



DEPOSIÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE ARROZ NA SUPERFÍCIE DE MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO DE LINHAÇA OBTIDAS POR SPRAY DRYING

Palavras-Chave: [Microencapsulação], [hidrólise enzimática], [emulsão]

Autores/as:

Lucas Eidi Takitani [Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP]

Orientadora Profa. Dra. Louise Emy Kurozawa [Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP]

Co-orientador Mestre Matheus Gouveia [Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP]

1. INTRODUÇÃO:

Óleos com propriedades funcionais são muito suscetíveis à degradação pelo ambiente e de difícil manuseio durante os processos. Como alternativa para aumentar a vida útil desses alimentos, as indústrias estão optando pela técnica de microencapsulação. A microencapsulação consiste basicamente em um revestimento de um núcleo funcional (material ativo) por uma membrana semipermeável fina (material de parede), e pode ser feito por diversos processos, sendo a secagem spray drying um dos processos mais empregados na indústria de alimentos (SARAO; ARORA, 2017).

A capacidade do material de parede de produzir micropartículas estáveis é altamente relacionado com suas propriedades emulsificantes. A maltodextrina é um material de parede bastante utilizado pelas indústrias. No entanto, sua baixa propriedade interfacial é um problema quando utilizado isoladamente. Por isso, são usados acompanhados de proteínas emulsificantes. A aplicação de proteínas vegetais como material de parede tem sido amplamente estudada como alternativa de proteínas animais. Um dos motivos destes surfactantes de origem animal serem mais utilizadas é menor tamanho molecular, o que confere maior estabilidade às gotas da emulsão e podem migrar mais facilmente para a superfície da gotícula da solução durante a secagem no spray dryer, formando uma barreira à volatilização de compostos voláteis e à entrada de oxigênio (ZANG et al., 2019).

Para aumentar a eficiência das proteínas vegetais como material de parede, alguns autores propõem tratar a proteína com hidrólise enzimática limitada, produzindo peptídeos com maior solubilidade, melhores propriedades emulsificantes, maior flexibilidade e capacidade de retenção de óleo e água (GOMES; KUROZAWA, 2020; NESTERENKO et al., 2014). Tais estudos ainda mostram que, devido a sua maior solubilidade e menor tamanho molecular, os hidrolisados proteicos podem difundir e se propagar mais facilmente para as interfaces óleo-água e partícula-ar. A proteína de arroz isolada a partir do farelo de arroz, que é biodegradável e de baixo custo, ao ser hidrolisada pode ser uma alternativa como material de parede, conforme apresentado por Gomes e Kurozawa (2020).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo é investigar a capacidade da proteína isolada de arroz e seus hidrolisados em microencapsular o óleo de linhaça em uma matriz com maltodextrina via spray drying, e avaliar a capacidade e os mecanismos de migração da proteína de arroz não-hidrolisada e hidrolisadas nas superfícies das micropartículas durante sua formação.

2. METODOLOGIA:

Como composto ativo hidrofóbico, foi utilizado óleo de linhaça altamente suscetível à oxidação lipídica. Maltodextrina (MOR-REX® 1910, 10 DE, Ingredion, Brazil) foi usada como material de parede e, como componente com atividade superficial, a proteína isolada de arroz (PIA) (Gramkow, Joinville, Brasil). Os demais materiais utilizados foram de grau analítico. No processo de hidrólise do isolado proteico de arroz, foi utilizada a protease Protamex®.

2.1. Hidrólise enzimática da proteína isolada de arroz e caracterização dos hidrolisados proteicos

A hidrólise enzimática da proteína foi realizada pelo procedimento de pH-stat (ADLER-NISSEN, 1986). As propriedades dos hidrolisados com diferentes graus de hidrólise (GH) de 3% (GH3), 6% (GH6) e 10% (GH10) e a proteína isolada (PIA) foram analisadas quanto à: Solubilidade (Bera e Mukherjee, 1989); Carga superficial (microeletroforese de partículas Zetasizer Nano Series, Malvern Instruments, Reino Unido); Distribuição do peso molecular com SDS-PAGE para proteína isolada de arroz (Laemmli, 1970) e para os hidrolisados proteicos (Schägger e von Jagow (1987) com pequenas modificações de GOMES e KUROZAWA (2020)).

