



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ARIANA JUSTUS

**OBTENÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO POR SPRAY
DRYING DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE OKARA**

Londrina
2019

ARIANA JUSTUS

**OBTENÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO POR SPRAY
DRYING DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE OKARA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dra. Louise Emy Kurozawa

Coorientadora: Dra. Elza Louko Ida

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

JUSTUS, ARIANA.

OBTENÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO POR SPRAY DRYING DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE OKARA / ARIANA JUSTUS. - Londrina, 2019.
146 f. : il.

Orientador: Louise Emy Kurozawa.

Coorientador: Elza louko Ida.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2019. Inclui bibliografia.

1. okara, hidrólise enzimática, microencapsulação, peptídeos antioxidantes, isoflavonas, carboidratos. - Tese. I. Kurozawa, Louise Emy. II. Ida, Elza louko. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

ARIANA JUSTUS

**OBTENÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO POR SPRAY DRYING DE
HIDROLISADOS PROTEICOS DE OKARA**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciência de Alimentos da
Universidade Estadual de Londrina como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor
em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Profa. Dra. Louise Emy Kurozawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marianne Shirai
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Profa. Dra Thaís de Souza Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fábio Yamashita
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 março de 2019.

Dedico

A Deus, pela força, fé, saúde e graça que proporcionou para chegar até aqui. Aos meus pais, Arleu e Cleosi, pelo incentivo e ajuda em toda minha trajetória. Ao meu esposo Robson Eiji pelo amor incondicional e apoio, ao nosso filho e anjinho que está a caminho, por permitir a mamãe finalizar essa etapa com sucesso e a minha fiel e amada filha Belinha, pela companhia e amor eterno.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Louise Emy Kurozawa pela excelente orientação, incentivo, confiança, paciência, ensinamentos, correções e sugestões para a execução e concretização deste trabalho.

À Professora Elza Louko Ida pela coorientação, colaboração para a finalização deste trabalho.

À Professora Marta Toledo Benassi pela generosidade, atenção e dedicação como profissional e pessoa em vários momentos durante o doutorado.

À Professora Thaís de Souza Rocha pelo auxílio e apoio na execução da análise de eletroforese.

A todos os Professores e toda equipe (Alessandra Silva, Patrícia Sambatti e Sandra Rezende) do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos desta Instituição pela colaboração, apoio e contribuição na minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e a Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico pelo apoio financeiro parcial.

Ao Osvaldo pelo auxílio na execução das análises de microscopia eletrônica de varredura e a Mayara pelo apoio na utilização do calorímetro diferencial de varredura.

À minha família, em especial aos meus pais, Arleu e Cleosi, meu irmão e cunhada, Cleon e Lucielly, meus sobrinhos, Marcello e Miguel por serem o meu maior apoio e incentivo. Obrigada pelo amor incondicional de vocês e por estarem sempre presentes na minha vida, sem vocês eu não teria conseguido concretizar esta fase.

Ao meu esposo Robson Eiji Murate pelo amor incondicional, incentivo e zelo por mim e pela nossa família. Obrigada pelo apoio em todos os momentos desta caminhada.

Em especial, as minhas “irmãs científicas” Dafne Pereira e Bruna Böger, pela acolhida, atenção, ensinamentos repassados e principalmente pela amizade. Obrigada pelo auxílio na execução deste projeto.

Aos grandes amigos, Talita Kato (prima e madrinha querida), Natália Bom, Marcela Guelfi, Fernando Sanches, Cíntia Ladeira Handa, Daniele Honorato, Daniele Rodrigues, Thaisa Marcello, Geovana Piveta, Isabela Dias, Rodolfo Zanin, Natália Niguma, Valéria Brito, pelo apoio, incentivo, aprendizado e principalmente pela amizade que ficará guardada para sempre. Obrigada amigos por me auxiliarem em diferentes fases durante toda esta caminhada.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho, o meu agradecimento!

JUSTUS, A. **Obtenção e microencapsulação por *spray drying* de hidrolisados proteicos de okara**. 2019. 146 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo obter peptídeos a partir da hidrólise enzimática de proteínas de okara, microencapsular por *spray drying* e avaliar a estabilidade das microcápsulas. Na primeira fase, foi realizado um estudo de cinética de hidrólise enzimática das proteínas pela ação das proteases Alcalase e Flavourzyme e a combinação delas para a produção de hidrolisados de proteínas com maior capacidade antioxidante e maior conteúdo de isoflavonas agliconas. A hidrólise enzimática das proteínas de okara pela Alcalase foi mais eficiente que a Flavourzyme e resultou em um hidrolisado com maior capacidade antioxidante. Este resultado foi devido à liberação de peptídeos antioxidantes e isoflavonas e à conversão de glicosídeos de isoflavonas em agliconas. Na segunda fase, a hidrólise com Alcalase foi escolhida por apresentar melhores resultados na fase anterior. Novos ensaios foram realizados para obter as microcápsulas por *spray drying*, utilizando maltodextrina (MD) 10 DE e amido modificado (AM) como material de parede. Os pós foram avaliados em relação as características físico-químicas (atividade de água, densidade volumétrica, distribuição e diâmetro médio das partículas, microestrutura) e propriedades nutricionais (conteúdo de açúcares e capacidade antioxidante pela (capacidade de redução de Folin-Ciocalteu (FC), ensaios de FRAP e ABTS), e isothermas de sorção e temperatura de transição vítrea. O hidrolisado de proteína liofilizado sem a adição de material de parede foi obtido e considerado como amostra controle, visando avaliar o efeito da microencapsulação sobre as características dos pós. Em geral, não houve influência significativa do tipo de material da parede nas propriedades dos pós. No entanto, diferenças significativas foram observadas entre as amostras secas por *spray dryer* e as amostras controle. O processo de encapsulamento preservou a capacidade antioxidante. Além disso, devido aos açúcares e peptídeos de baixa massa molecular no hidrolisado proteico, a microencapsulação melhorou seus valores críticos de armazenamento de umidade relativa e umidade. Na etapa final, foi avaliada a estabilidade de hidrolisados proteicos de okara microencapsulados com maltodextrina 10 DE ou amido modificado, e hidrolisado não encapsulado (controle) em relação à microestrutura, capacidade antioxidante e cor das amostras durante 120 dias a 35 °C. Os resultados indicaram que o processo de microencapsulação favoreceu a integridade física das partículas. Os resultados indicaram que as microcápsulas obtidas por *spray drying* usando MD ou AM mantiveram a cor dos pós e apresentaram boa capacidade antioxidante pelo método ABTS e FC.

Palavras-chave: Okara. Hidrólise enzimática. Peptídeos antioxidantes. Isoflavonas. Carboidratos.

JUSTUS, A. **Obtaining and microencapsulation by spray drying of okara protein hydrolysates**. 2019. 146 p. Thesis (Doctoral degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The present work aimed to obtain peptides from the enzymatic hydrolysis of okara proteins, microencapsulate by spray drying and evaluate the stability of the microcapsules. In the first phase, a kinetic study of enzymatic hydrolysis of protein by Alcalase and Flavourzyme proteases action and their combination for the production of protein hydrolysates with higher antioxidant capacity and higher content of aglycone isoflavones. The enzymatic hydrolysis of okara proteins by Alcalase was more efficient than Flavourzyme and resulted in a hydrolysate with higher antioxidant capacity. This finding was due to the release of antioxidant peptides and isoflavones and the conversion of glycosides isoflavones to aglycones. In the second phase, Alcalase hydrolysis was chosen because it presented better results in the previous phase. New assays were performed to obtain the microcapsules by spray drying using maltodextrin (MD) 10 DE and modified starch (AM) as wall material. The powders were evaluated in relation to physical-chemical characteristics (water activity, bulk density, distribution and mean particle diameter, and microstructure) and nutritional properties (sugar content and antioxidant capacity by (reducing capacity of Folin-Ciocalteu (FC), FRAP and ABTS), and sorption isotherms and glass transition temperature. Lyophilized protein hydrolysate without the addition of wall material was obtained and considered as a control sample, aiming to evaluate the effect of microencapsulation on powders characteristics. In general, there was no significant influence of the type of wall material on the properties of powders. However, significant differences were observed between the spray dried samples and the control samples. The encapsulation process preserved the antioxidant capacity. In addition, due to the low molecular weight sugars and peptides in the protein hydrolysate, microencapsulation has improved its critical storage values for relative humidity and moisture content. In the final step, the stability of okara protein hydrolysates unencapsulated (control) and microencapsulated with maltodextrin 10 DE or modified starch was evaluated with respect to the microstructure, antioxidant capacity and color for 120 days at 35 °C. The results indicated that the microencapsulation process favored the physical integrity of the particles. The results indicated that the microcapsules obtained by spray drying using MD or AM maintained the color of the powders and presented good antioxidant capacity by the ABTS and FC method.

Keywords: Okara. Enzymatic hydrolysis. Antioxidant peptides. Isoflavones. Carbohydrates.

LISTA DE FIGURA

Figura 1.	Estrutura química das isoflavonas da soja e possíveis transformações por clivagem de ligações.	22
Figura 2.	Estrutura química dos oligossacarídeos da soja	24
Figura 3.	Micropartículas com diferentes tipos de estrutura	31
Figura 4.	Modelos de microcápsulas. (A): matriz (microsfera); (B): microcápsula simples; (C): simples, irregular; (D): duas paredes; (E): vários núcleos; (F): agrupamento de microcápsulas.	32
Figura 5.	Esquema das principais etapas envolvidas no processo de microencapsulação por <i>spray drying</i>	34
Figura 6.	Tipos de isotermas de sorção	43

ARTIGO CIENTÍFICO 1 - Combined uses of an endo- and exopeptidase in okara improve the hydrolysates via formation of aglycone isoflavones and antioxidant capacity

Figure 1.	Kinetics of enzymatic hydrolysis of okara protein by several Alcalase and Flavourzyme combinations.	85
Figure 2.	Polyacrylamide gel electrophoresis: A) Tris-HCl buffer. Lane 1: High-MW protein marker. Lane 2: Okara (control); B) SDS-Tris-Tricin buffer. Lane 1: Low-MW protein marker. Protein hydrolysates were generated by Flavourzyme (DH 7.7%, Lane 2), Alcalase (DH 34.8%, Lane 3), a blend of 50% Alcalase and 50% Flavourzyme (DH 22.1%, Lane 4), Alcalase followed by addition of Flavourzyme (DH 34.3%, Lane 5), and Flavourzyme followed by addition of Alcalase (DH 25.5%, Lane 6). Tentative identification of known protein bands (Peñas et al., 2011) is indicated.	85

ARTIGO CIENTÍFICO 2 - Microencapsulation of okara protein hydrolysate by spray drying: physicochemical and nutritive properties, sorption isotherm and glass transition temperature

Figure 1.	Particle size distribution of okara protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin or modified starch. Control sample is freeze dried sample without wall materials.	116
------------------	--	-----

Figure 2.	Scanning electron microphotographs of protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (a) and modified starch (b) and protein hydrolysate freeze dried without wall material as control sample (c). Images with a magnitude of 6000× (a and b) and 400× (c)	117
Figure 3.	Water sorption isotherms of okara protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin or modified starch. Control is freeze dried sample without wall materials.....	118
Figure 4.	Relationship between relative humidity, water content and glass transition temperature of okara protein hydrolysates microencapsulated with maltodextrin (a) or modified starch (b). Control sample is freeze dried sample without wall materials (c)	120
ARTIGO CIENTÍFICO 3 - Estabilidade física e físico-química de hidrolisados proteicos de okara microencapsulados por spray drying		
Figura 1:	Micrografias eletrônicas de varredura dos hidrolisados proteicos microencapsulados com amido modificado (a) e maltodextrina (b), bem como a amostra controle (c)	140
Figura 2:	Cinética dos parâmetros de cor dos hidrolisados proteicos de okara microencapsulados com maltodextrina e amido modificado Capsul® durante estocagem a 35°C. Controle é referente à amostra liofilizada não-microencapsulada: (a) luminosidade L*, (b) croma (C*) e (c) tonalidade cromática (°h)	142
Figura 3:	Cinética da capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos de okara microencapsulados com maltodextrina e amido modificado Capsul® durante estocagem a 35°C. Controle é referente à amostra liofilizada não-microencapsulada: (a) métodos ABTS e (b) capacidade redutora (FC). GAE é o equivalente de ácido gálico	143
Figura 4:	Hidrolisados proteicos de okara caracterizados pela cor e capacidade antioxidante: Projeção das amostras (a) e variáveis (b) pela Análise de Componentes Principais e Dendograma para definição dos agrupamentos (c).....	145

LISTA DE TABELA

Tabela 1.	Grupos de isoflavonas da soja e seus principais radicais químicos.....	22
Tabela 2.	Principais agentes encapsulantes em alimentos.....	36
ARTIGO CIENTÍFICO 1 - Combined uses of an endo- and exopeptidase in okara improve the hydrolysates via formation of aglycone isoflavones and antioxidant capacity		
Table 1.	Hydrolysis conditions used for preparation of okara protein hydrolysates and protein content in hydrolysates and protein recovery	86
Table 2.	Pearson"s correlation coefficients of various parameters	87
Table 3.	Reducing capacity by Folin-Ciocalteu and isoflavone contents and antioxidant capacity of okara and proteins hydrolysates.....	88
Table 4.	Amino acid composition of okara and protein hydrolysates obtained by Alcalase	89
Table 5.	Antioxidant capacity and protein content of okara protein hydrolysates obtained by Alcalase for non-fractionated and fractionated samples by membrane ultrafiltration.....	89
ARTIGO CIENTÍFICO 2 - Microencapsulation of okara protein hydrolysate by spray drying: physicochemical and nutritive properties, sorption isotherm and glass transition temperature.		
Table 1.	Physico-chemical properties of protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (MD) or modified starch (MS). Control sample is freeze dried sample without wall materials.....	114
Table 2.	Antioxidant capacity of protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (MD) and modified starch (MS). Control sample is freeze dried sample without wall materials.....	114
Table 3.	Sugar content (mg/g solids) of protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (MD) or modified starch (MS). Control sample is freeze dried sample without wall materials.....	115

Table 4.	Estimated parameter values of GAB and Gordon-Taylor models for okara protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (MD) or modified starch (MS). Control sample is freeze dried sample without wall materials.....	118
Table 5.	Critical values of air relative humidity (RH_c) and moisture content (X_c) of okara protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (MD) or modified starch (MS). Control sample is freeze dried sample without wall materials	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Alcalase
a*	Componente vermelho-verde
ABTS ⁺	Capacidade de sequestrar o radical livre ABTS ⁺ (μmol TE/g)
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AU	Unidades Anson
a _w	Atividade de água
b*	Compomente amarelo-azul
BET	Modelo BRUNAUEREMMETT-TELLER
C*	Croma
C _{GAB}	Constante do modelo de GAB
CP	Componente principal
CUPRAC	Poder de redução do metal cobre
D[4.3]	Diâmetro médio das partículas (μm)
DE	Dextrose equivalente
DH	Grau de hidrólise (%)
DP	Grau de polimeração
DPPH	Capacidade de doar hidrogênio ao radical livre DPPH (μmol TE/g sólidos)
E/S	Relação enzima:substrato (%)
ES	Extrato de soja
F	Flavourzyme
FRAP	Capacidade de redução dos íons férricos FRAP (μmol TE/g)
FC	Capacidade redutora avaliada pelo teor de substâncias redutoras do Folin-Ciocalteau
GAB	Modelo GUGGENHEIM-ANDERSON-DE BÔER
GAE	Equivalente ácido gálico
HCA	Análise de grupamentos hierárquicos
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
K	Constante de Gordon-Taylor
K _{Gab}	Constante modelo GAB
L*	Luminosidade

MW	Peso molecular (g/mol)
PEAD	Polietileno de alta densidade
PM	Peso molecular (g/mol)
PP	Polipropileno
SDS	Gel de eletroforese dodecil sulfato de sódio
TE	Trolox equivalente
T_g	Temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$)
T_{g_s}	Temperatura de transição vítrea de sólidos anidros ($^{\circ}\text{C}$)
UPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
UV	Ultravioleta
USDA	United States Department of Agriculture
X	Conteúdo de umidade
X_e	Umidade de equilíbrio (g água/g sólidos)
X_m	Conteúdo de umidade na monocamada (g água/g sólidos)
$^{\circ}\text{h}$	Tonalidade cromática
ρ	Densidade volumétrica (g/mL)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Produção e composição química da soja	19
3.2	Compostos bioativos da soja.....	20
3.2.1	Isoflavonas da soja.....	21
3.2.2	Açúcares da soja.....	23
3.3	Okara	25
3.4	Hidrólise enzimática da proteína de okara.....	26
3.5	Peptídeos bioativos	28
3.5.1	Atividade antioxidante	29
3.6	Microencapsulação	30
3.6.1	Microencapsulação por <i>spray drying</i>	33
3.6.2	Agentes encapsulantes	36
3.6.2.1	Maltodextrina	37
3.6.2.2	Amido modificado.....	38
3.7	Isoterma de sorção	40
3.8	Transição vítrea	43
	REFERÊNCIAS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO 1	60
5.2	ARTIGO CIENTÍFICO 2	90
5.3	ARTIGO CIENTÍFICO 3	121
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	146
7	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	146

1 INTRODUÇÃO

A produção de soja tem sido um das atividades econômicas que mais tem crescido no mundo (SEIBEL, 2018). O fato se deve ao desenvolvimento e estruturação de um sólido mercado da soja, por ser uma importante fonte de proteína vegetal e pela geração de novas tecnologias para a exploração dos grãos de soja. O aumento da demanda mundial de soja se deu pela ampla utilização do grão, tanto para o consumo humano na forma de óleo e derivados, como para a alimentação animal. Em 2018, a produção mundial atingiu aproximadamente 337 milhões de toneladas (USDA, 2018).

Do ponto de vista nutricional, a soja é uma excelente fonte de proteínas de origem vegetal para a alimentação humana, com qualidade comparável às proteínas de origem animal. Além disso, possui vários outros compostos bioativos tais como oligossacarídeos, fitoesteróis e isoflavonas que apresentam benefícios à saúde do indivíduo, prevenindo-o ou protegendo contra alguns tipos de doenças, (LIU, 1997), por isso a soja vem sendo cada vez mais estudada e utilizada pela indústria de alimentos.

No entanto, apesar da grande produção do grão no Brasil e no mundo, apenas 10% são destinados à alimentação humana (RIAZ, 2006), na forma de óleo refinado, lecitina e farelos, sendo estes últimos transformados em ingredientes proteicos como farinhas, concentrados, isolados e texturizados proteicos. Dentre os produtos destinados à alimentação humana, tem-se o extrato de soja que é obtido a partir da extração aquosa de soja, seguido de filtração, tendo ao final um subproduto sólido e outro insolúvel, denominado de okara. Considera-se que para cada um quilo de soja utilizado para a produção do extrato de soja é gerado cerca de um quilo de okara. Do total de sólidos presentes inicialmente na soja 34% são perdidos no okara e 16% no soro gerado na produção do tofu (LIU, 2008). Além da alta concentração de proteínas no okara, outros constituintes importantes também ficam retidos, como carboidratos, lipídios, fibras insolúveis e solúveis. No entanto, apesar de ser um material com elevado valor nutritivo, é pouco utilizado para a alimentação humana, sendo destinado para fertilizantes, alimentação animal ou é descartado.

Uma forma de aproveitamento interessante do okara seria a obtenção de peptídeos a partir das proteínas presentes no mesmo. A hidrólise proteica consiste na clivagem química ou enzimática de moléculas de proteínas em peptídeos de

tamanhos diversos e, eventualmente, em aminoácidos (ADLER-NISSEN, 1986). Para aplicação nutricional dos peptídeos, a hidrólise enzimática é mais indicada do que a hidrólise química, por envolver condições alcalinas moderadas que não destroem as proteínas. Segundo Holanda (2004), os peptídeos podem ser destinados a diferentes usos, que dependerá de suas características funcionais, químicas e moleculares.

Os hidrolisados proteicos têm diversas aplicações na indústria de alimentos. Têm sido utilizados para modificar as propriedades funcionais dos alimentos e como fonte de pequenos peptídeos e aminoácidos. Podem ser incorporados a uma série de produtos, como fórmulas balanceadas para atletas, regimes de emagrecimento e em rações (FURLAN; OETTERER, 2002). Podem também ser usados em alimentos especiais para fins geriátricos e infantis, e para indivíduos com problemas de digestão ou má-absorção de proteínas, graças à sua elevada digestibilidade e disponibilidade dos aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 1996).

Os peptídeos são também considerados substâncias bioativas. Segundo CHALAMAIAH *et al.* (2018), peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteína, que ocasionam impactos positivos em funções fisiológicas e influenciam positivamente na manutenção da saúde humana. Esses efeitos benéficos na saúde são atribuídos a inúmeras sequências de aminoácidos, que podem exercer funções tais como propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-hipertensivas (CHALAMAIAH *et al.*, 2018; JIN *et al.*, 2016; ABU-SALEM *et al.*, 2013). Algumas fontes proteicas já foram estudadas como soja (RANAMUKHAARACHCHI; MEISSNER; MORESOLI, 2013; ABU-SALEM *et al.*, 2013; CASTRO, SATO, 2015), okara (SBROGGIO *et al.*, 2016), farelo de arroz (TANIGUCHI *et al.*, 2017), peixe (HALIM *et al.*, 2016; ZAMORA-SILLERO *et al.*, 2018) dentre outras.

No entanto, a hidrólise enzimática leva a exposição de aminoácidos ou peptídeos de gosto amargo, sendo uma das limitações envolvidas para a utilização destes compostos hidrolisados em alimentos. O gosto amargo está relacionado com a formação de pequenos peptídeos compostos principalmente por aminoácidos hidrofóbicos (CLEMENTE, SANJUÁN; MULET, 2010). Dessa forma, a utilização destes hidrolisados de proteínas para a adição em alimentos, como ingrediente funcional ou como substâncias bioativas, só é viável se esse problema for minimizado. A tecnologia de microencapsulação tem sido utilizada para minimizar tais efeitos, por conseguir, através da adição de material de parede, mascarar gosto

indesejável, neste caso o amargo (SARABANDI, SADEGHI; HAMISHEKAR, 2018 e SUBTIL *et al.*, 2014).

Como forma de preservação das características dos peptídeos bioativos e minimização do gosto amargo, esses são envolvidos em cápsulas protetoras. A microencapsulação é uma técnica que consiste basicamente no aprisionamento de um agente ativo (pequenas partículas sólidas, gotas de líquidos ou compostos gasosos) em invólucro protetor (filmes finos ou coberturas poliméricas) para que seja liberado em uma condição específica (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). De acordo com RÉ (1998), as principais razões para o uso da microencapsulação em alimentos são: proteger os alimentos contra condições ambientais adversas (como luz, umidade, oxigênio, radiação UV); preservar os componentes sensíveis dos alimentos contra outros ingredientes durante a estocagem; minimizar as perdas nutricionais durante o processo ou até mesmo adicionar materiais nutritivos a eles; incorporar mecanismos de liberação controlada às formulações; mascarar ou preservar *flavours* e aromas, e finalmente, tornar o produto mais atrativo, promovendo uma maior flexibilidade e controle no desenvolvimento de produtos mais saborosos e nutritivos, a fim de satisfazer as expectativas dos consumidores.

A hipótese desta pesquisa consiste em que a hidrólise das proteínas poderá acarretar em um aumento da capacidade antioxidante das proteínas do okara através da exposição de peptídeos antioxidante, bem como o processo de microencapsulação por *spray dryer* poderá favorecer a estabilidade física e química dos hidrolisados proteicos em pó.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter peptídeos a partir da hidrólise enzimática de proteínas de okara e microencapsulá-los por *spray drying*.

2.2 Objetivos Específicos

- Hidrolisar proteína de okara através de tratamento enzimático com as proteases Alcalase e Flavourzyme e suas combinações para produzir hidrolisados proteicos com maior capacidade antioxidante, e maior teor de isoflavonas agliconas.
- Microencapsular por *spray drying* as frações peptídicas com maior capacidade antioxidante utilizando dois diferentes agentes encapsulantes e avaliar em relação à atividade físico-química (atividade de água, densidade volumétrica, distribuição de partículas e diâmetro médio, microestrutura) e capacidade antioxidante pelos ensaios ABTS, FRAP e capacidade redutora avaliada por Folin-Ciocalteu (FC) e açúcares.
- Obter as isotermas de sorção e temperatura de transição vítrea das micropartículas visando determinar as condições críticas de estocagem.
- Avaliar a estabilidade das microcápsulas em condições aceleradas de estocagem durante 4 meses.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção e composição química da soja

A soja (*Glycine max L.*) é a principal oleaginosa produzida no Brasil e no mundo. Sua produção vem crescendo mundialmente devido a um crescimento contínuo e diferenciado que pode ser atribuído a vários fatores como o desenvolvimento e estruturação do mercado internacional; consolidação da oleaginosa como fonte de proteína vegetal; geração e oferta de tecnologias que proporcionam a expansão da exploração do grão para diversas regiões do mundo (SEIBEL, 2018). Para a economia brasileira, a soja é uma cultura importante, assim como para outros países como Estados Unidos, Argentina e China. A previsão é que os Estados Unidos conquistem a maior produtividade na safra de 2018/2019, seguidos do Brasil, Argentina e China, com produções de aproximadamente 135,5, 126,4, 60,4 e 59,7 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2018). Com esta perspectiva de produção aumentando nos últimos anos, enfatiza-se a importância de estudar cada vez mais esta matéria prima e seus derivados, visando à alimentação humana.

As proteínas presentes na soja, em maior quantidade, são as globulinas β -conglucina (7S) constituída de subunidades α , α' e β , com massas moleculares de 71, 65 e 50 kDa e a glicina (11S) com as subunidades ácidas (35 kDa) e básicas (25 kDa). Devido à diferença na composição e estrutura, as frações 7S e 11S exibem diferenças nas características nutricionais e funcionais (PEÑAS *et al.*, 2011).

Do ponto de vista nutricional, a soja é a principal fonte de proteínas de origem vegetal, de excelente qualidade, o que se deve a um bom balanço de aminoácidos essenciais o que confere qualidade comparável às proteínas de origem animal (AL LOMAN; JU, 2017; SEIBEL, 2018) e atende às necessidades nutricionais de humanos e de animais. O grão de soja se destaca pelo elevado teor de proteínas (40-41 g/100 g), lipídeos (18-22 g/100 g), contém quantidades significativas de carboidratos (30-35 g/100 g) onde estão inclusos açúcares (glicose, frutose e sacarose), fibras e oligossacarídeos (rafinose e estaquiase) e cinzas (5-7 g/100 g) em base seca. A composição química da soja pode variar em função da cultivar, estágio de maturação e localização geográfica de cultivo (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014).

A soja e os seus derivados vêm sendo amplamente estudados devido ao seu valor nutricional, uma vez que as proteínas e isoflavonas exercem ação moduladora em determinados mecanismos fisiológicos e às suas propriedades funcionais desejadas pela indústria de alimentos (CIABOTTI; FÁTIMA; BARCELLOS, 2006). No Brasil, o consumo de grãos de soja está fortemente associado a manutenção da boa saúde e a redução do risco de doenças, principalmente devido às isoflavonas cujas propriedades biológicas são consideradas benéficas (FANTE *et al.*, 2011). Desta forma, é altamente recomendável a inclusão da soja, assim como também a de seus derivados, na dieta humana.

Do total da produção mundial de soja, aproximadamente 10% são destinadas diretamente à alimentação humana (RIAZ, 2006), na forma de óleo refinado, lecitina e farelos, sendo estes últimos transformados em ingredientes proteicos como farinhas, concentrados, isolados e texturizados. Além de se obter esses ingredientes, é possível o processamento dos grãos, com obtenção de produtos alimentícios fermentados (missô, shoyu, tempeh e natto) e não fermentados como o extrato aquoso de soja (extrato de soja ou soymilk), tofu, okara, farinha integral de soja, farinha torrada de soja (kinako), soja tipo vegetal (edamame) e brotos de soja (moyashi).

3.2 Compostos bioativos da soja

Os compostos bioativos ou substâncias bioativas são nutrientes ou não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica (BRASIL, 2002). Os compostos bioativos geralmente são metabólitos secundários de plantas e, por isto, muitas vezes são denominados de fitoquímicos. Os alimentos funcionais são justificados pela presença de compostos bioativos. Entretanto, estes alimentos não podem ter finalidade medicamentosa ou terapêutica, qualquer que seja a forma de apresentação ou o modo como são administrados. Além disso, esta classe de produtos deve ser segura para o consumo humano, sem necessidade de orientação e/ou acompanhamento médico, a não ser que sejam destinados a grupos populacionais específicos (BRASIL, 2002).

A soja possui diversos compostos bioativos, tais como proteínas, peptídeos, fibras, oligossacarídeos, ácidos fenólicos, flavonoides, saponinas, fitosteróis, ácido fítico e outros (VILLARES *et al.*, 2011). Entretanto, de acordo com a Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) somente as proteínas da soja possuem essa alegação autorizada. Alguns estudos clínicos têm demonstrado efeito benéfico de outros constituintes da soja sobre a saúde (CHEN *et al.*, 2012; MESSINA; BADGER, 2017).

3.2.1 Isoflavonas da soja

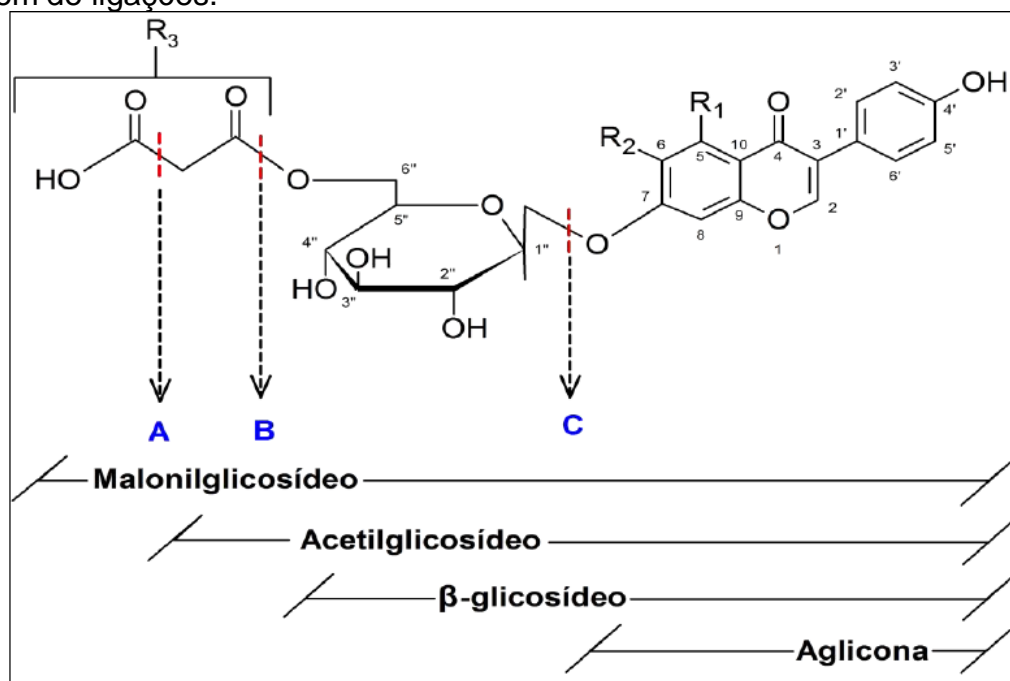
As isoflavonas são compostos polifenólicos e correspondem a uma subclasse, denominada de isoflavonoides, do grupo dos flavonoides (Figura 1). Ao todo, há doze formas principais de isoflavonas que podem ser encontradas na soja e seus derivados. Estas são divididas em quatro grupos conforme a sua estrutura química e denominadas de agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosídeos (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina e 6''-O-acetilglicitina) e malonilglicosídeos (6''-O-malonildaizina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina) (LIU, 2004). Na Tabela 1 estão ilustrados os grupos de isoflavonas da soja e seus principais radicais químicos (R1, R2 e R3). Na Figura 1, além das estruturas químicas, são apresentadas também as possíveis transformações que podem ocorrer nas estruturas como clivagem das ligações por descarboxilação, desesterificação ou hidrólise.

As isoflavonas de soja têm sido objeto de diversas pesquisas devido às associações com suas atividades biológicas, como atividade estrogênica e antioxidante, ação antitumoral, prevenção de doenças cardiovasculares e osteoporose (CHEN *et al.*, 2012). As 12 formas de isoflavonas possuem diferenças nas estruturas químicas e na biodisponibilidade. Várias evidências demonstram que as isoflavonas não são bem absorvidas em suas formas conjugadas. Assim, para ser bioacessível, as isoflavonas de soja devem ser hidrolisadas em suas formas agliconas correspondentes (BAÚ; GARCIA; IDA, 2015; GÓES-FAVONI; CARRÃO-PANIZZI; BELEIA, 2010). As agliconas são mais prontamente absorvidas do que os glicosídeos conjugados, devido a sua baixa massa molecular, o que facilita a difusão e está relacionado à melhor atividade biológica. Malonil e acetilglicosídeos podem ser convertidos em β -glicosídeos após a hidrólise utilizando as β -glicosidases endógenas, calor, tratamento ácido/alcalino ou outras enzimas é possível produzir agliconas (NIAMNUY *et al.*, 2011).

