

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO E REDUÇÃO DO GOSTO
AMARGO DO HIDROLISADO DE FARELO DE SOJA**

Raquel Ströher

Engenheira Química, UEM, 2007

Mestre em Engenharia Química, UEM, 2010

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Gisella Maria Zanin

Coorientador: Prof. Dr. Nehemias Curvelo Pereira

Maringá – PR – Brasil

Fevereiro de 2014.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO E REDUÇÃO DO GOSTO
AMARGO DO HIDROLISADO DE FARELO DE SOJA**

Raquel Ströher

Engenheira Química, UEM, 2007

Mestre em Engenharia Química, UEM, 2010

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Gisella Maria Zanin

Coorientador: Prof. Dr. Nehemias Curvelo Pereira

Tese de Doutorado submetida à
Universidade Estadual de Maringá, como
parte dos requisitos necessários à
obtenção do Grau de Doutor em
Engenharia Química, área de
Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR – Brasil

Fevereiro de 2014.

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

Ströher, Raquel
S921c Caracterização do perfil peptídico e redução do
 gosto amargo do hidrolisado de farelo de soja/ . --
 Maringá, 2014.
 150 f. il. : figs., tabs., color.

 Orientador: Prof.a. Dr.a. Gisella Maria Zanin
 Coorientador: Prof. Dr. Nehemias Curvelo Pereira
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, 2014.

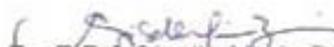
 1. Farelo de soja - Solubilizar proteína. 2.
Hidrólise enzimática de proteína - Farelo de soja.
3. Caracterização do perfil peptídico. 4. Redução do
gosto amargo. I. Zanin, Gisella Maria, orient. II.
Pereira, Nehemias Curvelo, coorient. III.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de
Tecnologia. Departamento de Engenharia Química.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV
Título.

CDD 22. ED. 660.284425
JLM001622

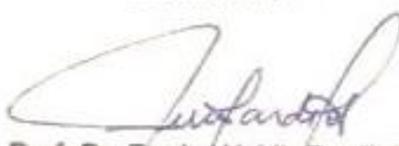
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

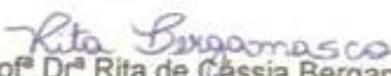
Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Raquel Ströher perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 25 de fevereiro de 2014.

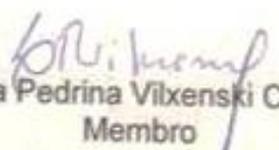
COMISSÃO JULGADORA

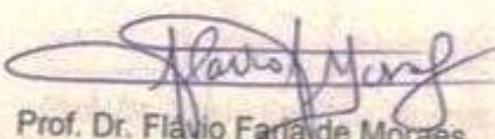

Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin
Orientadora / Presidente


Prof. Dr. Mehemias Curvelo Pereira
Coorientador


Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
Membro


Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Bergamasco
Membro


Dr.^a Luiza Pedrina Vilxenski Calsavara
Membro


Prof. Dr. Flavio Faria de Moraes
Membro

DEDICATÓRIA

*À minha família,
pelo incentivo e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sobretudo, a Deus pela oportunidade de vencer mais uma etapa em minha vida.

Aos professores Gisella Maria Zanin e Nehemias Curvelo Pereira pela orientação ao longo de todo trabalho.

À minha família, Angela, Edmar, Ana Paula, Amanda e Diogo, sempre me incentivando e me apoiando.

Aos amigos e colegas de laboratório em especial ao André, pela colaboração ao longo do trabalho.

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

Ao professor Paulo, ao técnico Amadeus e aos alunos do Laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, que me auxiliaram na realização de diversas análises durante o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Engenharia Química da UEM, que, de alguma forma colaboraram para que eu pudesse realizar o meu trabalho.

À Cooperativa Agroindustrial COCAMAR® pelo fornecimento do farelo de soja.

À Wacker® pelo fornecimento das ciclodextrinas.

À CAPES pelo suporte financeiro.

OBRIGADA!

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO E REDUÇÃO DO GOSTO AMARGO DO HIDROLISADO DE FARELO DE SOJA

AUTOR: RAQUEL STRÖHER

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. GISELLA MARIA ZANIN

COORIENTADOR: PROF. DR. NEHEMIAS CURVELO PEREIRA

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL. E46 - 09; CEP: 87020-900, Maringá - PR, Brasil, defendida em 25 de fevereiro de 2014. 150 p.

RESUMO

Apesar de ser uma fonte rica em proteína, o farelo de soja é, em sua maior parte, destinado ao uso como suplemento proteico em rações animais. Diante da grande disponibilidade dessa fonte de proteína e do crescente interesse na busca por componentes e aditivos alimentares, surge o processo de modificação enzimática para produção de hidrolisado do farelo de soja em substituição aos processos químicos tradicionais de extração de proteína. Entretanto, a desvantagem resultante dessa reação de catálise é o surgimento do sabor amargo que é considerado um dos maiores obstáculos para a aplicação generalizada desses hidrolisados em dietas alimentares. Sendo assim, vários estudos têm sido feitos para prevenir, remover, eliminar ou mascarar o sabor amargo dos peptídeos que limitam a aceitabilidade desses hidrolisados proteicos. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção do hidrolisado do farelo de soja com características sensoriais agradáveis, que possibilitem seu uso como ingrediente alimentar. Para tanto, foi realizada a caracterização do farelo de soja e do hidrolisado obtido via reação enzimática. Os resultados de composição centesimal apresentados para o farelo de soja e para o hidrolisado produzido confirmam sua potencialidade na produção de alimentos destinados ao consumo humano, proporcionando a possibilidade de agregar valor a esse subproduto da indústria de óleo vegetal. O hidrolisado enzimático obtido nas condições definidas como ótimas utilizando 1,00% enzima Alcalase® 2.4L e 2 horas de reação é, em sua maior parte, composto por peptídeos na faixa molecular entre 2,86 e 6,50 kDa. Ambos os tratamentos utilizados para redução do amargor, adsorção com carvão

ativado e adição de ciclodextrinas, foram eficientes pois promoveram interações entre os peptídeos e aminoácidos livres do hidrolisado enzimático de farelo de soja. O carvão ativado pode ser considerado uma alternativa para tratamento desse hidrolisado uma vez que reduziu significativamente o teor de peptídeos na faixa molecular em até 1 hora de percolação do adsorbato pelo leito fixo de carvão. As ciclodextrinas também podem ser consideradas uma opção de tratamento do hidrolisado, uma vez que ao interagirem com as moléculas presentes no material, resultam em uma melhor biodisponibilidade desse ingrediente. A adição em solução de 2,0% de β -ciclodextrina resultou em uma redução de 49% do teor de aminoácidos livres presentes no hidrolisado. As análises sensoriais indicaram uma boa aceitação entre os provadores de formulações preparadas com as amostras de hidrolisados submetidas aos tratamentos com carvão ativado e com a β -ciclodextrina, o que pode ser verificado pela classificação das notas médias obtidas na escala hedônica, 7,82 e 8,04, respectivamente.

PEPTIDE PROFILE CHARACTERIZATION AND REDUCTION OF BITTER TASTE OF HYDROLYZED OF SOYBEAN MEAL

AUTHOR: RAQUEL STRÖHER

SUPERVISORS: PROF^a. DR^a. GISELLA MARIA ZANIN

PROF. DR. NEHEMIAS CURVELO PEREIRA

Doctoral Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL. E46 - 09; CEP: 87020-900 - Maringá - PR, Brazil, presented on 25th February 2012. 150 p.

ABSTRACT

Despite being a rich source of protein, soybean meal is for the most part, intended for use as protein supplement in animal feed. Given the broad availability of this source of protein and the growing interest in the search for components and food additives, there is the modification process for the production of enzymatic hydrolysates of soybean meal in place of traditional chemical processes to extract protein. However, the disadvantage resulting from this reaction of catalysis is the emergence of bitter taste that is considered a major obstacle to the widespread application of these hydrolysates in diets. Thus, several studies have been done to prevent, remove, eliminate or mask the bitter taste of peptides that limit the acceptability of these hydrolysates. Given the above, this study aims to obtain the hydrolysate of soybean meal with pleasant sensory characteristics, enabling its use as a food ingredient. For this purpose, the characterization of soybean meal and hydrolysate obtained via enzymatic reaction was performed. The enzymatic hydrolysate obtained in the conditions defined as optimal using 1.00 % enzyme Alcalase® 2.4L and 2 hours of reaction is mostly composed of peptides in the molecular range between 2.86 and 6.50 kDa. Both treatments used to reduce bitterness, adsorption with activated charcoal and addition of cyclodextrins, were efficient because their capacity of promote interactions between peptides and free amino acids from enzymatic hydrolysate of soybean meal. The activated charcoal can be considered an alternative to the treatment of the hydrolysate because it reduced significantly the concentration of peptides in the molecular range studied within 1 hour percolation of the adsorbate by the fixed bed of charcoal. The

cyclodextrins can also be considered as an option of hydrolysate treatment option, because they interact with the molecules in the material, resulting in better bioavailability of this ingredient. The addition of 2.0 % of β -cyclodextrin in the solution resulted in a reduction of 49% of the free amino acids levels in the hydrolysate. The sensory tests indicated a good acceptance among tasters of formulations prepared with samples of hydrolysates subjected to treatments with activated carbon and the β -cyclodextrin, which can be verified by the classification of average scores obtained on a hedonic scale, 7.82 and 8.04, respectively.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
NOMENCLATURA	xviii
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 A Soja e seus Subprodutos	23
2.1.1 <i>O Farelo de Soja</i>	24
2.1.2 <i>As Proteínas do Farelo de Soja: A Estrutura e A Composição</i>	27
2.1.3 <i>Os Aminoácidos do Farelo de Soja</i>	28
2.1.4 <i>O Sabor Característico da Soja</i>	28
2.1.5 <i>Os Fatores Antinutricionais da Soja</i>	30
<u>2.1.5.1 <i>Os Inibidores de Proteases</i>.....</u>	<u>31</u>
<u>2.1.5.2 <i>As Lectinas</i>.....</u>	<u>32</u>
2.1.5.3 <i>As Saponinas</i>	32
<u>2.1.5.5 <i>Os Oligossacarídeos</i>.....</u>	<u>32</u>
2.2 As Enzimas	33
2.2.2 <i>A Enzima Alcalase® 2.4L</i>	36
2.2.1 <i>Os Usos das Enzimas</i>	37
2.2.2 <i>As Enzimas na Indústria de Alimentos</i>	38
2.3 A Hidrólise das Proteínas	41
2.3.1 <i>A Hidrólise Enzimática das Proteínas</i>	43
2.3.2 <i>A Aplicação dos Hidrolisados Proteicos Enzimáticos</i>	47
2.3.3 <i>A Importância Nutricional dos Hidrolisados Proteicos</i>	48
2.3.4 <i>Os Métodos de Caracterização do Perfil dos Aminoácidos de Hidrolisados Proteicos</i>	49
2.4 O Gosto Amargo	51
2.4.1 <i>A Redução/Remoção do Gosto Amargo dos Hidrolisados</i>	53
<u>2.4.1.2 <i>O Tratamento com Carvão Ativado</i>.....</u>	<u>57</u>
2.4.2.1 <i>A Adição das Ciclodextrinas</i>	61
3. MATERIAIS E MÉTODOS	68

3.1 Materiais	68
3.1.1 Farelo de soja.....	68
3.1.2 Enzima.....	68
3.1.3 Carvão Ativado.....	68
3.1.4 Ciclodextrinas.....	69
3.2 Métodos	69
3.2.1 Extração de Açúcares.....	69
3.2.2 Hidrólise Enzimática do Farelo de Soja	69
3.2.2 Determinação do Teor de Proteína em Solução	70
3.2.3 Análises Físico-Químicas.....	71
3.2.4 Tratamento do Hidrolisado com Carvão Ativado	72
<u>3.2.4.1 Caracterização do Carvão por Medidas de Adsorção de N₂.....</u>	<u>73</u>
<u>3.2.4.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....</u>	<u>73</u>
<u>3.2.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</u>	<u>73</u>
<u>3.2.4.4 Cálculo da Capacidade de Adsorção da Coluna</u>	<u>74</u>
3.2.5 Tratamentos do Hidrolisado com as Ciclodextrinas.....	75
<u>3.2.5.1 Maxalagem</u>	<u>75</u>
<u>3.2.5.2 Mistura Física</u>	<u>76</u>
<u>3.2.5.3 Adição em Solução</u>	<u>76</u>
3.2.6 Avaliação do Hidrolisado e dos Tratamentos	76
<u>3.2.6.1 Determinação do Perfil Peptídico.....</u>	<u>76</u>
<u>3.2.6.2 Determinação do Teor de Aminoácidos Livres</u>	<u>77</u>
<u>3.2.6.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H1).....</u>	<u>78</u>
<u>3.2.6.4 Formulação das Bebidas.....</u>	<u>78</u>
<u>3.2.6.5 Análise Sensorial.....</u>	<u>78</u>
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1 Análises Físico-Químicas do Farelo de Soja	81
4.2 Determinação da Condição Ótima de Reação	82
4.3 Avaliação do Hidrolisado Enzimático de Farelo de Soja	88
4.3.1 Análises Físico-Químicas.....	88
4.3.2 Determinação do Teor de Proteína Solúvel	90
4.3.3 Determinação do Perfil Peptídico.....	92
4.3.4 Determinação do Teor de Aminoácidos Livres	93
4.4 Avaliação dos Tratamentos	95

<i>4.4.1 Tratamento com Carvão Ativado</i>	95
<i>4.4.1.1 Caracterização do Carvão Ativado por Medidas de Adsorção de N₂</i>	95
<i>4.4.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	96
<i>4.4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	97
<i>4.4.1.4 Tratamento do Hidrolisado com Carvão Ativado</i>	98
<i>4.4.1.5 Cálculo da Capacidade de Adsorção da Coluna</i>	101
<i>4.4.2 Tratamento do Hidrolisado com as Ciclodextrinas</i>	108
4.5 Ressonância Magnética Nuclear	115
<i>4.5.1 Tratamentos com as Ciclodextrinas</i>	115
<i>4.5.2 Tratamento com Carvão Ativado</i>	115
4.6 Análises Sensoriais	116
<i>4.6.1 Teste de Preferência</i>	116
<i>4.6.2 Testes de Escala Hedônica</i>	118
<i>4.6.2.1 Tratamento com Carvão Ativado</i>	118
<i>4.6.2.2 Tratamento com β-Ciclodextrina</i>	119
5. CONCLUSÕES	122
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	124
7. REFERÊNCIAS	125
APÊNDICE 1	143
ANEXO 1	146
ANEXO 2	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Perfil de concentração da adsorção em coluna de leito fixo.....	58
Figura 2: Perfil de concentração da curva de ruptura na saída do leito	59
Figura 3: Característica estrutural das ciclodextrinas.	62
Figura 4: Representação molecular das CD na forma de um cone truncado, com as dimensões aproximadas em ângstrons.....	63
Figura 5: Dados de RMN característico de peptídeos.....	66
Figura 6: Preparo das dispersões na razão de substrato de 10% (m/V).	70
Figura 7: Módulo da coluna de adsorção contendo carvão ativado.	72
Figura 8: Modelo da ficha de avaliação para aplicação do teste de escala hedônica.	79
Figura 9: Gráfico de Pareto obtido para o modelo da concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos correspondente ao tempo de retenção de 81 min.....	85
Figura 10: Superfície de resposta da concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliada (P) em função da quantidade de enzima utilizada na reação (E) e o tempo da reação (t) na hidrólise enzimática do farelo de soja.....	87
Figura 11: Perfil peptídico do hidrolisado enzimático de farelo de soja obtido a 60 °C, 100 rpm, pH ≈ 6,5, concentração de enzima 1,00% (proteína enzimática/proteína substrato), 2 horas de reação.	92
Figura 12: Teores de aminoácidos livres presentes no farelo de soja e no hidrolisado enzimático obtido.	94
Figura 13: Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ para caracterização física do carvão ativado.	96
Figura 14: Espectro no infravermelho do carvão ativado utilizado.	97
Figura 15: Micrografia do carvão ativado (a) visão geral da superfície, (b) e (c) presença de estruturas tubulares.	98
Figura 16: Comparação visual das amostras de (a) hidrolisado controle (sem adição de enzima), (b) hidrolisado e (c) hidrolisado após tratamento com carvão ativado.....	99
Figura 17: Perfil da razão entre os teores de proteínas na saída do leito.	102
Figura 18: Teores de aminoácidos livres presentes no hidrolisado enzimático de farelo de soja submetido ao tratamento com carvão ativado.....	105
Figura 19: Comparação dos teores dos aminoácidos leucina, valina, prolina, ácido glutâmico e ácido aspártico, presentes no hidrolisado no tempo inicial e nos tempos de coleta de 30 minutos e 1 hora.	107

Figura 20: Comparação dos teores dos aminoácidos ácido glutâmico, ácido aspártico e tirosina, presentes no hidrolisado no tempo inicial e nos tempos de coleta de 2 e 3 horas.	107
Figura 21: Teores de aminoácidos livres presentes no hidrolisado enzimático de farelo de soja submetido ao tratamento com ciclodextrinas.	112
Figura 22: Teores dos aminoácidos livres em que houve maior redução no tratamento com as ciclodextrinas.	114
Figura 23: Gráfico do teste sensorial para avaliar a preferência do provador em relação a três formulações de bebidas à base de soja diferentes entre si pelo sabor da polpa de fruta: maracujá, manga e morango.	116
Figura 24: Notas médias obtidas no teste de escala hedônica aplicado com 50 provadores não treinados para avaliar a aceitabilidade de duas formulações com polpa de fruta sabor morango, sendo (A) com hidrolisado enzimático de farelo de soja e (B) com hidrolisado submetido ao tratamento com carvão ativado.	118
Figura 25: Médias das notas obtidas no teste de escala hedônica aplicado com 50 provadores não treinados para avaliar a aceitabilidade das formulações preparadas com polpa de fruta sabor morango, sendo (A) com hidrolisado enzimático de farelo de soja e (B) com adição em solução de 2,0% β -CD ao hidrolisado.	120

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das frações proteicas da soja.	28
Tabela 2: Características dos aminoácidos presentes no farelo de soja.	29
Tabela 3: Classificação das peptidases de acordo com o tipo de reação catalisada.	35
Tabela 4: Características de algumas enzimas comerciais.	39
Tabela 5: Características do kit de calibração.	77
Tabela 6: Características físico-químicas de amostras de farelo de soja após a coleta e após o procedimento de extração de carboidratos*.	81
Tabela 7: Ensaios variando a quantidade de enzima utilizada e o tempo de reação para a determinação da concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos correspondente ao tempo de retenção de 81 minutos.	83
Tabela 8: Estimativa dos efeitos para a concentração de proteína solúvel para os ensaios variando a quantidade de enzima empregada e o tempo de reação, sendo E a variável quantidade de enzima empregada e t a variável tempo de reação.	84
Tabela 9: Análise de variância obtida para os ensaios de determinação da concentração de proteína da faixa de peptídeos correspondente ao tempo de retenção de 81 minutos.	86
Tabela 10: Características físico-químicas do hidrolisado enzimático de farelo de soja obtido a 60 °C, 100 rpm, pH \approx 6,5, concentração de enzima 1,00% (proteína enzimática/proteína substrato), 2 horas de reação*.	88
Tabela 11: Características físico-químicas do hidrolisado enzimático de farelo de soja e dos extratos elaborados por Rodrigues e colaboradores (2003)*.	89
Tabela 12: Teores de aminoácidos livres do hidrolisado enzimático de farelo de soja obtido a 60 °C, 100 rpm, pH \approx 6,5, concentração de enzima 1,00% (proteína enzimática/proteína substrato), 2 horas de reação.	93
Tabela 13: Caracterização física do carvão ativado.	96
Tabela 14: Dados do teor de proteínas na faixa molecular de 2,86 a 6,50 kDa do hidrolisado submetido ao tratamento com carvão ativado.	100
Tabela 15: Resultados obtidos na análise cromatográfica para a determinação dos teores de aminoácidos livres presentes nas amostras de hidrolisado de farelo de soja submetido ao tratamento com carvão ativado.	104
Tabela 16: Dados cromatográficos dos tratamentos com ciclodextrinas.	108

Tabela 17: Resultados obtidos na análise cromatográfica para a determinação dos teores de aminoácidos livres presentes nas amostras de hidrolisado de farelo de soja submetido aos tratamentos com α - e β - CDs..... 111

NOMENCLATURA

ala: alanina

arg: arginina

asp: ácido aspártico

AU: Unidade Anson de atividade enzimática

BBI: inibidor de protease Bowman-Birk

BET: modelo Brunauer-Emmett-Teller

BJH: modelo Barrett-Joyner-Halenda

C_b : capacidade utilizável da coluna

C_t : capacidade estequiométrica da coluna

C_0 : capacidade total da coluna

cys: cistina

FTIR: espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier

glu: ácido glutâmico

gly: glicina

his: histidina

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

H_T : comprimento total do leito

H_U : comprimento do leito utilizado

ile: isoleucina

IPS: isolado proteico de soja

kDa: quiloDalton, unidade de massa molecular

KTI: inibidor de tripsina Kunitz

leu: leucina

lys: lisina

met: metionina

MEV: microscopia eletrônica de varredura

nm: nanômetro

phe: fenilalanina

pro: prolina

RMN H1: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

S: velocidade de sedimentação em um campo gravitacional unitário

ser: serina

t_b : tempo de operação do leito

thr: treonina

trp: triptofano

t_t : tempo total do leito

t_u : tempo útil do leito

tyr: tirosina

val: valina

ZTM: zona de transferência de massa

α -CD: alfa-ciclodextrina

β -CD: beta-ciclodextrina

γ -CD: gama-ciclodextrina

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho faz parte da área de pesquisa em “Biocatálise”, criada há mais de vinte anos no DEQ/UEM. Nesta área são realizadas pesquisas que envolvem a aplicação de enzimas industriais para a obtenção de produtos de aplicação nos setores alimentícios, farmacêuticos e energéticos. Em 2004, deu-se início ao projeto de pesquisa cujo objetivo principal era a extração da proteína do farelo de soja comercial desengordurado com a aplicação de enzimas comerciais. Procurou-se selecionar as condições com as quais foram obtidos os melhores resultados de extração com um menor consumo de reagentes. O presente projeto representa a continuidade desta linha de pesquisa, tendo como meta final a obtenção do hidrolisado do farelo de soja com características sensoriais agradáveis, que possibilitem o uso como ingrediente alimentar.

O interesse nessa pesquisa surgiu, primeiramente, como uma forma de reaproveitamento de um subproduto da indústria extratora de óleo de soja. Apesar de ser uma fonte rica em proteína, o farelo de soja utilizado como matéria-prima dos experimentos, é, em sua maior parte, destinado ao uso como suplemento proteico em rações animais. Diante da grande disponibilidade de fonte de proteína e do crescente interesse na busca por componentes e aditivos alimentares, surge o processo de modificação enzimática para a produção de hidrolisado do farelo de soja.

O desenvolvimento tecnológico mundial avança cada vez mais no caminho dos processos biotecnológicos, devido à irreversível tendência de prevalência das políticas ambientais. Nesse sentido, a substituição de processos químicos convencionais por processos enzimáticos torna o desenvolvimento e o aprimoramento desta tecnologia de suma importância (COELHO *et al.*, 2001).

A hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química, como especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial em larga escala, custo moderado, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos (MANNHEIM e CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995; CLEMENTE, 2000; BIASUTTI, 2006).

Além da melhoria das propriedades funcionais (solubilidade, poder emulsificante e textura) e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas por meio do tratamento enzimático. Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres,

apresentando assim um maior valor nutritivo (KEOHANE *et al.*, 1985, GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; BOZA *et al.*, 2000; BIASUTTI, 2006).

As proteínas de soja e do leite são as fontes mais utilizadas quando a finalidade do hidrolisado é a alimentação humana, sendo principalmente destinadas a dietas infantis e enterais (BENÍTEZ *et al.*, 2008). Biasutti (2006) destaca a introdução dos hidrolisados proteicos ricos em oligopeptídeos na dieta alimentar, principalmente em determinadas situações como síndromes de má absorção intestinal, intolerância às proteínas do leite e em casos de deficiência enzimática, como por exemplo, fenilcetonúria.

O controle das condições hidrolíticas do sistema é o ponto fundamental para a obtenção de hidrolisados com qualidade nutricional elevada e com propriedades desejáveis e agradáveis ao consumidor. Dentre os fatores interferentes encontram-se a natureza e associação de enzimas, pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima/substrato, inativação enzimática ao final do processo (CÂNDIDO, 1998; BIASUTTI, 2006).

Segundo Benítez e colaboradores (2008), um efeito secundário negativo da hidrólise da proteína é a liberação dos peptídeos com sabor mais amargo do que a proteína nativa. Tem-se demonstrado que o sabor amargo dos peptídeos puros, apesar de depender da fonte de proteína e da especificidade da enzima, está relacionado com a presença e a posição dos aminoácidos hidrofóbicos dos peptídeos do hidrolisado.

Entretanto, vários estudos têm sido feitos para prevenir, remover, eliminar ou mascarar o sabor amargo dos peptídeos que limitam a aceitabilidade desses hidrolisados proteicos. Saha e Hayashi (2001) citam diversos métodos como tratamento com carvão ativado, extração com álcool, precipitação isoeletrica, separação cromatográfica, condensação dos peptídeos de sabor amargo utilizando protease e mascaramento do sabor amargo utilizando glutamato monossódico, polifosfatos e ciclodextrinas. Outro procedimento eficientemente utilizado é a inclusão em lipossomas e em lipoesferas para mascarar o sabor amargo de hidrolisados enzimáticos de caseína, obtidos pela ação da papaína (MORAIS *et al.*, 2003, 2005).

Cogan e colaboradores (1981) relataram que o mascaramento do sabor amargo do hidrolisado de caseína tratado com carvão ativado foi acompanhado de uma perda seletiva de triptofano (63%), fenilalanina (36%), e arginina (30%). Adição de pequenas quantidades de triptofano e fenilalanina ao hidrolisado submetido ao tratamento com carvão ativado melhorou sua qualidade nutricional, o que proporcionou a produção de um hidrolisado de caseína de alto poder nutritivo e paladar aceitável.

O desenvolvimento de novos produtos no mercado agroindustrial pode ser vantajoso em alguns aspectos: econômico, pois no caso do farelo de soja seria uma forma de reaproveitar um subproduto da indústria de extração de óleo, agregando valor a um material que até então era utilizado apenas para alimentação animal; ambiental, pois proporciona a redução do volume de resíduo sólido da indústria; e social, com o desenvolvimento de produtos à base de soja, aumentam-se as opções de escolha do consumidor, gerando uma impulsão no consumo humano dos derivados de soja.

A hidrólise enzimática do farelo de soja resulta em produto com potencial uso como ingrediente para alimentos à base de soja, porém ainda há a necessidade de melhoramentos dessa tecnologia a fim de se obter produtos com maior aceitabilidade do consumidor.

Este trabalho teve como objetivo o estudo de diferentes métodos para reduzir o sabor amargo do hidrolisado enzimático de farelo de soja, a fim de se obter hidrolisados com características sensoriais mais agradáveis para servirem de ingredientes alimentares. Para tanto, utilizou-se a técnica de adsorção em carvão ativado e a adição de α - e β -ciclodextrinas visando a redução de oligopeptídeos de sabor amargo. Os hidrolisados submetidos aos tratamentos com carvão e β -CD foram utilizados na formulação de uma bebida à base de soja e analisados sensorialmente quanto à aceitabilidade do produto.

Os principais objetivos específicos desse trabalho foram:

- produção e caracterização do hidrolisado enzimático de farelo de soja;
- tratamentos do hidrolisado para redução do sabor amargo;
- formulação de bebidas à base de soja.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Soja e seus Subprodutos

A soja é uma planta que pertence à família das leguminosas denominadas cientificamente de *Glycine max* (L). É originária da China Continental e está na cadeia alimentar há 5000 anos, porém somente no século XIX foi introduzida no Ocidente (EMBRAPA, 2011).

A soja chegou ao Brasil via Estados Unidos, em 1882 e foram realizados os primeiros estudos sendo considerada como uma cultura forrageira. Em 1900 e 1901, houve registros do primeiro plantio de soja no Rio Grande do Sul (RS), onde a cultura encontrou efetivas condições para se desenvolver e expandir (EMBRAPA, 2011).

Em meados dos anos 50, a cultura da soja foi incentivada, por ser, desde o ponto de vista técnico (leguminosa sucedendo gramínia), quanto econômico (melhor aproveitamento das máquinas, implementos, infra-estrutura e mão de obra), a melhor alternativa de verão para suceder o trigo plantado no inverno. Além disso, o fato da colheita coincidir com a entressafra dos estados norte-americanos assegura bom mercado de exportação para o produto brasileiro (GOLDFLUS, 2001).

A soja é amplamente cultivada em vários países do mundo. A produção mundial estimada para a safra 2013/2014 será de 281,7 milhões de toneladas do grão, sendo que os principais produtores são os Estados Unidos, responsáveis por 32% (88,6 milhões de toneladas) do total, e o Brasil, que produz 30% (85 milhões de toneladas) do valor mundial. No país, as principais áreas produtoras estão nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do País. O maior produtor brasileiro do grão é o Mato Grosso, com uma produção correspondente a 23,5 milhões de toneladas, seguido do Paraná, com 15,9 milhões de toneladas produzidas (CONAB, 2013a, b).

Atualmente, o Brasil é responsável por cerca de 22% do volume total de soja exportado, sendo o segundo maior exportador de soja do mundo. Em média, 49% da produção de soja brasileira é exportada, principalmente para a China, União Europeia, EUA e Japão. O consumo brasileiro de grão de soja considerando a próxima safra deve ser de aproximadamente 44,8 milhões de toneladas e as exportações deverão ficar entre 39,1 e 41,5 milhões de toneladas (CONAB 2013a, b).

A maior parte da produção mundial de soja, cerca de 85%, é processada para produzir o óleo e os resíduos da extração, torta, no caso da prensagem, farelo, no caso de

extração por solvente, usados na preparação de rações para animais; de 4% a 5% desses resíduos da extração do óleo são reprocessados em farinhas e proteínas para uso alimentício. Somente 10% são destinados diretamente para alimentação humana (tofu, miso, natto, leite de soja, etc.), principalmente na Ásia, e os 5% restantes são usados como sementes ou para alimentação dos animais nas próprias fazendas produtoras (GOLDFLUS, 2001; CAMPOS, 2006).

No Brasil, a soja é predominantemente utilizada para o processamento do grão em óleo e proteína. A proteína processada (torta ou farelo) é utilizada como suplemento proteico na ração animal, ou ainda para enriquecer alimentos melhorando sua composição nutricional e na obtenção de concentrados e isolados de proteína (DALL'AGNOL *et al.*, 2007).

A soja é considerada uma fonte de proteína completa, isto é, contém quantidades significativas de todos os aminoácidos essenciais que devem ser providos ao corpo humano por meio de fontes externas, devido à sua inabilidade para sintetizá-los. Ela tem várias vantagens sobre as carnes, tais como: não excita os centros nervosos e não aumenta a pressão sanguínea, além de ser utilizada em dietas e nos tratamentos que retardam o processo de envelhecimento. A soja é um alimento indispensável na alimentação das pessoas desnutridas e anêmicas (CAMPOS, 2006).

A soja e seus derivados são consideradas matérias-primas altamente promissoras para uso na indústria de alimentos, sobretudo em produtos à base de cereais e de carnes. Além disso, a adição apropriada de derivados de soja resulta em produtos alimentícios menos calóricos; com teor de lipídios reduzido e com elevado conteúdo de proteína adequada às necessidades nutricionais de indivíduos adultos; mais baratos; além de preservar as características físicas e sensoriais do produto tradicional (SILVA *et al.*, 2006).

2.1.1 O Farelo de Soja

A Portaria nº 795 (BRASIL, 1993) estabelece a norma de identidade do farelo de soja e define: “Entende-se por farelo de soja o produto resultante da extração do óleo dos grãos de soja [*Glicine max* (L) Merrill], por processo mecânico e/ou químico”. Essa legislação ainda classifica o farelo em duas classes, segundo o tratamento a que foi submetido após a extração do óleo:

- farelo cru: é o farelo que não foi submetido à tostagem após a extração do óleo, devendo apresentar aspecto e odor peculiares ao produto fresco, ser livre de matérias

estranhas à sua composição e apresentar atividade ureática com variação no pH igual ou superior a 0,5.

- farelo tostado: é o farelo que foi submetido a tratamento térmico após a extração do óleo, devendo apresentar aspecto e odor peculiares ao produto tostado, ser livre de matérias estranhas à sua composição e apresentar atividade ureática com variação de pH inferior a 0,5.

A legislação ainda determina que, o farelo de soja tostado ou cru, segundo a sua apresentação, será ordenado em quatro subclasses:

- natural: é o farelo de soja resultante do processo de fabricação sem ter sofrido outro processo qualquer. Sua apresentação é normalmente em aglomerados, natural do processo de fabricação.

- peletizado: é o farelo de soja que sofreu pressão mecânica, após sua obtenção, formando aglomerados geralmente de forma cilíndrica.

- moído: é o farelo de soja que sofreu processo de moagem após sua obtenção.

O farelo representa em torno de 70% da semente de soja e corresponde à parte sólida da semente. Sua composição pode variar de acordo com os valores a seguir: 47 a 51% de proteínas, 43 a 47% de carboidratos e 6 a 8% de cinzas (PARAÍSO, 2001).

Os carboidratos são compostos de monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. O monossacarídeo está presente apenas como traços de glicose; os oligossacarídeos têm composição de aproximadamente 44% e são constituídos por sacarose, rafinose e estaquiase; e os polissacarídeos têm aproximadamente 56% e são formados por arabinose, arabinogalactose e por ácidos polissacarídeos (PARAÍSO, 2001).

Paraíso (2001) destaca que as proteínas formam uma parte importante do farelo, fato que o tornam importante do ponto de vista nutricional e comercial. Entretanto, as proteínas de soja contêm compostos conhecidos como inibidores de tripsina, os quais inibem a digestão das proteínas. Normalmente, a redução dos efeitos destes inibidores é feita por meio de aquecimento durante o processo.

De acordo com Karr-Lilienthal e colaboradores (2004), o farelo de soja corresponde à aproximadamente 62% do material proteico usado na produção de rações animais. Em razão das diferenças de condições ambientais, variedades genéticas e condições de processamento (umidade, tempo e temperatura de secagem, tostagem), a composição química do farelo difere, afetando seu valor nutricional. Além disso, o processamento incompleto do farelo causado por aquecimento insuficiente pode resultar

em um produto de qualidade inferior, com altas concentrações de fatores antinutricionais que afetam sua digestibilidade.

A soja, ao ser processada, gera dois produtos principais que são o óleo vegetal e o farelo, que, por sua vez, pode servir de matéria-prima para muitos outros produtos comerciais, com exceção da farinha integral que é obtida sem a remoção do óleo (STENZEL, 2007).

Segundo Paraíso (2001), as operações para a obtenção do óleo e do farelo de soja podem ser agrupadas em cinco estágios principais, sendo eles: a preparação das sementes na forma de flocos, que envolve a limpeza, a secagem, a quebra dos grãos de soja, o cozimento, a laminação e a expansão; a extração do óleo com solvente; a destilação da Miscela; a dessolventização/tostagem; e a secagem.

A preparação das sementes é a etapa que visa dispor as sementes na forma de flocos para facilitar a extração do óleo, e se inicia com a limpeza de impurezas com o uso de peneiras agitadas. A secagem é utilizada para diminuir a umidade e facilitar a etapa seguinte de quebra dos grãos. A quebra da semente é feita em trituradores e objetiva aumentar a área superficial do grão e facilitar a laminação. Antes da laminação, é realizado o tratamento térmico com vapor saturado, que auxilia o processo de laminação em cilindros de rolos lisos, aumentando ainda mais a área superficial da semente e facilitando a expansão do sólido. A expansão da massa é realizada pela compressão com vapor em contato direto, sendo assim, os vacúolos contendo o óleo são rompidos e expostos (PARAÍSO, 2001).

Após as etapas citadas todo o material segue para o extrator. No extrator, as lâminas e a massa obtida juntamente com o óleo entram em contato com o hexano, ocorrendo a extração de maior quantidade de óleo, gerando assim, duas correntes: a corrente líquida denominada de miscela, que é formada de óleo e hexano e a corrente sólida denominada de Lex, que é uma torta constituída de farelo de soja, óleo residual, hexano e umidade (PARAÍSO, 2001).

A corrente líquida passa por um processo de separação do óleo do hexano denominado de destilação da Miscela, que é constituída por um conjunto de operações de evaporação e de *stripping*. O óleo bruto obtido segue para o refino e o hexano retorna ao extrator. Já a corrente sólida (Lex), segue para a operação denominada de dessolventização/tostagem, em que na presença de vapor direto e indireto produz um farelo úmido com excelente qualidade nutricional para a alimentação animal. O farelo úmido livre de hexano segue para o secador. A mistura de vapor de água e hexano sai no topo do

dessolventizador/tostador, sendo utilizada na destilação da Miscela, aproveitando o seu potencial energético (CUSTÓDIO, 2003).

A secagem do farelo úmido pode ser considerada uma forma de aumentar o tempo de validade deste produto, já que não é consumido de imediato e contém quantidades expressivas de proteínas e carboidratos. O processo de secagem é obtido com um tratamento térmico do farelo, que é aquecido por contato indireto num secador rotativo até 100 °C. As correntes produzidas neste equipamento são a gasosa – constituída por vapor d'água e pequena quantidade de ar que entra nas zonas de carga e descarga do equipamento, e a sólida – constituída pelo farelo seco (PARAÍSO, 2001; CUSTÓDIO, 2003).

Embora a maior parte do farelo de soja ainda seja destinada a rações animais, muitos processos têm sido desenvolvidos com o objetivo de obter produtos mais refinados, destinados diretamente ao consumo humano ou à produção de ingredientes proteicos (aditivos alimentares) (STENZEL, 2007).

2.1.2 As Proteínas do Farelo de Soja: A Estrutura e A Composição

O farelo de soja, sob o ponto de vista da nutrição, possui proteínas de alto valor biológico, e neste aspecto, assemelha-se mais à proteína animal do que à qualquer outra vegetal (LIMA, 1999). Normalmente o valor do teor das proteínas é dado multiplicando-se o valor de nitrogênio por 6,25. Os farelos de soja comuns têm aproximadamente 43,5 a 48,5% de proteína bruta, dependendo do teor de fibras (5 a 9%). Existem também os farelos “hipro” que possuem de 49 até 54% de proteína bruta com teor mínimo de fibras (menor que 4%), geralmente destinados à exportação (ALMEIDA e SIMÃO, 1972).