2.2. Estudo e caracterização das emulsões

Foram preparadas duas emulsões para cada hidrolisado com diferentes Graus de hidrólise (GH), em concentrações de proteínas de 1% e 2% e concentração de sólidos fixada em 35% parede (maltodextrina + proteína ou hidrolisado proteico) (GOMES; KUROSZAWA, 2020) com 10% de óleo homogeneizado com Ultra-Turrax.

Então, um total de 6 emulsões (GH3-1%, GH3-2%, GH6-1%, GH6-2%, GH10-1%, GH10-2%) e 2 emulsões controle utilizando a proteína isolada de arroz (PIA-1%, PIA-2%) foram avaliadas quanto à: Estabilidade cinética da emulsão pelo índice de cremeação (IC); Distribuição do tamanho das gotas de óleo, diâmetro médio das gotas e índice de polidispersidade (IPD) pela técnica de difração de laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido); Carga superficial elétrica das gotículas de óleo (microeletroforese de partículas Zetasizer Nano Series, Malvern Instruments, Reino Unido); Índice de estabilidade da emulsão (IEE) e Índice de atividade emulsificante (IAE) (PEARCE; KINSELLA, 1978).

2.3. Secagem e caracterização das propriedades tecnológicas das micropartículas

Foram realizadas a secagem e microencapsulação de todas as amostras em um spray dryer em escala laboratorial (Lab Plant SD-06A, North Yorkshire, Reino Unido). As soluções foram bombeadas para o spray dryer à temperatura ambiente, com uma vazão de entrada de 485 mL/h e a temperatura do ar de entrada de 180°C (GOMES; KUROSZAWA, 2020). Após isso, as micropartículas obtidas foram caracterizadas de acordo com: Eficiência de encapsulação (EE) (BAE; LEE, 2008); Diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula pelo método de difração de laser (Mastersizer Hydro 2000 MU - Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK); e Atividade de água (Novasina AG Ziirich, Switzerland).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. Hidrólise e caracterização das proteínas hidrolisadas

O comportamento da hidrólise da proteína isolada de arroz (PIA) em função do tempo é descrita na Figura 1.

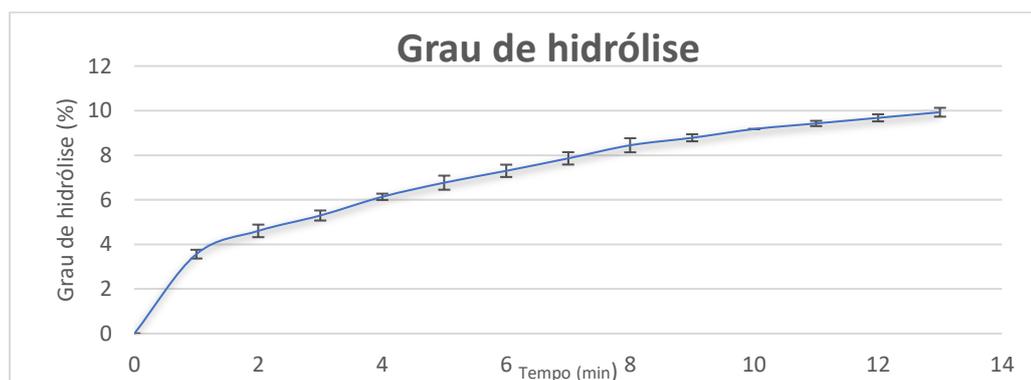


Figura 1 – Cinética do grau de hidrólise (GH) hidrólise em função do tempo

A enzima Protamex possui ambas atividades de endopeptidase e exoprotease, catalisando a clivagem das ligações amina e éster, causando alterações nas propriedades funcionais da proteína (NESTERENKO et al., 2014). A cinética da hidrólise inicia com maior velocidade pela quebra das ligações peptídicas seguido da hidrólise de proteínas mais compactas, causando a diminuição da velocidade (NGUYEN et al., 2011). O impacto da hidrólise na distribuição do peso molecular pode ser observado na Figura 2.