Tabela 1. Grupos de isoflavonas da soja e seus principais radicais químicos.

Grupos	Isoflavonas	R1	R2	R3
Agliconas	Daidzeína	-H	-H	-
	Genisteína	-OH	-H	-
	Gliciteína	-H	-OCH ₃	-
β-glicosídeos	Daidzina	-H	-H	-H
	Genistina	-OH	-H	-H
	Glicitina	-H	-OCH ₃	-H
Acetilglicosídeos	6''-O-acetildaidzina	-H	-H	-COCH ₃
	6''-O-acetilgenistina	-OH	-H	-COCH ₃
	6''-O-acetilglicitina	-H	-OCH ₃	-COCH ₃
Malonilglicosídeos	6''-O-malonildaidzina	-H	-H	-COCH ₂ COOH
	6''-O-malonilgenistina	-OH	-H	-COCH ₂ COOH
	6''-O-malonilglicitina	-H	-OCH ₃	-COCH ₂ COOH

Fonte: LIU, (2004) – Adaptado

Figura 1. Estrutura química das isoflavonas da soja e possíveis transformações por clivagem de ligações.

A = descarboxilação de malonilglicosídeos com a formação de acetilglicosídeos.

B = desesterificação de malonil e acetilglicosídeos com a formação de β-glicosídeos.

C = hidrólise de malonil, acetil e β-glicosídeos com a formação de agliconas.

Uma melhora na conversão de isoflavonas de soja em agliconas foi observada por MALAYPALLY e ISMAIL (2010) quando as proteínas da soja foram hidrolisadas, sendo atribuído à maior exposição das isoflavonas que estão inicialmente complexadas com proteínas globulares. Por isso, há um interesse crescente em obter produtos de soja com alto teor de isoflavonas agliconas devido à sua alta bioatividade.

O perfil e conteúdo das isoflavonas nos grãos de soja são influenciados por vários fatores, entre os quais se destacam a genética da cultivar, grau de maturidade, safra, clima da região de cultivo e condições de estocagem (BRITZ; SCHOMBURG; KENWORTHY, 2011; WANG; MURPHY, 1994). Além disso, uma grande variação do perfil e do teor de isoflavonas são observados entre os diferentes produtos de soja (VILLARES *et al.*, 2011) e isso se deve ao grande número de variáveis que afetam o conteúdo destas substâncias desde a matéria prima até o produto final.

3.2.2 Açúcares da soja

Na soja, além da sacarose, os oligossacarídeos rafinose, estaquiase e verbascose são os principais açúcares solúveis. Estes oligossacarídeos fazem parte do grupo das fibras alimentares ou dietéticas. A rafinose é um trissacarídeo que contém em sua estrutura química uma galactose ligada por α -(1-6) a uma molécula de sacarose. A estaquiase é um tetrassacarídeo, o qual é constituído por uma molécula de galactose ligada por α -(1-6) à galactose terminal da rafinose. A verbascose é um pentassacarídeo cuja estrutura química apresenta uma galactose ligada por α -(1-6) à galactose terminal da estaquiase (Figura 2) (AL LOMAN; JU, 2017; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

Do conteúdo total de carboidratos nas sementes de soja, 8 a 13% são oligossacarídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A sacarose e estaquiase são os carboidratos solúveis predominantes em grãos maduros de cultivares de soja convencional ou tipo alimento e representam 60 e 36% do conteúdo total de carboidratos solúveis, respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A variabilidade no conteúdo de oligossacarídeos na soja é devida ao cultivar, estágio de maturação, região de cultivo, dentre outros fatores (SALDIVAR *et al.*, 2011). Portanto, os

inflamações sistêmicas e associadas à obesidade (WONG *et al.*, 2006; LI; LU; YANG, 2013).

Sendo assim, produzir alimentos a base de soja com maior conteúdo de isoflavonas agliconas e adequado teor de oligossacarídeos podem ser benéficos à saúde humana.

3.3 Okara

Dentre os produtos alimentícios a base de soja de consumo direto ao consumidor, o extrato de soja (ES) é considerado um dos mais conhecidos. O ES é obtido a partir da extração aquosa dos sólidos solúveis da soja, seguido de filtração, obtendo-se um resíduo sólido insolúvel denominado okara. O consumo de ES vem aumentando em todo o mundo, principalmente nos países ocidentais, devido aos seguidores da dieta vegana e saudáveis, atingindo cerca de 13,5 bilhões de litros em 2015 (STATISTA, 2018). É indicado para indivíduos que possuem intolerância ou restrição a lactose e é também recomendado em dietas com ingestão de colesterol reduzido. Para cada quilo de soja seca utilizada para a produção de extrato de soja ou tofu, cerca de um quilo úmido do okara é gerado (WANG; MURPHY, 1994).

Com relação às proteínas, cerca de 23% delas estão presentes no okara (LIU, 2008). O okara possui em sua composição química um conteúdo de: 31,7% de proteínas, 3,0% de lipídeos, 5,3% de cinzas e 60,2% de fibras totais, em base seca (FIGUEIREDO *et al.*, 2018). Apesar da alta qualidade nutricional deste material ele é pouco utilizado para consumo humano, na maioria das vezes é destinado para ração animal, fertilizantes ou é descartado, o que representa um problema para a indústria (SBROGGIO *et al.*, 2016).

Durante a produção do extrato de soja, somente 3 a 5% da matéria seca é retida no ES, ou seja, aproximadamente 95% dos sólidos do grão de soja ficam retidos no okara. Com isto, pode-se afirmar que as grandes porcentagens de nutrientes da soja apresentam-se no okara, sendo um indicativo do alto valor nutritivo deste subproduto e que ele tem grande parte das propriedades benéficas à saúde da soja (PERUSSELLO, 2008). A utilização do okara para a obtenção de novos produtos é uma alternativa interessante do ponto de vista nutricional, social, econômico e ambiental.

3.4 Hidrólise enzimática da proteína de okara

Uma forma de aproveitamento do okara é obter hidrolisados proteicos pela hidrólise enzimática, que consiste na clivagem química ou enzimática, de moléculas de proteínas em pequenos peptídeos de diversos tamanhos e, eventualmente, em aminoácidos (ADLER-NISSEN, 1986). Para aplicação nutricional dos peptídeos, a hidrólise enzimática é mais indicada do que a hidrólise química. A adição de enzimas, ao invés de reagentes químicos, oferece muitas vantagens por permitir o controle do processo, melhorando as propriedades do produto final. Além disso, o processo de hidrólise enzimática é mais simples, eficiente e envolve condições alcalinas moderadas que não destroem as proteínas (SCHMIDT & SALAS-MELLADO, 2009). As enzimas proteolíticas aplicadas podem ser endógenas ou exógenas, tendo um enorme campo de aplicação na geração de produtos de alto valor nutritivo e funcional (RODRIGUEZ-DÍAZ *et al.*, 2011).

A protease Alcalase é uma endopeptidase muito utilizada comercialmente e é produzida por fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformis*. Esta enzima possui ação catalítica nas regiões internas das cadeias polipeptídicas. Dependendo da dimensão da hidrólise, a tendência dessa enzima é produzir peptídeos de menor massa molecular. A Flavourzyme é uma exoprotease, que possui ação sobre as ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas. Essa enzima produz peptídeos com alta massa molecular, aminoácidos com grupo carboxi-terminal e também aminoácidos livres. É uma protease fúngica produzida pela fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae* não modificada geneticamente, atuando na hidrólise em condições neutras ou ligeiramente ácidas (MERZ *et al.*, 2015; SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009; SILVA-LÓPEZ, 2010).

Para que se tenham bons resultados no processo de hidrólise enzimática é necessário que as condições de temperatura, pH, tempo e concentração de substrato sejam controladas. Além disso, a escolha adequada da enzima é importante, bem como a sua concentração, para que se obtenham produtos com características desejadas e sejam possíveis de serem aplicados na formulação de alimentos (ADLER-NISSEN, 1986).

Os hidrolisados proteicos têm sido utilizados para modificar as propriedades funcionais dos alimentos (LACOU; LÉONIL; GAGNAIRE, 2016) ou para serem

utilizados como fonte de peptídeos bioativos (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018; RIZZELLO et al., 2016). Podem ser incorporados a uma série de produtos, como fórmulas balanceadas para atletas, dietas de emagrecimento e em rações (FURLAN; OETTERER, 2002). Outra forma de aplicação é em dietas para indivíduos com problemas de digestão ou má-absorção de proteínas, graças à sua elevada digestibilidade e disponibilidade dos aminoácidos essenciais (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008). Estudos demonstram que as preparações ricas em pequenos peptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, provenientes da hidrólise parcialca de proteínas, possuem maior valor nutricional e uma absorção gastrointestinal mais eficiente quando comparado com a proteína intacta e aminoácidos livres (BHASKAR *et al.*, 2007). O processo de hidrólise enzimática resulta também na liberação de aminoácidos, tornando o aroma e o sabor mais acentuados (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008). Desta forma, a utilização de hidrolisados proteicos, disponibilizam produtos nutricionalmente equilibrados, que pode contribuir para o enriquecimento proteico em dietas alimentares.

Segundo SARABANDI; SADEGHI; HAMISHEKAR (2018), apesar das propriedades benéficas da proteína à saúde, o processo de hidrólise acarreta a formação do sabor amargo, sendo uma das limitações do uso de hidrolisados proteicos em sistemas alimentares. O gosto amargo está relacionado à liberação de pequenos peptídeos compostos principalmente por aminoácidos hidrofóbicos (CLEMENTE; SANJUÁN; MULET, 2010). A formação de peptídeos com gosto amargo depende da composição e da sequência de aminoácidos e do tipo de enzimas usadas. Os hidrolisados de proteínas altamente hidrofóbicas, como caseína, proteínas da soja e proteínas do milho são muito amargos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008). SARABANDI; SADEGHI; HAMISHEKAR (2018) e SUBTIL et al. (2014) utilizaram a microencapsulação de peptídeos para minimizar esse fator indesejável. A microencapsulação é uma técnica que envolve o aprisionamento de um agente ativo (material do núcleo) em um envoltório protetor (material de parede) (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Apesar da grande variedade de benefícios biológicos oferecidos pela ingestão de determinadas proteínas, peptídeos e aminoácidos, a disponibilidade e a incorporação destes compostos em produtos alimentícios ainda representam um grande desafio a serem superados. Segundo DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, (2008) os principais desafios observados na adição são: ausência de interação,

alteração sensorial do alimento, estabilidade durante a produção, armazenamento, transporte e consumo dos alimentos e a garantia de que permaneçam intactos dentro do corpo humano antes de serem absorvidos no local de ação, ou seja, estômago e intestino.

3.5 Peptídeos bioativos

A proteína é um importante macronutriente e tem sido reconhecida como fonte de aminoácidos essenciais na dieta. Além da nutrição básica, algumas proteínas alimentares podem proporcionar benefícios adicionais para a saúde através da liberação de peptídeos bioativos (CHALAMAIAH, YU, WU, 2018). Os peptídeos bioativos são fragmentos proteicos específicos que causam impactos positivos nas funções fisiológicas, influenciando na manutenção da saúde humana. Tais efeitos benéficos na saúde são atribuídos à sequência de aminoácidos, que possuem propriedades antioxidantes, antimicrobianas, imunomoduladoras, anticancerígenas e anti-hipertensivas (CHALAMAIAH, YU, WU, 2018; CUMBY *et al.*, 2008; JIN *et al.*, 2016; MAGAÑA *et al.*, 2015; PAZINATTO *et al.*, 2013; RIZZELLO *et al.*, 2016).

Pesquisas sobre hidrolisados de proteínas ou peptídeos bioativos para a produção de alimentos com valor agregado tem atraído a atenção de cientistas de todo o mundo. Esses peptídeos estão inativos dentro de uma cadeia polipeptídica da proteína, os quais são liberados por processos de hidrólise pelas enzimas digestivas do trato gastrointestinal, fermentação ou amadurecimento, durante o processamento de alimentos e ainda por ação de enzimas obtidas de microrganismos ou plantas (CHALAMAIAH *et al.*, 2012).

Os peptídeos, com baixa massa molecular, são facilmente digeríveis, mais biodisponíveis e apresentam bioatividade superior em relação as proteínas intactas para uma variedade de funções biológicas do corpo humano. SBROGGIO *et al.* (2016) obtiveram peptídeos bioativos com alta capacidade antioxidante utilizando a hidrólise enzimática das proteínas de okara, e superior a proteína não-hidrolisada. AGUILAR *et al.* (2018) observaram que a capacidade antioxidante das proteínas de feijão preto, medidos pela capacidade total e FRAP, aumentou após a hidrólise em 31% e 70%, respectivamente.

3.5.1 Atividade antioxidante

Nos últimos anos, pesquisadores têm repensado a importância da alimentação na manutenção da saúde e prevenção de doenças. Muitas pesquisas mostram que, além dos nutrientes, existem outros componentes nos alimentos que possuem efeito benéfico ao organismo, como os compostos fenólicos e flavonóides, que exercem vários efeitos, destacando a capacidade antioxidante (NIMALARATNE; BANDARA; WU, 2015).

As reações de oxidação em alimentos causam uma série de alterações indesejáveis nos parâmetros de qualidade como textura, sabor, cor, redução do valor nutricional como a degradação parcial de ácidos graxos essenciais e vitaminas. Em níveis mais avançados, podem gerar produtos que interagem com proteínas e causam a perda ou diminuição da absorção destas (LIN; LIANG, 2002), provocando a redução da vida útil e rejeição por parte do consumidor.

A deterioração do alimento com o tempo é inevitável e pode ocorrer por perda de elétrons, com formação intermediária de radical livre. O efeito do antioxidante consiste na inativação dos radicais livres (LIMA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2006). Antioxidantes são definidos como substâncias que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato (FERREIRA; MATSUBARRA, 1997; PIETTA, 2000) através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000). Desta forma, é essencial que haja um equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA; MATSUBARRA, 1997).

Para retardar o processo oxidativo e aumentar a estabilidade dos alimentos, antioxidantes sintéticos e naturais vêm sendo utilizados pelas indústrias de alimentos. Atualmente, há um crescente interesse em encontrar antioxidantes de fontes naturais. Sendo assim, os antioxidantes naturais têm sido mais estudados e valorizados para aplicação em produtos alimentícios. Estudos sugerem que as proteínas dos alimentos podem ser uma potencial fonte alimentar de antioxidantes naturais (SARABANDI, SADEGHI; HAMISHEKAR, 2018; SARMADI; ISMAIL, 2010).

Proteínas alimentares tais como as do leite e soja, têm mostrado boa capacidade para eliminar radicais livres, reduzir ação de metais de transição e inibir a peroxidação lipídica em alimentos. Estudos têm demonstrado que as proteínas da

soja são uma importante fonte de peptídeos com ação antioxidante (ABU-SALEM *et al.*, 2013; SBROGGIO *et al.*, 2016).

Segundo ELIAS; KELLERBY; DECKER (2008), a atividade antioxidante das proteínas tem sido relacionada à composição de seus aminoácidos. No entanto, essa propriedade é limitada pela estrutura terciária, porque muitos aminoácidos com potencial antioxidante podem estar no núcleo da proteína, onde são inacessíveis aos pró-oxidantes. As propriedades antioxidantes dos hidrolisados proteicos dependem de diversos fatores, tais como: tipo de proteína, enzima empregada, grau de hidrólise e pré-tratamento do substrato (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008; PAZINATTO *et al.*, 2013). Esta atividade ocorre por mecanismos específicos, incluindo a capacidade de resíduos de aminoácidos para doar elétrons aos radicais livres. Os peptídeos bioativos têm uma grande capacidade de reduzir a reatividade dos radicais livres devido à exposição dos aminoácidos que reagem mais efetivamente com esses radicais (SBROGGIO *et al.*, 2016).

Diferentes métodos podem ser utilizados para medir a atividade antioxidante de alimentos. Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC – capacidade de absorção de radical oxigênio, e TRAP – potencial reativo antioxidante total), poder de redução de metal (FRAP e CUPRAC – métodos de redução do ferro e cobre, respectivamente), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS e DPPH) e quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS, oxidação de LDL e co-oxidação do β -caroteno) (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Estudos demonstram que a proteína hidrolisada de soja possui habilidade de inibir o radical livre DPPH, ABTS e FRAP (ABU-SALEM *et al.*, 2013; SBROGGIO *et al.*, 2016).

3.6 Microencapsulação

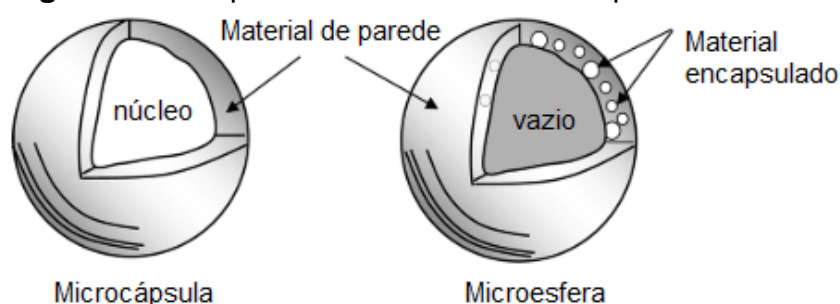
A microencapsulação é um processo que vem sendo muito utilizado com o intuito de proteger os compostos com capacidade antioxidante (CARNEIRO *et al.*, 2013; SARABANDI, SADEGHI; HAMISHEKAR, 2018; SOUZA *et al.*, 2018). SARABANDI, SADEGHI; HAMISHEKAR (2018) avaliaram a capacidade antioxidante de hidrolisados de caseína por diferentes ensaios e observaram que as atividades foram mantidas mesmo após o processo de secagem por pulverização.

Na indústria de alimentos, a microencapsulação é um processo no qual ocorre a inclusão de substância ativa em uma matriz sólida formando a micropartícula (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). É uma técnica que consiste basicamente no isolamento de substâncias ativas, como por exemplo, compostos de sabor, pigmentos, acidulantes, proteínas, enzimas, microrganismos, no estado líquido, sólido ou gasoso, em um invólucro protetor (filmes finos ou cobertura poliméricas), para que a substância seja liberada em uma determinada condição (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; HOYOS-LEYVA *et al.*, 2018).

O material encapsulado é denominado de núcleo, material ativo, fase interna ou recheio, enquanto o material que forma a cápsula ou revestimento é chamado de material de parede, encapsulante, carreador, membrana, cobertura ou casca. O núcleo pode ser formado por uma ou mais substâncias, assim como o material de parede, uma ou mais camadas (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

As micropartículas produzidas pelos diferentes métodos de microencapsulação são conhecidas como microcápsulas ou microesferas (Figura 3). As microcápsulas são consideradas sistemas do tipo reservatório onde se observa a presença de um núcleo contendo a substância ativa e a matriz (invólucro), podendo apresentar mais de um núcleo e/ou várias paredes para um mesmo núcleo. As microesferas são sistemas onde o ativo encontra-se suspenso e dissolvido em uma matriz homogênea ou heterogênea, no qual o ativo encontra-se suspenso. As partículas podem ser classificadas por tamanho em 3 categorias: macro ($>5000\ \mu\text{m}$), micro ($0,1 - 5000\ \mu\text{m}$) e nano ($<0,1\ \mu\text{m}$) (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; RÉ, 1998; SILVA *et al.*, 2003).

Figura 3. Micropartículas com diferentes tipos de estrutura



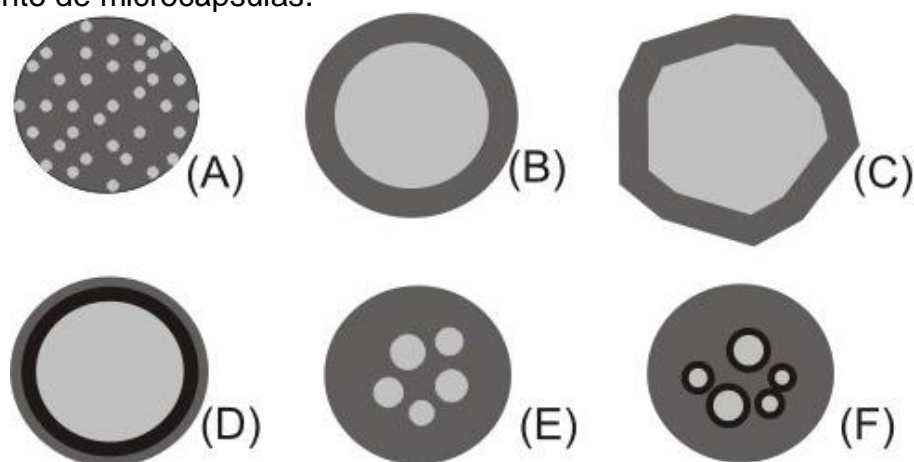
Fonte: Adaptado de Jafari *et al.* (2008).

Na figura 3, a primeira micropartícula pode ser classificada como sistema do tipo reservatório, e caracteriza as “verdadeiras” microcápsulas e a segunda,

classificado como sistema matricial, resulta nas chamadas microsferas (RÉ, 1998). A principal diferença entre as microcápsulas e as microsferas é que nas microsferas uma pequena fração do material encapsulado permanece exposta na superfície, o que é evitado pela verdadeira encapsulação. Porém, o termo 'encapsulação' tem sido usado englobando tanto a formação de microcápsulas quanto de microsferas (DEPYPERE *et al.*, 2003).

As microcápsulas podem ter ainda mais de um núcleo, ou várias paredes para um mesmo núcleo. Na Figura 4 são apresentados alguns dos principais modelos de microcápsulas.

Figura 4. Modelos de microcápsulas. (A): matriz (microsfera); (B): microcápsula simples; (C): simples, irregular; (D): duas paredes; (E): vários núcleos; (F): agrupamento de microcápsulas.



Fonte: Adaptado de Gibbs; Kermasha; Mulligan (1999).

Segundo GHARSALLAOUI *et al.* (2007), RÉ (1998) e SOUZA *et al.* (2018), as principais razões para o uso da microencapsulação são: proteger os alimentos contra condições ambientais adversas (luz, umidade, oxigênio, radiação UV); proteger componentes sensíveis dos alimentos contra outros ingredientes durante a estocagem; proteger os alimentos contra perdas nutricionais ou até mesmo adicionar materiais nutritivos a eles, incorporando mecanismos de liberação controlada às formulações; mascarar sabor e aroma dos peptídeos indesejáveis do núcleo ou preparar *flavours* e aromas; diluir material do núcleo quando é preciso ser usados em quantidades muito pequenas e; finalmente, tornar o produto mais atrativo, promovendo uma maior flexibilidade e controle no desenvolvimento de produtos mais saborosos e nutritivos, a fim de satisfazer as expectativas dos consumidores.

A indústria de alimentos utiliza a técnica de microencapsulação principalmente para reduzir a reatividade do produto com o meio externo, diminuindo a evaporação ou a velocidade de transferência do material para o ambiente. Além disso, o manuseio do produto é melhorado, uma vez que o mesmo adquire uma forma sólida, com maior uniformidade, facilitando misturas (THIES, 2001).

Diversos processos podem ser utilizados para a produção de ingredientes microencapsulados, como físicos, químicos e físico-químicos. A seleção do método depende de fatores econômicos, da sensibilidade e propriedades físico-químicas do núcleo, da biodisponibilidade e biodegradação das cápsulas, do tamanho da partícula desejada, do material de parede, bem como o mecanismo de liberação (JACKSON; LEE, 1991; NESTERENKO; ALRIC; DURRIEU, 2013).

3.6.1 Microencapsulação por *spray drying*

A técnica de microencapsulação física mais utilizada na indústria de alimentos é a de secagem por *spray drying*, por ser considerada um processo econômico e flexível, realizado em equipamento de acesso fácil e resultando em partículas de boa qualidade (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2018). Este processo é útil para ingredientes sensíveis ao calor, uma vez que a secagem ocorre de forma rápida, na qual a temperatura alcançada pelo material de recheio é inferior a 100 °C. No entanto, ainda assim, podem ocorrer perdas de alguns compostos deste material.

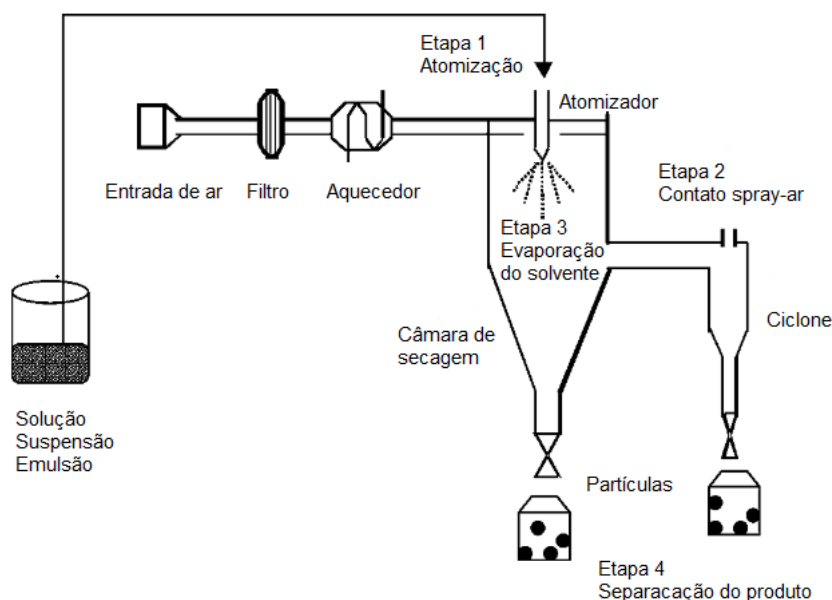
Segundo MADENE *et al.* (2006), a microencapsulação por *spray drying* apresenta algumas vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens: baixo custo de operação; alto rendimento e cápsulas de boa qualidade, com alta estabilidade, rápida solubilidade e tamanho pequeno. No que diz respeito às desvantagens, podem ser citadas, produção não uniforme de cápsulas; limitações na escolha do material de parede (baixa viscosidade a altas concentrações); produção de um pó muito fino, podendo necessitar de um processo adicional (com aglomeração) e possibilidade de prejudicar materiais altamente sensíveis ao calor (que apresentem compostos de aroma com baixo ponto de ebulição).

Nos últimos anos, a secagem por *spray drying* ou atomização é o método mais utilizado pela indústria de alimentos para microencapsular compostos alimentícios (COSTA *et al.*, 2013; KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009; SARABANDI, SADEGHI; HAMISHEKAR, 2018; SUBTIL *et al.*, 2014) e tem sido

amplamente utilizada para encapsulação de hidrolisados proteicos (KUROZAWA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2009; SARABANDI, SADEGHI; HAMISHEKAR, 2018; SUBTIL *et al.*, 2014), de aromas alimentícios (MADENE *et al.*, 2006; NESTERENKO; ALRIC; DURRIEU, 2013; REINECCIUS, 2004), de óleos essenciais (CARNEIRO *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2013; HIJO *et al.*, 2015) e de microrganismos (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002), entre outros.

O processo de secagem por atomização consiste na transformação de produtos líquidos em partículas sólidas por meio do agente dessecante, ar quente (RÉ, 1998). Neste processo a substância a ser encapsulada é homogeneamente dispersa ou dissolvida em uma solução aquosa ou dispersão que contém o agente encapsulante. A solução é bombeada até o atomizador e é aspergida na forma de névoa de gotículas (*spray*) até a câmara de secagem. Neste compartimento ocorre a evaporação do solvente (secagem pelo ar quente), em que as gotas líquidas passam a partículas sólidas secas que depois são recolhidas no coletor de pó ou ciclone (Figura 5).

Figura 5. Esquema das principais etapas envolvidas no processo de microencapsulação por *spray drying*.



Fonte: Adaptado Ré (2006).

A utilização de calor pode ser considerada um inconveniente, capaz de afetar as propriedades dos compostos termossensíveis, quer seja o agente encapsulado

ou o agente encapsulante. No entanto, a relação elevada entre a superfície/volume das partículas promove uma rápida evaporação do solvente. O tempo de exposição das partículas ao calor é reduzido, geralmente em poucos segundos e a temperatura do núcleo não ultrapassa os 100 °C, o que reduz a probabilidade de ocorrerem alterações indesejáveis em compostos termossensíveis (JAFARI *et al.*, 2008).

Por atomização podem formar microcápsulas ou microesferas, conforme o composto ativo está disperso ou dissolvido na solução de polímero. As formas do produto obtido dependem das propriedades físicas e químicas do material, do projeto e operação do secador. A qualidade dos produtos obtidos por atomização depende das características da solução de alimentação (conteúdo de sólidos, viscosidade e temperatura), do atomizador e da transferência de calor e massa entre o ar aquecido e as gotículas da câmara de secagem (FURUTA; HAYASHY; OHASHI, 1994). Também são dependentes das características do material líquido e das condições do processo as propriedades dos produtos obtidos por *spray drying*, tais como densidade do pó, distribuição do tamanho, diâmetro médio e formato das partículas. Esses parâmetros contribuem nas propriedades funcionais dos pós, incluindo a sua fluidez, manipulação, compressibilidade e mistura/segregação dos seus componentes (BHANDARI; HARTEL, 2005).

O tamanho das partículas é um importante parâmetro físico a ser considerado em sistemas particulados. Essa propriedade pode influenciar na aparência, escoabilidade e dispersibilidade do pó. Por esse parâmetro é possível avaliar a estabilidade de uma mistura de diferentes componentes, como a homogeneidade na distribuição das diferentes partículas na mistura e da compactação ou segregação de seus componentes, em que um produto com menor diâmetro fica distribuído na parte inferior (O'HAGAN *et al.*, 2005). Quando o tamanho da partícula diminui, o aumento da sua área superficial acarreta uma maior afinidade com a água e habilidade para aglomerar. O conhecimento da densidade de um determinado material é importante para o armazenamento, processamento, empacotamento e distribuição. A densidade volumétrica (ou *bulk density*) considera os poros internos e externos da partícula e é geralmente usada para caracterizar um produto obtido por moagem ou secagem (BARBOSA-CÁNOVAS; JULIANO, 2005).

3.6.2 Agentes encapsulantes

A escolha do agente encapsulante depende das condições físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do processo empregado para formar as partículas. Um material de parede ideal deve ser insolúvel, não deve reagir com o material do núcleo, ter baixa higroscopicidade para facilitar a manipulação e evitar aglomeração, apresentar baixa viscosidade a altas concentrações, ter habilidade para dispensar ou emulsificar o material ativo e estabilizar emulsão produzida, aprisionar e manter o material ativo dentro da sua estrutura durante o processamento e a estocagem. Além disso, deve liberar completamente o solvente ou outro material ativo que será usado durante o processo de encapsulação, proporcionar a máxima proteção ao material ativo contra condições ambientais, ser solúvel em solventes utilizados na indústria de alimentos, apresentar boa disponibilidade no mercado e baixo custo (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Os materiais que podem ser utilizados na microencapsulação é bastante diversificada (SOUZA *et al.*, 2018). Os principais agentes encapsulantes utilizados na indústria de alimentos são apresentados na Tabela 2 (SHAHIDI; HAN, 1993).

Tabela 2. Principais agentes encapsulantes em alimentos.

Classe	Agente encapsulante
Açúcares e materiais amiláceos	Amido, maltodextrina, xarope de milho, dextrana, sacarose e ciclodextrina
Celulose	Carboximetilcelulose, metil e etil celulose, acetil celulose e nitrocelulose
Gomas	Goma arábica, ágar, alginato de sódio e carragena
Lipídeos	Cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras
Proteínas	Glúten, caseína, gelatina, albumina, hemoglobina e peptídeos

Os agentes de encapsulação podem ser aplicados sozinhos ou combinados e a composição ideal é importante para o sucesso do processo de microencapsulação (FERNANDES; CANDIDO; OLIVEIRA, 2012). Normalmente, a seleção do material utilizado é feita por tentativa e erro, em que cápsulas são formadas e, em seguida, avaliadas quanto à eficácia de encapsulação e estabilidade.

