



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS PROVENIENTES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FARELO DE SOJA
COM CICLODEXTRINAS – AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO AMARGOR**

ANDRÉ ÁLVARES MONGE NETO

**Maringá
2013**

ANDRÉ ÁLVARES MONGE NETO

**INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS PROVENIENTES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FARELO DE SOJA
COM CICLODEXTRINAS – AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO AMARGOR**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciência de Alimentos.

**Maringá
2013**

ANDRÉ ÁLVARES MONGE NETO

INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS PROVENIENTES DA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE FARELO DE SOJA COM CICLODEXTRINAS –
AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO AMARGOR

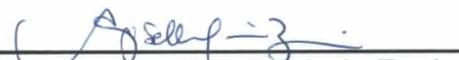
Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.



Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes



Profa. Dra. Rita de Cássia Bergamasco



Profa. Dra. Gisella Maria Zanin
(Orientadora)

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)**

M743i Monge Neto, André Álvares
Interação de peptídeos provenientes da hidrólise enzimática de farelo de soja com ciclodextrinas - avaliação da redução do amargor / André Álvares Monge Neto. -- Maringá, 2013.
[35], 13 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2013.

1. Hidrolisado proteico. 2. Farelo de soja - Solubilizar proteína. 3. Hidrólise enzimática de proteínas - Farelo de soja. 4. Ciclodextrinas. 5. Língua eletrônica - Redução do amargor - Peptídeos. I. Zanim, Gisella Maria, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD 21.ed. 660.634

AMMA-002974

Orientadora
Dra. Gisella Maria Zanin

BIOGRAFIA

André Álvares Monge Neto nasceu em Ubirajara (SP). Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Maringá. Atua como Técnico de Ensino no curso Técnico em Biotecnologia do SENAI Maringá e tem experiência na área de tecnologia enzimática, análise sensorial e controle de qualidade.

"Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam no poder realizador que reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível se torna realidade".

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

À Professora Dra. Gisella Maria Zanin pela confiança, respeito e orientação.

A todos os professores que colaboraram com este trabalho na viabilização de análises, em ideias, em ensinamentos, em parcerias.

À Raquel Ströher, mais que uma fiel parceira para a realização dos experimentos, uma amiga.

Aos Engenheiros do Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Engenharia Química, Lauro e Luiza, pela disposição e orientação nas práticas realizadas.

Às secretárias dos programas de pós graduação em Ciência de Alimentos e Engenharia Química, Lúcia Harumi Ueda Cawahisa e Marilza Neri, respectivamente, por suas atitudes, sempre, muito solícitas.

À EMBRAPA Instrumentação, principalmente ao Dr. Daniel S. Corrêa, pelas análises realizadas na Língua Eletrônica.

À minha família, pelo suporte e incentivo.

Ao apoio de pessoas importantes: Robson, Carol, Rodrigo, Natália, Karine, Camila, Juliana, Renata, Luciana, Ana Elisa, Aline...

A todos os meus amigos.

À CAPES.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de um artigo científico:

AUTORES: André Álvares Monge Neto, Raquel Ströher, Vanessa Priscila Scagion, Heloisa Brigante Rodrigues Assenha, Daniel Souza Corrêa, Flávio Faria de Moraes, Gisella Maria Zanin.

TÍTULO: INTERACTION OF PEPTIDES FROM THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SOYBEAN MEAL WITH CYCLODEXTRINS – AN EVALUATION OF BITTERNESS REDUCTION.

REVISTA: Food Research International.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO. A hidrólise enzimática confere às proteínas do farelo de soja melhora em características funcionais e nutricionais. No entanto, peptídeos hidrofóbicos são expostos conferindo amargor acentuado ao hidrolisado. As ciclodextrinas, devido à sua estrutura, apresentam diversas aplicações em alimentos, dentre elas a redução de gostos desagradáveis.

OBJETIVO. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação dos peptídeos presentes no hidrolisado enzimático de farelo de soja com α -, β - e γ -ciclodextrinas a fim de reduzir o amargor.

MATERIAL E MÉTODOS. Cada uma das ciclodextrinas foi adicionada nas frações mássicas de 1,5%, 2,0% e 2,5% em um hidrolisado de farelo de soja preparado com a enzima Alcalase 2,4L® na concentração de 1% (proteína enzimática/proteína presente no farelo de soja). Os tratamentos e cada os componentes puros (hidrolisado proteico e α -, β - e γ -ciclodextrinas) foram avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Diferencial (DTG), Ressonância Magnética Nuclear (RMN H^1), Difração de Raio-X (DRX) e Língua Eletrônica. A análise sensorial foi realizada com 50 provadores não treinados mediante um teste de ordenação do atributo amargor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO. Todas as análises instrumentais apresentaram diferenças entre as amostras puras e os tratamentos α -, β - e γ -ciclodextrinas. Espectros de RMN H^1 mostraram indícios de fortes interações de regiões aromáticas e alifáticas dos peptídeos com as cavidades internas das ciclodextrinas. Análise em língua eletrônica mostrou que as α - e β -ciclodextrinas adicionadas ao hidrolisado nas concentrações de 1,5% e 2,0% (m/m), respectivamente, provocam a maior diferença em relação ao hidrolisado controle. A diferença entre as amostras contendo 1,5% e 2,0% (m/m) de α - e β -ciclodextrina e o hidrolisado puro foi sensorialmente perceptível por provadores não treinados no teste de ordenação de amargor.

CONCLUSÃO. A adição de 1,5% e 2,0% (m/m) α - e β -ciclodextrinas altera os espectros obtidos por RMN H^1 . As interações também foram evidenciadas por diferenças perceptíveis por análise em Língua Eletrônica. Provadores não treinados demonstraram que estes dois tratamentos são eficientes para a redução de amargor do hidrolisado obtido das proteínas do farelo de soja.

Palavras chaves: hidrolisado proteico, farelo de soja, ciclodextrina, língua eletrônica, amargor.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION. Enzymatic hydrolysis improves soybean meal in its functional and nutritional characteristics. However, the exposed hydrophobic peptides give a bitter taste to the hydrolysate. Due to their structure, cyclodextrins have several applications in food, among which a decrease in undesirable tastes.

AIM. Current study evaluates the interaction between peptides in the enzyme hydrolysate of soy meal and alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins so that bitterness may be reduced.

MATERIAL AND METHODS. Alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins were added in mass fractions 1.5%, 2.0% and 2.5% to a soybean meal hydrolysate prepared with Alcalase 2.4L® enzyme at concentration 1% (enzyme protein/protein in soybean meal). Treatments and pure components (protein hydrolysate and alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins) were evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Thermogravimetry (DTG), Nuclear Magnetic Resonance (H^1 NMR), X-ray Diffraction (XRD) and Electronic Tongue. Sensory analysis was performed with 50 untrained panelists involving rank bitterness test.

RESULTS AND DISCUSSION. All instrumental analysis showed differences between the pure hydrolysate and treatments with alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins. H^1 NMR spectra evidenced strong interactions of aromatic and aliphatic regions of the peptides with the cyclodextrins' internal cavities. Electronic Tongue results registered that alpha- and beta-cyclodextrin added to the hydrolysate at concentrations 1.5% and 2.0% (w/w), respectively, caused the greatest difference when compared to control hydrolysate. The difference between 1.5% and 2.0% (w/w) alpha- and beta-cyclodextrin and pure hydrolysate was sensory and noted by the untrained panel in a rank bitterness test.

CONCLUSION. The addition of 1.5% and 2.0% (w/w) of alpha- and beta-cyclodextrins changes the H^1 NMR spectra. Interactions were also evidenced by differences reported by Electronic Tongue. Untrained panel showed that the two treatments are effective to reduce bitterness of soybean meal hydrolysate.

Keywords: protein hydrolysate, soybean meal, cyclodextrin, electronic tongue, bitterness.

ARTIGO

INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS PROVENIENTES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FARELO DE SOJA COM CICLODEXTRINAS – AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO AMARGOR.

RESUMO

A hidrólise enzimática confere às proteínas do farelo de soja melhora em características funcionais e nutricionais. No entanto, peptídeos hidrofóbicos são expostos conferindo amargor acentuado ao hidrolisado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação dos peptídeos presentes no hidrolisado enzimático de farelo de soja com α -, β - e γ -ciclodextrinas a fim de reduzir o amargor. Cada uma das ciclodextrinas foi adicionada nas frações mássicas de 1,5%, 2,0% e 2,5% em um hidrolisado de farelo de soja preparado com a enzima Alcalase 2,4L[®] na concentração de 1% (proteína/proteína). Testes instrumentais foram realizados para identificar possíveis interações entre os componentes. Espectros de RMN H¹ mostraram indícios de fortes interações de regiões aromáticas e alifáticas dos peptídeos com as cavidades internas das ciclodextrinas. Análise em língua eletrônica mostrou que as α - e β -ciclodextrinas adicionadas ao hidrolisado nas concentrações de 1,5% e 2,0% (m/m), respectivamente, provocam a maior diferença em relação ao hidrolisado controle. Esta diferença foi sensorialmente perceptível a provadores não treinados em um teste de ordenação do amargor das amostras, sendo consideradas menos amargas que o controle.

Palavras-chave: hidrolisado proteico, farelo de soja, ciclodextrina, língua eletrônica, amargor.