As proteínas de soja e de seus derivados constituem uma mistura de macromoléculas de tamanhos, densidades de carga e estrutura diferentes. A massa molar das proteínas é uma característica importante para o estudo das suas propriedades físicas, entre elas pode-se destacar o coeficiente de sedimentação dado pela constante S (velocidade de sedimentação em um campo gravitacional unitário). Essa medida surgiu graças ao desenvolvimento das técnicas de centrifugação sugeridas em grande parte por Svedberg. Esse parâmetro S é expresso em unidades Svedberg ($1\text{ S} = 10^{-13}$ segundos). A ultracentrifugação separa as proteínas da soja em quatro frações de sedimentação equivalentes a 2, 7, 11 e 15 S (CHEFTEL e LORIENT, 1990). A quantidade relativa e a faixa de massas molares são listadas na Tabela 1.

A fração 2 S constituída por inibidores de tripsina é praticamente destruída na formação do farelo, assim como as hemaglutininas, que também são inativadas pelo tratamento térmico. Assim 90% das proteínas do farelo são globulinas 7 S e 11 S. O restante são proteínas da fração 15 S que não foram ainda classificadas (CHEFTEL e LORIENT, 1990; SIMAS, 2005).

Tabela 1: Classificação das frações proteicas da soja.

Fração	2 S	7 S					11 S	15 S
Proporção (%)	15	35					40	10
Proteína	Inibidores de tripsina	Citocromo C	β -amilase	Lipoxigenase	Hematoglutininas	Globulina 7S β -conglucina	Globulina 11S Glicinina	Não classificada
Massa molar	7860-21500	12000	62000	120000	110000	140000-175000	320000-350000	600000

Fonte: SIMAS, 2005.

2.1.3 Os Aminoácidos do Farelo de Soja

As proteínas de farelo de soja são formadas por 18 aminoácidos. O farelo possui ainda uma pequena quantidade de nitrogênio não proteico (NH_3), que impede que a somatória de todos os aminoácidos seja igual ao teor total de proteína bruta. O único problema dos aminoácidos do farelo de soja é sua baixa concentração de metionina e cistina (aminoácidos sulfurados). Outra característica marcante do farelo de soja são os altos níveis de lisina, que o qualifica ainda mais como excelente fonte de proteína vegetal (ACASIO, 1997; BAKER, 2000; SIMAS, 2005).

Os aminoácidos presentes no farelo de soja estão listados na Tabela 2 (SWICK, 1994; KIRBY *et al.*, 1993; FAO, 1976).

2.1.4 O Sabor Característico da Soja

Apesar de a soja possuir bom valor nutritivo e propriedades funcionais características, seus produtos sofrem restrições por parte dos consumidores ocidentais, sendo muito pouco usada na dieta do brasileiro. Segundo Silva e colaboradores (2006), as razões para esse baixo consumo são atribuídas ao seu sabor e odor desagradável,

Tabela 2: Características dos aminoácidos presentes no farelo de soja.

Aminoácido	Símbolo	Nome Químico	Fórmula Molecular	Massa Molar	Cadeia Lateral	Fração nas Proteínas do Farelo de Soja (%)
Ácido Glutâmico	GLU	Ácido α -aminoglutâmico	$C_5H_9NO_4$	147,10	Lateral Carboxilada	16 a 20
Ácido Aspártico	ASP	Ácido α -amino-succínico	$C_4H_7NO_4$	133,10	Carboxilada	8,0 a 9,5
Leucina	LEU	Ácido α -amino-isocapróico	$C_6H_{13}NO_2$	131,20	Lateral Aberta	6,3 a 8,0
Arginina	ARG	Ácido α -amino-ureinovaleriânico	$C_6H_{14}N_4O_2$	174,20	Lateral Básica	6,5 a 7,2
Lisina	LYS	Ácido α - ϵ -diamino caprúico	$C_6H_{14}N_2O_2$	146,20	Lateral Básica	5,5 a 6,0
Serina	SER	Ácido α -amino- β -hidróxi-propionico	$C_3H_7NO_3$	133,10	Lateral Hidroxilada	5,0 a 5,8
Fenilalanina	PHE	Ácido α -amino- β -fenil-propionico	$C_9H_{11}NO_2$	165,20	Lateral Aromática	4,8 a 5,5
Valina	VAL	Ácido α -amino-isovaleriânico	$C_5H_{11}NO_2$	117,10	Lateral Aberta	4,7 a 5,0
Prolina	PRO	Ácido pirrolidin-2-carboxílico	$C_5H_9NO_2$	115,10	Lateral Alifática	4,5 a 5,0
Isoleucina	ILE	Ácido α -amino- β -metil-valeriânico	$C_6H_{13}NO_2$	131,20	Lateral Aberta	4,0 a 4,6
Alanina	ALA	Ácido α -aminopropionico	$C_3H_7NO_2$	89,10	Lateral Aberta	4,0 a 4,5
Glicina	GLY	Ácido α -aminoacético	$C_2H_5NO_2$	75,10	Lateral Aberta	3,5 a 4,0
Treonina	THR	Ácido α -amino- β -hidróxi-n-butírico	$C_4H_9NO_3$	119,10	Lateral Hidroxilada	3,2 a 4,0
Tirosina	TYR	Ácido α -amino- β -p-hidróxi-fenil-propionico	$C_9H_{11}NO_3$	181,20	Lateral Aromática	3,0 a 3,9
Histidina	HIS	Ácido α -amino- β -imidazol-propionico	$C_6H_9N_3O_2$	155,20	Lateral Básica	2,0 a 2,5
Triptofano	TRP	Ácido α -amino- β -3-indol-propionico	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204,20	Lateral Aromática	1,0 a 1,8
Metionina	MET	Ácido α -amino- γ -metil-tio-n-butírico	$C_5H_{11}NO_2S$	149,20	Lateral Sulfurada	1,0 a 1,7
Cistina	CYS	Ácido α -amino- β -carbóxi-di-tio-propionico	$C_6H_{12}N_2O_4S_2$	240,30	Lateral Sulfurada	1,0 a 1,5

Fonte: SWICK, 1994; KIRBY *et al.*, 1993; FAO, 1976.

denominado *beany flavor*, o que contribui para que grande parte da soja seja utilizada na extração de óleos e seus resíduos sejam destinados, especialmente, à alimentação animal.

O *beany flavor* pode ser atribuído a alguns fatores como a associação de compostos carbonílicos de cadeia curta com a fração proteica, à indução de flatulência gerada por oligossacarídeos do tipo estaquiase, rafinose e verbascose, e também aos seus componentes antinutricionais (MONTEIRO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006). Entretanto, Rodrigues e Moretti (2008) alertam que, muitas das substâncias responsáveis pelas características indesejáveis são também responsáveis pelas propriedades de saúde da soja que a caracterizam como alimento funcional. Esse é o caso dos oligossacarídeos, responsáveis pelo aumento da flatulência, mas relacionados com a proliferação de microorganismos probióticos no trato gastrointestinal. Também é o caso das isoflavonas, responsáveis pelo sabor amargo e adstringente dos produtos derivados de soja, porém estão associadas à prevenção de doenças hormônio-dependentes. Drewnowski e Gomez-Careros (2000) sugerem que a genistina, um glicosídeo da isoflavona, seja responsável pelo sabor pouco apreciado da proteína de soja.

Segundo Lusas e Riaz (1995), o desenvolvimento de técnicas que reduzam essas características indesejáveis tem sido muito pesquisado. O tratamento térmico é uma das técnicas usadas para melhorar o valor nutricional e tais características típicas do grão, porém este tratamento deve ser controlado para evitar a destruição de aminoácidos importantes e a diminuição da biodisponibilidade de outros nutrientes. Segundo Monteiro e colaboradores (2004), uma das formas utilizadas para resolver o problema dos inibidores e a consequência do tratamento térmico elevado sobre a qualidade da proteína seria a eliminação genética desses na soja.

2.1.5 Os Fatores Antinutricionais da Soja

Conforme citado no item 2.1.1, a soja apresenta um conteúdo proteico bastante elevado. Deste percentual, uma pequena parte compreende os fatores antinutricionais, que são os inibidores de proteases (inibidor de tripsina Kunitz, ou KTI, e inibidor de protease Bowman-Birk, ou BBI), lectinas, oligossacarídeos, saponinas e fitatos (CARDOSO *et al.*, 2007; BACKES, 2011).

Geralmente os fatores antinutricionais da soja são eliminados com um correto tratamento térmico. Porém, estudos indicam que, devido à característica da estrutura compacta da molécula estabilizada por ligações dissulfeto, pode haver alguma atividade residual desses inibidores de proteases (BACKES, 2011).

Em estudo comparativo para verificação da atividade inibitória da tripsina e quimotripsina e a verificação da eliminação genética na atividade destes inibidores em genótipos de soja, Cardoso e colaboradores (2007) demonstraram a diminuição do tempo necessário de processamento térmico para a redução da atividade inibitória de tripsina. A completa inativação dos inibidores nas variedades isentas de KTI se deu com o processamento térmico de 120 °C por 9 minutos.

2.1.5.1 Os Inibidores de Proteases

Os inibidores de proteases são biomoléculas (proteínas) formadas pela ligação de dois ou mais aminoácidos (peptídeos) de ampla distribuição no reino vegetal, principalmente presentes na soja *in natura*. São capazes de se ligarem à enzimas proteolíticas pancreáticas (tripsina, quimotripsina, amilase e carboxipeptidase) de forma a inibir as atividades das mesmas. As enzimas são inativadas e, conseqüentemente, há uma diminuição da digestibilidade das proteínas na dieta prejudicando a quebra das cadeias proteicas que liberariam os aminoácidos para absorção intestinal (SILVA e SILVA, 2000).

Os principais estudos estão direcionados aos inibidores da tripsina por isto estas substâncias são usualmente denominadas por esta enzima. Os efeitos perniciosos dos inibidores da protease são essencialmente quanto a alterações no pâncreas, com o aumento da secreção de enzimas, hipertrofia e hiperplasia pancreática e diminuição no crescimento em animais. Quando o nível de tripsina do pâncreas abaixa até certo limiar a colecistoquina é ativada secretando mais enzimas pancreáticas. Como o inibidor da tripsina se complexa com a tripsina ocorre um decréscimo desta enzima livre no intestino aumentando a concentração plasmática da colecistoquina estimulando o pâncreas a liberar mais enzimas, levando a uma hipertrofia pancreática (SILVA e SILVA, 2000; BACKES, 2011).

Os inibidores de proteases da soja são classificados em duas principais categorias: os de alta massa molecular, com aproximadamente 20.000, que apresentam duas ligações dissulfeto, 181 resíduos de aminoácidos e possuem especificidade primária para tripsina; e

os de massa molecular entre 6.000 e 10.000, com alta proporção de ligações dissulfeto, 71 resíduos de aminoácidos e capacidade para inibir tripsina e quimotripsina em sítios de ligação independentes. Estes inibidores são referidos como tipo Kunitz e Bowman-Birk, respectivamente (SILVA e SILVA, 2000).

2.1.5.2 As Lectinas

As lectinas são proteínas não pertencentes ao sistema imunológico, porém capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se reversivelmente a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios. Elas têm alta capacidade de se ligar a carboidratos, principalmente nas células do duodeno e jejuno causando prejuízos à parede intestinal, levando a desordens e destruição das microvilosidades, intervindo na digestão e absorção dos nutrientes (BACKES, 2011). As lesões à parede intestinal aumentam sua permeabilidade permitindo que as lectinas sejam absorvidas, dependendo da quantidade absorvida elas podem causar alguns danos como: lesões renais, atrofia do timo, hipertrofia do fígado e pâncreas, atrofia muscular e aumento do catabolismo proteico, lipídico e de carboidratos (SILVA e SILVA, 2000).

2.1.5.3 As Saponinas

São glicosídeos presentes em algumas plantas e possuem propriedades de formar espuma em soluções aquosas, agem sobre membranas desorganizando as mesmas, se complexam com esteroides, são irritantes para as mucosas e tem sabor amargo e ácido (SILVA e SILVA, 2000).

2.1.5.5 Os Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos da soja são formados a partir de ligações α -1,6 galactosídicas entre a sacarose e a galactose, sendo, portanto, também conhecidos como α -galactosídeos. Representam aproximadamente 90% dos oligossacarídeos do grão, sendo que os principais açúcares da soja são a sacarose, estaquiose, rafinose e verbascose. Não podem ser digeridos por alguns animais devido à falta de enzima endógena α -(1,6)-galactosidase,

causando flatulência, desconforto abdominal e diarreias, diminuindo a digestão e absorção dos nutrientes (SILVA e SILVA, 2000; BUTOLO, 2002; PIVATTO, 2013).

2.1.5.6 Os Outros Fatores Antinutricionais da Soja

Os fitatos são substâncias capazes de aprisionar minerais como o cálcio, zinco, cobre, ferro e cromo, reduzindo a sua disponibilidade, também podem se combinar com proteínas e amido (BUTOLO, 2002).

Existem também agentes antitireoideanos que inibem a produção de iodo bloqueando a utilização da tiroxina, os goitrogênios. A enzima lipase presente nas sementes das oleaginosas promovem a rancificação hidrolítica do óleo da soja prejudicando tanto a qualidade do grão como do óleo, esta enzima possui odor e sabor desagradável. A enzima lipoxigenase também desenvolve sabor e odor desagradável, pois promove a oxidação dos ácidos graxos (SILVA e SILVA, 2000).

O grão de soja *in natura* possui outros fatores antinutricionais como antivitaminas A e E, havendo necessidade de suplementar estas vitaminas quando este tipo de alimento é usado. Possuem também substâncias que diminuem a absorção de nutrientes, a glicina e a conglucina (BUTOLO, 2002).

2.2 As Enzimas

A denominação “enzima” (palavra que, em grego, significa “em leveduras”) foi utilizada pela primeira vez por Kühne, em 1878. Nesta época se acreditava que enzimas só eram ativas em células vivas, conceito que perdurou até 1897, quando Büchner observou que o extrato obtido por prensagem de células de leveduras ainda possuía a propriedade de fermentar sacarose (COELHO *et al.*, 2008).

Foi a partir das primeiras décadas do século XX que o desenvolvimento da tecnologia de enzimas se intensificou. A descoberta de novas enzimas integrantes das vias metabólicas, o aumento do conhecimento das propriedades das enzimas e a constatação de que quase todas as enzimas de interesse industrial podem ser produzidas por micro-organismos, foram alguns dos fatores responsáveis para a evolução da tecnologia enzimática (COELHO *et al.*, 2008).

As enzimas são catalisadores biológicos de extraordinária eficiência. Elas não apenas têm habilidade de fazer com que as reações ocorram muito mais rapidamente do que elas ocorreriam, mas elas têm também a habilidade de exercer uma influência quiral dramática na reação. As enzimas atuam dessa maneira pois são quirais e possuem um sítio ativo onde as moléculas do reagente são momentaneamente ligadas enquanto a reação ocorre. O sítio ativo é quiral, e apenas um enantiômero de um reagente quiral encaixa-se nele apropriadamente e é capaz de sofrer a reação (SOLOMONS e FRYHLE, 1934).

Uma reação enzimática pode ser influenciada pelos seguintes fatores (SOLOMONS e FRYHLE, 1934; COELHO *et al.*, 2008):

- temperatura: quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação, até se atingir a temperatura ótima; a partir dela, a atividade volta a diminuir, por desnaturação da molécula;

- pH: idem à temperatura; existe um pH ótimo, no qual a distribuição de cargas elétricas da molécula da enzima e, em especial do sítio catalítico, é ideal para a catálise.

Silva e colaboradores (2005) citam as vantagens da utilização de enzimas em relação a muitas reações da química orgânica convencional:

- as reações catalisadas por enzimas são realizadas em condições brandas com temperatura próxima de 37 °C, pressão de 1 atm e pH \approx 7,0;

- energia-eficiência quando comparadas com processos químicos;

- as enzimas apresentam alta quimiosseletividade, regioseletividade e estereosseletividade, além de possibilitar a geração de produtos com atividade óptica;

- enzimas podem promover reações que dificilmente podem ser simuladas pelas técnicas da síntese orgânica convencional;

- enzimas são catalisadores naturais que trazem benefícios comerciais e/ou ecológicos; e,

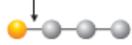
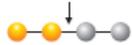
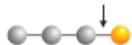
- enzimas usam, normalmente, água como meio reacional. Por outro lado, dificultam uma série de reações orgânicas pela baixa solubilidade dos reagentes em água. Entretanto, existem algumas enzimas (como as lipases) que funcionam como catalisadores em meio orgânico.

As enzimas, tais como poligalacturonase e pectinase, entre outras, são utilizadas nas indústrias de suco de frutas para diminuir a viscosidade do mesmo, contribuindo para o aumento do seu fluxo nos processos que empregam membrana (COELHO *et al.*, 2001).

Segundo Guadix e colaboradores (2000), as proteases podem ser classificadas de acordo com:

- a origem: animal, vegetal, bacteriana ou fúngica;
- a natureza do sítio catalítico: proteases serínicas, possuem um resíduo de serina no sítio ativo; proteases sulfidrílicas, possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo; proteases “metálicas”, possuem em seu sítio ativo um íon metálico; e as proteases ácidas, possuem pelo menos um grupo carboxila no sítio ativo;
- sua ação catalítica: em endopeptidases ou proteinases, rompem ligações situadas dentro da cadeia peptídica; e, exopeptidases, sendo elas carboxipeptidases (rompem as ligações a partir da extremidade C-terminal) e aminopeptidases (rompem as ligações a partir da extremidade N-terminal), conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Classificação das peptidases de acordo com o tipo de reação catalisada.

Exopeptidases		Aminopeptidase		
	N-terminal	Dipeptidil peptidase		
		Tripeptidil peptidase		
	C-terminal	Carboxipeptidase		
		Peptidil peptidase		
		Dipeptidases		
	Omega peptidases			
Endopeptidases				

Fonte: VERMELHO *et al.*, 2008.

Embora estas enzimas basicamente clivem ligações peptídicas, existem diferenças entre as enzimas individualmente no que diz respeito à posição da ligação hidrolisada na cadeia peptídica e a seqüência de aminoácidos de preferência nos dois lados

desta ligação. Se estas diferenças fossem consideradas, entretanto, seria impossível construir um sistema geral de classificação e nomenclatura (VERMELHO *et al.*, 2008).

Criou-se então um tipo de classificação baseado na estrutura química do centro ativo. Vermelho e colaboradores (2008) ainda acrescentam que, nesta classificação, as carboxipeptidases e as endopeptidases são divididas em subclasses de acordo com os grupos químicos do centro-ativo envolvidos no mecanismo catalítico. Neste sistema, as carboxipeptidases são subdivididas em serina- (EC 3.4.16.), metalo- (EC 3.4.17.) e cisteína- (EC 3.4.18.). As endopeptidases são subdivididas em serina- (EC 3.4.21.), cisteína- (EC 3.4.22.), aspártico- (EC 3.4.23.), metalo- (EC 3.4.24) e treonina-peptidases (E.C 3.4.25.). Assim, as serina-, aspártico- e cisteína- endopeptidase tem esses aminoácidos no seu centro ativo. Nas metalopeptidases, um ou dois íons metálicos estão envolvidos no mecanismo catalítico. Existe, atualmente, um sexto tipo catalítico, as glutâmico-peptidases que apresentam o ácido glutâmico em seu centro ativo. As enzimas cujos mecanismos de ação não estão suficientemente elucidados são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99.

2.2.2 A Enzima Alcalase® 2.4L

A Alcalase® 2.4L é uma preparação enzimática de grau alimentício disponível comercialmente. Tem sido amplamente utilizada na produção de hidrolisados proteicos devido à sua termoestabilidade (60 °C) e ao pH de atividade ótima (pH 8,5), os quais podem minimizar o crescimento de micro-organismos.

A enzima Alcalase® 2.4L é fabricada pela Novozymes Latin America Ltda. Conforme informações contidas na ficha técnica do produto (NOVO NORDISK, 2002), a Alcalase® 2.4L é uma enzima proteolítica produzida por fermentação submersa de uma cepa selecionada do *Bacillus licheniformis*. É uma protease bacteriana altamente eficiente desenvolvida para a hidrólise de todos os tipos de proteínas. O principal componente enzimático, a Subtilisina A, é uma endoproteínase com condições ótimas de temperatura entre 55 e 70 °C, dependendo do tipo do substrato, e pH entre 6 e 8. Sua atividade declarada é de 2,4 Unidades Anson por g (AU/g), em que uma Unidade Anson equivale a um miliequivalente de tirosina liberada na hidrólise de hemoglobina por minuto.

A Alcalase® 2.4L pode ser inativada em 30 minutos na temperatura de 50 °C ou em temperatura mais alta quando o pH for de 4, e em 10 minutos na temperatura de 85 °C ou mais alta, quando o pH for igual a 8. No entanto, a inativação é muito dependente do substrato (concentração do substrato, pH, etc.). Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999) produzindo hidrolisados de proteína de peixe, e Hrčková e colaboradores (2002) produzindo hidrolisados de farinha de soja desengordurada, encerraram a atividade catalítica da enzima Alcalase® 2.4L a 85 °C por 15 minutos. Li e colaboradores (2010) inativaram a enzima Alcalase utilizada na produção de hidrolisados de caseína por meio de aquecimento em banho termostático a 90 °C por 15 minutos.

As enzimas são diferenciadas quanto à posição da ligação hidrolisada na cadeia peptídica e a seqüência de aminoácidos de preferência nos dois lados desta ligação. Apesar de sua vasta utilização em inúmeras campos biotecnológicos, sua especificidade não está totalmente elucidada. Quanto ao seu sítio ativo, a Alcalase® (EC 3.4.21.62) é classificada como serina-protease, tendo esse aminoácido no seu centro ativo (VERMELHO *et al.*, 2008).

A enzima Alcalase® 2.4L se mostrou eficiente na hidrólise das proteínas do farelo de soja tratado termicamente. Stenzel (2007) extraiu 50% da proteína inicialmente presente no farelo de soja (concentração de proteína solúvel de 23,45 mg/mL) utilizando a enzima Alcalase® 2.4L nas seguintes condições de hidrólise: temperatura de 60 °C, pH em torno de 6,5 (pH da suspensão), 100 rpm de agitação e período de 3 horas de reação.

2.2.1 Os Usos das Enzimas

O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e às vantagens em relação aos catalisadores (aceleradores de reações) químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação (MUSSATTO *et al.*, 2007).

O mercado mundial de enzimas tem três segmentos: enzimas técnicas (destinadas a indústrias de tecidos e de produtos de limpeza), enzimas para alimentos e bebidas e enzimas para ração animal. As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanases e fitases, e as maiores empresas produtoras são europeias: Gist-Brocades (Holanda), Genencor International e Novo Nordisk (Dinamarca).

Esta última detém sozinha, cerca de metade do mercado mundial de enzimas industriais (MUSSATTO *et al.*, 2007).

A seguir, são citadas algumas das numerosas aplicações das enzimas (GUADIX *et al.*, 2000; COELHO *et al.*, 2001; MUSSATTO *et al.*, 2007):

- indústria de detergentes: utilizadas na remoção de manchas de proteínas, de gordura, de amido, na proteção de cor e na remoção de partículas de sujeiras;

- indústria têxtil: empregadas na etapa de desengomagem, no acabamento de *jeans*, no biopolimento, na remoção do resíduo de alvejante e na desengomagem da seda;

- indústria de amido: utilizada nas reações de liquefação, sacarificação e isomerização do amido;

- indústrias de rações animais: empregadas na degradação do NSP (fibras) e na produção de complementos enzimáticos;

- indústria cervejeira: utilizadas na substituição do malte por cevada; na produção de cerveja com até 100% de cereais não maltados, na liquefação de agregados; podem ser utilizadas também com a finalidade de aumentar a fermentabilidade, no melhoramento na filtração do mosto e da cerveja, no controle de nitrogênio; podem ser usadas na obtenção de cervejas com baixo teor de calorias ou ainda para promover a aceleração do amadurecimento do mosto;

- laticínios: utilizadas na hidrólise da lactose para a modificação da proteína do leite, no processamento do leite e soro de leite além da etapa de maturação do queijo;

- análises e medicamentos: utilizadas especificamente para fins analíticos, medicação oral e formulação de auxiliares digestivos;

- higiene pessoal: utilizadas na limpeza de lentes de contato e de dentaduras;

- papel e celulose: usadas como reforçador de branqueamento, para controle do piche e, ainda, no destingimento de papel velho misto de escritório.

2.2.2 As Enzimas na Indústria de Alimentos

As primeiras enzimas proteolíticas utilizadas na indústria alimentícia foram as proteases pancreáticas de origem animal, apesar das enzimas de origem bacteriana e fúngica estarem adquirindo maior importância. Na Tabela 4 encontram-se algumas das proteases comerciais de grau alimentício disponíveis no mercado. Estas soluções

correspondem à misturas de enzimas e normalmente são vendidas em estado líquido ou *pellets* secos (GUADIX *et al.*, 2000).

As enzimas têm destacado papel no setor alimentício, pois podem influir na composição, no processamento e na deterioração dos alimentos. Elas às vezes são indesejáveis: provocam, por exemplo, o escurecimento de frutas e vegetais (é o caso das polifenoloxidasas), o ranço de farinhas (lipases e lipoxigenases) e o amolecimento de tecidos vegetais (enzimas pécticas) (MUSSATTO *et al.*, 2007).

Tabela 4: Características de algumas enzimas comerciais.

Enzima	Origem	Estabilidade	
		pH	Temperatura (°C)
Alcalase 0,6L	<i>B. licheniformis</i>	4<pH<11,5	50<T<60
Neutrase	<i>B. subtilis</i>	6<pH<8	45<T<55
Protease 660L	<i>B. subtilis</i>	7<pH<10	50<T<70
Fungal-Protease	<i>A. oryzae</i>	6<pH<9	45<T<55
	tripsina suína		30<T<60
P.E.M 25000 S	tripsina bovina	6<pH<10	25<T<45
	quimiotrip. bovina		
	tripsina		
Corolase PP	quimiotripsina	7<pH<9	45<T<55
Corolase OS	<i>A. oryzae</i>	5<pH<7	50<T<60
Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	6<pH<8,5	55<T<60
Corolase 7092	<i>A. oryzae</i>	6<pH<9	35<T<45
Corolase 7093	<i>A. oryzae</i>	7<pH<9	40<T<50
Corolase 7107	<i>A. niger</i>	2<pH<3	30<T<50
Bromelina Takamina	vegetal	4<pH<9	20<T<65
Papaína Takamina	vegetal	6<pH<8	20<T<75

Fonte: GUADIX *et al.*, 2000.

Especialmente as peptidases possuem um papel de destaque porque catalisam a hidrólise de uma ligação específica em um determinado aminoácido, o que permite modificações pontuais em sistemas complexos como os alimentos, melhorando o sabor, o

aroma, a textura, a funcionalidade e a qualidade nutricional. Este processo, sem dúvida, é mais eficaz do que um processo físico ou químico que pode afetar todas as outras moléculas presentes no alimento. Alguns exemplos do uso das peptidases na modificação de alimentos incluem: a redução do sabor amargo de queijos; a substituição de gorduras e carboidratos por proteínas modificadas enzimaticamente que proporcionam propriedades organolépticas similares; a restauração das propriedades emulsificantes de proteínas da soja desnaturadas pelo calor; e a redução do potencial alergênico de alimentos proteicos através da degradação de epítomos. Além disso, as peptidases podem agir sobre proteínas complexas como as do soro de leite e da caseína, gerando peptídeos biologicamente ativos com papel significativo na manutenção da saúde e prevenção de doenças, como peptídeos anti-hipertensivos que inibem a enzima conversora da angiotensina e peptídeos que atuam na supressão do apetite pela produção de colecistoquinina, um hormônio intestinal, que produz uma sensação de saciedade, agindo nos centros cerebrais de controle do apetite (VERMELHO *et al.*, 2008).

Em certas situações, porém, a detecção da atividade prejudicial de uma enzima em um produto pode servir como indicador da eficiência de uma operação. No leite pasteurizado, por exemplo, a constatação da atividade de fosfatase indica que o processo térmico não foi bem executado. Da mesma forma, se a peroxidase está ativa em vegetais que passaram pelo método de branqueamento, o processo foi ineficaz. Por outro lado, existem vários exemplos do uso de enzimas com o objetivo de modificar matérias-primas e/ou obter produtos específicos (MUSSATTO *et al.*, 2007).

As enzimas apresentam ampla utilização na indústria alimentícia, principalmente em processos de maceração de vegetais e frutas para a produção de néctares e purês, no processamento de produtos cárneos (tenderização), na produção de queijos, na extração e clarificação de sucos de frutas e vinho, na desengomagem de fibras naturais e na recuperação de óleos vegetais. Mussatto e colaboradores (2007) detalharam algumas aplicações das enzimas na indústria alimentícia:

- na panificação, a enzima alfa-amilase promove a decomposição do amido, que leva à produção de maltose, aumentando a maciez e a textura da massa e do miolo e mantendo o pão fresco por mais tempo. Já a amilase maltogênica e a xilanase conferem estabilidade à massa, enquanto a protease altera a elasticidade e a textura do glúten e melhora a cor e o sabor do pão. No processamento de amidos, enzimas como glicose-

isomerase, alfa-amilase, beta-amilase, pululanase e isoamilase convertem o amido em dextrose ou xaropes ricos em açúcares simples.

- na indústria de laticínios, a quimosina promove a coagulação do leite (para a produção de queijos), a lactase decompõe a lactose em açúcares mais simples, a protease quebra proteínas de soro. Neste e em outros setores, as lipases decompõem gorduras.

- enzimas como papaína, bromelina e ficina ajudam a amaciar carnes, e outras são empregadas nos processos de produção de bebidas alcoólicas. No caso das bebidas destiladas, a alfa-amilase e a glicoamilase decompõem o amido. No caso dos vinhos, a pectinase facilita a prensagem, a filtração e a clarificação e reduz o tempo de processamento. Nos dois tipos de bebidas, as proteases quebram proteínas. As cervejarias usam diferentes enzimas para liquefazer e fermentar a matéria-prima (alfa-amilase), aumentar o teor de certos açúcares (glicoamilase), aumentar a velocidade de filtração (glucanase), remover compostos indesejáveis (pentosanases) e evitar a turbidez do produto final (papaína, bromelina ou ficina).

Segundo Mutlu e colaboradores (1999), enzimas, tais como poligalacturonase e pectinase, entre outras, são utilizadas nas indústrias de suco de frutas para diminuir a viscosidade do mesmo, contribuindo para o aumento do seu fluxo nos processos que empregam membrana.

Outras enzimas bastante utilizadas na indústria de alimentos são a celulase, cuja função é liquefazer o tecido vegetal, permitindo extrair pigmentos do fruto, e a glicoamilase, que tem por finalidade decompor o amido, evitando turvação e gelatinização durante o processamento (MUSSATTO *et al.*, 2007).

2.3 A Hidrólise das Proteínas

As proteínas podem ser quebradas em peptídeos de diferentes tamanhos moleculares e aminoácidos livres como resultado da clivagem de ligações peptídicas. Esta degradação, chamada hidrólise, pode ser realizada por enzimas, ácidos ou álcalis. As hidrólises ácida ou alcalina tendem a ser um processo difícil de controlar e resulta em produtos com reduzidas qualidades nutricionais (CLEMENTE, 2000). Além disso, são totalmente inespecíficas, podendo destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e

causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (ADLER-NISSEN, 1985).

Para Hrčková e colaboradores (2002), comparada às hidrólises ácida ou alcalina, a hidrólise enzimática de proteína utilizando proteases específicas proporciona condições mais moderadas de processo e pouco ou nenhuma reação lateral ou produtos indesejáveis. Além disso, o hidrolisado final após a neutralização contém menos sais e a funcionalidade do produto final pode ser controlada pela seleção de enzimas específicas e dos fatores da reação.

A matéria-prima utilizada para a obtenção de hidrolisados de proteína pode ser de origem animal, vegetal ou bacteriana. Entre os vegetais, os mais utilizados nos países desenvolvidos são as proteínas de soja, trigo e arroz. Dos substratos de origem animal mais utilizados, principalmente em países orientais (Japão e Coreia) estão os peixes. Também são utilizados como fonte proteica resíduos de carne como tendões ou ossos e alguns micro-organismos, como as algas (BENÍTEZ *et al.*, 2008).

Benítez e colaboradores (2008) ainda enfatizam que, para a seleção adequada de uma fonte de proteína deve ser levado em conta a finalidade do hidrolisado, além do valor agregado ao produto final sobre o substrato inicial. Sendo assim, para a obtenção de hidrolisados com propriedades de geleificação e emulsionantes, utiliza-se colágeno e gelatina por sua capacidade de formar géis transparentes. Também tem sido amplamente utilizado para esse efeito a proteína presente no ovo, carne, sangue, vísceras e até mesmo cereais. Como fonte de fermentação para o crescimento de micro-organismos são empregados os hidrolisados de levedura e caseína, que também são utilizados como matéria-prima quando a finalidade é o uso em cosméticos. Quando a finalidade do hidrolisado é o uso como fontes de nitrogênio, são utilizadas as proteínas de peixe e proteínas microbianas para alimentação humana, e proteínas de soja e leite para alimentação animal, sendo que a proteína do soro do leite é bastante utilizada na preparação de alimentos para crianças e dietas enterais.

A sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional da fonte de proteína também são fatores a serem considerados na reação de hidrólise, pois interferem na sensibilidade diante do ataque proteolítico e no tipo de peptídeos formados durante a hidrólise (BENÍTEZ *et al.*, 2008).

Adler-Nissen (1985) menciona diversos exemplos da aplicação da hidrólise de proteínas em alimentos como a fabricação de queijos, amaciamento de carnes, maturação e autólise de pescado, produção de extratos de levedura, amaciamento do glúten e prevenção da turvação química da cerveja pelo resfriamento. Alguns processos para fins não alimentícios também foram citados pelo mesmo autor: manufatura do couro e da gelatina, fabricação de detergentes e dissolução de coágulos sanguíneos.

2.3.1 A Hidrólise Enzimática das Proteínas

A hidrólise proteica se realiza normalmente em um reator com controle de agitação, pH, temperatura e tempo do processo. O substrato é dissolvido ou permanece em suspensão em água até que o pH e a temperatura se estabilizem. A adição da protease inicia a hidrólise propriamente dita. À medida que a reação progride, observa-se uma diminuição do pH devido à ruptura das ligações peptídicas. No caso da hidrólise enzimática, o pH deve ser mantido no valor ótimo para a enzima mediante a adição de base diluída. Para finalizar a reação, a enzima pode ser inativada com calor, mediante uma diminuição do pH ou ainda com uma combinação de ambos (BENÍTEZ *et al.*, 2008).

Além da escolha mais adequada do tipo de enzima a ser utilizada, devem-se considerar alguns parâmetros como pH, temperatura, tamanho da partícula e agitação, pois as condições utilizadas no processo influenciam o rendimento da extração. Porém, um exame detalhado da correlação desses parâmetros com as enzimas ainda não está completamente esclarecido (SANTOS e FERRARI, 2005).

Deve ser estabelecida a relação [proteína]/[protease], uma vez efetuado um possível pré-tratamento da proteína se necessário. Devem ser definidas as condições da reação, sendo que as principais variáveis que determinam o resultado da reação são temperatura, pH, relação enzima-substrato e tempo de reação. Os três primeiros fatores determinam a velocidade de reação e podem influenciar na especificidade da enzima. O tempo de reação somente determina o grau final de hidrólise. Os efeitos interativos entre os parâmetros da hidrólise também influenciam na composição do hidrolisado. Se o processo de hidrólise não é controlado, o pH da solução mudará depois do início da hidrólise devido à formação de novos grupos amino, os quais são capazes de liberar ou aceitar novos prótons, dependendo do pH da hidrólise. Em um pH baixo, todos os grupos amino estão

protonados e somente parte dos grupos carboxila estão desprotonados, resultando em uma rede de captação de prótons para cada ligação peptídica quebrada, causando um aumento do pH. Em pH neutro ou alcalino, a hidrólise resulta em uma diminuição do pH, pois todas as carboxilas estão desprotonadas e somente parte dos grupos amino estão protonados. Com a finalidade de prevenir uma mudança de pH durante a hidrólise, a reação deveria ser conduzida em sistema tamponado ou em um sistema de pH-stat no qual o pH se fixa no valor desejado (BENÍTEZ *et al.*, 2008).

Em relação à tecnologia enzimática, existe abundância de matéria-prima a ser utilizada em processos fermentativos e extrativos e enorme quantidade de biomassa a ser transformada por via enzimática em produtos diversificados e de maior valor agregado. O uso e produção de enzimas, em diferentes áreas da agroindústria de alimentos, mostram perspectivas futuras promissoras devido às várias características inerentes à ação das enzimas, que são compostos naturais, biodegradáveis e capazes de desempenhar reações específicas sem produzirem produtos secundários (SANTOS e FERRARI, 2005).

As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas visando à melhoria da sua qualidade nutricional e funcional. Os peptídeos produzidos tem um tamanho molecular menor do que as proteínas. Então, suas propriedades funcionais são diferentes: maior solubilidade na faixa de pH, diminuição da viscosidade, e alterações significativas na formação de espuma, gelificação e propriedades emulsificantes. As propriedades funcionais das proteínas hidrolisadas são reguladas em grande parte pelo tamanho das suas moléculas e por sua hidrofobicidade (HRČKOVÁ *et al.*, 2002). Cheftel e colaboradores (1989) citam alguns exemplos desse processo: hidrólise de soja e outros vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, amaciamento de carnes; hidrólise de caseína, na melhoria da textura de queijos.

Especialmente a protease Alcalase® 2.4L tem sido utilizada na hidrólise de diversas fontes de proteína. Pacheco e colaboradores (2005) utilizaram enzimas, entre elas a Alcalase® 2.4L, com diferentes especificidades em hidrólise extensiva, para verificar a atividade funcional de hidrolisados obtidos a partir do concentrado de soro de leite. Observou-se que o hidrolisado utilizando o sistema enzimático Alcalase® 2.4L teve maior perda de aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína), que poderia estar relacionado às condições mais severas de temperatura e pH (50 °C / pH 8,0) utilizados no processo de hidrólise da proteína.