3.6.2.1 Maltodextrina

As maltodextrinas são polissacarídeos nutritivos não doces formados por unidades de D-glicose unidas principalmente por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ e apresentam uma fórmula geral igual à $[(C_6H_{10}O_5)_nH_2O]$, podem ser obtidos pela hidrólise parcial, ácida ou enzimática de qualquer amido (milho, milho ceroso, batata, tapioca/mandioca, trigo, arroz) (HOYOS-LEYVA *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2009). Os hidrolisados são descritos em relação à sua dextrose equivalente (DE), que é uma medida do total do número de unidade de α -D-glicose anidro e está ligada ao grau de polimerização (DP) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Para serem denominadas de maltodextrinas o equivalente dextrose (DE) deve ser menor que 20. Se o DE é for maior que 20, são chamados de xarope de amido. As maltodextrinas são produtos com baixa higroscopicidade, não apresentam sabor doce e são amplamente utilizadas para melhorar o corpo dos produtos alimentícios. Já os xaropes de milho apresentam uma leve doçura e maior capacidade de absorver umidade (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

As maltodextrinas, por serem produtos de amido hidrolisado, consistem em uma mistura de monossacarídeos, principalmente D-glicose, maltose e uma série de oligossacarídeos e polissacarídeos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008). Dessa forma, apresentam uma ampla distribuição de massa molecular entre polissacarídeos e oligossacarídeos e estão disponíveis comercialmente, na forma de um pó branco ou de soluções concentradas. Ao contrário de amidos naturais, são solúveis em água fria.

A maltodextrina é um dos principais materiais utilizados no processo de secagem por atomização, devido às suas características físicas, tais como baixa viscosidade, mesmo quando se encontram em elevadas concentrações de sólidos, elevada solubilidade, é insípida e inodora (CARNEIRO *et al.*, 2013;

GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). São muito utilizadas na microencapsulação de alimentos, principalmente devido ao seu baixo custo em comparação com outros hidrocoloides comestíveis. Porém, por não possuir boa propriedade emulsificante, normalmente é utilizada junto com outros materiais que possuam esta propriedade (CARNEIRO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2018), e biopolímeros com atividade de superfície, como goma arábica (CARNEIRO *et al.*, 2013; FERNANDES, CANDIDO; OLIVEIRA, 2012; HIJO *et al.*, 2015), amidos modificados (CARNEIRO *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2018) e com proteínas (CARNEIRO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2018), com o objetivo de aumentar a eficiência e reduzir custos da microencapsulação por *spray drying*.

No entanto, segundo REINECCIUS (1988), apesar de as maltodextrinas apresentarem certa deficiência em relação às propriedades emulsificantes, isso não representa um problema se o material a ser encapsulado for solúvel em água ou se for utilizado um emulsificante secundário (como, por exemplo, concentrado proteico de soro de leite) no processo. Desse modo, são utilizadas principalmente como auxiliares para materiais de difícil secagem, como suco concentrado de frutas, flavorizantes solúveis em água, enzimas ou adoçantes de alta potência. SARABANDI, SADEGHI; HAMISHEKAR (2018) utilizaram maltodextrina no processo de microencapsulação de hidrolisados de caseína e obtiveram melhorias em relação a higroscopicidade, estabilidade físico-química e prazo de validade desses compostos ao longo do tempo de estocagem. RÉ (1998) e REINECCIUS (2004) relatam que a maltodextrina é capaz de proteger os materiais encapsulados da oxidação.

3.6.2.2 Amido modificado

O mercado de amidos vem crescendo e se aperfeiçoando nas últimas décadas, devido à busca de produtos com características específicas que atendam as exigências e necessidades da indústria. O objetivo da produção de amidos modificados é de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos e, assim, aumentar a utilidade deste polímero nas aplicações industriais.

As razões que levam à modificação do amido incluem modificar as características de gelatinização, diminuir a retrogradação; aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e descongelamento, a transparência das pastas ou géis

e a adesividade; melhorar a textura das pastas ou géis e a formação de filmes; adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante (SILVA *et al.*, 2006).

As modificações nas propriedades tecnológicas dos amidos podem ser obtidas por processos físicos, como tratamento térmico, exposição a radiações, processos enzimáticos ou por processos químicos nos quais se empregam reagentes específicos com o objetivo de alterar a estrutura das macromoléculas dos componentes do amido (SILVA *et al.*, 2006).

O amido modificado Capsul® é um agente encapsulante muito utilizado pela estabilização da emulsão, baixa viscosidade e excelente retenção de voláteis (acima de 93%) (ARANCIBIA *et al.*, 2011). Assim como a maltodextrina, os amidos são modificados para ter baixa viscosidade, o que facilita o seu uso em maiores concentrações do que a goma arábica. Por outro lado, segundo REINECCIUS (2004), os amidos modificados exercem pouca proteção contra a oxidação durante a estocagem e isto pode ser melhorado combinando-no com monossacarídeos, dissacarídeos ou xarope de milho.

Em busca de material substituto para a goma arábica para a redução de custos, a *National Starch and Chemical Corporation*, dos Estados Unidos, desenvolveu um amido modificado chamado Capsul®. A modificação consiste em acrescentar o componente lipofílico – succinato de octanil – que, aumenta a capacidade e a estabilidade de emulsões nas formulações (COSTA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2011). Em outras palavras, o Capsul®, também conhecido como amido octenilsuccinato, é um derivado de amido de milho obtido pela esterificação do amido com o ácido octenilsuccinato anidro, resultando, portanto, em um amido hidrofobicamente modificado (WANG *et al.*, 2011). Por meio desta modificação, a hidrofobicidade do octenilsuccinato é introduzida e a hidrofiliabilidade do amido é mantida. Como resultado da anfifilicidade, este derivado de amido tem sido relatado como um emulsionante eficaz (WANG *et al.*, 2011) e é, portanto, utilizado preferencialmente como um agente encapsulante no processo de encapsulação de alimentos.

Assim, o amido modificado Capsul® tem capacidade de oferecer excelente propriedade emulsificante para uma grande variedade de mistura com voláteis, como ácidos graxos de cadeia curta, óleos essenciais cítricos, óleos vegetais e outros ativos, com a função estabilizadora para o processo de secagem por

atomização. O amido de milho modificado por inclusão de grupamento lipofílico tem se tornado um substituto de proteínas e da goma arábica, por custar, em média, três vezes menos, ser usado em menor quantidade (em peso), além de estar prontamente disponível (ABURTO; TAVARES; MARTUCCI, 1998).

3.7 Isoterma de sorção

Em relação à composição de alimentos frescos, a água é o componente mais importante, sendo o agente controlador da deterioração dos mesmos. A deterioração dos alimentos está intimamente ligada à concentração e mobilidade da água. A taxa e intensidade com que ocorre a deterioração podem ser relacionadas pela atividade de água (WOLF; SPIESS; JUNG, 1985).

A atividade de água (A_w) é um parâmetro físico-químico definido como a pressão de vapor no alimento (p) a uma temperatura definida dividido pela pressão de vapor da água pura (p_0) na mesma temperatura constante, de acordo com a Equação (1).

$$A_w = \frac{p}{p_0} = \frac{URE}{100} \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde: URE é a umidade relativa de equilíbrio (%)

Alimentos ricos em água com valores de atividade de água acima de 0,90 poderão formar soluções diluídas com componentes dos alimentos que servirão de substrato para os microrganismos se desenvolverem. Quando a atividade de água baixar para 0,40-0,80 haverá a possibilidade de reações químicas e enzimáticas rápidas pelo aumento das concentrações dos reagentes, enquanto que em alimentos com atividade de água próxima de 0,60 há um pequeno ou nenhum crescimento de microrganismo. Em regiões de atividade de água inferiores a 0,30, atinge-se a zona de absorção primária, onde as moléculas de água poderão estar ligadas a pontos de absorção primários (exemplo: grupos $-\text{COOH}$) e por sua vez se ligar a outras moléculas de água por ligações de hidrogênio. Esta água está fortemente ligada ao alimento formando a chamada monocamada, não utilizável para dissolver componentes dos alimentos, o que leva as reações a terem

velocidade tendente a zero, com exceção da oxidação de lipídeos que é consideravelmente mais rápida (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

Ao colocar um material biológico exposto a certa umidade relativa, ocorre um fenômeno de transferência de massa no sentido de se alcançar um equilíbrio dinâmico entre a umidade do produto e a da vizinhança. Tal equilíbrio acontece quando a pressão de vapor de água na superfície do material se iguala à do ar que o envolve (TREYBAL, 1981).

O estudo da A_w pode ser feito através das isotermas de sorção que descreve uma relação entre a A_w e a umidade de equilíbrio de um produto alimentar, ou seja, é uma curva que descreve a relação de equilíbrio do teor total de umidade de um alimento e a pressão de vapor ou umidade relativa, a uma dada temperatura (CATELAM; FÁVARO-TRINDADE; ROMERO, 2011). Essa relação depende de diversos fatores, tais como a estrutura física da superfície do material, composição química e afinidade com a água. Assim, cada alimento apresenta características distintas de sorção de umidade, sendo necessária a determinação experimental para cada produto (WOLF *et al.*, 1985).

O conhecimento das isotermas de sorção é importante na análise e montagem de vários processos alimentares, tais como preservação, secagem, armazenamento, embalagem e mistura. Elas podem ser usadas para prever mudanças na estabilidade do alimento e para selecionar o material de embalagem e ingredientes apropriados (ZHANG *et al.*, 1996).

As isotermas são úteis para o cálculo do tempo e consumo de energia durante a secagem, para prever o comportamento do ingrediente após a mistura, para auxiliar a seleção de embalagem, para modelar variações de umidade durante o armazenamento e para prever a vida de prateleira de produtos alimentícios (COMUNIAN *et al.*, 2011; LABUZA; SCHMIDL, 1985; SIRIPATRAWAN; JANTAWAT, 2006). Estas propriedades também fornecem informações sobre os mecanismos de sorção e interações entre componentes dos alimentos e da água (GABAS; MENEGALLI; TELIS-ROMERO, 2000).

Em produtos alimentícios, as isotermas de sorção geralmente podem ser divididas em três regiões. A primeira região está localizada na faixa de A_w de 0 – 0,25 e representa a adsorção de água na monocamada; a segunda região com A_w entre 0,25 – 0,60 representa a adsorção nas demais camadas após a monocamada e a terceira região, que corresponde a uma A_w superior a 0,60, representa a região

onde a água é inicialmente condensada no interior dos poros e depois na superfície, causando a dissolução de materiais solúveis presentes (LOMAURO, BAKSHI, LABUZA, 1985).

Para a determinação experimental de umidade de equilíbrio é necessário um ambiente com umidade relativa constante e controlada. O método de controle de umidade mais usado é o que utiliza soluções aquosas de ácido sulfúrico e soluções saturadas de sais.

Várias equações são utilizadas para representar as curvas de sorção de alimentos. Os modelos de GAB (GUGGENHEIM-ANDERSON-DE BÔER) e de BET (BRUNAUER EMMETT-TELLER) são preferidos porque tem bases físico-químicas mais sólidas. O modelo GAB abrange uma faixa de atividade de água entre 0,1 – 0,9, enquanto o modelo BET fornece um bom ajuste para uma variedade de alimentos na região de A_w entre 0,05 – 0,45 (RIZVI, 1995).

O modelo de BET se baseia na suposição de que a água é adsorvida na forma de camadas. A primeira se fixa por adsorção sobre pontos uniformemente localizados enquanto que as camadas seguintes se fixam entre si mediante ligação de hidrogênio, sendo que o fator que limita o número de camadas adsorvidas é o diâmetro dos capilares. A equação do modelo de BET é escrita da seguinte forma.

$$X_e = \frac{X_m C A_w}{(1 - A_w)[1 + (C - 1)A_w]} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde: X_e é a umidade de equilíbrio ($g_{\text{água}}/g_{\text{sólido}}$); X_m é a umidade na monocamada molecular ($g_{\text{água}}/g_{\text{sólido}}$); C é uma constante do modelo.

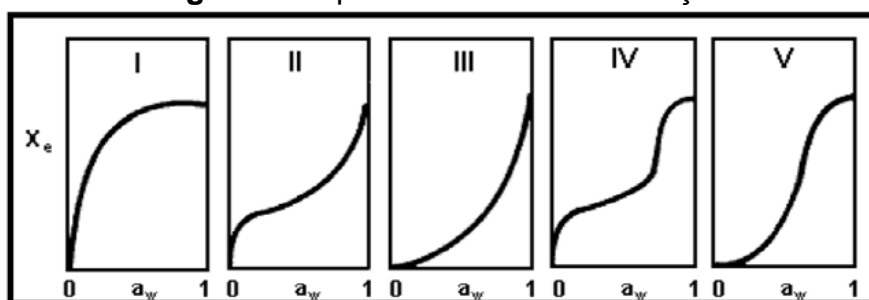
Uma detalhada pesquisa na literatura (VAN DER BERG, 1984) indicou que a equação mais eficiente para a predição das isotermas de sorção é a equação de GAB. Ela é um modelo relativamente simples com um pequeno número de parâmetros que têm significado físico e pode ser aplicada a uma grande faixa de A_w . O modelo de GAB estendeu as teorias de adsorção física de BET, resultando numa equação triparmétrica, que permite um melhor ajuste dos dados de sorção dos alimentos até a A_w de 0,9 (VAN DER BERG, 1984; LEWICKI, 1997). A equação de GAB é escrita conforme Equação 3:

$$X_e = \frac{X_m C_{GAB} K_{GAB} A_w}{(1 - K_{GAB} A_w)(1 - K_{GAB} A_w + C_{GAB} K_{GAB} A_w)} \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde: X_m é o conteúdo de umidade na monocamada (g/g sólidos), C e K são as constantes do modelo. Quando $K_{GAB} = 1$, a equação GAB fica reduzida a equação BET.

As isotermas podem ser classificadas de acordo com os formatos, que podem ser de cinco tipos, apresentados na Figura 6. No caso de alimentos, as isotermas de maior interesse são as do Tipo II e III (BRUNAUER, EMMET, TELLER, 1938).

Figura 6 - Tipos de isotermas de sorção.



Fonte: Brunauer *et al.* (1938)

3.8 Transição vítrea

Transição vítrea refere-se à mudança dos estados físicos de material (sólido, líquido e gasoso) provocada por alteração de temperatura ou pressão, que afetam suas propriedades físicas (ROOS, 1995).

Um material estável termodinamicamente é aquele que se encontra em equilíbrio nas condições de pressão e temperatura do ambiente, ou seja, não há nenhuma alteração no seu estado físico no decorrer do tempo. Ou seja, a estrutura molecular desses materiais se encontra organizada da melhor forma possível, de modo que o sistema esteja em seu nível mínimo de energia livre. Este estado em equilíbrio é observado em compostos quimicamente puros (ROOS, 1995).

Os alimentos, ao contrário dos compostos puros, são matrizes complexas, por possuírem uma diversidade de componentes, como os carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas e água, os quais influenciam o equilíbrio molecular. Segundo ROOS (1995), o estado físico dos alimentos geralmente é governado pela transição

de fase dos seus principais componentes. Como a maioria dos alimentos possui a água como principal componente e diluente, ela deve afetar o estado físico e as demais propriedades dos compostos.

Desta forma, a maioria dos alimentos e de polímeros sintéticos existe em um estado de não-equilíbrio amorfo. Este estado pode ser definido como uma falta de organização das moléculas, sendo o oposto do estado cristalino, o qual se caracteriza pelo melhor arranjo da estrutura (menor nível de energia). Estes materiais são metaestáveis, de modo que seu estado físico e suas propriedades físico-químicas mudam de comportamento durante as etapas de processamento, estocagem, distribuição e consumo (ROOS, 1995; SLADE; LEVINE, 1994).

A mudança de fase mais importante nos alimentos é a transição vítrea que consiste em uma transição de fase de segunda ordem de um estado sólido-vítreo para um estado semi-líquido gomoso (ROOS, 1995). Essa transformação ocorre em uma faixa de temperatura, embora seja frequentemente referida a um único valor. A temperatura, em uma determinada umidade, à qual é atribuída essa transição é denominada temperatura de transição vítrea T_g (KAUZMANN, 1948; SPERLING, 1992).

Um material em estado vítreo comporta-se como um sólido quebradiço, com rigidez ou viscosidade extremamente alta (cerca de 10^9 Pa.s), apresentando mobilidade molecular semelhante aos sólidos cristalinos, enquanto no estado gomoso, a mobilidade molecular aumenta significativamente e o material adquire propriedades mecânicas tipicamente viscoelásticas (CHAMPION; LE MESTE; SIMATOS, 2000; ROOS, 1995).

ROOS e KAREL (1991) atribuíram os valores de T_g ao ponto inicial da transição, por se tratar da temperatura em que se observaram rápidas mudanças na viscosidade do sistema. A T_g não é um ponto nitidamente localizado, mas define o centro de uma região em torno de 20 °C, na qual a transformação ocorre. Abaixo da T_g , um material se encontra no estado vítreo, acima da T_g , no estado gomoso (WHITE; CAKEBREAD, 1966).

A principal consequência da transição vítrea é um aumento da mobilidade molecular e do volume livre em temperaturas acima da T_g , o que caracteriza o estado gomoso, podendo resultar em deteriorações físicas e físico-químicas (ROOS; KAREL, 1991).

Quando se encontra no estado vítreo e, portanto, abaixo da temperatura de fusão, um material possui energia maior que o estado de equilíbrio cristalino. O estado de não-equilíbrio amorfo está sempre sujeito a uma força motriz que tende ao estado de equilíbrio. Acima da T_g , a mobilidade molecular é suficiente para permitir a reorganização das moléculas. Em temperaturas abaixo da T_g , a mobilidade molecular é baixa devido à alta viscosidade, não permitindo os rearranjos moleculares necessários na formação de estruturas cristalinas (ROOS, 1995).

A transição do estado vítreo para o gomoso pode ocorrer tanto pelo aumento da temperatura, como pelo aumento do agente plasticizante, no caso, a água. Quando um alimento é submetido a um ambiente de elevada umidade relativa e temperatura constante, ele absorve água, ocorrendo um aumento deste plasticizante. Com isso, há uma redução na sua viscosidade e um conseqüente aumento na mobilidade molecular. Analogamente, em um material submetido a um aumento da temperatura acima da T_g , com umidade constante, observam-se diversas alterações tais como, aumento do volume livre, decréscimo da viscosidade, aumento do calor específico e aumento da expansão térmica (WHITE; CAKEBREAD, 1966).

Assim, a transição vítrea possui importância fundamental por estar intimamente relacionada com a preservação da qualidade de produtos alimentícios e materiais biológicos de baixa umidade. Esse conceito pode ser utilizado para interpretar transformações que ocorrem durante o processamento e estocagem destes produtos, sendo assim, de interesse para as indústrias que utilizam processos de desidratação ou congelamento (ROOS, 1995).

Para a indústria de alimentos, particularmente aquelas que utilizam processo de conservação por desidratação (secagem, aspersão e liofilização) ou processos a baixas temperaturas (congelamento), o conhecimento da temperatura de transição vítrea e do mecanismo de transformação vítrea são de interesse primordial e utilizável para poder prever o comportamento dos alimentos, os quais são considerados cineticamente estáveis no estado vítreo (KHALLOUFI; EL-MASLOUHI; RATTI, 2000; SLADE; LEVINE, 1994).

As alterações estruturais que ocorrem em alimentos desidratados com características amorfas, em temperaturas acima da T_g , são a aglomeração, adesividade, colapso e cristalização. O aumento da mobilidade molecular também

afeta a difusão, resultando no aumento de reações de deterioração, como reações enzimáticas, escurecimento não enzimático e oxidação (ROOS, 1995).

Os hidrolisados proteicos em pó possuem altos conteúdos de peptídeos e carboidratos de baixa massa molecular (glicose, frutose, sacarose, lactose), e baixos valores de temperatura de transição vítrea e assim causam problemas na secagem por atomização desses produtos. Uma vez que a T_g aumenta com o aumento do massa molecular, a adição de agentes coadjuvantes ou carreadores na solução a ser desidratada é uma alternativa para melhorar o processo de secagem, diminuindo a aderência do produto na câmara do secador e aumentar a estabilidade do produto em condições ambientais adversas (ROOS; KAREL, 1991).

REFERÊNCIAS

- ABU-SALEM, F. M.; MAHMOUD, M. H.; GIBRIEL, A. Y.; ABOU-ARAB, A. Characterization of Antioxidant Peptides of Soybean Protein Hydrolysate. **International Scholarly and Scientific Research & Innovation**, 79(7), 249–253, 2013.
- ABURTO, L. C.; TAVARES, E.; MARTUCCI, D. Q. Microencapsulation of orange essential oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18(1), 45–48, 1998.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- AGUILAR, J. G. S.; CASON G. V.; CASTRO, R. J. S. Improving antioxidant activity of black bean protein by hydrolysis with protease combinations. **International Journal of Food Science & Technology**, 53(9), 1–8, 2018.
- AL LOMAN, A.; JU, L. K. Enzyme-based processing of soybean carbohydrate: Recent developments and future prospects. **Enzyme and Microbial Technology**, 106, 35–47, 2017.
- ARANCIBIA, C.; JUBLOT, L.; COSTELL, E.; BAYARRI, S. Flavor release and sensory characteristics of o / w emulsions . Influence of composition, microstructure and rheological behavior. **Food Research International Journal**, 44(6), 1632–1641, 2011.
- BARBOSA-CÁNOVAS. G. V.; JULIANO. P. Physical and chemical properties of food powders. In: ONWULATA. C. (Ed.). **Encapsulated and powdered foods**. Boca Raton. *Taylor & Francis.*, 39–71, 2005.
- BHANDARI, B. R.; HARTEL, R. W. Phase transitions during food powder production and powder stability In: ONWULATA, C. (Ed.). **Encapsulated and powdered foods** (Boca Raton), 2005.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. Varela, Ed. São Paulo, 1992.
- BRITZ, S. J.; SCHOMBURG, C. J.; KENWORTHY, W. J. Isoflavones in seeds of field-grown soybean: Variation among genetic lines and environmental effects.

JAOCS, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 88(6), 827–832, 2011.

BRUNAUER, S.; EMMET, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of American Chemistry Society**, 60(2), 309–320, 1938.

CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGER, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, 115(4), 443–451, 2013.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic actions of proteolytic enzymes for production of soy protein hydrolysates with antioxidant activities: An approach based on enzymes specificities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 4(4), 694–702, 2015.

CATELAM, K. T.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; ROMERO, J. T. Water adsorption isotherms and esoteric sorption heat of spray-dried and freeze-dried dehydrated passion fruit pulp with additives and skimmed Milk. **Ciência e Agrotecnologia**, 35(6), 1196–1203, 2011.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, 135(4), 3020–3038, 2012.

Chalamaiah, M.; Yu, W.; Wu, J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. **Food Chemistry**, 245, 205–222, 2018.

CHAMPION, D.; LE MESTE, M.; SIMATOS, D. Toward an improved understanding of glass transition and relaxation in foods: molecular mobility in the glass transition range. **Trends in Food Science and Technology**, 11(2), 41–55, 2000.

CHEN, K. I., ERH, M. H., SU, N. W., LIU, W. H., CHOU, C. C., & CHENG, K. C. (2012). Soyfoods and soybean products: From traditional use to modern applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 96(1), 9–22, 2012.

CIABOTTI, S., FÁTIMA, M. DE, & BARCELLOS, P. Avaliações químicas e bioquímicas grãos, extratos e tofus. **Ciência e Agrotecnologia**, 30(5), 920–929, 2006.

CLEMENTE, G., SANJUÁN, N., & MULET, A. **Influence of ultrasounds in drying kinetics of grape seeds.** 3–6, 2010.

COMUNIAN, T. A.; MONTERREY-QUITERO, E. S.; THOMAZINI, M., BALIEIRO, J. C. C.; PICCONE, P., PITTIA, P.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum Arabic, maltodextrin and soy protein isolate-based carrier systems. **International Journal of Food Science and Technology**, 46(6), 1259–1265, 2011.

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Food Hydrocolloids Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids : A review. **Food Hydrocolloids**, 61, 442–457, 2016.

COSTA, J. M. G.; BORGES, S. V.; HIJO, A. A. C. T.; SILVA, E. K.; MARQUES, G. R.; CIRILLO, M. Â.; DE AZEVEDO, V. M. Matrix structure selection in the microparticles of essential oil oregano produced by spray dryer. **Journal of Microencapsulation**, 30(8), 717–727, 2013.

COSTA, J. M. G.; SILVA, E. K.; TOLEDO HIJO, A. A. C.; AZEVEDO, V. M.; MALTA, M. R.; FERREIRA ALVES, J. G. L.; BORGES, S. V. Microencapsulation of Swiss cheese bioaroma by spray-drying: Process optimization and characterization of particles. **Powder Technology**, 274, 296–304, 2015.

CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**, 109, 144–148, 2008.

DAMODARAN, S; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry.** (C. Pres, Ed.) (4th ed.). Boca Baton, FL, USA, 2008.

FIGUEIREDO, V. R. G.; YAMASHITA, F.; VANZELA, A. L. L.; IDA, E. I.; KUROZAWA, L. E. Action of multi-enzyme complex on protein extraction to obtain a protein concentrate from okara. **Journal of Food Science and Technology**, 55 (4), 1508-1517, 2018.

DEPYPERE, F.; DEWETTINCK, K.; RONSSE, F.; PIETERS, J. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **Applied Biotechnology Food Science Policy**, 1(2), 75–94, 2003.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 48(5), 430–441, 2008.

FANTE, C. A.; GOULART, P. F. P.; ALVES, J. D.; HENRIQUE, P. C.; FRIES, D. D. Isoflavone and protein content in soybeans grains submitted to flooding at different stages of development. **Ciência Rural**, 41(12), 2011.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. Acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, 19(4), 485–494, 2002.

FERNANDES, L. P.; CANDIDO, R. C.; OLIVEIRA, W. P. Food and Bioproducts Processing Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food and Bioproducts Processing**, 90(3), 425–432, 2012.

FURLAN, E. F.; OETTERER, M. Hidrolizado proteico de pescado. **Revista de Ciência Tecnologia**, 10, 79–89, 2002.

FURUTA, T.; HAYASHY, H.; OHASHI, T. Some criteria of spray dryer design for food liquid. **Drying Technology**, 12(1&2), 151–177, 1994.

GABAS, A. L.; MENEGALLI, F. C.; TELIS-ROMERO, J. Water sorption enthalpy-entropy compensation based on isotherms of plum skin and pulp. **Journal of Food Science**, 65(4), 680–684, 2000.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, 40(9), 1107–1121, 2007.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 50, 219–224, 1999.

GÓES-FAVONI, S. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELEIA, A. Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. **Food Chemistry**, 119(4), 1605–1612, 2010.

HIJO, A. A. C. T.; COSTA, J. M. G.; SILVA, E. K.; AZEVEDO, V. M.; YOSHIDA, M. I.; BORGES, S. V. Physical and thermal properties of oregano (*Origanum vulgare* L.)

essential oil microparticles. **Journal of Food Process Engineering**, 38(1), 1–10, 2015.

HOYOS-LEYVA, J. D.; BELLO-PÉREZ, L. A.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; HUGO, S. Microencapsulation using starch as wall material : A review. **Food Reviews International**, 34(2), 148–161, 2018.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie**, 24(4), 289–297, 1991.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. **Drying Technology**, 26, 816–835, 2008.

JIN, D. X.; LIU, X. L.; ZHENG, X. Q.; WANG, X. J.; HE, J. F. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. **Food Chemistry**, 204, 427–436, 2016.

KAUZMANN, W. The nature of glassy state and the behavior of liquids at low temperatures. **Chemical Reviews**, 43(2), 219–256, 1948.

KHALLOUFI, S.; EL-MASLOUHI, Y.; RATTI, C. Mathematical model for prediction of glass transition temperature of fruit powders. **Journal of Food Science**, 65(5), 842–848, 2000.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Effect of maltodextrin and gum arabic on water sorption and glass transition temperature of spray dried chicken meat hydrolysate protein. **Journal of Food Engineering**, 91(2), 287–296, 2009.

LABUZA, T. P.; SCHMIDL, M. K. Accelerated shelf-life testing of foods. **Food Technology**, 39(9), 57–62, 1985.

LACOU, L.; LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V. Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products. **Food Hydrocolloids**, 57, 187–199, 2016.

LEWICKI, P. P. The applicability of the GAB model to food water sorption isotherms. **International Journal of Food Science and Technology**, 32(6), 553–557, 1997.

LOMAURO, C. J.; BAKSHI, A. S.; LABUZA, T. P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part 1: Fruit, vegetable and meat products. **Journal of Agricultural-Food Chemistry**, 18(2), 11–117, 1985.

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

MAGAÑA, M. D.; SEGURA-CAMPOS, M.; DÁVILA-ORTIZ, G.; BETANCUR-ANCONA, D.; CHEL-GUERRERO, L. ACE-I inhibitory properties of hydrolysates from germinated and ungerminated *Phaseolus lunatus* proteins. **Food Science and Technology (Campinas)**, 35(1), 167–174, 2015.

MALAYPALLY, S. P.; ISMAIL, B. Effect of protein content and denaturation on the extractability and stability of isoflavones in different soy systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(16), 8958–8965, 2010.

MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean composition. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, 91(3), 363–384, 2014.

MERZ, M.; EISELE, T.; BERENDS, P.; APPEL, D.; RABE, S.; BLANK, I.; FISCHER, L. Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63(23), 5682–5693, 2015.

MESSINA, M.; BADGER, T. M. Health effects of isoflavones misrepresented. **Food Chemistry**, 225, 289–292, 2017.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation : A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, 42, 469–479, 2013.

Niamnuy, C.; Nachaisin, M.; Laohavanich, J.; Devahastin, S. Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions. **Food Chemistry**, 129(3), 899–906, 2011.

NIMALARATNE, C.; BANDARA, N.; WU, J. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. **Food Chemistry**, 188, 467–472, 2015.

O'HAGAN, P.; HASAPIDIS, K.; CODER, A.; HELSING, H.; POKRAJAC, G. Particle size analysis of food powders. In: Onwulata, C. (Ed.). **Encapsulated and powdered foods**, chapter 9. (Taylor & F). Boca Raton, USA, 2005.

OLIVEIRA, M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S.; CAMPOS-FILHO, P. J.; VICENTINI, M. B. Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/ cultivares de soja (Glycine Max (L) Merrill) especiais utilizados para alimentação humana. **Brazilian Journal of Food Technology**, 13, 23–29, 2010.

PAZINATTO, C.; MALTA, L. G.; PASTORE, G. M.; NETTO, F. M. Antioxidant capacity of amaranth products : effects of thermal and enzymatic treatments. **Food Science and Technology**, 33(3), 485–493, 2013.

PEÑAS, E.; GOMEZ, R.; FRIAS, J.; BAEZA, M. L.; VIDAL-VALVERDE, C. High hydrostatic pressure effects on immunoreactivity and nutritional quality of soybean products. **Food Chemistry**, 125(2), 423–429, 2011.

PERUSSELLO, C. A. **Estudo dos parâmetros de processo e modelagem numérica da secagem do resíduo sólido da produção do extrato hidrossolúvel de soja (okara)**. Curitiba: Biblioteca PUCPR, 2008. Disponível em: [http:// Acesso em: 16 jul. 2014](http://Acesso em: 16 jul. 2014). Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC. Disponível em: www.biblioteca.pucpr.br/tede//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=1176

PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63(7), 1035–1042, 2000.

RANAMUKHAARACHCHI, S.; MEISSNER, L.; MORESOLI, C. Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, 429, 81–87, 2013.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, 16(1195–1236), 1998.

RÉ, M. I. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. **Drying Technology**, 24, 433–446, 2006.

REINECCIUS, G. A. The Spray Drying of Food Flavors. **Drying Technology**, 22(6), 1289–1324, 2004.

RIAZ, M. N. **Soy applications in food**. Boca Raton, EUA: CRC Press, 2006.

RIZVI, S. S. H. Thermodynamic properties of foods in dehydration. In: Rao, M.A., RIZVI, S.S.H. **Engineering Properties of Foods**. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 1995

RIZZELLO, C. G.; TAGLIAZUCCHI, D.; BABINI, E.; SEFORA RUTELLA, G.; TANEYO SAA, D. L.; GIANOTTI, A. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, 27, 549–569, 2016.

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

RODRIGUES, R. B.; LICHTENTHÄLER, R.; ZIMMERMANN, B. F.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total Oxidant Scavenging Capacity of Euterpe oleracea Mart . (Açai) Seeds and Identification of Their Polyphenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 4162–4167, 2006.

RODRIGUEZ-DÍAZ, J. C.; KUROZAWA, L. E.; NETTO, F. M.; HUBINGER, M. D. Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Blue Shark Skin. **Journal of Food Science**, 76(7), 938–949, 2011.

ROOS, Y. Glass transition – related physicochemical changes in foods. **Food Technology**, 49(10), 97–102, 1995.

ROOS, Y.; KAREL, M. Applying state diagrams to food processing and development. **Food Technology**, 45(12), 66–71, 1991.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, 50, 1–16, 2013.

SALDIVAR, X.; WANG, Y.; CHEN, P.; HOU, A. Changes in chemical composition during soybean seed development. **Food Chemistry**, 124(4), 1369–1375, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, 8(3), 121–137, 2002.

SARABANDI, K.; SADEGHI, A.; HAMISHEKAR, H. Microencapsulation of casein hydrolysates : Physicochemical , antioxidant and microstructure properties. **Journal of Food Engineering**, 237, 86–95, 2018.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, 31(10), 1949–1956, 2010.