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis confers protein soybean meal improvement in functional and nutritional characteristics. However, hydrophobic peptides are exposed causing pronounced bitterness in the hydrolysate. The objective of this work was evaluating the interaction of peptides present in the enzymatic hydrolysate of soybean meal with α -, β - and γ -cyclodextrins in order to reduce the bitterness. Each of the cyclodextrins was added in the mass fractions of 1.5%, 2.0% and 2.5% in a hydrolysate of soybean meal prepared with the enzyme Alcalase[®] 2.4 L at a concentration of 1% (protein / protein). Instrumental tests were performed to identify possible interactions with components. H¹ NMR spectra evidence strong interactions among the aromatic and aliphatic regions of the peptides with the internal cavities of the cyclodextrins. Analysis by an electronic tongue showed that α - and β -cyclodextrins addition to the hydrolysate at concentrations of 1.5% and 2.0% (w/w), respectively, causes higher differences in relation to control sample. This difference was sensorially perceptible to untrained taster in one test ranking according to the bitterness of the samples, being considered less bitter than the control.

Keywords: protein hydrolysate, soybean meal, cyclodextrin, electronic tongue, bitterness.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de enzimas na solubilização das proteínas de farelo de soja é um processo a ser explorado na área de alimentos, aumentando as possibilidades de aproveitamento deste subproduto do processo de extração do óleo (STRÖHER et al., 2011). A solubilização das proteínas de farelo de soja pela ação de enzimas proteolíticas faz com que os peptídeos sejam hidrolisados, trazendo propriedades não encontradas nas proteínas em sua forma nativa, como atividade antioxidante, menor imunogenicidade, maior solubilidade, além de serem mais facilmente absorvíveis pelo organismo (CLEMENTE, 2000; SAMARANAYAKA et al., 2010). Proteínas hidrolisadas também podem apresentar características interessantes do ponto de vista industrial. Estudos verificaram a presença de características como solubilidade (CHIANG, SHIH e CHU, 1999; LAMSAL, JUNG e JOHNSON, 2007; SANTOS et al., 2011) e capacidade de retenção de óleos (SANTOS et al., 2011), importantes para se evitar a separação de fases de

alguns alimentos. Gao e colaboradores (2011) concluem que a hidrólise de isolado proteico de soja melhora a adsorção da proteína em óleo e água, com consequente benefício à emulsificação.

Apesar das diversas vantagens funcionais e nutricionais, peptídeos hidrolisados geralmente apresentam gosto amargo muito acentuado. Durante a reação de hidrólise, grupos apolares que anteriormente estavam no interior da estrutura tridimensional da proteína, são expostos resultando no aparecimento do amargor característico (CHO et al., 2004; SPELLMAN, O'CUINN e FITZGERALD, 2005; KIM e LI-CHAN, 2006; SEO, 2008; LIU et al., 2010).

Tratamentos como adsorção em carvão ativado (MURRAY e BAKER, 1952; COGAN, 1981; SOARES et al., 2004), microencapsulação (BARBOSA et al., 2004; ROCHA et al., 2009; FAVARO-TRINDADE et al., 2009; ORTIZ et al., 2009; KUROZAWA, PARK e HUBINGER, 2009; MENDANHA et al., 2009) e adição de ciclodextrinas (LINDE et al., 2009; LINDE et al., 2010 e HOU, WANG e ZHANG, 2011) vêm sendo aplicados para diminuir este amargor e, conseqüentemente, aumentar a possibilidade de aplicação de hidrolisados proteicos em produtos alimentícios.

Singh, Sharma e Banerjee (2002) e Astray e colaboradores (2009) citam em suas respectivas revisões diversas aplicações das ciclodextrinas em alimentos: proteção de aromas para reduzir a volatilização, proteção de componentes alimentícios contra a degradação pelo calor ou luz, remoção de colesterol em produtos de origem animal, diminuição do gosto residual de edulcorantes e diminuição de amargor de taninos e de hidrolisados de leite desnatado. Há duas possibilidades das ciclodextrinas reduzirem gostos desagradáveis: formação de complexo do composto de gosto ruim com a ciclodextrina, impedindo, desta forma, a sua interação com as papilas gustativas; e as ciclodextrinas interagirem e, conseqüentemente, paralisarem as proteínas carreadoras das papilas gustativas (SZEJTLI e SZENTE, 2005).

Tamura e colaboradores (1990) utilizaram α -ciclodextrina para reduzir amargor de aminoácidos e pequenos peptídeos e perceberam que, em soluções nas quais havia grande excesso de α -ciclodextrina, a efetividade em mascarar o gosto amargo de peptídeos foi maior. Hou e colaboradores (2011) determinaram as melhores condições de adição de β -ciclodextrina em hidrolisado de isolado proteico de soja de modo a minimizar o amargor deste e manter o potencial antioxidante dos peptídeos. A afinidade de aminoácidos amargos como fenilalanina, triptofano, prolina e tirosina com as cavidades apolares da α - e β -ciclodextrina foi verificada por Linde e colaboradores (2009 e 2010). Por análise sensorial, observaram a modificação do sabor de soluções destes aminoácidos não-complexados e complexados com β -ciclodextrina. Quando adicionaram α - e β -ciclodextrina em hidrolisado enzimático de farelo de soja também notaram a redução do gosto amargo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as interações entre os peptídeos presentes no hidrolisado enzimático de concentrado proteico de soja e diferentes concentrações de α -, β - e γ -ciclodextrinas bem como avaliar a redução do amargor por meio de possíveis formações de complexo de inclusão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Para a realização dos experimentos foi utilizado farelo de soja fornecido pela Imcopa® – Importação, Exportação e Indústria de óleos S.A., o qual é obtido após a extração do óleo e posterior processo de remoção de lecitina e lípidios polares. α -, β - e γ -ciclodextrinas foram doadas pela Wacker®. A enzima Alcalase 2,4L® foi adquirida da Novozymes Latinamerica. Os demais reagentes utilizados foram em Padrão Analítico.

2.2 Métodos

2.2.1 Caracterização do Farelo de Soja

O farelo foi caracterizado quanto à sua composição centesimal e granulometria. Para a caracterização centesimal utilizou-se a metodologia segundo AOAC (1995) para determinação

de umidade, cinzas, proteína bruta, lipídios totais e fibra bruta. Calculou-se o teor de carboidratos por diferença.

A fim de calcular a granulometria do farelo de soja utilizado, o mesmo foi submetido ao processo de peneiramento em peneiras da série de Tyler nos seguintes mesh: 12, 20, 60, e 80. Uma máquina vibratória foi utilizada para a separação dos grânulos de farelo de soja até que a massa de farelo de soja presente em cada peneira fosse constante. O diâmetro médio de Sauter foi calculado pela metodologia descrita por Perry e Green (1984).

2.2.2 Reação de hidrólise

A reação de hidrólise foi realizada segundo a metodologia de Ströher e colaboradores (2011) com algumas modificações. Pesou-se 10 g de farelo de soja e, em um erlenmeyer, adicionou-se 100 mL de água destilada e 1% de enzima Alcalase 2,4L® considerando proteína enzimática/proteína contida no substrato (em base úmida). O frasco foi levado em uma incubadora com agitação orbital por 3 horas, a 60°C e 100 rpm. Após, os frascos foram levados a um banho termostático a 90°C por 15 minutos de modo a inativar a enzima. Procedeu-se uma filtragem e as amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento do seu uso.

2.2.3 Caracterização do hidrolisado enzimático de farelo de soja

O hidrolisado foi caracterizado quanto à sua composição centesimal, seguindo os mesmos parâmetros utilizados para o farelo de soja e metodologia segundo AOAC (1995).

2.2.4 Preparo das amostras

A adição das ciclodextrinas seguiu a metodologia utilizada por Hou e colaboradores (2011) com algumas modificações. Cada uma das ciclodextrinas (α -, β - e γ -) foi adicionada ao hidrolisado em tubos de 45 mL nas concentrações de 1,5%, 2,0% e 2,5% (m/m), sendo considerado o hidrolisado em base úmida. Os tubos foram vedados e imersos em um banho a 38,5 °C, sendo mantidos a esta temperatura por 12 minutos sob agitação constante. Após, os hidrolisados tratados foram armazenados e encaminhados para atomização em secador tipo *spray*. Uma amostra controle também foi preparada seguindo os mesmos procedimentos, no entanto, sem a adição de ciclodextrinas.

O equipamento utilizado na atomização era da marca LM MSD 1.0, sendo a vazão de entrada de ar 40 L/min a 140 °C. A temperatura de saída de ar era de cerca 96°C e a vazão de entrada do hidrolisado era 0,40 L/h. As amostras foram armazenadas em local seco e temperatura ambiente.

2.2.5 Caracterização dos complexos

Os complexos obtidos foram caracterizados pelas seguintes técnicas:

2.2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram metalizadas com ouro a 10 Pa e 6 mA em um metalizador SHIMADZU IC-50, para posterior captura de imagens em um microscópio eletrônico de varredura SHIMADZU SS-550.

2.2.5.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Diferencial (DTG)

Amostras de, aproximadamente, 20 mg dos tratamentos, ciclodextrinas puras e hidrolisado controle foram analisadas em um calorímetro modelo DSC-50 da marca SHIMADZU, na faixa de 30 °C a 500 °C de temperatura, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (30 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, e empregando-se cápsulas de platina. As massas coletadas durante o experimento para a obtenção dos termogramas foram obtidas por uma termobalança de marca SHIMADZU, modelo TGA-50, acoplada ao calorímetro.

