídos para 30 ± 1° Brix com água destilada. A análise sensorial foi feita usando-se 1,0 grama da solução a 30 °Brix diluída para 100 mL com água destilada a 60°C contendo 0,5 gramas de cloreto de sódio.

Foi aplicado o teste de preferência utilizando-se escala hedônica de 1 a 9 pontos, sendo que o ponto 1 correspondia a “desgostei muitíssimo” e o 9 a “gostei muitíssimo” (Anexo 1), pedindo-se ao provador que respondesse a razão pela qual gostou da amostra mais preferida e porque menos gostou da amostra menos preferida. Em cada sessão foram avaliadas quatro amostras, utilizando-se o delineamento estatístico de blocos completos balanceados, para variar a ordem de apresentação das amostras aos provadores.

No experimento de substituição de extrato de carne por hidrolisados, foram obedecidos os mesmos procedimentos da análise sensorial dos hidrolisados, sendo que as amostras foram servidas a 60 ± 2°C, na concentração de 20 gramas de hidrolisado a 80 °Brix por litro de água.

Os resultados desses dois experimentos, foram avaliados estatisticamente pela análise de variância e pelo teste de Tukey

2.1.8. Determinação da isoterma de adsorção do hidrolisado de protenose

Inicialmente foi determinada a umidade do hidrolisado seco em *spray drier*, de acordo com a metodologia descrita em métodos analíticos (item. 2.1.5.) e, em seguida, as amostras secas foram transferidas para ambientes com umidade relativa controlada e temperatura de 23 e $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.1.8.1.1. Obtenção da umidade relativa controlada

As umidades relativas, variando de 7 a 95%, foram obtidas em dessecadores contendo soluções saturadas de sais, de acordo com a AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (1989). As soluções utilizadas para obtenção das umidades relativas estão relacionadas na Tabela 4.

2.1.8.2. Absorção de umidade

Amostras de 2 gramas de hidrolisado em pó foram pesadas em balança analítica e distribuídas uniformemente em placas de Petri de 4 cm de diâmetro previamente secas em estufa a 105°C até peso constante, e transferidas para dessecadores contendo soluções saturadas de sais que proporcionavam as umidades relativas desejadas. Após estabelecimento de vácuo parcial, os dessecadores foram colocados em câmara climática modelo 347 CDG - FANEM com temperatura de 23 e $38 \pm 1^\circ\text{C}$. As amostras que estavam a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ foram pesadas de 24 em 24 horas e as que estavam a $38 \pm 1^\circ\text{C}$ foram pesadas, nos três primeiros dias, de 12 em 12 horas, e depois, de 24 em 24 horas até apresentarem peso constante. A pesagem das amostras foi feita em balança analítica Metler imediatamente após a abertura dos dessecadores, tomando-se o cuidado de secar a parte externa das placas de Petri, com lenço de papel, para eliminar a umidade absorvida na superfície. A umidade de equilíbrio foi calculada pela diferença entre o peso inicial e final das amostras que foi considerado constante quando a diferença entre os dois pesos foi menor ou igual a 0,2 mg (LABUZA, 1984).

2.1.8.3. Umidade crítica do produto

Quando o equilíbrio foi atingido, as amostras foram analisadas visualmente para verificar as alterações físicas ocorridas em função da umidade relativa de equilíbrio. O maior teor de umidade de equilíbrio em que o produto apresentou as primeiras alterações

físicas, como a mudança de cor, foi considerado como sendo a umidade crítica do produto (MADI *et al*, 1979; XAVIER *et al*, 1987). A alteração de cor foi determinada subjetivamente, comparando as amostras, após o equilíbrio nas diferentes umidades relativas.

O teor de umidade do produto em base seca foi correlacionado com a atividade de água (Aa) ou umidade relativa (UR) para obtenção da representação gráfica da isoterma.

Tabela 4 - Soluções saturadas utilizadas na determinação das isotermas de adsorção

Solução saturada	Umidade relativa (%)
Hidróxido de sódio	7
Cloreto de lítio	11
Acetato de potássio	22
Cloreto de magnésio	33
Carbonato de potássio	43
Brometo de sódio	58
Nitrito de sódio	65
Cloreto de sódio	75
Cloreto de bário	90

FONTE: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (1989)

2.1.9. Determinação do coeficiente de eficiência protéica (PER) e do PER corrigido

O PER foi calculado, segundo PELLET & YOUNG (1980) pela relação entre o ganho de peso de cada rato, devido a dieta consumida durante o período de 28 dias , e a proteína ingerida:

$$\text{PER} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{proteína ingerida}}$$

A correção do PER foi feito pelo uso da expressão:

$$\text{PER corrigido} = \text{PER} \times \frac{2,5}{\text{PER da caseína}}$$

2.1.10. Curva de crescimento dos ratos

A curva de crescimento foi elaborada, levando-se em consideração a média de aumento de peso, de cada grupo de ratos, semanalmente, em relação aos dias de consumo das dietas com as respectivas fontes de proteína (caseína, protenose e hidrolisado).

2.1.11. Determinação da vida-de-prateleira do hidrolisado

Para determinar a vida-de-prateleira ou vida útil do hidrolisado protéico, foi utilizado o modelo teórico proposto por LABUZA *et al* (1972) onde:

$$\ln \frac{U_e - U_i}{U_e - U} = \frac{k \cdot A \cdot ps}{l \cdot M \cdot \infty} \cdot t$$

em que:

U_e = umidade de equilíbrio do produto com o ambiente externo baseado na extrapolação linear da isoterma (gramas de água / 100g de matéria seca);

U_i = umidade inicial do produto (gramas de água / 100 gramas de matéria seca);

- U = umidade variável do produto em função do tempo após o acondicionamento (gramas de água / 100 gramas de matéria seca);
- k = permeabilidade da embalagem ao vapor de água ($\text{g} \cdot \mu\text{m} / \text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{mmHg}$), definida pela relação:

$$k = \frac{\text{TPVA} \cdot l}{p_s \cdot \text{UR}}$$

- l = espessura do filme (μm)
- A = área da embalagem (m^2)
- p_s = pressão de vapor de água na temperatura média de armazenamento (mmHg)
- α = tangente da isoterma referente a reta entre a umidade inicial e a crítica do produto (gramas de $\text{H}_2\text{O}/\text{UR}$)
- t = tempo (dias)
- M = massa do produto (gramas)
- TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor de água
- UR = umidade relativa usada na determinação da permeabilidade inicial da embalagem

Mediante esse modelo matemático, foram estabelecidas as condições de embalagem do hidrolisado, considerando-se aspectos ambientais, características do produto e propriedades do material de embalagem.

Os cálculos da vida útil teórica foram feitos considerando-se as características dos materiais de embalagem mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Características dos materiais de embalagem utilizados nos cálculos da vida-de-prateleira do hidrolisado

Material	Taxa de permeabilidade ao vapor de água (g/m ² .dia)		
	Espessura (µm)	23°C / 75% UR	38°C / 90% UR
PEBD	50	1,8	8,2
PEBD	100	0,9	4,5
PEBD	150	0,5	2,8
PP	70	1,0	4,9
PEAD	100	0,31	1,3
PET/PEBD	2/100	-	5,0

FONTE: ARDITO (1987); GARCIA *et al* (1989).

PEBD = polietileno de baixa densidade

PEAD = polietileno de alta densidade

PP = polipropileno

PET = polietileno tereftalato

2.2. Experimentos

2.2.1. Obtenção de hidrolisados em laboratório

No preparo do hidrolisado o ácido clorídrico, previamente diluído com água destilada aquecida, foi adicionado à matéria prima. A contagem do tempo de hidrólise foi iniciada quando a mistura atingiu a temperatura de refluxo de $100 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após a hidrólise, as huminas, subproduto sólido de coloração escura formado durante a hidrólise ácida pela condensação do triptofano e componentes aldeídicos, foram separadas por filtração em papel de filtro e os hidrolisados acondicionados em frascos de vidro (Figura 13). Em seguida foram feitas as determinações de proteína e teor de sólidos solúveis ($^\circ\text{Brix}$) diretamente no hidrolisado. A neutralização a pH 7,0 foi feita com hidróxido de sódio.

As condições de hidrólise foram definidas tomando-se como base a determinação do rendimento de hidrólise, analisando-se os efeitos dos parâmetros que influenciam o processo, em função do tempo de hidrólise de 1 a 8 horas. Assim, a otimização do rendimento de hidrólise foi realizada através de ensaios onde foram testados:

- variação do teor de matéria prima (protenose) na formulação,
- variação da concentração do ácido hidrolítico,
- variação do tempo e da temperatura de hidrólise.

2.2.1.1. Efeito da variação do teor de matéria prima na hidrólise

A formulação para avaliação do efeito do teor de matéria prima sobre o processo de hidrólise continha 10, 20 ou 30% (p/v) de matéria prima (protenose), 15% (v/v) de ácido clorídrico (37%, $d = 1,19$) e quantidade suficiente de água destilada para completar 100 mL de mistura hidrolítica. O tempo máximo de hidrólise foi 8 horas e a temperatura de refluxo 100°C .

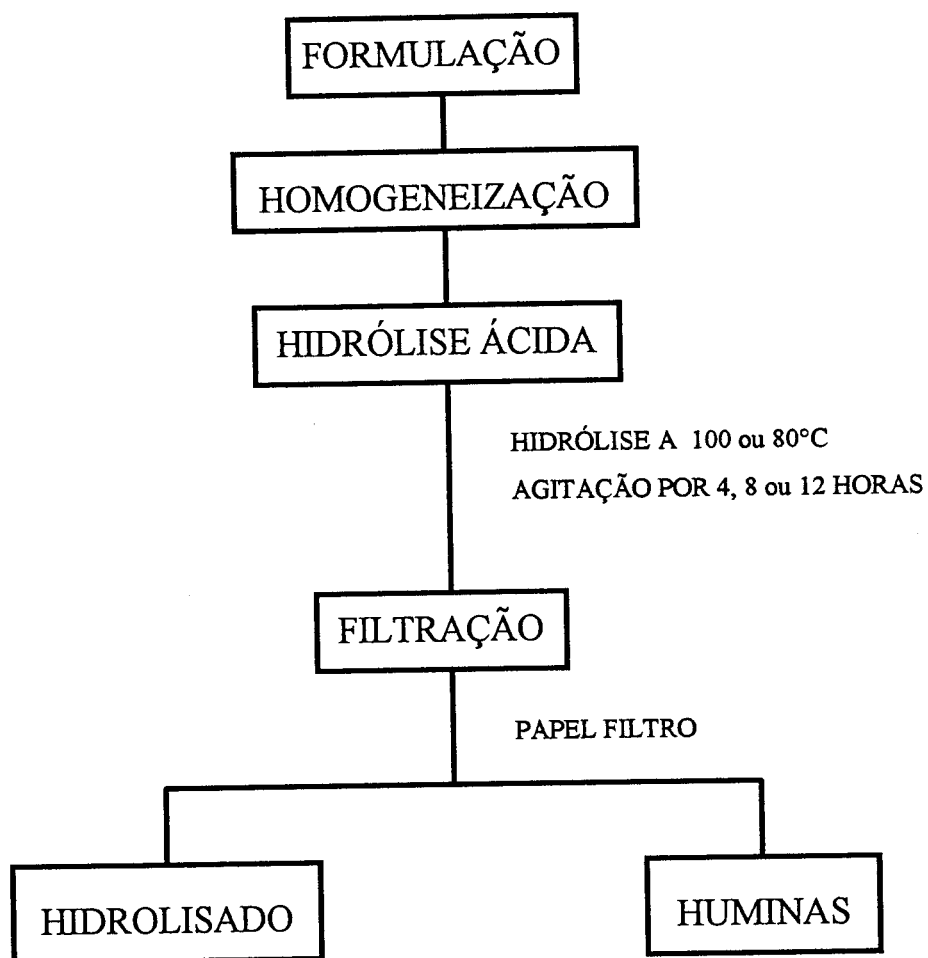


Figura 13 - Fluxograma geral de produção de hidrolisado protéico

2.2.1.2. Efeito da variação da concentração de ácido clorídrico sobre a hidrólise

O efeito da variação do teor de ácido na hidrólise foi verificado mantendo-se constante o teor de matéria prima e variando-se o teor de ácido clorídrico, conforme a seguinte formulação:

- Protenose - 30% (p/v)
- ácido clorídrico (37%, d = 1,19) - 20, 30 ou 50% (v/v)
- água destilada q.s.p. - 100 mL de mistura hidrolítica

A temperatura de refluxo foi de 100°C durante 8 horas.

2.2.1.3. Efeito da variação da temperatura de 100 para 80°C sobre a hidrólise

Nesse experimento, manteve-se as mesmas concentrações de matéria prima, ácido e o mesmo tempo de hidrólise do experimento para verificar o efeito da variação da concentração de ácido sobre a hidrólise, descrito no item 2.2.1.2., variando-se apenas a temperatura de 100 para 80°C

Após a avaliação da hidrólise, utilizando a protenose como matéria prima, selecionou-se as condições mais adequadas para processar os demais materiais, considerando-se o rendimento de hidrólise.

2.2.2. Preparo de hidrolisados das diversas matérias primas em laboratório

As matérias primas constituídas por torta de soja, soja em grãos moídos, proteína texturizada de soja, fermento biológico fresco, farelo de milho (refinasil), caseína, gelatina, além da protenose, foram hidrolisadas segundo a seleção das condições mais adequadas dentre os fatores estudados, que foram:

- formulação para hidrólise: 30% de matéria prima
20% de ácido clorídrico
50% de água

A temperatura de refluxo foi de 100°C e o tempo de hidrólise de 8 horas. Esse experimento foi avaliado pelo cálculo do rendimento de hidrólise (item 2.1.1.1.).

Os hidrolisados de torta de soja, soja em grãos moídos e fermento biológico fresco, foram utilizados para avaliação comparativa de rendimento de hidrólise.

Os hidrolisados de torta de soja, proteína texturizada de soja, fermento biológico fresco, além da protenose, foram utilizados para análise sensorial (item 2.2.1.)

Os hidrolisados de torta de soja, refinasil, caseína, gelatina e protenose, foram utilizados para os ensaios de avaliação da eficiência da destilação a vácuo (item 2.2.5.2.).

2.2.2.1. Avaliação dos hidrolisados preparados com tempos de hidrólise de 3 e 8 horas a partir das diversas matérias primas.

Os experimentos foram também conduzidos com tempo de hidrólise de 3 horas, visando avaliar a influência do grau de hidrólise sobre, principalmente, o sabor do hidrolisado. Essa avaliação foi feita através de análise sensorial (item 2.1.7.), com o objetivo de substituir o extrato de carne por hidrolisados em formulações para caldo de carne.

2.2.2.2. Avaliação de caldo de carne contendo hidrolisados protéicos

Os hidrolisados com melhor avaliação na análise sensorial foram selecionados para o experimento de substituição do extrato de carne nas proporções de 0, 20, 30 e 100% na formulação para caldo de carne mostrada na Tabela 6.

No preparo da formulação, primeiramente misturou-se a gordura vegetal com o hidrolisado concentrado e depois adicionou-se os demais ingredientes. Finalmente homogeneizou-se por 1 minuto em liquidificador usando máxima velocidade.

Nesse experimento, as amostras para análise sensorial, foram servidas a $60 \pm 2^\circ\text{C}$. A concentração do hidrolisado, utilizado para substituir o extrato de carne, foi de 20 gramas a 80°Brix por litro de água.

Tabela 6 - Percentagem de substituição de extrato de carne por hidrolisado protéico na formulação de caldo de carne.

Ingredientes*	Substituições de extrato de carne por hidrolisado			
	0 g %	20 g %	50 g %	100 g %
Hidrolisado protéico (g)	0,00	0,80	2,00	4,00
Extrato de carne Swift (g)	4,00	3,20	2,00	0,00
Sal (g)	12,00	12,00	12,00	12,00
Glutamato nonossódico (g)	2,96	2,96	2,96	2,96
Gordura vegetal (Anderson Clayton) (g)	0,40	0,40	0,40	0,40
Cebola em pó (g)	0,60	0,60	0,60	0,60
Pimenta branca em pó (g)	0,04	0,04	0,04	0,04
Água (mL) q.s.p.	1000	1000	1000	1000

* - Concentração final de 2 g/100ml de formulação

Visando obter hidrolisados protéicos, em quantidade suficiente, para realizar os testes finais de secagem em *spray drier* e avaliação nutricional, bem como testar as condições de hidrólise, selecionadas em laboratório, frente a uma produção de hidrolisado em maior escala, desenvolveu-se um método de obtenção de hidrolisados em escala piloto.

2.2.3. Obtenção do hidrolisado em escala piloto

Em função da disponibilidade e teor de proteína, a protenose foi utilizada como matéria prima na obtenção do hidrolisado em escala piloto.

O preparo da mistura de hidrólise foi semelhante ao do método laboratorial sendo que, antes da filtragem do hidrolisado em papel de filtro, foi feita uma pré-filtragem em sacos de pano para eliminar a maior quantidade possível de sólidos insolúveis (huminas). A contagem do tempo de hidrólise foi iniciada quando a mistura atingiu a temperatura de 80°C, que foi mantida constante durante o processo.

(huminas). A contagem do tempo de hidrólise foi iniciada quando a mistura atingiu a temperatura de 80°C, que foi mantida constante durante o processo.

As condições de hidrólise adotadas nesse método foram, previamente, estabelecidas em laboratório (item 2.2.1.). Para manter um rendimento equivalente às condições laboratoriais, o tempo máximo de hidrólise, a 80°C, foi aumentado de 8 para 12 horas.

2.2.4. Avaliação do teor de aminoácidos em hidrolisados obtidos em laboratório e em escala piloto.

O teor de aminoácidos foi determinado em hidrolisados obtidos em laboratório pela hidrólise da protenose durante 4 horas a 100°C, segundo as condições estabelecidas no item 2.2.2., sendo que esse hidrolisado foi destilado a vácuo com injeção de vapor de água a 100°C durante 20 e 30 minutos.