Santos e colaboradores (2009) obtiveram hidrolisados enzimáticos a partir de duas espécies de pescado (cabrinha e corvina) de baixo valor comercial, tendo como agentes de hidrólise a Alcalase® 2.4L e a Flavourzyme® 500L. Para Alcalase® 2.4L as variáveis que obtiveram maior efeito no processo de hidrólise foram temperatura, pH e concentração do substrato, enquanto que para Flavourzyme® 500L foram pH, concentração da enzima e concentração do substrato. O maior grau de hidrólise obtido para a enzima Alcalase® 2.4L foi de 34,7%, enquanto para a Flavourzyme® 500L foi 30%.

Schmidt e Sallas-Mellado (2009) produziram hidrolisados enzimáticos de carne de frango utilizando as enzimas Alcalase® 2.4L e a Flavourzyme® 1000L. Nesse trabalho, os autores avaliaram a influência das variáveis da hidrólise enzimática: concentração de substrato, concentração de enzima e tempo de hidrólise sobre o grau de hidrólise das proteínas. Obtiveram hidrolisados enzimáticos de peito e coxa de frango com diferentes valores de grau de hidrólise, maiores para os obtidos com a enzima Alcalase 2.4L® quando comparados com os obtidos com Flavourzyme 1000L®. Maiores valores de grau de hidrólise foram obtidos com a carne de peito como substrato, quando comparados com a carne de coxa. Os autores ainda afirmam que a obtenção de hidrolisados com graus de hidrólise diferentes sugere sua aplicação como ingredientes alimentícios, dependendo da propriedade funcional desejada.

Caetano (2012) utilizou as enzimas Neutrase ® 0,8L, Alcalase® 2.4L, Flavourzyme® 1000L e papaína com o objetivo de obter o concentrado proteico, substrato para o desenvolvimento de hidrolisados enzimáticos de proteína. Nesse trabalho, foram preparados a partir do hidrolisado complexos/quelatos de metal-peptídeos. Os resultados demonstraram que, quanto a distribuição de tamanho do perfil de peptídeos, a enzima Alcalase® 2.4L obteve o melhor desempenho em relação as demais enzimas.

Hrčková e colaboradores (2002) observaram especificamente para a proteína de soja, que os hidrolisados produzidos tem várias aplicações em fórmulas nutricionais específicas para adultos, geralmente utilizados em combinação com outros hidrolisados de proteínas ou então com proteínas intactas. Sendo assim, modificações enzimáticas das proteínas de soja poderiam oferecer uma segunda ou terceira geração de produtos que poderiam permitir uma gama ainda mais ampla da utilização dos mesmos. Segundo, Hrčková e colaboradores (2002) tal fato pode ser exemplificado pelo desenvolvimento de

um produto com proteína de soja hidrolisada pela ação da pepsina, o qual poderia ser utilizado em substituição à clara do ovo.

Stenzel (2007) determinou as condições ótimas para a extração da proteína do farelo de soja desengordurado tostado utilizando a enzima Alcalase® 2.4L. Outras conclusões referentes a esse estudo foram que não existe necessidade de se corrigir o pH do meio, nem de uma moagem mais severa do farelo, pois as alterações nesses parâmetros não levaram a alterações significativas nos resultados de solubilização da proteína do farelo de soja.

Além da melhoria das propriedades funcionais e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas pelo tratamento enzimático (BIASUTTI, 2006). Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para a utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois é sabido que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção. Biasutti (2006) ainda afirma que diversos estudos tem demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente pelo organismo do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta apresentando um maior valor nutricional.

Martins (2005) destaca que a hidrólise enzimática é mais adequada em relação aos métodos químicos quando a aplicação é dirigida a fins nutricionais. Os critérios de seleção mais importantes a serem considerados em hidrolisados proteicos incluem valor nutricional, custo, sabor, antigenicidade, solubilidade e funcionalidade.

De acordo com Biasutti (2006), uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática é o desenvolvimento de sabor amargo no decorrer da catálise. Tal fato está relacionado à liberação de grupamentos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas proteicas, ou seja, ao aparecimento de peptídeos que apresentam aminoácidos hidrofóbicos no terminal carboxílico (MARTINS, 2005). Esta característica representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados (MINAGAWA *et al.*, 1989; SAHA e HAYASHI, 2001). Desta forma, fica evidente que a investigação do processo de modificações enzimáticas das proteínas constitui uma etapa importante para se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características organolépticas agradáveis ao consumidor.

2.3.2 A Aplicação dos Hidrolisados Proteicos Enzimáticos

Os hidrolisados proteicos enzimáticos com cadeia polipeptídica curta e massa molar definida são importantes complementos para a alimentação de indivíduos que apresentam dificuldade na digestão de proteínas, alergia e/ou intolerância a proteínas alimentares ou outras patologias associadas ao metabolismo de aminoácidos, como nos casos de doenças crônicas do fígado (falência hepática) e fenilcetonúria (CLEMENTE, 2000). Além disso, também podem ser empregados como suplementos nutricionais para facilitar a assimilação de nitrogênio (MIRA e MARQUEZ, 2000).

Dias (2007) afirma que esses hidrolisados podem ser utilizados como alternativas à alimentação, substituindo as misturas de aminoácidos, incorporados ou não aos alimentos, para tratamento clínico de pacientes, com distúrbios específicos na digestão, na absorção e no metabolismo de aminoácidos. Além disso, essas misturas de peptídeos também são empregadas como matérias-primas de patês, pães, doces, produtos alimentícios fortificados, produtos alimentícios para crianças, alimentos em geral para a saúde, nutrientes para dieta enteral e suplementos para atletas, entre outros.

Segundo Cogan e colaboradores (1981), outra vantagem relacionada ao uso dos hidrolisados proteicos refere-se à sua produção economicamente mais viável do que as misturas de aminoácidos livres (sintéticos). Além disso, estas últimas têm pelo menos três limitações à sua utilização, a saber: o gosto e odor desagradáveis característicos de aminoácidos livres; a alta osmolaridade, o que acarreta um aumento da pressão osmótica intestinal causando diarreia e absorção reduzida, uma vez que os aminoácidos livres não são tão rápida e completamente absorvidos pelo organismo quanto os hidrolisados proteicos (BIASUTTI, 2006; LIRA, 2010).

As fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente di e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, pois estudos do mecanismo de absorção intestinal verificaram que a velocidade de absorção de aminoácidos livres é menor que aquela dos pequenos peptídeos devido à alguns fatores como (KEOHANE *et al.*, 1985, GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; BOZA *et al.*, 2000):

- competição de aminoácidos com moléculas estruturalmente relacionadas pelo mesmo carreador. Assim, a absorção de alguns aminoácidos pode ser inibida por outros,

como, por exemplo, o triptofano inibe a absorção de histidina e a leucina diminui a absorção de isoleucina, fenilalanina e triptofano;

- enquanto os aminoácidos livres parecem ser mais rapidamente absorvidos apenas no intestino delgado proximal, os di- e tripeptídeos o são tanto na porção proximal, quanto distal do intestino delgado.

2.3.3 A Importância Nutricional dos Hidrolisados Proteicos

A introdução na dieta de hidrolisados enzimáticos ricos em pequenos peptídeos pode ser importante, no sentido de propiciar uma melhor utilização das proteínas (AFONSO *et al.*, 2009). Desde 1940, os hidrolisados proteicos têm sido utilizados com finalidades terapêuticas para a manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. Entretanto, na década de 1970, esta utilização registrou expressivo crescimento, que continuou ao longo dos últimos anos, tanto por seus aspectos nutricionais e clínicos, como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas (BARBOSA *et al.*, 2002; DIAS, 2007).

Dias (2007) destaca que, em geral, os hidrolisados são destinados a três grandes grupos alimentares sendo eles:

- formulações infantis para crianças que apresentam alergia à proteína intacta ou algum problema causado por um erro inato do metabolismo;

- formulações especiais para adultos com função gastrointestinal prejudicada ou doenças em órgãos específicos;

- suplementos nutricionais para facilitar a assimilação de nitrogênio.

Além disso, estes preparados enzimáticos podem ser úteis na suplementação dietética de idosos, pacientes HIV positivos, na nutrição de esportistas, como também, em dietas para controle de peso (AFONSO *et al.*, 2009).

Segundo Dias (2007), os hidrolisados proteicos também podem ser eficientemente empregados na complementação alimentar de certas patologias, em que a alimentação via oral não é possível. Nestas situações, a ingestão de alimentos é insuficiente, estando prejudicadas a digestão e a absorção intestinais, fazendo com que a dieta normal se torne ineficaz ou mesmo inadequada.

O valor nutricional dos hidrolisados está diretamente relacionado à natureza da proteína de origem, que deverá ser de alto valor nutricional e ao método de hidrólise que possibilite a obtenção de peptídeos de massas molares diferentes (DIAS, 2007). A avaliação da qualidade nutricional dos hidrolisados proteicos deve envolver a análise dos seus perfis peptídicos (SOARES *et al.*, 2004; LIRA, 2010).

2.3.4 Os Métodos de Caracterização do Perfil dos Aminoácidos de Hidrolisados Proteicos

A determinação dos aminoácidos vem sendo usada, há muito tempo, na pesquisa bioquímica e, mais recentemente, na área de ciência de alimentos, no intuito de melhor se conhecer a composição das proteínas. Sabendo-se que os aminoácidos são unidades estruturais básicas das proteínas, a quantificação e a qualificação dos mesmos tornam-se necessárias, uma vez que, o principal fator determinante da qualidade da proteína é a sua composição em aminoácidos. Portanto, a determinação desta composição é um dos primeiros passos na compreensão da estrutura da molécula da proteína, sendo de grande importância, a análise precisa e quantitativa destes aminoácidos, a fim de se verificar o valor nutricional das proteínas (CARREIRA *et al.*, 2002).

O valor nutricional dos hidrolisados depende da qualidade da proteína utilizada, a qual deverá ser de alto valor biológico, do método de hidrólise e dos tamanhos das cadeias peptídicas nos hidrolisados (SOARES *et al.*, 2004; LIRA, 2010). Os hidrolisados de melhor qualidade devem apresentar elevados teores de di- e tripeptídeos, bem como conter baixos teores de aminoácidos livres (CARREIRA *et al.*, 2002, 2003; SOARES *et al.*, 2004; LIRA, 2010).

Silva (2009) observa que diversos métodos têm sido relatados na literatura visando ao fracionamento de hidrolisados proteicos. Atualmente, em escala laboratorial, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para a caracterização de hidrolisados. Para avaliação da distribuição dos peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, a cromatografia líquida de alta performance de exclusão molecular (SE-HPLC), baseada nas diferenças de volumes hidrodinâmicos das moléculas, tem sido largamente utilizada. A cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC), baseada na diferença da hidrofobicidade, vem sendo, igualmente, empregada na caracterização de hidrolisados proteicos, sendo possível, a partir do perfil cromatográfico, prever a

distribuição das massas molares dos peptídeos. A cromatografia de troca iônica (IE-HPLC), baseada na separação de cargas das moléculas, ou aquela fundamentada na afinidade específica por determinados ligantes (LE-HPLC), é outro método que, também, tem sido utilizado para analisar os hidrolisados proteicos.

A combinação de SE-HPLC e IE-HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica) mostrou grande sucesso na separação de peptídeos fosforilados e desfosforilados no hidrolisado de caseína, além da identificação de mais de 200 destes compostos (LEMIEUX e PIOT, 1990 *apud* SILVA, 2009).

Segundo Silva (2009), o fracionamento de oligopeptídeos apresenta problemas, ainda mais complexos, pois envolve a interação com o suporte cromatográfico. Silvestre e colaboradores (1994 a, b) desenvolveram um método eficiente para este fim, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietilaspartamido)- sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídeos com massas molares menores do que 1 kDa. A espectrofotometria derivada segunda (EDS) foi empregada pelos mesmos autores para analisar hidrolisados de caseína. Com este método, os autores estimaram o grau de hidrólise e a homogeneidade do hidrolisado (presença de hidrolisado protéico ou mistura de aminoácidos).

Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica (HILIC) com coluna PHEA, Carreira e colaboradores (2002) demonstraram a eficiência da metodologia para a separação, identificação e quantificação dos aminoácidos essenciais de hidrolisados de caseína. Segundo os autores, esta técnica apresentou boa linearidade e precisão, mostrando-se como um meio útil para uma avaliação complementar do valor nutricional de hidrolisados proteicos.

Carreira e colaboradores (2003), visando à produção de hidrolisados de caseína para uso como suplemento dietético, empregaram a pepsina para elevar os teores de di- e tripeptídeos. Para a avaliação do melhor perfil peptídico para uso em dietas especiais, os hidrolisados foram fracionados pela SE-HPLC, seguida da quantificação dos peptídeos nas frações cromatográficas pelo método rápido da Área Corrigida da Fração. Os autores concluíram que a ação da pepsina foi mais eficiente na produção de di- e tripeptídeos, quando empregadas as seguintes condições E:S a 4%, pH de 1,9 e temperatura de 37 °C ou 40 °C, resultando em hidrolisados com maiores teores de peptídeos com massa molar

média de 0,5 kDa, menor porcentagem de peptídeos com massa molar maior que 0,8 kDa, bem como o nível mais baixo de aminoácidos livres.

Pretto e colaboradores (2010) avaliaram diferentes metodologias de determinação do perfil peptídico em amostras contendo proteína de soja hidrolisada. O perfil peptídico das amostras proteicas foi obtido por cromatografia líquida de exclusão de tamanho (SE-HPLC), e as frações do eluente (peptídeos e proteínas) foram investigadas por quatro métodos, sendo eles: Fischer (FISCHER, 2006), Sousa Jr. (SOUSA JR. *et al.*, 2003), Silvestre (SILVESTRE *et al.*, 1994 a, b) e Kjeldahl (IAL, 2008), sendo este último utilizado como método de referência para comparação com os demais métodos.

Pretto e colaboradores (2010) descrevem os métodos utilizados:

- Método Fischer: propõe quantificar os peptídeos e proteínas considerando que o percentual de área do cromatograma é diretamente proporcional à concentração do analito;

- Método Sousa Jr.: a quantificação de peptídeos e proteínas é feita por meio do levantamento de curva de calibração utilizando padrões de concentração e massa moleculares conhecidas;

- Método Silvestre: a quantificação é similar ao método Fischer, entretanto a interferência dos aminoácidos aromáticos é eliminada das áreas cromatográficas;

- Método Kjeldahl: proposto por Johan Kjeldahl em 1883, esse método faz a quantificação de proteínas e peptídeos por meio de fracionamento da amostra, seguida da quantificação do nitrogênio liberado após hidrólise ácida.

A partir dos perfis peptídicos obtidos, Pretto e colaboradores (2010) puderam concluir que os métodos que apresentaram maior potencial de utilização para uma ampla faixa de distribuição de tamanhos foram os métodos de Silvestre e de Sousa Jr.

2.4 O Gosto Amargo

Segundo o IAL (2008), sabor e gosto são características sensoriais consideradas como uma experiência mista, mas unitária de sensações olfativas, gustativas e táteis percebidas durante a degustação. O gosto é percebido, principalmente, por meio dos sentidos do gosto e olfato, também influenciado pelos efeitos táteis, térmicos, dolorosos e/ou cinestésicos.

O gosto específico de cada alimento está fortemente relacionado com seus componentes extrativos. Segundo Fuke e Konosu (1991), estes componentes são caracteristicamente solúveis em água, possuem baixa massa molecular e são classificados em compostos nitrogenados e não nitrogenados, com exceção de vitaminas, pigmentos e minerais. Os amoníacos livres contribuem com a maior parte destes compostos, os quais tem sido responsabilizados pela determinação do sabor, juntamente com os nucleotídeos. Dessa forma, os sabores podem ser relacionados com alguns aminoácidos:

- adocicado: glicina, alanina, treonina, prolina, serina e glutamina;

- amargo: fenilalanina, tirosina, arginina, leucina, isoleucina, valina, metionina e histidina;

- umami e ácidos: glutamato e ácido aspártico.

Drewnowski e Gomez-Carneros (2000) atentam-se para o fato de que os estudos de que se referem ao consumo e comercialização de alimentos invariavelmente demonstram que o gosto, com exceção a questões de nutrição e saúde, é a influência principal na seleção dos alimentos. A amargura geralmente é equiparada com questões de perigo pois remetem a gorduras ranças, proteínas hidrolisadas, derivados de alcalóides, fermentação microbiana e alguns vegetais que possuem gosto amargo característico.

O desenvolvimento de gosto amargo no decorrer da catálise é considerado uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática. Acredita-se que tal fato decorra da exposição de aminoácidos hidrofóbicos ao ambiente aquoso, pois a massa molar dos peptídeos é tal que eles não podem se esconder dentro da molécula protéica, o que ocorreria normalmente na proteína intacta. A intensidade desse sabor depende do grau de hidrólise e da especificidade da protease, ou seja, do tamanho dos peptídeos gerados e da intensidade da quebra das ligações (HALL e AHMAD, 1992).

Salado (1997) observa que os hidrolisados enzimáticos de caseína e soja são frequentemente amargos, e os peptídeos que conferem esse sabor podem ser isolados. É possível determinar o grau de amargor de um hidrolisado protéico, em função do grau de hidrofobicidade das cadeias laterais dos aminoácidos que entram na composição da proteína. O grau de amargor dos aminoácidos e das cadeias peptídicas pode ser estimado pela determinação do valor médio de hidrofobicidade $Q = \Delta F$ em que ΔF é a variação na energia livre em cal/mol, para a cadeia lateral de um aminoácido passar de uma solução alcoólica para a água. Assim, proteínas que apresentam altos valores Q , como caseína e a

soja, são propensas a produzir hidrolisados amargos, enquanto outras com baixo valor Q, não formarão peptídeos amargos.

Os peptídeos com gosto amargo isolados de hidrolisado enzimático de soja, são principalmente os que contém 2, 3 ou 4 resíduos de aminoácidos, contendo principalmente leucina e fenilalanina. Arginina, fenilalanina, valina, leucina e isoleucina são aminoácidos amargos típicos com diferentes potência de amargor (TAMURA *et al.*, 1990).

Salado (1997) verificou que 37,8% dos aminoácidos obtidos no hidrolisado proteico de soja eram compostos por leucina e fenilalanina, o que explica o desenvolvimento do sabor amargo. Devido à isso, foi descartada a possibilidade do consumo do hidrolisado obtido como suporte por via oral em pacientes desnutridos.

Stroher e colaboradores (2009), utilizando a metodologia de hidrólise do farelo de soja proposta por Stenzel (2007), realizaram a análise sensorial do hidrolisado adicionado a néctares de frutas e detectaram o forte sabor amargo, resultante da liberação de grupos hidrofóbicos. Os autores confirmam a necessidade de algum procedimento que reduza ou mascare o amargor de hidrolisados protéicos para a produção de um hidrolisado com características mais agradáveis ao paladar do consumidor.

2.4.1 A Redução/Remoção do Gosto Amargo dos Hidrolisados

Desde que se sabe que os peptídeos amargos são produzidos durante a hidrólise enzimática, as primeiras tentativas feitas para reduzir a produção de peptídeos amargos durante o processo alteraram as enzimas e/ou as condições da reação (TAMURA *et al.*, 1990). Já Biasutti (2006) observa que outros estudos tem utilizado alguns procedimentos para prevenir, remover, eliminar ou mascarar o sabor amargo dos peptídeos que limitam a aceitabilidade dos alimentos proteicos.

Saha e Hayashi (2001) citaram diversos procedimentos como tratamento com carvão ativado, extração com álcool, precipitação isoelétrica, separação cromatográfica, condensação dos peptídeos de sabor amargo utilizando protease e mascaramento do sabor amargo utilizando glutamato monossódico, polifosfatos e ciclodextrinas. Outro procedimento eficientemente utilizado é a inclusão em lipossomas e em lipoesferas para mascarar o sabor amargo de hidrolisados enzimáticos de caseína, obtidos pela ação da papaína (MORAIS *et al.*, 2003, 2005).

Tossavainen e colaboradores (1996) removeram o sabor amargo da proteína residual da β -lactoglobulina de um hidrolisado de soro de leite com a adsorção em uma resina de poliestireno.

Peptídeos hidrofóbicos têm solubilidade muito baixa próximo ao pH do ponto isoelétrico da proteína. Eles podem ser removidos por precipitação isoelétrica (ajuste do pH) (ADLER-NISSEN, 1985). Visser e colaboradores (1975) demonstraram que a cromatografia em sílica gel utilizando um solvente orgânico como álcool propil como parte do eluente possibilita a purificação das frações que causam o gosto amargo da caseína e é muito promissor para o fracionamento de peptídeos de sabor desagradável do queijo.

Noguchi e colaboradores (1975) propuseram o mascaramento do sabor amargo utilizando o glutamato monossódico e alguns oligopeptídeos glutâmicos. Ciclodextrinas podem mascarar o sabor amargo pela inclusão dos grupos hidrofóbicos dos peptídeos dentro do anel da sua estrutura (TAMURA *et al.*, 1990; LINDE *et al.*, 2010).

Uma outra maneira de se reduzir ou eliminar o contato destes grupos hidrofóbicos com as papilas gustativas poderia ser pelo emprego da tecnologia de encapsulamento dos hidrolisados proteicos.

Segundo Barbosa e colaboradores (2002), vários sistemas têm sido utilizados com esta finalidade, especialmente na indústria farmacêutica, visando à melhoria da estabilidade, liberação prolongada do princípio ativo e, ainda, direcionamento do princípio ativo no seu sítio de ação. Por outro lado, com relação à indústria alimentícia poucos trabalhos foram publicados a respeito do uso da tecnologia de encapsulamento.

A superioridade das lipoesferas se destaca como sistemas de encapsulamento frente a outros, a qual estaria relacionada a alguns fatores, tais como melhor estabilidade, uso de ingredientes de baixo custo, fácil preparo em grande escala, alta dispersibilidade em meios aquosos e elevada taxa de encapsulamento de substâncias hidrofóbicas. Considerando estas vantagens, seria interessante testar seu emprego no encapsulamento de produtos alimentícios, tais como os hidrolisados proteicos para fins dietéticos (BARBOSA *et al.*, 2002).

Barbosa e colaboradores (2002) desenvolveram uma nova tecnologia para o mascaramento do sabor amargo de hidrolisados de caseína, obtidos pela ação da papaína, baseada no encapsulamento em lipoesferas. Utilizando a espectrofotometria, os autores

obtiveram uma taxa de encapsulamento em torno de 66%, fato que relaciona a eficiência da tecnologia em reduzir a hidrofobicidade e o sabor amargo de hidrolisados de caseína.

Já a encapsulação dos hidrolisados proteicos em lipossomas destaca-se por sua capacidade em encapsular materiais hidrofóbicos, hidrofílicos e anfifílicos, e também pela sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, sendo constituídos por fosfolípidios, comumente presentes nas membranas celulares. A solubilização dos lipossomas pelos sais biliares constitui outra vantagem, quando se deseja a incorporação de moléculas neste sistema e sua liberação no trato intestinal. Além disso, a grande variação do pH, ao longo do trato gastrintestinal, induz várias modificações físicas e químicas na estrutura das vesículas, alterando a permeabilidade das membranas e, assim, contribuindo para a liberação do material encapsulado. Outra vantagem associada ao emprego de lipossomas refere-se à preservação da qualidade nutricional dos hidrolisados (MORAIS *et al.*, 2003).

Morais e colaboradores (2003) utilizaram a encapsulação em lipossomas para mascarar o sabor amargo de hidrolisados de caseína. Por meio da microencapsulação foi possível reduzir o índice de hidrofobicidade e mascarar o sabor amargo destes hidrolisados, devendo ser testado em larga escala. A eficiência do método utilizado foi verificada pela determinação da taxa de encapsulação de hidrolisados proteicos, observando-se um valor médio de 59%. A análise por microscopia eletrônica de varredura revelou a morfologia esférica das vesículas, e a medida da oxidação lipídica revelou boa estabilidade química por um período de até 60 dias.

A plasteína é uma reação que ocorre de modo reverso à hidrólise usual de proteínas. Esta reação tem sido usada para reduzir o sabor amargo de hidrolisados protéicos e melhorar o valor nutricional de proteínas por meio da incorporação de éster-aminoácidos (MARTINS, 2005).

A reação de síntese de plasteína é um processo de modificação enzimática que ocorre de modo reverso à hidrólise usual catalisada por proteinases. Operacionalmente, a formação de plasteína tem sido definida como a formação de material insolúvel em solução de TCA 10%, etanol 70% ou acetona. Esta reação tem sido utilizada para as proteínas de soja e, em menor grau, para caseína, ovalbumina, proteínas de soro lácteo, concentrado protéico de peixe e outras fontes proteicas não convencionais (MARTINS, 2005).

Li e colaboradores (2010) observaram que a reação de plasteína foi bastante utilizada para remover o amargor de hidrolisados de proteína, melhorar o valor nutricional

de proteínas deficientes em aminoácidos essenciais, diminuir o conteúdo de alguns aminoácidos (por exemplo, fenilalanina) para fins dietéticos, modificar as propriedades funcionais de proteínas alimentares, e mais recentemente, aplicado em hidrolisados de proteína para melhorar a sua bioatividade.

Embora a reação de síntese de plasteína tenha sido descrita há mais de 100 anos, os mecanismos envolvidos na reação ainda não estão completamente elucidados. Segundo Li e colaboradores (2010), três mecanismos foram inicialmente sugeridos como condensação, transpeptidação e forças físicas, embora trabalhos recentes sugerem que a reação pode ocorrer por vários caminhos ao mesmo tempo.

Na década de 70, alemães e japoneses publicaram diversos trabalhos envolvendo a reação de plasteína e os mecanismos envolvidos nesta reação. Neste período, a reação de plasteína foi considerada um processo reverso à hidrólise enzimática tradicional, tendo como substrato uma elevada concentração de peptídeos, os quais eram condensados resultando em um novo material protéico de alta massa molar (MARTINS, 2005).

Martins (2005) produziu hidrolisado de isolado proteico de soja (IPS) em sistema descontínuo, com 5% de substrato, relação enzima/substrato 1/20, 6 horas, 37 °C, sob agitação. Já a plasteína foi produzida com 40% de substrato em solução aquosa, pH 7, 24 horas a 37 °C, sob repouso. O hidrolisado apresentou perfil cromatográfico com 5 frações de massa molar na faixa de 5,4 a 66,2 kDa e a plasteína com 2 frações de massa molar na faixa de 9,6 e 58,7 kDa.

Para Martins (2005), a modificação enzimática pela reação de hidrólise e de síntese de plasteína mostrou ser um processo viável na produção de matéria-prima para ser aplicada em formulações de uso em nutrição clínica e em outros sistemas alimentares nos quais é necessário o uso de peptídeos de massa molar variada. Porém, a autora salienta a necessidade da suplementação de metionina quando utilizada como fonte exclusiva de proteína.

Souza e colaboradores (2000), visando ao aproveitamento de fontes proteicas de baixo custo (folha de mandioca, soro de queijo e soja), testou a reação de plasteína para obtenção de um produto com propriedades físico-químicas e nutricionais satisfatórias para fins na alimentação humana. Os autores obtiveram os teores de proteína da ordem de 54,70% para o isolado proteico de folha de mandioca; 83,16% para o isolado proteico de soja e 64,70% para o concentrado proteico de soro ultrafiltrado. O processo de ressíntese

foi realizado com a mistura dos hidrolisados na proporção de 2:2:1 (isolado proteico de soja/concentrado proteico de soro ultrafiltrado/isolado proteico de folha de mandioca) e os teores de proteína obtidos foram da ordem de 52,6% para a plasteína precipitada e 72,0% para o sobrenadante de plasteína. Pela composição aminoacídica, pode-se constatar que tanto as matérias-primas quanto os produtos obtidos nessas reações podem ser considerados boas fontes de aminoácidos essenciais, principalmente para adultos e criança após o desmame. Ainda os autores destacam que a reação de plasteína proporcionou uma melhoria na qualidade proteica das fontes alternativas por eles utilizadas.

Li e colaboradores (2010) prepararam hidrolisados de caseína utilizando Alcalase®, os quais foram submetidos à reação de plasteína na presença de prolina. Utilizando uma concentração de 35% (m/m) e tempo de reação de 6 h, as condições ótimas encontradas para a reação de plasteína foram temperatura de 48 °C, adição de prolina na ordem de 0,54 mol/mol de grupos amino livres do hidrolisado de caseína e adição da Alcalase® 9,5 kU/g de proteínas. Os resultados mostraram que a atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ACE) dos preparados de plasteína na presença de prolina apresentaram mudanças durante a extensão da reação, devido à ligação entre a prolina e o carbono terminal dos peptídeos. Concluíram que a adição de prolina na reação de plasteína dos hidrolisados de caseína catalisada pela Alcalase® proporcionou maior atividade inibitória da ACE.

A seguir, estão detalhados os métodos utilizados nesse trabalho para a redução/mascaramento do sabor amargo desenvolvido durante a reação de hidrólise.

2.4.1.2 O Tratamento com Carvão Ativado

O carvão ativado é um dos adsorventes mais utilizados por apresentar uma grande área superficial, uma alta reatividade de superfície, estrutura interna acessível e alta resistência mecânica (COUTINHO *et al.*, 1998).

Trata-se de uma forma de carbono tratado cuja estrutura é constituída por um conjunto irregular de camadas de carbono e os espaços entre as camadas constituem a porosidade do material. Esta constituição evita a formação de grafite, mesmo quando o carvão é aquecido a 300 °C. Tal característica contribui para a sua propriedade adsorvente mais importante, isto é, a presença de uma estrutura porosa interna altamente desenvolvida

instante de tempo. Em seguida, decorrido um intervalo de tempo, o sólido próximo à entrada, torna-se saturado e a maior parte da transferência de massa ocorre no interior do leito. A ZTM desloca-se em direção ao final do leito com o decorrer do tempo, até a sua completa saturação (BARROS, 2003).

A adsorção de um sistema contínuo permite a construção de uma curva de ruptura que é obtida pela relação gráfica entre a razão da concentração do material em um determinado tempo e a concentração inicial em função do tempo de operação da coluna, até a completa saturação. O ponto de ruptura C_b e a ZTM, na qual acontece a maior parte da adsorção em um determinado tempo, são demonstrados na curva de ruptura da Figura 2. Em um dado tempo, t_3 , quando quase a metade do leito está saturado com soluto, a concentração de saída da coluna é próxima de zero e continua assim até que a ZTM alcança a saída da coluna no tempo t_4 . A partir de t_4 a concentração de saída, começa a aumentar até t_5 , chegando, então, ao ponto C_b , o qual é chamado de tempo de ruptura, ou seja, a capacidade máxima da coluna. Em seguida, a concentração C aumenta rapidamente até o ponto C_d . A partir de t_5 o leito torna-se ineficaz (GEANKOPLIS, 1993; BARROS, 2003).

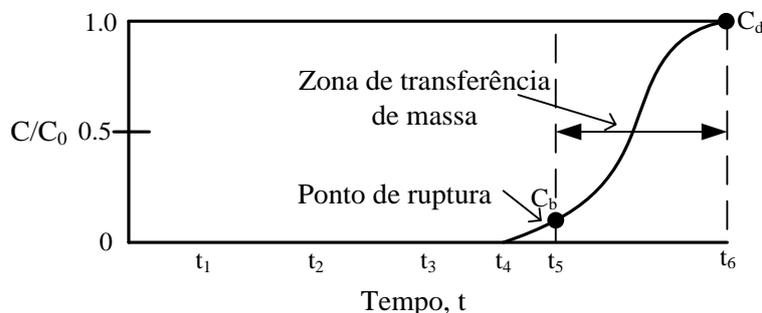


Figura 2: Perfil de concentração da curva de ruptura na saída do leito (GEANKOPLIS, 1993).

De acordo com Mussatto e Roberto (2004), os carvões ativados têm se mostrado altamente eficientes na remoção de compostos que transmitem cor e odor, e na remoção de metais e compostos orgânicos de baixa massa molar. Desta forma, os carvões ativados têm sido usados em tratamentos como, purificação, desintoxicação, desodorização, filtração, descoloração, declorificação, remoção ou modificação de sabor e concentração de uma infinidade de materiais e substâncias líquidos e gasosos.

Na indústria de alimentos é usado, por exemplo, na purificação de óleos, clarificação de glicose, açúcar e gelatinas. É amplamente aplicado na redução de cor, via a adsorção de elementos corantes presentes no produto tratado, ou de compostos orgânicos dissolvidos e indesejáveis. Quando se deseja purificar vodca, usa-se o carvão ativado para remover os ingredientes que comprometeriam a pureza da bebida. Do mesmo modo na clarificação de vinhos e sucos, transformando-os em produtos mais límpidos, padronizando a tonalidade da cor desejada. Outras aplicações mais comuns se referem às indústrias farmacêutica e química, além do tratamento de ar, água e efluentes (MUCCIACITO, 2006).

Mussatto e Roberto (2004) demonstraram a influência dos diferentes tipos de carvão ativado utilizados no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. O material favoreceu a adsorção dos compostos tóxicos ao metabolismo microbiano, contribuindo para melhorar os resultados da bioconversão de xilose a xitolol pela levedura *Candida guilliermondii*.

Murray e Baker (1952) demonstraram que o tratamento dos hidrolisados enzimáticos de caseína com carvão ativado resultou em uma melhoria substancial do sabor dos produtos.

Cogan e colaboradores (1981) relataram que o mascaramento do sabor amargo do hidrolisado de caseína tratado com carvão ativado foi acompanhado de uma perda seletiva de triptofano (63%), fenilalanina (36%), e arginina (30%). Adição de quantidades de triptofano e fenilalanina ao hidrolisado submetido ao tratamento com carvão ativado melhorou sua qualidade nutricional, o que possibilitou a produção de um hidrolisado de caseína de alto poder nutritivo e paladar aceitável.

Segundo Lopes Jr (2008), o carvão ativado foi utilizado com eficiência para a remoção de fenilalanina de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado (93,6 a 99%), de soro de leite em pó, de arroz (85 a 100%), de fubá de milho (68,63 a 97,55%) e de farinha de arroz.

Soares e colaboradores (2004), visando ao desenvolvimento de formulações dietéticas especiais para fenilcetonúricos, empregaram o carvão ativado para a remoção de fenilalanina de hidrolisados enzimáticos de leite em pó. Foram testados os tratamentos em béquer e em coluna consituída por seringa descartável e a avaliação da remoção do aminoácido foi realizada por espectrofotometria. O carvão ativado mostrou-se eficaz na

remoção de fenilalanina (94 a 98%) dos hidrolisados enzimáticos produzidos, sendo que o tratamento em coluna foi mais vantajoso do que em béquer. Das condições testadas, o tratamento em coluna por corrida direta com 90g de carvão hidratado por grama de caseína, em seringa de 20 mL, propiciou elevada remoção de fenilalanina (98%) e maior praticidade.

Silva e colaboradores (2005), por meio do procedimento de passagem por coluna contendo carvão ativado, removeram a fenilalanina dos hidrolisados enzimáticos de soro de leite em pó produzidos com a pancreatina imobilizada em carvão ativado e em alumina. O percentual de remoção de fenilalanina variou de 84% a 95%. As perdas de tirosina foram, em média, de 45% e de 70% nos hidrolisados produzidos pela pancreatina imobilizada em carvão ativado e em alumina, respectivamente. As perdas de triptofano foram de 64% e de 63% nos hidrolisados produzidos nas mesmas condições.

Capobianco (2006) obteve hidrolisados enzimáticos de extrato proteico de fubá de milho com teor final de fenilalanina (18,80 a 240,75 mg fenilalanina/100 g de hidrolisado) dentro do limite máximo permitido pela legislação brasileira. A remoção do aminoácido neste trabalho foi avaliada mediante o estudo de diversos parâmetros, tais como concentração do extrato proteico, relação E:S, emprego da liofilização, relação proteína: carvão e modo de emprego do carvão ativado.

Lopes Jr (2008) utilizou o carvão ativado na remoção da fenilalanina de hidrolisados proteicos de feijão, sob diversas condições hidrolíticas, obtendo teores de remoção que variaram de 25,43 a 87,93%. O melhor resultado obtido foi o ensaio em que empregou a protease *Papaya carica* na relação E:S de 10:100, relação proteína:carvão ativado de 1:88, pH inicial a 8,4 e temperatura de 50 °C; originando um hidrolisado proteico de feijão com teor final de 433,7 mg de fenilalanina/100g, que pode ser utilizado parcialmente na reconstituição do feijão, permitindo sua inserção na dieta de fenilcetonúricos.

2.4.2.1 A Adição das Ciclodextrinas

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos constituídos de unidades de glicopiranosose unidas por ligações α -(1,4). Estes compostos são também conhecidos como

cicloamilose, ciclomaltose ou dextrinas de Schardinger (SZEJTLI, 1988; SZENTE E SZEJTLI, 2004).

As ciclodextrinas têm a forma de um tronco de cone conforme mostrado na Figura 3, com um interior relativamente não polar comparado à água. Isto permite a formação de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e substâncias orgânicas, conferindo aos complexos maior estabilidade física e química. Tais propriedades permitem a aplicação desta tecnologia em diversas áreas como de alimentos, cosmética, farmacêutica, agrícola, analítica, entre outras (MATIOLI, 1997; TARDIOLI, 1998; MATIOLI *et al.*, 2001).

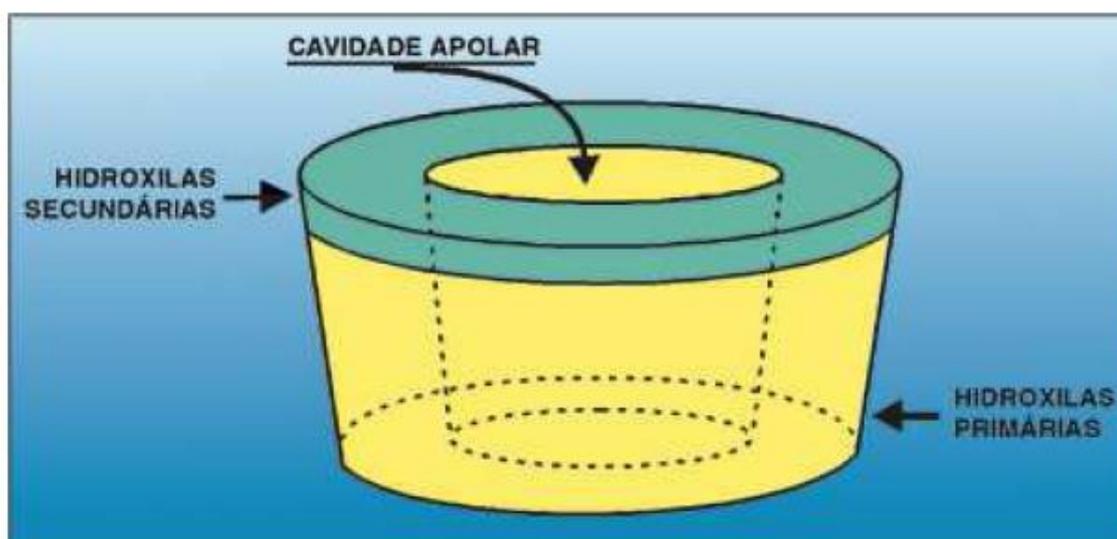


Figura 3: Característica estrutural das ciclodextrinas (SZEJTLI, 1988).