A distribuição de peso molecular da proteína isolada de arroz (PIA) apresentou possíveis frações de polipeptídeos de prolamina (10, 13 e 16kDa), globulina (16 e 26 kDa) e glutenina (~40 kDa), que são amplamente relatadas na proteína de arroz (AMAGLIANI et al., 2017). Nos hidrolisados foi perceptível apenas peptídeos menores que 14 kDa, em específico os de peso de ~6 kDa. A partir desses resultados, pode-se concluir que a alta especificidade da enzima Protamex por ligações peptídicas foi capaz de produzir peptídeos de menor peso molecular como foi observado em outros estudos (NGUYEN et al., 2011; ZHENG et al., 2015).

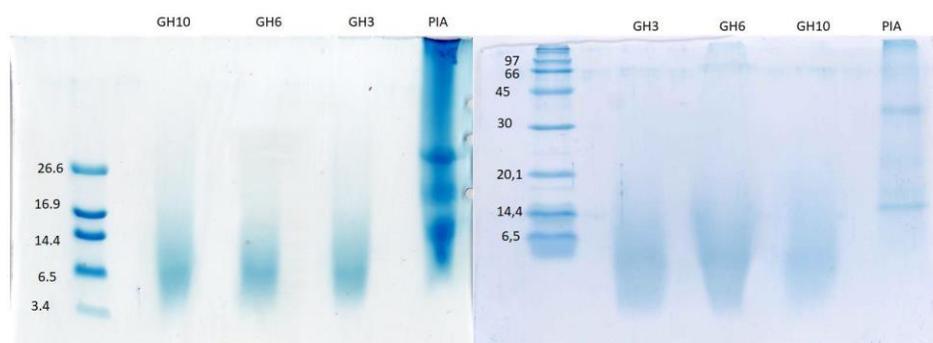


Figura 2- Tris-tricina SDS-PAGE da proteína de arroz isolada (PIA) e dos hidrolisados (GH3, GH6 e GH10)

3.1.1. Efeito da hidrólise enzimática na solubilidade e carga superficial da proteína

A solubilidade da proteína é um importante parâmetro para a formação de emulsões estáveis para a produção de micropartículas e é altamente dependente do estado físico químico que se encontra a proteína, como o pH. Percebe-se que o aumento do grau de hidrólise aumentou a solubilidade da proteína em todos os pH, uma vez que a hidrólise libera peptídeos solúveis de agregados insolúveis e aumenta a quantidade de grupos carboxil e amina ionizáveis (MOKNI GHRIBI et al., 2015). Além disso tanto o PIA quanto os hidrolisados apresentaram melhor solubilidade em meio básico, que pode ser descrito melhor com o estudo da carga superficial.

A partir da análise de Potencial Zeta, que mede a carga resultante na interface da proteína, observou-se que as cargas resultantes do PIA e dos hidrolisados é quase neutra quando está próximo do pH 4 (ponto isoelétrico). Proteínas com módulo da carga superficial acima de ± 30 mV são mais prováveis de se manterem solubilizadas, devido ao aumento de grupos ionizáveis e forças de repulsão eletrostáticas, evitando agregação e precipitação por meio de interações hidrofóbicas (GALVES et al., 2021; PARKIN; FENNEMA; CLADERA-OLIVERA, 2010).