A determinação de aminoácidos também foi realizada utilizando-se o hidrolisado preparado pelo método em escala piloto. Essa análise foi feita em amostras destiladas a vácuo com injeção de vapor de água úmido durante 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 4,0, e 8,0 horas e também em amostras destiladas a vácuo com injeção de vapor seco por 0,5, 1,0 e 1,5 horas.

O teor de aminoácidos da matéria prima (protenose) também foi analisado.

2.2.5. Obtenção de hidrolisados protéicos com baixos teores de sal

O método para obtenção de hidrolisados protéicos com baixos teores de sal, baseou-se no fato de que quanto maior a concentração do ácido hidrolítico, maior a percentagem de sal no produto final, após a neutralização do ácido. Assim, foi desenvolvido um estudo que teve como base a eliminação do ácido utilizado na hidrólise.

2.2.5.1. Destilação a vácuo do ácido clorídrico, sem injeção de vapor de água

Nessa etapa, foi feita uma destilação do ácido clorídrico em evaporador rotativo até toda fase líquida ser eliminada. Os sólidos solúveis remanescentes foram diluídos em

processo de evaporação foi repetido. As diluições foram repetidas até que a quantidade de ácido foi constante após seguidas diluições. Em seguida, ajustou-se o pH do hidrolisado para 6,5 a 7,0 e determinou-se o teor de cloreto de sódio.

2.2.5.2. Destilação a vácuo do ácido clorídrico com injeção de vapor de água

Nesse método, o vapor era produzido pelo aquecimento de água destilada até ebulição e injetado, através do sistema de injeção de vapor, no fundo do balão que continha a amostra de maneira que promovesse a agitação do hidrolisado, homogeneizando a injeção de vapor e aumentando a superfície de destilação. O balão que continha a amostra a ser destilada, era mantido, durante todo o processo, em banho-maria. Assim o aquecimento do hidrolisado é realizado tanto pelo banho de aquecimento como pela injeção de vapor, permitindo conduzir o experimento de forma a concentrar o hidrolisado, o que seria impossível com aquecimento exclusivo da injeção de vapor.

A destilação foi realizada com vácuo de 26 mmHg e temperatura do banho de aquecimento de 88 ± 2 °C. Na otimização deste processo, foram utilizadas também as temperaturas de 100, 130 e 150 ± 2 °C.

O vapor de água a ser injetado passava por uma serpentina de alumínio imersa em banho de óleo aquecido a 140°C, para produzir vapor seco com temperatura de 100°C. Em função do vácuo, a temperatura interna do balão de destilação ficava em 60 ± 2 °C.

Inicialmente foram destiladas alíquotas de 50 ml de hidrolisado protéico durante 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos, respectivamente. A contagem do tempo de destilação era iniciada quando o vácuo em todo o sistema atingia 26 mmHg. A injeção de vapor era feita quando a água entrava em ebulição e antes de estabelecer o vácuo do sistema. Numa segunda etapa, utilizando balão de destilação de 1000 ml, o volume de amostra a ser destilado foi de 500 ml, obedecendo o mesmo procedimento.

Após a destilação, o volume da amostra era reconstituído em balões volumétricos de 50 ou 500 ml, dependendo do volume da amostra destilado, pela adição de água destilada, tomando-se a precaução de recuperar todo hidrolisado contido no balão de destilação.

2.2.6. Secagem do hidrolisado de protenose com baixo teor de sal

Para esse teste utilizou-se hidrolisado protéico de protenose preparado em escala piloto, descrito no item 2.2.3.

Após a eliminação do ácido utilizado na hidrólise por destilação a vácuo com injeção de vapor de água (item 2.2.5.2.), neutralizou-se o hidrolisado até pH 7,0, adicionou-se malto dextrina (5% p/p), ajustou-se o teor de sólidos solúveis para 38°Brix pela adição de água destilada e fez-se a secagem em *spray drier* mantendo-se a temperatura de entrada e saída do *spray* em 200 e 100°C, respectivamente.

Em seguida à secagem, fez-se uma raspagem manual interna no *spray drier* para recuperar todo hidrolisado, que foi acondicionado em sacos plásticos. Esse hidrolisado na forma de pó, foi utilizado, posteriormente, na determinação da estabilidade do hidrolisado seco e como fonte de aminoácidos no ensaio biológico.

2.2.7. Ensaio biológico

Foram utilizados ratos machos recém desmamados (21 dias de nascidos), da linhagem wistar, adquiridos no biotério central da UNICAMP.

2.2.7.1. Avaliação da eficiência protéica (PER) do hidrolisado de protenose seco com baixo teor de sal

Inicialmente utilizou-se 48 ratos. Após a pesagem, os extremos foram eliminados e selecionou-se 18 ratos que foram distribuídos em blocos casualizados de 6 animais por grupo (3 grupos). A média de peso dos 3 grupos de ratos foi 55,8 gramas.

Durante todo período do experimento, os animais permaneceram em gaiolas individuais de crescimento com dieta e água *ad libitum*, em biotério com luzes acesas e temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

As dietas para cada grupo, tinham como fonte protéica a caseína, a torta de extração de óleo de milho (protenose) e hidrolisado protéico de protenose seco em *spray drier* (item 2.2.5.), com 10,4, 10,6 e 10,2% de proteína total, respectivamente. O controle da ingestão de dieta e do peso dos ratos foram feitos de 5 em 5 dias.

As dietas foram preparadas de acordo com a AOAC (1975) com modificações para as misturas vitamínica e mineral segundo o American Institute of Nutrition-AIN (1976) do Nutrition Research Center-NRC, de maneira que contivesse a composição básica mostrada na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição básica das dietas utilizadas no ensaio biológico

Componentes	Percentagem
Proteína	10,00
Gordura	8,0
Sais minerais (tabela 10)	4,0
Vitaminas (tabela 11)	5,0
Fibras*	1,0
Carboidratos** q.s.p.	100

FONTE: HEGSTED (1941)

* Celulose microfina da Blanver Farmoquímica Ltda.

** 25% de açúcar refinado e 75% de amido de milho.

Tabela 8 - Composição da mistura salina usada nas dietas para o ensaio biológico

Ingredientes	g/kg de mistura
Fosfato de cálcio dibásico	500
Cloreto de sódio	74
Citrato de potássio monoidratado	220
Sulfato de potássio	52
Óxido de magnésio	24
Carbonato manganoso (43 - 48% de Mn)	3,5
Citrato férrico	6,0
Carbonato de zinco (70% de OZn)	1,6
Carbonato cúprico (53 - 55% de Cu)	0,3
Iodato de potássio	0,01
Selenito de sódio ($\text{Na}_2 \text{SeO}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,01
Sulfato de cromo e potássio [$\text{CrK} (\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$]	0,55
Sacarose q.s.p.	1000

FONTE: American Institute of Nutrition-AIN (1976)

Tabela 9 - Composição da mistura vitamínica usada nas dietas para o ensaio biológico

Vitaminas	Por Kg de mistura
Tiamina.HCl	600 mg
Riboflavina	600 mg
Piridoxina.HCl	700 mg
Ácido nicotínico	3000 mg
p-Pantotenato de cálcio	1600 mg
Ácido fólico	200 mg
p-Biotina	20 mg
Vitamina B-12	1,0 mg
Vitamina A	4000.000 UI
Vitamina E	5000 UI
Vitamina D-3	2,5 mg
Vitamina K	5,0 mg
Sacarose q.s.p.	1000 g

FONTE: American Institute of Nutrition-AIN (1976)

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da matéria prima

O teor de proteína bruta das matérias primas utilizadas para preparar hidrolisados protéicos, está mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Proteína total das matérias primas utilizadas no preparo de hidrolisados protéicos

Produtos	Proteína bruta(%) (N x 6,25)
Torta de soja	44,00
Soja em grãos moídos	31,50
Farelo de milho (refinasil)	21,00
Fermento biológico fresco (Fleischmann & Royal)	15,90

Como a protenose (concentrado protéico de milho), em função da sua disponibilidade e teor de proteína, foi selecionada para a determinação das condições de hidrólise em laboratório e para preparar o hidrolisado em escala piloto, determinou-se a sua composição centesimal (Tabela 11).

Tabela 11 - Composição centesimal da protenose.

Composição	gramas/100g de protenose
Proteína bruta (N x 6,25)	64,00
Umidade	12,50
Cinzas	3,50
Gordura	1,00
Carboidratos totais*	19,00

* - Calculado por diferença

4.2. Determinação das condições de hidrólise em laboratório

Nesse experimento a matéria prima foi a protenose e o parâmetro para estabelecer as condições ótimas de hidrólise foi o rendimento de hidrólise.

4.2.1. Rendimento de hidrólise

O rendimento ótimo de hidrólise define as condições de hidrólise que proporcionam maior teor de proteína solubilizada no hidrolisado, em relação ao seu conteúdo na matéria prima.

Na determinação do rendimento tomou-se como base a padronização dos parâmetros que influenciam o processo hidrolítico. Analisou-se: o efeito da variação do tempo de hidrólise, do teor de matéria prima, do ácido hidrolítico e da temperatura sobre a hidrólise.

O efeito da variação do teor de matéria prima na hidrólise é mostrado na Tabela 12. Pode-se verificar que mantendo-se a percentagem de ácido em 15%, ocorre um aumento no teor de sólidos solúveis (Brix) e no rendimento de proteínas solubilizadas à medida que se aumenta a concentração de matéria prima na formulação de 10 para 20 e 30%. Como a matéria prima tem outros componentes além da proteína, a relação entre sólidos solúveis e proteína não é proporcional, o que significa que outros materiais, além do material protéico, foram solubilizados. Pode-se observar também, que ocorre uma elevação significativa no rendimento quando se analisa esse parâmetro em função do tempo de hidrólise. O melhor rendimento foi obtido quando se utilizou 30% de protenose na formulação.

A Tabela 13 relaciona o efeito da variação da percentagem de 20, 30 e 50% de ácido numa formulação com 30% de protenose. Pode-se verificar que o teor de sólidos solúveis e rendimento de hidrólise aumentam consideravelmente com o aumento do teor de ácido na formulação. Efeito semelhante pode ser observado na Figura 14 que mostra que o aumento na concentração do ácido de 10 para 20 e 30% na formulação, aumenta a taxa de ligações peptídicas hidrolisadas (grau de hidrólise). Contudo, é necessário levar em consideração, que apesar de melhorar o rendimento de hidrólise, uma proporção

maior de ácido tem a desvantagem de prejudicar a qualidade final do produto, uma vez que será formada uma quantidade bem maior de sal na neutralização desse ácido.

Assim, considerando que o emprego de 20% de ácido originou resultados de rendimento de 74,56%, e que o grau de hidrólise nessa concentração de ácido atinge valores próximos ao máximo, além de que será formada uma menor quantidade de sal (NaCl) na neutralização, esta concentração de 20% de ácido foi selecionada para a continuidade dos ensaios.

A diminuição do teor de proteína nas Tabelas 12 e 13 indicam a solubilização desse componente com o decorrer do tempo de hidrólise, conforme esperado.

Segundo MAY (1974), a influência da concentração do ácido sobre o processo hidrolítico é fundamental, uma vez que, com o aumento da força do ácido, a destruição de aminoácido diminui e o sabor do hidrolisado se torna melhor, ainda que altas concentrações de ácido resultem em elevadas concentrações de sal no produto final após a neutralização. Em 1965, GRIFFIT LABORATORIES LIMITED (Pat 1,071,248) concluiu que a redução da concentração de ácido no processo de hidrólise, tem conduzido a um baixo rendimento de aminoácidos no produto final. Ratificando esse aspecto, HAMPTON (Pat.1 494 856, 1975) publicou que o excesso de ácido é necessário para garantir a complementação da reação. Entretanto, em alguns produtos com características específicas, é imprescindível a restrição deliberada do grau de hidrólise pela diminuição da percentagem de ácido na formulação ou a redução do tempo de reação (GRIFFIT LABORATORIES LIMITED Pat. 1,071,248, 1965). Em relação a isso, alguns autores têm publicado que a restrição do grau de hidrólise pode provocar o aparecimento de peptídios e aminoácidos de sabor amargo, liberados durante o processo hidrolítico (FUGIMAKI *et al.*, 1968; ROLAND, 1978)

Tabela 12 - Efeito da variação do teor de matéria prima (protenose) na hidrólise, quanto ao Brix e teor de proteína dos hidrolisados e rendimento de hidrólise utilizando ácido clorídrico a 15% e temperatura de refluxo de 100°C.

Amostras											
Tempo	Protenose 10%				Protenose 20%				Protenose 30%		
	Brix	Proteína*	Rend. **		Brix	Proteína*	Rend. **		Brix	Proteína*	Rend. **
2	17,5	3,61 ± 0,007	43,67 ± 0,11		22,5	5,09 ± 0,035	60,27 ± 0,28		32,0	6,79 ± 0,007	64,66 ± 0,04
4	18,0	3,31 ± 0,021	48,36 ± 0,33		23,0	4,98 ± 0,021	61,13 ± 0,17		28,4	6,31 ± 0,007	67,16 ± 0,04
6	17,5	2,58 ± 0,021	59,77 ± 0,33		21,1	4,50 ± 0,014	64,84 ± 0,11		26,5	5,70 ± 0,014	70,31 ± 0,07
8	17,5	2,07 ± 0,042	67,66 ± 0,66		20,7	4,19 ± 0,014	67,27 ± 0,11		25,0	4,71 ± 0,007	75,49 ± 0,04

* - Proteína média ± desvio padrão (g/100 ml de hidrolisado)

** - Rendimento médio ± erro absoluto

No presente trabalho, a influência da temperatura sobre a hidrólise foi analisada determinando-se o grau de hidrólise (item 2.1.3.1.) como está mostrado na Figura 14. Neste experimento, além da variação na concentração do ácido, a temperatura de hidrólise foi mudada de 100 para 80°C. Os resultados mostram um comportamento semelhante aos experimentos anteriores onde a percentagem de ligações peptídicas quebradas aumentam com o tempo de hidrólise e com o aumento da concentração de ácido na formulação. Contudo, comparando-se os processos com temperaturas de 100 e 80°C em formulação com 20% de ácido, pode-se constatar que a 100°C, 75% das ligações peptídicas foram clivadas em 2 horas, enquanto que a 80°C, para o mesmo tempo de hidrólise, apenas 45% das ligações foram quebradas, o que sugere que a temperatura é um fator limitante do processo de hidrólise, independente da percentagem de ácido utilizada na formulação.

BIRD & MINOR (1948) estudando a influência da temperatura, concentração do íon hidrogênio e proteína sobre a hidrólise, concluíram que o conteúdo de nitrogênio amínico no produto final é diretamente proporcional às concentrações de proteína e ácido na formulação, e que o hidrolisado preparado em baixas temperaturas apresenta importantes vantagens sobre aqueles preparados em temperaturas mais elevadas, quanto ao aroma do produto final. Segundo PHAN & ROSARIO (1983), o efeito da variação da temperatura, tempo e concentração de ácido sobre a taxa de hidrólise de extrato desengordurado de côco e farinha desengordurada de soja, estão interrelacionados. Segundo esses autores, a taxa de nitrogênio amínico aumenta com o aumento da concentração de ácido clorídrico; contudo, a amplitude da reação é determinada pela temperatura, ou seja, em temperaturas baixas a hidrólise não se completa mesmo em altas concentrações de ácido. Além dessas condições, um tempo mínimo é necessário para completar a reação. Do mesmo modo, YUNES *et al.* (1981) publicaram que a composição dos hidrolisados protéicos depende diretamente da matéria prima, da concentração do ácido hidrolítico, da concentração de proteína, da temperatura e do tempo de hidrólise.

O efeito da variação da temperatura sobre a hidrólise foi estudado também por outros autores, que concluíram que uma hidrólise realizada em temperatura abaixo de 100 °C só se completa após vários dias, enquanto que acima de 120°C ocorre destruição de alguns aminoácidos (HALL, 1949), e ainda que, em meio ácido, a maioria dos aminoácidos são estáveis em temperaturas em torno de 100°C (KRAMPITZ, citado por KONRAD & LIESKE, 1979). Entretanto SCHEIN & BERG (citados por KONRAD & LIESKE, 1979) mostraram que os aminoácidos são destruídos em maior proporção pelas temperaturas elevadas do que pela hidrólise prolongada ou altas concentrações de ácido.

O tempo mínimo para que uma hidrólise se complete pode ser diminuído, quando o hidrolisado é produzido em um meio pressurizado. HALL (1949) obteve um hidrolisado ácido com excelente aroma quando utilizou pressão na hidrólise. KONRAD & LIESKE, (1979) citam que essa pressão pode variar de 2 a 7 atmosferas.

Tabela 13 - Efeito da variação do teor de ácido clorídrico na hidrólise de 30% de protenose na formulação, quanto ao Brix e teor de proteína dos hidrolisados e rendimento de hidrólise. A temperatura de refluxo foi de 100°.