SBROGGIO, M. F.; MONTILHA, M. S.; FIGUEIREDO, V. R. G.; GEORGETTI, S. R.; KUROZAWA, L. E. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology (Campinas)**, 36(2), 375–381, 2016.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, 2009.

SEIBEL, N. F. **Soja: cultivo, benefícios e processamento**. (CRV). Curitiba, PR, 2018.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: Propriedades – degradações – modificações** (Varela). São Paulo, 1996.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 33(6), 501–547, 1993.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, 33(7), 1541–1548, 2010.

SILVA, O. G.; TAKIZAWA, F. F.; PEDROSO, R. A.; FRANCO, C. M. L.; LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. S.; DEMIATE, I. M. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26(1), 188–197, 2006.

SIRIPATRAWAN, U.; JANTAWAT, P. Determination of moisture sorption isotherms of jasmine rice crackers using BET and GAB models. **Food Science and**

Technology International, 6(12), 459–465, 2006.

SOUZA, A. L. R.; HIDALGO-CHÁVEZ, D. W.; PONTES, S. M.; GOMES, F. S.; CABRAL, L. M. C.; TONON, R. V. Microencapsulation by spray drying of a lycopene-rich tomato concentrate : Characterization and stability. **LWT - Food Science and Technology**, 91, 286–292, 2018.

SPERLING, L. H. **Introduction to physical polymer science**. New York: Wiley-Interscience, 1992.

SUAREZ, F. L.; SPRINGFIELD, J.; FURNE, J. K.; LOHRMANN, T. T.; KERR, P. S.; LEVITT, M. D. Beans Naturally Low in Oligosaccharides 1 – 3. **American Journal of Clinical Nutrition**, 69, 135–139, 1999.

SUBTIL, S. F.; ROCHA-SELMÍ, G.; THOMAZINI, M.; TRINDADE, M.; NETTO, F. M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Effect of spray drying on the sensory and physical properties of hydrolysed casein using gum arabic as the carrier. **Journal Food Science Technonology**, 51(9), 2014–2021, 2014.

TANIGUCHI, M.; KAMEDA, M.; NAMAÉ, T.; OCHIAI, A.; SAITOH, E.; TANAKA, T. Identification and characterization of multifunctional cationic peptides derived from peptic hydrolysates of rice bran protein. **Journal of Functional Foods**, 34, 287–296, 2017.

THIES, C. Microencapsulation: what it is and purpose. In: VILSTRUP, P. Microencapsulation of food ingredients. **Surrey, Leatherhead Publishing**, 1–30, 2001.

TREYBAL, R. E. **Mass transfer operations**. (A. McGraw-Hill, Ed.), 1981.

VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; MARTÍNEZ, J. A. Content and Profile of Isoflavones in Soy-Based Foods as a Function of the Production Process. **Food and Bioprocess Technology**, 4(1), 27–38, 2011.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42, 1666–1673, 1994.

WANG, X.; LI, X.; CHEN, L.; XIE, F.; YU, L.; LI, B. Preparation and characterisation

of octenyl succinate starch as a delivery carrier for bioactive food components. **Food Chemistry**, 126(3), 1218–1225, 2011.

WHITE, G. W.; CAKEBREAD, S. H. The glassy state in certain sugar-containing food products. **Journal of Food Technology**, 1(1), 73–82, 1966.

WOLF, W.; SPIESS, W. E. L.; JUNG, G. **Sorption isotherms and water activity of food material**. (E. S. New York, Ed.), 1985.

WONG, J. M. W.; SOUZA, R.; KENDALL, C. W. C.; EMAM, A.; JENKINS, D. J. A. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 40, 235–243.

ZHANG, X. W.; LIU, X.; GU, D. X.; ZHOU, W.; WANG, R. L.; LIU, P. Desorption isotherms of some vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 70(3), 303–306, 1996.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este item **4 MATERIAL E METODOS** foi contemplado com a redação de três artigos científicos abaixo relacionados e serão apresentados nesta Tese no item **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**.

ARTIGO CIENTÍFICO 1: JUSTUS, A.; PEREIRA, D.; IDA E. I.; KUROZAWA L. E. Combined uses of an endo- and exopeptidase in okara improve the hydrolysates via formation of aglycone isoflavones and antioxidant capacity. Submetido para a revista científica LWT- Food Science and Technology.

ARTIGO CIENTÍFICO 2: JUSTUS, A.; IDA, E. I., KUROZAWA, L. E. Microencapsulation of okara protein hydrolysate by spray drying: physicochemical and nutritive properties, sorption isotherm and glass transition temperature. O artigo será submetido para a revista científica LWT- Food Science and Technology.

ARTIGO CIENTÍFICO 3: JUSTUS, A.; BENASSI, M. T.; IDA, E. I.; KUROZAWA, L.E. Estabilidade física e físico-química de hidrolisados proteicos de okara microencapsulados por spray drying. Submetido para a revista científica Brazilian Journal of Food Technology.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO** foi contemplado com a redação de três artigos científicos abaixo relacionados e serão apresentados nesta Tese conforme seguem.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1: JUSTUS, A.; PEREIRA, D.; IDA E. I.; KUROZAWA L. E. Combined uses of an endo- and exopeptidase in okara improve the hydrolysates via formation of aglycone isoflavones and antioxidant capacity. Submetido para a revista científica LWT- Food Science and Technology.

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2: JUSTUS, A.; IDA, E. I, KUROZAWA, L. E. Microencapsulation of okara protein hydrolysate by spray drying: physicochemical and nutritive properties, sorption isotherm and glass transition temperature. O artigo será submetido para a revista científica LWT- Food Science and Technology.

5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3: JUSTUS, A.; BENASSI, M. T; IDA, E. I.; KUROZAWA, L.E. Estabilidade física e físico-química de hidrolisados proteicos de okara microencapsulados por spray drying. Submetido para a revista científica Brazilian Journal of Food Technology.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

COMBINED USES OF AN ENDO- AND EXOPEPTIDASE IN OKARA IMPROVE THE HYDROLYSATES VIA FORMATION OF AGLYCONES ISOFLAVONES AND ANTIOXIDANT CAPACITY

Ariana Justus¹, Dafne Garcia Pereira¹, Elza Iouko Ida¹, Louise Emy Kurozawa^{1,2*}

¹Department of Food Science and Technology, State University of Londrina,

Londrina, PR 86057-970, Brazil

²Department of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP 13083-

862, Brazil

*Corresponding author:

Department of Food Engineering, University of Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80,
Campinas, SP 13083-862, Brazil. Phone number: +55 (19) 3521-4029. Email:
louisek@unicamp.br

ABSTRACT

The aim of the study was to apply Alcalase and Flavourzyme proteases and their combinations in okara to produce protein hydrolysates and obtain hydrolyzed protein with higher antioxidant capacity and content of isoflavone aglycones. Several Alcalase and Flavourzyme combinations were used. The hydrolysis process was evaluated by the degree of hydrolysis and recovery of proteins. Protein hydrolysates were characterized by antioxidant capacity measures, isoflavone content, the amino acid profile, and molecular weight. After the hydrolysis, the protein bands in the electrophoresis were less intense, more diffuse, and their molecular weight was below 14.4 kDa. Hydrolysis with Alcalase increased the antioxidant capacity from 36.0 to 202.1, 7.3 to 20.3, and 1.2 to 5.9 $\mu\text{mol Trolox/g}$ of solids and determined according to the ABTS, FRAP, and DPPH assays, respectively. Protein hydrolysates produced by Flavourzyme followed by addition of Alcalase had higher isoflavone aglycones content. The permeate fractions 3–10 kDa and >30 kDa of hydrolysates produced by Alcalase had higher antioxidant capacity than did the fraction <3 kDa. Therefore, it was possible to obtain protein hydrolysates of nutritional quality by applying different protease combinations to the coproduct generated by the soymilk industry.

KEYWORDS: soy pulp, antioxidant capacity, isoflavone profile, peptides, fractionation.

1 INTRODUCTION

Okara is a coproduct of soymilk processing that contains significant amount of protein (32 g/100 g solids), fibers (60 g/100 g solids) (Figueiredo, Yamashita, Vanzela, Ida, & Kurozawa, 2018), and isoflavones (0.02-0.12 g/100 g solids) (Jackson, Dini, Lavandier, Rupasinghe, Faulkner, Poysa, Buzzell, & DeGrandis, 2002). Despite the high nutritional quality of this material, it is little used for human consumption, being more commonly destined for animal feed or fertilizers. Also, okara has been discarded as industrial waste, which represents a problem for the industry (Sbroggio, Montilha, Figueiredo, Georgetti, & Kurozawa, 2016). The enzymatic hydrolysis of okara proteins could be a way to take advantage of this high-protein product.

Studies have shown that peptides, especially di- and tripeptides, from protein hydrolysis, have a higher nutritional value and a more efficient gastrointestinal absorption when compared to intact proteins and free amino acids (Bhaskar, Modi, Govindaraju, Radha, & Lalitha, 2007). In addition, enzymatic hydrolysis of proteins favors the release of bioactive peptides that are in their inactive state when are within of the intact protein. Bioactive peptides are specific protein fragments that have positive effects on physiological functions and on maintenance of human health (Chalamaiah, Yu, & Wu, 2018). These beneficial effects on health are attributed to amino acid sequences that may exert such activities as antioxidant and antimicrobial effects (Chalamaiah et al., 2018; Jin, Liu, Zheng, Wang, & He, 2016; Abu-Salem, Mahmoud, Gibriel, & Abou-Arab, 2013). Antioxidant abilities of protein hydrolysates depend on the type of protein and enzyme, the degree of hydrolysis (DH), substrate pretreatment, and amino acid composition (Pazinatto, Malta, Pastore, & Netto, 2013). Therefore, it is interesting to study the influence of these factors on the antioxidant

capacity of hydrolysates, to verify their potential as a substitute of synthetic antioxidants in food formulations.

There are several proteases used to obtain value-added bioactive peptides, such as Alcalase and Flavourzyme. Endopeptidase Alcalase has been widely used and has specific activity of 2.4 AU/g and hydrolyzes the internal regions of polypeptide chains, releasing peptides of low molecular weight (MW). Flavourzyme is a mixture of aminopeptidases, dipeptidyl peptidases, endopeptidases, and α -amylase. Aminopeptidases catalyze breakage of peptide bonds from the N-terminus of a protein, releasing amino acids, while dipeptidyl peptidases are a subclass of exopeptidases that release an N-terminal dipeptide from the protein. Thus, such enzymes may produce peptides of high MW (Merz et al., 2015). The combined use of proteases with different specificities and mechanisms of action can be applied as a valuable tool to improve the functional and biological properties of protein hydrolysates, resulting in peptides of different sizes and exposure of hydrophilic and hydrophobic groups (Castro & Sato, 2015).

Furthermore, an improvement in the conversion of the isoflavone conjugates into their aglycone forms was reported by Malaypally & Ismail (2010) when soybean proteins were hydrolyzed. According to these authors, owing to their phenolic nature, isoflavones are associated with the hydrophobic interior of the globular soybean proteins. Protein hydrolysis most likely disrupts protein-isoflavone interactions, exposing isoflavones to conversion. Soybean isoflavones have been the object of several researches due the associations with their biological activities, such as estrogenic and antioxidant activity, antitumor action, prevention of cardiovascular diseases and osteoporosis (Chen et al., 2012). Isoflavone has 12 forms, which possess differences in chemical structures and bioavailability. Aglycones are more

readily absorbed than the conjugated glycosides, because of their low MW, which facilitates diffusion and is related to better biological activity. The conjugated glycosides, however, need to be hydrolyzed prior to absorption (Villares, Rostagno, García-Lafuente, Guillamón, & Martínez, 2011) by action of endogenous β -glycosidases, heat, or acid/alkaline treatment (Niamnuy, Nachaisin, Laohavanich, & Devahastin, 2011).

The objective of this study was to use Alcalase and Flavourzyme proteases and their combinations in okara to produce protein hydrolysates with higher antioxidant capacity and greater content of aglycones isoflavones.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Material

Okara was donated by Cocamar Cooperativa Agroindustrial (Maringá, Brazil) and stored at $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alcalase 2.4L[®] and Flavourzyme 1000L[®] were purchased from Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Daidzin, genistin, glycitin, daidzein, genistein, glycitein, and p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetyldaidzin (6''-O-acetyldaidzin), acetylgenistin (6''-O-acetylgenistin), acetylglycitin (6''-O-acetylglycitin), malonyldaidzin (6''-O-malonyldaidzin), malonylgenistin (6''-O-malonylgenistin), and malonylglycitin (6''-O-malonylglycitin) were purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), the Folin–Ciocalteu reagent, and gallic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The MW profiles of the proteins were evaluated using the standard Precision Plus protein[™] All Blue

Standards and polypeptide standard (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). All the reagents used were of analytical grade or high-performance liquid chromatography (HPLC) grade.

2.2 Enzymatic Hydrolysis of Okara Protein

The enzymatic hydrolysis of okara protein was carried out in duplicate according to the pH-stat procedure and monitored by DH (Adler-Nissen, 1986). Five combinations of Alcalase (A) and Flavourzyme (F) were applied to okara protein hydrolysis (in order to obtain different protein hydrolysates) and were designated as (A), (F), (A+F), (A→F), and (F→A) (Table 1). The hydrolysis conditions of the enzymes were set up according to the manufacturer's information (Novozymes) and preliminary tests. For experiments 1, 2, and 3, the enzymes were added as soon as the desired hydrolysis conditions were reached. For hydrolysis catalyzed by two proteases sequentially (experiments 4 and 5), okara protein was initially hydrolyzed with one type of protease under appropriate reaction conditions. When no change in pH was observed, the reaction conditions were adjusted before the addition of the other protease. At the end of reactions, the enzymes were inactivated in a water bath with controlled temperature at 85 °C for 15 min, followed by cooling in an ice bath. The mixture was centrifuged at 5,228 × *g* (5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany) at 4 °C for 20 min. The supernatant containing the protein hydrolysate was stored at -22 °C and thawed according to the quantity required for protein and moisture content assays. For the other analyzes, the protein hydrolysates and okara were previously lyophilized (Labconco Lyph.Lock 1L) for approximately 36 h at -40 °C.

2.3 Evaluation of the Okara Protein Hydrolysis Process and Chemical Characteristics of Hydrolysates

The okara protein hydrolysis process was studied by means of reaction kinetic curves, protein recovery, and the electrophoretic profile of protein hydrolysates. The okara protein hydrolysate was evaluated by: reducing capacity by Folin-Ciocalteu (FC), different forms of isoflavones, antioxidant capacities, and the amino acid profile. The amino acid profile and fractions of the ultrafiltered hydrolysates was carried out in Alcalase hydrolysate. As a control measure of hydrolysis, these analyses were also performed on crude okara.

2.3.1 Electrophoresis of Protein Hydrolysates of Okara

Freeze-dried okara and a protein hydrolysate were suspended in a buffer solution containing 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 and 5% β -mercaptoethanol, to obtain protein concentrations of 0.4% and 2.0%, respectively, and heated at 95 °C for 4 min. The electrophoretic profiles of the intact protein were obtained using 4 – 20% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) containing Tris-HCl buffer (Laemmli, 1970). For protein hydrolysate, electrophoresis was carried out using 4 – 10% SDS-PAGE gels containing Tris-Tricin buffer (Schägger & Von Jagow, 1987). Electrophoresis was performed in a Mini-protein II system (Electrophoresis Power Supply Loccus Biotechnology). Molecular weight profiles were determined in comparison with protein and polypeptide standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.3.2 Protein Recovery in Hydrolysates (PRH)

The PRH was calculated as the ratio of mass of protein in the hydrolysate to the mass of protein in the original substrate. The protein content of okara and hydrolysates was determined by the Kjeldahl method (AOAC, 2012).

2.3.3 Determination of Reducing Capacity by Folin-Ciocalteu (FC)

The freeze-dried samples were placed in distilled water to prepare a 2% solution of protein, were shaken (Ika® ababer, Ika Works, Inc., Wilmington, USA) for 10 min at 25 °C, centrifuged at 794 × *g* and 4 °C for 15 min, and the aqueous extract was obtained (Pazzinato et al., 2013). The FC reductive capacity was determined according to the Folin–Ciocalteu colorimetric method (Kumazawa et al., 2002) which is usually used to estimate the total phenolic compounds content and calculated using a calibration curve of gallic acid (0.004–0.016 mg/mL). The results were expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE)/g of solids.

2.3.4 Quantification of Isoflavones by UPLC

Isoflavone extraction from freeze-dried samples was carried out in triplicate according to (Yoshiara, Madeira, Delarozza, da Silva, & Ida, 2012) using an extraction solution composed of water, ethanol and acetone (1:1:1, v/v/v) for 1 h at room temperature, and vortexing every 15 min. Isoflavones were separated and quantified by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) (Acquity UPLC® System, Waters, USA) (Handa, Couto, Vicensoti, Georgetti, & Ida, 2014). The column was a reversed-phase type (model Acquity-UPLC BEH C18, Waters, USA) with dimensions of 2.1 mm × 50 mm and a particle size of 1.7 μm. Aliquots of 1.4 μL of extract were automatically injected into the UPLC device. Elution was performed with a non-linear

gradient using mobile phase A, containing acidified water at pH 3.0 adjusted with glacial acetic acid, and mobile phase B, containing acetonitrile. The flow rate was 0.7 mL min⁻¹ at 35°C. The elution gradient used was as follow: 0 min, 90% eluent A and 10% eluent B; 8 min, 0% A and 100% B. The initial conditions returned in 9 min with a total run time of 10 min. The detector was a diode array (Waters) with a 260 nm wavelength. External calibration data were calculated from standard solutions (0.1–0.0005 mg/mL) for each isoflavone. Isoflavone content was expressed in µmol/100 g of solids.

2.3.5 Determination of Antioxidant Capacity

Freeze-dried hydrolysates were resuspended in distilled water to prepare a 2% sample solution of protein. Antioxidant capacity was evaluated by the ability to scavenge the ABTS free radical (Sánchez-González, Jiménez-Escrig & Saura-Calixto, 2005) and to donate hydrogen to the stable free radical DPPH (Casagrande et al., 2007), and ferric reduction antioxidant power (Benzie & Strain, 1996). All the assays were performed in triplicate, and the results were expressed in µmoles of Trolox equivalent (TE)/g of solids, using calibration curves of Trolox.

2.3.6 Identification and Determination of Amino Acid Composition

The amino acid composition was determined according to the Pico-Tag method (White et al., 1986; Hagen, Frost, & Augustin, 1989). Identification of amino acids was carried out by HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan), on a reversed-phase LUNA C18 column (Phenomenex, Torrance, USA) and compared to the standards. Tryptophan content was determined after enzymatic hydrolysis of samples by the enzyme Pronase, followed by colorimetric reaction with p-

dimethylaminobenzaldehyde and sulfuric acid for 6 h, and then with sodium nitrite. Transmittance was read at 590 nm using a spectrophotometer (700 Plus, FEMTO) (Bernardo & Sotelo, 1980). The amino acid content and tryptophan content were expressed in g/100 g of proteins.

2.3.7 Fractionation of the Alcalase Hydrolysate by Membrane Ultrafiltration

Fractionation of the Alcalase hydrolysate was performed in triplicate by centrifugal ultrafiltration with 30, 10, and 3 kDa MW cut-off membranes (Millipore Corporation Ultrafiltration Membranes, Billerica, USA). Approximately 15 mL of a sample was added to the Amicon® ultrafiltration device and centrifuged at $4,000 \times g$ at 4 °C for 40 min. Four fractions (MW <3 kDa, 3–10 kDa, 10–30 kDa, and >30 kDa) were obtained. All the fractions isolated from the respective hydrolysates were evaluated for antioxidant capacity.

2.4 Statistical Analysis

Amino acid content is presented as the means [(means \pm standard deviation (SD))] of two determinations ($n = 2$). For the comparison of means, the Student's *t* test was carried out ($p < 0.05$). For the other analyses ($n=3$), results were expressed as mean \pm SD and compared ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's tests. Correlations between the DH, isoflavone content, antioxidant capacity, and total phenolic content of okara and protein hydrolysates were determined by means of Pearson's correlation coefficient (*R*) at $p < 0.05$. Statistical analyses were conducted in the Statistica 7.0 software (Statsoft, Tulsa, USA).

3 Results and discussion

3.1 Characterization of okara

Okara chemical composition was determined according to the AOAC (2012) standards and found to be $78.1\% \pm 0.1\%$ of moisture, $6.8\% \pm 0.2\%$ of protein, $3.5\% \pm 0.1\%$ of fat, $1.0\% \pm 0.2\%$ of ash, and $11.4\% \pm 0.7\%$ of total fiber in which insoluble and soluble fiber were $10.9\% \pm 0.7\%$ and $0.5\% \pm 0.1\%$, respectively, all expressed as wet weight basis.

3.2 Evaluation of Hydrolysis of Okara Protein with Alcalase and Flavourzyme

Figure 1 shows typical kinetics of hydrolysis of okara protein using combinations of Alcalase and Flavourzyme. It was observed that at the beginning of the hydrolysis, the reaction rate was high with greater breakdown of peptide bonds and therefore a higher DH. After the hydrolysis reaction, a reduction in the rate of cleavage of protein was observed until a constant DH was reached. Alcalase conferred greater cleavage of peptide bonds than Flavourzyme, especially when this exopeptidase was applied alone in the hydrolysis process. Higher DH was expected for the combination Alcalase (A)→Flavourzyme (F) when compared with Alcalase, because Flavourzyme can effectively hydrolyze residual peptides resulting from Alcalase action (Jin et al., 2016). Nonetheless, there was no improvement in the DH when fresh Flavourzyme was added after 540 min of hydrolysis by Alcalase. For the combination Flavourzyme (F)→Alcalase (A), the DH was lower than that of the reverse order Alcalase (A)→Flavourzyme (F), indicating that Alcalase was not able to act efficiently after Flavourzyme action. Alcalase inhibition may have occurred due to the products generated during the hydrolysis by Flavourzyme. Moreover, the reaction conditions could have modified stability of the enzyme, causing its irreversible denaturation, and as a consequence, loss of activity (Damodaran, Parkin, &

Fennema, 2008). The treatment Alcalase (A) + Flavourzyme (F) resulted in the lowest DH value. An antagonistic interaction between the proteases could have occurred, resulting in a decrease of the DH, as compared to the hydrolysates of okara protein produced with individual enzymes. Isolation and identification of eight enzymes (three endopeptidases, two aminopeptidases, two dipeptidyl peptidases, and one amylase) from Flavourzyme was performed by Merz et al. (2015). Each of them requires optimal conditions and specific substrates to exert the maximum enzymatic activity. The complexity of factors and requirements, e.g., the effects of temperature, pH, substrate, and culture medium, make it difficult to identify the impact and synergism of these peptidases in the process of hydrolysis of okara protein. It is possible that one or more peptidases with greater sensitivity was affected by product inhibition, negatively influencing the enzymatic activity.

To verify the okara protein hydrolysis, electrophoretic profiles of okara and protein hydrolysates were obtained (Figure 2). In Figure 2(A), fractions of soybean proteins can be identified. Two high-intensity bands with MW of approximately 25 and 35 kDa correspond to the 11S fraction, basic and acidic subunits of glycinin, respectively. Other well-defined bands with MW of around 50 and 70 kDa may correspond to the β and α' subunits of the β -conglycinin fraction (fraction 7S) (Peñas, Gomez, Frias, Baeza, & Vidal-Valverde, 2011), in which the most abundant protein is β -conglycinin, representing ~30–35% of the total seed protein. Conglycinin, hemagglutinin, α -amylase, and lipoxygenase represent the smallest 7S fraction (Hou & Chang, 2004). Moreover, it could be seen a band with 20 kDa that may be related to trypsin inhibitor (Abu-Salem et al., 2013). Nevertheless, it was not identified in hydrolysates, except for treatment (F) (Figure 2(B)). This fact may be considered an

advantage of protein enzymatic hydrolysis because trypsin inhibitors are antinutritional factors that affect protein digestibility (Peñas et al., 2011).

According to Figure 2(B), the intensity of bands with MW above 15 kDa decreased for all hydrolysates, with appearance of a diffuse band with MW below 14.4 kDa. Abu-Salem et al. (2013) found that most of the 7S and 11S subunits are cleaved to peptides with a wide range of MW (6–44 kDa) and free amino acids. In the present study, degradation of the subunits of β -conglycinin and glycinin was also observed after hydrolysis of proteins in all treatments, revealing their effectiveness at protein cleavage. Peptides with lower MW are easily digestible and more easily absorbed than intact proteins, being available for a variety of physiological functions of the human body (Chalamaiah et al., 2018). On the other hand, peptides with higher MW have improvements in their functionality (Damodaran et al., 2008).

After a centrifugation step (Table 1), 37.6% to 62.5% of protein in the crude okara was recovered to the soluble fraction. A strong positive effect of the DH on PRH was observed by the Pearson's correlation coefficient of 0.85 (Table 2). When a great number of bonds are cleaved, greater dissolution of proteins in an aqueous medium could occur, resulting in higher PRH. Although Alcalase yielded the highest DH, only 49.5% of proteins were recovered in the hydrolysate, indicating that the protease acted mainly on the soluble peptide.

PRH was also favored when the proteases were used sequentially. Possibly, synergistic action of proteases could have improved the solubilization of proteins, increasing PRH, even though these enzymes combinations did not manifest a higher DH. Besides molecular size, solubility of peptides depends on the global hydrophobicity and peptide charge, which is not predictable in a mixture of peptides of different sizes and characteristics (Lacou, Léonil, & Gagnaire, 2016).

3.3 Effects of Okara Protein Hydrolysis on the Chemical Characteristics of Hydrolysates

After hydrolysis of okara protein, there was an increase in the reductive capacity of the Folin-Ciocalteu (FC) reagent up to 2.8-fold in the Flavourzyme (F)→Alcalase (A) treatment (Table 3). A positive correlation could be seen between the DH and FC (Table 2). Given that phenolic compounds may be associated with proteins (Pazinatto et al., 2013), protein hydrolysis improved the extraction of phenolic compounds from okara. In addition to the phenolic compounds, the reagent may have been reduced by other compounds such as sugars, proteins, peptides and amino acids released by protein hydrolysis. An expected positive relation between FC and antioxidant capacity was observed (Table 2) because such substances possess antioxidant capacity (Xu, Yuan, & Chang, 2007).

All protein hydrolysates had higher free-radical ABTS-scavenging capacity than the nonhydrolyzed sample (Table 3). The DH positively affected ABTS results (Table 2), as also reported by Jamdar et al. (2010). Extensive hydrolysis favors the exposure of antioxidant amino acids in proteins that are buried within the protein core, increasing antioxidant capacity (Elias, Kellerby, & Decker, 2008). On the other hand, this trend was not observed for DPPH radical-scavenging capacity, where there were significant differences only between samples hydrolyzed by Alcalase (A) or Alcalase (A)→Flavourzyme (F) and the control sample ($p \leq 0.05$; Table 3).

All samples showed lower DPPH radical-scavenging capacity in comparison with the ABTS assay (Table 3) probably because of different mechanisms involved in such methods, which are associated with the structure of the peptide, amino acid composition, and its hydrophobicity. Thus, to explore the possible correlation between antioxidant capacity and amino acids, amino acid composition was

evaluated in crude okara and the hydrolysate generated by Alcalase (Table 4), which had higher antioxidant capacity. Higher capacity for elimination of the ABTS⁺ radical than for the DPPH radical could be due to a higher concentration of hydrophilic amino acids in the hydrolysate and crude okara (Table 3). Although hydrophobic amino acids represent a significant proportion of total amino acids in both samples, lower antioxidant capacity was observed in the DPPH assay. According to Zhu, Jie, Tang, & Xiong, (2008), extensive hydrolysis leads to the formation of short peptides (tri- and dipeptides) and free amino acids, which become more hydrophilic and more accessible to the ABTS radical, which is soluble in water. Chen, Muramoto, Yamauchi, Fujimoto and Nokihara (1998) confirmed that soybean peptides cannot interact properly with hydrophobic peroxy radicals, such as DPPH, owing to the hydrophilicity of peptides.

In addition to the higher exposure of antioxidant amino acids, the protein hydrolysate had a higher content of sulfur amino acids (methionine and cysteine) than in the okara (Table 4). Such amino acids possess high capacity to sequester free radicals by direct interaction with SH group of cysteine (Sarmadi & Ismail, 2010).

The DH had a positive influence on the ferric reduction capacity (Table 2), where protein hydrolysates generated by Alcalase (A), Alcalase (A)→Flavourzyme (F), and Flavourzyme (F)→Alcalase (A) had higher values than did the other samples (Table 3). According to Carrasco-Castilla et al. (2012), reducing power is a result of the presence of peptides that are electron donors and that can react with free radicals, thus terminating a free-radical chain reaction. Reducing power has been attributed to Tyr, Met, Cys, His, Lys, and Trp residues. The amount of these amino acid residues in hydrolysates was relatively low, 15.75 g/100 g of protein explaining lower FRAP values when compared with ABTS values.

Acetylglucoside, malonylglucoside and aglycone glycitein were not detected by the UPLC device in all samples (Table 3). The absence of malonylglucoside in okara may be due to its conversion to β -glycosides by de-esterification reaction during the heat treatment of soymilk processing (Chien, Hsieh, Kao, & Chen, 2005). Okara protein hydrolysis caused significant changes in the content of isoflavones and isoflavone forms (Table 3). Endogenous β -glycosidase was probably responsible for these changes in the isoflavone forms in hydrolysates because it catalyzes the hydrolysis of β -glycosidic isoflavones in their corresponding aglycones (Wang & Murphy, 1994), thereby increasing biological activity (Izumi et al., 2000). The action of β -glycosidase should have been favored by the exposure of β -glycosides after partial denaturation of the soybean globular proteins caused by thermal (Lima & Ida, 2014) and protease treatments.

Although the Flavourzyme (F)→Alcalase (A) treatment gave a lower DH than the other treatments did, greater conversion of β -glycosidic isoflavones to aglycones was observed. β -glycosidase activity could be increased when protein hydrolysis was started by Flavourzyme at 40 °C and followed by Alcalase at 50 °C. Higher conversion of β -glycosides to aglycones occurs at the optimal temperature for β -glucosidase action, 50–55 °C (Lima & Ida, 2014). In the current study, the protein hydrolysis by Alcalase was carried out at 50 °C; however, the hydrolysate presented lower aglycone content. Probably, this finding could be due to the long hydrolysis period, leading to the predominance of the isoflavone degradation reaction over interconversion to aglycones.

Besides being related to bioactive peptides and phenolic compounds, greater antioxidant capacity verified for the Flavourzyme (F)→Alcalase (A) hydrolysate was also due to higher concentrations of aglycones daidzein and genistein (Table 3).

Ruiz-Larrea et al. (1997) reported that antioxidant capacity of isoflavones follows the order genistein > daidzein > genistin > daidzin, which is associated with the number of free hydroxyls on ring A. Because β -glycosides undergo O-glycosylation at position 7 of ring A, it results in a decrease in antioxidant capacity. On the other hand, Alcalase (A) treatment yielded the highest antioxidant capacity and genistin content, despite lower total aglycone content relative to the other hydrolysates.

3.4 Fractions of the Alcalase Hydrolysate and Associations with Antioxidant Capacity

The hydrolysate generated by Alcalase was subjected to the fractionation process because it had higher antioxidant capacity by methods ABTS, FRAP and DPPH. With the exception of the ABTS and FRAP assays, the nonfractionated hydrolysate had antioxidant capacity superior or similar to that of the fractionated samples. The fractions MW 3–10 and > 30 kDa presented higher ABTS capacity than did the nonfractionated sample (Table 5). Phongthai, D'Amico, Schoenlechner, Homthawornchoo, & Rawdkuen, (2018) reported that the fractionated rice bran hydrolysates had more capacity to scavenge the ABTS radicals than the nonfractionated sample. Among the fractionated okara hydrolysates, no significant improvement difference in the iron reduction capacity was observed with exception for fraction 3–10 kDa. On the other hand, it was observed that the nonfractionated sample, composed of a mixture of peptides with different MWs, afforded similar DPPH values than each fractionated sample did. Thus, in this case, the fractionation process did not promote the increase in antioxidant capacity.

Even though several works suggested that smaller peptides have greater antioxidant capacity, some authors observed a negative effect of fractionation of

peptides on these results [Aguilar, Granato Cason, & Castro, (2018), Phongthai et al., (2018), Kumar, Chatli, Singh, Mehta, & Kumar, (2016), Girgih et al., (2015)]. These observations may be related to several factors, among them the content of peptides with different characteristics, such as MW, size, sequence, and amino acid composition as well as the structural functionality of the constituent peptides; the higher concentration of peptides in whole hydrolysates in comparison with fractions may have synergistic effects on the elimination of free radicals (Phongthai et al., 2018; Kumar et al., 2016; Sarmadi & Ismail, 2010).