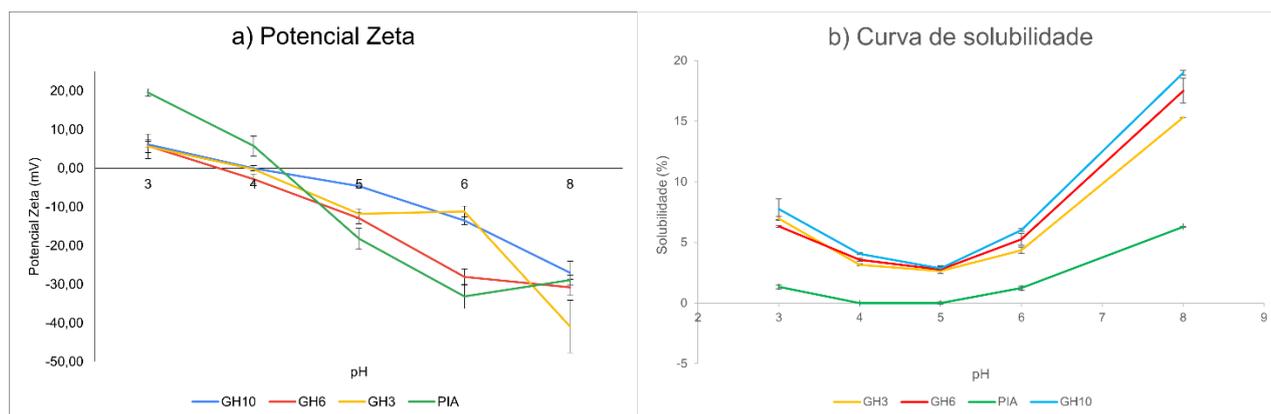


Figura 3 – Avaliação da Proteína de arroz isolada (PIA) e hidrolisados (GH3, GH6, GH10) em relação a a) Potencial Zeta e b) Solubilidade

3.2. Caracterização da emulsão de óleo de linhaça estabilizada por proteína de arroz e hidrolisados

O processo de homogeneização produziu emulsões com dispersão de tamanho de gota unimodal com o aumento do Índices de polidispersidade (IPD) relacionado ao aumento do GH ($1,85 \pm 0,04$ do PIA-1% a $2,10 \pm 0,03$ do GH10-1%). Em ambas as concentrações, a hidrólise se mostrou capaz de diminuir o tamanho de gota de óleo da emulsão, apesar do tempo de hidrólise não ter causado diferença considerável (Tabela 1). Além disso, esperava-se que houvesse correlação negativa entre o tamanho de gota e a concentração da proteína, pois maior concentração de proteínas na interface é capaz de romper gotas na emulsificação e evitar coalescência (MCCLEMENTS, 2004). Porém esse fenômeno ocorreu apenas entre o PIA-1% e PIA-2%. Joye e McClements (2014) também se deparou com esse efeito adverso com emulsão estabilizada por glúten hidrolisado (3%) por tripsina ao aumentar a concentração de 1% a 2,5% de proteína.

Gotículas de óleo maiores geralmente aceleram a separação de fases devido à ação gravitacional, favorecendo o fenômeno de cremação (DAMODARAN, 2005). Essa relação pôde ser vista na análise de Índice de cremação (IC) das emulsões à concentração de 1%. Contudo, a cremação é um dos efeitos precursores da coalescência, que tem relação positiva com o tamanho de gota e negativa com a tensão interfacial (DAMODARAN, 2005), e que pode ser o responsável pelo estreitamento da coluna de cremação ao longo do tempo. Por esse motivo, as emulsões com 2% de proteínas apresentaram maior IC em relação às de 1%, devido à menor taxa de coalescência e, conseqüentemente, menor estreitamento da fase de óleo ao longo do tempo. Esse fenômeno também explica os valores de IC dos hidrolisados maiores do que da proteína intacta nas emulsões de 2%.