Amostras												
Tempo	20% de ácido clorídrico				30% de clorídrico				50% de ácido clorídrico			
	Brix	Proteína*	Rend.**		Brix	Proteína*	Rend.**		Brix	Proteína*	Rend.**	
(h)												
2	32,5	7,11 ± 0,021	62,99 ± 0,11		38,7	6,89 ± 0,014	64,11 ± 0,07		39,5	5,39 ± 0,014	71,93 ± 0,07	
3	30,5	6,76 ± 0,042	64,79 ± 0,22		37,8	6,70 ± 0,014	65,10 ± 0,07		39,0	4,79 ± 0,042	75,05 ± 0,22	
4	29,5	6,60 ± 0,035	65,65 ± 0,18		35,4	6,50 ± 0,021	66,17 ± 0,11		38,0	2,88 ± 0,028	85,00 ± 0,15	
5	30,5	6,30 ± 0,035	67,19 ± 0,18		35,3	6,21 ± 0,007	67,68 ± 0,04		37,4	2,57 ± 0,007	86,64 ± 0,04	
6	29,5	6,00 ± 0,007	68,78 ± 0,04		34,0	5,50 ± 0,021	71,38 ± 0,11		36,9	2,45 ± 0,049	87,27 ± 0,26	
7	28,8	5,50 ± 0,028	71,35 ± 0,15		33,0	4,89 ± 0,007	74,56 ± 0,04		36,5	2,32 ± 0,007	87,94 ± 0,26	
8	27,0	4,89 ± 0,007	74,56 ± 0,04		32,7	4,03 ± 0,028	79,01 ± 0,15		35,3	2,09 ± 0,021	89,14 ± 0,11	

* - Proteína média ± desvio padrão (g/100 ml de hidrolisado)

** - Rendimento médio ± erro absoluto

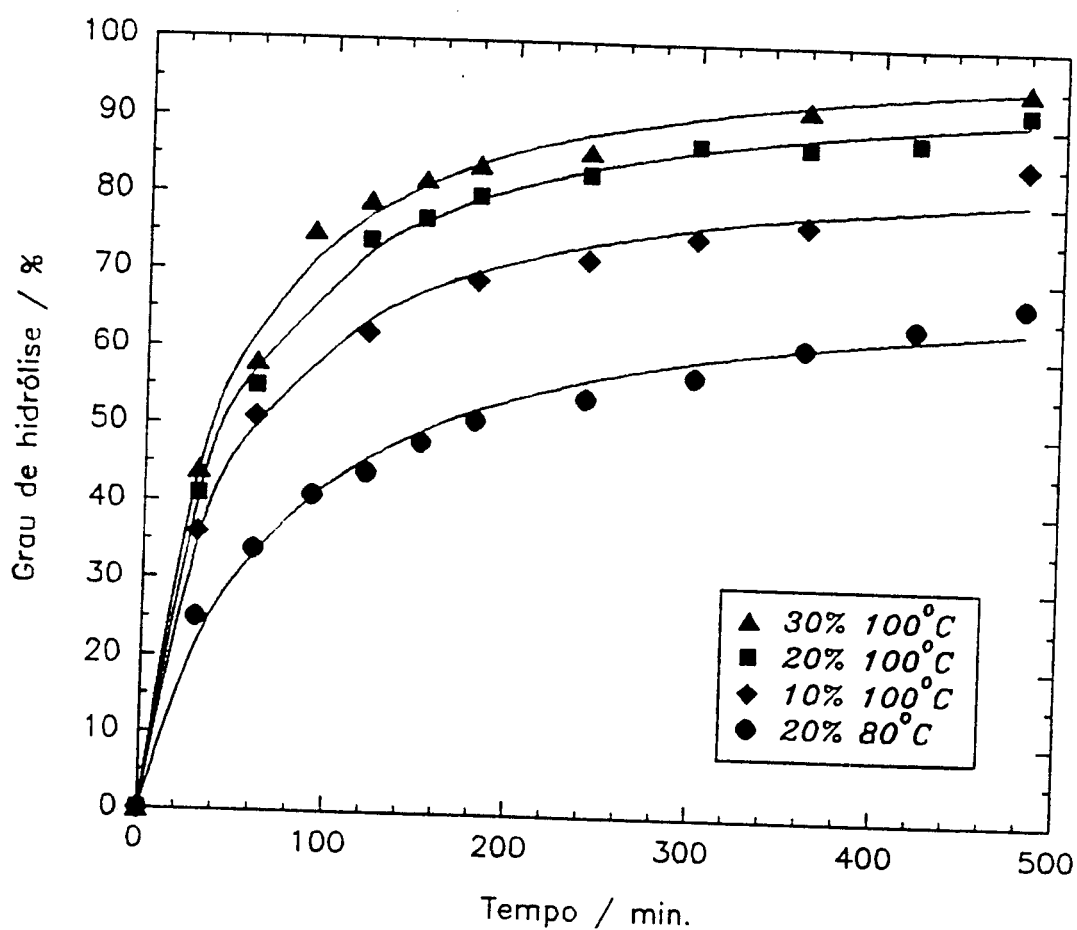


Figura 14 - Grau de hidrólise da protenose (30%) com variação na concentração de ácido clorídrico e da temperatura de hidrólise, em função do tempo.

4.2.2. Preparo de hidrolisados das diversas matérias primas em laboratório

Para uma avaliação do comportamento e rendimento de hidrólise de outras matérias primas, foram selecionadas a torta de soja, grãos de soja moídos e fermento biológico fresco, cujos resultados encontram-se respectivamente nas Tabelas 14, 15 e 16. Pode-se verificar que o desenvolvimento do processo hidrolítico dessas matérias primas são semelhantes ao da protenose (Tabela 13), ou seja, o rendimento aumenta com o tempo de hidrólise e com o aumento da percentagem de ácido na formulação.

Tabela 14 - Efeito da variação do teor de ácido clorídrico na hidrólise de 30% de torta de soja na formulação quanto ao conteúdo de proteína no hidrolisado e rendimento de hidrólise. A temperatura de refluxo foi 100°C

Tempo (h)	Amostras					
	20% de ácido clorídrico		30% de ácido clorídrico		50% de ácido clorídrico	
	Proteína*	Rend.**	Proteína*	Rend.**	Proteína*	Rend.**
1	8,05±0,099	39,02±0,75	7,00±0,014	46,97±0,11	5,79±0,28	56,89±0,22
2	7,29±0,035	44,73±0,27	6,30±0,014	52,27±0,11	4,10±0,21	68,98±0,16
3	6,58±0,007	50,11±0,05	5,00±0,035	62,16±0,27	3,30±0,014	75,00±0,11
4	5,67±0,035	57,01±0,27	4,12±0,042	68,79±0,32	2,61±0,035	80,27±0,27
6	4,49±0,035	65,95±0,27	2,81±0,035	78,75±0,27	1,78±0,014	86,52±0,11
7	3,68±0,035	72,08±0,27	2,39±0,028	81,89±0,21	1,61±0,021	87,84±0,16
8	3,39±0,021	74,28±0,16	2,10±0,028	84,09±0,21	1,50±0,021	88,67±0,16

* - Proteína média ± desvio padrão (g/ml de hidrolisado)

** - Rendimento médio ± erro absoluto

Tabela 15 - Efeito da variação do teor de ácido clorídrico na hidrólise de 30% de grãos de soja moídos na formulação quanto ao conteúdo de proteína no hidrolisado e rendimento de hidrólise. A temperatura de refluxo foi 100°C.

Tempo (h)	Amostras					
	20% de ácido clorídrico		30% de ácido clorídrico		50% de ácido clorídrico	
	Proteína*	Rend.**	Proteína*	Rend.**	Proteína*	Rend.**
2	6,29±0,028	33,44±0,30	4,39±0,035	53,49±0,37	3,71±0,014	60,74±0,15
3	6,00±0,035	36,46±0,37	3,71±0,028	60,74±0,30	3,31±0,028	64,97±0,30
4	4,88±0,021	48,31±0,22	3,18±0,007	66,30±0,07	2,65±0,084	71,96±0,09
5	4,51±0,007	52,22±0,07	2,59±0,014	72,59±0,15	1,79±0,035	81,01±0,37
6	4,15±0,049	56,46±0,52	2,12±0,035	77,51±0,37	1,59±0,021	83,12±0,22
7	3,57±0,035	62,17±0,37	1,80±0,021	80,90±0,22	1,39±0,007	85,24±0,07
8	3,39±0,035	64,07±0,37	1,71±0,028	81,90±0,30	1,27±0,021	86,51±0,22

* - Proteína ± desvio padrão (g/100ml de hidrolisado)

** - Rendimento médio ± erro absoluto

Tabela 16 - Efeito da variação do teor de ácido clorídrico na hidrólise de 30% de fermento Fleischmann Royal fresco (*Saccharomyces cerevisiae*) na formulação quanto ao conteúdo de proteína no hidrolisado e rendimento de hidrólise. A temperatura de refluxo foi 100°C.

Tempo (h)	Amostras					
	20% de ácido clorídrico		30% de ácido clorídrico		50% de ácido clorídrico	
	Proteína*	Rend.**	Proteína*	Rend.**	Proteína*	Rend.**
2	3,10±0,063	35,12±1,33	2,50±0,021	47,69±0,44	1,50±0,007	68,66±0,15
3	2,89±0,021	39,52±0,44	2,09±0,042	56,18±0,89	1,21±0,021	74,74±0,44
4	2,60±0,028	45,49±0,59	1,80±0,000	62,26±0,00	1,20±0,007	74,95±0,44
5	2,29±0,028	51,99±0,59	1,30±0,021	72,85±0,44	1,20±0,007	74,95±0,15
7	2,00±0,014	58,07±0,30	1,21±0,007	74,74±0,15	0,99±0,014	79,25±0,30
8	1,60±0,02	66,56±0,44	1,02±0,049	78,72±1,04	0,68±0,014	85,74±0,30

* - Proteína média ± desvio padrão (g/100 ml de hidrolisado)

** - Rendimento médio ± erro absoluto

A comparação entre os rendimentos de hidrólise de diferentes matérias primas mostradas nas Tabelas 13, 14, 15 e 16, indicam que as proteínas têm diferentes suceptibilidades à hidrólise, uma vez que após 8 horas em ácido clorídrico a 20%, o rendimento médio de hidrólise de grãos de soja moídos, fermento biológico, torta de soja e protenose foram 64,07, 66,56, 74,28 e 74,56%, respectivamente. A torta de soja e protenose tiveram rendimento equivalentes somente a partir de 7 horas de hidrólise sendo que no período de 2 a 6 horas a protenose foi hidrolisada mais rapidamente que a torta de soja. Quanto a isso, tem sido publicado que alguns peptídios aumentam a sua resistência à hidrólise ácida quando os grupos carboxílicos da valina, leucina e isoleucina estão envolvidos (SINGE, 1944 e 1945; LAWRENCE & MOORE, 1951; CRISTENSEN, 1954). Do mesmo modo, DAVIES & THOMAS (1973) comparando o efeito de vários tratamentos ácidos sobre o rendimento de hidrólise, concluíram que a valina, leucina e isoleucina são liberados lentamente somente quando o meio hidrolítico é o ácido clorídrico, contudo, quando o ácido sulfúrico é utilizado na hidrólise, esses aminoácidos, além da treonina serina e ácido glutâmico, são liberados rapidamente para o meio hidrolítico.

4.2.2.1. Avaliação de diversas matérias primas com tempo de hidrólise de 3 e 8 horas

A avaliação da influência da matéria prima na qualidade do hidrolisado, foi feita através de uma análise sensorial dos hidrolisados preparados a partir de diferentes matérias primas (ítems 2.2.2. e 2.2.2.1).

Na avaliação da preferência entre os hidrolisados protéicos obtidos após 3 horas de hidrólise observou-se, pela Tabela 17, que os obtidos da protenose e torta de soja não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$), tendo obtido as médias de notas mais baixas. Os obtidos de proteína texturizada de soja e fermento biológico não diferiram estatisticamente entre si, tendo a proteína texturizada de soja obtido a maior média (4,40) correspondente ao “desgostei ligeiramente” da escala. O hidrolisado obtido a partir do fermento biológico apresentou média também bastante próxima ao meio da escala.

Após 8 horas de hidrólise, observou-se que o hidrolisado obtido a partir da protenose apresentou praticamente o mesmo grau de preferência que o hidrolisado obtido

com 3 horas de hidrólise, enquanto que os de torta de soja e fermento biológico apresentaram ligeiro aumento das médias de preferência. Já o obtido de proteína texturizada de soja apresentou ligeira diminuição do grau de preferência. Contudo, tanto o obtido de proteína texturizada de soja e fermento biológico situaram-se ainda próximos ao meio da escala com as maiores médias. Neste estudo, os hidrolisados obtidos a partir de protenose e fermento biológico diferiram estatisticamente entre si ($p>0,05$).

Em termos da avaliação sensorial da preferência, podemos observar que as melhores matérias primas para obtenção de hidrolisado são o fermento biológico e a proteína texturizada de soja, tanto para 3 horas como para 8 horas de hidrólise.

Tabela 17 - Avaliação da aceitação dos hidrolisados preparados a partir de diferentes matérias primas

Matéria prima hidrolisada	Preferência	
	3 horas	8 horas
Protenose	2,96 ^c	2,94 ^c
Torta de soja	3,04 ^{bc}	3,79 ^{bc}
Proteína texturizada de soja	4,40 ^a	4,04 ^a
Fermento biológico	4,12 ^{ab}	4,33 ^{ab}
DMS (1%)	1,13	1,33

* DMS (1%) - Diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade

** Entre letras iguais não há diferença significativa ($p<0,05$)

Quanto à frequência das razões apresentadas pelos julgadores para a aceitação ou rejeição dos hidrolisados (Tabela 18), podemos observar que o sabor foi o item de maior peso tanto para aqueles que rejeitaram como para aqueles que aceitaram os hidrolisados, seguido do item teor de sal.

Em virtude de terem atingido as médias mais altas na preferência dos provadores, as amostras obtidas a partir do fermento biológico e torta de soja com 8 horas de hidrólise, foram selecionadas para substituir o extrato de carne em formulações para caldo de carne de uso culinário nos experimentos seguintes. No caso, as mais preferidas foram as amostras obtidas do fermento biológico, torta de soja e proteína texturizada de soja. Como com 8 horas de hidrólise a torta de soja e a proteína texturizada de soja não diferiram estatisticamente entre si, por disponibilidade de amostras, optou-se pela torta de soja.

Tabela 18 - Frequência das razões para aceitação ou rejeição dos hidrolisados

Razões		Protenose		Torta de soja		Prot. Text. Soja		Ferm. Biológico	
Aceitação		3 h	8 h	3 h	8 h	3 h	8 h	3 h	8 h
	Menor amargor	-	-	2	-	1	-	1	1
	Melhor odor	1	-	-	1	1	2	1	-
	Melhor sabor	1	2	5	6	3	3	3	5
	Melhor teor de sal	3	-	1	3	1	2	3	2
	Outros	-	-	-	-	-	-	-	-
Rejeição	Maior amargor	2	4	2	-	3	3	-	-
	Pior odor	1	-	1	1	2	-	-	1
	Pior sabor	8	5	3	3	4	6	2	2
	Pior teor de sal	2	3	3	1	1	1	-	-
	Outros	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2.2.2. Avaliação de hidrolisados selecionados para substituição do extrato de carne em caldo de carne

Os hidrolisados de torta de soja e fermento biológico fresco (ítems 2.2.2 e 2.2.2.2) foram submetidos à avaliação sensorial como substituto de extrato de carne em caldo de carne.

Os resultados da análise sensorial (Tabela 19) mostram que na comparação entre as formulações para caldo de carne, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações contendo extrato de carne e as formulações em que o extrato de carne foi substituído por 20, 50 e 100% de hidrolisado de torta de soja ou de fermento biológico.

É interessante observar que as substituições de extrato de carne pelos hidrolisados protéicos, promoveram um aumento do grau de preferênica nas formulações de caldo de carne em relação à formulação padrão com 100% de extrato de carne.

Tabela 19 - Avaliação sensorial de amostras com substituição de extrato de carne por hidrolisados nas formulações para caldo de carne.

Matéria prima hidrolisada	Preferência na % de substituição de extrato de carne por hidrolisado				DMS (1%)
	0%	20%	50%	100%	
Torta de soja	4,12 ^a	4,67 ^a	5,08 ^a	4,67 ^a	1,23
Fermento biológico	3,88 ^a	3,92 ^a	4,84 ^a	4,14 ^a	1,27

- Não há diferença significativa entre as amostras analisadas a nível de 1% quando as médias são seguidas das mesmas letras
- DMS (1%) -Diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

As formulações contendo o hidrolisado de torta de soja apresentaram sempre médias das notas superiores às das formulações contendo o hidrolisado de fermento biológico. As notas máximas, para os dois hidrolisados, foram alcançadas para 50% de

substituição e para a torta de soja com 100% de substituição, quando corresponderam ao indiferente da escala.

Nessa avaliação em que as amostras já incluíam outros ingredientes além do hidrolisado, a principal razão para atribuição de valores continuou sendo o sabor seguido do teor de sal (Tabela 20), aparecendo em menor número de vezes as razões referentes ao amargor, comparando-se aos resultados dos testes anteriores, apresentados na Tabela 18.

Tabela 20 - Frequência das razões para preferir ou rejeitar as formulações de caldo de carne com substituição de extrato de carne por hidrolisado.

Razões		Ext. carne	Hidrol. de torta de soja*			Ext. carne	Hidrol. de Ferm. Biol.*		
		100%	20%	50%	100%	100%	20%	50%	100%
Para preferir	Menor amargor	-	-	-	-	-	-	-	-
	Melhor odor	-	-	-	2	-	-	-	1
	Melhor teor de sal	1	4	1	1	1	1	2	1
	Melhor sabor	6	3	4	8	3	3	7	6
	Outros	-	-	-	-	-	-	-	-
Para rejeitar	Maior amargor	1	-	-	1	-	-	-	1
	Pior odor	1	-	-	-	1	-	1	2
	Pior sabor	6	3	1	9	6	2	1	5
	Pior teor de sal	5	3	-	2	1	5	4	3
	Outros	-	-	-	-	-	-	-	-

* 8 horas de hidrólise

4.3. Obtenção de hidrolisado em escala piloto

Como o grau de hidrólise (Figura 14) mostrou que a hidrólise, quando conduzida a 80°C, quebra somente 65% das ligações peptídicas após 8 horas de hidrólise, montou-se outro experimento onde as condições de temperatura e percentagem de matéria prima foram mantidas, porém, o tempo máximo de hidrólise foi aumentado de 8 para 12 horas, com o objetivo de melhorar o rendimento de hidrólise (Tabela 21).