2.2.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN H^1)

Amostras das ciclodextrinas, hidrolisado controle e tratamentos foram analisadas em um espectrofotômetro de RMN- H^1 , marca Varian, modelo Mercury-300BB, operando a 300 MHz. As amostras foram dissolvidas em óxido de deutério (D_2O). As condições para as medidas de transformada de Fourier foram: D1 (“delay”) de 0,02 s, tempo de aquisição, 3,333 s; ângulo do pulso, 45° e janela de 8 ppm.

2.2.5.4 Difração de Raios-X (DRX)

Amostra do hidrolisado controle e dos tratamentos foram analisados por um equipamento de Difractometria de Raios X, modelo Shimadzu XRD – 7000 com radiação $Cu K\alpha$, a um tempo de varredura de 0,6 s. A região de varredura do ângulo de difração foi de $10-80^\circ$ (2θ), usando um gerador de tensão de 40 kV e uma corrente emissora de 30 mA.

2.2.5.5 Língua Eletrônica

A língua eletrônica funciona com eletrodos metálicos cobertos com finas camadas de alguns polímeros. Os eletrodos geram sinais elétricos de acordo com os componentes existentes na solução analisada. As medidas de resistência elétrica das amostras foram feitas utilizando-se de um analisador de impedância e seis unidades sensitivas da língua eletrônica, compostas por filmes nanoestruturados de polímeros condutores. As amostras foram dissolvidas em água destilada na concentração de 0,01 mg/mL. Utilizou-se o programa *Statistica 7.0* para realização da Análise das Componentes Principais (PCA) a fim de tratar os dados e gerar um gráfico em duas dimensões, PC1 e PC2.

2.2.5.6 Análise Sensorial

Foi realizado teste discriminativo de ordenação com as amostras que mais se diferenciaram do controle na análise da língua eletrônica. Amostras do hidrolisado controle e dos tratamentos que mais se diferenciaram na análise em língua eletrônica foram dissolvidas a uma concentração de 10 g/L. O teste foi feito com 50 provadores não treinados no Campus Sede da Universidade Estadual de Maringá. A análise sensorial está inscrita no comitê de ética da Universidade Estadual de Maringá sob o registro 03841312.5.0000.0104. As amostras foram apresentadas com Algarismos randômicos e aleatorizadas antes de serem entregues aos provadores. Foi solicitado aos provadores que colocassem as amostras em ordem crescente de amargor. Os resultados foram avaliados mediante a tabela de Newel e MacFarlane ao nível de 5% de significância (IAL, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do Farelo e do Hidrolisado

O diâmetro médio de Sauter para o farelo de soja utilizado foi de 0,41 mm. Segundo Stenzel e colaboradores (2009), farelo de soja com granulometria média menor que 0,59 mm gera um hidrolisado com maior teor proteico. Dessa forma, o diâmetro médio determinado é adequado para a obtenção de hidrolisado proteico com alto rendimento.

O farelo de soja e o produto obtido da hidrólise enzimática foram analisados para a obtenção da composição centesimal de cada um (Tabela 1). O hidrolisado obtido nas condições utilizadas possui alto teor proteico, 93,69% em base seca, e a sua produção constituiu-se numa metodologia adequada para solubilização das proteínas do farelo de soja.

3.2 Caracterização das amostras tratadas com ciclodextrinas

3.2.1 MEV

Nas imagens obtidas para o hidrolisado sem nenhum tratamento (Figura 1a), observa-se que as microesferas se apresentam arredondadas com irregularidades côncavas em suas superfícies. Estas irregularidades tem relação com a rápida evaporação das gotículas de água no processo de atomização. Outra característica facilmente observada nos grânulos de

hidrolisado enzimático de farelo de soja são aberturas na superfície das microesferas. Essas aberturas estão relacionadas à evaporação da água no *spray dryer*. A água superficial é evaporada mais rapidamente, de forma que resulta a formação de um invólucro nos grãos do hidrolisado. O solvente que se encontra internamente ao grânulo se evapora de maneira mais lenta que a taxa de transferência de calor para o interior das gotas, havendo um aumento da pressão interna do grânulo. Uma vez que a “casca” externa da partícula é pouco permeável, pode haver rupturas e conseqüente formação de poros na superfície (FAVARO-TRINDADE et al., 2010).

Ao observar os grânulos dos tratamentos (Figura 1b-j), pode-se visualizar uma tendência de ter maior quantidade de partículas ocas em tratamentos com maiores quantidades de ciclodextrinas de qualquer tipo. Favaro-Trindade e colaboradores (2010), em seu trabalho com encapsulação de hidrolisado de caseína em maltodextrina, sugerem que, as microesferas ocas, são indícios de que houve a formação da microcápsula. A estrutura é formada quando o núcleo e o transportador são hidrofílicos. Ambos se misturam e formam a parede da microesfera. Kurozawa e colaboradores (2009) relacionam a formação de vazios a mecanismos ligados à atomização como desorção de gases dissolvidos durante a secagem e conseqüentemente expansão, formação de uma bolha de vapor dentro da gotícula de amostra ou incorporação de ar.

3.2.2 Difração de Raios-X (DRX)

John e Bhattacharya (1999) em seus estudos observaram que isolado de soja, concentrado proteico de soja e farinha de soja produziram padrões de difrações de raio X de características amorfas. A avaliação dos gráficos obtidos na análise de DRX (Figura 2) permite a observação do mesmo comportamento amorfo no hidrolisado enzimático de farelo de soja. No entanto, com a adição de ciclodextrinas, uma banda larga na região de 20° 2-Theta aumenta e, em algumas vezes, se desloca. Este fato pode ser um indício de interação das ciclodextrinas com os peptídeos que faz com que o comportamento do padrão de raios-X se altere.

3.2.3 Calorimetria Diferencial de Varredura

Ortiz e colaboradores (2009) citam que proteínas nativas de soja apresentam picos endotérmicos em temperaturas de 75 e 85°C que correspondem às globulinas 7S e 11S. O hidrolisado controle apresenta um pico endotérmico a 72,7°C, temperatura próxima ao pico da globulina 7S. Todos os tratamentos também apresentam picos nesta mesma região. A adição de ciclodextrinas ao hidrolisado fez com que as curvas da análise de DSC ficassem diferentes, como pode ser observado na Figura 3. Esta diferença apresenta indícios de uma possível interação entre o hidrolisado e as ciclodextrinas.

3.2.4 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivativa (DTG)

As curvas dos tratamentos obtidas pela termogravimetria (TGA) foram muito próximas das curvas obtidas para hidrolisado controle. Para a obtenção de mais informações, foi feita a diferencial das curvas, obtendo a termogravimetria derivativa (DTG). Desta forma, pode-se obter a temperatura do pico de degradação de cada um dos compostos (Tabela 2). Os tratamentos com ciclodextrinas aumentaram a temperatura de degradação do hidrolisado. Este aumento também pode ser um indício de interação entre os peptídeos presentes no hidrolisado enzimático de farelo de soja e as ciclodextrinas.

3.2.5 Ressonância Magnética Nuclear

Comparando os espectros obtidos pelas análises de RMN H^1 , há sobreposição de picos encontrados em regiões das ciclodextrinas e do hidrolisado, não permitindo a observação dos deslocamentos dos picos de vibração dos hidrogênios internos às ciclodextrinas para avaliar a interação destes com os peptídeos.

Analisando a Figura 4, observa-se, no gráfico obtido da amostra sem tratamento, pequenos picos na região entre 6,5 e 8 ppm, correspondendo a grupamentos aromáticos. Também se observa pequenos picos na região entre 0 e 3 ppm, que correspondem a cadeias alifáticas (CAVANAGH et al., 2007).

Nos tratamentos utilizando 1,5% de α - e γ -ciclodextrinas, houve desaparecimento de picos anteriormente observados na região dos grupamentos aromáticos. No tratamento com 2,0% de β -ciclodextrina houve desaparecimento dos picos dessa região dos grupamentos aromáticos e também dos picos anteriormente observáveis na região entre 1 e 3ppm, o que pode indicar uma interação dos peptídeos com a cavidade apolar da ciclodextrina.

HARTI e colaboradores (2011), estudando a complexação de josamicina em γ -ciclodextrina, observaram o desaparecimento de um pico do composto puro após a complexação do mesmo. Este fato é um indício de que as regiões das moléculas que vibram neste ppm estão interagindo fortemente com o interior da cavidade apolar característico da ciclodextrina.

3.2.6 LÍNGUA ELETRÔNICA

Os dados obtidos na análise com a língua eletrônica foram estatisticamente tratados pela Análise das Componentes Principais (PCA). Foram encontradas duas componentes principais PC1 e PC2, que tiveram, respectivamente, variâncias de 49,24% e 20,04%, sendo que a soma das duas representa 69,28% da variância total. A PC1, representada no eixo horizontal da Figura 5, é a que mais interfere na diferença entre as amostras, sendo que, pontos que apresentam maiores distâncias horizontais são mais diferentes entre si. Analogamente, maiores distâncias com relação ao eixo vertical (PC2) também implicam em amostras mais diferentes, no entanto a uma menor relevância. As amostras α _1,5%, β _2,0% e γ _1,5% foram as que mais se diferenciaram do controle, sendo que, as amostras α _1,5% e β _2,0% foram as que apresentaram maior distância horizontal (PC1), onde a variância da componente é maior. Comparando estes dados com os obtidos na Ressonância Magnética Nuclear (RMN H^1), observa-se que o tratamento com α _1,5% foi o que apresentou a diminuição nas quantidades de picos na região característica dos grupamentos aromáticos. O tratamento com β _2,0%, além de mostrar o desaparecimento dos picos desta região, também indicou o desaparecimento dos picos na região entre 1 e 3 ppm, região dos carbonos alifáticos. Essas possíveis interações podem ter alterado o gosto destas amostras de forma a fazer com que estas se diferenciassem mais significativamente em relação ao controle.