Os hidrolisados apresentaram melhor estabilidade (ESI) e atividade emulsificante (EAI) em comparação com a proteína nativa (Tabela 1). Os melhores resultados de EAI e ESI foi o GH10, em ambas as concentrações. Além disso, observou correlação positiva entre a estabilidade da emulsão e o grau de hidrólise.

	D [3,2] (μm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	EAI (m^2/g)	ESI (min)	
1%	PIA	$9,3 \pm 0,37$	$1,85 \pm 0,04$	$-21,5 \pm 2,5$	$5,4 \pm 0,9$	$15,4 \pm 0,9$
	GH3	$8,25 \pm 0,21$	$1,95 \pm 0,12$	$-13,9 \pm 1,6$	$11,7 \pm 0,2$	$59,7 \pm 4,3$
	GH6	$8,71 \pm 0,45$	$2,06 \pm 0,15$	$-16,2 \pm 2$	$12,9 \pm 0,5$	$77,3 \pm 5,5$
	GH10	$8,44 \pm 0,82$	$2,10 \pm 0,03$	$-19,5 \pm 1,2$	$14,4 \pm 0,2$	$187,9 \pm 3,5$
2%	PIA	$12,01 \pm 0,27$	$1,56 \pm 0,08$	$-17,1 \pm 2,3$	$4,9 \pm 0,4$	$20,9 \pm 2,8$
	GH3	$8,89 \pm 1,06$	$1,91 \pm 0,22$	$-16,7 \pm 2,3$	$11,1 \pm 0,4$	$103,7 \pm 12,1$
	GH6	$8,2 \pm 0,37$	$2,08 \pm 0,02$	$-29,8 \pm 1,9$	$11,4 \pm 0,3$	$141,8 \pm 25,9$
	GH10	$9,02 \pm 0,55$	$1,99 \pm 0,08$	$-16,0 \pm 1,8$	$12,3 \pm 0,5$	$267,1 \pm 21,8$

Tabela 1 - Avaliação das emulsões de acordo com o Tamanho de gota ($D[3,2]$), índice de polidispersidade (IPD), Potencial Zeta, Índice de atividade emulsificante (IAE) e Índice de estabilidade da emulsão (IEE)

A carga superficial das gotas de óleo com maior módulo foi a da emulsão de GH3 (2%) de $-29,8 \pm 1,9$ mV (Tabela 1). As outras emulsões atingiram valores baixos de carga superficial, que foram de $-16,0 \pm 1,8$ mV a $-21,5 \pm 2,5$ mV, e esperava-se que isso fosse refletido na estabilidade emulsificante. Porém não se identificou tal relação. Em relação à estabilidade da emulsão, provavelmente a contribuição da exposição de grupos hidrofóbicos proveniente do aumento do grau de hidrólise superou a contribuição das interações hidrofílicas, que foi mostrado na análise de potencial Zeta.