A avaliação da hidrólise foi feita levando-se em consideração o rendimento de hidrólise. Na Tabela 21 pode-se observar que mesmo utilizando elevadas concentrações de ácido na formulação (50%), em 12 horas a hidrólise não foi completa, tendo um rendimento de 83%, enquanto que com 20% de ácido na formulação, o rendimento foi de 80%. Como um dos objetivos do trabalho era produzir hidrolisados com baixo teor de sal pela eliminação do ácido clorídrico utilizado na hidrólise, optou-se pela concentração de 20% de ácido na formulação para preparar o hidrolisado em escala piloto (item 2.2.3.)

4.4. Avaliação do teor de aminoácidos do hidrolisado de protenose

Outro fator importante a ser levado em consideração é a perda de aminoácidos que ocorre durante a hidrólise ácida. Como o presente trabalho envolveu, além da hidrólise ácida, outros tratamentos como a destilação a vácuo e neutralização, analisou-se as diferenças entre o conteúdo de aminoácidos da protenose e do hidrolisado de protenose, com o objetivo de avaliar as possíveis perdas de aminoácidos ocorridas durante o processo de produção do hidrolisado.

Nesse experimento analisou-se o conteúdo de aminoácidos do hidrolisado de protenose produzido pelo método laboratorial e em escala piloto, utilizando as melhores condições de hidrólise estabelecidas neste trabalho. Os tratamentos de obtenção de hidrolisados para este experimento estão descritos no item 2.2.4.

Se compararmos a análise de aminoácidos da matéria prima, mostrada na Tabela 22, com a dos hidrolisados protéicos (Tabelas 23, 24 e 25), pode-se observar que quando a hidrólise foi conduzida a 80°C durante 12 horas, houve uma redução acentuada no teor de ácido glutâmico, leucina e prolina. Do mesmo modo, mantendo-se a mesma formulação para hidrólise e variando apenas a temperatura de 80 para 100°C (Tabela 23), houve uma redução ainda mais acentuada no teor de ácido glutâmico e leucina, mesmo

reduzindo o tempo de hidrólise para 4 horas. Esses resultados mostram que a temperatura além de ser um fator limitante do processo de hidrólise, também é responsável pela redução do conteúdo de aminoácidos. Quanto a isso, SCHEIN & BERG (citados por KONRAD & LIESKE, 1979) mostraram que os aminoácidos são destruídos em maior proporção pelas temperaturas elevadas do que pela hidrólise prolongada ou altas concentrações de ácido. Além disso, de acordo com BIRD & MINOR (1948), os hidrolisados preparados em temperatura abaixo de 100°C apresentam melhores propriedades quanto ao sabor e aroma em relação àqueles preparados em temperaturas mais elevadas. Outro estudo conduzido por PHAN & ROSARIO (1983) concluiu que a amplitude da hidrólise é determinada pela temperatura.

As Tabelas 24 e 25 mostram a análise de aminoácidos de dois experimentos conduzidos nas mesmas condições de hidrólise, sendo que receberam tratamentos diferentes quanto ao processo de destilação a vácuo com injeção de vapor de água. Um hidrolisado foi destilado a vácuo com injeção de vapor úmido (Tabela 24) e o outro com injeção de vapor seco (Tabela 25). Pode-se observar que não houve variações significativas quanto ao teor de aminoácidos durante todos os períodos de destilação. Contudo, como o vapor seco (100°C) foi mais eficiente no arraste de ácido clorídrico, passou-se a utilizá-lo nos experimentos subsequentes.

Outro aspecto importante a ser considerado na perda de aminoácidos durante o processo de hidrólise ácida, é a formação de huminas, que segundo PRENDERGAST (1974), mesmo não se conhecendo a exata estrutura desse material, sabe-se que é um produto polimérico resultante da condensação do triptofano e componentes aldeídicos. Para KONRAD & LIESKE (1979), além do triptofano, outros aminoácidos como a tirosina, cisteína, fenilalanina, metionina e arginina participam da formação desse produto. YUNES *et al* (1981) acrescentam que as huminas são também formadas por restos de cadeias protéicas e carboidratos, além dos aminoácidos já citados. Como a maioria dos fabricantes preferem filtrar o hidrolisado várias vezes, para remover a maior quantidade possível de material humínico e descartá-lo, as huminas se constituem em fator importante de perda de aminoácidos (PRENDERGAST, 1974; KONRAD & LIESKE, 1979).

Em 1946 REES publicou que durante a hidrólise ácida, a treonina e a serina são destruídos progressivamente enquanto que toda asparagina e glutamina são transformados

Tabela 21 - Efeito da variação do teor de ácido clorídrico na hidrólise de 30% de protenose na formulação quanto ao teor de proteína do hidrolisado e rendimento de hidrólise. A temperatura de refluxo foi de 80°C.

Tempo (h)	Amostras					
	20% de ácido clorídrico		30% de ácido clorídrico		50% de ácido clorídrico	
	Proteína*	Rend.**	Proteína*	Rend.**	Proteína*	Rend.**
2	10,79±0,028	43,80±0,15	10,49±0,042	45,36±0,22	9,21±0,007	52,06±0,04
3	9,89±0,014	48,49±0,07	9,12±0,007	52,53±0,04	8,50±0,028	55,73±0,15
4	9,31±0,021	51,54±0,11	8,80±0,035	54,19±0,18	7,29±0,014	62,03±0,07
5	8,69±0,000	54,74±0,00	8,01±0,028	58,28±0,15	6,41±0,014	66,61±0,07
6	8,39±0,021	56,33±0,11	7,77±0,021	59,92±0,11	5,40±0,021	71,90±0,11
7	7,89±0,028	58,91±0,15	6,89±0,021	64,14±0,11	4,71±0,007	75,49±0,04
8	7,59±0,014	60,47±0,07	6,32±0,007	67,11±0,04	4,37±0,028	77,24±0,15
12	4,49±0,021	76,64±0,11	3,90±0,014	79,69±0,07	3,28±0,035	82,94±0,18

* - Proteína média ± desvio padrão g/100 ml de hidrolisado

** - Rendimento médio ± erro absoluto

quantitativamente em ácido aspártico e glutâmico, respectivamente. OLCOT & FRANKEL-KONRAT (1947) mostraram que o aquecimento em ácido clorídrico 6 a 7 N não destrói totalmente o triptofano se o oxigênio e metais pesados forem excluídos dos processos. Resultado semelhante foi obtido por LAWRENCE & MOORE (1951) que conseguiram detectar uma considerável quantidade de triptofano após hidrólise quando o oxigênio foi excluído. GUNDLACH *et al* (1959) e MAHOWALD *et al* (1962) publicaram que ocorre uma extensiva destruição da cistina e cisteína durante esse processo, principalmente na presença de carboidratos.

Do mesmo modo, DAVIES & THOMAS (1973) comparando o efeito de vários tratamentos ácidos sobre o rendimento dos aminoácidos, observaram que a treonina e a serina são destruídos com o prolongamento do tempo de hidrólise.

Tabela 22 - Composição de aminoácidos da matéria prima (protenose) utilizada na padronização do método de hidrólise

Aminoácidos	g AA*/100 g de proteína
Ácido aspártico	5,09
Treonina	3,18
Serina	4,81
Ácido glutâmico	23,84
Prolina	8,96
Glicina	2,82
Alanina	9,88
Cisteína	-
Valina	4,05
Metionina	1,99
Isoleucina	3,66
Leucina	16,55
Tirosina	4,12
Fenilalanina	5,15
Lisina	1,60
Histidina	1,68
Arginina	2,62
Σ AA	100,00

Tabela 23 - Composição de aminoácidos de hidrolisado protéico de protenose hidrolisada durante 4 horas em temperatura de 100°C e destilada a vácuo com injeção de vapor de água seco.

Aminoácidos	Gramas de aminoácidos/100 gramas de proteína	
	Amostra 1	Amostra 2
Ácido aspártico	4,05	5,80
Treonina	1,85	1,72
Serina	4,32	4,08
Ácido glutâmico	15,34	15,63
Prolina	2,84	2,65
Glicina	2,97	3,03
Alanina	8,86	8,71
Cisteína	-	-
Valina	3,08	2,76
Metionina	2,09	1,89
Isoleucina	2,45	2,47
Leucina	9,61	9,39
Tirosina	3,10	3,10
Fenilalanina	6,48	6,46
Lisina	1,58	1,48
Histidina	2,09	1,79
Arginina	1,90	1,65
ΣAA	72,58	72,61

Amostras: hidrolisado protéico destilado a vácuo por 20(amostra 14) e 30(amostra 15) minutos.

Tabela 24-Composição de aminoácidos de hidrolisado protéico de protenose hidrolisada por 12 horas em temperatura de 80°C e destilada a vácuo com injeção de vapor de água úmido.

Aminoácidos	gramas de aminoácidos/100 gramas de proteína						
	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9
Ácido aspártico	6,19	5,88	6,29	6,29	6,24	6,24	5,29
Treonina	2,77	2,98	3,03	2,91	2,47	2,53	2,99
Serina	4,88	4,83	4,78	4,88	4,88	4,71	4,80
Ácido glutâmico	16,58	17,70	17,98	18,23	17,76	18,18	18,25
Prolina	7,99	7,96	7,11	6,12	5,60	5,12	4,64
Glicina	2,79	2,93	2,70	2,98	2,79	2,65	3,03
Alanina	9,54	9,18	10,10	9,13	9,64	9,34	9,47
Cisteína	-	-	-	-	-	-	-
Valina	3,88	3,55	3,69	3,86	3,83	3,93	3,89
Metionina	1,97	1,80	1,99	2,06	2,02	1,96	1,90
Isoleucina	4,18	4,01	4,17	4,18	4,03	4,05	4,12
Leucina	12,19	12,36	11,90	12,26	12,21	12,67	12,07
Tirosina	4,44	4,27	4,05	4,57	4,25	3,89	4,52
Fenilalanina	5,80	5,48	5,39	5,22	5,66	5,77	5,87
Lisina	1,55	1,60	1,51	1,53	1,63	1,58	1,53
Histidina	1,60	1,67	1,62	1,55	1,62	1,67	1,65
Arginina	2,26	2,13	2,18	2,35	2,36	2,02	2,31
Σ AA	88,61	88,33	88,49	88,12	86,99	86,31	86,33

Amostras: hidrolisado destilado a vácuo com injeção de vapor úmido por 0,5(Amostra 3), 1,0(Amostra 4), 1,5(Amostra 5), 2,0(Amostra 6) 2,5(Amostra 7), 4,0(Amostra 8) e 8,0(Amostra 9) horas.

Tabela 25 - Composição de aminoácidos de hidrolisado protéico de protenose hidrolisada durante 12 horas em temperatura de 80°C e destilada a vácuo com injeção de vapor de água seco.

Aminoácidos	gramas de aminoácidos/100 gramas de proteína		
	Amostra 10	Amostra 11	Amostra 12
Ácido aspártico	5,07	5,37	5,29
Treonina	2,65	2,81	2,53
Serina	4,81	4,80	4,86
Ácido glutâmico	18,18	17,52	17,93
Prolina	4,86	5,05	4,76
Glicina	2,87	2,93	2,79
Alanina	9,59	9,25	9,74
Cisteína	-	-	-
Valina	4,56	4,40	4,49
Metionina	2,67	2,84	3,10
Isoleucina	4,12	4,35	4,26
Leucina	13,20	12,47	12,67
Tirosina	4,15	4,78	4,49
Fenilalanina	5,00	4,90	5,05
Lisina	1,65	1,77	1,68
Histidina	1,53	1,58	1,72
Arginina	2,18	2,36	2,33
ΣAA	87,09	87,18	87,69

Amostras: hidrolisado protéico destilado a vácuo com injeção de vapor seco por 0,5 (Amostra 10), 1,0 (Amostra 11), 1,5 (Amostra 12) horas.

4.5. Obtenção de hidrolisados protéicos ácidos com baixos teores de sal

4.5.1. Eliminação do ácido de hidrólise por destilação a vácuo

Para obter hidrolisados com baixos teores de cloreto de sódio (item 2.2.5.), tomou-se como base o fato de que o sal presente no hidrolisado é formado quando se faz a neutralização do ácido clorídrico utilizado no processo de hidrólise. Desse modo, procurou-se eliminar o ácido hidrolítico antes da neutralização.

A condução deste processo provoca a concentração gradativa do hidrolisado, que passa a ser mais susceptível à queima. Assim, com a continuação do processo a destilação deve ser interrompida e o hidrolisado diluído para se proceder novo ciclo de destilação. A Figura 15 mostra que a destilação do ácido clorídrico a vácuo, em evaporador rotativo (item 2.2.5.1.), reduz o teor de cloreto de sódio no produto final, contudo, mesmo repetindo o processo por dez vezes, a percentagem final de cloreto de sódio ficou em torno de 7%, que corresponde a 42,6% do original.

Apesar da redução significativa do cloreto de sódio, as repetições exigidas por este processo deram origem a um hidrolisado com cheiro de queimado que se intensificou com o aumento das repetições da destilação.

Um método semelhante foi patenteado em 1975 como processo industrial (HAMPTON, Pat. 1 494 856, 1975). Nesse processo, após a hidrólise, o material insolúvel era filtrado e o ácido utilizado era recuperado por destilação e reciclado para ser utilizado no preparo de novo hidrolisado. O conteúdo de cloreto de sódio no hidrolisado produzido por esse método, na forma de pó com 5% de umidade, era 32%.

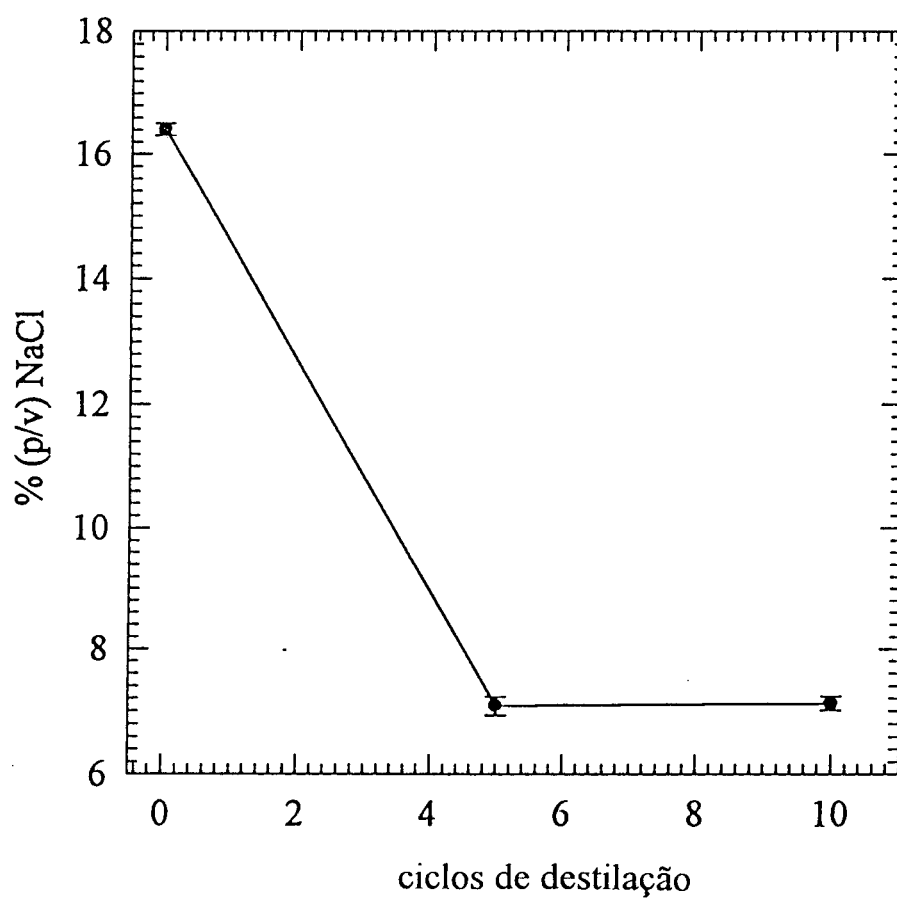


Figura 15 - Destilação a vácuo do ácido clorídrico em evaporador rotativo

4.5.2. Destilação a vácuo do ácido clorídrico, com injeção de vapor de água

A injeção de vapor, em função da condensação de água, não permite a secagem completa do hidrolisado evitando a sua queima. Os resultados mostram que num só ciclo de destilação o ácido pode ser quase totalmente eliminado sem os inconvenientes da destilação em evaporador rotativo.

A eficiência desse método foi avaliada pela determinação do teor de cloreto de sódio remanescente, após a destilação e neutralização das amostras de hidrolisado. Em todos os experimentos realizados houve uma redução progressiva na percentagem de cloreto de sódio, quando as amostras foram destiladas até 30 minutos. Após esse tempo de destilação houve, praticamente, uma estabilização e o conteúdo de cloreto de sódio foi pouco reduzido (Figuras 16 e 17).

Parece que a eliminação do ácido clorídrico é mais eficiente quando o meio líquido favorece a homogeneização do vapor na amostra, facilitando a transferência de massa e, portanto, o arraste do ácido clorídrico. A estabilização que se verifica após esse tempo de destilação, como pode ser observado nas Figuras 16 e 17, ocorre em função do aumento da concentração de sólidos solúveis do meio, como consequência da perda de água nos 30 minutos de destilação. O aumento da concentração do meio faz o vapor passar através de canais preferenciais e não de forma homogênea, o que impede uma maior interação do vapor com o ácido clorídrico, tornando mais difícil a sua eliminação.

Muitas substâncias são difíceis de serem separadas à pressão atmosférica, por causa da sua alta temperatura de vaporização. Geralmente, o que é feito para solucionar esse problema, é destilar a mistura reduzindo a pressão do meio através de vácuo e, em seguida, injetar vapor para reduzir a pressão parcial dos componentes a serem destilados. A maioria das indústrias utilizam o vapor de água pela sua disponibilidade, baixo custo e remoção fácil pela condensação (WIRTH & PARK, 1980).