4 CONCLUSION

The enzymatic hydrolysis of okara proteins by Alcalase was more efficient than that by Flavourzyme and resulted in a hydrolysate with higher antioxidant capacity. Okara protein hydrolysates contained higher concentrations of isoflavone genistein and sulfur amino acids methionine and cysteine than crude okara. Such compounds gave the hydrolysate greater capacity for elimination of free radicals and greater reducing power. Fractions of protein hydrolysates had a positive effect only on the ferric reduction capacity and ABTS radical-scavenging ability. The study indicates that it is possible to add value to okara, a coproduct obtained from soymilk processing, by generating peptides with higher antioxidant capacity, good-quality essential amino acids, and an excellent profile and availability of isoflavone aglycones (daidzein and genistein) and β -glycosidic isoflavones (daidzin, glycitin and genistin).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors are grateful to the Araucaria Foundation of Paraná (160/2014) and CNPq (473117/2013-4) for financial support. LEK was an Araucaria Foundation research fellow (501/2014). EII and LEK are CNPq research fellows.

REFERENCES

- Abu-salem, F. M., Mahmoud, M. H., Gibriel, A. Y., & Abou-arab, A. (2013). Characterization of Antioxidant Peptides of Soybean Protein Hydrolysate. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 79(7), 249–253.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food protein*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Aguilar, J. G. dos S., Granato Cason, V., & de Castro, R. J. S. (2018). Improving antioxidant activity of black bean protein by hydrolysis with protease combinations. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(9), 1–8.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. (2012). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington: AOAC.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Bernardo, L., & Sotelo, A. (1980). Effect of different alkalies , temperature , and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. *Analytical Biochemistry*, 197(1), 192–197.
- Bhaskar, N., Modi, V. K., Govindaraju, K., Radha, C., & Lalitha, R. G. (2007).

- Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology*, 98, 388–394.
- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Jacinto-Hernández, C., Alaiz, M., Girón-Calle, J., ... Dávila-Ortiz, G. (2012). Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 135(3), 1789–1795.
- Casagrande, R., Georgetti, S. R., Verri, W. A., Borin, M. F., Lopez, R. F. V, & Fonseca, M. J. V. (2007). In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 328(2), 183–190.
- Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Synergistic actions of proteolytic enzymes for production of soy protein hydrolysates with antioxidant activities: An approach based on enzymes specificities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 694–702.
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020–3038.
- Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, 245, 205–222.
- Chen, H., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49–53.

- Chen, K. I., Erh, M. H., Su, N. W., Liu, W. H., Chou, C. C., & Cheng, K. C. (2012). Soyfoods and soybean products: From traditional use to modern applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *96*(1), 9–22.
- Chien, J. T., Hsieh, H. C., Kao, T. H., & Chen, B. H. (2005). Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chemistry*, *91*(3), 425–434.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food chemistry*. (C. Pres, Ed.) (4th ed.). Boca Baton, FL, USA.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *48*(5), 430–441.
- Figueiredo, V. R. G., Yamashita, F., Vanzela, A. L. L., Ida, E. I., & Kurozawa, L. E. (2018). Action of multi-enzyme complex on protein extraction to obtain a protein concentrate from okara. *Journal of Food Science and Technology*, *55*(4), 1508–1517.
- Georgetti, S. R., Casagrande, R., Verri, W. A., Lopez, R. F. V., & Fonseca, M. J. V. (2008). Evaluation of in vivo efficacy of topical formulations containing soybean extract. *International Journal of Pharmaceutics*, *352*(1–2), 189–196.
- Girgih, A. T., He, R., Hasan, F. M., Udenigwe, C. C., Gill, T. A., & Aluko, R. E. (2015). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chemistry*, *173*, 652–659.
- Góes-Favoni, S. P., Carrão-Panizzi, M. C., & Beleia, A. (2010). Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. *Food Chemistry*, *119*(4), 1605–1612.
- Hagen, S. R., Frost, B. & Augustin, J. (1989). (1989). Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in

- food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, 72(6), 912–916.
- Handa, C. L., Couto, U. R., Vicensoti, A. H., Georgetti, S. R., & Ida, E. I. (2014). Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce b-glucosidase for bioconversion into aglycones. *Food Chemistry*, 152, 56–65.
- Hou, H. J., & Chang, K. C. (2004). Structural characteristics of purified beta-conglycinin from soybeans stored under four conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7931–7937.
- Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., ... Kikuchi, M. (2000). Human Nutrition and Metabolism Soy Isoflavone Aglycones Are Absorbed Faster and in Higher Amounts than Their Glucosides in Humans. *J. Nutr*, 130, 1695–1699.
- Jackson, C.-J. C., Dini, J.P.; Lavandier, C., Rupasinghe, H. P. V., Faulkner, H.; Poysa, V., & Buzzell, D.; DeGrandis, S. (2002). Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochemistry*, 37(10), 1117–1123.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178–184.
- Jin, D. X., Liu, X. L., Zheng, X. Q., Wang, X. J., & He, J. F. (2016). Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 204, 427–436.
- Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., & Kumar, P. (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research*, 139, 20–25.

- Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M. S., & Nakayama, T. (2002). Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(2), 373–377.
- Lacou, L., Léonil, J., & Gagnaire, V. (2016). Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products. *Food Hydrocolloids*, *57*, 187–199.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 685–9.
- Lima, F. S., & Ida, E. I. (2014). Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. *LWT - Food Science and Technology*, *56*, 232–239.
- Malaypally, S. P., & Ismail, B. (2010). Effect of protein content and denaturation on the extractability and stability of isoflavones in different soy systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(16), 8958–8965.
- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., ... Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(23), 5682–5693.
- Niamnuy, C., Nachaisin, M., Laohavanich, J., & Devahastin, S. (2011). Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions. *Food Chemistry*, *129*(3), 899–906.
- Pazinatto, C., Malta, L. G., Pastore, G. M., & Netto, F. M. (2013). Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology*, *33*(3), 485–493.
- Peñas, E., Gomez, R., Frias, J., Baeza, M. L., & Vidal-Valverde, C. (2011). High

- hydrostatic pressure effects on immunoreactivity and nutritional quality of soybean products. *Food Chemistry*, 125(2), 423–429.
- Phongthai, S., D'Amico, S., Schoenlechner, R., Homthawornchoo, W., & Rawdkuen, S. (2018). Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 240, 156–164.
- Ruiz-Larrea, M. B., Mohan, A. R., Paganga, G., Miller, N. J., Bolwell, G. P., & A., C. (1997). Antioxidant Activity of Phytoestrogenic Isoflavones. *Free Radical Research*, 26(1), 63–70.
- Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90(1–2), 133–139.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956.
- Sbroggio, M. F., Montilha, M. S., Figueiredo, V. R. G. de, Georgetti, S. R., & Kurozawa, L. E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36(2), 375–381.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379.
- Spies, J. R. (1967). Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry*, 39(12), 1412–1416.
- Villares, A., Rostagno, M. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Martínez, J. A. (2011). Content and Profile of Isoflavones in Soy-Based Foods as a Function of

- the Production Process. *Food and Bioprocess Technology*, 4(1), 27–38.
- Wang, H., & Murphy, P. A. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1666–1673.
- White, J. A., Fry, J. C., & Hart, R. J. (1986). An Evaluation of the Waters Pico Tag System for the Amino Acid Analysis of Food Materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 8(4), 170–177.
- Xu, B. J., Yuan, S. H., & Chang, S. K. C. (2007). Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science*, 72(2), 167–177.
- Yoshiara, L. Y., Madeira, T. B., Delaroza, F., da Silva, J. B., & Ida, E. I. (2012). Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(December), 978–986.
- Zhu, L., Jie, C., Tang, X., & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

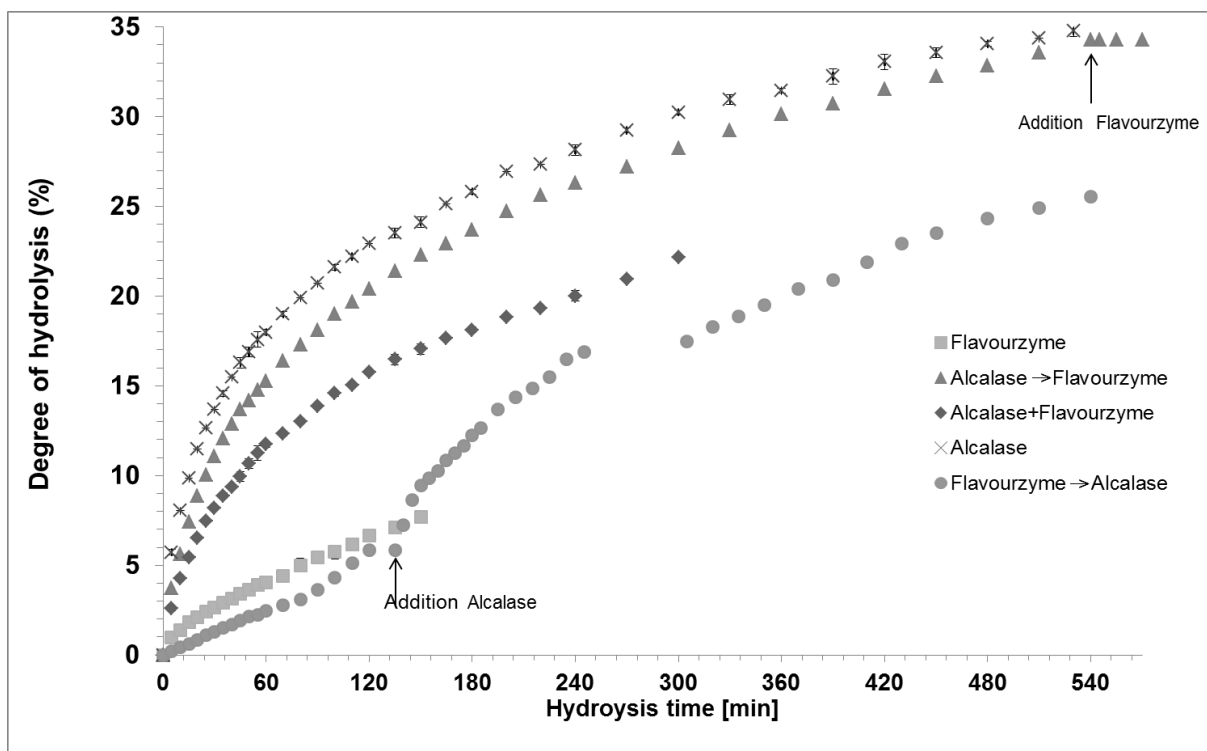


Figure 1. Kinetics of enzymatic hydrolysis of okara protein by several Alcalase and Flavourzyme combinations.

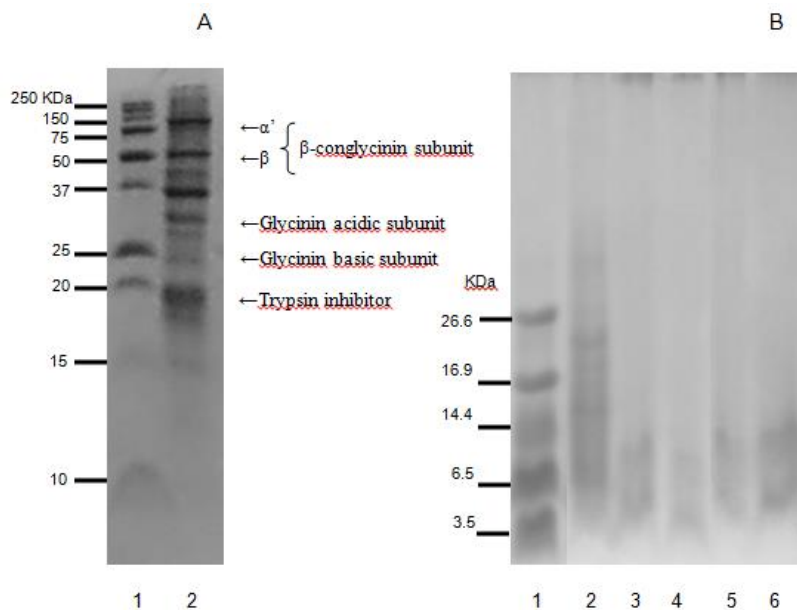


Figure 2. Polyacrylamide gel electrophoresis: A) Tris-HCl buffer. Lane 1: High-MW protein marker. Lane 2: Okara (control); B) SDS-Tris-Tricin buffer. Lane 1: Low-MW protein marker. Protein hydrolysates were generated by Flavourzyme (DH 7.7%, Lane 2), Alcalase (DH 34.8%, Lane 3), a blend of 50% Alcalase and 50% Flavourzyme (DH 22.1%, Lane 4), Alcalase followed by addition of Flavourzyme (DH 34.3%, Lane 5), and Flavourzyme followed by addition of Alcalase (DH 25.5%, Lane 6). Tentative identification of known protein bands (Peñas et al., 2011) is indicated.

Table 1. Hydrolysis conditions used for preparation of okara protein hydrolysates and protein content in hydrolysates and protein recovery

Experiments	Enzymatic treatment	Temperature (°C)	pH	Enzyme:substrate ratio (g/100g protein)		Protein content (g/100g solids)	Protein recovery (g/100 g protein crude okara)
					AU or LAPU/g		
1	(A)	50	9.0	5.0 (A)	0.12 AU/g	50.8 ± 0.1 ^{ab}	49.5 ± 0.5 ^b
2	(F)	40	7.0	5.0 (F)	50 LAPU/g	47.6 ± 0.3 ^c	37.6 ± 1.2 ^c
3	(A)+(F)	45	8.0	2.5 (A)	0.06 AU/g	52.1 ± 0.1 ^a	47.7 ± 3.1 ^b
				2.5 (F)	25 LAPU/g		
4	(A)→(F)	50	9.0	2.5 (A)	0.06 AU/g	49.8 ± 0.4 ^b	58.0 ± 2.9 ^a
		40	7.0	2.5 (F)	25 LAPU/g		
5	(F)→(A)	40	7.0	2.5 (F)	25 LAPU/g	52.4 ± 0.9 ^a	62.5 ± 1.3 ^a
		50	9.0	2.5 (A)	0.06 AU/g		

(A) Alcalase; (F) Flavourzyme; (A)+(F) Alcalase and Flavourzyme blend; (A)→(F) Alcalase followed by addition of Flavourzyme; (F)→(A) Flavourzyme followed by addition of Alcalase.

Results reported are means (n=3) ± standard deviation.

Values in the same column with different superscripts are significant different at $p < 0.05$.

Table 2. Pearson's correlation coefficients of various parameters

	FC	ABTS	FRAP	DPPH	GLU	AGLY	DH	PRH
FC	-	0.953*	0.924*	0.257	-0.189	0.272	0.754	0.920*
ABTS		-	0.977*	0.484	0.025	0.068	0.815*	0.957*
FRAP			-	0.536	-0.092	0.131	0.855*	0.983*
DPPH				-	0.229	-0.646	0.675	0.434
GLU					-	-0.627	-0.080	-0.081
AGLY						-	-0.161	0.219
DH							-	0.847*
PRH								-

FC = reducing capacity by Folin-Ciocalteu; ABTS = antioxidant capacity determined by the ABTS^{•+} assay; FRAP = ferric reducing antioxidant power; DPPH = antioxidant capacity determined by the DPPH[•] assay; GLU = β -glucoside isoflavones; AGLY = aglycone isoflavone; DH = degree of hydrolysis; PRH = Protein recovery in the hydrolysate.

*High linear and positive correlation ($p < 0.05$)

Table 3. Reducing capacity by Folin-Ciocalteu and isoflavone contents and antioxidant capacity of okara and proteins hydrolysates

Treatment	FC	ABTS	FRAP	DPPH	Daidzin	Daidzein	Glycitin	Genistin	Genistein	Total Isoflavones
	(mg GAE/ g solid)	(μmol TE/g solid)			(μmol/100g solid)					
(A)	13.2 ± 0.1 ^c	202.1 ± 2.7 ^{ab}	20.3 ± 1.3 ^{ab}	5.9 ± 0.9 ^a	14.5 ± 0.1 ^{bc}	nd ^c	nd ^d	45.9 ± 0.5 ^a	9.8 ± 0.2 ^d	70.2 ± 0.8 ^c
(F)	10.4 ± 0.1 ^e	166.0 ± 1.4 ^c	17.1 ± 0.7 ^c	3.6 ± 0.9 ^{ab}	15.4 ± 0.2 ^{bc}	1.5 ± 0.5 ^b	27.5 ± 0.2 ^a	31.8 ± 0.5 ^c	19.0 ± 0.4 ^a	95.5 ± 1.8 ^{ab}
(A)+(F)	13.6 ± 0.1 ^b	208.0 ± 2.1 ^a	18.2 ± 0.7 ^{bc}	2.5 ± 1.0 ^b	20.1 ± 0.6 ^a	nd ^c	20.7 ± 0.3 ^c	42.9 ± 1.6 ^{ab}	13.2 ± 0.9 ^c	96.6 ± 3.4 ^a
(A)→(F)	11.2 ± 0.3 ^d	196.8 ± 0.2 ^b	20.3 ± 1.0 ^{ab}	5.9 ± 1.5 ^a	16.1 ± 0.1 ^{bc}	nd ^c	26.9 ± 0.6 ^a	40.1 ± 2.4 ^{ab}	8.9 ± 0.4 ^d	92.1 ± 3.4 ^{ab}
(F)→(A)	14.4 ± 0.1 ^a	202.2 ± 5.0 ^{ab}	20.8 ± 1.0 ^a	1.3 ± 0.2 ^b	16.7 ± 2.0 ^b	20.4 ± 0.4 ^a	nd ^d	38.4 ± 2.4 ^b	20.0 ± 0.3 ^a	95.5 ± 5.1 ^{ab}
Okara (control)	5.20 ± 0.1 ^f	36.0 ± 2.6 ^d	7.3 ± 0.7 ^d	1.2 ± 0.1 ^b	13.3 ± 0.5 ^c	nd ^c	24.5 ± 1.2 ^b	32.0 ± 1.0 ^c	16.2 ± 0.6 ^b	86.1 ± 3.3 ^b

Results reported are means (n=3) ± standard deviation.

Values in the same column with different superscripts are significant different at p < 0.05.

GAE = gallic acid equivalents. TE = Trolox equivalents. FC = reducing capacity by Folin-Ciocalteu. DPPH = antioxidant activity determined by the DPPH[•] assay. ABTS = antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} assay. FRAP = ferric reducing antioxidant power

ND= not detected

Table 4. Amino acid composition of okara and protein hydrolysates obtained by Alcalase

Amino acids	Hydrolysate (g/100 g protein)	Okara
Non-essential		
ALA	4.58 ± 0.07 ^A	4.59 ± 0.04 ^A
ARG	7.63 ± 0.32 ^A	7.72 ± 0.42 ^A
ASP	11.64 ± 0.23 ^A	11.33 ± 0.47 ^A
GLU	17.57 ± 0.30 ^A	17.12 ± 0.42 ^A
GLY	4.51 ± 0.23 ^A	4.72 ± 0.22 ^A
PRO	5.03 ± 0.18 ^A	5.09 ± 0.18 ^A
SER	5.38 ± 0.03 ^B	5.61 ± 0.02 ^A
Essential		
HIS	2.82 ± 0.01 ^B	2.89 ± 0.00 ^A
ILE	4.68 ± 0.15 ^A	4.56 ± 0.22 ^A
LEU	8.18 ± 0.15 ^A	8.21 ± 0.18 ^A
LYS	6.36 ± 0.26 ^A	6.67 ± 0.27 ^A
MET + CYS	2.23 ± 0.16 ^A	1.98 ± 0.27 ^B
PHE + TYR	8.75 ± 0.17 ^A	8.71 ± 0.31 ^A
THR	4.09 ± 0.04 ^A	4.17 ± 0.16 ^A
TRP	0.64 ± 0.01 ^A	0.83 ± 0.07 ^A
VAL	5.06 ± 0.30 ^A	4.95 ± 0.24 ^A
Hydrophilic amino acid ¹	64.83	64.9
Hydrophobic amino acids ²	33.68	33.42

Different letters the same line are considered significantly different at $p < 0.05$

¹Hydrophilic amino acids = Asp, Glu, Lys, Arg, His, Gly, Ser, Thr, Tyr, Cys

²Hydrophobic amino acids = Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Val, Pro

Table 5. Antioxidant capacity and protein content of okara protein hydrolysates obtained by Alcalase for non-fractionated and fractionated samples by membrane ultrafiltration

Fractions	Antioxidant capacity [$\mu\text{mol TE/g protein}$]		
	ABTS	FRAP	DPPH
< 3 kDa	772±52 c	18.7±0.2 c	3.2±0.6 b
3 – 10 kDa	1089±3 a	26.3±0.1 a	5.9±0.4 a
10 – 30 kDa	959±40 b	23.1±0.2 b	5.9±0.4 a
> 30 kDa	1077±13 a	23.7±0.4 b	7.2±0.3 a
Nonfractionated	949±12 b	23.9±0.6 b	7.1±1.5 a

Results reported are means ($n=3$) ± standard deviation.

Values in the same column with different superscripts are significant different at $p < 0.05$.

GAE = gallic acid equivalents. TE = Trolox equivalents. DPPH = antioxidant activity determined by the DPPH[•] assay. ABTS = antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} assay. FRAP = ferric reducing antioxidant power

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

MICROENCAPSULATION OF OKARA PROTEIN HYDROLYSATE BY SPRAY DRYING: PHYSICOCHEMICAL AND NUTRITIVE PROPERTIES, SORPTION ISOTHERM AND GLASS TRANSITION TEMPERATURE

A. JUSTUS¹, E.I. IDA¹, L.E. KUROZAWA^{1,2,*}

¹ Department of Food Science and Technology, State University of Londrina,
Londrina, PR, Brazil

² Department of Food Engineering, School of Food Engineering, University of
Campinas, Campinas, SP, Brazil

*Corresponding author (Present address):

Department of Food Engineering, School of Food Engineering, University of
Campinas, Monteiro Lobato, 80, Campinas, SP, 13083-862, Brazil. Phone number:
+55 19 3521-4029. Email: louisek@unicamp.br

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate okara proteins hydrolysate microencapsulated by spray drying with respect to the physicochemical (water activity, bulk density, particle distribution and mean diameter, microstructure) and nutritive properties (sugar content and antioxidant capacity by FC reducing capacity, FRAP, and ABTS assays), sorption isotherm, and glass transition temperature. Maltodextrin 10 DE and modified starch were used as wall material. Freeze dried protein hydrolysate without addition of wall material was obtained as control sample. In general, there was no significant influence of the type of wall material on the properties of powders. However, significant differences were observed between spray dried and control samples. The encapsulation process preserved the antioxidant capacity. Moreover, due to low molecular weight sugars and peptides in protein hydrolysate, microencapsulation improved its storage critical values of relative humidity and moisture content.

KEYWORDS: microencapsulation; peptides, antioxidant properties; physicochemical properties; sorption isotherm; glass transition temperature.

1 INTRODUCTION

Soy milk consumption has been increasing worldwide, mainly in western countries, due to the vegan and healthy diet followers, reaching about 13.5 billion liters in 2015 (Statista, 2018). Nevertheless, as a consequence, a great amount of okara, a by-product from the soy milk and tofu processing, has been produced. Although it is a material with high protein content, it is little used for human consumption, being destined for feed or fertilizer or discarded, representing a significant problem of industrial waste. On average, 23% of the proteins present initially in the soybeans remain in the okara (Liu, 2008). One way to take advantage of okara is to obtain protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis of proteins.

Protein hydrolysates have several applications in the food industry. They have been used to modify the functional properties of foods (Lacou, Léonil, & Gagnaire, 2016) or as a source of bioactive peptides (Rizzello et al., 2016; Chalamaiah, Yu, Wu, 2018). Bioactive peptides are specific protein fragments that cause positive impacts on physiological functions, influencing the maintenance of human health. Such beneficial effects on health are attributed to numerous amino acid sequences, which have antioxidant, antimicrobial, immunomodulatory, anticancer, and antihypertensive properties (Rizzello et al., 2016; Chalamaiah, Yu, Wu, 2018).

According to Sarabandi, Sadeghi, & Hamishekar, (2018), despite the health-improving properties of protein, hydrolysis process entails the formation of bitter taste, being one of the limitations of the use of protein hydrolysates in food systems. Bitter taste is related to the release of small peptides composed mainly of hydrophobic amino acids (Clemente, Sanjuán, & Mulet, 2010).

Sarabandi et al., (2018) and Subtil et al., (2014) have microencapsulated peptides to minimize this undesirable factor. Microencapsulation is a technique that

involves the entrapment of an active agent (core material) in a protective envelope (wall material) (Gharsallaoui et al., 2007). One of the techniques used to microencapsulate food is by spray drying. Depending on the type of active agent, proteins or carbohydrates may be used as wall materials. Maltodextrin and modified starches are often used as wall materials (Costa et al., 2015) due to their capacity to form a continuous film necessary to protect the core material. They offer advantages such as relatively low cost, neutral aroma and taste, high solubility, low viscosity at high solids concentrations. They are materials frequently used for the spray drying of sensitive and bioactive compounds (Sarabandi et al., 2018). The modified starch Capsul® (trade name) is a waxy maize starch enzymatically modified by the addition of the lipophilic component (octanyl succinate) to the starch molecules. As a result, this derivative has increased the capacity and stability of the emulsions or suspensions (Costa et al., 2015). It has been used to retain and encapsulate microorganisms, pigments, proteins, flavors, and other compounds (Hoyos-Leyva et al., 2018). The use of different wall materials may affect some chemical and physical properties of microparticles, such as particle size and microstructure, density and porosity of particulate system, particle size, moisture content, and bioactive compound retention. Thus the knowledge of these properties is essential to optimize processes, improve functionality and reduce costs (Barbosa-Cánovas & Juliano, 2005).

Another drawback of protein hydrolysis is the release of low molecular weight (LMW) peptides that causes the reduction of glass transition temperature T_g . As consequence, the spray dried powders could present high hygroscopicity and become more susceptible to caking and chemical deterioration. Moreover, during hydrolysis process, LMW sugars in okara, such as glucose and sucrose, could be

lixiviated to protein hydrolysates. Since T_g increases with increasing molecular weight, the high molecular weight (HMW) wall material used to microencapsulate protein hydrolysate can improve the drying process by decreasing the adhesion of the product in the dryer chamber, and increase the powder stability under adverse environmental conditions (Roos & Karel, 1991).

Due to the non-equilibrium state of the amorphous structure produced by spray drying, powders can exhibit undesirable physicochemical changes during storage. If storage temperature is above the T_g , in which powder is in the rubbery state, it can suffer agglomeration, adhesion, collapse and crystallization (Bhandari & Roos, 2017). Moreover, in the rubbery state, molecular mobility of the matrix is high, which increase diffusion of compounds. As consequence, the deterioration reactions, such as enzymatic reactions, non-enzymatic darkening and oxidation, are accelerated (Roos, 1995). Therefore, T_g could be considered a reference parameter to indicate stability of food system. Since a slight increase in moisture content reduces T_g significantly, analysis of the data of the water sorption isotherm together with the T_g permit to predict the critical values of air relative humidity and moisture content at a certain temperature of dried samples (Roos, 1993).

The objective of this work was to evaluate the okara protein hydrolysate microencapsulated by spray drying with respect to the physicochemical (water activity, mean diameter and particle distribution, bulk density, and microstructure) and nutritive properties (sugar content and antioxidant capacity by reducing capacity by Folin-Ciocalteu (FC), ABTS, and FRAP methods), and determine the critical storage condition by sorption isotherm and glass transition temperature of the powders.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Material

Okara was collected at a local soybean processing company and stored at -22 °C. Alcalase 2.4L® was the protease used to obtain protein hydrolysate of okara. The wall materials used were maltodextrin 10DE and Capsul® modified starch (Ingredion, Mogi Guaçu, Brazil). Glucose, fructose, galactose, sucrose, raffinose, stachyose, 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), Folin–Ciocalteu reagent and gallic acid were purchased from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA. All reagents used were of analytical or HPLC grade.

2.2 Preparation of okara protein hydrolysate

Enzymatic hydrolysis of okara protein was conducted according to the pH-stat method (Adler-Nissen, 1986). The crude okara was dispersed in distilled water (1:4, w/w) and kept under agitation by magnetic stirrer during enzymatic reaction. The mixture was heated to 50 °C and the pH adjusted to 9.0 with 1M NaOH solution. The enzyme alcalase was then added at a concentration of 5 g/100 g protein. Enzymatic hydrolysis was monitored by continuous titration of 1M NaOH solution to maintain the pH constant. The reaction time was 8h 50 min. The total volume of NaOH was used to calculate the degree of hydrolysis of the protein hydrolysate (Adler-Nissen, 1986), which was 34.8%. The enzyme was inactivated by heating at 85 °C for 15 min, followed by cooling in an ice bath. The mixture was centrifuged at 5,228 × g (5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany) at 4 °C for 20 min to separate the precipitate from the protein hydrolysate. Protein hydrolysate presented a protein content of 1.40 ± 0.01% (wb), which was determined according to AOAC, (2012).

2.3 Microencapsulation by spray drying

The wall material (maltodextrin or modified starch) was dissolved in the protein hydrolysate at a concentration of 10% (g/100 g feed solution). The microencapsulation was carried out in a laboratory scale spray dryer (model SD-05, LabPlant, Chelmsford, England) with a two-fluid atomizer nozzle with a 0.7 mm diameter orifice. The process conditions were: inlet and outlet air temperature of 180 ± 5 °C and 100 ± 8 °C, respectively; feed and drying air flow rate of 420 mL/h and 73 m³/h, respectively; and compressed air pressure of 1.4 bar.

Microencapsulated protein hydrolysates were analyzed for: water activity, bulk density, particle size distribution, volume mean diameter D[4,3], microstructure, sorption isotherm, glass transition temperature, antioxidant capacity by FRAP, ABTS, and FC reducing capacity assays, and sugar content. Protein hydrolysate without wall material was lyophilized in about 36 h and at approximately -40 °C (Labconco, Lyph.Lock 1L) to be compared with the microencapsulated samples. The protein hydrolysates microencapsulated by spray drying were identified as abbreviations referring to wall material used, as follows: MD is maltodextrin and MS is modified starch. Control sample is the freeze dried protein hydrolysate without addition of wall material.

2.4 Analytical methods

Moisture content was determined gravimetrically by oven at 105 °C for 6 h (AOAC, 2012). Water activity was determined using Aqualab thermohygrometer (4 TEV, Decagon, Pullman, USA) at 25 °C. Bulk density was calculated by dividing the mass of the powder by the volume occupied in a graduated cylinder of 25 mL. Particle size distribution, volume mean diameter D[4,3], span and the surface area of

the microparticles were determined by laser light diffraction analyzer (Mastersizer, model 2000, Malvern, UK). Microstructure was evaluated by scanning electron microscopy SEM (FEI Quanta 200, FEI Company, The Netherlands) with a magnification of $\times 6000$ and $\times 400$.

Prior to the analysis of antioxidant capacity, powder samples were dissolved in 10 mL of distilled water (2% protein), shaken at 1,500 rpm (Ika®lab dancer, Ika Works, Inc, Wilmington, USA) during 10 min at 25 °C and centrifuged $794 \times g$ at 4 °C for 15 min (centrifuge model 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany) obtaining an aqueous extracts. Antioxidant capacity was evaluated in triplicate by reducing capacity for content of reducing substances in Folin-Ciocalteu (FC) reagent, ability to scavenge the ABTS free radical, and ferric reduction antioxidant power (FRAP). The FC reductive capacity was determined by the Folin–Ciocalteu colorimetric method Kumazawa et al., (2002) and calculated using a calibration curve of gallic acid (0.004–0.016 mg/mL). The result was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g proteic hydrolysate solids, disregarding the mass of wall material.

For the ABTS method Sánchez-González; Jiménez-Escrig; & Saura-Calixto, (2005), the ABTS⁺ cation was produced by reacting 7 mM ABTS aqueous solution with 140 mM potassium persulfate, and stored in a dark vial at room temperature for 16 h. The ABTS⁺ solution was diluted with 20 mM phosphate buffered saline (pH 7.4) to an absorbance of 0.700 at 730 nm. Ethanolic solutions of Trolox (1.25–10 mM) were used for calibration. The reduction power was estimated according to Benzie & Strain, (1996). Briefly, 900 μ L of FRAP reagent, freshly prepared and heat at 37 °C, were mixed with 70 μ L distilled water and either 30 μ L of test sample or standard or appropriate reagent blank. Absorbances were measured in a spectrophotometer at 595 nm after 30 min. The results of FRAP assay was correlated with a standard

Trolox curve (50–600 μM). ABTS and FRAP results were expressed as μmol of Trolox equivalent (TE)/g solids on proteic hydrolysate, disregarding the mass of wall material.