Trabalhos anteriores, como Hou e colaboradores (2011) e Linde e colaboradores (2009 e 2010), observaram que, sensorialmente, quanto mais ciclodextrina era utilizada, menos os provadores sentiam o gosto amargo. Os dados apresentados nas Figuras 4 e 5 mostram que, menores concentrações de α - e β -ciclodextrinas podem interagir de forma mais efetiva com os peptídeos do hidrolisado. Como, no presente trabalho, utilizou-se de métodos instrumentais para verificar as diferenças entre as amostras, não houve possíveis interferências da interação entre as ciclodextrinas e as proteínas carreadoras das papilas gustativas (SZEJTLI e SZENTE, 2005). Desta forma, a variação da resposta detectada, possivelmente relacionada à redução do amargor observada deve-se, exclusivamente, à interação entre ciclodextrinas e peptídeos presentes no hidrolisado.

3.2.7 ANÁLISE SENSORIAL

A fim de avaliar se as amostras que apresentaram maior discrepância detectadas pela análise realizada em língua eletrônica são perceptivelmente diferentes para humanos, realizou-se um teste sensorial de ordenação com 50 provadores não treinados. Elas foram escolhidas por se diferenciarem mais no teste realizado com a língua eletrônica. Apesar de também ter se diferenciado muito da amostra controle, o tratamento γ _1,5% não foi utilizado na análise sensorial. A γ -ciclodextrina é muito mais cara que as demais, o que poderia dificultar a sua aplicação em alimentos.

Ao nível de 5% de significância, ambos os tratamentos testados, α _1,5% e β _2,0%, diferiram significativamente da amostra controle, não mostrando diferenças entre si. Este resultado vem confirmar os dados obtidos na língua eletrônica, a diferença entre cada amostra e o controle pela análise PCA (Principal Component Analysis) é perceptível também sensorialmente. Dessa forma, estes tratamentos reduzem o gosto amargo do hidrolisado enzimático de farelo de soja, trazendo maiores perspectivas na aplicação deste em produtos alimentícios.

O resultado encontrado está de acordo com as observações de outros autores que também utilizaram ciclodextrinas na redução do amargor de peptídeos e hidrolisados proteicos. Tamura e colaboradores (1990) observaram a redução de amargor de peptídeos com adição de α -ciclodextrina. Linde e colaboradores (2009) realizaram tratamentos de hidrolisado proteico de soja com 3%, 5% e 10% (m/v) de α -ciclodextrina e observaram redução do amargor apenas nas concentrações mais altas.

A redução do gosto amargo com adição de β -ciclodextrina também foi verificada em outros trabalhos. Hou e colaboradores (2011) concluíram que a adição de 2,0% (m/m) de β -ciclodextrina em hidrolisado de isolado proteico de soja era o tratamento mais efetivo para, simultaneamente, manter o poder redutor e diminuir o amargor do hidrolisado. Linde e colaboradores (2010) obtiveram uma grande redução do amargor de hidrolisado de proteína de soja quando utilizaram a menor concentração de β -ciclodextrina.

4. CONCLUSÃO

As análises instrumentais permitiram observar diferenças nos comportamentos de hidrolisado enzimático de farelo de soja e seus tratamentos com α -, β - e γ -ciclodextrinas. Destaca-se a diferença nos espectros de absorvância obtidos pelas análises de RMN, em que o desaparecimento de alguns picos característicos do hidrolisado em alguns tratamentos seriam um indício de forte interação entre grupamentos dos peptídeos e a cavidade apolar das ciclodextrinas. Os resultados obtidos pela língua eletrônica e analisados por PCA permitem concluir que os tratamentos α _1,5% e β _2,0% são os que mais diferem do controle. Análise sensorial, por meio de um teste de ordenação, confirma que essas duas amostras diferem significativamente, ao nível de 5% de significância, do hidrolisado controle e não apresentam diferença significativa entre si.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (1995). *Official methods of AOAC INTERNATIONAL*, 16th ed., p.16.

ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J. C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. (2009). A review of the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p.1631-1640.

BARBOSA, C. M. S.; MORAIS, H. A.; DELVIVO, F. M.; MANSUR, H. S.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. (2004). Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J. Sci. Food Agric.*, p.1891-1900.

CAVANAGH, J.; FAIRBROTHER, W. S.; PALMER, A. G.; RANCE, M.; SKELTON, N. J. (2007). Sequential assignment, structure determination, and other applications. In: CAVANAGH, J.; FAIRBROTHER, W. S.; PALMER, A. G.; RANCE, M.; SKELTON, N. J. *Protein NMR Spectroscopy - Principles and Practice*. Elsevier Inc, p. 781-817.

CHIANG, W. D.; SHIH, C. J.; CHU, Y. H. (1999). Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chemistry*, v. 65, p.189-194.

CHO, M. J.; UNKLESBAY, N.; HSIEH, F.; CLARKE, A. D. (2004). Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem*, p.5895-5901.

CLEMENTE, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends In Food Science & Technology*, n. 11, p.234-262.

COGAN, V.; MOSHE, M.; MOKADY, S. (1981). Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolyzates. *J. Sci. Food Agric.*, v. 32, p. 459-466.

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

GAO, Y. Z.; XU, H. H.; JIANG, L. Z.; YU, G. P. (2011). Surface properties and structure characteristics of soybean protein isolate by limited hydrolysis. *New Technology of Agricultural Engineering (ICAE), 2011 International Conference on*, p. 968-971.

HARTI, J. E.; CHERRAH, Y; BOUKLOUZE, A. (2011). Improvement of water solubility of josamycin by inclusion complex with γ -cyclodextrin. *Isrn Analytical Chemistry*, v. 2012, p.1-6.

HOU, L.; WANG, J.; ZHANG, D. (2011). Optimization of debittering of soybean antioxidant hydrolysates with β -cyclodextrins using response surface methodology. *J Food Sci Technol*.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. (1ª Edição Digital). São Paulo.

JOHN, J.; BHATTACHARYA, M. (1999). Properties of reactively blended soy protein and modified polyesters. *Polymer Int.*, n. 48, p.1165-1172.

KIM, H. O.; LI-CHAN, E. C. Y. (2006). Application of fourier transform raman spectroscopy for prediction of bitterness of peptides. *Applied Spectroscopy*, v. 60, n. 11, p.1297-1306.

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

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

LINDE, G. A.; LAVERDE Jr., A.; FARIA, E. V.; COLAUTO, N. B.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. (2009). Taste modification of amino acids ad protein hydrolysate by α -cyclodextrin. *Food Research International*, p.814-818.

LINDE, G. A.; LAVERDE Jr., A.; FARIA, E. V.; COLAUTO, N. B.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. (2010). The use of 2D NMR to study b-cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides. *Food Research International*, p.187-192.

LIU, P.; HUANG, M.; SONG, S.; HAYAT, K.; ZHANG, X.; XIA, S.; JIA, C. (2010). Sensory characteristics and antioxidant activities of maillard reaction products from soy protein hydrolysates with different molecular weight distribution. *Food Bioprocess Technol*.

MENDANHA, D. V.; ORTIZ, S. E. M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTEIRO, E. S.; TOMAZINI, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, n. 42, p.1099-1104.

MURRAY, T. K.; BAKER B. E. (1952). Studies on Protein Hydrolysis: I. Preliminary observations on the taste of enzymic protein hydrolyzates. *J. Sci. Food Agric.*, v. 3, p. 470-475.

ORTIZ, S. E. M.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTEIRO, E. S.; TRINDADE, M. A.; SANTANA, A. S.; FAVARO-TRINDADE, C. S. (2009). Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *Lwt - Food Science And Technology*, n. 42, p.919-923.

Perry, R.H.; Green, D. (1984). *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 6th ed., McGraw-Hill Book Company, Singapore.

ROCHA, G. A.; TRINDADE, M. A.; NETTO, F. M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. (2009). Microcapsules of a casein hydrolysate: production, characterization, and application in protein bars. *Food Sci Tech Int*, p.407-413.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; KITTS, D. D.; LI-CHAN, E. C. Y. (2010). Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation. *J. Agric. Food Chem.*, n. 58, p.1535-1542.

SANTOS, S. D.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE, C. (2011). Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, p.1399-1406.

SEO, W. H. (2008). Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis. *Journal of Food Science*, v. 73, n. 1, p.S41-S46.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. (2002). Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, v. 20, p.341-359.

SOARES, R. D. L.; SILVA, V. D.; LOPES, D. C. F.; JUNQUEIRA, R. G.; FIGUEIREDO, A. F. S.; SILVESTRE, M. P. C. (2004). Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 40, n. 3.

SPELLMAN, D.; O'CUINN, G. FITZGERALD, R. J. (2005). Physicochemical and sensory characteristics of whey protein hydrolysates generated at different total solids levels. *Journal Of Dairy Research*, n. 72, p.138-143.