O tamanho da cavidade constitui o fator determinante através do qual as CDs são utilizadas para complexar outras moléculas. Se a espécie investigada tiver dimensões maiores que as da cavidade, conforme mostrado na Figura 4, ela não consegue entrar completamente na mesma e, se tiver dimensão muito pequena, ela acaba por passar pela cavidade sem ser complexada. O hóspede e o hospedeiro podem se associar sem quaisquer interações específicas, sendo o processo determinado pela forma, isto é, pela estrutura e pelo tamanho da molécula envolvida. A molécula de α -CD apresenta menor cavidade sendo incapaz de acomodar moléculas grandes, ao contrário do que ocorre com a β - e γ -CD. A β -CD possui cavidade com tamanho adequado para conter uma ou duas moléculas de um grande número de substâncias com atividades farmacológicas (MACEDO, 2010).

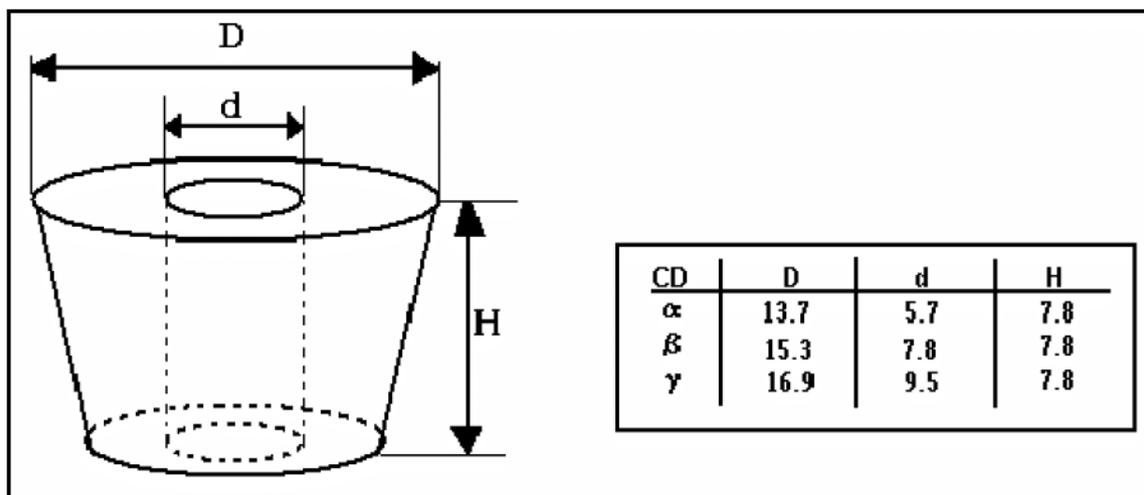


Figura 4: Representação molecular das CD na forma de um cone truncado, com as dimensões aproximadas em ângstrons (SZEJTLI, 1988).

As CDs também foram utilizadas em processos como a eliminação ou redução de sabores e odores indesejados, inclusão de toxinas e contaminantes microbiológicos, a transformação de líquidos em pós facilitando o manuseio com formulações padronizadas e a redução de embalagens reduzindo os custos envolvidos na cadeia produtiva (SZEJTLI, 1988; SZENTE e SZEJTLI, 2004).

Astray e colaboradores (2009) explicaram a relação entre energia e os mecanismos de inclusão. A inclusão de uma molécula “hóspede” em uma cavidade de ciclodextrina consiste basicamente em uma substituição das moléculas de água induzida pela molécula menos polar “hóspede”. O processo é energeticamente favorecido pelas interações da molécula “hóspede” com a cavidade hidrofóbica do hospedeiro. Neste processo, entropia e entalpia têm uma papel importante.

Apesar do fato da “força dirigida” de complexação não ser ainda completamente compreendida, Astray e colaboradores (2009) sugerem que esteja relacionado à vários efeitos:

- Substituição das interações energeticamente desfavorecidas polar-apolar (entre a água inclusa e a cavidade de CD, por um lado, e entre a água e a molécula “hóspede” por outro) pela interação apolar-apolar mais favorecida (entre o hóspede e a cavidade), e a interação polar-polar.
- Tensão do anel da ciclodextrina liberada na complexação.

- van der Waals e interações do tipo ligações de hidrogênio entre a molécula “hóspede” e a molécula “hospedeira”.

Miertus e colaboradores (1999) pesquisaram a modelagem da inclusão molecular de 20 aminoácidos em β -CD. Os resultados para os aminoácidos com cadeia lateral cíclica ou aromática e fracamente polar como prolina, fenilalanina, tirosina, histidina e triptofano indicaram formação de complexos de inclusão com fortes interações hidrofóbicas. Os pentapeptídeos destes aminoácidos mostraram também tendência de formação de complexos de inclusão com β -CD com fortes interações hidrofóbicas. Houve ainda um aumento da energia de inclusão com o aumento da cadeia lateral dos aminoácidos, sendo o triptofano o que apresentou maior interação energética para a formação do complexo de inclusão com β -CD.

O hidrolisado de caseína do leite, apesar de ser uma fonte de proteína facilmente digestiva, tem seu uso limitado por possuir sabor amargo acentuado. Suzuki (1975) citado por Szejtli (1988) demonstrou que a adição de 10% de β -CD ao hidrolisado de caseína do leite pode eliminar o seu sabor amargo. Isso possibilita a utilização de proteínas que não são usuais para o consumo humano. Szejtli (1988) cita como exemplos o extrato de ginseng e de propileno glicol, cujo amargor é eliminado pela adição de ciclodextrinas.

Tamura e colaboradores (1990) removeram o amargor de uma mistura sintética de aminoácidos por meio da adição de α -CDs. Segundo os autores, a quantidade de 1,5 eq. de α -CD não é suficiente para mascarar o sabor amargo da mistura de aminoácidos, pelo fato de as moléculas serem maiores do que a capacidade que a cavidade dessa CD tem em incluir moléculas, sendo necessário um excesso do aditivo.

Colauto (2008) utilizando aminoácidos puros e individuais observou que a presença das α - e β -CDs alterou a sensação dos aminoácidos na boca. A autora detectou a adstringência das soluções de fenilalanina e de triptofano na boca. Na presença da α -CD, essa sensação foi reduzida na solução de fenilalanina e, eliminada na solução do triptofano. Quanto ao aminoácido fenilalanina, caracterizado como sabor ácido com residual amargo, observou uma alteração para gosto metálico na presença de α -CD devido às modificações estéricas, e uma alteração para gosto levemente doce na presença de β -CD.

Para Linde e colaboradores (2010), a β -CD é mais eficiente do que a α -CD para alterar o gosto da fenilalanina e do triptofano, que são os aminoácidos livres que exibem

gosto amargo mais acentuado. Tal fato pode ser relacionado à maior cavidade da β -CD que permite a entrada da cadeia lateral do aminoácido.

Hou e colaboradores (2011) determinaram as melhores condições de adição de β -CD em hidrolisado de isolado proteico de soja de modo a minimizar o amargor deste e manter o potencial antioxidante dos peptídeos.

Monge Neto (2013) avaliou a interação dos peptídeos presentes no hidrolisado enzimático de farelo de soja com α -, β - e γ - CDs a fim de reduzir o amargor, adicionadas ao hidrolisado nas frações mássicas de 1,5%, 2,0% e 2,5%, respectivamente. As análises de RMN H1 mostraram indícios de fortes interações de regiões aromáticas e alifáticas dos peptídeos com as cavidades internas das ciclodextrinas. O autor ainda verificou, por meio de análise em língua eletrônica, que α - e β - CDs adicionadas ao hidrolisado nas concentrações de 1,5% e 2,0% (m/m), respectivamente, provocam a maior diferença em relação ao hidrolisado controle.

A avaliação dos complexos de ciclodextrinas com vários substratos orgânicos é uma etapa de suma importância. A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais informativas pois fornece evidências diretas da formação desses complexos. A razão para isso é que a presença da molécula hóspede, quando inserida na cavidade interna das ciclodextrinas, causa mudanças no ambiente químico dos hidrogênios internos (H3 e H5), mas não nos hidrogênios externos (H1, H2 e H4). Em adição, a interação da molécula hospedeira com a cavidade da ciclodextrina pode causar variação no deslocamento químico dos hidrogênios da molécula incorporada na cavidade (FRACETO *et al.*, 2007).

Segundo Cavanagh e colaboradores (2007) um espectro de RMN característico de peptídeos apresenta picos nas regiões conforme especificado na Figura 5. Nela, pode-se observar que os picos de regiões hidrofóbicas de aminoácidos, aromáticos e alifáticos, vibram entre 8 e 6,5 ppm e entre 3 e 0 ppm, respectivamente.

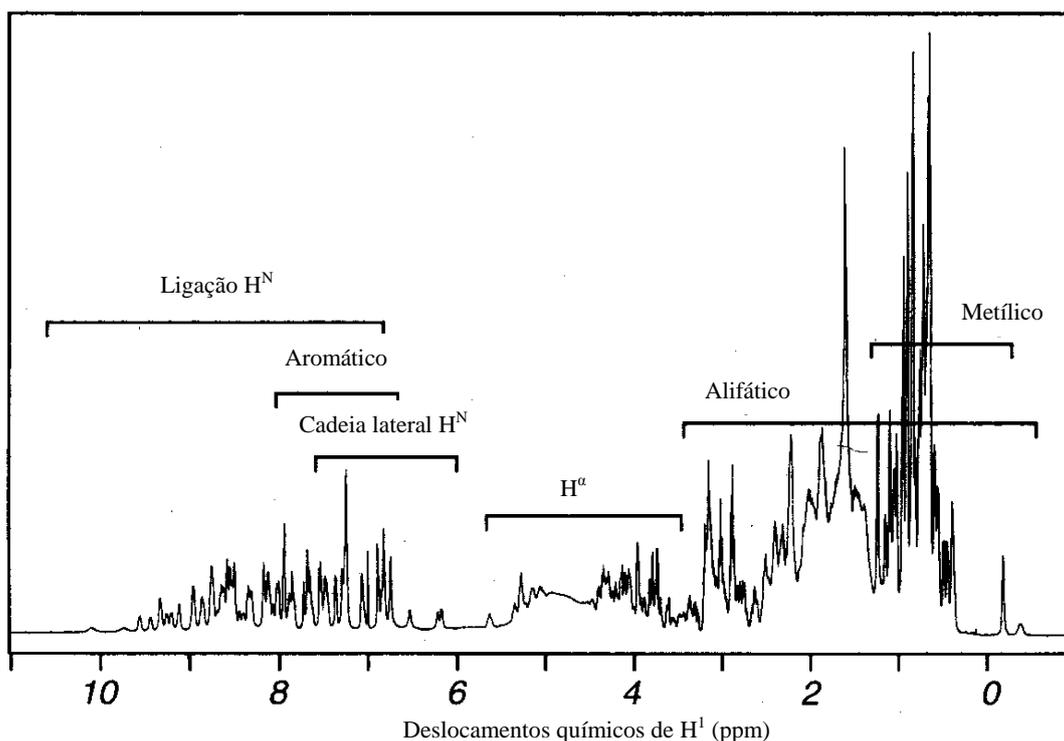


Figura 5: Dados de RMN característico de peptídeos (CAVANAGH *et al.*, 2007).

Diante dessa revisão bibliográfica, verifica-se a importância das pesquisas envolvendo a extração da proteína bem como a redução do amargor de hidrolisados enzimáticos.

Por sua vez, a escolha do farelo de soja como substrato da reação foi feita por ser uma fonte de proteínas, e também por sua grande disponibilidade como subproduto da indústria extratora do óleo de soja.

Quanto à escolha do método químico de reação, optou-se pelo processo de hidrólise enzimática das proteínas, que além de ser o mais indicado quando o hidrolisado é produzido com finalidades nutricionais, proporciona condições mais moderadas de processo e pouca ou nenhuma reação lateral ou produto indesejáveis, sendo possível produzir hidrolisados com perfil de peptídeos bem definido.

A enzima utilizada foi a Alcalase ® 2.4L que se mostrou uma alternativa eficiente na extração da proteína do farelo de soja, produzindo hidrolisados com possível uso como ingrediente alimentar.

Em relação aos tratamentos utilizados para redução/remoção do amargor do hidrolisado, optou-se pelo tratamento com carvão ativado e com as ciclodextrinas por serem comprovadamente eficazes nas mudanças das características sensoriais desse hidrolisado de farelo de soja, dando continuidade aos trabalhos desse grupo de pesquisa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Farelo de soja

O farelo de soja desengordurado tostado utilizado nos experimentos foi cedido pela indústria de extração de óleos da Cocamar® Cooperativa Agroindustrial, situada na cidade de Maringá, Paraná. Após a extração do óleo, o farelo foi submetido à dessolventização com vapor. Neste ponto do processo o material foi coletado à temperatura em torno de 60 °C.

3.1.2 Enzima

A enzima utilizada nesses experimentos foi a Alcalase® 2.4L (EC 3.4.21.62), adquirida da Novozymes Latinamerica.

Para a dosagem de proteína da enzima, foi utilizada uma diluição de 1 mL da solução enzimática em 100 mL de água destilada e a concentração de proteína foi determinada pelo Método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

3.1.3 Carvão Ativado

O carvão ativado utilizado nos ensaios foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) na forma granular. Por meio do processo de peneiramento, caracterizou-se as partículas que estavam na faixa de 8 a 20 mesh e calculou-se o diâmetro médio do material, que foi de 1,61 mm.

Para a utilização nos ensaios, o material foi lavado com água deionizada até a completa eliminação da coloração escura do sobrenadante. Após este procedimento, o carvão ativado foi submetido ao processo de secagem em estufa mantida a 50 °C até peso constante.

3.1.4 Ciclodextrinas

A α -ciclodextrina (Wacker Cavamax® W6) e a β -ciclodextrina (Wacker Cavamax® W8) foram cedidas pela Wacker®.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de Açúcares

O farelo de soja coletado foi submetido ao processo de extração de açúcares (carboidratos) baseado na metodologia de Siqueira e colaboradores (2013). O procedimento foi realizado por meio de uma solução aquosa de etanol a 70% (V/V). Utilizou-se a proporção 1:4 (m/V) de farelo de soja : solução de etanol. A dispersão foi mantida em ebulição por meio de mantas de aquecimento, por um período de 4 horas sob agitação magnética. Um condensador acoplado ao sistema fazia o reciclo da solução alcoólica que evaporava.

Ao final do processo, o material era filtrado e seguia para o processo de secagem em estufa a 50 °C até peso constante.

3.2.2 Hidrólise Enzimática do Farelo de Soja

A metodologia seguida foi baseada no estudo e nos resultados de Stenzel (2007) e Stroher e colaboradores (2011).

Com a finalidade de se encontrar a condição ótima dessa reação em relação à concentração de proteína solubilizada, foram testadas diferentes concentrações de enzima adicionada (0,00; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00% proteína enzimática/proteína contida no farelo em base úmida) e diferentes tempos de reação (1, 2 e 3 horas).

Os ensaios foram realizados em triplicata. Conforme mostra a Figura 6, as suspensões foram preparadas em frascos *erlenmeyers* utilizando-se 10 g de farelo de soja em 100 mL de água destilada. A solubilização enzimática foi realizada no pH da suspensão, que era próximo de 6,5. Nessa etapa de preparação, retirava-se uma alíquota da amostra para a quantificação de proteína solúvel presente na solução. A enzima Alcalase®

2.4L foi acrescentada à suspensão na concentração determinada. Os frascos *erlenmeyers* foram levados a uma incubadora que havia sido ajustada à temperatura de 60 °C e 100 rpm de agitação, onde permaneceram por um período determinado. Após finalizada a reação de hidrólise, os recipientes foram levados a um banho termostático ajustado a 90 °C por 15 minutos, para a inativação da enzima e assim encerrar a atividade enzimática. Ao final desse procedimento, o material era filtrado e retirava-se uma alíquota a fim de determinar a quantidade de proteína solubilizada.

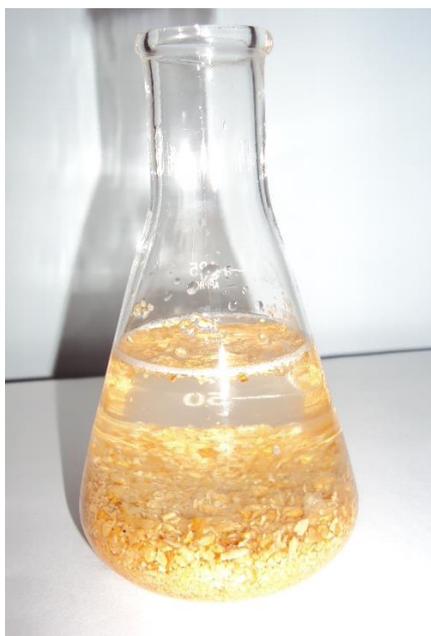


Figura 6: Preparo das dispersões na razão de substrato de 10% (m/V).

Para cada ensaio era feita uma reação controle, ou seja, nas mesmas condições do experimento, porém sem a adição da enzima. O objetivo desse procedimento foi determinar a quantidade de proteína solubilizada pela enzima e compará-la com a quantidade que foi solubilizada pela água.

3.2.2 Determinação do Teor de Proteína em Solução

A quantidade de proteína solubilizada foi determinada a partir da concentração de proteína em solução, obtida por meio do Método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) após o

processo de hidrólise enzimática do farelo de soja. Este método é bastante utilizado para medidas de teor de proteína e baseia-se na interação das proteínas com os reagentes de fenol e de cobre em condições alcalinas. A reação colorimétrica envolve uma oxidação, catalisada por cobre, de aminoácidos aromáticos por um reagente heteropolifosfato (fosfotungístico-fosfomolibídico), desenvolvendo uma cor azul. O método apresenta sensibilidade para uma faixa de 10 a 200 µg de proteína presente na amostra.

O método consiste em adicionar 5 mL de reagente de cobre (solução de tartarato de sódio e potássio 4% e solução de sulfato de cobre pentahidratado 2% em solução de carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio 0,1 N) em 0,1 mL da amostra e 0,4 mL de água destilada. Espera-se 10 minutos e adiciona-se o reagente de fenol (reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:3). Após 10 minutos, que é o tempo para o reagente interagir com as proteínas, faz-se a leitura da absorvância a 625 nm e o valor é comparado com a curva padrão de concentração de proteína. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1601PC.

A curva padrão de proteína apresentada na Figura 1.A no Anexo 1 foi construída a partir de uma solução de albumina bovina com concentração 2,0 mg/mL. Foram preparadas novas soluções com concentração de 0,0 até 2,0 mg/mL, diluindo-se a solução inicial. Foram seguidos os procedimentos do Método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) e a absorvância medida de cada solução foi plotada em função da concentração de proteína em mg/mL.

3.2.3 Análises Físico-Químicas

As caracterizações físico-químicas do farelo de soja e do hidrolisado enzimático produzido para redução do amargor foram realizadas conforme as metodologias descritas nas bibliografias: “Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos” do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) e “Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos” (CECCHI, 2003).

Foram realizadas as seguintes análises: umidade, cinzas, proteína, lipídeos e fibra bruta, sendo que o teor de carboidratos foi determinado por diferença. Todas as metodologias utilizadas estão descritas no Apêndice 1.

3.2.4 Tratamento do Hidrolisado com Carvão Ativado

O hidrolisado de farelo de soja foi submetido ao tratamento com carvão ativado com o intuito de reduzir o sabor amargo consequente da reação de hidrólise. A metodologia utilizada baseou-se nos procedimentos descritos por Soares e colaboradores (2004), com algumas adaptações. Nesse trabalho, os autores utilizaram o carvão ativado para adsorver a fenilalanina de hidrolisados enzimáticos de leite em pó para posteriormente serem empregados no desenvolvimento de formulações dietéticas especiais para fenilcetonúricos.

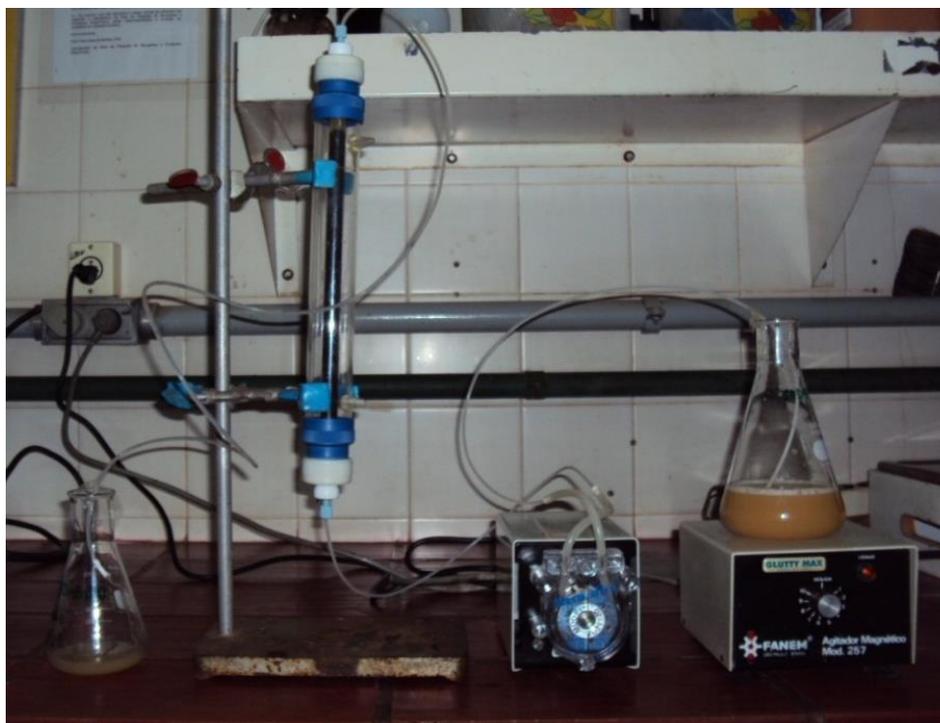


Figura 7: Módulo da coluna de adsorção contendo carvão ativado.

O tratamento do hidrolisado enzimático de farelo de soja foi realizado por meio da percolação do material por uma coluna de acrílico, encamisada, com 1,0 cm de diâmetro interno e 27 cm de altura. O leito fixo foi completamente preenchido pelo carvão ativado, sendo utilizadas cerca de 5 g do adsorvente e, filtro de nylon e algodão como suportes, conforme mostrado na Figura 7.

O hidrolisado era alimentado até a coluna de adsorção por meio de uma bomba peristáltica (Cole Parmer 6-600 rpm) utilizada para alimentação no leito em escoamento ascendente com uma vazão ajustada em 1 mL/min. As amostras eram retiradas em tempos de 15 minutos durante 2 horas e, posteriormente, em tempos de 30 minutos.

Em seguida, as amostras retiradas foram congeladas até o momento de serem analisadas.

3.2.4.1 Caracterização do Carvão por Medidas de Adsorção de N₂

A caracterização superficial física do adsorvente foi realizada a partir das isotermas de adsorção física de N₂ (77 K), obtidas em um adsortômetro Quantachrome, modelo NOVA-1200. Com o auxílio do *software* Autosorb for Windows[®] (versão 1.19), a área superficial específica foi calculada segundo o método Brunauer–Emmett–Teller (BET), enquanto a determinação do volume específico e do diâmetro médio de poros foram calculados pelo método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) (IUPAC, 1972; GREGG e SING, 1982).

3.2.4.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho visa à determinação das frequências de vibrações dos grupos funcionais presentes no carvão, que permite a análise das características superficiais dos carvões ativados utilizados. A amostra do carvão foi seca em estufa por um período de 12 h, a 100 °C. Posteriormente, foi triturada e misturada com KBr, numa proporção de 5% de adsorvente. O espectro de leitura variou na faixa de 400-4000 cm⁻¹.

3.2.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi realizada a metalização da amostra do carvão com ouro a 10 Pa e 6 mA em um metalizador SHIMADZU IC-50. Em seguida, procedeu-se a captura de imagens em um microscópio eletrônico de varredura SHIMADZU SS-550.

3.2.4.4 Cálculo da Capacidade de Adsorção da Coluna

Para a avaliação do comportamento do leito nos testes de adsorção, um parâmetro importante a ser determinado é a ZTM – Zona de Transferência de Massa, ou seja, a porção do leito que não é utilizado efetivamente para a adsorção.

A capacidade total da coluna, se todo o leito atingisse a concentração C_0 , pode ser

apresentada como proporcional à área abaixo da curva $\left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right)$. Entretanto, a capacidade utilizável da coluna refere-se à área abaixo da curva até o ponto de ruptura, que corresponde ao tempo de operação (t_b) da coluna em que a concentração na saída alcança um valor limite C_b (GEANKOPLIS, 1993). A área total sob a curva de ruptura representa a capacidade estequiométrica do leito (t_t), conforme mostra a Equação 1.

$$t_t = \int_0^{\infty} \left(1 - \int \frac{C_t}{C_0}\right) dt \quad (1)$$

em que: t_t é o tempo equivalente à capacidade estequiométrica, ou total, do leito (h).

Na Equação 1, o limite superior da integral de t_t , corresponde ao tempo para o qual o valor da razão C_t/C_0 é superior a 0,975 sendo chamado de tempo útil (t_u).

Analogamente ao tempo total do leito, t_t , o tempo útil (t_u) do leito até o ponto de ruptura (t_b) é dado pela Equação 2.

$$t_u = \int_0^{t_b} \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) dt \quad (2)$$

em que: t_b é o tempo relativo ao ponto de ruptura (h).

O comprimento do leito utilizado (H_U) até o ponto de ruptura pode ser calculado pela Equação 3.

$$H_U = \frac{t_u}{t_t} H_T \quad (3)$$

em que: H_T é o comprimento total do leito (cm).

A razão t_u/t_t é a fração útil da capacidade do leito, sendo denominada de tempo adimensional.

A altura da Zona de Transferência de Massa, ou altura do leito não utilizada é calculada pela Equação 4.

$$ZTM = H_T - H_U \quad (4)$$

A ZTM, ou comprimento do leito não utilizável, depende da velocidade do fluido, do tipo de adsorvente, do diâmetro da coluna, da concentração do efluente e independe do comprimento da coluna, podendo, assim, ser medida experimentalmente.

3.2.5 Tratamentos do Hidrolisado com as Ciclodextrinas

A adição das ciclodextrinas foi baseada em resultados ainda não publicados obtidos por Monge Neto (2013) em que α -, β - e γ - CDs foram adicionadas a um hidrolisado enzimático de farelo de soja em diferentes proporções. A análise em língua eletrônica mostrou que as α - e β - CDs adicionadas a esse 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.

Para todas as metodologias aqui empregadas, α - e β - CDs foram adicionadas ao hidrolisado de farelo de soja nas concentrações de 1,5% e 2,0% (m/m), respectivamente, sendo considerado o hidrolisado em base úmida. Foram utilizadas três diferentes metodologias descritas a seguir.

3.2.5.1 Maxalagem

A cada CD foi adicionada uma quantidade de água suficiente para formar uma pasta, aproximadamente 10% (m/m). Adicionou-se o hidrolisado em pó seco em secador do tipo spray seguindo a proporção estabelecida para cada CD. A pasta resultante dessa

mistura foi intensamente macerada e, posteriormente, foi seca em estufa a temperatura mantida em 50 °C.

3.2.5.2 Mistura Física

Cada CD foi adicionada ao hidrolisado em pó seguindo a proporção estabelecida para cada uma, sem água.

3.2.5.3 Adição em Solução

A metodologia utilizada nesta etapa foi adaptada nas descrições de Hou e colaboradores (2011). Cada uma das ciclodextrinas (α - e β - CD) foi adicionada ao hidrolisado em tubos de 45 mL nas concentrações de 1,5% e 2,0% (m/m), respectivamente, sendo considerado o hidrolisado em base úmida. Os tubos foram vedados e imersos em um banho, sendo mantidos a 38,5 °C por 12 minutos sob agitação constante. Os hidrolisados submetidos aos tratamentos seguiram para atomização em secador tipo *spray*.

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.

3.2.6 Avaliação do Hidrolisado e dos Tratamentos

3.2.6.1 Determinação do Perfil Peptídico

O perfil peptídico das amostras de hidrolisado enzimático de farelo de soja foi obtido utilizando-se a cromatografia líquida de exclusão de tamanho (SE-HPLC), por meio da coluna Superdex 200 10/300 GL e equipamento Varian 920-LC. A fase móvel era composta por tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7, contendo NaCl 0,15 M. As condições de análise empregadas foram: fluxo de 0,25 mL/min, volume de injeção de 25 μ L e detecção no UV no comprimento de onda de 214 nm.

As amostras foram centrifugadas, para posteriormente serem diluídas com água mili-Q na proporção de 1:2 e, em seguida, filtradas em filtro de porosidade 0,22 µm.

A Tabela 5 traz as características do kit de calibração de filtração em gel, de baixa massa molecular – Gel Filtration Calibration Kit – Low Molecular Weight (GE Healthcare Life Sciences do Brasil).

Tabela 5: Características do kit de calibração.

Padrão	Massa Molar (kDa)
Conoalbumina	75
Ovoalbumina	44
Anidrase Carbônica	29
Ribonuclease	13,7
Aprotinina	6,5
Gastrina	2,859

3.2.6.2 Determinação do Teor de Aminoácidos Livres

A determinação do teor de aminoácidos livres foi realizada pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Engenharia Química de São Carlos – UFSCar.

As análises seguiram as recomendações definidas pelo fabricante utilizando condições operacionais para hidrolisados proteicos (Waters Pico-Tag®).

O método consistiu na derivatização da amostra com fenilisotiocianato (PITC) formando derivados de feniltiocarbamil (PTC). Em seguida, realizou-se a separação dos produtos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O sistema era HPLC modelo 717 mais detector 486 UV-Vis (Waters, Milford, MA) com uma coluna de fase reversa de 300mm×3,9mm (Pico Tag®; Waters) a 50 °C. Foi utilizado um gradiente de duas fases móveis (A): 0,14M acetato de sódio contendo 0,5 µM EDTA e 6% acetonitrila (pH 5,7) e (B): 60% acetonitrila.

Utilizou-se uma vazão de 1,0 -1,5 mL/min para as fases móveis: 0,0-12,0 min, gradiente linear de A/B (99:1) a A/B (0:100); 12,0-12,5 min, eluição com A/B (99:1).

3.2.6.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H1)

Amostras das ciclodextrinas, do hidrolisado e das amostras submetidas aos tratamentos foram analisadas em um espectrofotômetro de RMN H1, marca Varian, modelo Mercury-300BB, operando a 300 MHz. As amostras foram dissolvidas em óxido de deutério (D₂O). 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°; janela de 8 ppm, número de espectro, 64.

3.2.6.4 Formulação das Bebidas

A formulação da bebida consistiu na adição do hidrolisado enzimático do farelo de soja aos demais ingredientes. A cada 100 mL de hidrolisado, adicionou-se: 50 g de polpa de fruta, 22,5 g de açúcar, 0,35 g de ácido ascórbico, 0,35 g de ácido cítrico e 0,1 g de aroma mascarante de soja fornecido pela Duas Rodas Industrial. A mistura foi liquidificada, embalada e armazenada até a realização dos testes de análise sensorial.

3.2.6.5 Análise Sensorial

A análise sensorial está inscrita no comitê de ética da Universidade Estadual de Maringá sob o registro 03841312.5.0000.0104.

Os testes de análise sensorial foram realizados em dias diferentes na sala 113 do bloco D67 da Universidade Estadual de Maringá. Normalmente, essas análises são feitas em cabines individualizadas próprias para este tipo de teste. Entretanto, pela necessidade de um número relativamente grande de provadores, foi escolhido um ambiente que houvesse maior facilidade em encontrar possíveis degustadores não treinados. Os testes foram realizados por 50 consumidores escolhidos ao acaso.

O provador recebia as amostras, codificadas com algarismos randômicos de forma aleatória, que eram mantidas sob refrigeração entre 4 e 10 °C. Recebia ainda um copo com água, uma caneta e a ficha de avaliação. Solicitou-se aos provadores que avaliassem as amostras da esquerda para a direita com a opção de repetir a avaliação das amostras já avaliadas, se necessário.

A primeira análise sensorial realizada foi o teste de preferência, empregado com intuito de avaliar o preparo da formulação da bebida à base de soja. Para tanto, foi utilizado o hidrolisado sem tratamento no preparo das bebidas e as amostras se diferenciavam entre si pelo sabor da polpa de fruta (manga, maracujá e morango). O provador, de acordo com a opinião pessoal, indicava a amostra preferida. Essa avaliação sensorial do produto foi elaborada por meio dos conceitos descritos por Dutcosky (1996).

Nas demais análises, empregou-se o teste de escala hedônica com o intuito de avaliar a aceitabilidade dos produtos empregando os hidrolisados submetidos aos tratamentos com carvão ativado e ciclodextrinas. O provador marcava os números das amostras na ficha, nos quadros à direita e à esquerda, e atribuía notas de acordo com a escala apresentada na própria ficha (Figura 8), que variava de “desgostei muitíssimo” até “gostei muitíssimo”.

Laboratório de análise sensorial		
Nome: _____	Data: / /	
<p>Prove as amostras na seqüência apresentada, da esquerda para a direita. Coloque os números nos quadros abaixo a esquerda e atribua um valor de 1 a 9 de acordo com a escala:</p>		
AMOSTRA	VALOR	ESCALA
<input type="text"/>	<input type="text"/>	9 - Gostei MUITÍSSIMO
<input type="text"/>	<input type="text"/>	8 - Gostei Muito
<input type="text"/>	<input type="text"/>	7 - Gostei Moderadamente
<input type="text"/>	<input type="text"/>	6 - Gostei Ligeiramente
<input type="text"/>	<input type="text"/>	5 - Nem Gostei / Nem desgostei
<input type="text"/>	<input type="text"/>	4 - Desgostei Ligeiramente
<input type="text"/>	<input type="text"/>	3 - Desgostei Moderadamente
<input type="text"/>	<input type="text"/>	2 - Desgostei Muito
<input type="text"/>	<input type="text"/>	1 - Desgostei MUITÍSSIMO
Comentários: _____		

Figura 8: Modelo da ficha de avaliação para aplicação do teste de escala hedônica (MONTEIRO, 2005).

Para avaliar os tratamentos com o carvão ativado, foram preparadas duas formulações: uma delas contendo o hidrolisado enzimático de farelo de soja e a outra contendo o hidrolisado submetido ao tratamento com carvão ativado. Para essa etapa, foi

realizado um ensaio de 1 hora de percolação do hidrolisado pela coluna de carvão ativado, e o material coletado foi utilizado para o preparo da formulação.

A avaliação da adição das ciclodextrinas baseou-se em resultados preliminares obtidos por Monge Neto (2013) e que ainda não foram publicados. Para tanto, foram preparadas duas formulações: uma delas contendo o hidrolisado enzimático de farelo de soja e a outra contendo o hidrolisado com adição de 2,0% de β -CD utilizando a metodologia adaptada de Hou e colaboradores (2011).

Uma vez finalizados os testes de análise sensorial, os dados obtidos passaram por uma análise estatística correspondente a cada tipo de teste empregado.

A avaliação do teste de preferência foi realizada submetendo-se os resultados à ANOVA e a comparação entre as médias foi efetuada pelo Teste de Friedman (DUTCOSKY, 1996).

Já a avaliação do teste de escala hedônica é realizada por meio de uma análise de variância das notas obtidas. Uma vez obtida a análise, faz-se um comparativo das médias dos produtos pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade para evidenciar qual ou quais produtos tiveram maior ou menor aceitação (MONTEIRO, 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Físico-Químicas do Farelo de Soja

Os dados da composição centesimal do farelo de soja após a coleta e do farelo submetido ao processo de extração de carboidratos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Características físico-químicas de amostras de farelo de soja após a coleta e após o procedimento de extração de carboidratos*.

Análises	Farelo de Soja		Farelo de Soja após Extração dos Carboidratos	
	(% b. u.)	(% b. s.)	(% b. u.)	(% b. s.)
Proteínas	59,50±0,03	66,97±0,05	73,55±0,30	77,73±0,45
Carboidratos	17,52	19,72	10,46	11,04
Lipídeos	0,47±0,02	0,52±0,02	0,11±0,02	0,13±0,06
Fibras	4,86±0,20	5,48±0,51	4,86±0,22	5,13±0,50
Cinzas	11,16±0,00	7,31±0,01	5,37±0,01	5,97±0,03
Umidade	6,49±0,01	-	5,65±0,01	-

* Valores relativos à média ± desvio padrão das amostras analisadas em triplicatas.

Quanto às análises realizadas para o farelo de soja após a coleta, todos os valores apresentados encontram-se de acordo com a legislação vigente que estabelece as características de identidade desse produto (BRASIL, 1993).

Observou-se ainda que, por ser um resíduo do processo de extração do óleo de soja, sendo, portanto, previamente desengordurado, o farelo de soja apresentou um baixo teor de lipídeos. Tal verificação também ocorreu quando se comparou com o valor de 15,74% encontrado por Ciabotti e colaboradores (2006) para o grão de soja. Silva e colaboradores (2006) utilizando resíduo de soja na forma de farinha também obtiveram menor percentual de lipídeos e fibras na comparação com o grão integral, ambos relacionados também ao processo de extração do óleo, que também removeu parte do resíduo fibroso, o que explica a menor quantidade de fibras.

Ainda em relação aos resultados apresentados para o farelo de soja, verificou-se um alto conteúdo de proteína, fato que confirma o grande potencial desse material como

fonte proteica para a alimentação humana. Quando comparada à composição centesimal do grão de soja comum descrita por Ciabotti e colaboradores (2006), os valores percentuais de proteína (32,77%) e cinzas (3,64%) são superiores.