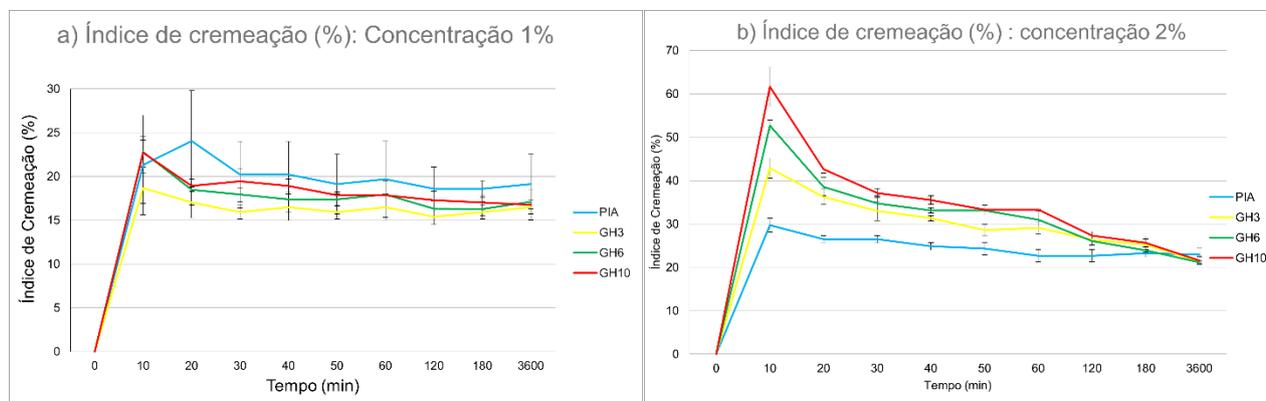


Figura 4 - Índice de cremação (IC) das emulsões de concentração a) 1% e b) 2%

3.3. Microencapsulação do óleo de linhaça e caracterização das propriedades tecnológicas das micropartículas

A eficiência de encapsulação (EE) avalia, a partir da quantidade de óleo superficial, a habilidade do material de parede em conter o óleo na microcápsula. A concentração da proteína possui um importante papel na secagem, pois, além de melhorar a estabilidade da emulsão, durante a secagem por spray drying, o aumento da concentração de proteína reduz o tempo para formar uma crosta semipermeável na interface ar/gotícula, dificultando a difusão do óleo para superfície (DI GIORGIO; SALGADO; MAURI, 2019). Esse fenômeno foi observado no aumento da EE das emulsões de 1% para 2% (Tabela 2).

Emulsões com maior tamanho de gota costumam ser mais suscetíveis à ruptura durante o processo de atomização, produzindo microcápsulas com menor EE (GOMES; KUROSZAWA, 2020). Esse comportamento foi observado nos pós contendo GH3-1% e GH6-2%. Contudo, apesar das propriedades emulsificantes terem melhorado com o grau de hidrólise, os hidrolisados de GH10 não foram eficientes em encapsular o óleo durante a secagem (GH10-1%: $16,6 \pm 2,3$ e GH10-2%: $21,8 \pm 1,9$). Isso pode ser explicado pelo fato de que pequenos peptídeos formados na hidrólise mais extensa não podem envolver com eficiência as gotículas de óleo na emulsão e formar um filme e, portanto, a retenção de óleo durante o spray drying é prejudicada (NESTERENKO et al., 2014).

A distribuição do tamanho da partícula influencia em propriedades como molhabilidade e dispersibilidade. As partículas apresentaram alto Índice de polidispersidade da partícula (IPDP), com valores de tamanho de gota entre 1 e 200 μm sem um pico predominante. Além disso, o tamanho médio das partículas (de $38,6 \pm 1,1$ μm a $69,6 \pm 0,1$ μm) foi relativamente alto comparado com outras micropartículas de proteínas vegetais (AVRAMENKO; LOW; NICKERSON, 2013; GALVES et al., 2021). O tamanho da partícula depende do método de atomização, concentração de alimentação, viscosidade da emulsão e das condições de secagem (JAFARI et al., 2008), parâmetros que não foram analisados neste estudo.

Com exceção das micropartículas de PIA-1% e GH10-2%, a atividade da água dos pós foi inferior a 0,1, apresentando estabilidade a reações deteriorantes quanto ao crescimento microbiano, reações bioquímicas e propriedades físicas (AVRAMENKO; LOW; NICKERSON, 2013).