STENZEL, M.; GIRATA, A. K.; PEREIRA, N. C.; ZANIN, G. M.; LIMA, O. C. M. (2010). Influência do tamanho das partículas na solubilização enzimática da proteína do farelo de soja. *Acta Scientiarum. Technology*, Maringá, v. 31, n. 2, p.195-200.

STRÖHER, R.; STENZEL, M.; PEREIRA, N. C.; ZANIN, G. M. (2011). Enzymatic extraction of protein from toasted and not toasted soybean meal. *Procedia Food Science*, p.463-469.

SZEJTLI, J.; SZENTE, L. (2005). Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, n. 61, p.115-125.

TAMURA, M.; MORI, N.; MIYOSHI, T.; ROYAMA, S. KOHRI, H.; OKA, H. (1990). Practical debittering using model peptides and related compounds. *Agric. Biol. Chem.*, n. 54, p.41-51.

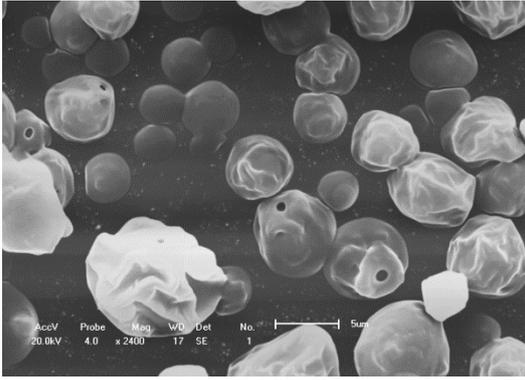
ANEXOS

ANEXO 1

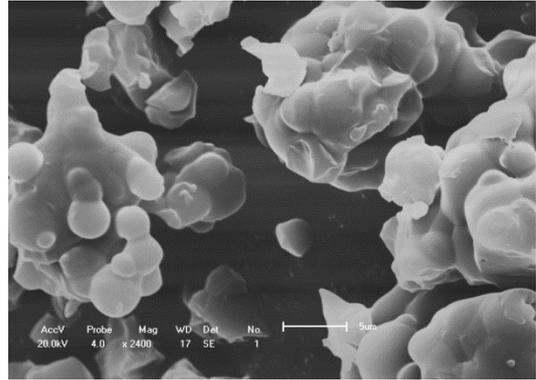
FIGURAS E TABELAS CITADAS NO ARTIGO

Tabela 1. Composição centesimal do concentrado proteico de soja e do hidrolisado enzimático de farelo de soja, ambos em base úmida e em base seca.

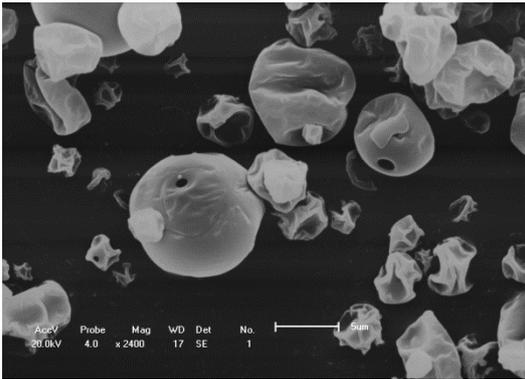
	<i>Concentrado proteico de soja (base úmida)</i>	<i>Concentrado proteico de soja (base seca)</i>	<i>Hidrolisado (base úmida)</i>	<i>Hidrolisado (base seca)</i>
Proteínas	87,50	92,11	6,24	93,69
Carboidratos	0,00	0,00	0,00	0,00
Cinzas	5,86	6,17	0,33	4,95
Fibras	1,00	1,05	0,02	0,30
Lipídios	0,64	0,67	0,07	1,05
Umidade	5,00	-	93,34	-



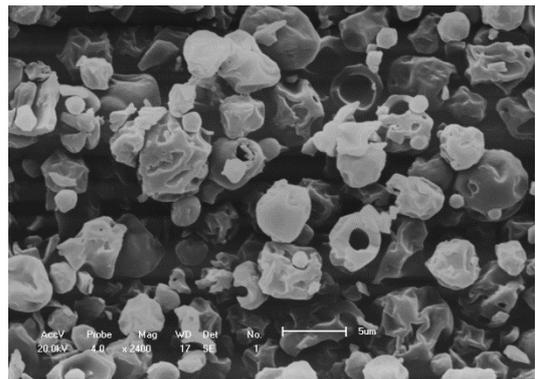
(a)



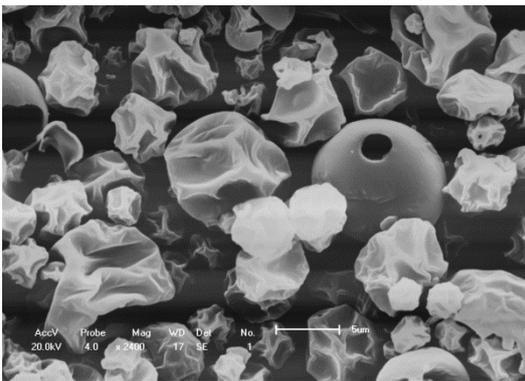
(e)



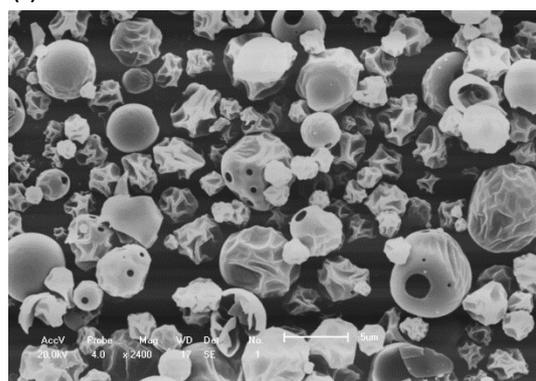
(b)



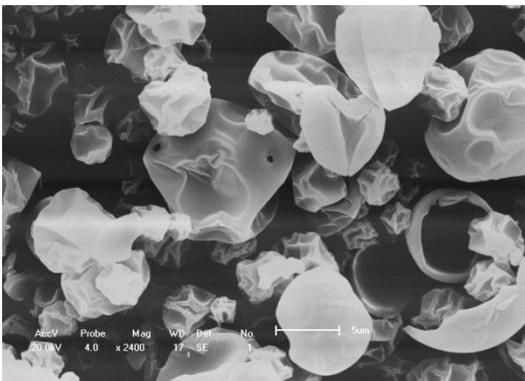
(f)



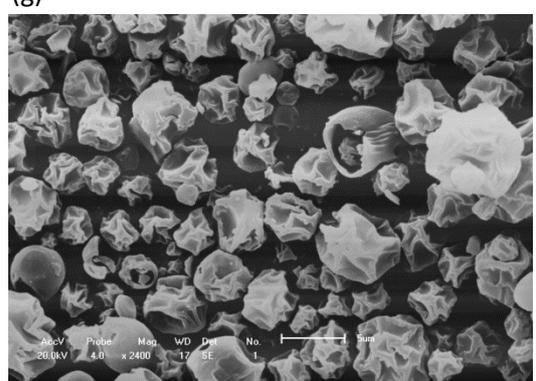
(c)



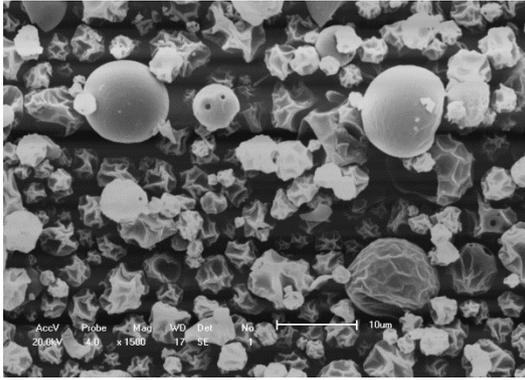
(g)



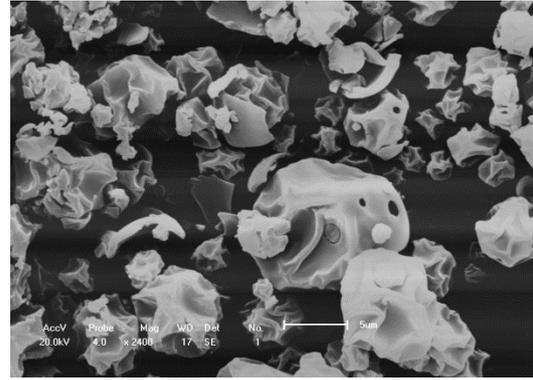
(d)



(h)

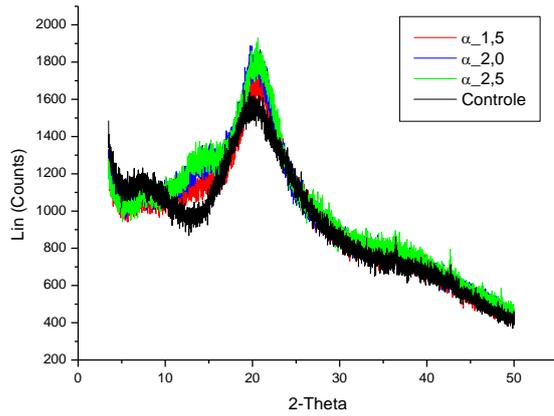


(i)