Assim sendo, é possível afirmar que o farelo de soja, possui uma boa qualidade química-nutricional, sendo fonte de carboidratos (18%), proteínas (60%), minerais (cinzas 11%) e fibras (5%). Portanto, o aproveitamento desse subproduto da indústria de óleo de soja é uma forma de minimizar esse resíduo agroindustrial viabilizando a produção de alimentos destinados ao consumo humano ou ainda à elaboração de aditivos alimentares.

O processo de extração de carboidratos por meio de solução etanólica foi eficaz uma vez que promoveu uma diminuição do teor desses compostos, cerca de 44,0% considerando os teores em base seca, possivelmente relacionado à diminuição dos açúcares solúveis. Nos produtos obtidos no processamento da soja, tais compostos se fazem presentes na forma de sacarose, rafinose e estaquiase os quais correspondem à maior parte dos carboidratos totais. Além disso, são considerados como fatores antinutricionais, presentes nos grãos das leguminosas, pois são açúcares não digeríveis aos organismos de alguns animais.

A IMCOPA, Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A., é uma empresa que atua no esmagamento e fabricação de derivados de soja. Dentre os produtos comercializados, estão os farelos denominados Imcosoy 60 e 70. São farelos concentrados proteicos (SPC = soybean protein concentrate), com teor de proteína de 70,00%, destinados a nutrição animal. São utilizados especialmente em ração para peixes e camarões, e também como substituto do leite em rações para desmame de bezerras e leitões (IMCOPA, 2014).

Assim sendo, o alto teor de proteína e o baixo teor de carboidratos apresentados para o farelo aqui utilizado após a extração etanólica proporcionou condições mais adequadas para a extração da proteína, fazendo desse subproduto uma fonte promissora de ingrediente à base de soja.

4.2 Determinação da Condição Ótima de Reação

Analisando os perfis de cromatografia de exclusão molecular dos hidrolisados obtidos variando a quantidade de enzima utilizada (0,00; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00% proteína

enzimática/proteína contida no substrato em base úmida) e o tempo de reação (1, 2 e 3 horas), verificou-se que a fração contendo maior quantidade de peptídeos correspondeu ao tempo de retenção de 81 minutos, conforme mostra a Figura 13. Em busca de investigar os efeitos desses fatores e visando a otimização das condições dessa reação, procedeu-se a análise estatística da concentração de proteína solúvel relacionada aos peptídeos contidos nessa fração.

Na Tabela 7, observa-se os resultados dos ensaios realizados tendo como variáveis a quantidade de enzima empregada e o tempo de reação, e também os valores apresentados para o efeito teor de proteína solúvel determinado para cada ensaio pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) em relação ao percentual da área da faixa de peptídeos correspondente ao tempo de retenção de 81 minutos.

Tabela 7: Ensaios variando a quantidade de enzima utilizada e o tempo de reação para a determinação da concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos correspondente ao tempo de retenção de 81 minutos.

Concentração de Enzima (%)	Tempo de Reação (h)	Concentração de Proteína da Faixa de Peptídeos (mg/mL)
0,00	1	0,46±0,04
0,00	2	0,26±0,09
0,00	3	0,14±0,03
0,10	1	11,90±0,04
0,10	2	11,99±0,06
0,10	3	15,13±0,05
0,25	1	8,40±0,06
0,25	2	13,41±0,13
0,25	3	14,41±0,10
0,50	1	18,09±0,01
0,50	2	18,96±0,04
0,50	3	22,97±0,14
0,75	1	17,91±0,23
0,75	2	19,62±0,13
0,75	3	21,89±0,11
1,00	1	23,92±0,08
1,00	2	29,29±0,74
1,00	3	32,78±0,03

Conforme já era esperado, os valores apresentados na Tabela 7 mostraram que a maior concentração de proteína ocorreu no ensaio cujas variáveis apresentaram os valores máximos, ou seja, a concentração de enzima 1,00% (proteína enzimática/proteína do substrato) e 3 horas de reação, no qual foi alcançada uma concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliada de 32,78 mg/mL.

Procedeu-se uma análise estatística dos dados obtidos por meio do *software* STATISTICA® com o intuito de investigar as variáveis concentração de enzima e tempo de reação em relação ao efeito concentração de proteína solúvel.

As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o planejamento são apresentadas na Tabela 8, juntamente com os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo, coeficiente de determinação do modelo R^2 com um nível de significância ($\alpha=0,05$). Os valores destacados em itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

Tabela 8: Estimativa dos efeitos para a concentração de proteína solúvel para os ensaios variando a quantidade de enzima empregada e o tempo de reação, sendo E a variável quantidade de enzima empregada e t a variável tempo de reação.

Variável	p-valor	Coefficiente	Erro
<i>Intercepto</i>	<i>0,000002</i>	<i>18,74562</i>	<i>2,155610</i>
<i>E</i>	<i>0,000003</i>	<i>11,22624</i>	<i>1,378016</i>
<i>E²</i>	0,237052	-3,16381	2,542109
<i>T</i>	0,070228	2,42216	1,218957
<i>t²</i>	0,971850	0,07477	2,075125
<i>E×t</i>	0,389297	1,50509	1,684997

$$R^2 = 0,8597$$

Observando-se os valores na Tabela 8 para a determinação da concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliada, constata-se que apenas a variável quantidade de enzima em sua forma linear é significativa, para um intervalo de confiança de 95%. O Gráfico de Pareto indicado na Figura 9 mostra a influência dos parâmetros sobre a resposta da concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliadas.

Por meio da análise do Gráfico de Pareto é possível visualizar que, dentre as variáveis estudadas, a concentração de enzima é a única variável significativa, pois encontra-se à direita da linha tracejada. Já a variável tempo de reação, bem como as formas

quadráticas das variáveis (E^2 e t^2) e também a interação entre as variáveis ($E \times t$) podem ser consideradas não significativas na faixa avaliada dos parâmetros.

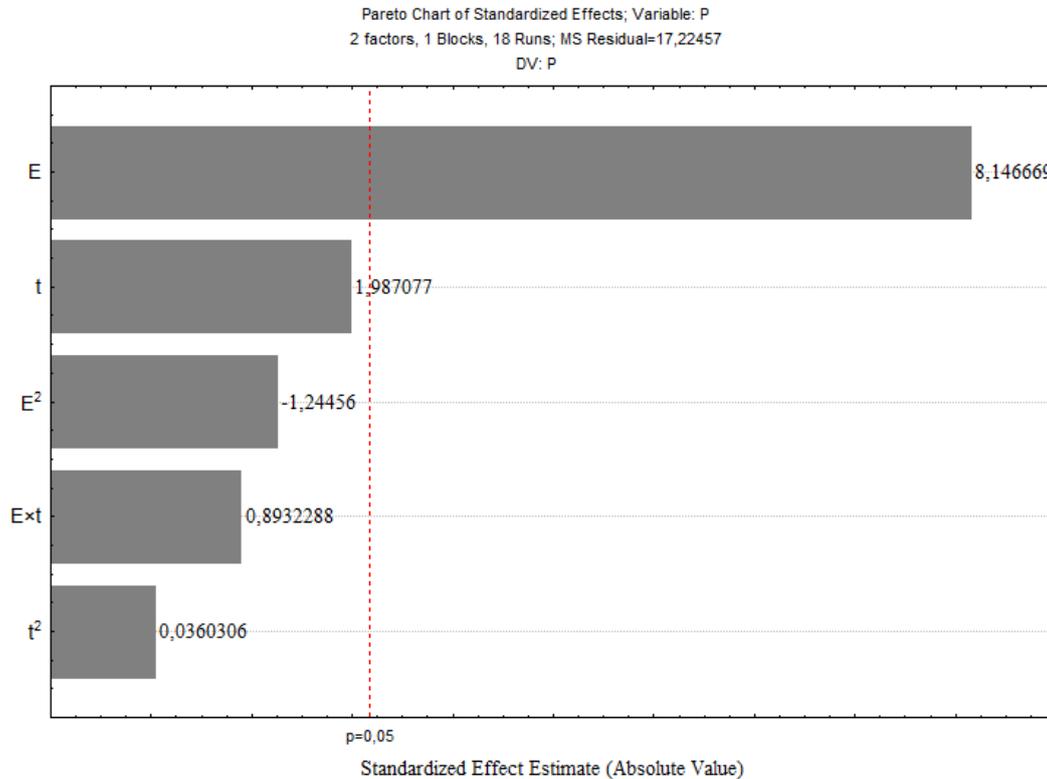


Figura 9: Gráfico de Pareto obtido para o modelo da concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos correspondente ao tempo de retenção de 81 min.

O ensaio com concentração de enzima de 1,00% e tempo de reação de 3 horas apresentou a maior concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos correspondente ao tempo de retenção de 81 min. Assim sendo, valores maiores de concentração de enzima resultam em uma maior concentração de proteína da faixa de peptídeos avaliada, entretanto o tempo de reação não mostrou-se tão relevante para a produção dessa faixa de peptídeos.

A análise de variância através do teste F é apresentada na Tabela 9, para os mesmos $F_{\text{regressão}}(5;12;0,05) = 3,11$.

Observando os dados obtidos na Tabela 9 para a regressão, $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ e possui uma razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ maior que 4. Desta forma, o modelo linear proposto é válido sendo possível escrever o modelo matemático empírico de concentração de proteína

do pico em função das variáveis significativas. Apesar de o coeficiente de correlação não ser tão alto ($R^2 = 0,8597$), a função que representa a reação nos fornece uma boa estimativa da concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliada, satisfazendo a predição dos dados experimentais.

Tabela 9: Análise de variância obtida para os ensaios de determinação da concentração de proteína da faixa de peptídeos correspondente ao tempo de retenção de 81 minutos.

	SQ	GL	MQ	F _{calculado}
Regressão	1266,500	5	253,300	14,70574
Erro	206,695	12	17,225	
Total SS	1473,195	17		

Para os dados obtidos, propõe-se o modelo de concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliada (P) tendo como variáveis a concentração de enzima utilizada na reação (E) e o tempo da reação (t), mostrado na Equação 5:

$$P = 18,74562 + 11,22624 E - 3,16381 E^2 + 2,42216 t + 0,07477 t^2 + 1,50509 E \times t \quad (5)$$

Pode-se afirmar que a interação das variáveis torna-se representativa ao nível de 95% de significância estatística por meio do seguinte modelo (considerando apenas os termos cujas variáveis são significativas), mostrado na Equação 6:

$$P = 18,74562 + 11,22624 E \quad (6)$$

A superfície de resposta, mostrada na Figura 10, representa o modelo linear obtido para a concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliada em função da concentração de enzima utilizada e do tempo de reação.

Na superfície apresentada na Figura 10, nota-se que para valores elevados de quantidades de enzima, são obtidos maiores valores de concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliada, enquanto o tempo de reação não afeta significativamente a concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliada, nestas condições estudadas.

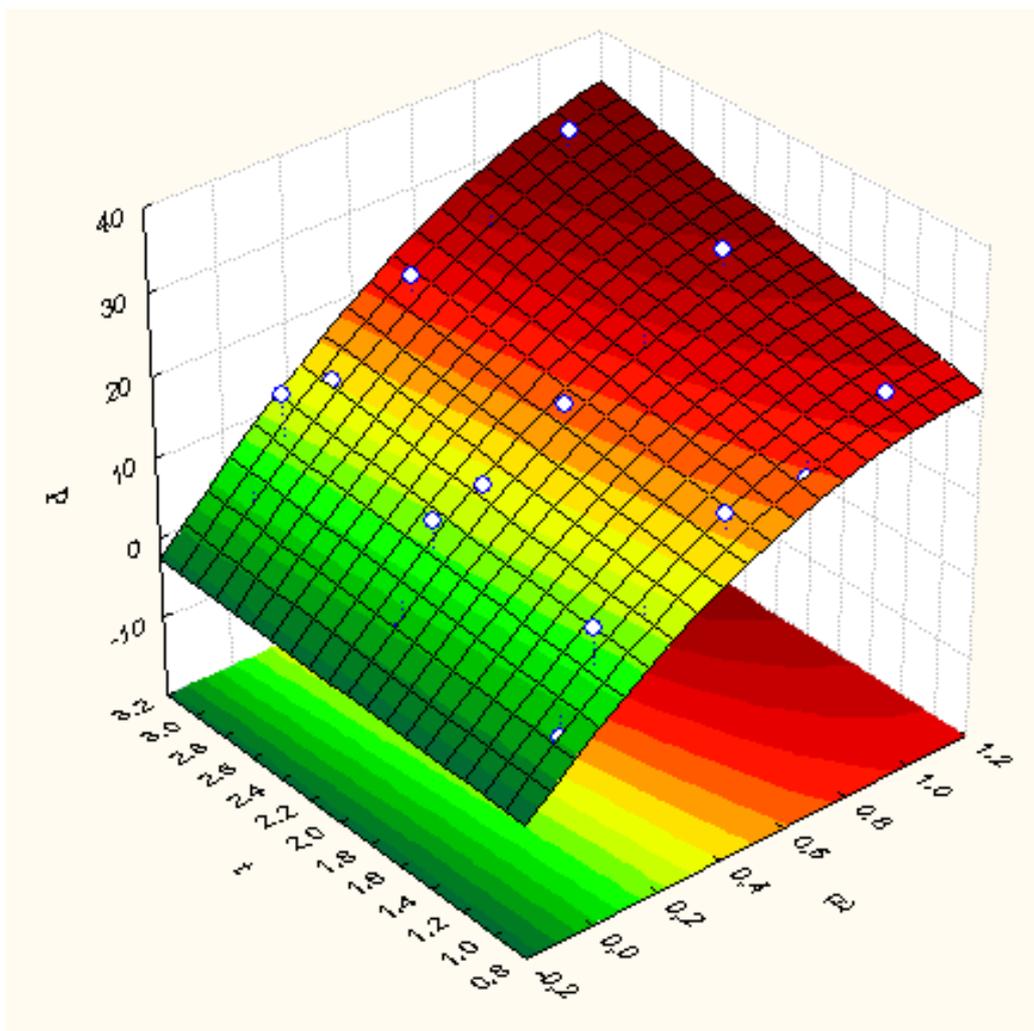


Figura 10: Superfície de resposta da concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliada (P) em função da quantidade de enzima utilizada na reação (E) e o tempo da reação (t) na hidrólise enzimática do farelo de soja.

Apesar da variável tempo de reação não ser significativa na avaliação estatística, optou-se por investigá-la realizando o Teste de Tukey. O cálculo da diferença média significativa (DMS) nos forneceu um valor de 3,60. Em seguida, procedeu-se a diferença

entre as médias duas a duas e comparou-as a DMS. Considerando que a quantidade de enzima de 1,00% resultou nos maiores valores de concentração de proteína solúvel da faixa de peptídeos avaliada, a comparação das médias mostrou que:

- nos tempos 1 e 2 horas: houve diferença significativa;
- nos tempos 1 e 3 horas: houve diferença significativa;
- nos tempos 2 e 3 horas: não houve diferença significativa.

Adequando os resultados da análise estatística aos objetivos estratégicos deste estudo com bom senso na interpretação dos valores, determinou-se como condições ótimas concentração de enzima de 1,00% (proteína enzimática/proteína do substrato) e o tempo de reação de 2 horas.

4.3 Avaliação do Hidrolisado Enzimático de Farelo de Soja

4.3.1 Análises Físico-Químicas

Os dados da composição centesimal do hidrolisado obtido via reação enzimática estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Características físico-químicas do hidrolisado enzimático de farelo de soja obtido a 60 °C, 100 rpm, pH \approx 6,5, concentração de enzima 1,00% (proteína enzimática/proteína substrato), 2 horas de reação*.

Análises	Hidrolisado Enzimático do Farelo de Soja	
	(% b. u.)	(% b. s.)
Proteínas	5,76 \pm 0,03	88,07 \pm 0,04
Carboidratos	0,05	0,76
Lipídeos	0,07 \pm 0,01	1,07 \pm 0,02
Fibras	0,24 \pm 0,01	3,67 \pm 0,01
Cinzas	0,42 \pm 0,00	6,42 \pm 0,01
Umidade	93,46 \pm 0,01	-

* Valores relativos à média \pm desvio padrão das amostras analisadas em triplicata.

A composição físico-química do hidrolisado enzimático produzido reflete a composição da matéria-prima de origem. Pode ser considerado um derivado proteico de soja, uma vez que é obtido a partir do resíduo resultante da extração do óleo. Ainda é possível afirmar que o hidrolisado de farelo de soja obtido possui teor proteico tão relevante quanto o do farelo de soja, fato que o considera um material com potencial uso como ingrediente para a produção de alimentos à base de soja.

Na Tabela 11 são apresentados os valores da composição centesimal do hidrolisado enzimático de farelo de soja a fim de comparar com valores obtidos por Rodrigues e colaboradores (2003) para os extratos elaborados a partir do grão, da farinha e do isolado de soja.

Tabela 11: Características físico-químicas do hidrolisado enzimático de farelo de soja e dos extratos elaborados por Rodrigues e colaboradores (2003)*.

Análises	Hidrolisado Enzimático do Farelo de Soja	Extrato de Grão de Soja (Rodrigues <i>et al.</i>, 2003)	Extrato de Farinha Integral de Soja (Rodrigues <i>et al.</i>, 2003)	Extrato de Isolado Proteico de Soja (Rodrigues <i>et al.</i>, 2003)
Proteínas (%)	5,76±0,03	3,03±0,02	3,03±0,01	3,00±0,03
Carboidratos (%)	0,05	1,66	1,56	0,19
Lipídeos (%)	0,07±0,01	0,89±0,02	1,47±0,02	0,02±0,00
Fibras (%)	0,24±0,01	0,07±0,00	0,28±0,10	0,02±0,01
Cinzas (%)	0,42±0,00	0,23±0,01	0,34±0,01	0,42±0,01
Umidade (%)	93,46±0,01	94,12±0,01	93,32±0,57	96,35±0,00

* Valores relativos à média ± desvio padrão das amostras analisadas em triplicata.

No que se refere aos teores de umidade, cinzas, lipídeos, fibras e carboidratos, os valores obtidos para o hidrolisado enzimático foram próximos dos valores obtidos por Rodrigues e colaboradores (2003).

Comparando-se os resultados obtidos para o hidrolisado enzimático de farelo de soja aos extratos de grão de soja, de farinha integral de soja e de isolado proteico de soja de

Rodrigues e colaboradores (2003) observou-se que o teor de proteína do hidrolisado produzido apresentou valor percentual superior aos extratos elaborados por Rodrigues e colaboradores (2003).

Quanto aos teores de carboidratos (0,19 e fibras obtidos para o hidrolisado de farelo de soja e para o extrato de isolado proteico de soja estão bem próximos, uma vez que no processo de obtenção dessas matérias-primas são removidos os açúcares e fibras solúveis.

Em comparação com o material utilizado nos demais trabalhos, o hidrolisado é produzido a partir de um subproduto da indústria de óleo de soja. Sendo assim, o aproveitamento do farelo é uma forma de minimizar esse resíduo agroindustrial e viabilizar a produção de alimentos destinados ao consumo humano ou ainda à elaboração de aditivos alimentares.

4.3.2 Determinação do Teor de Proteína Solúvel

Após a hidrólise enzimática, a concentração de proteína solúvel do hidrolisado foi 30,27 mg/mL, enquanto na reação controle (feita nas mesmas condições da reação enzimática porém sem adição da enzima) foi 16,43 mg/mL. Comparando os valores, concluiu-se que a enzima Alcalase® 2.4L aumenta o teor de proteína solúvel em 46% nas condições utilizadas para essa reação.

Considerando que o teor de proteína do hidrolisado determinado via medida de nitrogênio total é 5,76% e a concentração de proteína solúvel é de 30,27 mg/mL, pode-se afirmar que 53% das proteínas estão presentes na forma solúvel. Quanto à reação controle, pode-se afirmar que a água solubilizou em torno de 22% do total de 73,55% de proteínas presentes no farelo após a extração dos carboidratos.

Procedeu-se uma simples medida em triplicata da recuperação de líquido (hidrolisado), obtendo-se 83,67%. Observando os valores das composições centesimais das Tabelas 6 e 10, verificou-se que, das 10 g de farelo de soja inicialmente presentes no ensaio, 7,35 g correspondem às proteínas. Considerando a recuperação de líquido e o teor de proteínas obtido para o hidrolisado, verificou-se que 4,82 g de proteínas estão presentes no hidrolisado. Pode-se afirmar que a enzima extraiu 66% da proteína disponível no farelo após a extração, sendo que 53% está presente na forma solúvel.

Stenzel (2007), utilizando as condições de ensaio 1% enzima e 3 horas de reação a 60 °C, obteve uma concentração de proteína solubilizada do farelo de soja de 23,45 mg/mL, que correspondeu a 50% da proteína inicialmente presente no material disponível na forma solúvel. Apesar do farelo de soja ser fornecido pela mesma indústria em ambos os trabalhos, eles diferem entre si pelo teor de proteínas presentes no material. Sendo assim, a quantidade de enzima utilizada foi diferente pois se baseia no teor de proteína do substrato e, conseqüentemente, o teor de proteínas solubilizada pela enzima também será.

Stroher e colaboradores (2009), utilizando metodologia semelhante, extraíram 60% da proteína inicialmente presente no farelo de soja utilizando a enzima Alcalase® 2.4L. As diferenças constatadas entre Stroher e colaboradores (2009) e o presente trabalho se referem também à concentração de proteína solúvel obtida na reação controle. Stroher e colaboradores (2009) solubilizaram 15% da proteína inicial na reação controle, sendo que os resultados encontrados agora totalizam 22% da proteína solubilizada. A divergência quanto ao percentual de proteína solubilizada obtido para a reação controle está relacionada à forma de inativação da enzima, que Stroher e colaboradores (2009) realizaram por meio de banho de gelo e a metodologia utilizada no presente trabalho empregou o aquecimento das suspensões em banho termostático a 90 °C, o que favoreceu o aumento na quantidade de proteína hidrolisada. Além disso, a extração de carboidratos realizada após a coleta do farelo favoreceu um aumento do teor de proteína disponível para a hidrólise, e conseqüentemente o teor de proteína solubilizada pela enzima.

Rosenthal e colaboradores (2001), realizando hidrólise de farinha de soja integral tratada termicamente, com protease, obtiveram solubilização em torno de 65% do material proteico inicialmente presente. As condições utilizadas nesses ensaios foram temperatura de 50 °C, uma hora em pH 5,0 e 15 minutos em pH 8,0. Um fato a ser salientado é que o ponto isoelétrico (pH em que ocorre a precipitação das proteínas) da proteína de soja é em torno de 4,5 então reações que ocorrem em pH maiores tendem a um aumento na quantidade de proteína solubilizada.

4.3.3 Determinação do Perfil Peptídico

A Figura 12 demonstra o perfil peptídico do hidrolisado enzimático de farelo de soja obtido utilizando-se a condição ótima da concentração de enzima de 1,00% (proteína enzimática/proteína do substrato) e o tempo de reação de 2 horas, em comparação com os padrões de massa molecular utilizados.

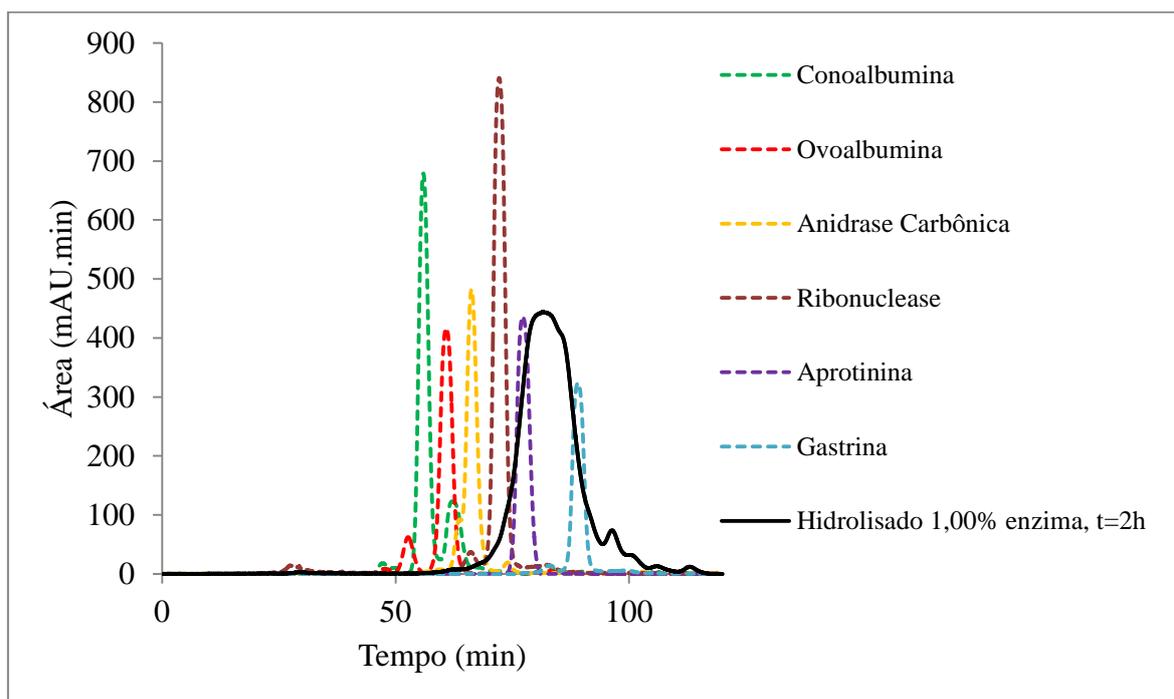


Figura 11: Perfil peptídico do hidrolisado enzimático de farelo de soja obtido a 60 °C, 100 rpm, pH \approx 6,5, concentração de enzima 1,00% (proteína enzimática/proteína substrato), 2 horas de reação.

Analisando o perfil peptídico do hidrolisado apresentado na Figura 11 é possível afirmar que a maior composição de peptídeos (96,75%) está situada na faixa molecular entre 2,86 e 6,50 kDa, que são os oligo (até 30 resíduos de aminoácidos) e polipeptídeos (de 30 a 50 resíduos de aminoácidos). Há também uma fração bem menor (2,31%) do hidrolisado que corresponde a peptídeos com tamanhos menores do que 2,86 kDa.

Segundo alguns autores (CARREIRA *et al.*, 2002, 2003; SOARES *et al.*, 2004; LIRA, 2010), a qualidade dos hidrolisados e o valor nutricional dos hidrolisados depende do tamanho das cadeias peptídicas. Biassuti (2006) sugere ainda que fórmulas contendo

um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente pelo organismo do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta apresentando um maior valor nutricional. Sendo assim, o hidrolisado enzimático de farelo de soja obtido pode ser considerado de boa qualidade nutricional uma vez que em sua maior parte é constituído por oligopeptídeos.

4.3.4 Determinação do Teor de Aminoácidos Livres

A Tabela 12 apresenta os teores de aminoácidos livres, determinados por meio de cromatografia de troca iônica, presentes no hidrolisado enzimático de farelo de soja.

Tabela 12: Teores de aminoácidos livres do hidrolisado enzimático de farelo de soja obtido a 60 °C, 100 rpm, pH ≈ 6,5, concentração de enzima 1,00% (proteína enzimática/proteína substrato), 2 horas de reação.

Aminoácidos (%)		Hidrolisado Enzimático
Essenciais	phe	0,027
	his	0,023
	ile	0,079
	leu	0,164
	lis	0,057
	met	0,000
	thr	0,047
	val	0,132
Não-Essenciais	asp	0,084
	glu	0,215
	ala	0,074
	arg	0,057
	cys	0,000
	gly	0,034
	pro	0,093
	ser	0,070
tyr	0,053	
Total		1,208

Pelos resultados da Tabela 12, observou-se que os aminoácidos essenciais presentes em maiores quantidades foram ácido glutâmico (0,215%), leucina (0,164%) e valina (0,132%). Os aminoácidos metionina e cistina não foram detectados.

Tal composição reflete a composição em aminoácidos do farelo de soja, sendo que os aminoácidos que correspondem à maior fração nas proteínas do farelo de soja são ácido glutâmico (16 a 20%), ácido aspártico (8,0 a 9,5%) e leucina (6,3 a 8,0%). Quanto aos aminoácidos de cadeia sulfurada que estão presentes em menores quantidades, destacam-se a metionina (1,0 a 1,7%) e a cistina (1,0 a 1,5%) (SWICK, 1994; KIRBY *et al.*,1993; FAO, 1976). O gráfico da Figura 12 traz a comparação do teor de aminoácidos livres do farelo de soja e do hidrolisado.

Pacheco e colaboradores (2005) também verificaram maior perda de aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína) na obtenção de hidrolisados a partir do concentrado de soro de leite usando Alcalase® 2.4L. Os autores concluíram que tal fato poderia estar relacionado às condições mais severas de temperatura e pH (50 °C / pH 8,0) utilizados no processo de hidrólise da proteína.

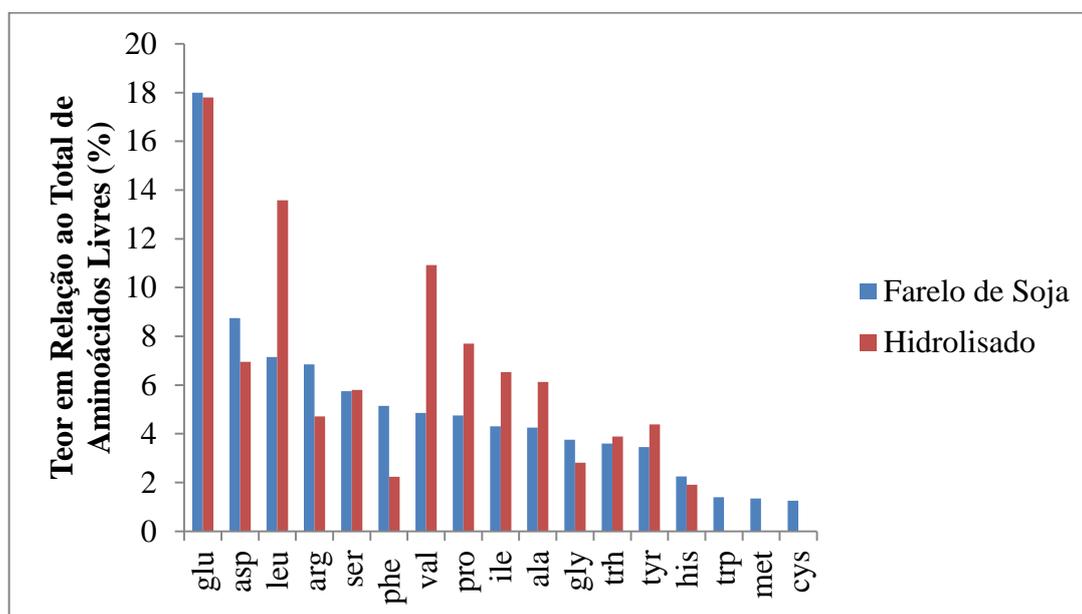


Figura 12: Teores de aminoácidos livres presentes no farelo de soja e no hidrolisado enzimático obtido.

O baixo teor de aminoácidos livres do hidrolisado, aproximadamente 1,21%, se refere à ação da enzima Alcalase® 2.4L que, por ser uma endoproteinase, atua na região

interna da cadeia polipeptídica, resultando em peptídeos maiores. Entretanto, a ocorrência de teores significativos dos aminoácidos leucina, valina, isoleucina, prolina e alanina sugere ação da enzima nas regiões terminais. Tal fato está relacionado à presença de exoproteases como contaminantes da preparação enzimática que, por sua região de atuação, liberam peptídeos e/ou aminoácidos não polares, que é o caso desses aminoácidos hidrofóbicos.

Santos e colaboradores (2010) determinaram os teores de aminoácidos livres e de proteína solúvel presentes na farinha de soja hidrolisada com as enzimas α -amilase, alcalase e flavourzyme. Observaram que os aminoácidos essenciais presentes em maiores quantidades foram a treonina (0,2887 %), a lisina (0,0966 %), triptofano (0,0879 %) e a leucina (0,0864 %). Já os aminoácidos presentes com menores valores foram metionina (0,0433 %), isoleucina (0,0489) e histidina (0,0499 %).

Apesar de alguns aminoácidos estarem presentes em menor quantidade o hidrolisado de farelo de soja apresentou os aminoácidos essenciais aos seres humanos.

4.4 Avaliação dos Tratamentos

4.4.1 Tratamento com Carvão Ativado

4.4.1.1 Caracterização do Carvão Ativado por Medidas de Adsorção de N_2

As isotermas de adsorção e dessorção de N_2 mostradas na Figura 13 proporcionaram a caracterização física desse adsorvente por meio dos parâmetros área superficial, calculada pelo modelo Brunauer-Emmett-Teller (BET), e volume e diâmetro dos poros, calculado pelo modelo Barrett-Joyner-Hanlenda (BJH). Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 13.

As análises de caracterização do carvão utilizado indicaram um tamanho médio de poros de 23,1 Å, o que corresponde a um material com predominância de microporos de volume de 0,215 cm³/g.

Os resultados das propriedades texturais obtidas para o carvão apresentadas na Tabela 13 indicam que o adsorvente tem uma área de superfície específica grande (687,0 m²/g), típico de carvões ativados comerciais. Considerando a classificação dos

poros do adsorvente em microporos (diâmetro de poro < 2 nm), mesoporos (diâmetro do poro entre 2 e 50 nm), e macroporos (diâmetro de poro > 50 nm), o diâmetro do poro obtido para o carvão indica que o adsorvente é altamente microporoso.

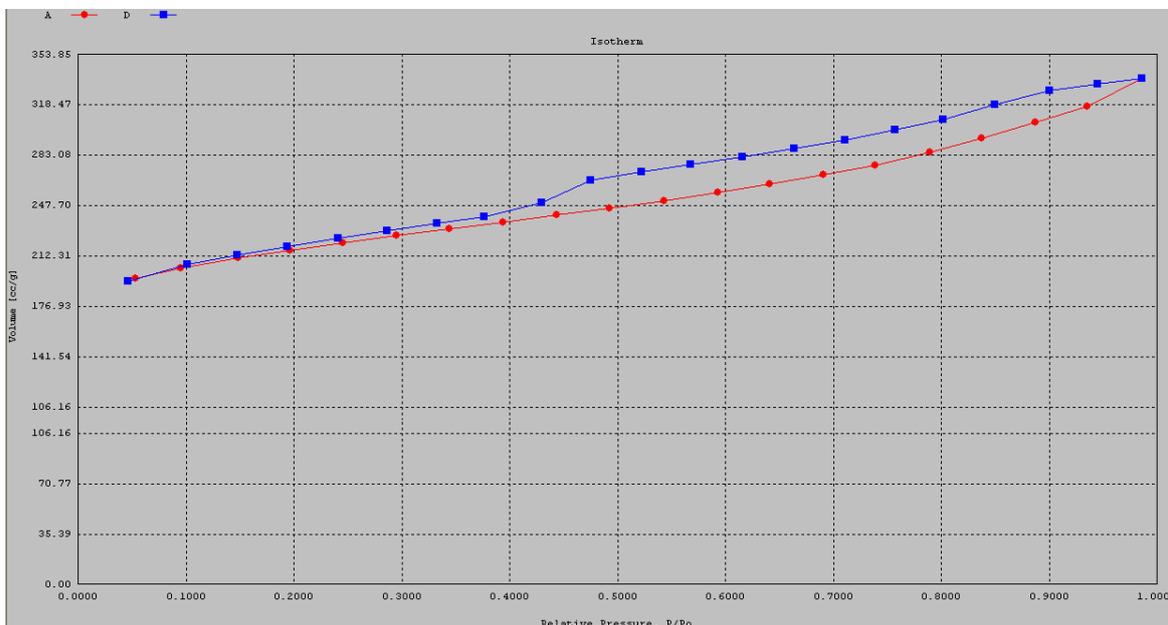


Figura 13: Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ para caracterização física do carvão ativado.

Tabela 13: Caracterização física do carvão ativado.

Parâmetros	Caracterização
Área de Microporos	875,3 m ² /g
Volume de Microporos	0,215 cm ³ /g
Área (BET)	687,0 m ² /g
Diâmetro Médio de Poros (BJH)	23,1 Å

4.4.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Visando à determinação das frequências de vibrações dos grupos funcionais presentes no carvão, realizou-se a espectroscopia no infravermelho possibilitando identificar características superficiais do carvão ativado utilizado. O espectro obtido para o carvão ativado está representado na Figura 14.

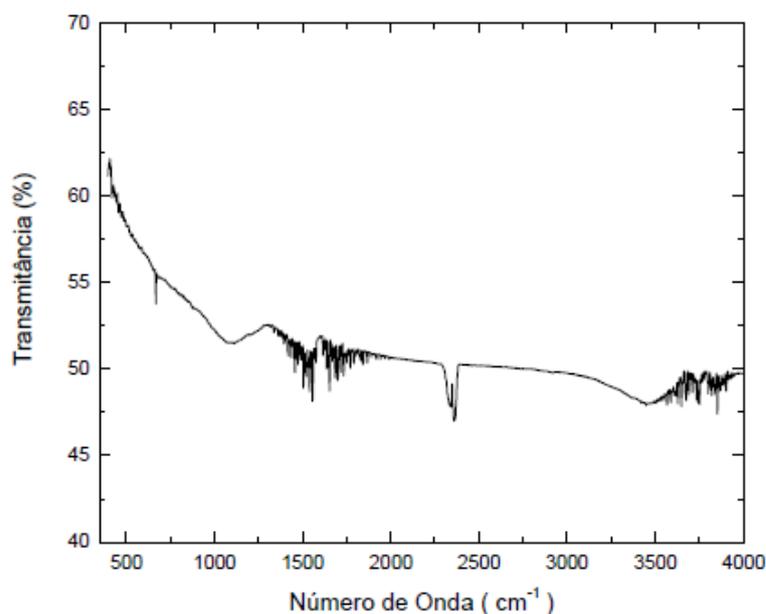


Figura 14: Espectro no infravermelho do carvão ativado utilizado.