Concentração (m/m)	Grau de hidrólise (%)	Tamanho da partícula (μm)	IPDP	EE (%)	A_w
1%	PIA	$40,5 \pm 3,3$	$6,65 \pm 0,55$	$16,8 \pm 0,4$	$0,085 \pm 0,002$
	GH3	$38,6 \pm 1,1$	$6,22 \pm 0,22$	$33,5 \pm 4,2$	$0,093 \pm 0,001$
	GH6	$43,1 \pm 0,1$	$5,51 \pm 0,79$	$12,5 \pm 4,0$	$0,096 \pm 0,008$
	GH10	$41,1 \pm 2,4$	$6,12 \pm 0,69$	$16,6 \pm 2,3$	$0,086 \pm 0,016$
2%	PIA	$36,0 \pm 0,4$	$5,82 \pm 0,06$	$25,9 \pm 0,2$	$0,117 \pm 0,008$
	GH3	$69,6 \pm 0,1$	$5,40 \pm 0,21$	$44,2 \pm 1,7$	$0,062 \pm 0,007$
	GH6	$54,3 \pm 2,9$	$7,49 \pm 0,12$	$38,9 \pm 5,1$	$0,060 \pm 0,004$
	GH10	$57,2 \pm 6,3$	$5,71 \pm 0,17$	$21,8 \pm 1,9$	$0,112 \pm 0,003$

Tabela 2- Avaliação das micropartículas quanto ao tamanho da partícula $D[4,3]$, Índice de polidispersidade da partícula (IPDP), Eficiência de Encapsulação (EE), Atividade de água (A_w).

4. CONCLUSÕES:

O processo de secagem produziu micropartículas com alta dispersão de tamanho de partícula e tamanho médio relativamente grande, comparado com outros trabalhos que usaram proteínas vegetais como materiais de parede. Além disso, nenhum hidrolisado da proteína de arroz foi capaz de reter mais que 50% do óleo após a secagem, mostrando-se um material de parede com baixa eficiência em proteger o óleo de linhaça. Contudo, o processo de hidrólise foi capaz de diminuir o tamanho de gota de óleo da emulsão e melhorar as propriedades emulsificantes da proteína, apesar dessa melhoria não ter sido expressiva nas características do pó.

5. BIBLIOGRAFIA

- ADLER-NISSEN, J. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers, p. 427, 1986.
- AMAGLIANI, L. et al. The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 64, p. 1–12, 2017.
- AVRAMENKO, N. A.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 162–169, 2013.
- DAMODARAN, S. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. **Journal of food science**, v. 70, n. 3, p. 54–66, 2005.
- DI GIORGIO, L.; SALGADO, P. R.; MAURI, A. N. Encapsulation of fish oil in soybean protein particles by emulsification and spray drying. **Food Hydrocolloids**, v. 87, n. September 2018, p. 891–901, 2019.
- GALVES, C. et al. Improving the emulsifying property of potato protein by hydrolysis: an application as encapsulating agent with maltodextrin. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 70, n. January, p. 102696, 2021.
- GOMES, M. H. G.; KUROZAWA, L. E. Improvement of the functional and antioxidant properties of rice protein by enzymatic hydrolysis for the microencapsulation of linseed oil. **Journal of Food Engineering**, v. 267, n. September 2019, p. 109761, 2020.
- JAFARI, S. M. et al. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816–835, 2008.
- JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. *Emulsifying and Emulsion-Stabilizing Properties of Gluten Hydrolysates*. 2014.
- MCCLEMENTS, D. J. Protein-stabilized emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 305–313, 2004.
- MOKNI GHRIBI, A. et al. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. **Food Chemistry**, v. 187, p. 322–330, 2015.
- NESTERENKO, A. et al. The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 95–102, 2014.
- NGUYEN, T. M. H. et al. Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Tuna ((*Thunnus albacares*) By-Products Using Protamex Protease. **Food Technology and Biotechnology**, v. 9862, n. 1, p. 48–55, 2011.
- PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R.; CLADERA-OLIVERA, F. **Alimentos de Fennema**. 2010.
- SARAO, L. K.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 344–371, 2017.
- ZANG, X. et al. Effect of limited enzymatic hydrolysis on the structure and emulsifying properties of rice bran protein. **Journal of Cereal Science**, v. 85, n. September 2018, p. 168–174, 2019.
- ZHENG, X. Q. et al. Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 172, p. 407–415, 2015.