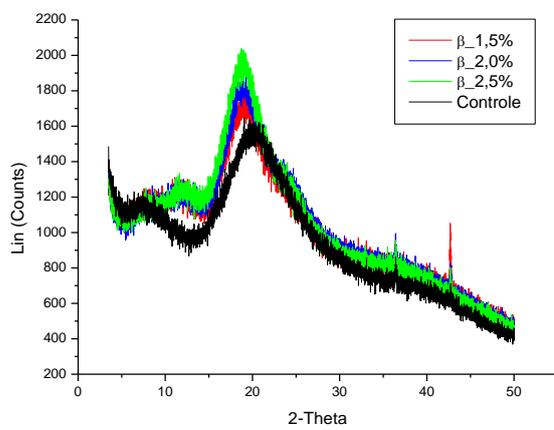


(j)

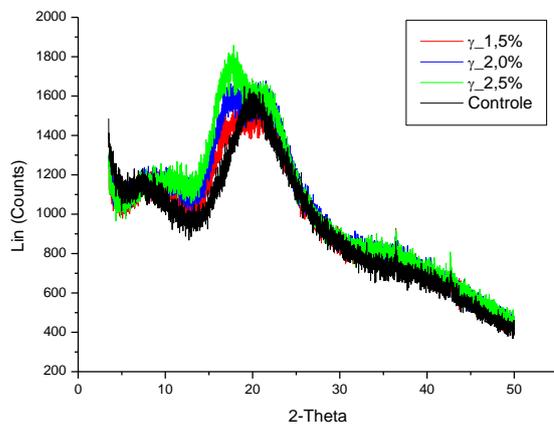
Figura 1. Captura de imagens em microscópio eletrônico de varredura. (a) Hidrolisado controle; (b) Tratamento α _1,5%; (c) Tratamento α _2,0%; (d) Tratamento α _2,5%; (e) Tratamento β _1,5%; (f) Tratamento β _2,0%; (g) Tratamento β _2,5%; (h) Tratamento γ _1,5%; (i) Tratamento γ _2,0%; (j) Tratamento γ _2,5%.



(a)

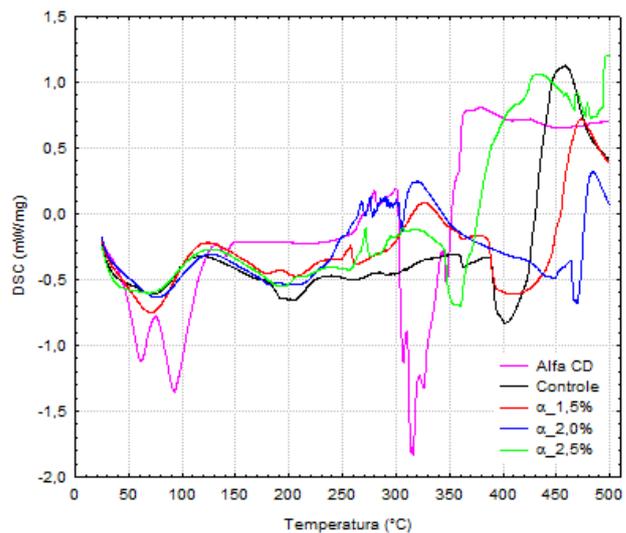


(b)

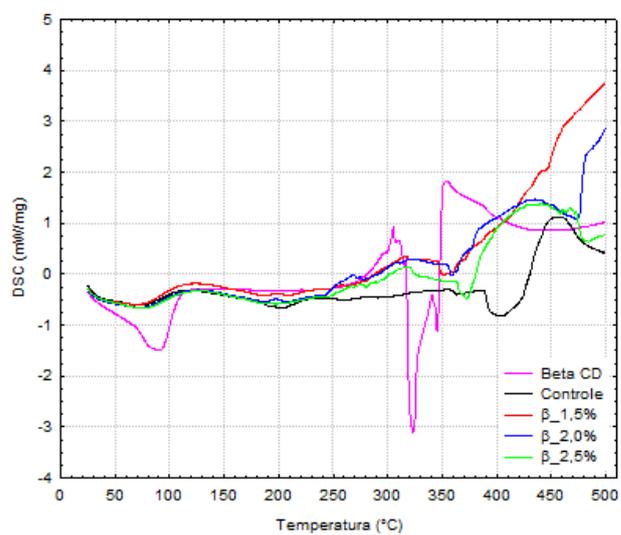


(c)

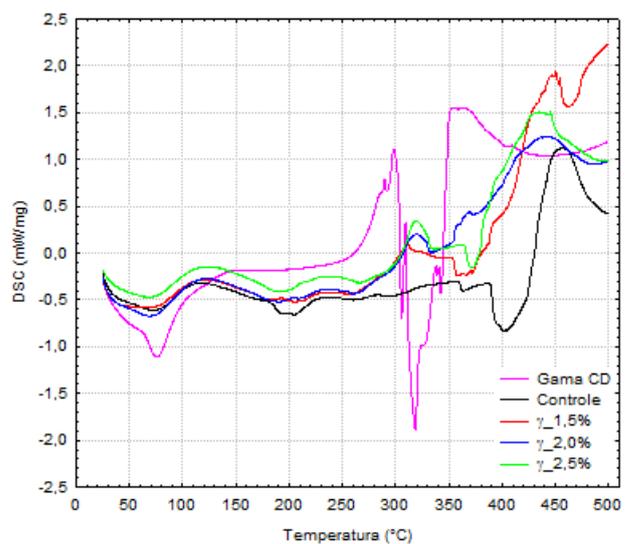
Figura 2. Padrões de difrações de raio X: (a) controle e tratamentos com α -ciclodextrina; (b) controle e tratamentos com β -ciclodextrina; (c) controle e tratamentos com γ -ciclodextrina.



(a)



(b)

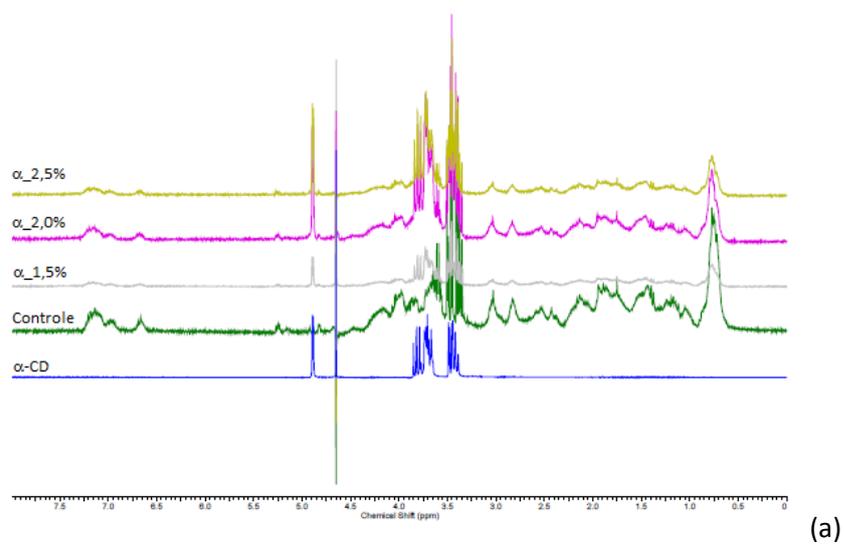


(c)

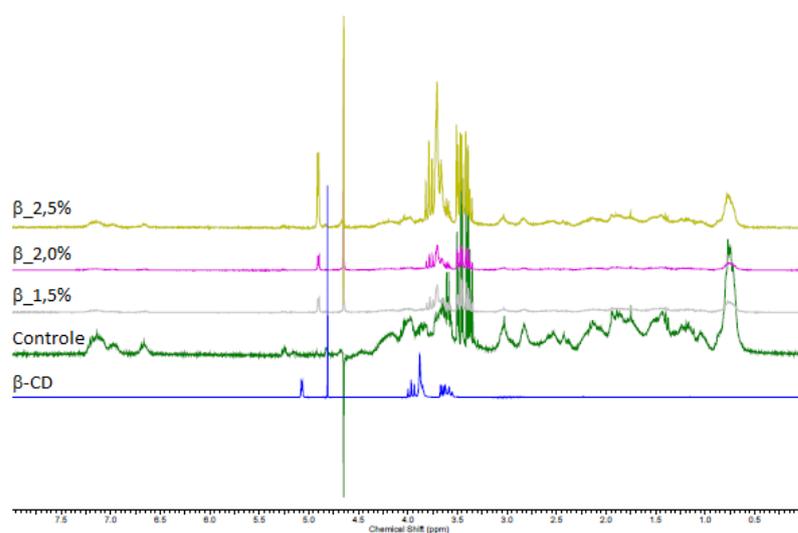
Figura 3. Gráficos de calorimetria diferencial de varredura: (a) Tratamentos com α -ciclodextrina e substâncias puras; (b) Tratamentos com β -ciclodextrina e substâncias puras e (c) Tratamentos com γ -ciclodextrina e substâncias puras.

Tabela 2. Valores de temperaturas de degradação obtidas mediante os gráficos de termogravimetria derivativa (DTG).