The extraction of sugars was performed as described by Baú, Garcia, Ida (2015) with some modifications. In this procedure, 0.2 g of dried and defatted sample were dispersed in 8 mL of 80% ethanol and stirred for 1 h in a shaker table (305 rpm). The suspension was centrifuged for 15 min at 4 °C and 794 \times g, and 0.5 mL of the supernatant was transferred to a microtube for the evaporation of ethanol in a vacuum centrifuge (Model RC 1022, Jouan, Inc., Winchester, VA, Estados Unidos). The material was suspended with 5 mL of ultrapure water and filtered (Millex-GV, PVDF, hydrophilic membrane, 0.22 μm , Millipore, Billerica, MA, USA) and injected into a high performance anion exchange chromatography instrument (Thermo Scientific ICS 5000, Dionex Canada Ltda, Oakville, Canada). Sugars were separated using 20 mmol of NaOH/L of ultra-pure water, which was comprised of 90% solvent A (ultra-pure water) and 10% solvent B (200 mmol of NaOH/L of ultra-pure water) with isocratic elution for 52 min at 1 mL/min at 25 °C. At the end chromatographic run, a column washing step was performed with 200 mmol of NaOH/L of ultra-pure water for 10 min at 25 °C followed by column stabilization with 20 mmol of NaOH/L of ultra-pure water for 15 min. The sugar contents were expressed as mg/g of solids of protein hydrolysate.

2.5 Sorption isotherms

Triplicate samples of about 1 g of each powder were placed into petri dish, weighed and equilibrated over saturated salt solutions of LiCl, CH_3COOK , MgCl_2 , K_2CO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, KI, NaCl and KCl, that conferred relative humidities (RH) of 11.2%,

22,6%, 32,8%, 43,2%, 52,9%, 68,9%, 75,3% and 84,3%, respectively (Greenspan, 1977), in desiccators at 25 °C. The time required for samples reached equilibrium ranged from 3 to 15 days. Equilibrium moisture content (X_e) at several relative humidities was calculated to construct the water adsorption isotherms. During analysis, the samples were also observed visually to verify some physical modification, such as agglomeration, caking or collapse.

The GAB (GUGGENHEIM-ANDERSON-DE BÔER) model was used to adjust the sorption data of okara protein hydrolyzate powders (Van Der Berg, 1984) (Eq. 1) :

$$X_e = \frac{X_m C_{GAB} K_{GAB} a_w}{[(1 - K_{GAB} a_w)(1 - K_{GAB} a_w + C_{GAB} K_{GAB} a_w)]}$$

where: X_e is the equilibrium moisture content, X_m is the monolayer moisture content (g/g solids), and C and K are the model constants.

The model parameters were obtained by non-linear regression analysis using Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) software package. The goodness of fitness of each model was evaluated by the coefficient of determination R^2 and mean relative deviation modulus E.

2.6 Glass transition temperature

The glass transition temperatures of powders equilibrated at several RH (11.2%, 22,6%, 32,8%, 43,2%, 52,9%, 68,9%, 75,3% and 84,3%) were determined by differential scanning calorimeter (DSC-60, Shimadzu, Kyoto, Japan). About 2 mg of sample were placed in aluminum pans, weight and hermetically sealed. Calibration of the equipment was done with indium ($T_{\text{melting}} = 156.6$ °C) and verification was

performed with azobenzol ($T_{\text{melting}} = 68 \text{ }^{\circ}\text{C}$), using nitrogen as a purge gas, with a constant flow of 50 mL/min. After cooling to $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ using liquid nitrogen, thermogram curves were obtained by heating the sample at $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to ($70^{\circ}\text{C} - 100^{\circ}\text{C}$). All analyses were done in triplicate and the data were treated by the software TA 60 version 2.21 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

To describe the plasticizing effect of water on the powders, the experimental T_g data were fitted to the Gordon-Taylor model (Gordon & Taylor, 1952) (Eq. 2):

$$T_g = \frac{w_s T_{g_s} + k T_{g_w}}{w_s + k w_w}$$

where: w_s is the mass fraction of solids (g/g sample), T_{g_s} is the glass transition temperature of anhydrous solid ($^{\circ}\text{C}$), k is a constant, w_w is the mass fraction of water (g/g sample), and T_{g_w} value was taken at $-135 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Johari, Hallbrucker, & Mayer, 1987) and corresponds to the glass transition temperature of water.

A non-linear regression analysis was carried out using the Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) software package to obtain the model parameters k and T_{g_s} .

2.9 Statistical analysis

The results were expressed as mean ($n = 3$) \pm standard deviation (SD) and were compared at a significance level of $p < 0.05$ by one-way analysis of variance (ANOVA), using Tukey's multiple range tests. The statistical analyses were made by the software Statistic 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Characterization of powders

Analyzing physico-chemical properties (Table 1 and Figure 1), there was no significant difference between the samples microencapsulated by maltodextrin or modified starch, except for water activity, span and surface area. On the other hand, physico-chemical properties of the microencapsulated samples were quite distinct from those of the control sample. Such results were expected, because these powders were obtained by different drying process (spray drying x freeze drying) and with or without addition of wall materials.

Besides the different type of drying process, microencapsulated samples had lower moisture content probably due to the increase of solids in the protein hydrolysate. The addition of wall material reduces the free water content to evaporate. Moreover, they are less hygroscopic, as observed by sorption isotherm data shown in item 3.5, than the control sample, resulting in a powder with lower final moisture. Water activities are below 0.3, indicating that the protein hydrolysate powders are considered stable with low rates of chemical degradation, with the exception for lipid oxidation (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2008).

The bulk density of the dried protein hydrolysates ranged from 0.300 to 0.484 g/mL, in which the control sample presented lower value. Such result was expected, since lyophilization results in the formation of dehydrated products with high porosity. Regarding to the effect of the type of wall material on bulk density, no difference was observed ($p > 0.5$), with values around 0.5 g/mL. Bulk density is an important property to be considered for particulate systems, since it influences pack sizes (it is possible to pack a large amount of high density powder in smaller containers) and storage stability (high density powder has less amount of air in the spaces between the particles).

The mean diameter $D[4,3]$ of the particles ranged from 12.2 to 208.1 μm , in which a lower values were observed for the spray dried powders, resulting in higher total surface area of the particles than the control sample, as expected. A bimodal particle size distribution can be observed for the microencapsulated samples (Figure 1), showing two predominant particle sizes: one with low population volume (<1%) containing particles in diameters ranging from 0.3 to 2 μm ; and another with the largest population volume (7%) with particles ranging in size from 3 to 50 μm . Already the control sample showed a wider distribution ranging from 10 to 1000 μm . This behavior could be confirmed by span value (Table 1). The span or the amplitude of particle size distribution characterize the homogeneity of particle population (Hijo et al., 2015). Control sample had a higher value, showing how heterogeneous its particle size distribution is. MD and MS microcapsules had more homogeneous size distribution than the control sample. In an ideal situation, the particulate system would be homogeneous, with only one size; nevertheless, in the real situation, a wide and bimodal distribution results to the segregation of a mixture, in which smaller particles keep in the bottom and larger particles, in the top (O'Hagan et al., 2005).

3.2 Microstructure of powders

Figures 2(a) and 2(b) show the microstructure of microencapsulated samples with maltodextrin or modified starch, respectively. For both samples, continuous walls without cracks or collapses could be observed. This feature is an advantage in providing greater protection and retention of active material. Microphotographs reveal the formation of some spherical and smooth particles. However, there are a greater number of irregularly shaped structures with depressions that are formed by particles shrinkage during drying and cooling (Kalab, 1979). According to Ré (1998), rough

particles are formed when there is a slow process of forming a film during the drying of the atomized droplets in the spray dryer chamber. The presence of these imperfections is undesirable because it affects flow out of powder. Differently to the spray dried samples, the control sample presented porous irregular particles (Figure 2c).

3.3 Antioxidant capacity of powders

No significant effect of the type of wall material on the antioxidant capacity by FC and FRAP assay was observed between the powders microencapsulated with MD and MS (Table 2). On the other hand, protein hydrolysate encapsulated with MD had higher ABTS free radical sequestering capacity than sample with MS. As expected, the FC was higher in control sample than in spray dried samples. Nevertheless, a little thermal degradation of FC after spray drying process was observed, with retention of about 90% of FC. Unexpected results of ABTS and FRAP were obtained. The encapsulation by spray drying increased the antioxidant capacity of the peptides when compared to the results of the control sample. Probably, the thermal treatment of the protein hydrolysate during spray drying could favor the occurrence of intermediates products of the Maillard reaction, for example the reductants that are antioxidant substances. The resultant products from this reaction exhibit antioxidant capacity (Morales & Jiménez-Peres, 2001).

3.4 Sugar content

This analysis was carried out in order to explore possible correlations between sugar composition and water sorption isotherm and glass transition temperature (to be discussed below). The main sugar compound found in all powders was sucrose,

corresponding to about 50% of the total sugar, followed overall by raffinose and stachyose oligosaccharides.

Significant differences were observed among all the samples (Table 3). Spray dried products presented higher glucose content and lower oligosaccharides content than control sample. Sugar hydrolysis could be a hypothesis for this sugar profile changes. Possibly, spray drying process may have favored action of the endogenous α -galactosidase of the soybean, thus converting the oligosaccharides, stachyose and raffinose, into sucrose. However, the sucrose content decreased after spray drying, indicating that sucrose could be converted to another compound. An explanation may be related to the significant increase in glucose content after the spray drying process. Other explanation may be related to the hydrolysis of β -glycoside isoflavone, producing aglycone isoflavone and glucose. The okara protein hydrolysate has 60.4 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ of solids of β -glycoside isoflavone (data not yet published). Since β -glycoside isoflavone conversion occurs by the action of endogenous β -glycosidase in soybeans, heat or acid/alkaline treatment (Wang, & Murphy, 1994), it is possible that the spray drying process favored this conversion, increasing glucose content in powders microencapsulated samples.

3.4 Water sorption isotherm and glass transition temperature

Sorption isotherms of control sample and microencapsulated with MD or MS are shown in Figure 3, with their respective fitting for the GAB model. The GAB model was adjusted to the experimental equilibrium moisture content (Table 4) to describe the water sorption isotherm and to obtain the storage critical conditions which will be discussed below. The microencapsulated protein hydrolysates had a higher C_{GAB} value than the control sample (Table 4), indicating that the binding force

of the water molecules to the primary binding sites on the microencapsulated sample surface is stronger than for control sample (Quirijns et al., 2005). Another important parameter that must be evaluated to ensure the stability of this product is the monolayer moisture content (X_m) that shows the amount of water that is strongly adsorbed at specific sites of the food surface. The control sample has a higher X_m value than the protein hydrolysate microencapsulated with MD or MS because it is more hygroscopic than the encapsulated samples.

Considerable differences can be observed between the isotherms. Okara protein hydrolysate microencapsulated with wall material had lower equilibrium moisture contents at given RH than the control sample (Figure 3). These results can be explained by the effect of encapsulation. The formation of coating of HMW wall materials with low hygroscopicity around the protein hydrolysate decreased its exposition to water molecules (Gharsallaoui et al., 2007).

The amorphous powders produced by spray drying and freeze drying suffered plasticizing effect of water, in which the moisture content had a strong influence on T_g (Figure 4). The increase of moisture content decreased T_g from 62.3 to -30.0 °C, 58.9 to -30.3 °C and 38.9 to -40.7 °C, respectively, when relative humidity varied from 11.2 to 84.3% for protein hydrolysate microencapsulated with MS and MD, and control sample, respectively. This plasticization effect was described by the Gordon-Taylor model and its estimated parameters were obtained (Table 4). The T_{gs} value for the control sample (55.1 °C) was significantly lower than for samples microencapsulated with MD (102.83 °C) or MS (112.93 °C). The lower T_g and T_{gs} values of the control sample (Figure 4) were due to the presence of LMW sugars with low T_g values (Table 3) and LMW peptides released after enzymatic hydrolysis of

protein by alcalase. Electrophoresis of the protein hydrolysates (data not shown) showed that the presence of small peptides with MW below 14.4 kDa.

It was not possible to dry the okara protein hydrolysate by spray drying process due to its low T_g , which increases the difference between outlet air temperature of spray dryer and T_g (ΔT). As consequence, a large amount of powder adhered in the dryer chamber and cyclone. This fact occurred because the outlet air temperature ($T_{out} = 100\text{ }^\circ\text{C}$) was higher than the T_g of pure protein hydrolysate ($T_{g,s} = 55.10\text{ }^\circ\text{C}$) (Table 4), resulting in a high ΔT . Therefore, it was only possible to dry the protein hydrolysate without wall materials by freeze drying, a low temperature process. An alternative to dry the okara protein hydrolysate was the addition of HMW compounds in feed formulation before atomization step in order to increase T_g . The positive effect of the encapsulating agents was demonstrated in this study, in which there was an increase on T_g values (Table 4 and Figure 4), thus permitting to obtain spray dried okara protein hydrolysates. Similar result was observed by (Fongi et al., 2017; Kurozawa, Park, & Hubinger, 2009). This is because the wall materials used in the current study have higher molecular weight (MW) and T_g values than LMW sugars (Table 3) and peptides. Maltodextrin 10 DE had T_g of $160\text{ }^\circ\text{C}$ and MW of $1,800\text{ g/mol}$ (Bhandari & Roos, 2017). No T_g data of Capsul® modified starch was found in the literature; however, (Bhandari & Roos, 2017) reported a T_g of $243\text{ }^\circ\text{C}$ for starch.

3.6 Determination of storage critical conditions

The use of moisture sorption data with glass transition temperature was suggested to evaluate food stability (Roos, 1993). Thus, in order to determine the storage critical conditions of air relative humidity RH and moisture content X, the data

of T_g and sorption isotherms, represented by Gordon-Taylor and GAB models, respectively, are shown together in Figure 4. The storage critical conditions are the values of RH and X when the T_g of some product is equal to the room temperature at 25 °C. This figure is useful for predicting the limit X and RH values which the amorphous product remains in the glassy state (Roos, 1995). The stability of an amorphous product is strongly dictated by T_g , which depends on the storage conditions, such as RH or temperature. When product suffers phase transition from glassy to the rubbery state, it is susceptible to agglomeration, caking, collapse or crystallization during storage (Roos & Karel, 1991).

Table 5 shows the critical values of RH and X for all dried samples. When control sample is stored at RH of 25%, it presents T_g equal 25 °C and equilibrium moisture content of 0.1 to water/g solids. That is, if the control sample is stored at T and RH above 25 °C and 25%, respectively, the glassy powder will undergo phase transition to rubbery state, being susceptible to undesirable alterations. Visually, control sample stored in RH above 32.8% suffered physical structure changes. This is because due to its low critical relative humidity (Table 5).

On the other hand, when powders containing MD or MS were stored at room temperature of 25 °C, their critical values of RH and X were 58% and 0.12 g water/g solids and 52% and 0.10 g water/g solids, respectively (Fig. 4(a) and 4(b) and Table 5). Thus, the addition of the HMW encapsulating agent in the okara protein hydrolysate improved the stability of powders. Sample containing MD presented the highest critical values of RH and X at 25 °C. In this way, it is possible to store this product at 25 °C and relative humidity of up to 58%. These values are higher than those observed for the control product. It is observed that the HMW encapsulating agents decreased powder hygroscopicity when compared with the control sample.

The addition of carrier agents provides an increase in powder stability against higher relative humidity. Visually the MD and MS samples presented physical changes when they were maintained in RH above 68.9%.

4 CONCLUSION

The results reported in the current study demonstrated the significant effect of the microencapsulation of protein hydrolysate on nutritive and physicochemical properties of powders. Due to the presence of LMW peptides and sugars, it was not possible to obtain protein hydrolysate powder without wall material by spray drying. The microencapsulation process preserved antioxidant capacity of okara protein hydrolysate powders. With the determination of the glass transition temperature, it was possible to observe the effect of the water as plasticizing agent, that is, an increase on moisture content caused a significant decrease on T_g . The control sample presented low T_g and low critical values of moisture content and relative humidity, indicating that the product has high vulnerability during processing, handling and storage. The addition of wall material in the microencapsulation of the hydrolyzed okara protein by spray dryer increased the T_g and, consequently, improved to the stability of the powder microencapsulated. The current study was important for providing necessary information about the characteristics of the protein hydrolysates of okara microencapsulated by spray dryer. Besides, the knowledge of storage critical conditions may be useful to store the product under appropriate conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – Finance Code 001; by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (473117/2013-4); and by the Fundação Araucária (160/2014). LEK and EII are CNPq Research Fellow.

REFERENCES

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food protein*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. (2012). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington: AOAC.
- Barbosa-Cánovas, G. V.; Juliano, P. (2005). Physical and chemical properties of food powders. In: ONWULATA, C. (Ed.). *Encapsulated and powdered foods*. Boca Raton. Taylor & Francis., 39–71.
- Baú, T. R., Garcia, S., & Ida, E. I. (2015). Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(8), 845–850.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Bhandari, B., & Roos, Y. H. (2017). *Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Foods*. *Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Foods* (Woodhead P). Nikki Levy.
- Clemente, G., Sanjuán, N., & Mulet, A. (2010). Influence of ultrasounds in drying kinetics of grape seeds. *October*, (October), 3–6.

- Costa, J. M. G., Silva, E. K., Toledo Hijo, A. A. C., Azevedo, V. M., Malta, M. R., Ferreira Alves, J. G. L., & Borges, S. V. (2015). Microencapsulation of Swiss cheese bioaroma by spray-drying: Process optimization and characterization of particles. *Powder Technology*, 274, 296–304.
- Damodaran, S. ., Parkin, K. L. ., & Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food chemistry*. (C. Pres, Ed.) (4th ed.). Boca Baton, FL, USA.
- Fongin, S., Kawai, K., Harnkarnsujarit, N., & Hagura, Y. (2017). Effects of water and maltodextrin on the glass transition temperature of freeze-dried mango pulp and an empirical model to predict plasticizing effect of water on dried fruits. *Journal of Food Engineering*, 210, 91–97.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121.
- Gordon, M., & Taylor, J. S. (1952). Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. I. Non-crystalline copolymers. *Journal of Applied Chemistry*, 2(9), 493–500.
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards – Physics and Chemistry*, 81(1), 89–86.
- Hijo, A. A. C. T., Da Costa, J. M. G., Silva, E. K., Azevedo, V. M., Yoshida, M. I., & Borges, S. V. (2015). Physical and thermal properties of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil microparticles. *Journal of Food Process Engineering*, 38(1), 1–10.
- Hoyos-Leyva, J. D., Bello-pérez, L. A., Alvarez-Ramirez, J., & Hugo, S. (2018). Microencapsulation using starch as wall material: A review. *Food Reviews*

- International, 34(2), 148–161.
- Johari, G. P., Hallbrucker, A., & Mayer, E. (1987). The glass-liquid transition of hyperquenched water. *Nature*, 330(10), 552–553.
- KALAB, M. (1979). Micro structure of dairy foods. 1. Milk products based on protein. *Journal of Dairy Science*, 62, 1352–1364.
- Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M. S., & Nakayama, T. (2002). Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 373–377.
- Kurozawa, L. E., Park, K. J., & Hubinger, M. D. (2009). Effect of maltodextrin and gum arabic on water sorption and glass transition temperature of spray dried chicken meat hydrolysate protein. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 287–296.
- Lacou, L., Léonil, J., & Gagnaire, V. (2016). Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products. *Food Hydrocolloids*, 57, 187–199.
- Liu, K. (2008). Food use of whole soybeans In: Johnson, L.A.; White, P.J.; Galloway, R. Soybeans. Urbana, Illinois, EUA: AOCS Press.
- Lu, W., Chen, X. W., Wang, J. M., Yang, X. Q., & Qi, J. R. (2016). Enzyme-assisted subcritical water extraction and characterization of soy protein from heat-denatured meal. *Journal of Food Engineering*, 169, 250–258.
- Morales, F. J., & Jiménez-Peres, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 119–125.
- O'Hagan, P.; Hasapidis, K.; Coder, A.; Helsing, H.; Pokrajac, G. (2005). Particle size analysis of food powders. In: Onwulata, C. (Ed.). *Encapsulated and powdered foods*, chapter 9. (Taylor & F). Boca Raton, USA.

- Quirijns, E. J., Van Boxtel, A. J. B., Van Loon, W. K. P., & Van Straten, G. (2005). Sorption isotherms, GAB parameters and isosteric heat of sorption. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(11), 1805–1814.
- Ré, M. I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16(1195–1236).
- Rizzello, C. G., Tagliacruzchi, D., Babini, E., Sefora Rutella, G., Taneyo Saa, D. L., & Gianotti, A. (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 27, 549–569.
- Roos, Y. . (1995). Glass transition – related physicochemical changes in foods. *Food Technology*, 49(10), 97–102.
- Roos, Y. H. (1993). Water activity and physical state effects on amorphous food stability. *Journal of Food Processes and Preservation*, 16(6), 433–447.
- Roos, Y., & Karel, M. (1991). Applying state diagrams to food processing and development. *Food Technology*, 45(12), 66–71.
- Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90(1–2), 133–139.
- Sarabandi, K., Sadeghi, A., & Hamishekar, H. (2018). Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical , antioxidant and microstructure properties. *Journal of Food Engineering*, 237, 86–95.
- Statista. (2018). Sales volume of soymilk worldwide in 2015 and 2018. Retrieved March 19, 2018, from <https://www.statista.com/statistics/645662/soy-milk-sales-volume-worldwide>
- Subtil, S. F., Rocha-Selmi, G. ., Thomazini, M., Trindade, M. ., Netto, F. M., &

Favaro-Trindade, C. S. (2014). Effect of spray drying on the sensory and physical properties of hydrolysed casein using gum arabic as the carrier. *Journal Food Science Technology*, 51(9), 2014–2021.

Van Der Berg, C. (1984). Description of water activity of foods for engineering purposes by means of the GAB model of sorption. In: MCKENNA, B.M. (ED.). London: Elsevier Applied Science. *Engineering and Food*, 1, 311–321.

Table 1. Physico-chemical properties of protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (MD) or modified starch (MS). Control sample is freeze dried sample without wall materials.

Properties	MD	MS	Control
Moisture content (%)	4.78±0.39 ^{bc}	4.13±0.64 ^c	5.38±0.33 ^a
a_w	0.257±0.005 ^a	0.226±0.006 ^b	0.133±0.003 ^c
ρ (g/mL)	0.469±0.01 ^a	0.484±0.01 ^a	0.300±0.01 ^b
D[4,3] (μm)	12.2±0.1 ^b	13.4±0.04 ^b	208.1±4.9 ^a
Span	1.93±0.01 ^b	1.88±0.00 ^c	2.8±0.03 ^a
Surface area (m ² /g)	1.18±0.01 ^a	1.08±0.00 ^b	0.10±0.00 ^c

Mean followed by the standard deviation (n=3).

a_w is water activity; ρ is bulk density; D[4,3] is volume mean diameter of the particles. The letter refers to the significant difference at $p < 0.05$ between samples.

Table 2. Antioxidant capacity of protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (MD) and modified starch (MS). Control sample is freeze dried sample without wall materials.

Antioxidant capacity	MD	MS	Control
FC	17.9±0.3 ^b	18.1±0.2 ^b	20.6±0.1 ^a
ABTS	613.6±8.0 ^a	583.2±8.9 ^b	584.0±7.3 ^b
FRAP	19.8±2.1 ^a	18.5±0.4 ^a	14.7±0.3 ^b

Means followed by standard deviation (n=3).

The letter refers to the significant difference at $p < 0.05$ between samples.

FC is reducing capacity by Folin-Ciocalteu (mg GAE/g solids on proteic hydrolysate); GAE is gallic acid equivalents; ABTS is antioxidant capacity determined by the ABTS^{•+} assay ($\mu\text{mol TE/g}$ solids on proteic hydrolysate); FRAP is ferric reducing antioxidant power ($\mu\text{mol TE/g}$ solids on proteic hydrolysate); and TE is Trolox equivalents.

Table 3. Sugar content (mg/g solids) of protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (MD) or modified starch (MS). Control sample is freeze dried sample without wall materials.

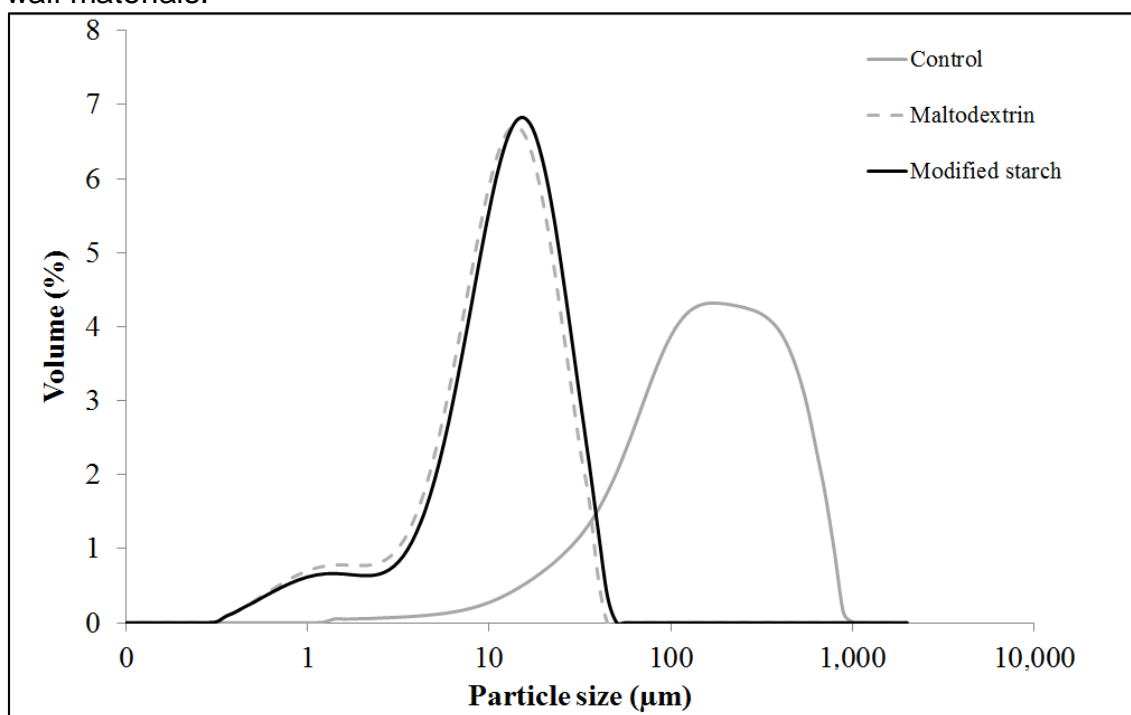
Sample	Galactose	Glucose	Fructose	Sucrose	Raffinose	Stachyose
MD	<LQ	1.34 ± 0.24 ^{Bab}	0.37 ± 0.02 ^{Bb}	3.22 ± 0.49 ^{Ac}	0.92 ± 0.20 ^{Bc}	1.11 ± 0.23 ^{Bc}
MS	<LQ	1.57 ± 0.10 ^{Ca}	0.69 ± 0.00 ^{Ea}	6.17 ± 0.09 ^{Ab}	1.76 ± 0.00 ^{Cc}	2.24 ± 0.09 ^{Bbc}
Control	ND	0.07 ± 0.01 ^{Ec}	0.37 ± 0.06 ^{Db}	7.28 ± 0.00 ^{Ab}	3.05 ± 0.00 ^{Cb}	3.70 ± 0.00 ^{Bb}
MW(g/mol)*	180.2	180.2	180.2	342.3	504.2	666.6
Tg (°C)**	38	36	16	67	77	

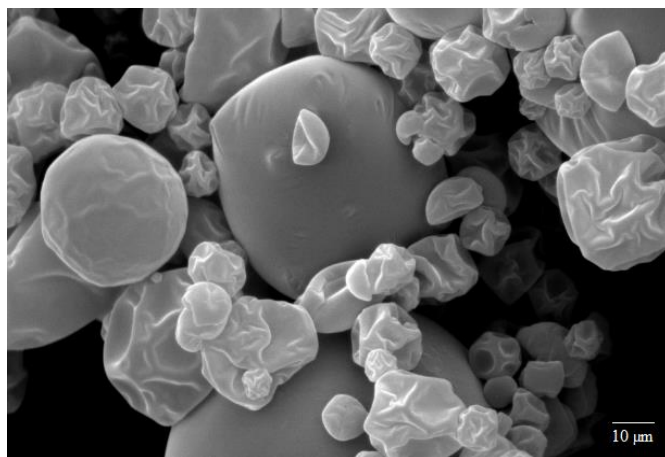
Means followed by the standard deviation (n=3). The values followed by the same letter do not differ statistically by the Tukey test at 5% probability. Lower case letter refers to the significant difference between samples. The capital letter refers to the significant difference within the sample as function of sugar compound. ND is not detected and < LQ is less than the limit of quantification. MW is molecular weight. Tg is glass transition temperature.

* Data from Damodaran et al. (2008)

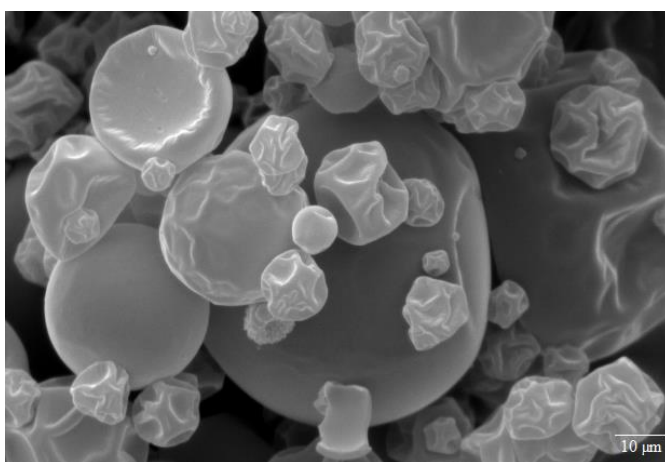
** Data from Bhandari and Roos (2017)

Figure 1. Particle size distribution of okara protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin or modified starch. Control sample is freeze dried sample without wall materials.

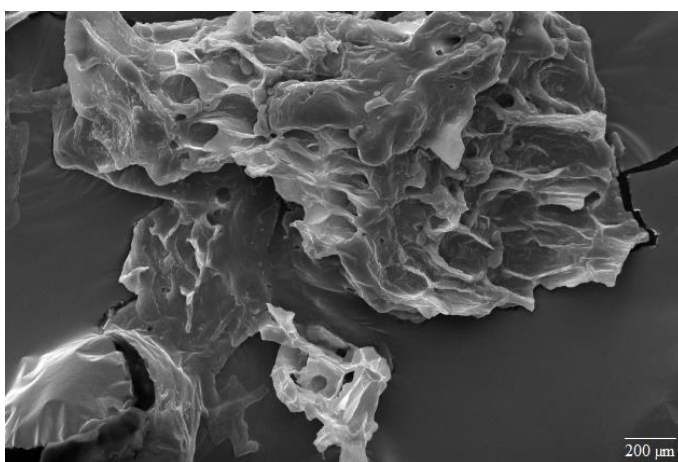




(a)



(b)



(c)

Figure 2. Scanning electron microphotographs of protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (a) and modified starch (b) and protein hydrolysate freeze dried without wall material as control sample (c). Images with a magnitude of 6000× (a and b) and 400× (c).