Pode-se observar também nas Figuras 16 e 17 a influência da concentração de ácido clorídrico nos hidrolisados, sobre a eficiência do processo de arraste a vapor. Quando se aumentou a concentração do ácido no preparo do hidrolisado, houve também um aumento significativo na sua eliminação durante a destilação. Nos primeiros 30 minutos de destilação a percentagem de cloreto de sódio eliminado para 10, 20 e 30% de ácido foi, respectivamente, 55, 76 e 82% nos hidrolisados preparados com protenose (Tabela 26). Em

um experimento complementar realizado com refinasil, os resultados foram semelhantes e mostram uma eliminação de 58, 75 e 85% (Tabela 27). Esse resultado é compreensível se analisarmos que em uma mistura de substâncias em aquecimento, cada componente exerce uma pressão de vapor na superfície líquida proporcional a sua concentração, ou seja, quanto maior a concentração de uma substância na mistura, maior a sua proporção na forma de vapor, conseqüentemente, uma concentração mais elevada de ácido clorídrico implica em uma maior percentagem desse ácido na forma gasosa, o que promove sua eliminação em maior proporção por arraste a vapor.

Não houve alteração no desempenho do processo quando se utilizou matérias primas com diferentes concentrações de proteína na formulação dos hidrolisados (refinasil 21% e protenose 64%), uma vez que a eliminação de ácido clorídrico nos dois experimentos foi semelhante, independente dos diferentes teores de proteína das amostras destiladas (Figuras 16 e 17). Isso pode ser explicado se levarmos em consideração que os aminoácidos, peptídios e polipeptídios que constituem os hidrolisados, têm baixa volatilidade em função do seu peso molecular e de suas estruturas que permitem a formação de pontes de hidrogênio, e em consequência, são encontrados apenas na fase líquida, não sendo eliminado pelo arraste a vapor.

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de eliminar total ou parcialmente o sal formado na neutralização dos hidrolisados ácidos. Assim, SIMONS, 1982, variando a corrente elétrica aplicada na eletrodialise e a concentração de sal em hidrolisados protéicos de soja, eliminou 97% de cloreto de sódio com uma pequena perda de 8 a 13% de moléculas orgânicas e concluiu que esse método é viável para remover cloreto de sódio. Entretanto, HOULDSWORTH (1980) estudando a desmineralização de soro de leite por eletrodialise e troca iônica, demonstrou que o custo operacional da eletrodialise é consideravelmente mais elevado, especialmente em altos níveis de desmineralização, e concluiu que para desmineralização acima de 90% somente a troca iônica é praticável comercialmente.

Os resultados do presente trabalho mostram que a destilação a vácuo com injeção de vapor de água, é um processo simples que pode se constituir em uma alternativa aos métodos convencionais de dessalinização, para a produção de hidrolisados protéicos ácidos com baixos teores de cloreto de sódio.

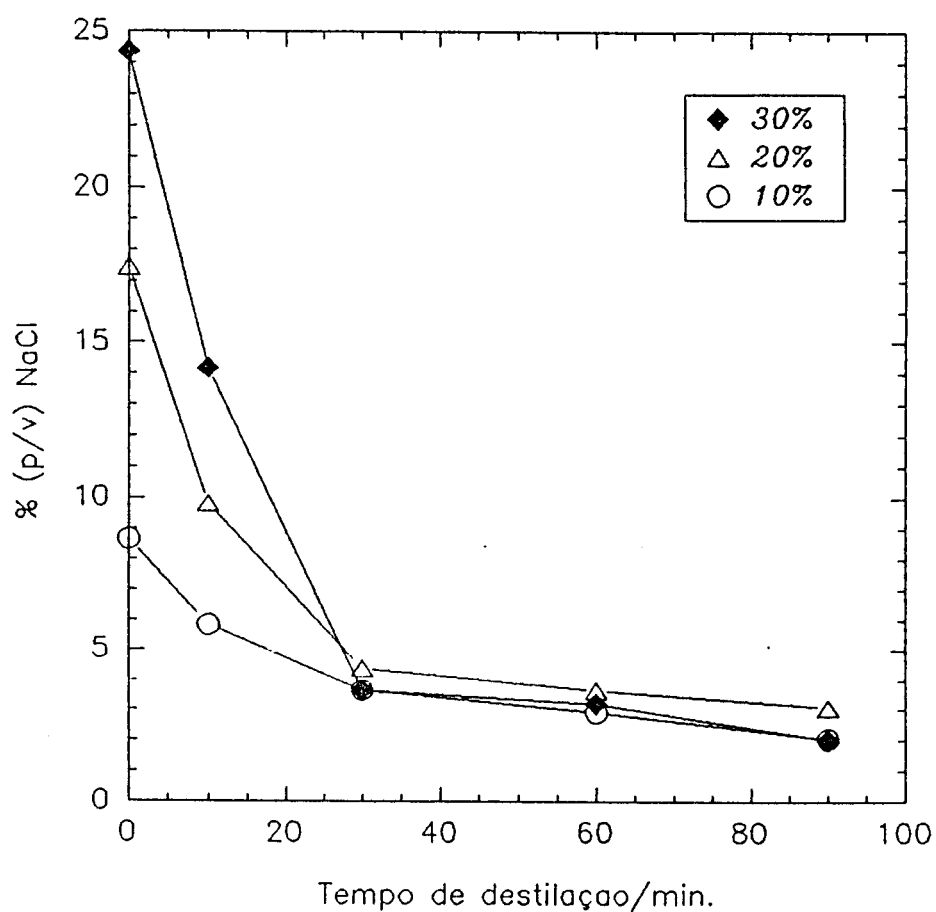


Figura 16 - Efeito do tempo de destilação e percentagem de ácido clorídrico no teor de cloreto de sódio remanescente no hidrolisado protéico de protenose

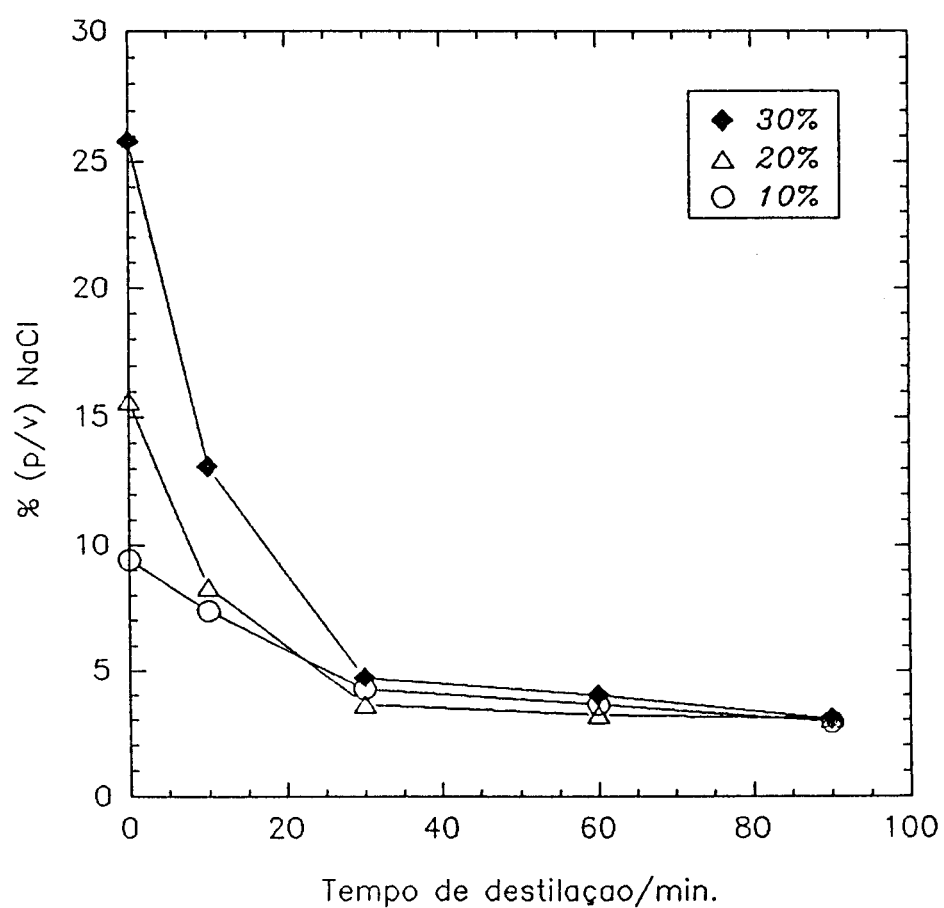


Figura 17 - Efeito do tempo de destilação e percentagem de ácido clorídrico no teor de cloreto de sódio remanescente no hidrolisado protéico de refinasil

Tabela 26 - Percentagem de cloreto de sódio eliminado na destilação de amostras de hidrolisado protéico de protenose preparado com diferentes concentrações de ácido clorídrico

Tempo de destilação (minutos)	10% de HCl		20% de HCl		30% de HCl	
	% de NaCl*	% de NaCl*	% de NaCl	% de NaCl*	% de NaCl*	% de NaCl*
	remanescente	eliminado	remanescente	eliminado	remanescente	eliminado
0	9,45	0	15,63	0	25,80	0
10	7,41	21,59	8,35	46,58	13,08	49,30
30	4,22	55,34	3,63	76,78	4,72	81,71
60	3,63	61,59	3,20	79,53	4,00	84,50
90	3,20	66,14	3,05	80,50	3,63	85,93

* % de NaCl eliminado = $100 - \frac{\% \text{ remanescente de NaCl no tempo } t}{\% \text{ de NaCl remanescente no tempo } t_0}$

Tabela 27 - Percentagem de cloreto de sódio eliminado na destilação de amostras de hidrolisado protéico de refinasil preparado com diferentes concentrações de ácido clorídrico

Tempo de destilação (minutos)	10% de HCl		20% de HCl		30% de HCl	
	% de NaCl* remanescente	% de NaCl* eliminado	% de NaCl* remanescente	% de NaCl* eliminado	% de NaCl* remanescente	% de NaCl* eliminado
0	8,64	0	17,45	0	24,35	0
10	5,82	32,64	9,81	43,78	14,17	41,81
30	3,63	58,00	4,36	75,01	3,63	85,09
60	2,91	66,32	3,63	79,20	3,20	86,86
90	2,61	69,79	3,17	81,83	2,81	88,46

$$*\% \text{ de NaCl eliminado} = 100 - \frac{\% \text{ de NaCl no tempo } t \times 100}{\% \text{ de NaCl no tempo } t_0}$$

4.5.2.1. Otimização do método de destilação a vácuo com injeção de vapor de água

Com o objetivo de melhorar a eficiência do método de destilação do ácido clorídrico com injeção de vapor de água, fez-se a padronização de alguns parâmetros como a variação da temperatura de destilação, da temperatura do vapor injetado e do vácuo a que o sistema estava submetido (item 2.2.5.2.).

A Figura 18 mostra que o aumento da temperatura de 100 para 130 e 150°C, reduz com eficiência o conteúdo de ácido clorídrico no hidrolisado, e consequentemente o teor de cloreto de sódio, nos primeiros 20 minutos de destilação e depois diminui progressivamente, até que aos 30 minutos, as percentagens de ácido eliminadas nessas temperaturas são equivalentes, sugerindo, mais uma vez, que o ácido clorídrico é mais facilmente eliminado quando o meio está diluído. Esses dados podem também ser comparados com a Figura 16, onde pode-se observar que mesmo a 88°C o ácido também é praticamente eliminado até 30 minutos de destilação.

Na Figura 19 está representada a destilação de hidrolisados preparados a partir de diferentes matérias primas. Pode-se observar um comportamento homogêneo entre os diferentes tipos de hidrolisados destilados, mostrando que não ocorre variação significativa a nível de 5% ($p < 0,05$) na eliminação do ácido quando se utiliza hidrolisados preparados com matérias primas diferentes.

A análise de variância (teste F) dos resultados apresentados nas Figuras 18 e 19 indicou que os mesmos não diferem após 20 minutos de destilação.

Quando o vapor de água destilada foi injetado com temperatura abaixo de 100°C, houve um acréscimo no volume inicial da amostra em consequência da condensação do vapor de água, não sendo possível concluir a destilação. Em contraposição, quando a temperatura foi mantida em 100°C, não houve condensação e a amostra foi concentrada até formar uma pasta que se manteve úmida durante todo processo não permitindo a queima do hidrolisado. Nesse mesmo experimento observou-se também, que o ácido eliminado nos primeiros dez minutos era bastante diluído, contudo após esse período, essa concentração era

bem mais elevada, o que torna possível a sua recuperação para ser utilizado novamente no preparo de novo hidrolisado, como foi sugerido por HAMPTON (Pat. 1 494 856, 1975).

Do mesmo modo, quando o sistema de destilação foi submetido a um vácuo acima de 45 mmHg, não foi possível completar a destilação porque o volume da amostra também aumentou, devido a condensação do vapor de água. Portanto, o vácuo utilizado no sistema foi de 26 mmHg.

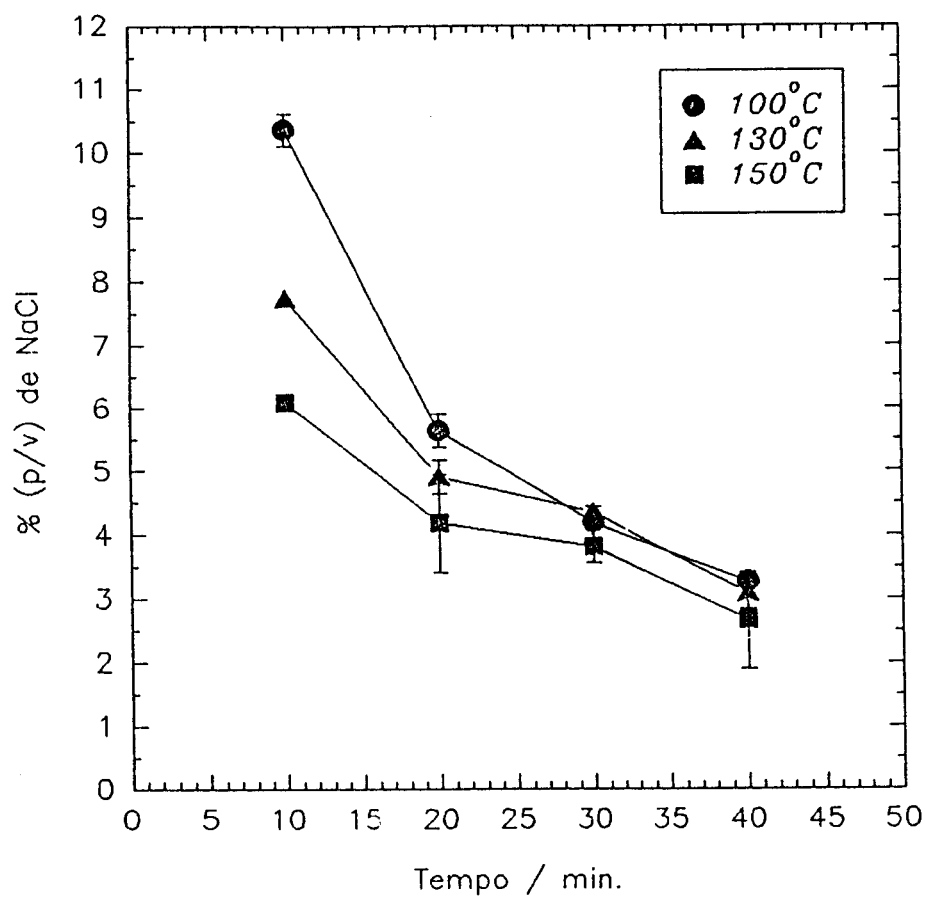


Figura 18 - Influência da temperatura na eficiência do método de destilação do ácido clorídrico com injeção de vapor seco

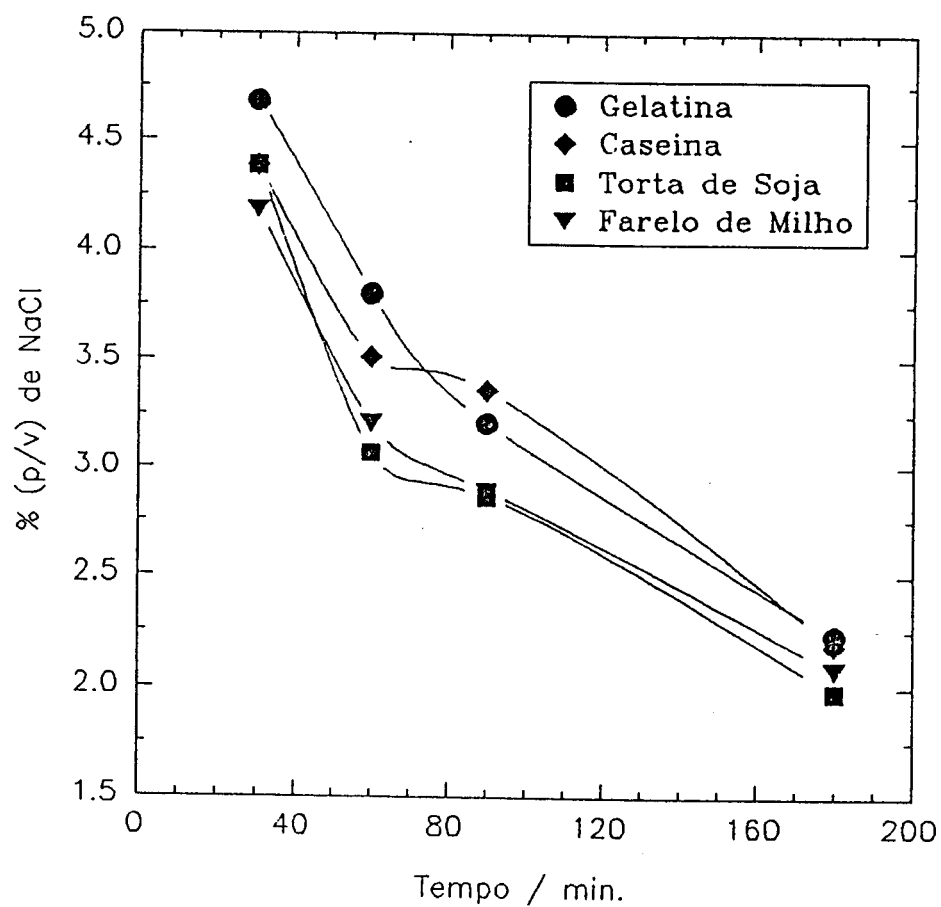


Figura 19 - Avaliação da eficiência do método de dessalinização com injeção de vapor seco utilizando hidrolisados preparados com diferentes matérias primas.