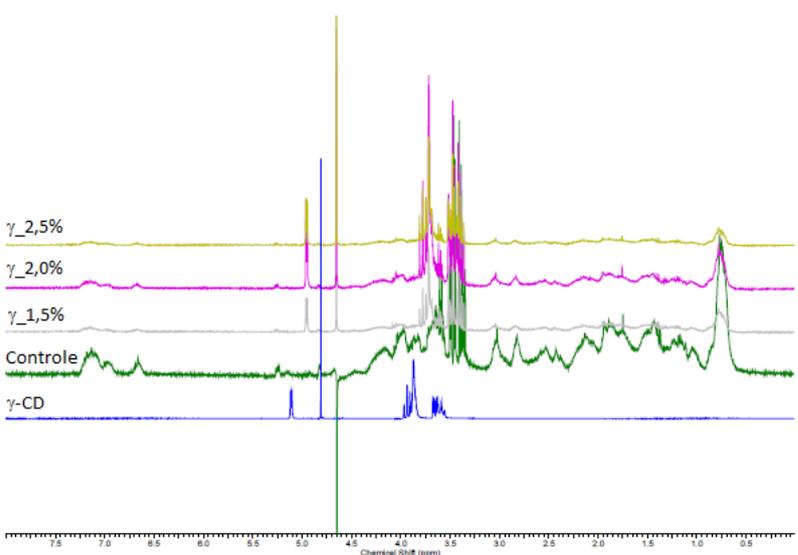
<i>Composto</i>	<i>Temperatura de degradação (°C)</i>
α -ciclodextrina	326,2
β -ciclodextrina	330,7
γ -ciclodextrina	320,8
Hidrolisado controle	305,5
Tratamento α _1,5%	319,2
Tratamento α _2,0%	316,9
Tratamento α _2,5%	322,9
Tratamento β _1,5%	315,1
Tratamento β _2,0%	318,4
Tratamento β _2,5%	320,5
Tratamento γ _1,5%	316,0
Tratamento γ _2,0%	311,5
Tratamento γ 2,5%	316,0



(a)



(b)



(c)

Figura 4. Espectro de RMN H^1 : (a) α -ciclodextrina e seus tratamentos; (b) β -ciclodextrina e seus tratamentos; (c) γ -ciclodextrina e seus tratamentos.

C = 0.01 mg/ml (em água destilada)

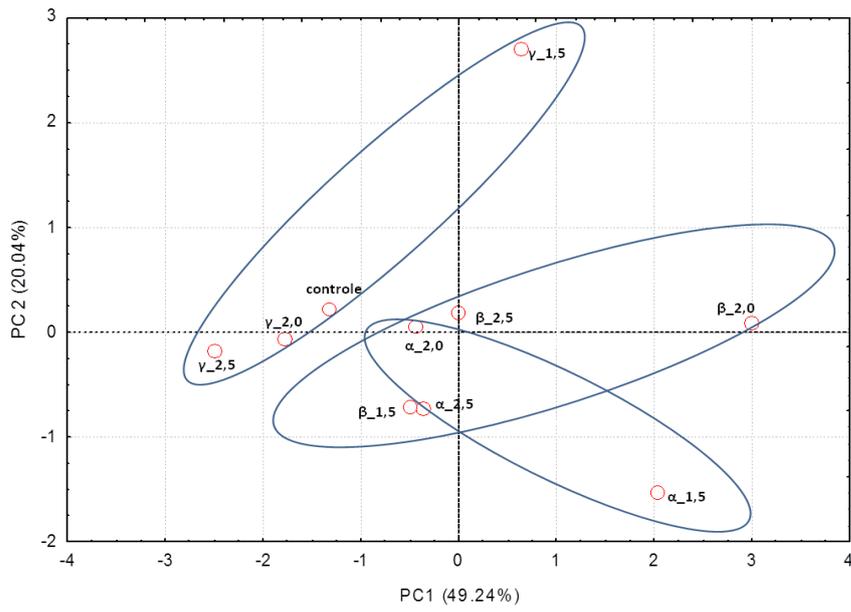


Figura 5. PCA do hidrolisado controle e dos tratamentos com α -, β - e γ -ciclodextrinas.

ANEXO II

FIGURAS E TABELA APOIO

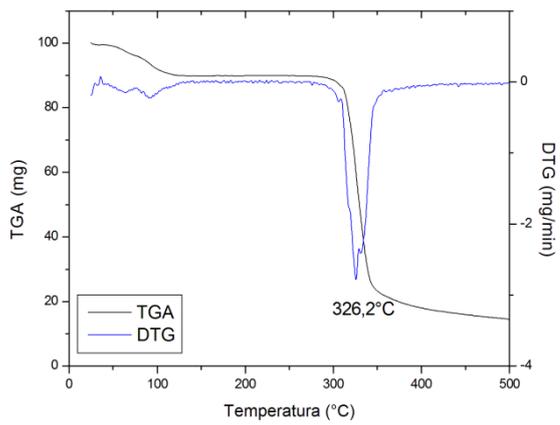


Figura 6. Termogravimetria derivativa da α -ciclodextrina.

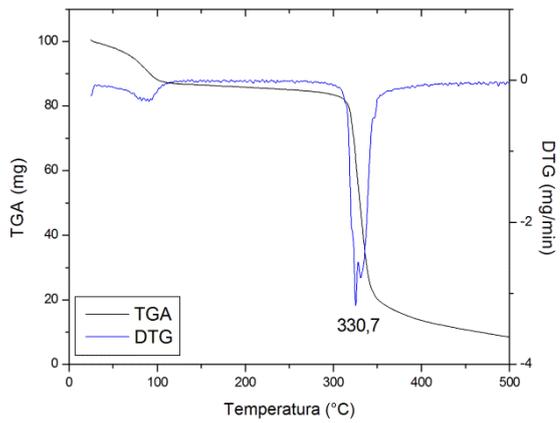


Figura 7. Termogravimetria derivativa da β -ciclodextrina.

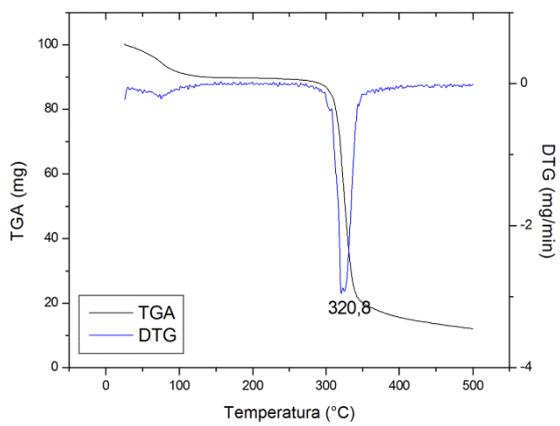


Figura 8. Termogravimetria derivativa da γ -ciclodextrina.

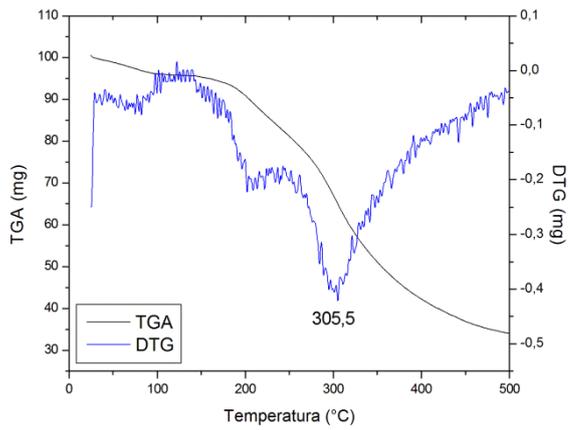


Figura 9. Termogravimetria derivativa do hidrolisado controle.

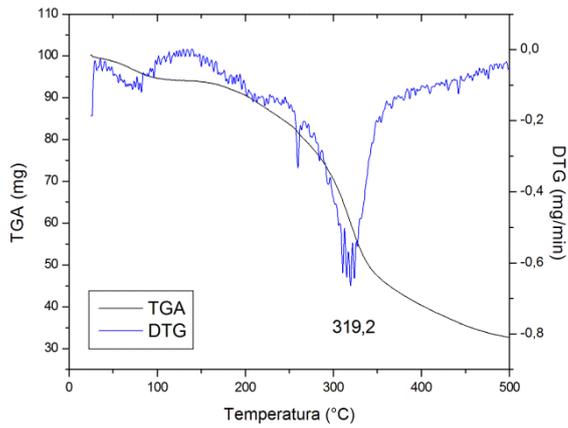


Figura 10. Termogravimetria derivativa da amostra $\alpha_{1,5\%}$.

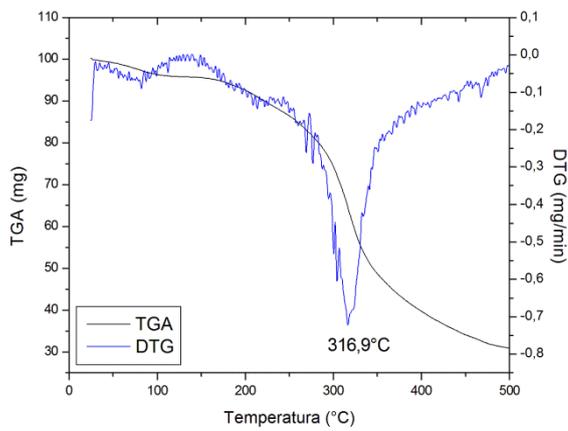


Figura 11. Termogravimetria derivativa da amostra $\alpha_{2,0\%}$.