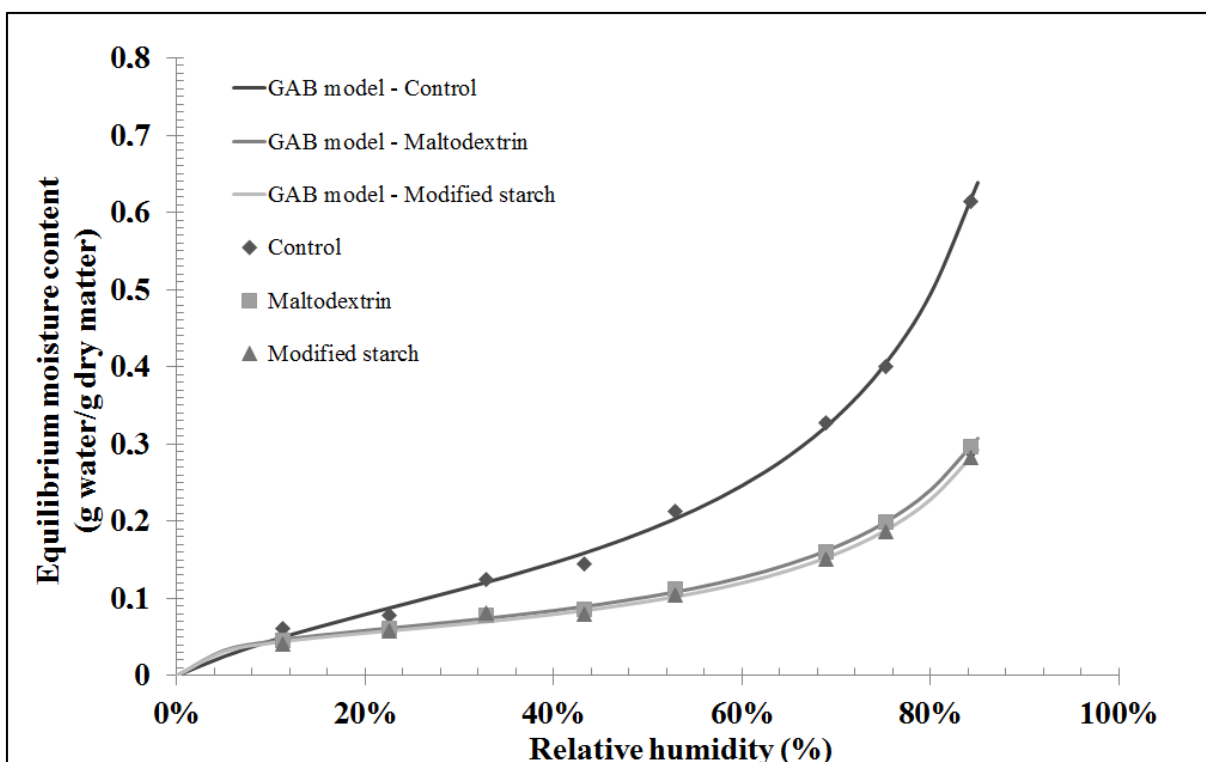
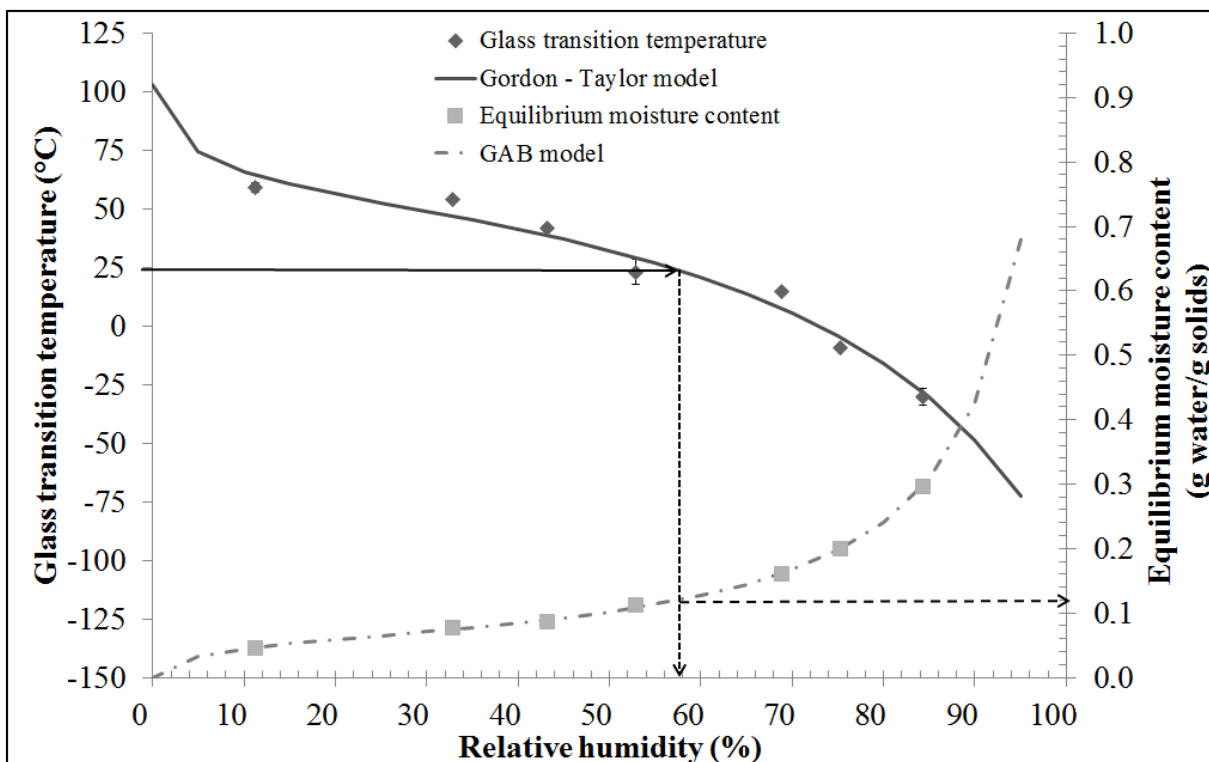


Figure 3. Water sorption isotherms of okara protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin or modified starch. Control is freeze dried sample without wall materials.

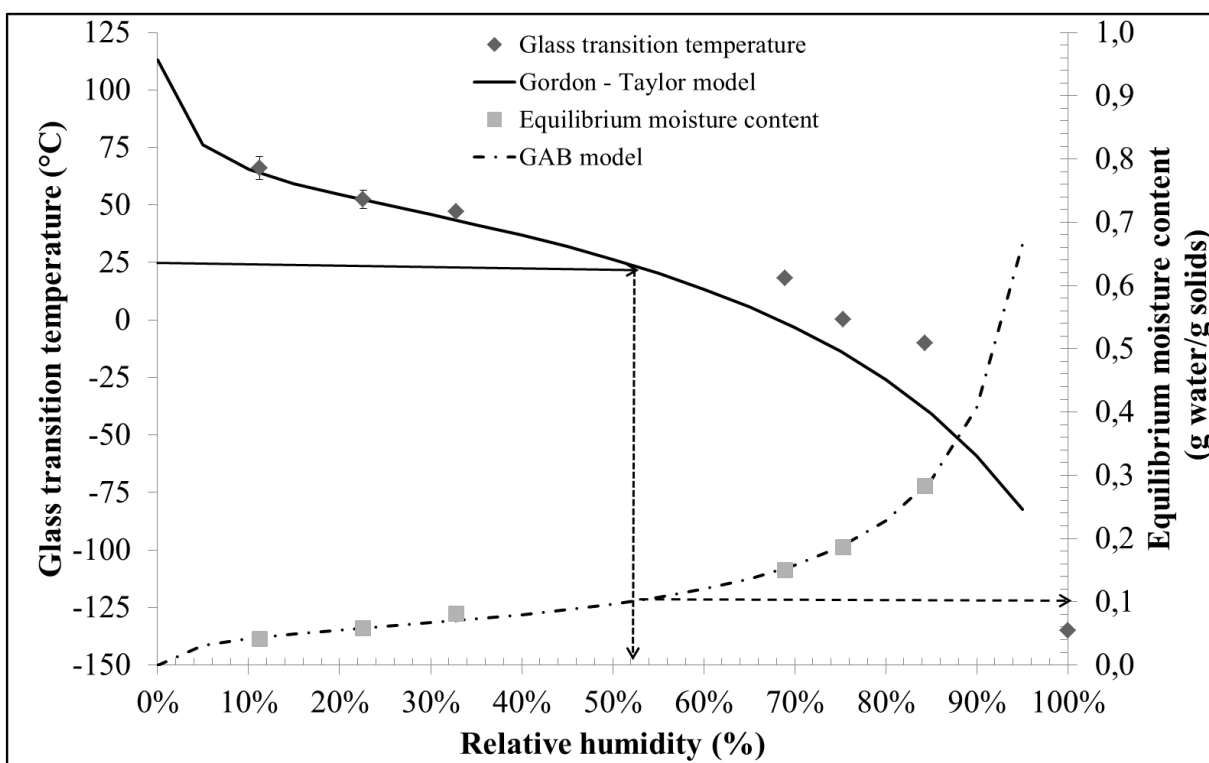
Table 4. Estimated parameter values of GAB and Gordon-Taylor models for okara protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (MD) or modified starch (MS). Control sample is freeze dried sample without wall materials.

Sample	GAB model					Gordon-Taylor model			
	X_m	C_{GAB}	K_{GAB}	R^2	E	T_{g_s}	k	R^2	E
Control	0.119	4.9	0.97	1.00	6,24	55.1	2.0	0.99	21.1
MD	0.055	25.5	0.97	1.00	1.83	102.8	4.1	0.98	22.5
MS	0.051	26.8	0.97	0.99	4.32	112.9	5.6	0.97	13.8

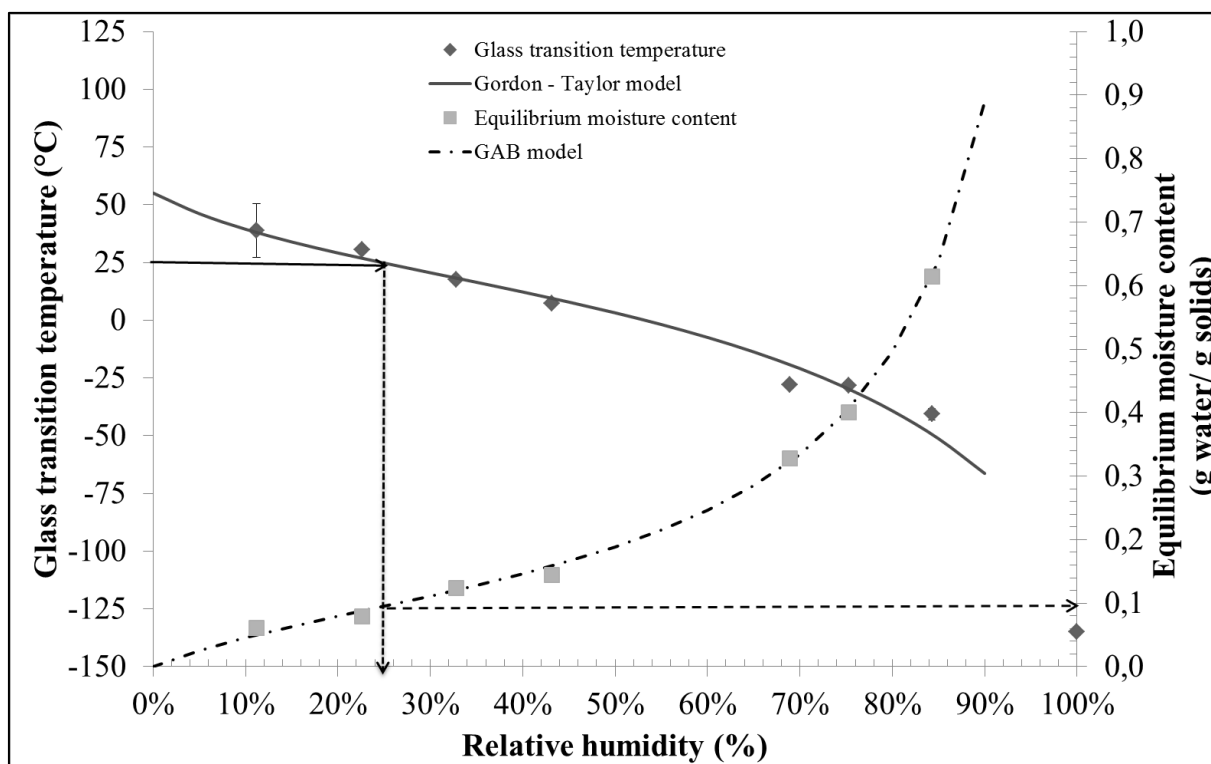
X_m is the monolayer moisture content (g/g solids); C_{GAB} and K_{GAB} are the GAB model constants; T_{g_s} is the glass transition temperature of anhydrous sample; k is the constant of the Gordon-Taylor model; E is the mean relative error (%)



(a)



(b)



(c)

Figure 4. Relationship between relative humidity, water content and glass transition temperature of okara protein hydrolysates microencapsulated with maltodextrin (a) or modified starch (b). Control sample is freeze dried sample without wall materials (c).

Table 5. Critical values of air relative humidity (RH_c) and moisture content (X_c) of okara protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin (MD) or modified starch (MS). Control sample is freeze dried sample without wall materials

Sample	RH_c (%)	X_c (g water/g solids)
Control	25	0.10
MD	58	0.12
MS	52	0.10

5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3

ESTABILIDADE FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE OKARA MICROENCAPSULADOS POR SPRAY DRYING

PHYSICAL AND PHYSICAL-CHEMICAL STABILITY OF OKARA PROTEIN HYDROLYSIS MICROENCAPSULATED BY SPRAY DRYING

A. JUSTUS¹, M. T. BENASSI¹, E.I. IDA¹, L.E. KUROZAWA^{1,2,*}

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

² Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

* Autor correspondente (Endereço atual):

Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Monteiro Lobato, 80, Campinas, SP, 13083-862, Brasil. Telefone: +55 19 3521-4032. Email: louisek@unicamp.br

RESUMO

A microencapsulação é um processo indicado para proteger substâncias que são susceptíveis à degradação ou redução da sua funcionalidade devido a diferentes reações como, por exemplo, oxidação, hidrólise, entre outros. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da microencapsulação, usando como materiais de parede maltodextrina ou amido modificado, sobre a estabilidade de hidrolisados proteicos de okara. Foram analisadas a microestrutura, capacidade antioxidante e cor das amostras durante estocagem dos pós por 120 dias a 35 °C. As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura indicaram que o processo de microencapsulação favoreceu a integridade física das partículas. A diferença de cor observada entre as amostras encapsuladas e não encapsuladas foram provenientes provavelmente da adição de materiais de paredes que contribuíram para a mudança da cor do pó obtido por *spray drying*. Os resultados indicaram que as microcápsulas obtidas por *spray drying* usando maltodextrina ou amido modificado mantiveram a cor dos pós e apresentaram boa habilidade em sequestrar o radical livre ABTS e teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu durante a estocagem.

Palavra chave: okara, capacidade antioxidante, maltodextrina, amido modificado, microestrutura, cor.

ABSTRACT

Microencapsulation is a process used for protecting substances that are susceptible to degradation or reduction of their functionality due to different reactions such as oxidation, hydrolysis, among others. The objective of this study was to evaluate the effect of microencapsulation, using maltodextrin or modified starch as wall materials,

on the stability of okara protein hydrolysates. The microstructure, antioxidant capacity, and color of the samples were analyzed during powder storage for 120 days at 35 °C. Micrographs obtained by scanning electron microscopy indicated that the microencapsulation process favored the physical integrity of the particles. The color difference observed between the encapsulated and unencapsulated samples was probably due to the addition of wall materials that contributed to color change of the powder obtained by spray drying. The results indicated that the microcapsules obtained by spray drying using maltodextrin or modified starch maintained the powder color and showed good ability to sequester the free radical ABTS and content of reducing substances from the Folin-Ciocalteu reagent during storage.

KEYWORDS: okara, antioxidant capacity, maltodextrin, modified starch, microstructure, color.

1 INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos é crescente o uso da microencapsulação para proteger, isolar ou controlar a liberação de uma determinada substância (Souza *et al.*, 2018). A microencapsulação é um processo de revestimento físico de uma substância (material ativo ou núcleo), que pode estar apresentada na forma de pequenas partículas sólidas, gotículas de líquidos ou gases, em um material de parede ou agente de encapsulação que tem a função de isolar total ou parcialmente o material ativo (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

O processo de secagem por atomização ou *spray drying* é comumente usado para produção de encapsulados, devido ao seu baixo custo, versatilidade e por ser um processo contínuo que mantém o material do núcleo a uma temperatura moderada, enquanto o estado seco é atingido (Hoyos-Leyva *et al.*, 2018). Esse tipo de processo proporciona diversos benefícios para a indústria alimentícia, tais como a eficiente retenção de voláteis, facilidade de manuseio, transporte, proteção do material ativo, estabilidade final do produto e utilização em formulações (Botrel *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013).

Diversos biopolímeros podem ser utilizados como material de parede (Sarabandi *et al.*, 2018). Maltodextrina, goma arábica, proteínas e amidos modificados são os agentes encapsulantes mais usados (Costa *et al.*, 2015; Hoyos-Leyva *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018). As maltodextrinas são produzidas por hidrólise parcial do amido por ácido ou enzimas. São os agentes encapsulantes mais comuns, por possuírem baixo custo, boa proteção contra oxidação e não conferirem sabor; no entanto, possuem baixa capacidade emulsificante (Goula & Adamopoulos, 2012; Rocha *et al.*, 2009). O amido modificado Capsul®, também conhecido como amido octenilsuccinato, é um derivado do amido obtido pela esterificação do amido

com o ácido octenilsuccinato anidro, resultando em um amido hidrofobicamente modificado. Por meio da modificação, a hidrofobicidade do octenilsuccinato é introduzida e a hidrofobicidade do amido é mantida. Como resultado, este derivado do amido tem sido usado devido ao aumento da capacidade e estabilidade das emulsões ou suspensões (Gomes Da Costa *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2018).

Uma das limitações da utilização das proteínas hidrolisadas em produtos alimentares é o seu gosto amargo. O gosto amargo está relacionado à formação de pequenos peptídeos compostos principalmente por aminoácidos hidrofóbicos (Adler-Nissen, 1986). Alguns autores, Sarabandi *et al.* (2018) e Subtil *et al.* (2014) aplicaram a tecnologia de microencapsulação para mascarar o gosto amargo.

Em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa, verificou-se que os hidrolisados proteicos de okara possuem vários constituintes antioxidantes, como peptídeos bioativos, proteínas, isoflavonas e compostos fenólicos (dados não publicados). A microencapsulação pode ser aplicada também sobre estes compostos para protegê-los contra as condições ambientais adversas (luz, umidade, oxigênio, radiação UV). Além disso, a microencapsulação pode conferir proteção física, uma vez que os peptídeos e açúcares de baixa massa molecular presentes no hidrolisado proteico diminuem a temperatura de transição vítrea e aumentam a higroscopicidade do pó, acarretando alterações indesejáveis nas características físicas, como aglomeração e compactação do pó.

Avaliar a estabilidade das microcápsulas é uma questão relevante quando objetiva-se garantir a qualidade do produto. Sendo assim, o estudo da estabilidade dos hidrolisados proteicos de okara microencapsulados usando como material de parede maltodextrina (MD) ou amido modificado (AM), bem como hidrolisados não encapsulados (controle), foi conduzido com o objetivo de avaliar as alterações na

microestrutura, cor e capacidade antioxidante nas amostras estocadas a 35 °C por 120 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Okara foi doado por uma indústria produtora de extrato de soja e estocado a -22 °C. A protease Alcalase 2.4L[®] foi utilizada no processo de hidrólise enzimática para obter o hidrolisado proteico de okara. Os materiais de parede utilizados foram maltodextrina 10DE e amido modificado Capsul[®] (Ingredion, Mogi Guaçu, SP, Brasil).

Os reagentes 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil (São Paulo, SP, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou grau para HPLC.

2.2 Obtenção do hidrolisado proteico de okara

A hidrólise proteica do okara com Alcalase foi conduzida de acordo com o método pH-stat (Adler-Nissen, 1986). O okara foi homogeneizado em água destilada (1:4, p/p) sob agitação e a dispersão obtida foi aquecida a 50 °C e o seu pH ajustado para 9,0 com solução de NaOH 1M. Adicionou-se a enzima a uma concentração de 5 g/100 g de proteína. A hidrólise enzimática foi monitorada por titulação contínua de solução de NaOH 1M para manter o pH constante. Quando nenhuma alteração adicional no pH foi observada, a enzima foi inativada por aquecimento a 85 °C por 15 min, seguido de resfriamento em banho de gelo. A mistura foi centrifugada a

5.228 × g (5804R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 4 °C por 20 min para separar o precipitado do hidrolisado proteico. O volume consumido de NaOH no final da reação enzimática foi utilizado para calcular o grau de hidrólise ($34,8 \pm 0,27\%$) do hidrolisado proteico conforme descrito por Adler-Nissen (1986). O hidrolisado apresentou conteúdo de proteína de $1,4 \pm 0,01\%$ (base úmida), que foi obtido de acordo com (AOAC, 2012).

2.3 Microencapsulação do hidrolisado proteico por *spray drying*

Os materiais da parede (maltodextrina ou amido modificado) foram dissolvidos no hidrolisado proteico a uma concentração de 10% (p/p). A secagem e microencapsulação foram conduzidas em um *spray dryer* de bancada (modelo SD-05, LabPlant, Chelmsford, Inglaterra). O bico atomizador foi do tipo duplo-fluido com um orifício de 0,7 mm de diâmetro. As condições do processo foram: temperatura do ar de entrada e saída de 180 ± 5 °C e 100 ± 8 °C, respectivamente; vazão de alimentação e do ar de secagem de 420 mL/h e 73 m³/h, respectivamente; e pressão do ar comprimido de 1,4 bar. As microcápsulas obtidas foram armazenadas a -22 °C até o início da avaliação da estabilidade.

Para verificar o efeito da microencapsulação, o estudo da estabilidade também foi realizado para o hidrolisado proteico não-encapsulado em pó (amostra controle). Por não ter sido possível obtê-lo por *spray drying*, o hidrolisado proteico do okara foi liofilizado, por aproximadamente 36 h à -40 °C (Labconco, Lyph.Lock 1L). Não foi possível secá-lo em *spray dryer*, devido a sua baixa temperatura de transição vítrea, cujo valor da amostra anidra foi de 55,1 °C (dado obtido em estudos prévios e não publicados), valor bem inferior à temperatura do ar de saída do secador (100 ± 8 °C).

2.4 Estudo da estabilidade

A estabilidade dos produtos microencapsulados e não-encapsulado (controle) foi avaliada a cada 15 dias, totalizando 120 dias de estocagem. A temperatura de estocagem foi de 35 °C, valor recomendado por Labuza & Schmidl (1985) para estudos de estabilidade acelerada. Os pós foram embalados em duas embalagens e armazenados em BOD (TE-402, Tecnal, Piracicaba, Brasil). Na embalagem primária, foram utilizados recipientes plásticos com tampa de polietileno de alta densidade (PEAD). Na embalagem secundária foram utilizados potes plásticos de polipropileno (PP) com vedação na tampa, com o intuito de oferecer maior barreira de proteção de umidade e luz (protegidos com papel alumínio).

Os hidrolisados proteicos em pó foram analisados quanto à microestrutura, cor avaliada pelos parâmetros L^* , C^* e $^{\circ}h$ e à capacidade antioxidante pelos métodos de captura do radical livre ABTS e capacidade redutora avaliada pelo teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu (FC).

2.5 Parâmetros físicos e físico-químicos

A cor das amostras microencapsuladas e não-encapsuladas (controle) foi determinada utilizando um colorímetro (Minolta CR-400, Osaka, Japão) com escala CIELab (L^* , a^* e b^*). As medições foram realizadas em triplicata, utilizando o iluminante D-65 e foram expressas em termos da luminosidade L^* ($L^* = 0$ para preto e $L^* = 100$ para branco) e parâmetros a^* ($+a^*$ para vermelho e $-a^*$ para verde) e b^* ($+b^*$ para amarelo e $-b^*$ para azul). A tonalidade cromática $^{\circ}h$ e croma C^* foram calculados pelas equações (1) e (2).

$$^{\circ}h = \arctg \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad \text{Eq. (1)}$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Eq. (2)}$$

A microestrutura das micropartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (FEI Quanta 200, FEI Company, Holanda). As microestruturas das partículas foram observadas no tempo inicial (0 dia) e final (120 dias) de cada tratamento. As amostras foram fixadas em suportes metálicos (stubs) com fita de carbono dupla face. Em seguida, foram metalizadas com uma liga de ouro com grau de pureza de 99,6% em um metalizador (Sputter Coster SCD 050 BAL-TEC) a uma taxa de recobrimento de 0,51 Å/s, por 98 s, a 40 mA de voltagem e 5×10^{-1} mba. As microestruturas das micropartículas foram avaliadas com uma ampliação de 6000 e 400 x.

A capacidade antioxidante dos hidrolisados proteicos de okara microencapsulados e não-encapsulados foi avaliada por dois métodos: capacidade redutora pelo teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu (FC) e capacidade de sequestrar o radical livre ABTS. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Previamente à análise da capacidade antioxidante, as amostras foram dissolvidas em 10 mL de água destilada, resultando em uma solução com 2% de proteína e agitadas (Ika Works, Ika Works, Inc, Wilmington, EUA) a 25 °C por 10 min. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 794 x g e 4 °C por 15 min (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), obtendo-se um extrato aquoso.

A capacidade redutora (FC) foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Kumazawa *et al.*, 2002) que é usualmente empregado para estimar o teor compostos fenólicos totais. Misturou-se 0,5 mL da amostra contendo os compostos fenólicos com 0,5 mL de reativo de Folin-Ciocalteu 0,9 N, agitados, adicionado 0,5 mL de solução de carbonato de sódio 10% e a absorbância a 760 nm

foi mensurada após 1h. Utilizou-se uma curva de calibração de ácido gálico (0,004-0,016 mg/mL).

Para o método ABTS, utilizou-se o protocolo de Sánchez-González, Jiménez-Escrig & Saura-Calixto (2005), com modificações. O cátion ABTS⁺ foi produzido pela reação de solução aquosa 7 mM ABTS com persulfato de potássio 140 mM, e armazenado em vidro âmbar em temperatura ambiente por 16 h. A solução ABTS⁺ foi diluída com solução salina tamponada com fosfato 20 mM (pH 7,4) até uma absorbância de 0,700 a 730 nm. Para a reação, 10µL das amostras foram diluídas em 4 mL de solução ABTS⁺ e, após 6 min do início da reação, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 730 nm. O resultado de ABTS foi correlacionado com uma curva padrão de Trolox (1,25-10 µM).

Os resultados de ABTS e FC foram expressos em µmol de equivalente de Trolox (TE)/g de sólidos de hidrolisado proteico e mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de sólidos de hidrolisado proteico, respectivamente, na qual foram desconsiderados os sólidos do material de parede.

2.6 Análise estatística

Para avaliação conjunta dos dados, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP), considerando com variáveis ativas os parâmetros de cor (L*, C* e °h) e capacidade antioxidante, e como variável suplementar o tempo. Os resultados foram também avaliados empregando Análise Hierárquica de Agrupamento (AHA) com as variáveis ativas da ACP. Considerou-se como medida de dissimilaridade a distância Euclidiana e, como critério para formar os grupos, o agrupamento não ponderado aos pares. Para ambas as análises, utilizou-se o software Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabilidade dos hidrolisados proteico de okara durante estocagem

3.1.1 Microestrutura dos pós

As microestruturas externas das micropartículas dos hidrolisados proteicos de okara encapsuladas e não-encapsulada são apresentadas na Figura 1. Foram avaliadas no tempo inicial e final de 120 dias de estocagem a 35 °C.

A integridade das estruturas dos pós microencapsulados obtidos por *spray drying* para ambos os materiais de parede, maltodextrina e amido modificado, foi mantida durante a estocagem dos pós. As partículas apresentaram paredes contínuas sem rachaduras ou colapsos, o que é importante para garantir menor permeabilidade a gases e maior proteção e retenção do material ativo. Observou-se também algumas poucas partículas esféricas e lisas. As microscopias revelaram maior número de estruturas com formatos irregulares. Partículas obtidas por *spray dryer* são geralmente esferas ocas, e a formação de vacúolos pode ser causada pelo processo de encolhimento que ocorre após o endurecimento da superfície externa, seguido pela expansão das bolhas de ar que estão presas dentro da gotícula pulverizadas na câmara de secagem. Os mecanismos associados à formação de vazios estão relacionados com a expansão das partículas durante os últimos estágios do processo de secagem (Sarabandi *et al.*, 2018).

Diferentemente, o hidrolisado proteico controle, obtido pelo processo de liofilização, apresentou partículas irregulares e porosas, características de produtos liofilizados. Após 120 dias, observou-se a perda da integridade do produto, provavelmente devido à absorção de umidade do ambiente. Pelas micrografias, é possível observar que o hidrolisado proteico liofilizado apresenta características bem diferentes dos pós obtidos por *spray dryer*. Poucas partículas ficaram aderidas nos

suportes metálicos (stubs) e puderam ser observadas; as demais se fundiram devido ao ganho de umidade (Figura 1). Nas micrografias apresentadas não foi possível observar com nitidez o fenômeno de absorção de umidade; entretanto, tal comportamento foi verificado visualmente no momento da análise. A alta higroscopicidade do hidrolisado proteico controle foi proveniente da presença de peptídeos e açúcares de baixa massa molecular, que apresentam baixos valores de transição vítrea. Assim, o hidrolisado proteico liofilizado apresentou menor estabilidade física devido a maior capacidade de absorção de água durante o preparo das lâminas mesmo em condições de baixa atividade de água. A adição de materiais de parede com peso molecular e T_g mais elevados do que os peptídeos e açúcares presentes na amostra controle confere ao hidrolisado proteico melhor estabilidade dos pós durante o período de armazenamento.

3.1.2 Avaliação da cor e capacidade antioxidante

Nas Figuras 2 e 3 são apresentados os resultados das cinéticas dos parâmetros de cor (L^* , C^* e $^{\circ}h$) e capacidade antioxidante (método ABTS) e capacidade redutora (FC), respectivamente, durante estocagem dos pós a 35 °C por 120 dias.

Os hidrolisados proteicos encapsulados apresentaram luminosidade maior (L^* de 87) do que o controle (L^* de 76), em média, devido provavelmente pelo efeito da cor mais clara dos agentes encapsulantes. No decorrer do tempo de estocagem, para todas as amostras, não houve variação da luminosidade (Figura 2a).

Analisando a Figura 2b, observa-se que a amostra controle apresentou uma cor mais saturada (C^* de 29) que as amostras microencapsuladas (C^* de 11). O croma define o grau de pureza da cor (Silva *et al.*, 2017). A diferença de saturação de cor

das amostras microencapsulados pode ser relacionada à adição de maltodextrina e amido modificado que contribuíram para a mudança da cor do pó obtido por *spray drying*. Não houve variação da saturação da cor dos pós microencapsulados com maltodextrina e amido modificado ao longo do tempo de estocagem. Entretanto, pode-se observar que houve aumento de até 25% do C* da amostra controle estocado por 120 dias (Figura 2b).

Com relação à tonalidade cromática ($^{\circ}h$), observou-se que não houve alteração ao longo da estocagem para todas as amostras (Figura 2c). Em todos os tratamentos, os valores estão compreendidos entre 85 e 90 $^{\circ}$, tendendo à tonalidade de amarelo, sendo que a amostra controle apresentou uma tendência de tonalidade amarelo alaranjado e os pós microencapsulados apresentaram tonalidade amarelo.

Na Figura 3a é apresentado o comportamento das amostras encapsuladas e controle em relação à capacidade de sequestro dos radicais catiônicos ABTS. No período estudado, foi possível observar que os materiais apresentaram boa manutenção da capacidade antioxidante, mesmo sem a proteção do material de parede, cerca de 87% para o controle e 92% e 81% para as amostras encapsuladas com amido modificado e maltodextrina, respectivamente. Sarabandi *et al.* (2018) obtiveram hidrolisados de caseína utilizando alcalase e pancreatina, e microencapsularam com maltodextrina. Os autores observaram que, mesmo após o processo de microencapsulação, os pós de caseína hidrolisados mantiveram a capacidade antioxidante pelo método ABTS em 77,5% e 91,6%, respectivamente.

A avaliação da capacidade de redutora (Figura 3b) demonstrou que todas as amostras não sofreram alterações durante a estocagem. Os resultados indicam que, mesmo após 120 dias, os pós permaneceram com a mesma capacidade de redução do início da avaliação da estabilidade.

Observou-se um resultado inesperado em relação à amostra controle, que conseguiu manter a capacidade redutora e capacidade de sequestro de radicais livres durante o tempo do experimento (Figura 3). Apesar de a amostra controle ter sido submetida a um processo de secagem realizada a baixa temperatura (liofilização) do que o empregado para os microencapsulados (*spray drying*), esperava-se menor estabilidade do controle durante estocagem com redução da capacidade redutora uma vez que o material não estava protegido e ocorreu uma maior alteração na estrutura desse produto (Figura 1).

Para avaliar de forma global as características dos pós, empregou-se análise multivariada. Numa solução bidimensional, os componentes principais I e II explicaram 75% da variabilidade dos dados (Figura 4a). A AHA e ACP indicam separação em dois grupos: um grupo foi composto por amostras do tratamento controle (hidrolisado proteico não-encapsulado) alocado na região esquerda no gráfico, e outro pelos hidrolisados microencapsulados com maltodextrina e amido modificado, alocados à direita (Figuras 4a e 4c). Conforme discutido anteriormente na parte dos resultados de cinética (Figuras 2 e 3), nas condições estudadas, não se observou discriminação pelo tempo de estocagem, e as amostras microencapsuladas com os dois diferentes materiais de parede foram caracterizadas como semelhantes com relação à cor e capacidade antioxidante.

A CP1, responsável por 54% da variabilidade e pela separação dos grupos, foi negativamente associada ao croma e positivamente associada à luminosidade e tonalidade cromática. Assim, pode-se considerar que as amostras encapsuladas foram caracterizadas pela maior luminosidade e tonalidade cromática mais amarela, enquanto as amostras não encapsuladas (controle) apresentaram maior saturação.

A CP2 foi associada negativamente a FC e positivamente a ABTS e a variável suplementar tempo de estocagem (Figura 4b). Não se observou discriminação entre o controle e as amostras microencapsuladas com diferentes materiais de parede com relação a essa componente, indicando capacidade antioxidante similar.