4.6. Secagem do hidrolisado de protenose

Estabelecidas as condições básicas de destilação, como sendo, vácuo de 26 mmHg e injeção de vapor de água a 100°C, preparou-se hidrolisado de protenose com baixo teor de sal em quantidade suficiente para a secagem em *spray drier* e posterior utilização na determinação da estabilidade do produto e no ensaio biológico.

A estabilidade do hidrolisado foi determinada através de isotermas de adsorção.

4.6.1. Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção do hidrolisado protéico de protenose para as temperaturas de 23 e 38°C estão representadas na Figura 20. Os resultados mostram que para a temperatura de 23 °C, as amostras não apresentam qualquer alteração em relação ao produto inicial, até umidade relativa de 33%. No entanto, com o aumento da umidade relativa de equilíbrio para 43%, o produto sofre mudanças drásticas com alterações na cor e aroma, características da reação de Maillard que, segundo YUNES *et al* (1981), além de escurecer os produtos possuem também o atributo de gerar sabores e aromas. A Figura 21 torna possível uma avaliação visual das alterações ocorridas com a mudança de umidade relativa na temperatura de 23°C.

Quando a temperatura da isoterma foi 38°C, a alteração do produto teve início em umidade relativa de 33%, indicando que com a elevação da temperatura ocorreu uma aceleração nas reações que provocam alterações físicas no produto, mesmo em baixa atividade de água, como o escurecimento não enzimático, que segundo LABUZA (1968), inicia-se com atividade de água em torno de 0,2 e aumenta progressivamente com o aumento da umidade. Além disso, SAWLIN (1963) publicou que quando a água se encontra em um nível acima do valor da monocamada (30% de umidade relativa), possui mobilidade suficiente para promover também o escurecimento enzimático e o aglomeração do produto (caking). Como no presente trabalho as alterações começaram a ocorrer em umidade relativa de 33% (Figura 22), é possível, que nessa faixa de atividade de água as alterações ocorridas possam representar o início do "caking" do produto. A antecipação da mudança de cor pelo aumento da temperatura, pode ser melhor observado comparando-se as Figuras 21 e 22.

É importante observar, ainda na Figura 20, o efeito da temperatura na umidade de equilíbrio para os diversos níveis de atividade de água. Pode-se constatar que com o aumento da temperatura, de 23 para 38 °C, ocorre uma diminuição na quantidade de água absorvida para níveis de atividade de água acima de 50%. Abaixo desse nível, o efeito da temperatura na absorção de água não pode ser observado com a mesma nitidez, certamente, devido à baixa capacidade de absorção de água do produto quando exposto a ambientes com baixa pressão de vapor. Resultados semelhantes foram publicados por SARAVACOS & STINCHFIELD (1965), PIXTON & Warburton (1973 e 1976), GÓIS (1981) e LIMA (1981).

As Figuras 23 e 24 mostram a taxa de absorção de água das amostras de hidrolisado mantidas a 23 e 38°C, respectivamente, em diferentes umidades relativas, durante 10 dias. Pode-se observar que a 38°C as amostras colocadas em ambientes com umidade relativa variando de 7 a 65%, entram em equilíbrio após o segundo dia, enquanto que em umidade de 75%, o equilíbrio só é atingido após 6 dias. Entretanto, quando a temperatura é 23°C o equilíbrio é atingido a partir do sexto dia, quando as amostras estão em umidade relativa variando de 7 a 43%; a partir do oitavo dia para umidade relativa de 58%; em umidade relativa de 75% o equilíbrio não foi atingido até o décimo dia do experimento.

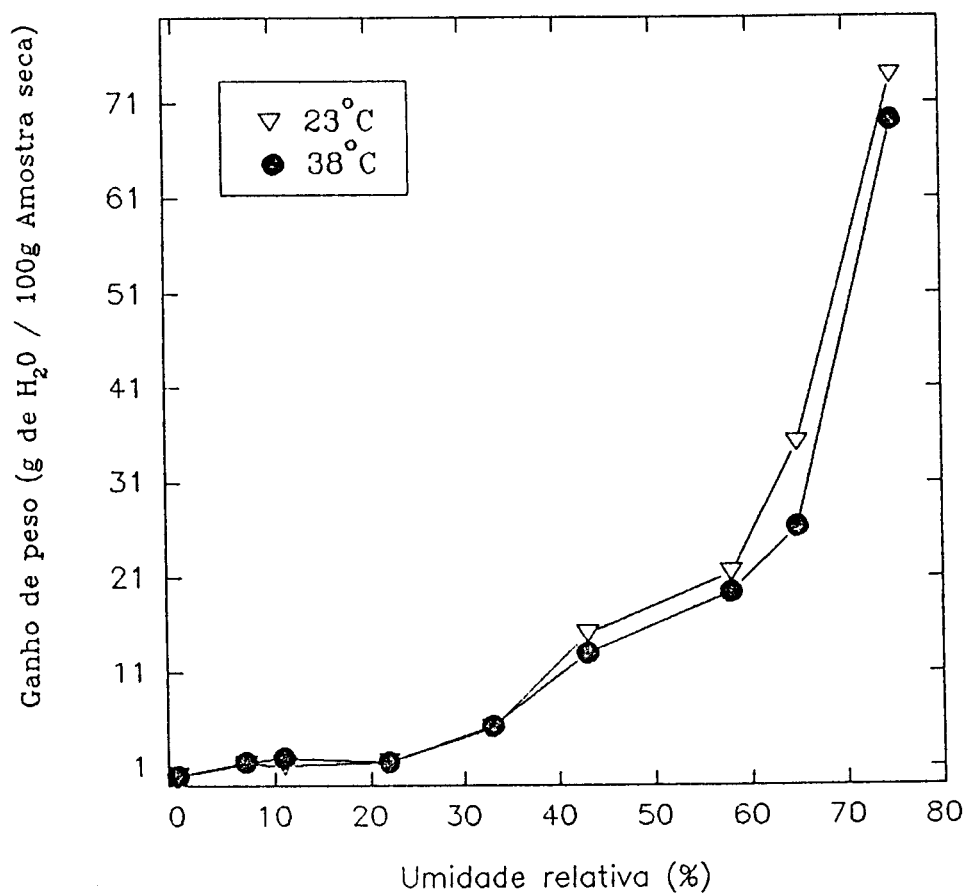


Figura 20 - Isotherma de adsorção de hidrolisado protéico de protenose seco em *spray drier*

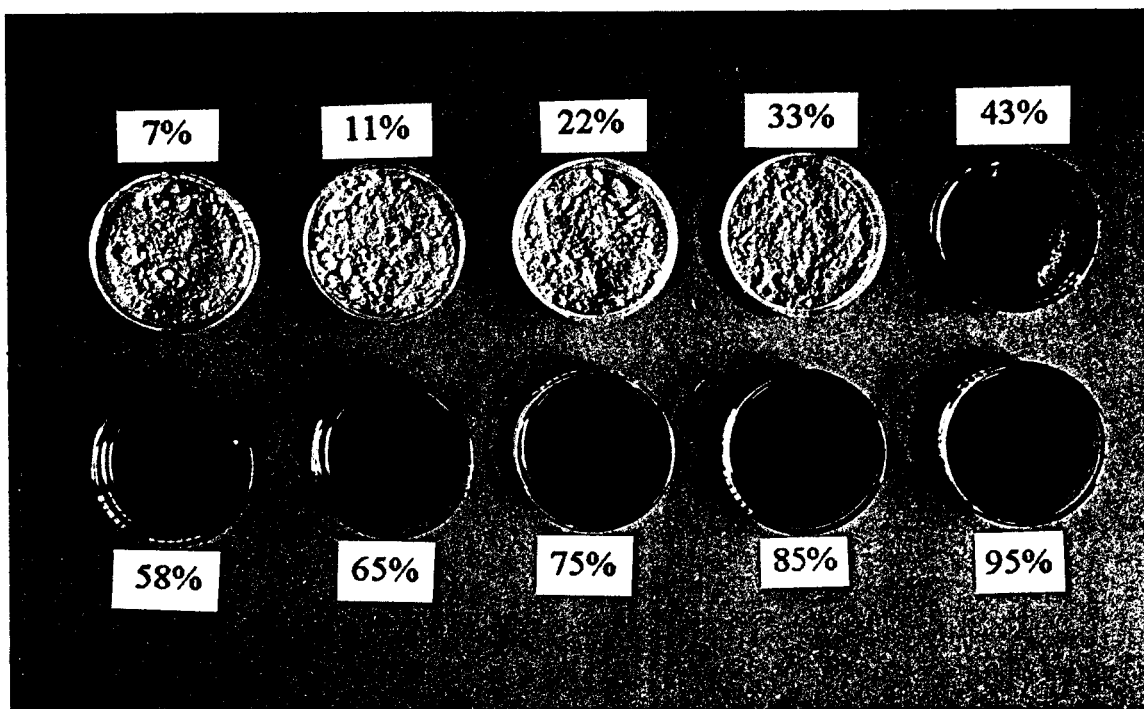


Figura 21 - Amostras de hidrolisado de protenose colocadas em dessecadores com diferentes umidades relativas a 23°C

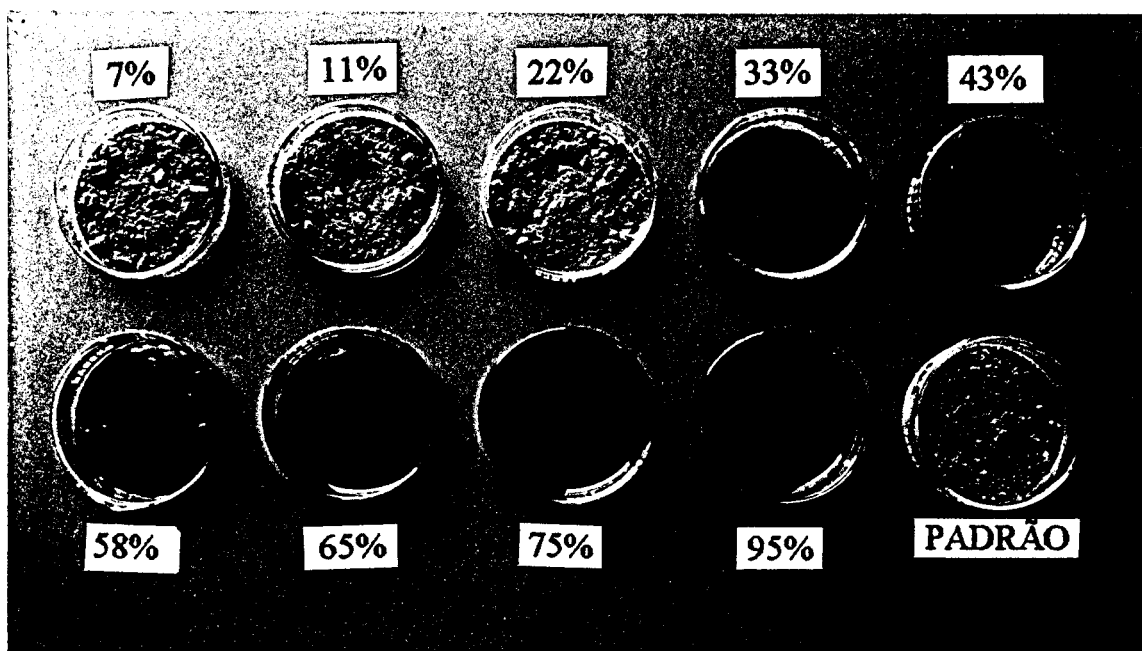


Figura 22 - Amostras de hidrolisado de protenose colocadas em dessecadores com diferentes umidades relativas a 38°C. O padrão foi mantido em saco de polietileno colocado em dessecador com sílica

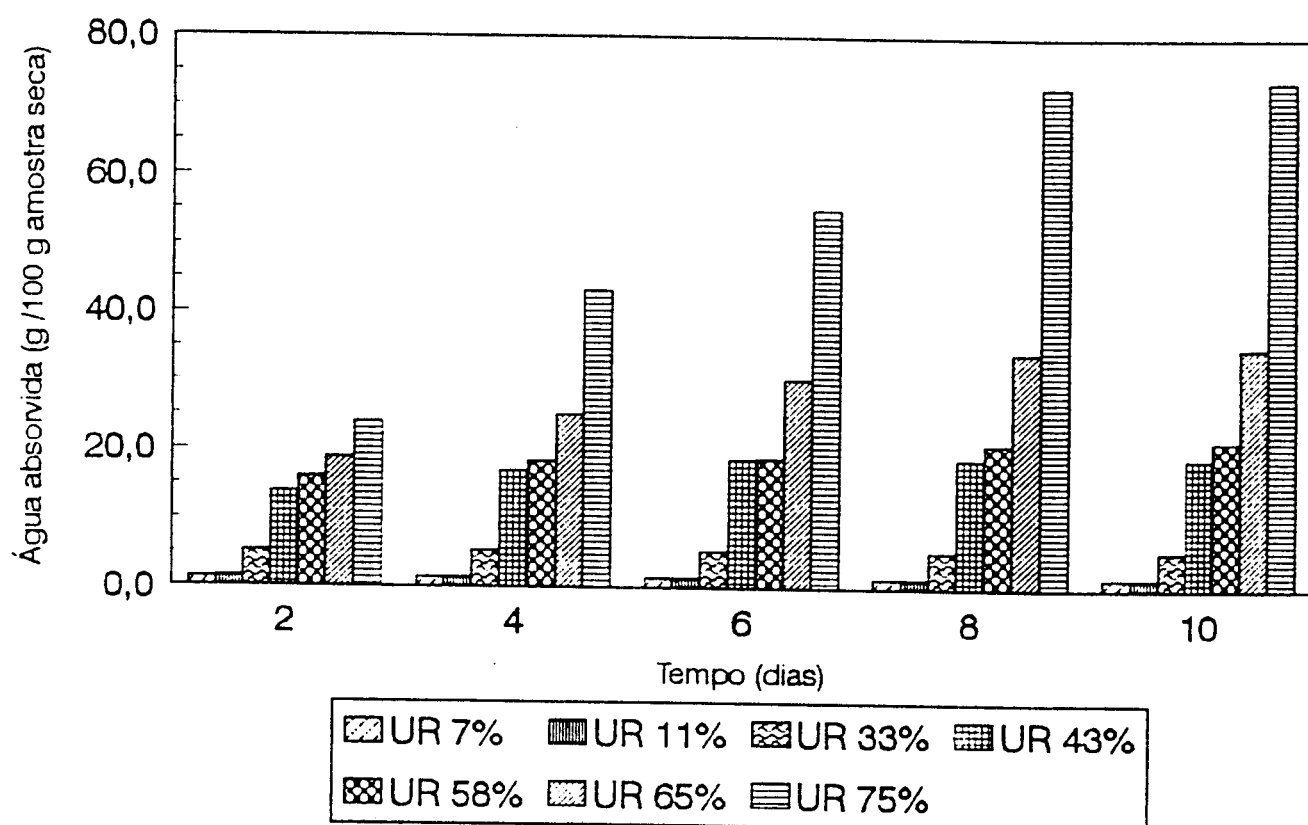


Figura 23 - Grau de absorção de água de hidrolisado protéico de protenose (seco em *spray drier*) em diferentes umidades relativas e temperatura de 23°C

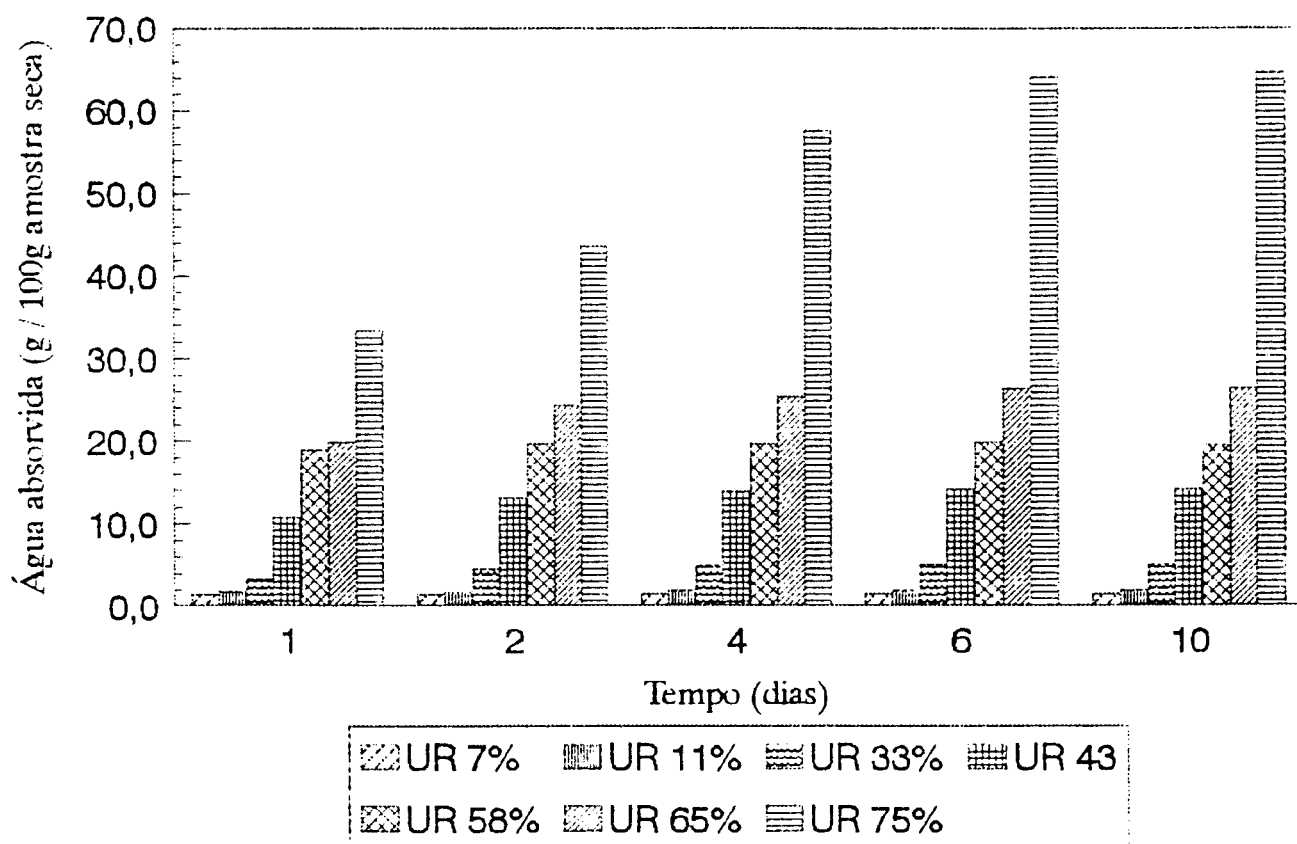


Figura 24 - Grau de absorção de água de hidrolisado protéico de protenose (seco em *spray drier*) em diferentes umidades relativas e temperatura de 38°C

Em função das primeiras alterações físicas ocorridas no hidrolisado, as condições de umidade relativa de 33% a 38°C e 43% a 23°C, foram apontadas como sendo as umidades críticas para o produto, sugerindo que nessas condições climáticas, é necessário a utilização de uma embalagem que proporcione uma barreira contra a umidade, protegendo o produto da deterioração, e com isso, prolongando a sua vida-de-prateleira.