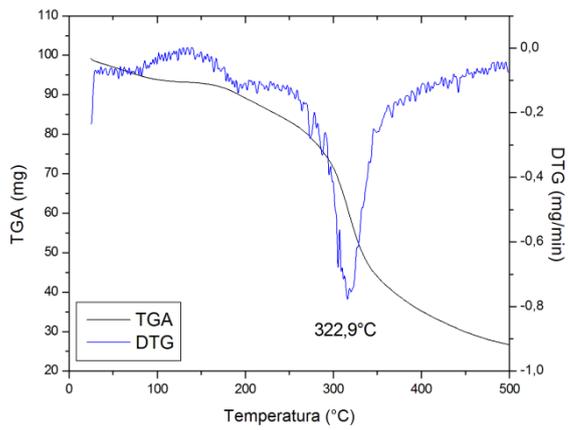


Figura 12. Termogravimetria derivativa da amostra $\alpha_{2,5\%}$.

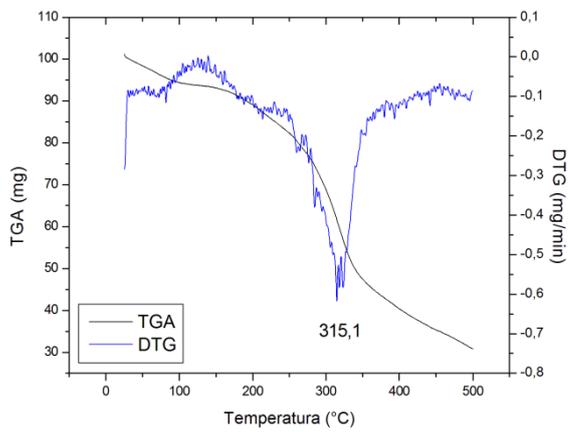


Figura 13. Termogravimetria derivativa da amostra $\beta_{1,5\%}$.

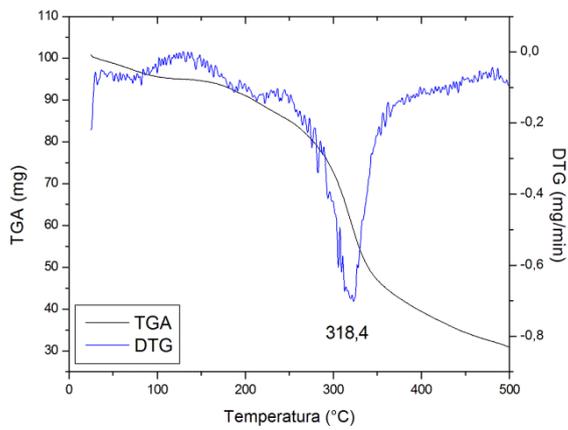


Figura 14. Termogravimetria derivativa da amostra $\beta_{2,0\%}$.

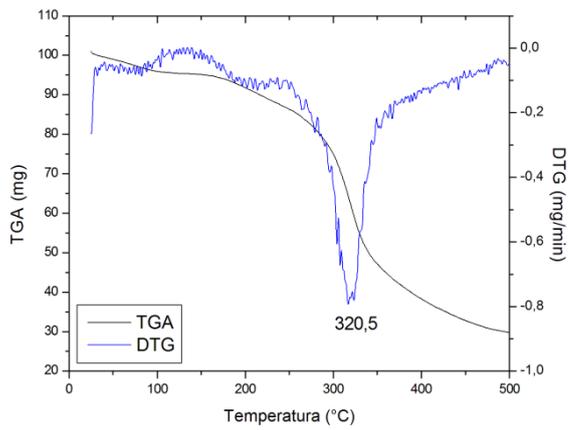


Figura 15. Termogravimetria derivativa da amostra $\beta_{2,5\%}$.

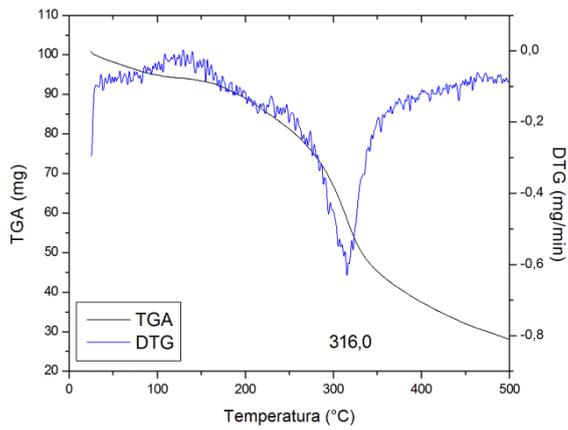


Figura 16. Termogravimetria derivativa da amostra $\gamma_{1,5\%}$.

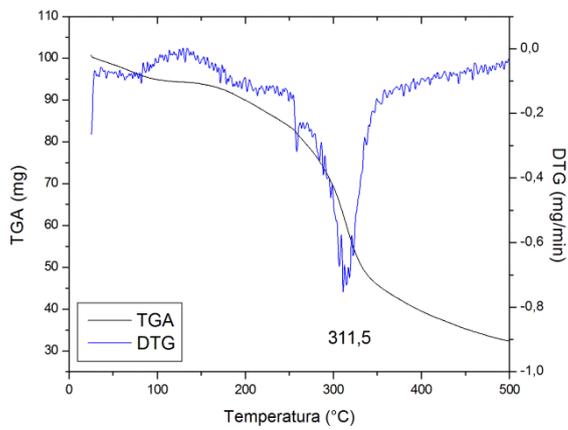


Figura 17. Termogravimetria derivativa da amostra $\gamma_{2,0\%}$.

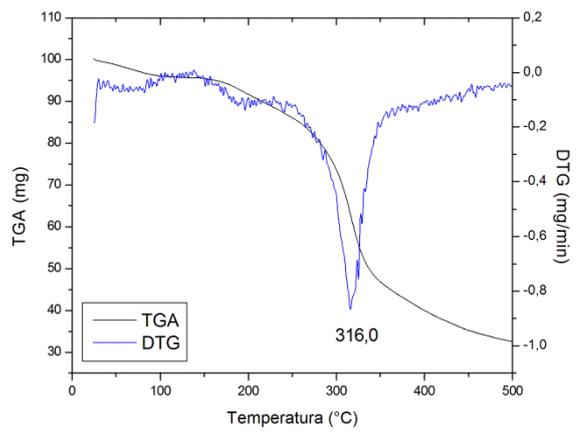


Figura 18. Termogravimetria derivativa da amostra $\gamma_{2,5\%}$.

Tabela 3. Valores críticos para comparação com os módulos das diferenças entre as somas das ordens do teste de ordenação, a 5% de significância.

Nº de julgamentos	nº de amostras ou tratamentos									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	8	11	14	17	21	24	27	30	34	37
6	9	12	15	19	22	26	30	34	37	42
7	10	13	17	20	24	28	32	36	40	44
8	10	14	18	22	26	30	34	38	43	47
9	10	15	19	23	27	32	36	41	46	50
10	11	15	20	24	29	34	38	43	48	53
11	11	16	21	25	30	35	40	45	51	56
12	12	17	22	27	32	37	42	48	53	58
13	12	18	23	28	33	39	44	50	55	61
14	13	18	24	29	34	40	46	52	57	63
15	13	19	24	30	36	42	47	53	59	66
16	14	19	25	31	37	42	49	55	61	67
17	14	20	26	32	38	44	50	56	63	69
18	15	20	26	32	39	45	51	59	65	71
19	15	21	27	33	40	46	53	60	66	73
20	15	21	28	34	41	47	54	61	68	75
21	16	22	28	35	42	49	56	63	70	77
22	16	22	29	36	43	50	57	64	71	79
23	16	23	30	37	44	51	58	65	73	80
24	17	23	30	37	45	52	59	67	74	82
25	17	24	31	38	46	53	61	68	76	84
26	17	24	32	39	46	54	62	70	77	85
27	18	25	32	40	47	55	63	71	79	87
28	18	25	33	40	48	56	64	72	80	89
29	18	26	33	41	49	57	65	73	82	90
30	19	26	34	42	50	58	66	75	83	92
31	19	27	34	42	51	59	67	76	85	93
32	19	27	35	43	51	60	68	77	85	95
33	20	27	36	44	52	61	70	78	87	96
34	20	28	36	44	53	62	71	79	89	98
35	20	28	37	45	54	63	72	81	90	99
36	20	29	37	46	55	63	73	82	91	100
37	21	29	38	46	55	64	74	83	92	102
38	21	29	38	47	56	65	75	84	94	103
39	21	30	39	48	57	66	76	85	95	105
40	21	30	39	48	57	67	76	86	96	106
41	22	31	40	49	58	68	77	87	97	107
42	22	31	40	49	59	69	78	89	98	109
43	22	31	41	50	60	69	79	89	99	110
44	22	32	41	51	60	70	80	90	101	111
45	23	32	41	51	61	71	81	91	102	112
46	23	32	42	52	62	72	82	92	103	114
47	23	33	42	52	62	72	83	93	104	115
48	23	33	43	53	63	73	84	94	105	116
49	24	33	43	53	64	74	85	95	106	117
50	24	34	44	54	64	75	85	95	107	118
55	25	35	46	56	67	78	90	101	112	124
60	26	37	48	59	70	82	94	105	117	130
65	27	38	50	61	73	85	97	110	122	135
70	28	40	52	64	76	88	101	114	127	140
75	29	41	53	66	79	91	105	118	131	145
80	30	42	55	68	81	94	108	122	136	150
85	31	44	57	70	84	97	111	125	140	154
90	32	45	58	72	86	100	114	129	144	159
100	34	47	61	76	91	105	121	136	151	167

(Fonte: Instituto Adolfo Lutz, 2008 apud ABNT – NBR 13170, 1994)