Observa-se na Figura 14 a existência de poucos picos, com diferentes intensidades, indicando a existência de poucos grupos superficiais. A presença de grupos hidroxilas, presentes no carvão sob a forma de grupos carboxílicos, é evidenciada por meio da existência de picos em 3600 cm^{-1} . Outros picos detectados, referente ao grupo N-O, podem ser vistos entre 1350 e 1500 cm^{-1} , além de aldeídos e cetonas vistos na faixa de 1500 e 1700 cm^{-1} . Outro pico importante, referente às ligações C=O (aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos), pode ser visto entre 2250 e 2400 cm^{-1} . A superposição de bandas na região entre 1200 e 1600 cm^{-1} e entre 3500 e 4000 cm^{-1} dificulta a identificação dos grupos separadamente.

4.4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises do carvão realizadas por microscopia eletrônica de varredura demonstraram que a superfície apresenta uma estrutura bastante heterogênea e irregular (Figura 15a), com a presença de estruturas tubulares ou nanotubos (Figura 15, b e c), e, aparentemente côncavas, com tamanho dos poros variando entre $1,0$ e $50,0\text{ }\mu\text{m}$, que pode

fornecer uma maior área de deposição ao material, favorecendo o processo de adsorção estudado.

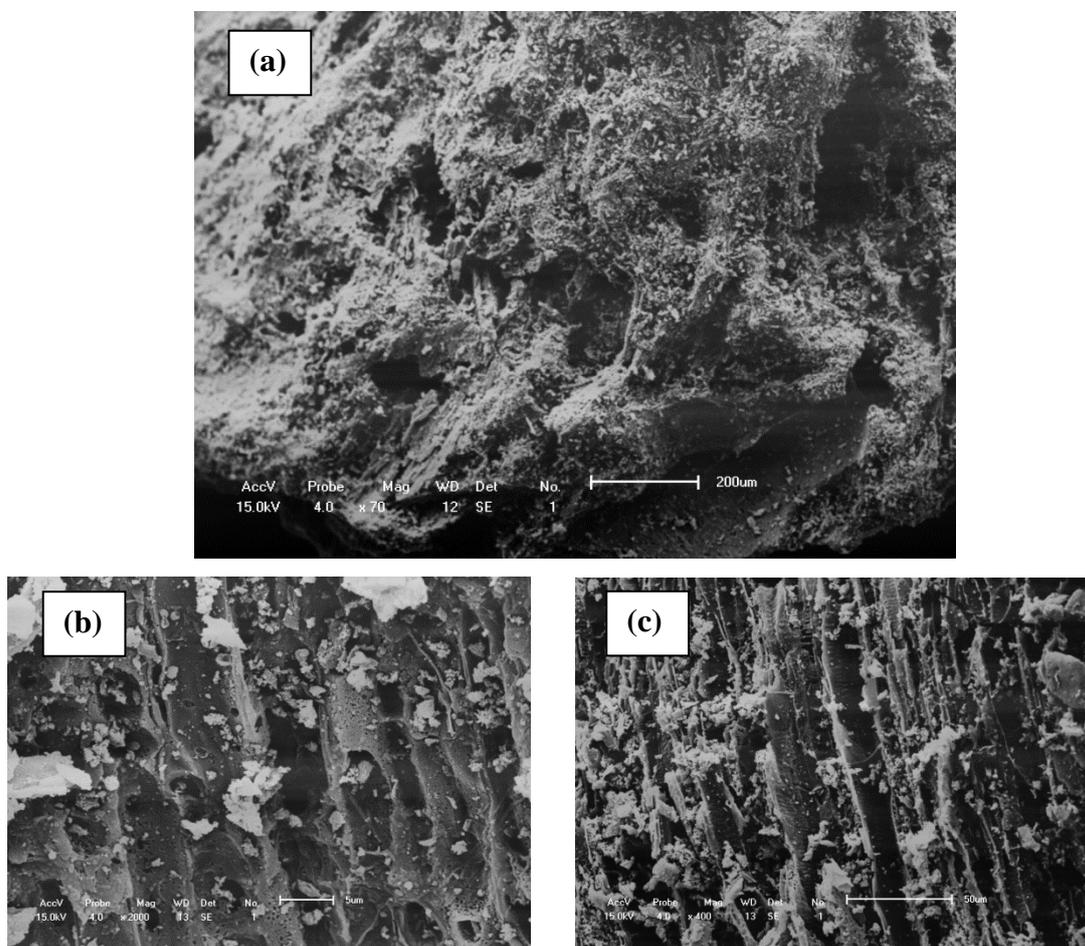


Figura 15: Micrografia do carvão ativado (a) visão geral da superfície, (b) e (c) presença de estruturas tubulares.

Desta forma, as características do carvão ativado utilizado em relação à área superficial, volume e diâmetro de poros bem como a identificação de demais características superficiais evidenciam a boa capacidade de adsorção do material utilizado.

4.4.1.4 Tratamento do Hidrolisado com Carvão Ativado

Coletou-se o hidrolisado após a percolação do material pela coluna contendo carvão ativado pelo período de 1 hora. Comparou-se com a amostra da reação controle

(sem a adição de enzima) e com o hidrolisado sem o tratamento e, conforme mostrado na Figura 16.

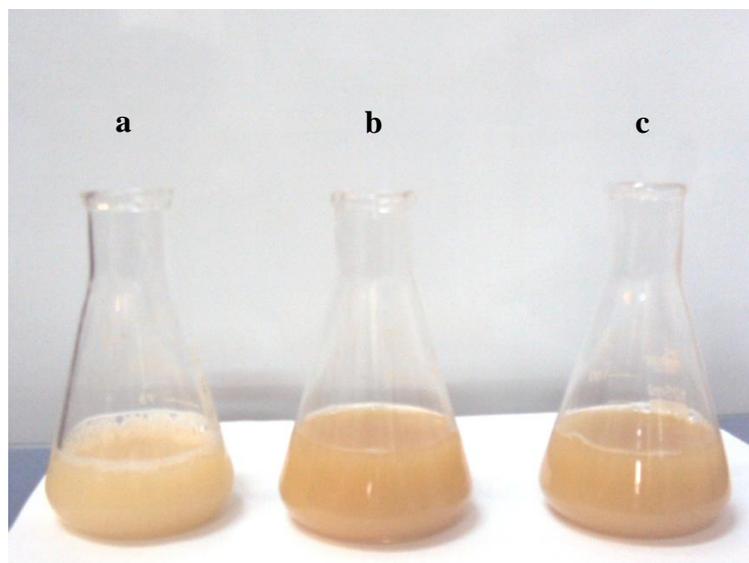


Figura 16: Comparação visual das amostras de (a) hidrolisado controle (sem adição de enzima), (b) hidrolisado e (c) hidrolisado após tratamento com carvão ativado.

Para a avaliação do tratamento com carvão ativado, relacionou-se o teor de proteína via determinação do nitrogênio total obtido para o hidrolisado com o percentual da área do maior pico para cada amostra, obtendo-se o teor de proteína referente a esse pico. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 14.

Pelos dados da Tabela 14, verifica-se que houve diferença no teor de proteína do pico cromatográfico analisado devido a presença de interações entre os aminoácidos de tamanho entre 2,86 e 6,50 kDa e superfície do carvão. Também existe a possibilidade da ocorrência de interações com os aminoácidos livres das amostras.

Realizou-se uma análise de variância dos dados por meio da ANOVA que indicou que as amostras diferem entre si quanto a concentração de proteína da faixa molecular avaliada, ao nível de significância de 5%. Sendo assim, realizou-se o teste de Tukey. O cálculo da diferença média significativa (DMS) nos forneceu um valor de 8,76. Calculou-se a diferença entre os teores de proteína do pico para cada amostra e o teor de proteína do pico da amostra inicial (tempo 0), e comparou-as com a DMS.

Do início do processo de percolação do material até o tempo de 2 horas e 30 minutos de coleta, houve diminuição do teor de proteína na faixa molecular estudada o que

significa que os peptídeos contidos nessa fração foram favoravelmente adsorvidos no carvão. Entretanto, a partir do tempo de 1 hora, essa diminuição não foi significativa. Sendo assim, o tratamento com carvão ativado nas condições utilizadas reduz significativamente as proteínas na faixa molecular de 2,86 a 6,50 kDa até 1 hora de adsorção. Pode-se considerar que, os peptídeos correspondentes a essa faixa interagiram com os poros do carvão, saturando-os até o período de 2 horas e 30 minutos.

Tabela 14: Dados do teor de proteínas na faixa molecular de 2,86 a 6,50 kDa do hidrolisado submetido ao tratamento com carvão ativado.

Tempo de Retirada das Amostras (h)	Teor de Proteína do Pico (%)	Diferença do Teor de Proteína do Pico em Relação à Amostra Inicial (%)
0	96,75	-
15 min	82,31	14,44
30 min	84,35	12,40
45 min	85,58	11,17
1 h	87,45	9,30
1 h 15 min	89,18	7,57
1 h 30 min	91,54	5,21
1 h 45 min	93,37	3,38
2 h	93,44	3,31
2 h 30 min	95,84	0,91
3 h	96,88	-0,13
3 h 30 min	96,88	-0,13
4 h	96,90	-0,15

A adsorção dos peptídeos na faixa molecular de 2,86 a 6,50 kDa foi mais rápida nos estágios iniciais do processo, ao passo que é mais lenta próxima ao equilíbrio. Este comportamento se deve ao fato de que, no início há uma grande quantidade de sítios vazios para a adsorção, com o decorrer do tempo, essa quantidade diminui e podem ocorrer a presença de forças repulsivas das moléculas de peptídeos.

Em geral, o mecanismo para adsorção das substâncias orgânicas envolve os passos seguintes: (1) migração das moléculas de adsorvato da solução para a superfície do

adsorvente, (2) difusão do adsorvato pela camada limite para a superfície do adsorvente, (3) adsorção do adsorvato em um sítio ativo na superfície do adsorvente, e (4) difusão intrapartícula do adsorvato no interior dos poros do adsorvente. Usualmente, a adsorção dessas substâncias em carvão ocorre de forma rápida no tempo inicial de contato e então fica lenta e estagna com o aumento do tempo de contato, o que pode estar relacionada com o tamanho da molécula.

Segundo Geankoplis (1993), a adsorção física (fissiossorção ou adsorção de van der Waals) é um fenômeno cujas forças intermoleculares de atração entre as moléculas do sólido e a substância adsorvida são relativamente fracas. Provalvemente na remoção dos peptídeos o principal mecanismo seja a fissiossorção. Tal fato também pode ser justificado por meio da caracterização da superfície do adsorvente que demonstrou a presença de poucos grupos funcionais presentes no adsorvente. Visto que a capacidade de adsorção de um composto é incrementada com um alto número de grupos funcionais, como por exemplo, compostos com duplas ligações ou compostos halogênicos.

Além dos peptídeos adsorvidos serem retidos na superfície do adsorvente por meio das forças de Van der Waals, tendo em vista a faixa de tamanho molecular a que pertencem, existe a possibilidade de formação da multicamada (adsorção multimolecular) em que existe interação de atração entre a molécula adsorvida e a que está no meio fluido.

4.4.1.5 Cálculo da Capacidade de Adsorção da Coluna

A razão entre o teor de proteínas do pico e o teor de proteínas inicial permite construir a curva de ruptura do processo de adsorção com carvão ativado, conforme mostra a Figura 18 abaixo.

Para o cálculo dos parâmetros de adsorção, considerou-se como sendo o ponto de ruptura o tempo em que a redução no teor de peptídeos na faixa molecular de 2,86 a 6,50 kDa foi significativa, ou seja, 1 hora de adsorção. Adequando os dados obtidos com a literatura (GEANKOPLIS, 1993), ao observar a curva da Figura 17, verifica-se que o ponto de ruptura ocorre nos primeiros tempos de amostras coletadas.

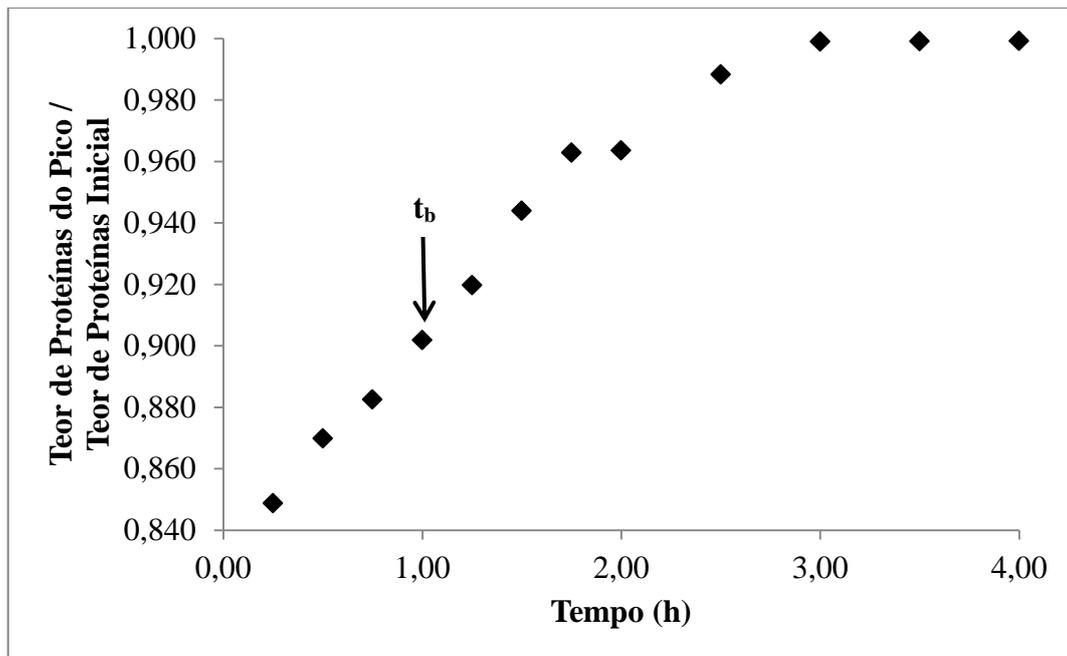


Figura 17: Perfil da razão entre os teores de proteínas na saída do leito.

Para avaliação do comportamento do leito nos testes de adsorção, um parâmetro importante a ser determinado é a Zona de Transferência de Massa (ZTM), ou seja, a porção do leito que não é utilizado efetivamente para a adsorção.

A capacidade total da coluna, se todo o leito atingisse a concentração C_0 , pode ser

apresentada como proporcional à área abaixo da curva $\left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right)$. Entretanto, a capacidade utilizável da coluna refere-se à área abaixo da curva até o ponto de ruptura, que corresponde ao tempo de operação (t_b) da coluna em que a concentração na saída alcança um valor limite C_b (GEANKOPLIS, 1993).

Nesse caso, a área total sob a curva de ruptura representa a capacidade estequiométrica, ou total, do leito, $t_t = 0,721$ h. Analogamente ao tempo total do leito, t_t , o tempo útil (t_u) do leito até o ponto de ruptura (t_b), $t_u = 0,497$ h.

A razão t_u/t_t é a fração útil da capacidade do leito, sendo denominada de tempo adimensional. Multiplicando essa razão pelo comprimento total do leito, é possível encontrar o comprimento do leito utilizado, $H_U = 18,6$ cm. A altura da Zona de Transferência de Massa, ou altura do leito não utilizada, dada pela diferença entre a altura

total do leito e a altura utilizada é 8,4 cm. Sendo assim, 31% da altura total do leito de carvão ativado, nas condições utilizadas, não é utilizável.

A seguir, avaliou-se o teor de aminoácidos livres presentes nas amostras submetidas ao tratamento com o carvão. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 15 e no gráfico da Figura 18.

Tabela 15: Resultados obtidos na análise cromatográfica para a determinação dos teores de aminoácidos livres presentes nas amostras de hidrolisado de farelo de soja submetido ao tratamento com carvão ativado.

		Tempo de Retirada das Amostras (h)										
Aminoácidos (%)		0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	2,50	3,00
Essenciais	phe	0,027	0,026	0,017	0,011	0,016	0,021	0,019	0,022	0,020	0,021	0,020
	his	0,023	0,022	0,018	0,020	0,020	0,021	0,021	0,019	0,020	0,021	0,019
	ile	0,079	0,088	0,068	0,069	0,094	0,086	0,080	0,085	0,079	0,083	0,083
	leu	0,164	0,162	0,123	0,112	0,156	0,147	0,150	0,160	0,149	0,163	0,163
	lis	0,057	0,087	0,055	0,051	0,056	0,062	0,063	0,064	0,062	0,062	0,075
	met	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	thr	0,047	0,055	0,051	0,054	0,055	0,045	0,044	0,058	0,040	0,056	0,052
	val	0,132	0,134	0,102	0,104	0,108	0,122	0,126	0,110	0,128	0,128	0,154
Não-Essenciais	asp	0,084	0,077	0,056	0,054	0,056	0,063	0,062	0,072	0,063	0,073	0,066
	glu	0,215	0,196	0,177	0,174	0,176	0,187	0,181	0,199	0,179	0,198	0,184
	ala	0,074	0,065	0,057	0,051	0,049	0,053	0,052	0,058	0,055	0,054	0,057
	arg	0,057	0,062	0,066	0,054	0,071	0,061	0,058	0,093	0,057	0,074	0,077
	cys	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	gly	0,034	0,030	0,013	0,021	0,023	0,025	0,023	0,025	0,026	0,024	0,034
	pro	0,093	0,084	0,063	0,063	0,069	0,079	0,077	0,083	0,075	0,076	0,077
	ser	0,070	0,080	0,042	0,057	0,061	0,063	0,059	0,065	0,065	0,059	0,080
	tyr	0,053	0,043	0,029	0,024	0,048	0,035	0,032	0,038	0,034	0,032	0,033
Total		1,208	1,211	0,937	0,919	1,057	1,071	1,046	1,151	1,053	1,124	1,175

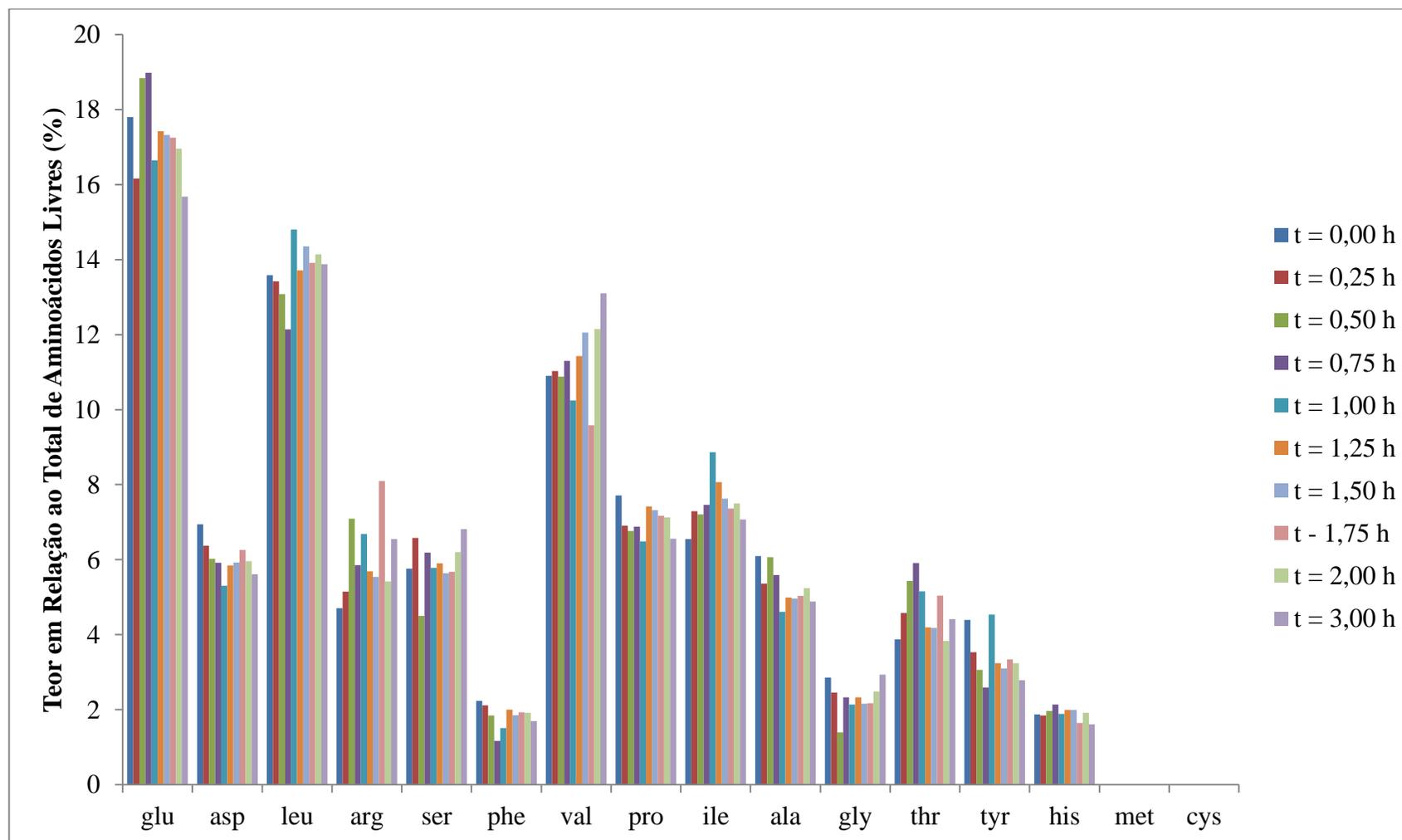


Figura 18: Teores de aminoácidos livres presentes no hidrolisado enzimático de farelo de soja submetido ao tratamento com carvão ativado.

A quebra das ligações peptídicas decorrentes da hidrólise enzimática provocam uma exposição de grupos protonados bem como de maior concentração de cátions H^+ . Peruzzo (2003) sugere que os íons H^+ podem formar ligações com os grupos que contém oxigênio dentro do carvão, nesse caso proporcionam sítios ideais para a formação de aglomerados adsorvidos de água por pontes de hidrogênio, aumentando assim a quantidade de moléculas adsorvidas na superfície e diminuindo assim os sítios disponíveis para a adsorção da molécula.

Os dados da Tabela 15 permitem afirmar que no tempo de 15 minutos, não verificou-se redução do teor de aminoácidos livres, possivelmente devido a ocupação dos poros do carvão pelos peptídeos de cadeias maiores.

No tempo de coleta de 30 minutos, houve uma redução de cerca de 23% do teor total de aminoácidos livres presentes inicialmente. A redução maior foi verificada nos aminoácidos de cadeia alifática prolina (55%), leucina (25%), valina (23%), além do ácido aspártico (33%) e ácido glutâmico (18%).

Até o período de 1 hora, observou-se uma maior redução do teor total de aminoácidos livres, sendo que a redução maior foi verificada nos aminoácidos ácido aspártico e ácido glutâmico, ambos com radical carregado negativamente, além dos aminoácidos leucina, valina, prolina (aminoácidos alifáticos polares). Adsorção de várias espécies aniônicas e catiônicas nos adsorventes é explicada pela adsorção competitiva dos íons H^+ e OH^- com os adsorvatos (HUANG e STUMM, 1973).

Na amostra coletada em 1 hora, observou-se uma redução um pouco menor no teor dos aminoácidos, sendo que os ácidos glutâmico e aspártico apresentaram o mesmo teor de redução do tempo de 30 minutos (33 e 18% de redução, respectivamente). O gráfico da Figura 20 traz a comparação da redução desses aminoácidos.

Após 1 hora e 30 minutos, observou-se uma maior redução do teor dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, 30 e 40% respectivamente. Capobiango (2006) demonstrou a eficácia do carvão ativado na remoção de fenilalanina de hidrolisados enzimáticos de fubá de milho, para ser utilizado em dietas alimentares de fenilcetonúricos. Tal estudo obteve hidrolisados com teores finais de fenilalanina que variaram de 18,80 a 240,75 mg fenilalanina/100 g de hidrolisado.

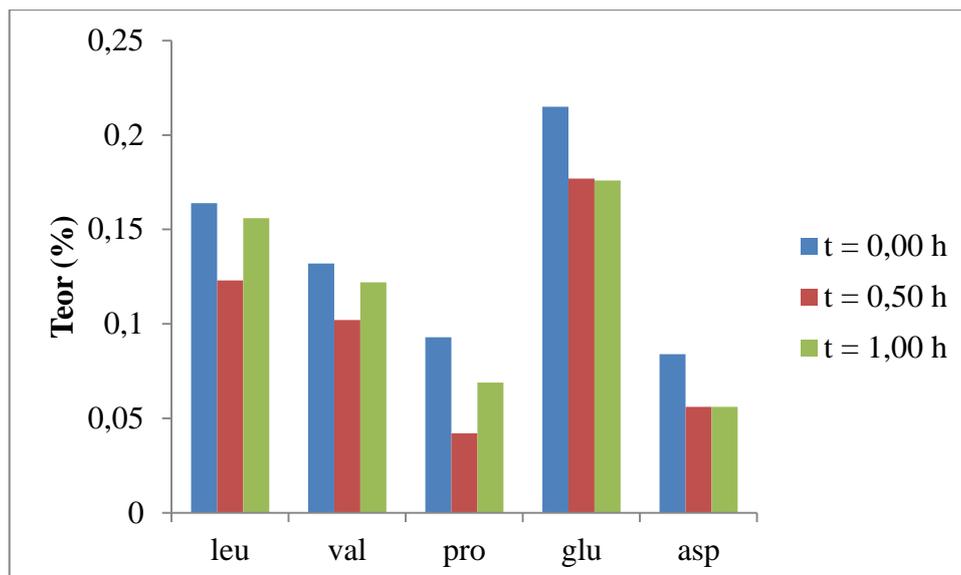


Figura 19: Comparação dos teores dos aminoácidos leucina, valina, prolina, ácido glutâmico e ácido aspártico, presentes no hidrolisado no tempo inicial e nos tempos de coleta de 30 minutos e 1 hora.

Houve uma redução dos teores de alguns aminoácidos nas coletas realizadas após 2 e 3 horas de ensaio, respectivamente: 36 e 38% para a tirosina, 25 e 21% para o ácido aspártico e 17 e 14%, para o ácido glutâmico. A Figura 20 traz a comparação dos teores desses aminoácidos presentes no hidrolisado.

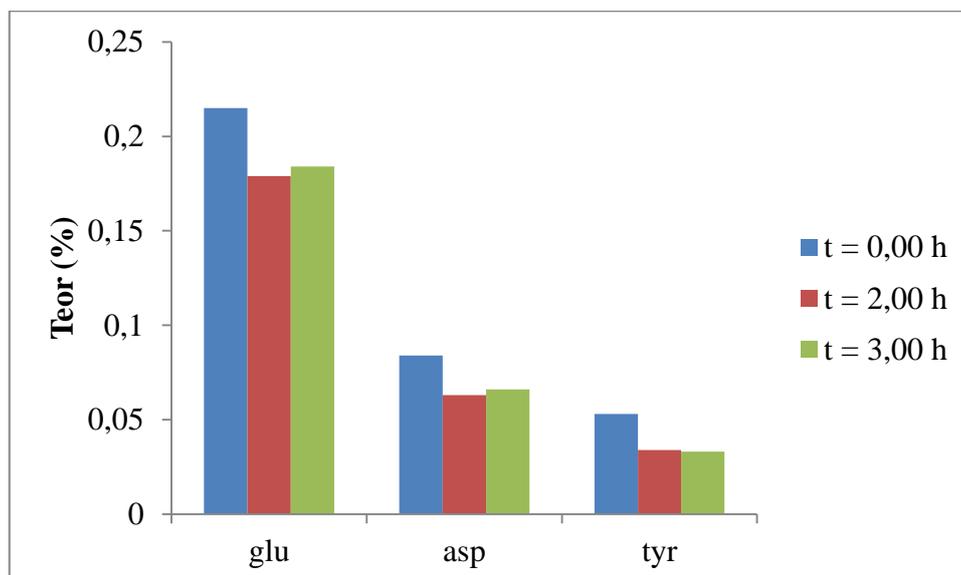


Figura 20: Comparação dos teores dos aminoácidos ácido glutâmico, ácido aspártico e tirosina, presentes no hidrolisado no tempo inicial e nos tempos de coleta de 2 e 3 horas.

A adsorção de compostos orgânicos de soluções aquosas sobre carvão ativado é resultado das propriedades hidrofóbicas do adsorvente (caráter não polar) e /ou alta afinidade dos compostos orgânicos pelo adsorvente (GEANKOPLIS, 1993; PERUZZO, 2003). Nesse caso, percebe-se que houve redução no teor de oligopeptídeos, bem como no teor de aminoácidos livres. Entretanto, especialmente na remoção de moléculas de alto peso molecular, surgem dificuldades no processo de adsorção devido à baixa difusão das partículas nos poros, principalmente no caso de adsorventes granulares.

O hidrolisado enzimático de farelo de soja submetido ao tratamento com carvão ativado pode ser considerado uma fonte de aminoácidos para a produção de alimentos à base de soja.

4.4.2 Tratamento do Hidrolisado com as Ciclodextrinas

Para a avaliação do tratamento com as ciclodextrinas, relacionou-se o teor de proteína via determinação do nitrogênio total obtido para o hidrolisado com o percentual de proteína referente à faixa de peptídeos entre 2,86 e 6,50 kDa para cada amostra tratamento utilizado. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 16.

Tabela 16: Dados cromatográficos dos tratamentos com ciclodextrinas.

Amostra	Teor de Proteína da Faixa Molecular (%)
Hidrolisado	96,75±0,50
Adição em Solução, metodol. Hou e colab. (2011) 1,5% α -CD	90,58±0,90
Adição em Solução, metodol. Hou e colab. (2011) 2,0% β -CD	87,35±0,88
Mistura Física 1,5% α -CD	94,57±0,45
Mistura Física 2,0% β -CD	93,54±0,77
Maxalagem 1,5% α -CD	92,31±0,34
Maxalagem 2,0% β -CD	91,45±0,22

Os dados da Tabela 16 mostram os teores de proteína da faixa molecular entre 2,86 e 6,50 kDa para cada metodologia de adição de α - e β - CDs empregada. Comparando as amostras submetidas aos tratamentos com o hidrolisado sem tratamento, os teores de proteína apresentados indicam que a adição de α - e β - CDs promoveu interações entre os

peptídeos na faixa avaliada e as ciclodextrinas. Ao realizar uma análise de variância dos dados por meio da ANOVA, verificou-se que as amostras diferem entre si quanto ao teor de proteína do pico, ao nível de significância de 5%.

Segundo Drunkler e colaboradores (1999), a estrutura das ciclodextrinas permite a formação de complexos de inclusão estáveis, com grande diversidade de substâncias orgânicas, sais e halogênios, além de formar complexos com substâncias de massa molecular típica de 0,08 a 0,25 kDa. Por ser uma endoproteínase, a enzima Alcalase® 2.4L atua preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, o que permite afirmar que os peptídeos formados ainda tem tamanho relativamente grande, de forma que não haja compatibilidade da faixa de peptídeos estudada com a cavidade da molécula.

Entretanto tais autores afirmaram ser possível que compostos hidrófobos de cadeias longas formem complexos mais fortes do que compostos hidrofílicos de cadeias curtas. Dessa forma, adições são formadas mesmo quando o tamanho molecular do componente a incluir não permite a completa inserção dentro da cavidade central. Segundo os seus respectivos tamanhos, as moléculas complexadas são encapsuladas de maneira total ou parcial, cabendo à ciclodextrina o papel de molécula “hospedeira” ou receptora. Sendo assim, é possível que a diminuição do teor de peptídeos na faixa molecular entre 2,86 e 6,50 kDa tenha ocorrido por uma inclusão parcial desses peptídeos nas ciclodextrinas.

Dentre as metodologias utilizadas, a baseada no descrito por Hou e colaboradores (2011) apresentou maior redução desses peptídeos. Segundo Drunkler e colaboradores (1999), em solução aquosa, a cavidade fracamente apolar da ciclodextrina é ocupada por moléculas de água que podem ser facilmente substituídas por moléculas “hóspedes”, menos polares que a água. Sendo assim, a hidratação do complexo CD é energeticamente favorecida quando comparada com a hidratação separada dos componentes (ASTRAY *et al.*, 2009).

Drunkler e colaboradores (1999) afirmam que a estrutura dos complexos cristalinos de ciclodextrina não é idêntica àquela dos complexos em solução. Nos complexos em solução a molécula incluída na CD possui maior mobilidade enquanto que, no complexo sólido observa-se um arranjo sequestrante firme (VIEIRA, 1999). Em solução, a molécula hóspede (ou seu grupo correspondente) está localizada dentro da cavidade da ciclodextrina e todo complexo é rodeado por múltipla camada de hidratação. No estado cristalino, as moléculas “hóspedes” estão localizadas não somente no interior da cavidade da ciclodextrina, mas também entre seus anéis, na forma de anéis inclusos entrelaçados. Portanto, os complexos cristalinos praticamente não se encontram numa

composição estequiométrica rigorosa, o que explica a menor interação dos peptídeos avaliados com as CDs nas metodologias maxalagem e mistura física.

Veiga e Saltão (2001) destacam que as forças envolvidas no processo de formação dos complexos são ainda, objeto de discussão na comunidade científica. Sabe-se que não se trata apenas de interação apolar clássica. Estão envolvidas forças de van der Wals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e alguns autores apontam, também a liberação de energia devido à substituição de moléculas de água por outras menos polares e devido a alterações conformacionais, que contribuem para a formação e estabilização do complexo.

Munoz-Botela e colaboradores (1995) afirmam que existe a possibilidade de se estabelecerem interações com hóspedes polares graças à formação de pontes de hidrogênio com as hidroxilas. Estas interações, por sua vez, fazem com que se solubilizem as substâncias hidrofóbicas, melhorando a estabilidade de moléculas “hóspedes”, não somente em solventes aquosos, mas também no ar.

Os dados obtidos dos teores de aminoácidos livres das amostras submetidas aos tratamentos com as CDs estão dispostos na Tabela 17 e mostrados no gráfico da Figura 21.

Tabela 17: Resultados obtidos na análise cromatográfica para a determinação dos teores de aminoácidos livres presentes nas amostras de hidrolisado de farelo de soja submetido aos tratamentos com α - e β - CDs.

Aminoácidos (%)		Hidrolisado	Hou 1,5% α -CD	Hou 2,0% β -CD	Maxalagem 1,5% α -CD	Maxalagem 2,0% β -CD	Mist. Física 1,5% α -CD	Mist. Física 2,0% β -CD
Essenciais	phe	0,022	0,020	0,013	0,027	0,014	0,023	0,016
	his	0,026	0,036	0,014	0,025	0,013	0,025	0,015
	ile	0,098	0,068	0,048	0,095	0,049	0,096	0,060
	leu	0,182	0,115	0,081	0,171	0,086	0,171	0,114
	lis	0,079	0,043	0,029	0,070	0,121	0,060	0,040
	met	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	thr	0,050	0,075	0,028	0,067	0,024	0,062	0,042
	val	0,156	0,050	0,061	0,121	0,048	0,126	0,085
Não-Essenciais	asp	0,063	0,058	0,040	0,055	0,038	0,061	0,040
	glu	0,197	0,177	0,117	0,191	0,100	0,197	0,126
	ala	0,052	0,049	0,029	0,066	0,031	0,052	0,035
	arg	0,073	0,089	0,042	0,130	0,044	0,103	0,077
	cys	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	gly	0,034	0,026	0,015	0,018	0,007	0,027	0,019
	pro	0,085	0,063	0,047	0,079	0,041	0,086	0,056
	ser	0,077	0,053	0,030	0,052	0,019	0,063	0,038
	tyr	0,016	0,035	0,026	0,030	0,052	0,022	0,038
Total		1,210	0,957	0,617	1,196	0,689	1,174	0,802

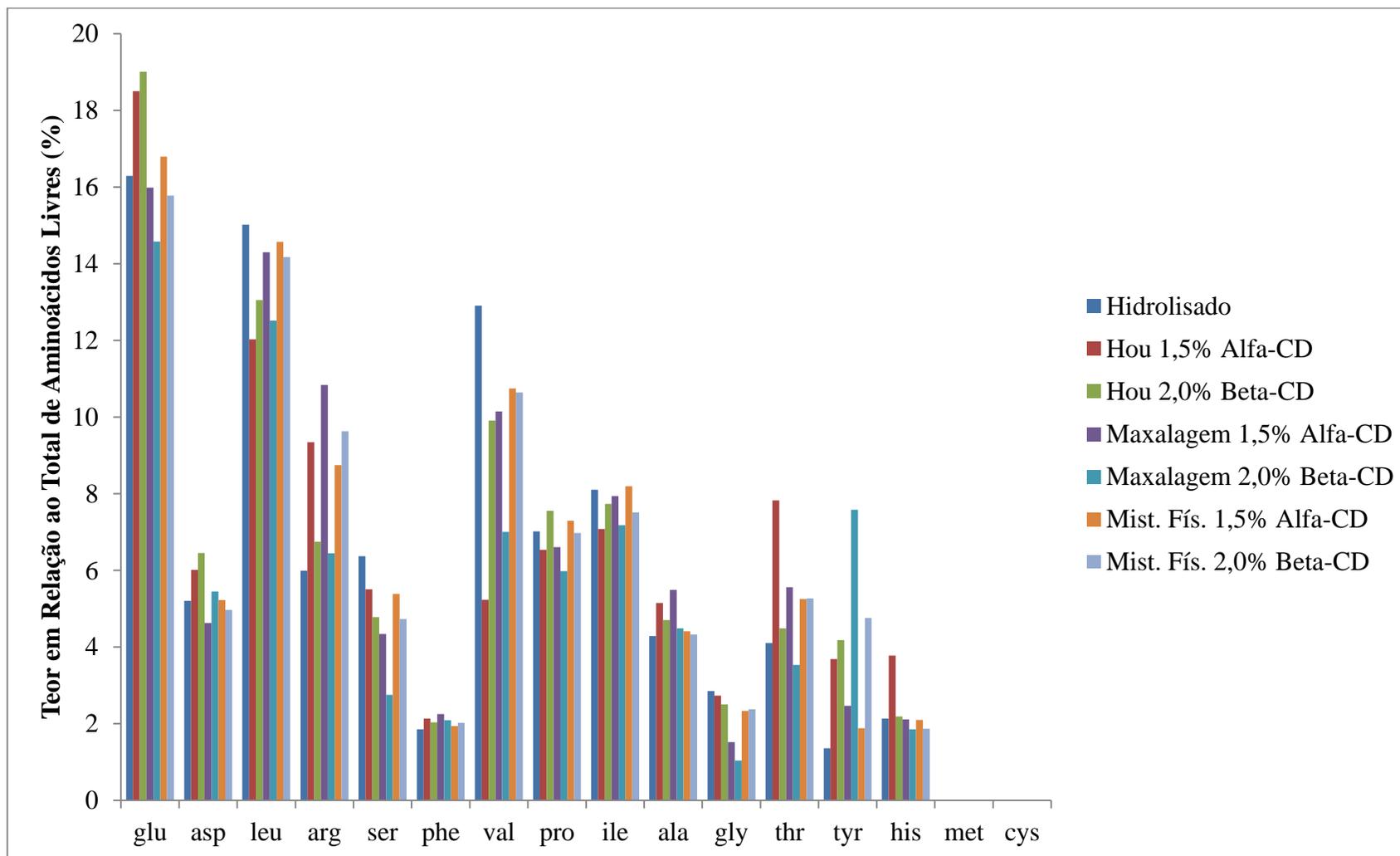


Figura 21: Teores de aminoácidos livres presentes no hidrolisado enzimático de farelo de soja submetido ao tratamento com ciclodextrinas.