4.6.2. Determinação da vida útil do hidrolisado

Os cálculos da vida útil teórica do hidrolisado foram feitos considerando-se a utilização de filmes plásticos com propriedades de barreira ao vapor de água, comumente encontrados no mercado nacional, como está mostrado na Tabela 5 (ARDITO, 1987; GARCIA *et al*, 1989). A Tabela 28 mostra os resultados obtidos nos cálculos da vida útil, segundo LABUZA *et al.*(1972). Pode-se observar que houve uma redução brusca na vida útil do produto, para a mesma embalagem, quando as condições ambientais foram 38°C e 90% de umidade relativa, mostrando que o hidrolisado é muito sensível às mudanças de temperatura e umidade. Ratificando essa afirmação, pode-se verificar, ainda, que mantendo-se as mesmas condições ambientais e variando-se apenas a espessura do filme de polietileno de baixa densidade (PEBD), a vida útil do produto aumenta proporcionalmente à espessura, ou seja, quando a espessura do filme foi 150 em vez de 50 μm , praticamente, o período de conservação calculado do hidrolisado triplicou e, teve melhor desempenho quando a taxa de permeabilidade utilizada no cálculo foi a do filme de polietileno de alta densidade (PEAD), indicando que quanto maior as propriedades de barreira da embalagem, maior o seu período de conservação. Entretanto, outros fatores podem influenciar a vida útil do produto, uma vez que estas estimativas são feitas em condições ambientais pré-estabelecidas (23°C/75% UR e 38°C/90% UR) não levando em consideração as reais variações de temperatura e umidade relativa dos ambientes onde, provavelmente, serão comercializados os produtos. Além disso, os cálculos apresentados na Tabela 28, considerou embalagens cujos volumes destinam-se à comercialização em varejo. Se o produto for comercializado em maiores volumes, digamos, para o mercado institucional acima de 5 Kg, o fator proteção da embalagem será menos crítico, devido a relação área/volume ter sido diminuída.

Tabela 28- Vida útil do hidrolisado protéico acondicionado em diferentes materiais de embalagem

Material de embalagem	Espessura** (μm)	Conteúdo da embalagem (g)	Vida útil do hidrolisado* (dias)	
			23°C / 75% UR	38°C / 90% UR
PEBD	50	500	227	14
PEBD	100	500	453	25
PEBD	150	500	815	41
PEAD	100	500	1315	88
PP	70	500	408	23
PET / PEBD	2 / 100	500	-	23

* - Estimada de acordo com LABUZA *et al.* (1972).

** - FONTE: ARDITO (1987); GARCIA *et al* (1989)

PEBD - Polietileno de baixa densidade

PEAD - Polietileno de alta densidade

PET - Polietileno tereftalato

PP - Polipropileno

4.7. Ensaio biológico

O ensaio biológico foi conduzido utilizando-se a caseína, a protenose e o hidrolisado de protenose seco e com baixo teor de cloreto de sódio, como fontes de proteína no preparo das dietas.

4.7.1. Avaliação da eficiência protéica (PER) do hidrolisado de protenose seco com baixo teor de sal.

Os valores médios e desvios padrão do ganho de peso, consumo de proteína e PER encontrados para as dietas com caseína, protenose e hidrolisado protéico estão mostrados na Tabela 29. O crescimento dos animais, mantidos em dieta com cada uma dessas fontes de proteína, durante os 28 dias do ensaio biológico, está representado na Figura 25. Pode-se observar que o coeficiente de eficiência protéica (PER) da caseína, foi praticamente duas vezes maior que o da protenose e, aproximadamente, três vezes o do hidrolisado de protenose.

Em função dos processos de hidrólise, destilação, neutralização e secagem, os hidrolisados resultantes apresentaram características diferentes da matéria prima, tanto no conteúdo de aminoácidos (Tabelas 22, 23 e 24) como no teor de cloreto de sódio no produto final. Portanto, era previsível que o PER do hidrolisado fosse menor que o da matéria prima. Em relação a esse aspecto, NETTO (1992) citou que embora não sendo um fator antinutricional, o alto conteúdo de sais deprime o crescimento de animais. STEINKE (1977) relatou que a adição de 5 mmol de sódio por grama de proteína, diminui o PER da caseína em 15%, enquanto que a adição dessa mesma quantidade de malato de sódio, reduz em 35%. ADLER-NISSEN (1985) publicou que a presença de 100 mg de sódio/grama de proteína em hidrolisado enzimático de soja, não causa qualquer efeito deletério no fígado, rim, ou na concentração de hemoglobina e proteína sérica dos animais. Segundo o Nutritional Research Council (1980) a ingestão de eletrólitos para adultos saudáveis, em relação à ingestão de 44 a 56 gramas diárias de proteína, é de 1100 a 3300 mg/dia de sódio; 1875 a 5625 mg/dia de potássio e 1700 a 5100 mg/dia de cloreto.

Tabela 29 - Ganho de peso, consumo de proteína e coeficiente de eficiência protéica (PER) para a caseína, protenose e hidrolisado protéico de protenose.

Parâmetros	Dietas		
	Caseína	Protenose	Hidrolisado
Peso inicial (g)*	55,80 ± 2,56	55,84 ± 2,32	55,79 ± 1,98
Ganho de peso (g / dia)*	2,82 ± 0,14	1,40 ± 0,12	0,63 ± 0,12
Consumo de Proteína (g / dia)*	1,18 ± 0,04	1,12 ± 0,03	0,90 ± 0,08
PER*	2,38 ± 0,03	1,25 ± 0,12	0,70 ± 0,09
PER corrigido**	2,5	1,30	0,74

* - Média ± desvio padrão de 6 animais

** - $PER\ corrigido = PER \times \frac{2,5}{PER\ da\ caseína}$

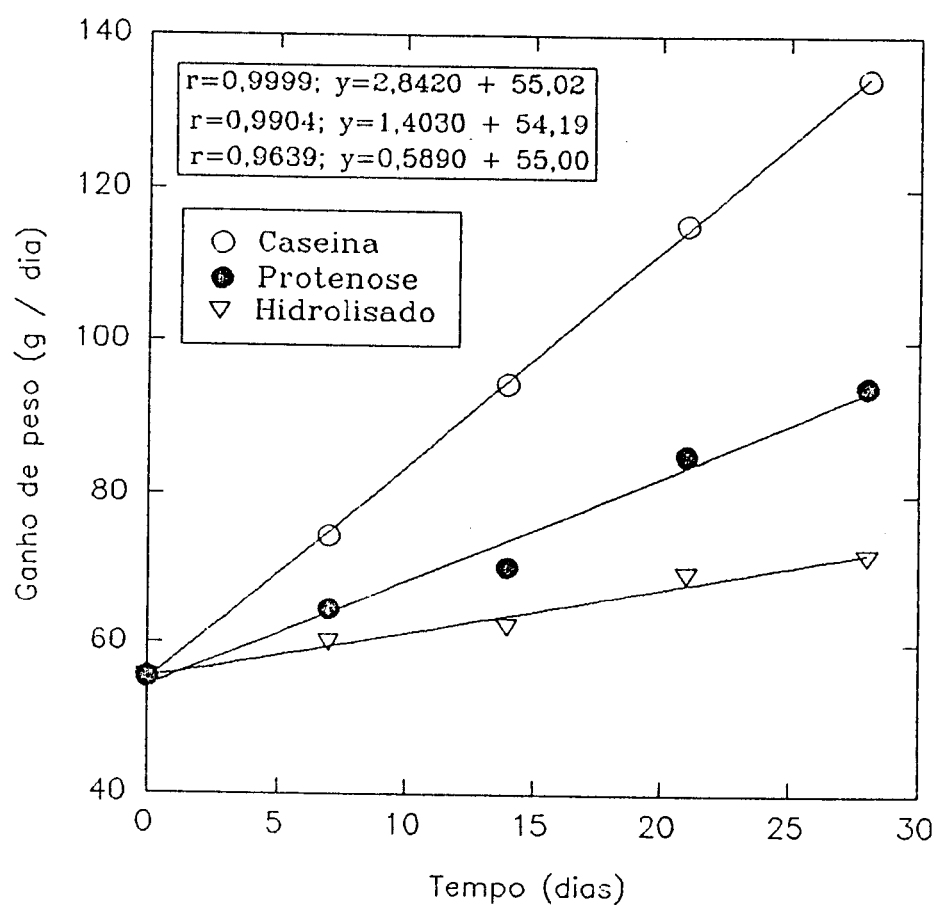


Figura 25 - Variação do peso médio de ratos wistar em relação ao tempo em dieta de caseína, protenose e hidrolisado de protenose

VI. CONCLUSÕES

A avaliação geral dos dados obtidos permite concluir que:

1. O hidrolisado protéico ácido, produzido pelo processo em escala piloto, apresenta composição básica dentro das especificações do padrão de identidade e qualidade para proteína hidrolisada da Comissão Nacional de Normas e Padrões (Resolução nº 15/78) da Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação - ABIA.
2. O método de dessalinização, baseado na eliminação do ácido utilizado na hidrólise, pela destilação a vácuo com injeção de vapor de água, se constitui uma alternativa viável para obter hidrolisado protéicos ácidos com baixos teores de cloreto de sódio.
3. A eliminação do ácido clorídrico por destilação com injeção de vapor de água reduz o teor de cloreto de sódio no hidrolisado, independente da concentração do ácido, até níveis em torno de $2,5 \pm 0,5\%$ em 90 minutos de destilação, enquanto que, a eliminação do ácido em rotavapor, mesmo após sucessivas repetições, consegue reduzir o teor de cloreto de sódio para, no máximo, $7 \pm 0,5\%$.
4. Quando utilizou-se vapor com temperatura abaixo de 100°C e vácuo acima de 45 mmHg, não foi possível completar a destilação devido o aumento do volume da amostra causado pela condensação do vapor de água. O método foi eficiente com temperatura do vapor de 100°C e vácuo de 45 mmHg e teve maior desempenho quando o vácuo foi de 26 mmHg. O efeito da injeção de vapor superaquecido deverá ser estudado e, certamente, vai tornar o processo de eliminação do ácido clorídrico mais eficiente.
5. As condições mais adequada para a estocagem do hidrolisado protéico seco em *spray drier*, é em ambiente com umidade relativa igual ou menor que 22%, para a temperatura de 38°C e 33% para a temperatura de 23°C . Em ambientes com umidade relativa mais alta, o produto atingirá sua umidade crítica, diminuindo rapidamente a sua vida útil.
6. Em regiões com condições climáticas médias de $23^{\circ}\text{C}/75\%$ U.R. e $38^{\circ}\text{C}/90\%$ U.R., a comercialização do hidrolisado seco só será possível com o uso de embalagens como

os filmes de polietileno de alta densidade (PEAD), que propiciem barreira à passagem de água para o produto.

7. A umidade crítica do hidrolisado protéico de protenose, determinadas através de isotermas de adsorção, foi 43% de umidade relativa para a temperatura de 23°C e 33% para a temperatura de 38°C, reafirmando a alta higroscopicidade e sensibilidade do produto.
8. O extrato de carne utilizado em formulações para caldo de carne de uso culinário, pode ser substituído em até 100% por hidrolisado de torta de soja ou fermento biológico, uma vez que os ingredientes foram facilmente incorporados e, na análise sensorial, a substituição foi amplamente aceita pelos provadores.

VII - TRABALHOS FUTUROS

1. Estudo da quelação de metais com hidrolisados ácidos dessalinizados com o objetivo de melhorar a absorção dos metais.
2. Uso de vapor super aquecido para melhorar a eficiência da eliminação do ácido clorídrico por destilação a vácuo com injeção de vapor de água.
3. Estudo da obtenção de aromas, originados pela reação entre aminoácidos, obtidos por hidrólise ácida de diferentes fontes protéicas, e açúcares redutores segundo a reação de Maillard.
4. Estudo da hidrólise ácida utilizando o ácido clorídrico em combinação com outros ácidos, como o fosfórico e o acético, principalmente no início da hidrólise, para reduzir o teor de huminas e a destruição aminoácidos.
5. Influência do uso de encapsulantes, como goma arábica, amido de mandioca e outros, na vida-de-prateleira de hidrolisados ácidos dessalinizados e desidratados.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIA (Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação). **Compêndio de legislação de alimentos**. 5ª rev. São Paulo, 1989. v. 1A. (Resolução 15/78).
2. ACKER, L.W. Water activity and enzyme activity. **Food Technology** 23(10):1257-70, 1969.
3. ADLER-NISSEN, J. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 27(6):1256-61, 1979.
4. ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food proteins. London and New York, Applied Science Publishers Ltda. 1985, 427 p.
5. ALLISON, H.L. high-barrier packaging - what are the options? **Packaging** 30(3):25-29, 1985.
6. AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (AIN). Adhoc Committee on Standard for Nutritional Study. **Journal of Nutrition** 107:1340-48, 1977.
7. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard practice for maintaining constant relative humidity by means of aqueous solutions. In: ASTM. Annual Book of ASTM Standards: plastics. Philadelphia, 1989. v. 8, part 3, p. 695-97. (ASTM designation: E 104-85)
8. ARDITO, E.F.G. Projeto de embalagem para produtos alimentícios desidratados. In: I Seminário sobre atividade de água em alimentos. ITAL. Campinas. 1987.
9. ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official method of analysis of the Association Official Analytical Chemistry 12th ed. Washington, 1975, 875 p.

10. ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official method of analysis of the Association Official Analytical Chemistry 13th ed. Washington, 1980. 1018 p.
11. AUDU, T.O.K.; LONCIN, M.; WEISSER, H. Sorption isotherms of sugars. **Lebensmittel -wissenschaft und Technologie** 11(1):31-4, 1978.
12. AYREST, G. Determination of the water activity of some hygroscopic food materials by a dew-point method. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 16(2):71-8, 1965.
13. AYHUM, M. E.U.A. Pat. 2,416,956. **Separation of triptophan from mixed amino acids.** 1947.
14. BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S.; BARONE, J.S. Química analítica quantitativa elementar. Ed. Edgard Blucher Ltda. 1979, 245 p.
15. BANFIELD, D.L. Reverse osmosis costs. **Chemistry and industry** 11:348-51, 1970.
16. BARNETT, H.M. E.U.A. Pat. 1,990,769. **Amino Acids.** Feb. 12, 1935.
17. BENDER, A.E.; WOOD, T.; PALGRAVE, J.A. Analysis tissue constituents. Extract of fresch ox-muscle. **Journal of Food and Agriculture** 9(12):812-17, 1958.
18. BENDER, A.E. & DOELL, B.H. Procedure for the estimation of relative net protein ration in rats. **Britanic Journal of Nutrition** 11:140-48, 1957
19. BENDER, A.E. & MILLER, D.S. A new brief method of estimating net protein value. **The Biochemical Journal** 53(718):4-5, 1953.
20. BERLIN, E.; ANDERSON, B.A.; PALLANSCH, M.J. Effect of temperature on water vapor sorption by dried milk powders. **Journal of Dairy Science** 53(2):146-9, 1970.