Dessa forma, é possível afirmar que o processo de microencapsulação, independentemente do material de parede, afetou a cor do hidrolisado, mas não a sua capacidade antioxidante, que se manteve estável durante o período estudado. Verifica-se assim que foi possível microencapsular o hidrolisado empregando *spray dryer* sem perda de capacidade antioxidante.

4 CONCLUSÃO

A microencapsulação foi eficiente para manter a integridade física dos pós desde o início até os 120 dias de estocagem. As microcápsulas obtidas por *spray drying* usando maltodextrina 10DE ou amido modificado mantiveram a cor dos pós e apresentaram boa capacidade antioxidante pelo método ABTS e capacidade redutora (FC). A estocagem a 35 °C por 120 dias causou perda da integridade da estrutura do produto não encapsulado (controle), provavelmente devido à absorção de umidade do ambiente. Essa alteração não foi suficiente, no entanto, para causar alterações na capacidade antioxidante do material controle, assim nas condições do estudo não foi possível verificar um efeito da proteção pela microencapsulação, sendo necessários estudos adicionais em diferentes condições para se avaliar o potencial de proteção. Não houve diferença em relação ao tipo de material de parede utilizado para a microencapsulação do hidrolisado proteico de okara.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001; pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do CNPq (473117/2013-4); e pela Fundação Araucária (160/2014). LEK, MTB e EII são bolsistas produtividade do CNPq.

REFERÊNCIAS

Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food protein*. London: Elsevier Applied Science Publishers.

Botrel, D. A., Borges, S. V., Barros F. V., Dantas, A. V., Costa, M. G. J., & Marques, G. R. (2012). Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(11), 2289–2296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03100.x>

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (2012). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington: AOAC.

Costa, J. M. G., Borges, S. V., Hijo, A. C. T., Silva, E. K., Marques, G. R., Cirillo, M. Â., & Azevedo, V. M. (2013). Matrix structure selection in the microparticles of essential oil oregano produced by spray dryer. *Journal of Microencapsulation*, 30(8), 717–727. <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.778909>

Costa, J. M. G., Silva, E. K., Toledo Hijo, A. C., Azevedo, V. M., Malta, M. R.,

Ferreira Alves, J. G. L., & Borges, S. V. (2015). Microencapsulation of Swiss cheese bioaroma by spray-drying: Process optimization and characterization of particles. *Powder Technology*, *274*, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.01.037>

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, *40*(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>

Gomes Da Costa, J. M., Silva, E. K., Toledo Hijo, A.C., Azevedo, V. M., & Borges, S. V. (2015). Physical and Thermal Stability of Spray-Dried Swiss Cheese Bioaroma Powder. *Drying Technology*, *33*(3), 346–354. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.952376>

Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. A. (2012). A New Technique for Spray-Dried Encapsulation of Lycopene. *Drying Technology*, *30*, 641–652. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.655871>

Hoyos-Leyva, J. D., Bello-Pérez, L. A., Alvarez-Ramirez, J., & Hugo, S. (2018). Microencapsulation using starch as wall material: A review. *Food Reviews International*, *34*(2), 148–161. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1261298>

Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M. S., & Nakayama, T. (2002). Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(2), 373–377. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf010938r>

Labuza, T. P., & Schmidl, M. K. (1985). Accelerated shelf-life testing of foods. *Food Technology*, 39(9), 57–62. <http://www.nal.usda.gov/>

Rocha, G. A., Trindade, M. A., Netto, F. M., & Favaro-Trindade, C. S. (2009). Microcapsules of a casein hydrolysate: Production, characterization, and application in protein bars. *Food Science and Technology International*, 15(4), 407–413. <https://doi.org/10.1177/1082013209346042>

Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90(1–2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.037>

Sarabandi, K., Sadeghi, A., Hamishekar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S.M. (2018). Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical, antioxidant and microstructure properties. *Journal of Food Engineering*, 237, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.036>

Silva, E. K., Toledo Hijo, A. C., Costa, J. M. G., Marques, G. R., Pereira, J., & Borges, S. V. (2017). Influence of the addition of microencapsulated Swiss cheese bioaroma on the technical and sensory qualities of cheese bread. *International Journal of Dairy Technology*, 70(3), 372–379. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12358>

Souza, A. L. R., Hidalgo-Chávez, D. W., Pontes, S. M., Gomes, F. S., Cabral, L. M. C., & Tonon, R. V. (2018). Microencapsulation by spray drying of a lycopene-rich tomato concentrate: Characterization and stability. *LWT - Food Science and Technology*, *91*, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.053>

Subtil, S. F., Rocha-Selmi, G., Thomazini, M., Trindade, M., Netto, F. M., & Favaro-Trindade, C. S. (2014). Effect of spray drying on the sensory and physical properties of hydrolysed casein using gum arabic as the carrier. *Journal of Food Science Technology*, *51*(9), 2014–2021. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-012-0722-z>

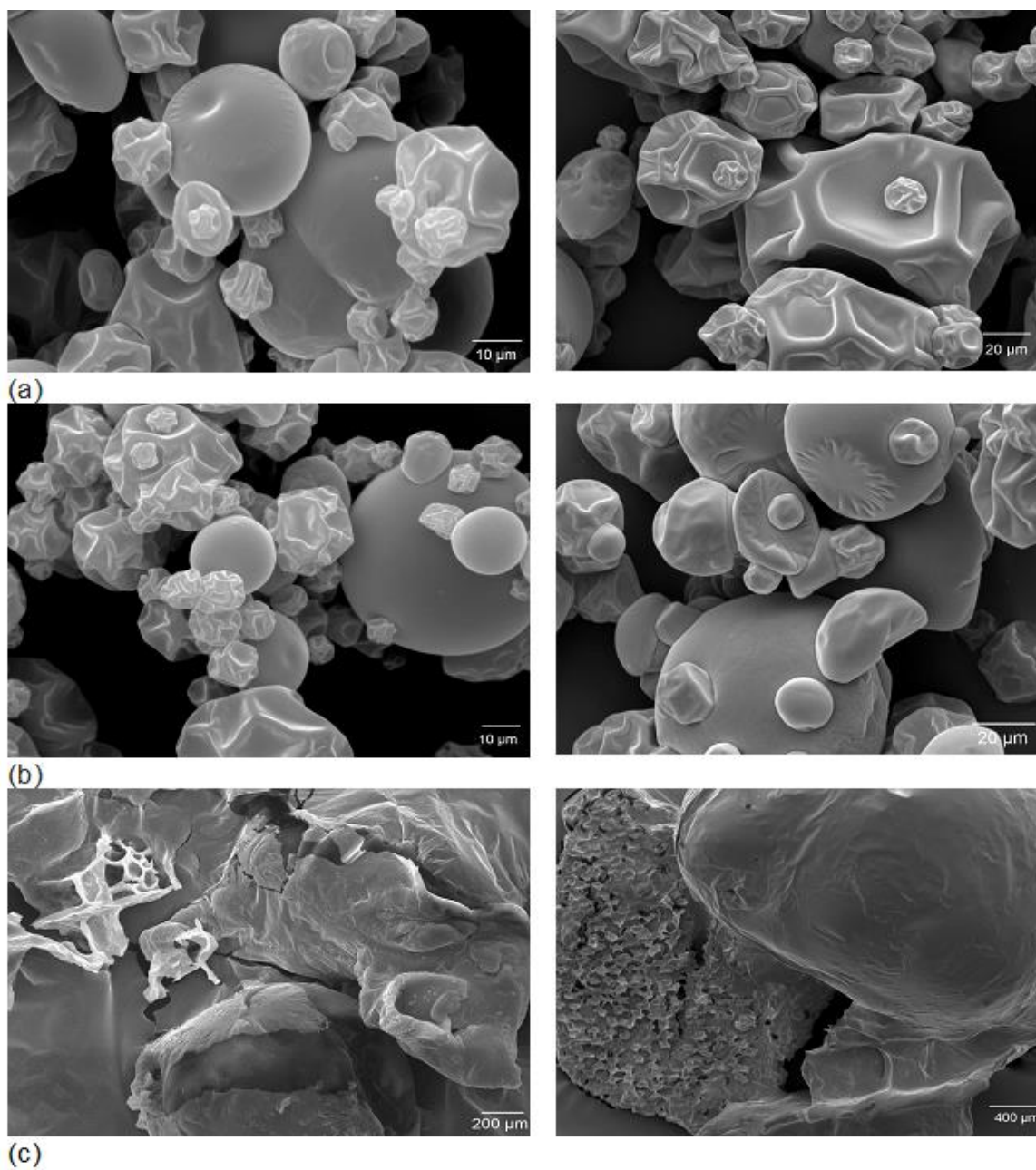
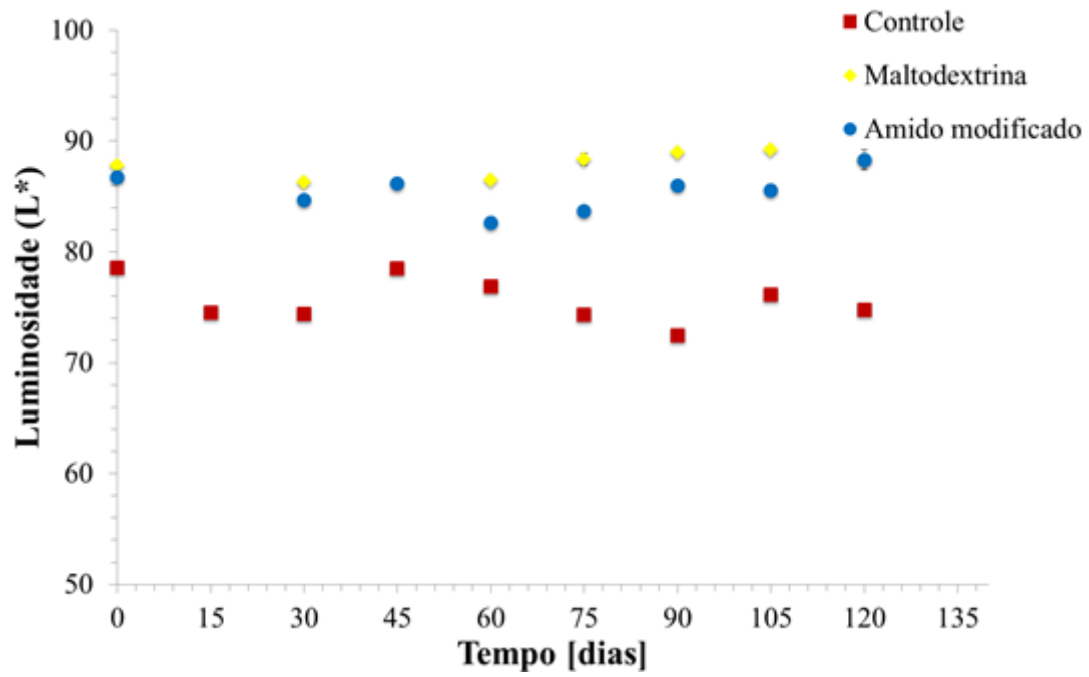
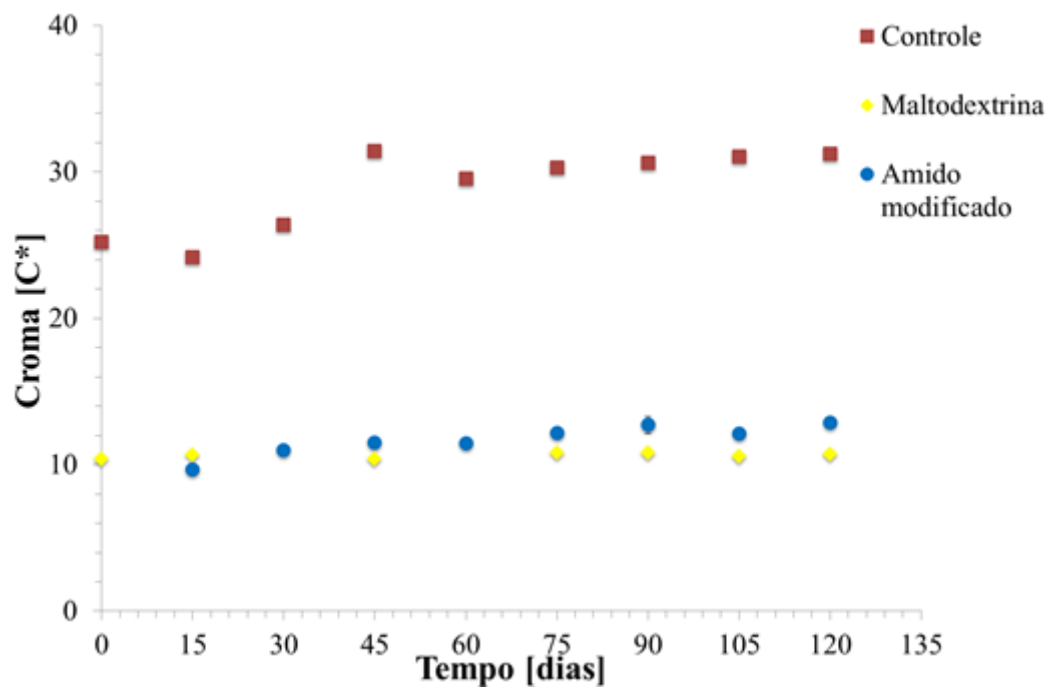


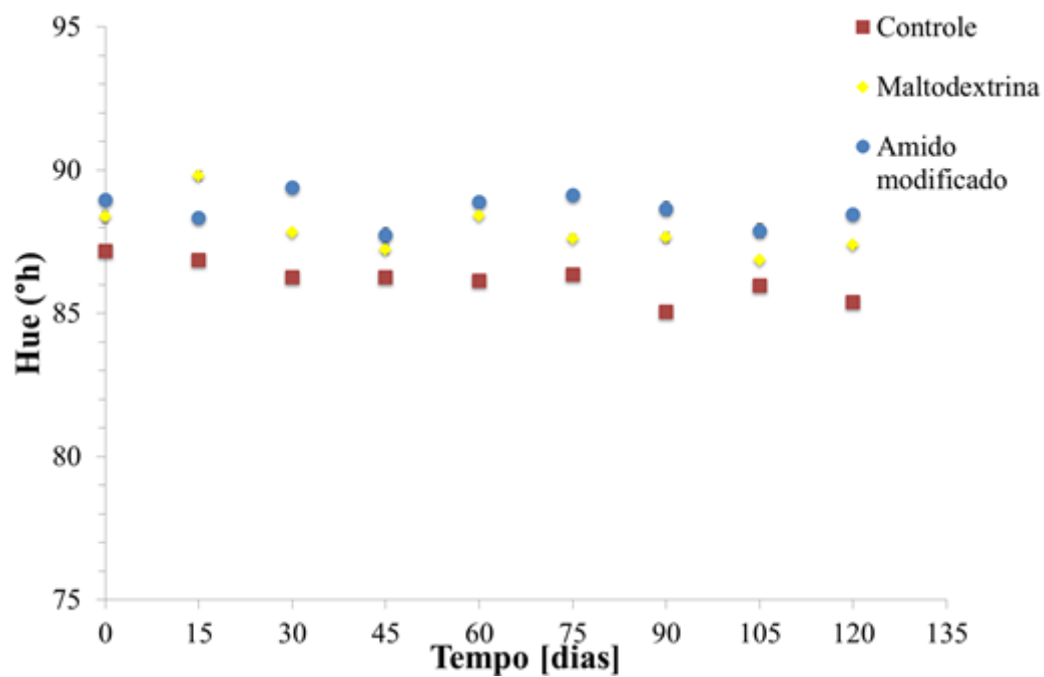
Figura 1. Micrografias eletrônicas de varredura dos hidrolisados proteicos microencapsulados com amido modificado (a) e maltodextrina (b), bem como a amostra controle (c).



(a)

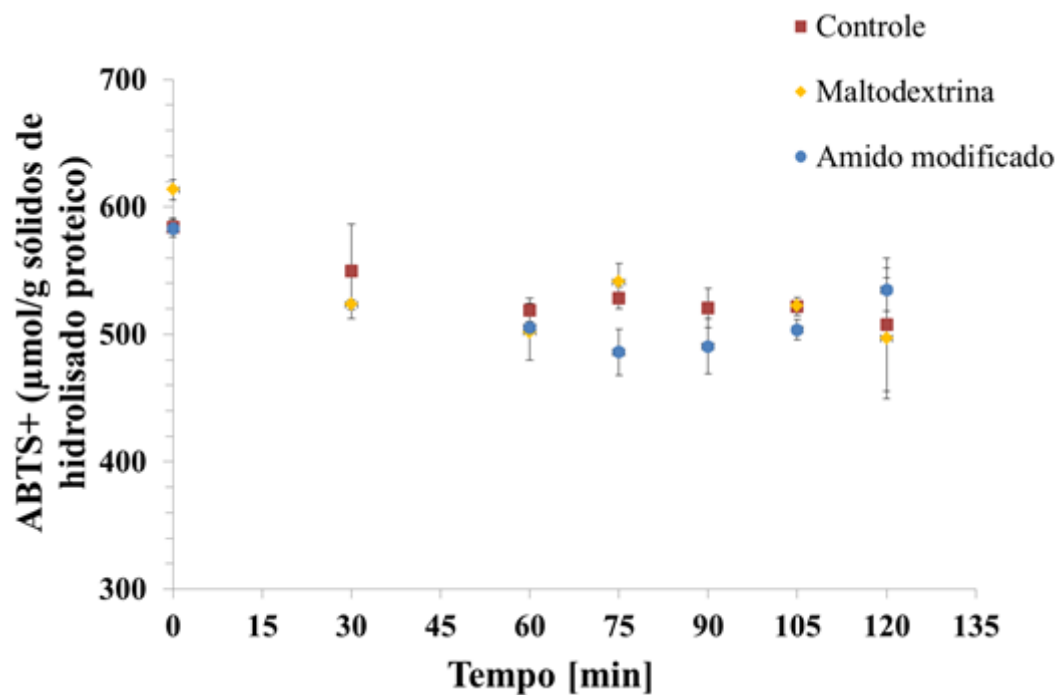


(b)

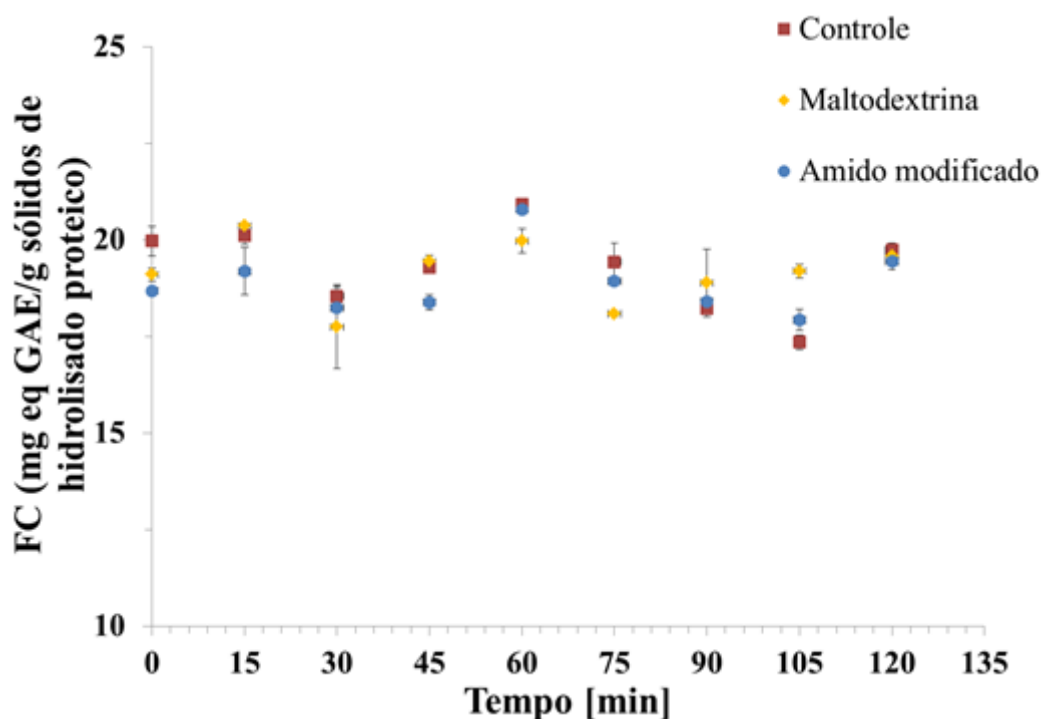


(c)

Figura 2. Cinética dos parâmetros de cor dos hidrolisados proteicos de okara microencapsulados com maltodextrina e amido modificado Capsul® durante estocagem a 35°C. Controle é referente à amostra liofilizada não-microencapsulada: (a) luminosidade L*, (b) croma (C*) e (c) tonalidade cromática (°h)

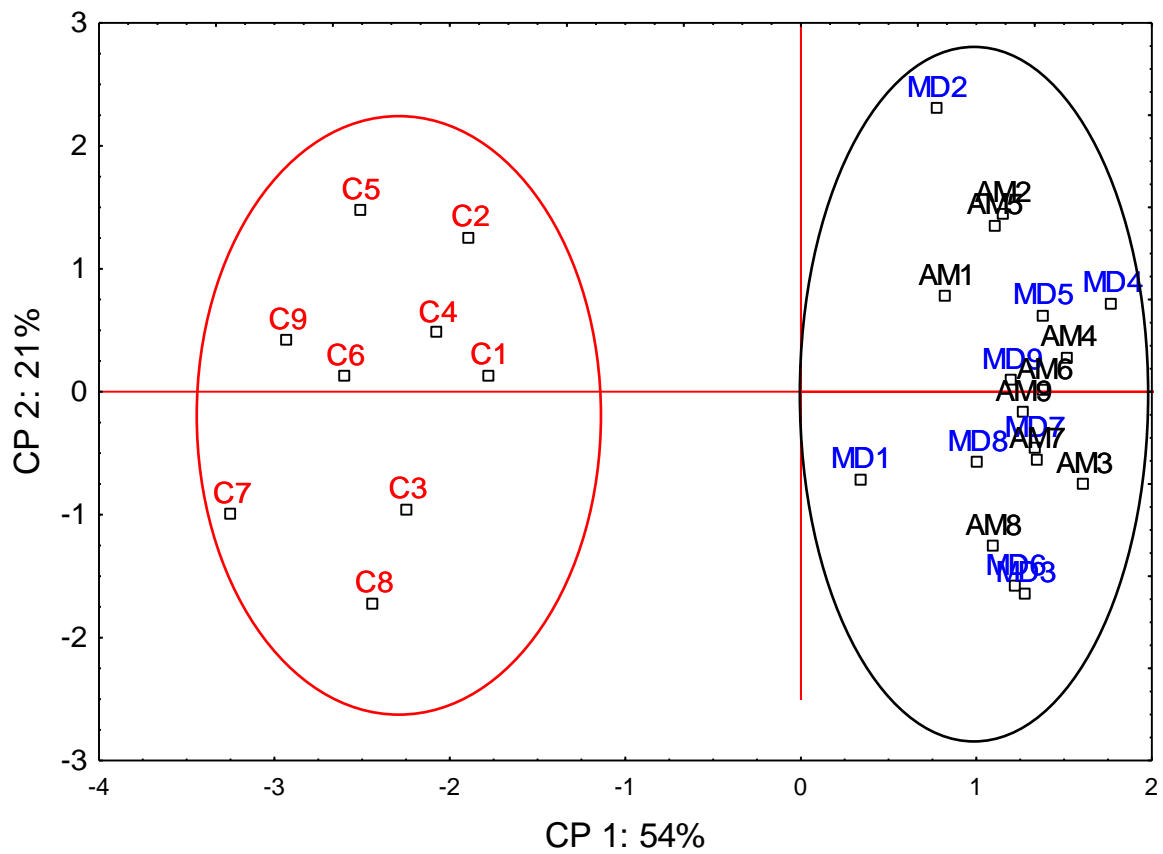


(a)

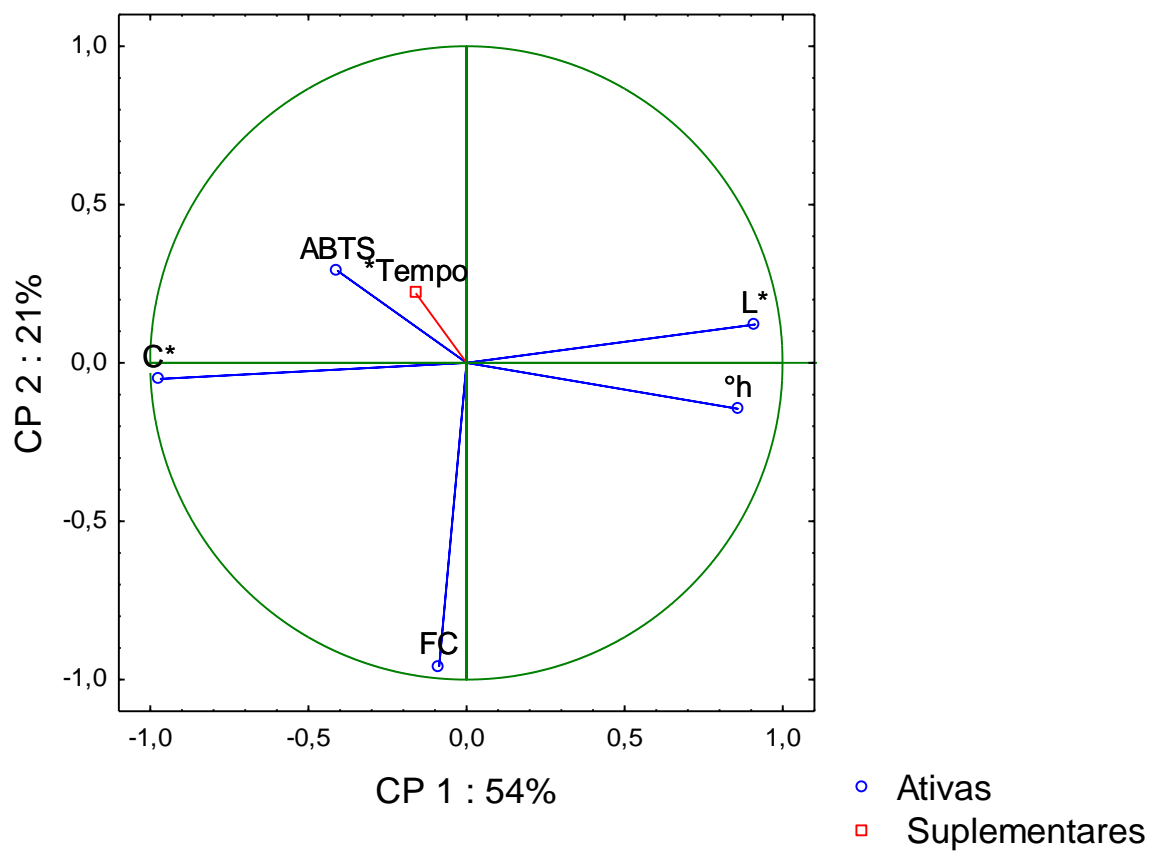


(b)

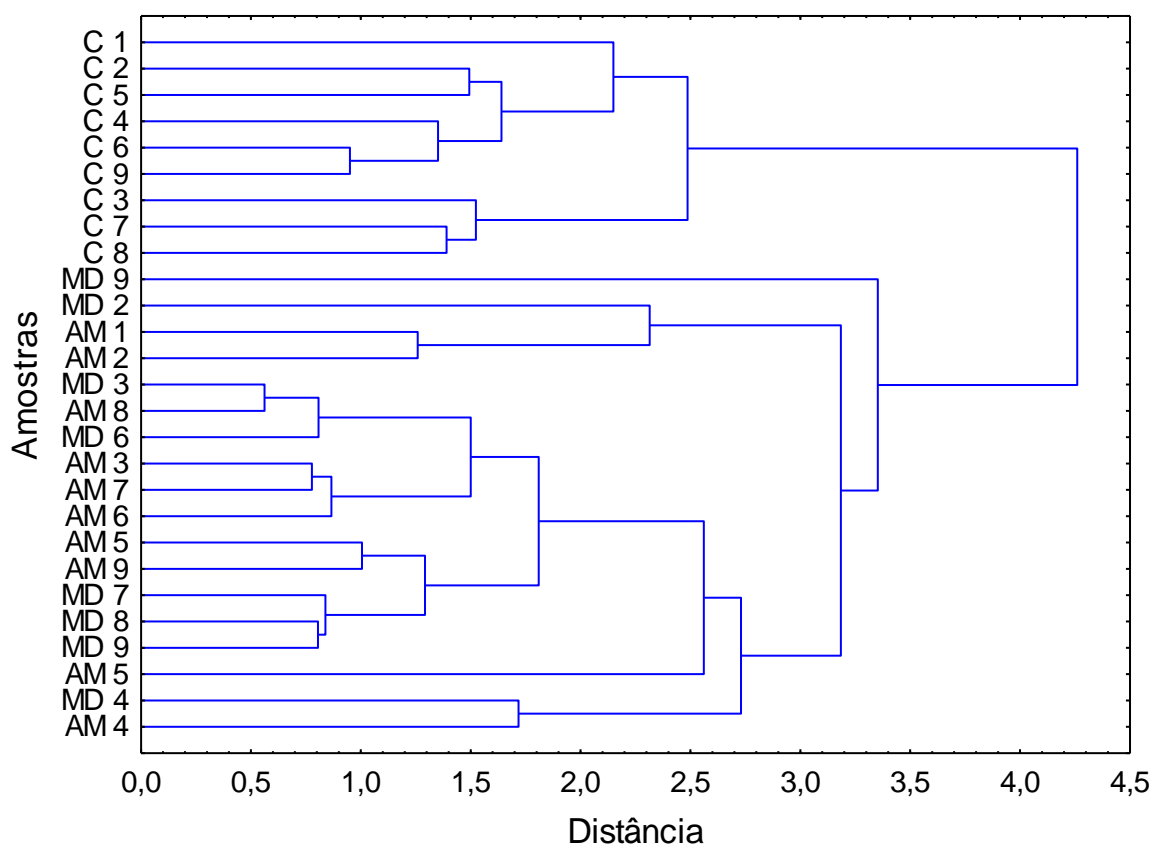
Figura 3. Cinética da capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos de okara microencapsulados com maltodextrina e amido modificado Capsul® durante estocagem a 35°C. Controle é referente à amostra liofilizada não-microencapsulada: (a) métodos ABTS e (b) capacidade redutora (FC). GAE é o equivalente de ácido gálico.



(a)



(b)



(c)

Figura 4. Hidrolisados proteicos de okara caracterizados pela cor e capacidade antioxidante: Projeção das amostras (a) e variáveis (b) pela Análise de Componentes Principais e Dendrograma para definição dos agrupamentos (c).

Amostras: Letras maiúsculas identificam tratamento (C: controle; AM: amido modificado; MD: maltodextrina), e números o tempo de estocagem (1-0 dia; 2-15 dias; 3-30 dias; 4-45 dias; 5-60 dias; 6-75 dias; 7-90 dias; 8-105 dias; 9-120 dias)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo indicam que a hidrólise das proteínas de okara mostrou ser um processo promissor para o aproveitamento do coproduto do extrato de soja e, também, para a obtenção de peptídeos bioativos. Os hidrolisados obtidos apresentaram maior capacidade antioxidante, boa qualidade de aminoácidos essenciais e excelente perfil e disponibilidade de isoflavonas agliconas e isoflavonas β -glicosídicas do que a okara não hidrolisada.

A capacidade antioxidante dos pós de hidrolisados proteicos de okara foi preservada com a microencapsulação dos peptídeos. A adição de material de parede na microencapsulação foi favorável para aumentar a T_g e conseqüentemente, melhorar a estabilidade dos pós. Com o estudo da temperatura de transição vítrea e das isotermas de sorção foi possível avaliar e determinar as condições críticas de estocagem dos pós.

O estudo da estabilidade dos pós microencapsulados demonstrou que a integridade física dos pós se manteve íntegra ao longo do período de 120 dias à 35°C. No entanto, o hidrolisado não encapsulado (controle) apresentou resultado inesperado em relação à capacidade antioxidante. Era esperado que os pós não encapsulados tivessem menos capacidade de preservação dos compostos antioxidantes do que os microencapsulados, no entanto, tal fato não foi verificado.

7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Outros estudos poderiam ser realizados para complementar os resultados obtidos neste estudo com o hidrolisado de proteína de okara microencapsulados, como: aplicar os pós de hidrolisados de proteína de okara em uma matriz alimentícia para avaliar a capacidade antioxidante dos hidrolisados microencapsulados e estabilidade durante um período de tempo; realizar a análise sensorial do hidrolisado proteico em pó para verificar a eficiência do processo de microencapsulação em mascarar o sabor amargo dos peptídeos e, avaliar a adição de diferentes agentes carreadores e em diferentes proporções sobre a estabilidade e propriedades físico-químicas do produto final.