Em relação ao teor total de aminoácidos livres do hidrolisado, a adição das ciclodextrinas promoveu as seguintes reduções:

- por meio da metodologia proposta por Hou e colaboradores (2011): 21% para α -CD, 49% para β -CD;
- maxalagem: 1% para a α -CD, 43% para β -CD;
- mistura física: 3% para a α -CD, 33% para β -CD.

Pelos resultados apresentados, observou-se que a metodologia empregada para a adição das ciclodextrinas diferiu na redução do teor de aminoácidos livres.

A redução maior dos aminoácidos livres, tanto utilizando a α - quanto a β - CDs, ocorreu na utilização da metodologia proposta por Hou e colaboradores (2011). Bekers e colaboradores (1991) sugerem que, em geral, moléculas hidrofóbicas, ou parcialmente hidrofílicas, têm uma maior afinidade pela cavidade das CDs em soluções aquosas.

Comparando as ciclodextrinas, as melhores preparações envolveram a utilização da β -CD. Segundo Macedo (2010) a molécula de α -CD apresenta menor cavidade e, conseqüentemente, é incapaz de acomodar moléculas grandes, ao contrário do que ocorre com a β -CD, que por sua vez possui tamanho adequado para conter uma ou duas moléculas de um grande número de substâncias. Além disso, do ponto de vista econômico, a utilização da β -CD também se torna vantajosa já que é a ciclodextrina com menor valor de venda no mercado.

Os aminoácidos que tiveram maior redução em todas as metodologias de tratamento foram: valina, leucina, lisina, isoleucina e serina, conforme mostrado na Figura 22. A menos da lisina e da serina, todos esses aminoácidos são hidrofóbicos. Considerando que a cavidade das ciclodextrinas é hidrofóbica, é possível que haja a formação de complexos de inclusão com esses aminoácidos livres. Quanto aos aminoácidos, lisina e a serina, de natureza hidrofílica, pode ser que tenham ocorrido ligações com a parte externa hidrofílica da ciclodextrina.

Quanto ao ácido glutâmico, observou-se que houve maior redução no teor desse aminoácido no emprego da β -CD: 49% no emprego da maxalagem, 41% quanto utilizou-se a metodologia baseada em Hou e colaboradores (2011), e na amostra de mistura física houve redução de 36% do teor de ácido glutâmico inicialmente presente no hidrolisado. Nesse caso, favoreceu a ocorrência de interações do aminoácido com caráter hidrofílico com a parte externa hidrofílica da ciclodextrina.

Quanto à prolina também houve reduções significativas apenas utilizando a β -CD: 51% na maxalagem, 45% de redução utilizando a metodologia proposta por Hou e colaboradores (2011), e 34% na mistura física. Segundo Del Valle (2004), baseado em suas dimensões, geralmente, a α -CD complexa com moléculas de baixo peso molecular, a β -CD forma complexos de inclusão com compostos aromáticos e heterociclos, que é o caso da prolina, aminoácido hidrofóbico alifático.

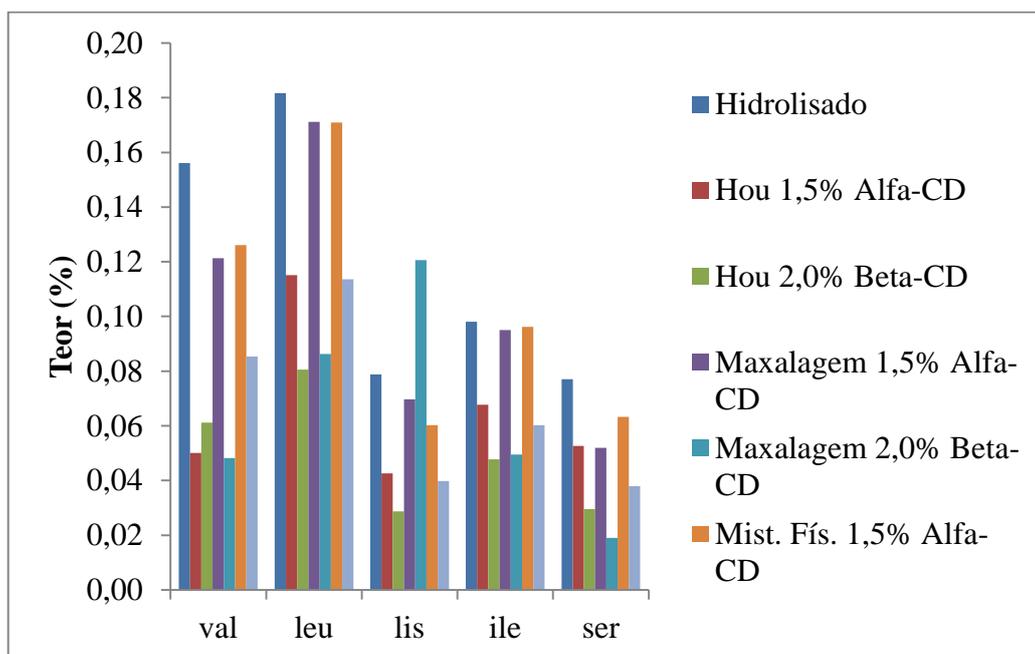


Figura 22: Teores dos aminoácidos livres em que houve maior redução no tratamento com as ciclodextrinas.

Os resultados obtidos por Miertus e colaboradores (1999), indicaram formação de complexos de inclusão com fortes interações hidrofóbicas com aminoácidos com cadeia lateral cíclica ou aromática e fracamente polar como prolina, fenilalanina, tirosina, histidina e triptofano. Os pentapeptídeos destes aminoácidos mostraram também tendência de formação de complexos de inclusão com β -CD com fortes interações hidrofóbicas.

A interação das ciclodextrinas com os peptídeos faz dessa metodologia uma alternativa para processos cujo objetivo é a supressão de moléculas indesejáveis. Além disso, as ciclodextrinas são capazes de ajustar o sabor e aumentar a biodisponibilidade de ingredientes.

4.5 Ressonância Magnética Nuclear

4.5.1 Tratamentos com as Ciclodextrinas

O espectro da β -CD mostrado na Figura 2.A do Anexo 2 apresenta vibrações características. No espectro contendo apenas o hidrolisado de farelo de soja apresenta picos sobrepostos aos picos dos hidrogênios internos à cavidade da β -CD. Desta forma, a simples verificação de deslocamento dos picos não é possível para constatar a formação do complexo de inclusão dos peptídeos contidos no hidrolisado.

Harti e colaboradores (2012), trabalhando com γ -CD e josamicina, afirmaram em seu trabalho que o desaparecimento de picos em espectro de RMN pode ser indício de formação de complexo entre ciclodextrina e o material de trabalho. Partindo deste princípio, podemos observar a diminuição na quantidade de picos no espectro de RMN foi mais efetiva no tratamento do hidrolisado com β -CD seguindo a metodologia de Hou e colaboradores (2011). A diminuição na quantidade dos picos nas regiões correspondentes à vibração dos anéis aromáticos e das cadeias alifáticas é um indício das interações dos peptídeos do hidrolisado de farelo de soja com a β -CD.

Na análise dos resultados feita de maneira análoga à realizada com o espectro de RMN de β -CD e os demais tratamentos, não foi possível observar evidências de formação do complexo de inclusão. O deslocamento dos picos referentes ao H(3) e H(5) não foi possível de se observar devido à sobreposição destes picos com os picos da alfa ciclodextrina. Por meio da observação da Figura 2.B do Anexo 2 também não se pode observar indícios da formação do complexo de inclusão pelo desaparecimento dos picos na região de cadeias aromáticas e alifáticas.

4.5.2 Tratamento com Carvão Ativado

Observando o espectro da Figura 2.C do Anexo 2 verifica-se que durante as duas horas de percolação do hidrolisado pela coluna de carvão ativado pode ser observada a redução gradativa dos picos das regiões das cadeias aromáticas e alifáticas, desta forma, houve uma considerável diminuição dos picos destas regiões principalmente no tempo de 30 minutos de percolação do adsorbato pelo carvão ativado.

Após o tempo de coleta de 30 minutos, observou-se um aumento gradativo do aparecimento destes picos. Este aumento pode estar relacionado à dessorção destes

compostos dos poros do carvão ativado. Ou seja, o material que permanecia adsorvido, deixa de estar aderido à superfície e volta a integrar a solução que percola pelo adsorvente.

4.6 Análises Sensoriais

4.6.1 Teste de Preferência

Apesar das características sensoriais fornecerem apenas uma estimativa da aceitação dos produtos, os testes sensoriais são de suma importância uma vez que indicam o potencial do produto, mediante a aceitabilidade do público alvo. Sendo assim, os testes de análise sensorial foram aqui utilizados como parâmetro para a melhoria das formulações preparadas e, diante dos resultados, direcionar a pesquisa em busca de um produto com características mais agradáveis ao paladar.

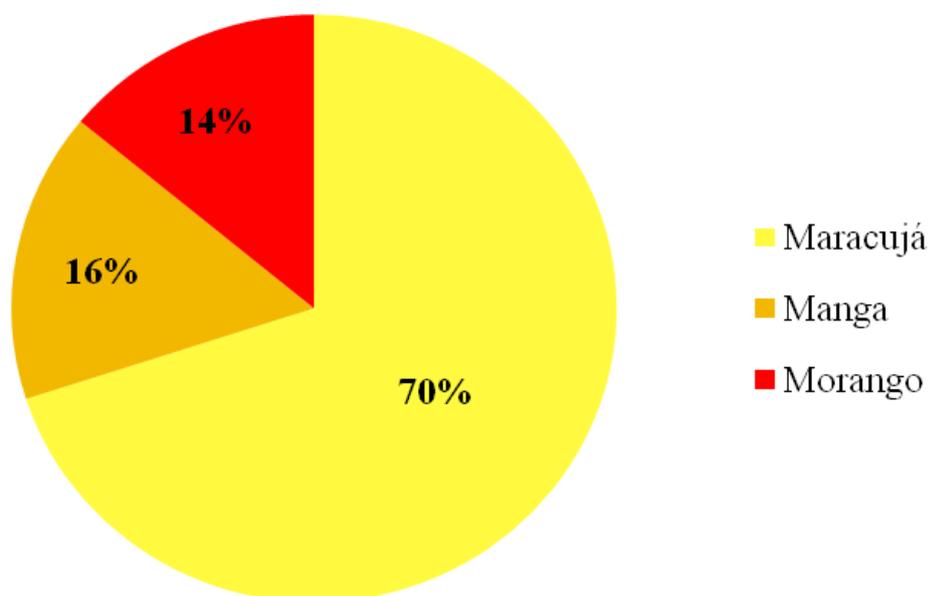


Figura 23: Gráfico do teste sensorial para avaliar a preferência do provador em relação a três formulações de bebidas à base de soja diferentes entre si pelo sabor da polpa de fruta: maracujá, manga e morango.

A Figura 23 apresenta o resultado do teste de preferência realizado com as formulações preparadas com hidrolisado enzimático sem tratamento e diferentes sabores de

polpa de fruta no qual o provador escolhia a amostra que mais agradasse ao seu paladar. Observa-se que 70% dos provadores preferiram a bebida à base de soja no sabor maracujá, 16% deram preferência ao sabor manga e 14% indicaram como preferida a amostra com polpa de morango.

De acordo com a análise estatística, a bebida à base de soja sabor maracujá diferiu das amostras sabor manga e sabor morango ao nível de 5% de significância. Já as amostras sabor manga e sabor morango não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$) quanto à preferência. É correto afirmar que a amostra sabor maracujá foi a preferida pelos julgadores com 70% de aceitação.

Dados da Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas (Abir) demonstram que, em 2009, o consumo de sucos/néctares prontos para beber sabor manga foi maior (6,90%) do que as bebidas de sabor maracujá (6,50%) e sabor morango (3,50%) (PIRILLO e SABIO, 2009). Então, o resultado da análise sensorial quanto à preferência de 70% dos julgadores pelo sabor maracujá pode estar relacionada ao preparo da formulação e não à preferência do provador em relação ao sabor da fruta.

Nesse caso, a preferência pela formulação de sabor maracujá pode estar relacionada com a presença do ácido cítrico na formulação. Este ingrediente, aqui utilizado por sua propriedade conservante, geralmente é utilizado em bebidas para dar o sabor ácido ou agridoce, imitando o gosto dos frutos. Assim sendo, o ácido cítrico pode ter realçado o sabor ácido da polpa de maracujá de modo que o amargor característico do hidrolisado se mantivesse mascarado.

Sendo assim, o teste de preferência foi importante pois forneceu uma estimativa de aceitação do produto baseada na sua característica sensorial. Ainda é possível afirmar que a formulação preparada com o hidrolisado enzimático de farelo de soja possibilitou aliar as características do sabor da fruta com as propriedades benéficas inerentes de produtos à base de soja.

Definidas as quantidades dos ingredientes para a formulação da bebida à base de soja mais agradável sensorialmente, nos testes sensoriais seguintes optou-se por preparar as formulações com polpa de fruta sabor morango, que obteve a menor aceitação entre os sabores para enfrentar a dificuldade de melhorar a formulação com aceitação sensorial mais reduzida.

4.6.2 Testes de Escala Hedônica

As notas obtidas nos testes de escala hedônica passaram por uma análise de variância por meio da ANOVA fator único, que forneceu as notas médias das formulações preparadas a fim de verificar a aceitabilidade do hidrolisado submetido aos tratamentos.

4.6.2.1 Tratamento com Carvão Ativado

A Figura 24 a seguir apresenta as notas médias das formulações para avaliar o tratamento do hidrolisado com carvão ativado.

A formulação contendo o hidrolisado sem tratamento apresentou uma nota média 6,00, que na escala hedônica apresentada corresponde à classificação “gostei ligeiramente”. Em relação à formulação contendo hidrolisado tratado com carvão ativado, a nota média obtida foi 7,82, que corresponde a “gostei muito”. Pelas notas médias apresentadas e a classificação na escala hedônica, pode-se afirmar que ambas as amostras obtiveram uma boa aceitação entre os provadores.

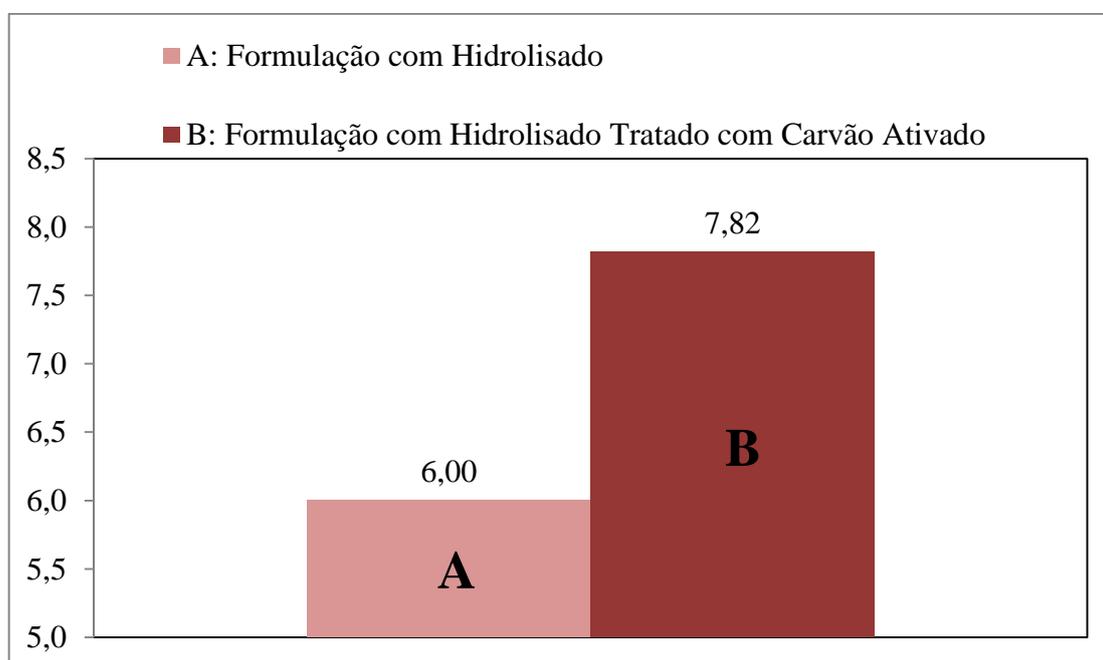


Figura 24: Notas médias obtidas no teste de escala hedônica aplicado com 50 provadores não treinados para avaliar a aceitabilidade de duas formulações com polpa de fruta sabor morango, sendo (A) com hidrolisado enzimático de farelo de soja e (B) com hidrolisado submetido ao tratamento com carvão ativado.

Pela análise de variância, concluiu-se que existe diferença significativa entre a aceitação das amostras ao nível de significância de 5%. E ainda, a formulação contendo hidrolisado enzimático tratado com carvão ativado obteve maior aceitação do que a amostra que não recebeu esse tratamento.

Segundo Soares (2008), os principais aminoácidos responsáveis pelo sabor amargo são a fenilalanina, a tirosina, a arginina, a leucina, a isoleucina, a valina, a metionina e a histidina. Ao submeter o hidrolisado enzimático de farelo de soja ao processo de adsorção com carvão ativado, verificou-se uma diminuição do teor de oligopeptídeos bem como do teor de alguns desses aminoácidos de sabor amargo.

Stroher e colaboradores (2011), utilizaram o carvão ativado como tratamento de um hidrolisado de farelo de soja obtido em condições semelhantes, porém sem extração de carboidratos do farelo e tempo de reação de hidrólise de 3 horas. Os autores detectaram mudanças nas características sensoriais do hidrolisado enzimático de farelo de soja tratado com carvão ativado e ainda afirmaram que, a diminuição do teor de proteína total favoreceu a redução do amargor residual decorrente da reação de hidrólise enzimática de forma a melhorar a aceitabilidade desse produto.

4.6.2.2 Tratamento com β -Ciclodextrina

A Figura 25 a seguir apresenta as notas médias das formulações para avaliação do hidrolisado com adição em solução de 2,0% de β -CD.

A formulação contendo o hidrolisado sem tratamento apresentou uma nota média 5,72, que na escala apresentada corresponde a um valor próximo de “gostei ligeiramente”. Já a formulação contendo hidrolisado com adição de 2,0% de β -CD obteve nota média 8,04, valor que se classifica na escala como acima de “gostei muito”. A boa aceitação de ambas as amostras entre os provadores pode ser verificada pela classificação das notas médias obtidas na escala hedônica.

A análise de variância permite concluir-se que existe diferença significativa de aceitação entre as amostras ao nível de significância de 5%, sendo que a formulação contendo 2,0% de β -CD adicionada ao hidrolisado enzimático obteve maior aceitação do que a amostra contendo apenas o hidrolisado.

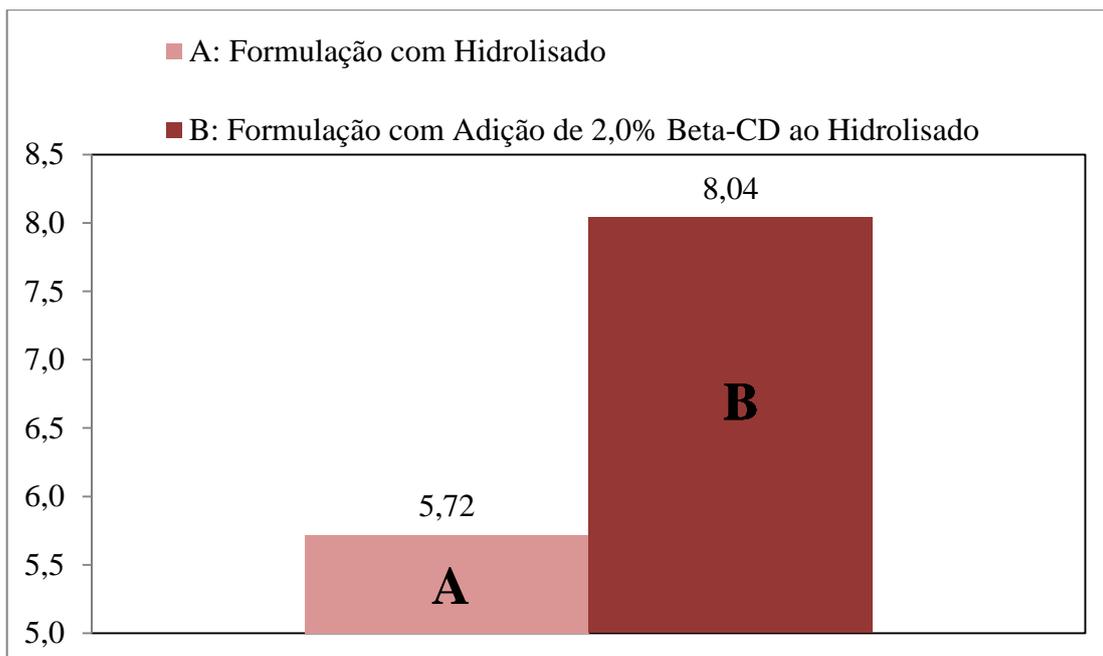


Figura 25: Médias das notas obtidas no teste de escala hedônica aplicado com 50 provadores não treinados para avaliar a aceitabilidade das formulações preparadas com polpa de fruta sabor morango, sendo (A) com hidrolisado enzimático de farelo de soja e (B) com adição em solução de 2,0% β -CD ao hidrolisado.

Segundo Hou e colaboradores (2011), a adição da β -CD ao hidrolisado de isolado proteico de soja foi considerado um tratamento efetivo, já que manteve o poder redutor e diminuiu o amargor desse hidrolisado. A redução do amargor também foi verificada por Linde e colaboradores (2010) na utilização de β -CD em hidrolisado de proteína de soja.

Monge Neto (2013) afirma que tratamentos com a adição de 1,5% de α -CD ou 2,0% de β -CD ao hidrolisado enzimático de farelo de soja resultam em significativas modificações nas características sensoriais desse hidrolisado. Ao nível de 5% de significância, ambos os tratamentos testados 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 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.

A necessidade de modificações capazes de alterar o sabor do hidrolisado enzimático do farelo de soja é etapa fundamental no desenvolvimento de produtos diferenciados para o consumidor final. Desta forma, pode-se afirmar que ambos os

tratamentos avaliados contribuíram na busca por um produto diferenciado, modificando sensorialmente as características da formulação da bebida à base de soja desenvolvida e resultando em um produto com sabor mais agradável ao paladar do consumidor.

O tratamento com carvão ativado pode ser considerado um processo vantajoso por ser um adsorvente comum. Além disso, por seu caráter anfótero decorrente dos vários grupos funcionais na sua superfície, tanto cargas negativas (aniônicas) como cargas positivas (catiônicas) serão adsorvidas do meio. Entretanto, por ser um processo capaz de remover substâncias do meio, a adsorção em carvão ativado pode comprometer o valor nutricional do hidrolisado dependendo a finalidade dietética ao qual se destina.

A adição das ciclodextrinas promoveram interações com os peptídeos e aminoácidos do hidrolisado enzimático de farelo de soja, contribuindo para a supressão de moléculas indesejáveis relacionadas ao amargor do hidrolisado. Além de aumentar a biodisponibilidade, o tratamento com as ciclodextrinas é vantajoso pelo fato de não remover nenhum componente do hidrolisado de forma que não implique em perda do valor nutricional.

5. CONCLUSÕES

Os resultados da composição do farelo de soja apresentando um alto teor de proteína e baixo teor de carboidratos, 77,73 e 11,04% b.s, respectivamente, permitem afirmar que o processo de extração por meio de solução etanólica de carboidratos ao qual foi submetido o farelo coletado, promoveu melhorias significativas no substrato da reação bem como no hidrolisado obtido. Sendo assim, a redução de 44,0% no teor de carboidratos em base seca proporcionou condições mais adequadas para a extração da proteína do farelo de soja.

Os resultados de composição centesimal apresentados para o hidrolisado enzimático confirmam sua potencialidade na produção de alimentos destinados ao consumo humano, proporcionando a possibilidade de agregar valor a esse subproduto da indústria de óleo vegetal. Dessa forma, a utilização de alternativas tecnológicas que proporcionem valor agregado à matéria-prima de interesse é de fundamental importância porque viabiliza a criação de novos produtos no mercado industrial da soja.

Visando à otimização de algumas condições dessa hidrólise, foi possível investigar os efeitos dos fatores concentração de enzima e tempo de reação na concentração de proteína solúvel o maior pico cromatográfico. Obteve-se um modelo que fornece uma boa estimativa da concentração de proteína do pico cromatográfico, satisfazendo a predição dos dados experimentais.

O perfil peptídico do hidrolisado indicou que 96,75% dos peptídeos presentes estão na faixa molecular entre 2,86 e 6,50 kDa, e um teor de aminoácidos livres de 1,21%.

No tratamento do hidrolisado enzimático com carvão ativado observou-se uma adsorção mais rápida nos estágios iniciais do processo, ao passo que é mais lenta próxima ao equilíbrio. Os peptídeos na faixa molecular de 2,86 a 6,50 kDa tiveram redução do teor de proteína de 12,4 e 9,3%, para amostras coletadas em 30 minutos e 1 hora de percolação do material pelo leito, respectivamente. Verificou-se reduções de 22,4 e 12,5% no teor de aminoácidos livres das amostras coletadas em 30 minutos e 1 hora de percolação do hidrolisado pelo leito de carvão. O ácido aspártico e o ácido glutâmico, ambos com radical carregado negativamente, estão entre os aminoácidos livres em que verificou-se maior redução no teor para a amostra coletada em 1 hora, 33,3 e 18,1%, respectivamente.

A adição das ciclodextrinas ao hidrolisado foi eficiente pois promoveu a interação das ciclodextrinas com os peptídeos e aminoácidos livres. A utilização da β -CD foi mais eficiente do que a α -CD na redução dos teores de peptídeos na faixa de 2,86 a 6,50 kDa

bem como no teor de aminoácidos livres. A metodologia em que se adicionou a CD em solução favoreceu as reduções dos teores avaliados: peptídeos na faixa de 2,86 a 6,50 kDa, 6,4 e 9,7%, para α - e β - CDs, respectivamente; aminoácidos livres, 20,9 e 49,0%, para α - e β - CDs, respectivamente. Tal fato está relacionado à maior afinidade das moléculas hidrofóbicas ou parcialmente hidrofílicas pela cavidade das CDs em soluções aquosas.

A boa aceitação entre os provadores das amostras submetidas aos tratamentos com carvão ativado e com a β -CD pode ser verificada pela classificação das notas médias obtidas na escala hedônica.

Ambos os tratamentos utilizados são eficientes pois promoveram interações entre os peptídeos e aminoácidos livres do hidrolisado enzimático de farelo de soja. O carvão ativado pode ser considerado uma alternativa para tratamento desse hidrolisado uma vez que favoreceu o processo de adsorção, resultado das propriedades hidrofóbicas do adsorvente e da afinidade dos compostos orgânicos pelo adsorvente. As ciclodextrinas também podem ser consideradas uma opção de tratamento do hidrolisado, uma vez que ao interagirem com as moléculas presentes no material, resultam em uma melhor biodisponibilidade desse ingrediente.

É importante considerar que as diferenças obtidas nessas pesquisas podem estar relacionadas não apenas aos distintos tratamentos empregados que propiciaram variações nos teores da faixa de peptídeos avaliados e nos teores de aminoácidos livres nesses hidrolisados. É possível que haja modificações de outros compostos e moléculas não avaliadas no presente trabalho, os quais podem ter atuado sinergicamente com as substâncias utilizadas para os tratamentos.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilização da espectrometria de massa para a determinação das massas de proteínas e peptídeos do hidrolisado de farelo de soja. E, posteriormente, se possível, utilizar esses dados para deduzir alterações na estrutura básica das proteínas que venham ocorrer no decorrer da reação.

- Investigar outras variáveis da reação a fim de direcionar o fracionamento do hidrolisado de acordo com a composição em proteínas. As propriedades funcionais, nutricionais e/ou biológicas devem ser ajustadas de acordo com determinada aplicação desejada visando empregá-lo em dietas alimentares específicas.

- Quantificação de peptídeos bioativos presentes em produtos à base de soja.

- Uso de programa computacional para prever a estrutura das proteínas.

- Avaliação da digestibilidade das proteínas do hidrolisado produzido por meio de testes *in vivo* em diferentes espécies.

- Avaliação do ganho financeiro de utilização dos produtos hidrolisados para definição do valor de mercado.

- Viabilidade econômica do processo.

- Testes adicionais em escala piloto para viabilização econômica.

- Colocação do novo produto no mercado.

7. REFERÊNCIAS

ACASIO, U. A. Handling and Store of Soybeans and Soybean Meal. Technical Bulletin. Singapura: American Soybean Association – ASA, nº 044/11/96. p. 16, 1997.

ADLER-NISSEN, J. “Control of the Proteolytic Reaction and of the Level of Bitterness in Protein Hydrolysis Processes”. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 34, p. 215-222, 1985.

AFONSO, W. O.; BIASUTTI, E. A. R.; GERALDI, L. M.; SILVA, V. D. M.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M. P. C. “Emprego da Hidrólise Enzimática Utilizando Subtilisina para Elevar o Valor Nutricional do Soro de Leite. *Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim.*, São Paulo, SP, v. 34, n. 1, p. 97-114, abr. 2009.

ALMEIDA, M. E. W. A.; SIMÃO, A. M. “Aminoácidos de Proteína de Soja e Dosagem de Ácido Glutâmico”. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, n. 32, p. 105-112, 1972.

ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J. C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. “A Review of the Use of Cyclodextrins in Foods”, *Food Hydrocolloids*, v. 23, p.1631-1640, 2009.

BACKES, S. Análise Proteômica de Variedades Convencionais e Geneticamente Modificadas de Soja (*Glycine max*) Visando Proteínas Bioativas. 136 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

BAKER, D. H. Nutritional Constraints to Use of Soy Products by Animals. In: *J. K. Drackley, J. K. Ed. Soy in Animal Nutrition*, Federation of Animal Science Societies, p. 1-12. 2000.

BARBOSA, C. M. S.; MORAIS, H. A.; LOPES, D. C. F.; MANSUR, H. S.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. “Microencapsulação de Hidrolisados de Caseína em Lipoesferas Para Mascaram o Sabor Amargo: Avaliação Físico-Química e Sensorial Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas”, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, n. 3, jul./set. 2002.

BARROS, M. A. S. D. *Avaliação do Mecanismo de Troca Iônica de Cromo em Sistemas Zeolíticos*. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, 2003.

BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. “Hidrolizados de Proteína: Procesos y Aplicaciones”, *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*, v. 42, n. 2, p. 227-236, 2008.

BEKERS, O.; UIJTENDAAL, E.V.; BEIJNEN, J.H.; BULT, A.; UNDERBERG, W. J. M. “Cyclodextrins in the Pharmaceutical Field”. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 17, p. 1503-1549, 1991.

BIASUTTI, E. A. R. Otimização das Condições da Hidrólise Enzimática das Proteínas do Soro de Leite para Obter elevado Teor de Oligopeptídeos: Utilização da Subtilisina e da Pancreatina. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2006.

BOZA, J. J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A. R.; GAUDARDDE-WECK, D. O. “Ballèvre Protein Hydrolysate vs Free Amino Acid-Based Diets on the Nutritional Recovery of Starved Rat”. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 795 de 15 de Fevereiro de 1993. Estabelece norma de identidade, qualidade, embalagem, marcação e apresentação do farelo de soja. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 dez., 1993.

BUTOLO, J. E. Qualidade de Ingredientes na Alimentação Animal. Campinas: Agros Comunicação, 2002.

CAETANO, F. F. Aproveitamento do Farelo de Soja no Desenvolvimento de Meios e Processos para a Obtenção Produtos Proteicos e Derivados. 165 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. 2012.

CÂNDIDO, L. M. B. Obtenção de Concentrados e Hidrolisados Protéicos de Tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*): Composição, Propriedades Nutritivas e Funcionais. 227 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 1998.

CAMPOS, S. “A Qualidade da Soja Processada e a Importância de Eliminar os Fatores Anti-Nutricionais”, *Medicina Avançada*. 2006. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/>>. Acesso em: 10 de agosto de 2008.

CAPOBIANGO, M. *Extração das Proteínas do Fubá de Milho e Obtenção de Hidrolisados Protéicos com Baixo Teor de Fenilalanina*. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2006.

CARDOSO, L. R. et al. “Atividade de Inibidores de Proteases em Linhagens de Soja Geneticamente Melhoradas”. *Alimentos e Nutrição*, v. 18, n. 1, p. 19-26, mar., 2007.

CARREIRA, R. L.; BARBOSA, M. da S.; JUNQUEIRA, R. G.; da MOTTA, S.; SILVESTRE, M. P. C. “Emprego de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Hidrofílica na Determinação dos Aminoácidos de Hidrolisados de Caseína”, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 22, n. 3, p. 229-232, set./dez. 2002.

CARREIRA, R. L.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; da MOTTA, S.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. “Otimização da Hidrólise da Caseína para Elevar o Teor de Pequenos Peptídeos: Emprego da Pepsina”. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 27, n. 3, p. 625-634, maio/jun. 2003.

CAVANAGH, J.; FAIRBROTHER, W. S.; PALMER, A. G.; RANCE, M.; SKELTON, N. J. 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, 2007.

CECCHI, H. M. *Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos*. 2. ed., Campinas: Ed. Unicamp, 2003. 207 p.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENTE, D. *Proteínas Alimentarias-Bioquímica Propriedades Funcionales-Valor Nutricional-Modificaciones Químicas*. Acribia, Zaragoza, 345 p., 1989.

CHEFTEL, J. C.; LORIENT, D. “Las proteínas de Soja”. In: PROTEINAS ALIMENTARES, BIOQUÍMICA, PROPIEDADES FUNCIONALES E VALOR NUTRICIONAL. Zaragoza: Acribia, p. 257-275. 1990.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M. de F. P.; MANDARINO, J. M.; TARONE, A. G. “Avaliações Químicas e Bioquímicas dos Grãos, Extratos e Tofus de Soja Comum e de Soja Livre de Lipoxigenase”, *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 30, n. 5, p. 920-929, set./out., 2006.

CLEMENTE, A. “Enzymatic Protein Hydrolysates in Human Nutrition”. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, p. 254-262, 2000.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F; ROSA, M. de F.; FURTADO, A. A. L. “Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: Produção de Enzimas a Partir da Casca de Coco Verde”, *B.CEPPA*, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, jan./jun., 2001.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. *Tecnologia Enzimática*. 1. ed. Petrópolis: EPUB, 288 p. 2008.

COGAN, V.; MOSHE, M.; MOKADY, S. “Debittering and Nutritional Upgrading of Enzymic Casein Hydrolyzates”. *J. Sci. Food Agric.*, v. 32, p. 459-466, 1981.

COLAUTO, G. A. L. *Caracterização de Complexos de Inclusão entre Ciclodextrinas e Aminoácidos Envolvidos no Sabor Amargo*. 220 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 2008.

CONAB, 2013a, Companhia Nacional de Abastecimento. Perspectivas Agropecuárias, Brasília, v. 1, p. 1-154, set. 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_13_14_55_32_perspectivas_da_agropecuaria_2013.pdf>. Consultado em: 5 de janeiro de 2014.

CONAB, 2013b, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos - Segundo Levantamento - Safra 2013/14, v. 1, n. 2, nov. 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_11_08_54_13_boletim_portugues_novembro_2013_-_ok.pdf>. Consultado em: 25 de novembro de 2013.

COUTINHO, A. R.; BARBIERI, F. C.; PAVANI, P. A. Preparação de Carvões Ativados a Partir de Fibras de Celulose. In: ANAIS DO 2º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO, Universidade Federal de Santa Catarina, 1998. p. 139-144.

CUSTÓDIO, A. F. Modelagem e Simulação do Processo de Separação de Óleo de Soja-Hexano por Evaporação. 247 p. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2003.

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H.; OLIVEIRA, A. O Complexo Agroindustrial da Soja Brasileira. Circular Técnica 43. Londrina: Embrapa Soja, 2007, 12 p. Disponível em: <http://www.aprosoja.com.br/novosite/downloads/EMBRAPA_Complexo_Industrial_da_Soja_%202007.pdf>. Consultado em: 11 de novembro de 2011.

DEL VALLE; E. M. M. "Cyclodextrins and Their Uses: a Review". *Process Biochem.*, v. 39, p. 1033-46, 2004.

DIAS, D. R. *Uso de Protease de Bacillus spp. na Hidrólise Protéica de Farinha de Feijão (Phaseolus vulgaris L.)*. 144 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2007.

DREWNOWSKI, A.; GOMEZ-CARNEROS, C. " Bitter Taste, Phytonutrients, and The Consumer: A Review". *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 72, p. 1424–1435, 2000.

DRUNKLER, D. A.; FETT, R.; LUIZ, M. T. B. “Polímeros de Ciclodextrina: Características, Formação de Complexos de Inclusão e Aplicações Industriais”. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 21-32, jan./jun.1999.

DUTCOSKY, S. D. *Análise Sensorial de Alimentos*. 3. ed. Curitiba: Ed. Universitária Champagnat, 123 p. 1996.

EMBRAPA, 2011, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Soja - Sistema de Produção. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Consultado em: 28 de agosto de 2011.

FISCHER, M. *Limiting Factors for The Enzymatic Accessibility of Soybean Protein*. 155 p. Ph.D. Thesis – Department of Agrotechnology and Food Sciences, Wageningen University, Wageningen. 2006.