21. BIRD, J.E. & MINOR, J.L. Low temperature hydrolysis of comercial proteins. **Food Industries** 20:216-18, 1948
22. BONE, D. Water activity in intermediate moisture foods. **Food Technology** 27(4):71-76, 1973.
23. BUCK, J.S. & LESUK, A. E.U.A. Pat. 2,685,601. **Method of hydrolysing proteins to amino acids**. Aug. 3, 1954.
24. CANFIELD, R.E. The amino acid sequence of egg white lysozyme. **Journal of Biological Chemistry** 238(3):2698-2707, 1963 a.
25. CANFIELD, R.E. The amino acid sequence of egg white lysozyme. **Journal of Biological Chemistry** 238(3):2698-2707, 1963 b.
26. COMITÉ MISTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS. Evaluacion de los aditivos alimentarios, 14º informe. Ginebra, 1971.
27. CRISTENSEN, L.R. The action of proteolytic enzyme on casein proteins. **Arach. Biochem. and Biophys.** 53:128-37, 1954.
28. DANEHY, J.P. & PIGMAN, W.W. Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. **Advanced in Food Research** 3:241-90, 1951.
29. DAVIES, M.G. & THOMAS, A.J. An investigation of hydrolytic techniques for the amino acid analysis of foodstuffs. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 24(12):1525-40, 1973.
30. DUNCAN, D. B. Multiple range and multiple F tests. **Biometrics** 11(1/4):1-42, 1955.
31. DZANIC, H.; MUJIC, I.; SUDARSKI-HACK, V. Protein hydrolysates from soy grits and dehydrated alfafa flour **Jounal of Agricultural and Food Chemistry** 33(4):683-85, 1985.

32. ERIKSEN, S. & FAGERSON, I.S. Flavors of amino acids and peptides **Flavors Jan./Feb.:13**
33. EVANS, E.W. & GLOVER, F.A. Basic principles of reverse osmosis and ultrafiltration. One symposium. Subject: membrane technology. **Journal of the Society of Dairy Technology**. 27(3):111-20, 1974.
34. FOUST, A.S.; WENSEL, L.A.; CLUMP, C.W.; MAUS, L.; ANDERSEN, B. Princípio das operações unitárias. Segunda Edição, Guanabara Dois, Rio de Janeiro-RJ, 1982.
35. FUGIMAKI, M.; KATO, H.L.; TAMAKI, E. Applying proteolytic enzymes on soybean protein and its effect on the flavor. **Food Technology** 22:889-93, 1968.
36. GARCIA, E.E.C.; PADULA, M.; SARANTOPOULOS, C.I. Embalagens plásticas: propriedades de barreira. ITAL. Campinas, 1989. 44P.
37. GÓIS, V.A. **Comportamento hygroscópico do mamão liofilizado com vistas ao estabelecimento do seu potencial de "kaking"**. Lavras, 1981. Tese (mestrado). ESAL. 114p.
38. GRIFFIT LABORATORIES LIMITED, Canadá Pat. 1,071,248, **Production of flavourful protein hydrolysate**. Dec. 20, 1965.
39. GUNDLACH, H. G.; STEIN, W.H.; MOORE, S. The nature of the amino acid residues involved in the inactivation of ribonuclease by iodoacetate. **Journal Biological Chemistry** 234:1754-60, 1959.
40. HALL, L.A. Pressure hydrolysis of proteins. **Food Technology** 3:51-6, 1949.
41. HAMPTON, M.G. INGLATERRA. Pat. 1 494 856. A.F.P. Consultants limited **Process for and product fo protein hydrolysis**. Aug. 06, 1975.
42. HEGSTED, M.D.; MILLS, R.C.; ELVEHJEM, C.A.; HART, E.B. Choline in the nutrition of chicks. **Journal Biological Chemistry** 138:459-466, 1941.

43. HERZ, W.J. & SHALLENBERGER, R.S. Some aromas produced by simple aminoacid, sugar reactions. **Food Research** 25(4):491-94, 1960.
44. HODGE, J.E. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 1(15):928-43, 1953.
45. HOULDSWORTH, D.W. Demineralization of whey by means of ion exchange and eletrodialysis. **Journal of the Society of Dairy Technology** 338(2):45-51, 1980.
46. IGLESIAS, H.A. & CHIRIFE, J. Isosteric heat of water vapor sorption on dehydrated foods. Part I. Analysis of the differential heat curves. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie** 9:116-22, 1976.
47. INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Shelf life of foods. **Food Technology**. 28(8):44-47,1974.
48. JASWAL, A.S. Amino acid hydrolysate from crab processing waste. **Journal of Food Science** 55(2):379-80, 1990.
49. KAREL, M. Water activity and food preservation in principles of food science. In: FENEMA, O.R.; **Physical Principles of Food Preservetion**. Marcel Dekker Inc., New York, p. 237-263, 1975.
50. KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients. **Process Biochemistry** 20(5):147-157, 1985.
51. KONRAD, G. & LIESKE, B. Preparation and use of protein hydrolysates. **Lebensmittel Industrie** 26(10):445-49, 1979.
52. KOYAMA, M. E.U.A. Pat. 3,937,844. **Process for producing processed low salt soybean paste**. Dec. 20, 1974.
53. LABUZA T.P.; TANNENBAUM, S.R.; KAREL, M. Water content and stability of low-moisture and intermediate moisture foods. **Food Technology** 24:35-41, 1970.

54. LABUZA, T.P.; McNALLI, L.; GALLAGHER, D.; HAWKES, J.; HURTADO, F. Stability of intermediate moisture foods. I. Lipid oxidation. **Journal of Food Science** 37:154-59, 1972.
55. LABUZA, T.P. Moisture sorption: practical aspects of isotherm measurement and use. St. Paul, American Association of Cereal Chemists. 1984, 150p.
56. LABUZA, T.P. Nutrient losses during drying and storage of dehydrated foods. **CRC Critical Reviews in Food Technology** 3(3):217-240, 1972.
57. LABUZA, T.P. Sorption phenomena in foods. **Food Technology** 22(3):263-73, 1968.
58. LACEY, R.E. Membrane separation process. **Chemical Engineering** Sept. (4):56-74, 1972.
59. LAWRENCE, L.; MOORE, W.J. Kinetics of the simple glycine peptides. **Journal of the American Chemical Society** 73(3):3973-77, 1951.
60. LEE, E.C.H. EUROPA. Pat. 0183 004 A1. S.P. Nestle S.A. **Methods of controlling the viscosity of protein hydrolysates**. Sept. 26, 1985.
62. LIMA, A.W.O. **Predição de vida-de-prateleira de banana liofilizada com base na análise da cinética de transferência do vapor de água em filmes flexíveis**. LAVRAS. ESAL. 1981. Tese de mestrado 143p.
63. LITNER, C.J. Color and aroma. Formation in dry malt. **Z. Ces. Brauw.** 35:545, 1912.
64. MADI, L.F.C.; QUAST, D.; SOLER, R.M.; GAZETA, E.F.; ORTIZ, S.A.; ALVIM, O.D.; CABRAL, A.C.D.; FERNANDES, M.H.C. Cálculo de vida-de-prateleira de produtos desidratados, com base na permeabilidade de filmes ao vapor de água. In: Manual de projetos de embalagens para alimentos, com base na permeabilidade a gases e ao vapor de água. ITAL, SBCTA, Campinas, 1979

65. MADI, L.F.C.; SOLER, R.M.; GAZETA E.F.; ORTIZ, S.A.; ALVIM, D.D.; CABRAL, A.C.D.; FARAH, J.L. Técnicas de laboratório de embalagens para alimentos - Embalagens flexíveis. ITAL, Campinas, Junho, 1980.
66. MAHOWALD, T.A.; NOLTMANN, E.A.; KUBY, S.A. Studies on adenosine triphosphate transphosphorylases. I. Amino acid composition of adenosine triphosphate-adenosine 5'-phosphate transphosphorylase (myokinase). **Journal of Biological Chemistry** 237(1):1138-45, 1962.
67. MAKINDE, M.A. Nutritional implications of packaging systems. **Food Product Development** 7:86-94, 1976.
68. MAKOWER, B. & DEHORITY, G.L. Equilibrium moisture content of dehydrated vegetables. **Industrial and Engineering Chemistry**, 35:193-7, 1943.
69. MANLEY, C.H. & FAGERSON, I.S. Major volatile neutral and acid compounds of hydrolyzed soy protein. **Journal of Food Science** 35:286-91, 1970.
70. MAY, C.G. An introduction to synthetic meat flavours. **Food Trade Review** 44(1):7-14, 1974.
71. MINOR, L.J. Soya sauce processes and how they can be improved. **Food Industries July**:758-60, 1945.
72. MURRAY, J.C.F. Producción y utilización de las proteínas vegetales hidrolizadas. **Afinidade Nov.**:661-65, 1977.
73. NETTO, M.F. **Produção e caracterização de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja para alimentação clínica**. Campinas, 1992. Tese (doutorado). FEA/UNICAMP. 156P.
74. NOLTMANN, E.A.; MAHOWALD, T.A.; KUBY, S.A. Studies on adenosine triphosphate transphosphorylases. II. Amino acid composition of adenosine triphosphate-creatine transphosphorylase. **Journal of Biological Chemistry** 237(1):1146-54, 1962.

75. NUTRITIONAL BIOCHEMICAL CORPORATION. Diet catalogue of INC, Cleveland Ohio, 1977, 24p.
76. NUTRITIONAL RESEARCH COUNCIL, COMMITTEE ON DIETARY ALLOWANCES. Recommend-Dietary-Allowances. 9th revised ed. National Academy of Sciences, Washington, DC., pg. 39-54, 1980.
77. OLCOTT, H.S.; FRANKEL-KONRAT, H. Formation and loss of cysteine during acid hydrolysis of proteins. Role of tryptophan. **Journal of Biological Chemistry** 171:583-594, 1947.
78. OSNER, R.C. & JOHNSON, R.M. Nutritional changes in protein during heat processing. **Journal of Food Technology** 3:81-86, 1986.
79. PARRY, J.L. Mathematical modelling and computer simulation of heat and mass transfer in agricultural grain drying: a review. **Journal of Agricu. Engng. Res.** 32:1-29, 1985.
80. PASSY, N. & MANNHEIM, C. Vida-de-prateleira para alimentos. In: I Congresso Brasileiro de embalagem, São Paulo, março, 1977.
81. PELLET, P.L. & YOUNG, V.R. Evaluación nutricional de alimentos proteínicos. Toquio, La Universidad de las Naciones Unidas, 1980, 175p.
82. PFISTER, B. E.U.A. Pat. 3,929,890. U.L.V., **Process for preparation of a hydolysate of protein for use as a foodstuff.** Jan. 24, 1973.
83. PHAN, C.B. & ROSARIO, R.R. The preparation of protein hydrolysate from defatted coconut and soybean meals. I. Effect of precess variables on the amino nitrogen released an flavour development. **Journal of Food Technology** 18(1);21-34, 1983.
84. PIXTON S.W. & WARBURTON, S. The relationship between moisture content and relative humidity of dried figs. **Journal of Stored Products Research** 12(2):87-92, 1976.

85. PIXTON, S.W. & WARBURTON, S. Determination of moisture content and equilibrium relative humidity of dried fruit-sultanas. **Journal of Stored Products Research** 8:263-70, 1973
86. PODALL, H.E. Recent advances in reverse osmosis membranes for dessalinization. **Chemical Engineering Progress** 67(107):260-66, 1971.
87. PRENDERGAST, K. Protein hydrolysate-a review. **Food Trade Review** Jan.:16-21, 1974.
88. RASEKH, J.G.; STILLINGS, B.R.; DUBROW, D.L. Moisture asorption of fish protein concentrate at various relative humidities and temperatures. **Journal of Food Science**, 36(4):705-7, 1971.
89. REES, M.W. The estimation of treonine and serine in proteins. **Biochemical Journal** 40:632-40, 1946.
90. REID, C.E. & SPENCER, N.G. Ultrafiltration of salt solution by ion-excluding and ion seletive membrane. **Journal of Applied Polymer Science and Symposium** 4:354-61, 1960.
91. ROLAND, J.F.; MATTIS, D.L.; KIANG, S.; ALM, W.L. Hidrophobic chromatography: debittering protein hydrolysates. **Journal of Food Science** 43(5):1491-3, 1978.
92. ROMERO, J.T. **Secagem de proteínas texturizadas de soja em leite estático e deslizantes**. Campinas, 1988. Tese (mestrado). FEA/UNICAMP. 144p.
93. SADIR, R.J. **Secagem por atomização de um meio de cultura para fermentação de hidrocarbonetos**. Campinas, 1972. Tese (mestrado). FEA/UNICAMP. 55p.
94. SARAVACOS, G.D. & STINCHFIELD, R.M. Effect of temperature and pressure on the sorption of water vapor by freeze dried food materials. **Journal of Food Science** 30(5):779-86, 1965.

95. SAWLIN, H. Defining minimum moisture contents for dehydrated foods. **Food Technology** 13(10):594-5, 1959.
96. SAWLIN, H. Moisture levels required for stability in dehydrated foods. **Food Technology** 17(9):1114-21, 1963.
97. SIMONS, R.G. Separation of salt from soya bean hydrolysate by electrodialysis. **Food Technology Australia** 34(6):294-95, 1982.
98. SINGE, L.M. Analysis of a partial hydrolysate of garamicidin by partition chromatography with starch. **Biochemical Journal** 38:285-94, 1944.
99. SINGE, L.M. The kinetics of low temperature acid hydrolysis of garamicidin and of some related dipeptides. **Biochemical Journal** 39:351-55, 1945.
100. SMITH, D.S.; MANHEIM, C.H.; GILBERT, S.G. Water sorption isotherm of sucrose and glucose by inverse gas chromatography. **Journal of Food Science** 46(4):1051-3, 1981.
101. SOBRAL, P.J.A. **Secagem de sangue bovino incorporado a proteína texturizada de soja, em leite fluidizado e em leite fixo.** Campinas. Tese (mestrado). FEA/UNICAMP. 171p.
102. SOURIRAJAN, S. The science of reverse osmosis-mechanisms, membranes, transport and applications. **Pure and Applied Chemistry** 50(7):593-615, 1978.
103. STEINKE, F.H. Protein efficiency ratio. Pitfalls and causes of variability: A review. **Cereal Chemistry** 54:949-57, 1977.
104. TAOUKIS, D.S.; BREENE, W.M.; LABUZA, T.P. Intermediate moisture foods. **Advances in Cereal Science and Technology** 9:91-128, 1988.
105. TRACHUK, R. & IRVINE, G.N. Amino acid compositions of cereals and oilseeds meals. **Cereal Chemistry** 46(2):206-18, 1969.

106. TRAGARD, G. Membrane application in food industry. **Polymer Journal** 23(5):521-29, 1991.
107. TREYBAL, R.E. Mass-transfer operations, third edition, McGraw-Hill International Book Company, Tokio, Japan, 1981.
108. VAN ARSDEL, W.B.; COPLEY, M.J.; MORGAN, A.J. Food dehydration, Second edition, v.1, **The Avi Publishing Company, Inc.**, Westport, USA, 1973a.
109. VAN ARSDEL, W.B.; COPLEY, M.J.; MORGAN, A.J. Food dehydration, Second Edition, V.2, **The Avi Publishing Company, Inc.**, Westport, USA, 1973b.
110. VAN DENDER, A.G.; BALDINI, V.L.S.; MELO, E.M. Efeito da desidratação sobre as qualidades dos alimentos. **Bol. ITAL**, 23(2):147-168, 1986.
111. VAN SLIKE, D.D. A method for quantitative determination of aliphatic amino groups. Applications to the study of proteolysis and proteolytic products. **Journal of Biological Chemistry** 9:185:204, 1911.
112. VEB BERLIN-CHEMIE ALEMANHA Pat. 1 595 499, **Protein hydrolysates**. Dec. 20, 1976.
113. VICKERY, H.B. The rate of hydrolysis of wheat gliadin. **Journal of Biological Chemistry** 53:495-511, 1922.
114. VILLA, A.C.; VECCHIOLINO, A.P.G.; MANGIA, A. INGLATERRA. Pat. GB 2 103 221. **Process for reducing glutamic and aspartic acid in protein hydrolysates**. Jun. 10, 1982.
115. WALTERS, E.H. Studies in the action of trypsin. I. On the hydrolysis of casein by trypsin. **Journal of Biological Chemistry** 11:267-305, 1912.
116. WALTERS, E.H. Studies in the action of trypsin. II.(a) on the influence of the products of hydrolysis upon the rate of hydrolysis of casein by triypsin; (b) the

- autolydrolisis of the caseinates. **Journal of Biological Chemistry** 12:43-54, 1912.
117. WEICHSELBAUM, T.E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. **Am. J. Clin. Pathol.** :16-49, 1946
118. WEST, S.I. Food Proteins: sources and properties. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 34b:176-81, 1984.
119. WIRTH, H.G. & PARK, K.J. **Princípios de destilação aplicados a economia de combustível**. Campinas. Ed. Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia, 1980. 113p.
120. WOLF, M.; WALKER, J.E.; KAPSALIS, J.C. Water vapor sorption hysteresis in the dehydrated food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 20(5):1073-77, 1972.
121. XAVIER, R.L.; ARDITO, E.F.G.; MORAIS, C. Isotermas de adsorção de umidade de blocos salgados, prensados e secos de pescado. **Coletânea-ITAL** 16:81-92, 1986.
122. YOUNG, P. An introduction to eletrolysis. **Journal of the Society of Dairy Technology** 27(3):141-50, 1974.
123. YUNES, R.A.; BURGIO, J.A.L.; KACZAN, L.E.; SANTA CRUZ, O.R. Obtenção de saboromas por hidrólise ácida de farinhas ricas em proteínas. **Boletim SBCTA** 15(3):241-51, 1981.

ANEXO 1 - ANÁLISE SENSORIAL

NOME: _____ DATA: ____/____/____

Por favor, prove as amostras e indique para cada uma dessas o quanto você gostou.

Nº Amostra: _____			
Gostei Multíssimo	Gostei Multíssimo	Gostei Multíssimo	Gostei Multíssimo
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
Desgostei Multíssimo	Desgostei Multíssimo	Desgostei Multíssimo	Desgostei Multíssimo

Responda em relação a amostra que você menos gostou: por que não gostou?

Menor amargor _____	Melhor sabor _____
Melhor odor _____	Melhor teor de sal _____
Outras _____	

Responda em relação a amostra que você menos gostou: por que não gostou?

Menor amargor _____	Pior sabor _____
Pior odor _____	Pior teor de sal _____
Outras _____	