FRACETO, L. F. et al., “Caracterização do Complexo de Inclusão Ropivacaína: b-Ciclodextrina”, *Quím. Nova*, v. 30, n. 5, São Paulo, set./out., 2007.

FUKE, S.; KONOSU, S. “Taste-Active Components in Some Foods: A Review of Japanese Research. *Physiology & Behavior*, v. 49, p. 863-868, 1991.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Amino Acids Content of Foods. Roma: FAO, n. 24, p. 190. 1976.

GEANKOPLIS, C. J. *Transport Processes and Unit Operations*. 3rd Edition. Prentice-Hall, 1993.

GOLDFLUS, F. Ingredientes Derivados do Processamento da Soja Aplicados na Nutrição Animal. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE RAÇÕES, Campinas, SP. Anais... Campinas: CBNA, 2001. p. 97-188.

GREGG S. J.; SING K. S. W. "Adsorption, Surface Area and Porosity", *Academic Press*, London, v. 4, 1982.

GRIMBLE, G. K.; KEOHANE, P. P.; HIGGINS, B. E.; KAMINSKI, M. V.; SILK, D. B. A. "Effect of Peptide Chain Length on Amino Acids and Nitrogen Adsorption from Two Lactalbumin Hydrolysates in the Normal Human Jejunum". *Clin. Sci.*, v. 71, p. 65-69, 1986.

GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; PÁEZ-DUEÑAS, M. P.; GONZÁLEZ-TELLO, P. Y.; CAMACHO, F. "Procesos Tecnológicos y Métodos de Control en la Hidrólisis de Proteínas", *Ars Pharmaceutica*, v. 41, p. 79-89, 2000.

HALL, G. M.; AHMAD, N. H. Functional Properties of Fish-Protein Hydrolysates. In: HALL, G. M. ed. *Fish Processing Technology*. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1992. p. 249-274.

HARTI, J. E.; CHERRAH, Y; BOUKLOUZE, A. "Improvement of Water Solubility of Josamycin by Inclusion Complex with γ -Cyclodextrin", *ISRN Analytical Chemistry*, v. 2, p.1-6, 2012.

HOU, L.; WANG, J.; ZHANG, D. "Optimization of Debittering of Soybean Antioxidant Hydrolysates with β -Cyclodextrins Using Response Surface Methodology", *J. Food Sci. Technol.*, v. 50, n. 3, p. 521-527, 2011.

HRČKOVÁ, M.; RUSŇÁKOVÁ, M.; ZEMANOVIČ, J. "Enzymatic Hydrolysis of Defatted Soy Flour by Three Different Proteases and Their Effect on The Functional Properties of Resulting Protein Hydrolysates". *Czech J. Food Sci.*, v. 20, n. 1, p. 7-14, 2002.

HUANG, C. P.; STUMM, W. "Specific Adsorption of Cations on Hydrated Al_2O_3 ". *J. Colloid Interface Sci.*, v. 43, p. 409-420, 1973.

IMCOPA, Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A. Disponível em: <<http://www.imcopa.com.br/produtos>>. Acesso em 2 de janeiro de 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

IUPAC. Manual of Symbols and Terminology, Appendix 2, Part I, Colloid and Surface Chemistry. *Pure Applied Chemistry*, v. 31, 578 p., 1972.

KARR-LILIENTHAL, L. K.; GRIESHOP, C. M.; MERCHEN, N. R.; MAHAN, D. C.; FAHEY Jr., G. C. “Chemical Composition and Protein Quality Comparisons of Soybeans and Soybean Meals from Five Leading Soybean-Producing Countries”. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, n. 20, p. 6193-6199, 2004.

KEOHANE, P. P.; GRIMBLE, G. K.; BROWN, B.; SPILLER, R. C. “Influence of Protein Composition and Hydrolysis Method on Intestinal Adsorption of Protein in Man”. *Gut.*, v. 26, p. 907-913, 1985.

KIRBY, S. R.; PESTI, G. M.; DORFMAN, J. H. “An Investigation of the Distribution of the Protein Content of Samples of Corn, Meat and Bone Meal, and Soybean Meal”. *Poultry Sci.*, v. 72, p. 2294-2298, 1993.

LI, Y.; LI, T.; ZHAO, X. “Preparation of Alcalase-Catalyzed Casein Plasteins in the Presence of Proline Addition and the ACE-Inhibitory Activity of the Plasteins in vitro”. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 231, p. 197–207, 2010.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. “Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*)”, *Journal of Food Science*, v. 64, n. 6, p. 1000-1004, 1999.

LIMA, G. J. M. M. Importância da Qualidade Nutricional da Soja e Seus Subprodutos no Mercado de Rações: Situação Atual e Perspectivas Futuras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina. Anais... Londrina: EMBRAPA Soja, 1999. p. 165-175.

LINDE, G. A.; et al. “The Use of 2D NMR to Study β -Cyclodextrin Complexation and Debittering of Amino Acids and Peptides”. *Food Research International*, v. 43, p. 187-192, 2010.

LIRA, T. B. F. *Avaliação das Variáveis que Influenciaram o Grau de Hidrólise Enzimática da Caseína do Leite de Cabra (Capra hircus Linnaeus, 1758) Moxotó*. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. 2010.

LOPES JR., C. O. *Extração Protéica e Obtenção de Hidrolisados Protéicos de Feijão com Baixo Teor de Fenilalanina*. 81 p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2008.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; RANDALL, R. J. “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent”. *J. Biol. Chem.*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUSAS, E. W.; RIAZ, M. N. “Soy Protein Products: Processing and Use”. *J. Nutr.*, v. 125, 3 s., p. 573-580, 1995.

MACEDO, O. F. L. *Preparação e Caracterização de Complexo de Inclusão entre Trimetoprim e 2-Hidroxiopropil-Gama-Ciclodextrina*. 81 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE. 2010.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. “Enzyme-Modified Proteins from Corn Gluten Meal: Preparation and Functional Properties”. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 69, p. 1163-1169, 1992.

MARTINS, M. T. S. “Caracterização Química e Nutricional de Plasteína Produzida a Partir de Hidrolisado Pancreático de Isolado Protéico de Soja”. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 25, n. 4, p. 683-690, out./dez. 2005.

MATIOLI, G. Seleção de Microrganismo e Caracterização de sua Enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase. 241 p. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica) - Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 1997.

MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. "Characterization of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus firmus* Strain nº. 37", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91-93, p. 643-654, 2001.

MIERTUS, S.; NAIR, A. C.; FRECER, V.; CHIELLINI, E.; CHIELLINI, F.; SOLARO, R.; TOMASI, J. "Modelling of β -cyclodextrin with L- α -Aminoacids Residues", *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 34, p. 69-84, 1999.

MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUKASAKI, F.; YAMAUCHI, K. "Debittering Mechanism in Bitter Peptides of Enzymatic Hydrolysates from Milk Casein by Aminopeptidase T". *J. Food Sci.*, v. 54, p. 1225-1229, 1989.

MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. "Importância do Diagnóstico e Tratamento da Fenilcetonúria". *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 86-96, 2000.

MONGE NETO, A. Á. *Interação de Peptídeos Provenientes da Hidrólise Enzimática de Farelo De Soja com Ciclodextrinas – Avaliação da Redução do Amargor*. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 2013.

MONTEIRO, A. R. G. *Introdução à Análise Sensorial de Alimentos*. Maringá: EDUEM, Editora da Universidade Estadual de Maringá. 47 p. 2005.

MONTEIRO, M. R. P.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; MOREIRA, M. A. "Qualidade Protéica de Linhagens de Soja com Ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das Isoenzimas Lipoxigenases". *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 17, n. 2, p. 195-205, abr./jun. 2004.

MORAIS, H. A.; BARBOSA, C. M. S.; DELVIVO, F. M.; SILVA, V. D M.; MANSUR, H. S.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. “Estabilidade e Avaliação Sensorial de Lipossomas Contendo Hidrolisados de Caseína”. *Braz. J. Food Technol.*, v. 6, n. 2, p. 213-220, jul./dez. 2003.

MORAIS, H. A.; BARBOSA, C. M. S.; DELVIVO, F. M.; SILVA, V. D M.; MANSUR, H. S.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. “Casein Hydrolysates using Papain: Peptide Profile and Encapsulation in Liposomes”. *Acta Alim.*, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2005.

MUCCIACITO, J. C. “Conceitos e Aplicações do Carvão Ativado”. *Revista Meio Filtrante On-Line*. v. 5, n. 22, set./out. 2006. Disponível em: <http://meiofiltrante.com.br/materias.asp?action=detalhe&id=254>. Acesso em: 3 de dezembro de 2011.

MUNOZ-BOTELA, S.; DEL CASTILLO, B.; MARTIN, M. A. “Las Cyclodextrinas: Características y Aplicaciones de la Formacion del Complejo de Inclusion”. *Arsh. Pharm.*, v. 36, n. 2, p. 187-198, 1995.

MURRAY, T. K.; BAKER B. E. “Studies on Protein Hydrolysis: I. Preliminary Observations on the Taste of Enzymic Protein Hydrolyzates”. *J. Sci. Food Agric.*, v. 3, p. 470-475, 1952.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. “Avaliação de Diferentes Tipos de Carvão Ativo na Destoxificação de Hidrolisado de Palha de Arroz para Produção de Xilitol”. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 24, n. 1, p. 94-100, jan./mar. 2004.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. “Enzimas: Poderosa Ferramenta na Indústria”, *Ciência Hoje*, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007. Disponível em: <http://cienciahoje.uol.com.br/banco-de-imagens/lg/protected/ch/242/enzimas242.pdf/view>. Acesso em: 29 de novembro de 2011.

MUTLU, M.; SARIOGLU, K.; DEMIR, N.; MERAL, T. E.; ACAR, J. “The Use of Commercial Pectinase in Fruit Juice Industry. Part I: Viscosimetric Determination of

Enzyme Activity”. *Journal of Food Engineering*, Abingdod, Oxon, v. 41, p. 147-150, 1999.

LOPES JR., C. O. *Extração Protéica e Obtenção de Hidrolisados Protéicos de Feijão com Baixo Teor de Fenilalanina*. 81 p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2008.

NOVO NORDISK A/S. Ficha Técnica - Alcalase® 2,4L de Grau Alimentício. Enzyme Process Division. 4 p. 2002.

NOGUCHI, M.; YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. “Bitter-Masking Activity of a Glutamic Acid-Rich Oligopeptide Fraction”. *J. Food Sci.*, v. 40, p. 367-379, 1975.

PACHECO, M.T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L.; TANIKAWA, C., SGARBIERI, V. C. “Propriedades Funcionais de Hidrolisados Obtidos a partir de Concentrados Protéicos de Soro de Leite”. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 25, n. 2, p. 333-338, abr./jun. 2005.

PARAÍSO, P. R. *Modelagem e Análise do Processo de Obtenção do Óleo de Soja*. 200 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, Campinas, SP. 2001.

PEARCE, R. J. “Food Functionality Success or Failure for Dairy Based Ingredients”. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, n. 1, p. 15-23, 1995.

PERUZZO, L. C. *Influência de Agentes Auxiliares na Adsorção de Corantes de Efluentes da Indústria Têxtil em Colunas de Leito Fixo*. 93 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2003.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. “Qualidade Nutricional e Escore Químico de Aminoácidos de Diferentes Fontes Protéicas”. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, n. 26, v. 1, p. 179-187, jan./mar., 2006.

PIRILLO, C. P.; SABIO, R. P. “100% Suco: Nem Tudo é Suco nas Bebidas de Frutas”. *Hortifruti Brasil*, p. 6-13, jul. 2009.

PIVATTO, R. S. Desenvolvimento de um Sistema de Separação por Aspiração de Farelo de Soja. 98 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2013.

PRETTO, C.; DE MIRANDA, L. C.; DE SIQUEIRA, P. F.; RODRIGUES, D. S.; FERREIRA, R. P.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Avaliação de Diferentes Métodos Para a Determinação do Perfil Peptídico em Amostras de Proteína de Soja Hidrolisada. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2010, Foz do Iguaçu, PR. *Anais...* São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2010. p. 4192-4200. v. 1.

RÉRAT, A. A. “Nutritional Supply of Proteins and Absorption of their Hydrolysis Products: Consequences on Metabolism”. *Prot. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335- 344, 1993.

RODRIGUES, R. S.; GOZZO, A. M.; MORETTI, R. H. “Comportamento Reológico de Extratos de Grãos, Farinha Integral e Isolado Protéico de Soja”. *B. CEEPA*, Curitiba, v. 21, p. 367-378, 2003.

RODRIGUES, R. S.; MORETTI, R. H. “Caracterização Físico-Química de Bebida Protéica Elaborada com Extrato de Soja e Polpa de Pêssegos”. *B. CEEPA*, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 101-110, jan./jun. 2008.

ROSENTHAL, A.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K.; GILMOUR, S.; TRINCA, L. “Combined Effect of Operational Variables and Enzyme Activity on Aqueous Enzymatic Extraction of Oil and Protein from Soybean”. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 499-509, 2001.

ROY, G. M. *Activated Carbon Applications in the Food and Pharmaceutical Industries*. Technomic Publishing Company, Inc. Basel, Switzerland. 1995.

SAHA, B. C.; HAYASHI, K. “Research Review Paper: Debittering of Protein Hydrolysates”. *Biotech. Adv.*, v. 19, p. 355-370, 2001.

SALADO, G. A. *Resposta Nutricional de Pacientes Hospitalizados Tratados com Dieta Formulada de Hidrolisado Protéico de Soja*. 181 p. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 1997.

SANTOS, R. D.; FERRARI, R. A. “Extração Aquosa Enzimática de Óleo de Soja”. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 25, n. 1, p. 132-138, jan./mar. 2005.

SANTOS, S. D.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. “Otimização dos Parâmetros de Produção de Hidrolisados Protéicos Enzimáticos Utilizando Pescado de Baixo Valor Comercial”, *Quím. Nova*, v. 32, n. 1, p. 72-77, 2009.

SANTOS, R. E.; GROFF, A. M.; ASSAD, N. F. Teores de Proteína Solúvel e Aminoácidos Livres em Farinha de Soja Hidrolisada com Enzimas. In: V ENCONTRO ANUAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 26 a 29 de outubro de 2010, Campo Mourão, PR. *Anais...* Campo Mourão: Faculdade Estadual de Ciências e Letras de Campo Mourão - FECILCAM. [online] Disponível em: <http://www.fecilcam.br/nupem/anais_v_epct/PDF/engenharias/01_SANTOS_%20GROFF_ASSAD.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2013.

SCHMIDT, C. G; SALLAS-MELLADO, M. “Influência da Ação das Enzimas Alcalase e Flavourzyme no Grau de Hidrólise das Proteínas de Carne de Frango”, *Quím. Nova*, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1144-1150, 2009.

SIMAS, R. C. Determinação de Proteína Bruta e Aminoácidos em Farelo de Soja por Espectroscopia no Infravermelho Próximo. 119 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, SP, 2005.

SILVA, M. C. Hidrolisados Enzimáticos do Concentrado Protéico do Soro do Leite - Remoção de Fenilalanina, Grau de Hidrólise e Perfil Peptídico. 113 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2009.

SILVA, F. M.; LACERDA, P. S.; JONES JR., J. “Desenvolvimento Sustentável e Química Verde”, *Quím. Nova*, v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. “Composição Química e Valor Protéico do Resíduo de Soja em Relação ao Grão de Soja”. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 3, p. 571-576, jul./set. 2006.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores Antinutricionais: Inibidores de Proteases e Lectinas. *Rev. Nutr.*, Campinas, v.13, n. 1, p. 3-9, jan./abr. 2000.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M.; YVON, M. “Analysis of Protein Hydrolysates. 1. Use of Poly(2-hydroxyethylaspartamide)- Silica Column in Size Exclusion Chromatography for the Fractionation of Casein Hydrolysates”. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 2778-2782, 1994a.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M.; YVON, M. “Analysis of Protein Hydrolysates. 2. Characterization of Casein Hydrolysates by a Rapid Peptide Quantification Method”. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 2783-2789, 1994b.

SIQUEIRA, P. F. ; MIRANDA, L. C. ; FRANQUETTO, E. M. ; SMOLAREK, F. S. F. ; FERREIRA, R. P. ; PIVATTO, R. S. ; PEDROSO, C. F. ; GIORDANO, R. C. ; TARDIOLI, P.W. ; GIORDANO, R.L.C. Extração de Fosfolipídeos Residuais em Farelo Desengordurado de Soja. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos - X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa, 2013, Foz do Iguaçu. XIX SINAFERM / X SHEB 2013, 2013.

SOARES, R. D. L.; SILVA, V. D.; LOPES, D. C. F.; JUNQUEIRA, R. G.; FIGUEIREDO, A. F. S.; SILVESTRE, M. P. C. “Perfil Peptídico de Hidrolisados

Enzimáticos de Leite em Pó Desnatado”. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 40, n. 3, jul./set. 2004.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Química Orgânica 1*. Tradução: Robson Mendes Matos, Revisão Técnica: Délio Soares Raslan. 1934. Rio de Janeiro: LTC. 715 p. 2005.

SOUSA JR., R.; RESENDE, M.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. “Hybrid Model for an Enzymatic Reactor: Hydrolysis of Cheese Whey Protein by Alcalase Immobilized in Agarose Gel Particles”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 105-108, 2003.

SOUZA, E. C. G.; MIRANDA, L. C. G.; NAGEM, J. T.; OLIVEIRA, T. T.; COSTA, N. M. B.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; REZENDE, J. L. M. “Síntese e Caracterização Nutricional de Plasteína Obtida da Proteína da Folha de Mandioca, da Soja e do Soro de Queijo”. *Revista Ceres*, v. 47, n. 269, p. 9-20, 2000.

STENZEL, M. Solubilização Enzimática de Proteína do Farelo de Soja e Caracterização Funcional dos Hidrolisados Formados. 136 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 2007.

STROHER, R.; ROSSI, R. A. S.; LARA, I.; ZANIN, G. M.; PEREIRA, N. C. Utilização da Enzima Alcalase na Hidrólise do Farelo de Soja. In: IX SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, Maringá. *Anais...* Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009.

STROHER, R.; et al. Remoção do Sabor Amargo do Hidrolisado de Farelo de Soja Utilizando Carvão Ativado. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS, Vassouras. *Anais...* Vassouras: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.

SZEJTLI, J. *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publisher: Dordrecht. 450 p. 1988.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. “Cyclodextrins as Food Ingredients”. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, p. 137–142, 2004.

SWICK, R. A. Soybean Meal Quality. Technical Bulletin. Singapura: American Soybean Association – ASA, nº 071/12/93, p. 13, 1994.

TAMURA, M.; MORI, N.; MIYOSHI, T.; KOYAMA, S.; KOHRI, H.; OKAI, H. “Practical Debittering Using Model Peptides and Related Compounds”. *Agric. Biol. Chem.*, v. 54, p. 41-51, 1990.

TARDIOLI, P. W. *Produção de Ciclodextrinas em Reator de Leito Fluidizado com a Enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase Imobilizada*. 166 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 1998.

TOSSAVAINEN, O.; OUTINEN, M.; HARJU, M.; MAKINEN-KILJUNEN, S. “Removal of β -Lactoglobulin Residues from an Enzymic Whey Protein Hydrolyzate”. *Milchwissenschaft*, v. 5, p. 628-632, 1996.

VEIGA, R.; SALTÃO, F. “Ciclodextrinas em Novos Sistemas Terapêuticos”. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 1, jan./abr., 2001.

VERMELHO, A. B. et al., “Enzimas Proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas”. In: ENZIMAS EM BIOTECNOLOGIA: PRODUÇÃO, APLICAÇÕES E MERCADO. Editora Interciência, p. 273-287. 2008.

VIEIRA, L. F. “A Técnica da Reflectância Difusa Aplicada ao Estudo da Fluorescência de 2,3-Naftalimidias n-Substituídas com Grupos Alquila Incluídas em β -Ciclodextrina e Adsorvidas em Celulose Microcristalina”, *Química Nova*, v. 22, n. 4, São Paulo, jul./agost., 1999.

VISSER, S.; SLANGEN, K. J.; HUP, G. “Some Bitter Peptides from Rennet-Treated Casein: A Method for Their Purification, Utilizing Chromatographic Separation on Silica Gel”. *Neth Milk Dairy J.*, v. 29, p. 319-334, 1975.

APÊNDICE 1

METODOLOGIAS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Proteínas

A determinação de proteína foi realizada pelo processo de digestão Kjeldahl. Este método se baseia na quantidade de nitrogênio orgânico da amostra e consiste nas seguintes etapas: digestão da amostra em ácido sulfúrico, liberação da amônia por adição de hidróxido de sódio e titulação da amônia com ácido clorídrico.

A digestão das amostras foi realizada em balões de Kjeldahl. Adicionou-se às amostras a mistura catalítica (sulfato de cobre anidro, sulfato de potássio anidro na proporção de 1:3, e zinco metálico) e o ácido sulfúrico. As amostras foram aquecidas em conjunto digestor com controle de temperatura até que solução se tornasse verde clara, o que demora em torno de quatro horas. Após serem resfriadas, adicionou-se às amostras zinco metálico e uma solução de hidróxido de sódio. Os balões contendo as amostras seguiram para o conjunto de destilação. O destilado de cada amostra era recebido em frasco contendo ácido sulfúrico e indicador vermelho de metila. O excesso da solução ácida era então titulada com hidróxido de sódio até coloração amarela.

Lipídios

A determinação do teor de lipídios do farelo de soja foi realizada pelo Método de Soxhlet, que consiste em uma extração com solvente a quente. Para a amostra de farelo de soja, o solvente utilizado foi o éter de petróleo. Essa metodologia está baseada nas seguintes etapas: extração da gordura da amostra com solvente; eliminação do solvente por evaporação e a quantificação da gordura por pesagem.

Para a avaliação dos lipídios contidos no hidrolisado, empregou-se o Método de Bligh-Dyer, que utiliza a mistura de três solventes, clorofórmio-metanol-água. Este método tem a vantagem de extrair os lipídios sem aquecimento.

A mistura dos solventes clorofórmio, metanol e água foi adicionada à amostra de hidrolisado seguindo a proporção 1:2:0,8. Após os tubos serem agitados por 30 minutos, adicionou-se o clorofórmio e uma solução de sulfato de sódio, ocasionando uma mudança na proporção para 2:2:1,8, o que causa a separação total do clorofórmio que carrega os

lipídios. Após as camadas separarem naturalmente, a camada inferior é coletada e rapidamente filtrada. O solvente é evaporado em estufa a 100 °C, restando apenas os lipídios da amostra.

Umidade

A metodologia empregada na determinação do teor de umidade é o método de estufa, que é uma medida indireta e está baseado na remoção de água por aquecimento.

Pesou-se de 2 a 10 g das amostras de farelo de soja e do hidrolisado em cápsula de porcelana, previamente tarada. A amostra foi submetida ao processo de aquecimento em estufa a uma temperatura de 105 °C durante 3 horas. Após esse período, a cápsula contendo a amostra foi resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e, posteriormente, pesada em balança analítica. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até massa constante.

Cinzas

A determinação do teor de cinzas consistiu na incineração matéria orgânica da amostra em uma mufla, de modo que resultasse apenas o resíduo inorgânico (cinzas).

Foram pesadas de 5 a 10 g da amostra em uma cápsula, previamente aquecida em mufla a 550 °C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada.

Por estar na forma líquida, a amostra de hidrolisado foi evaporada em banho-maria. Posteriormente, as amostras de farelo de soja e do hidrolisado foram carbonizadas em bico de Bunsen e incineradas em mufla a 550°C, até que haja a eliminação completa do carvão e as cinzas fiquem brancas ou ligeiramente acinzentadas. As amostras foram resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas em balança analítica. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até a massa constante.

Fibras

A metodologia empregada na determinação das fibras das amostras baseou-se na quantificação do resíduo orgânico obtido após sucessivas extrações e lavagens com ácido sulfúrico diluído e hidróxido de sódio diluído.

Primeiramente, adicionou-se uma solução de ácido sulfúrico às amostras que seguiram para o aquecimento. Após 30 minutos em ebulição, o material foi filtrado com água quente e o retido no papel foi retirado utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio. A solução foi levada ao aquecimento e após 30 minutos em ebulição, o material foi novamente filtrado com água quente. O papel filtro contendo o material retido foi levado a estufa a 100 °C, por uma hora. O resíduo foi pesado para a determinação do teor de fibras.

Carboidratos

A determinação do teor de carboidratos foi realizada após a determinação do teor dos outros constituintes, sendo feita por diferença: Carboidratos = 100 – proteínas – lipídios – cinzas – fibras – umidade.

ANEXO 1

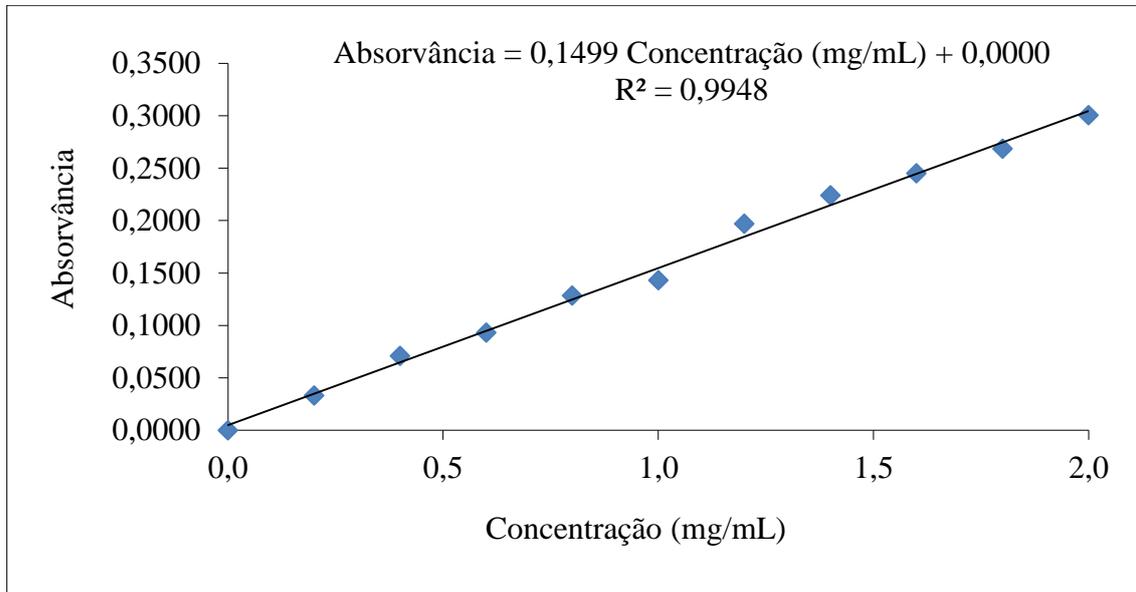


Figura 1.A: Curva padrão de albumina bovina construída usando o método de Lowry.

ANEXO 2

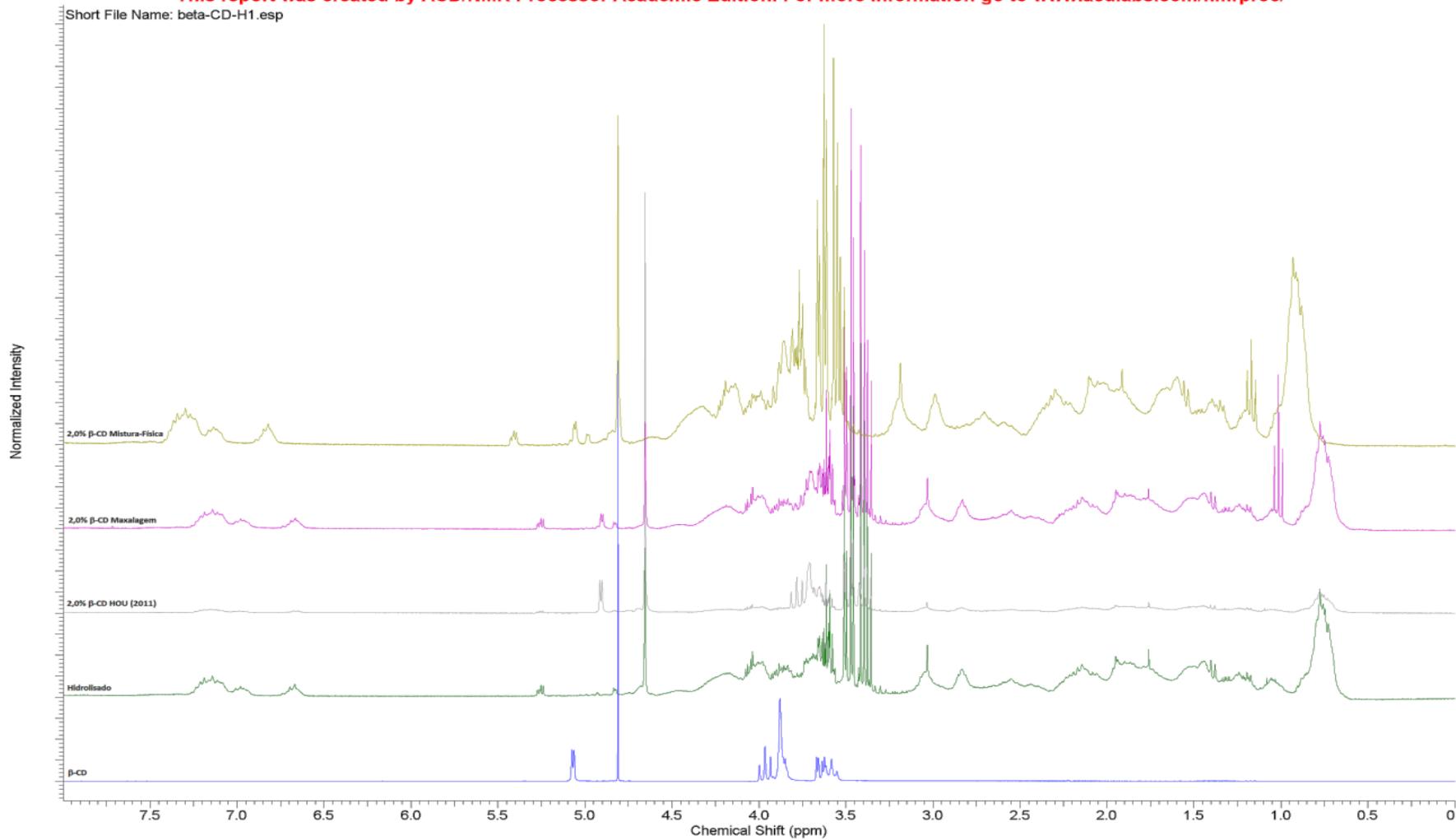


Figura 2.A: Espectros de ressonância magnética nuclear obtidos nos tratamentos do hidrolisado com a β -CD.

Short File Name: alfa-CD-H1.esp

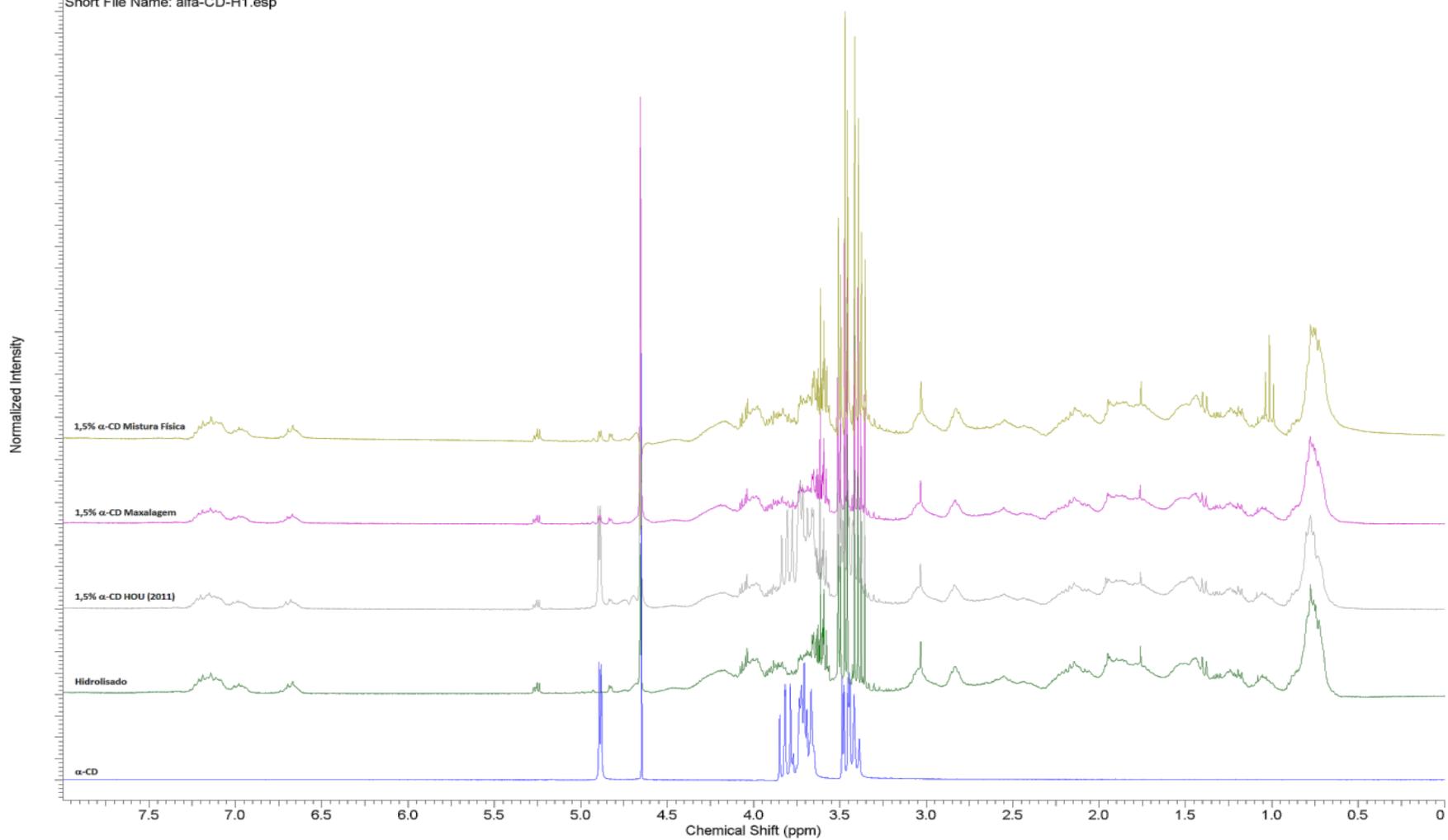


Figura 2.B: Espectros de ressonância magnética nuclear obtidos nos tratamentos do hidrolisado com a α -CD.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

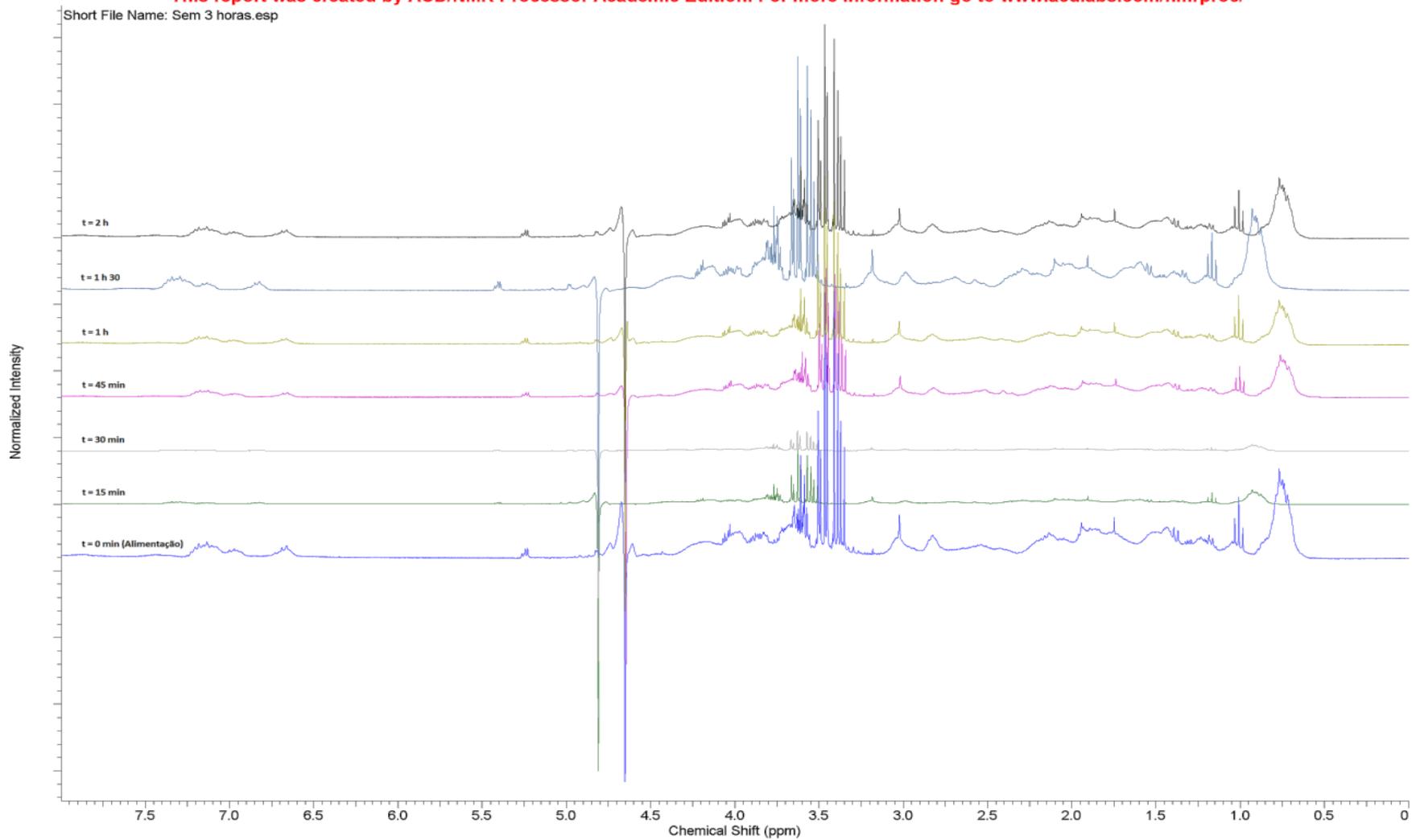


Figura 2.C: Espectro de ressonância magnética nuclear obtidos nos tratamentos do hidrolisado com o carvão ativado.