



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRÉ-TRATAMENTOS FÍSICO E ENZIMÁTICO PARA VALORAÇÃO
DAS PROTEÍNAS DO FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO**

Francisco Henrique Pereira Neves Leal

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong

Orientadora

Dra. Gabriela da Rocha Lemos Mendes

Coorientadora

RIO GRANDE – RS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRÉ-TRATAMENTOS FÍSICO E ENZIMÁTICO PARA VALORAÇÃO
DAS PROTEÍNAS DO FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO**

Francisco Henrique Pereira Neves Leal

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em
Engenharia e Ciência de
Alimentos.

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong

Orientadora

Dra. Gabriela da Rocha Lemos Mendes

Coorientadora

RIO GRANDE – RS

2020

Ficha Catalográfica

L435p Leal, Francisco Henrique Pereira Neves.
Pré-tratamentos físico e enzimático para valoração das proteínas
do farelo de arroz desengordurado / Francisco Henrique Pereira
Neves Leal. – 2020.
100 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.

Orientadora: Dra. Eliana Badiale Furlong.

Coorientadora: Dra. Gabriela da Rocha Lemos Mendes.

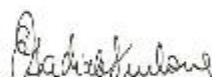
1. Digestibilidade 2. Propriedades Nutricionais 3. Propriedades
Tecnológicas 4. Cereal 5. Extrusão 6. Celulase I. Furlong, Eliana
Badiale II. Mendes, Gabriela da Rocha Lemos III. Título.

CDU 338.45:633.18

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

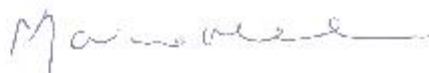
Dissertação defendida por Francisco Henrique Pereira Neves Leal, com orientação da Prof.^a Dr.^a Eliana Badiale Furlong e coorientação da Dr.^a Gabriela da Rocha Lemos Mendes, sendo aprovada em 29 de maio de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



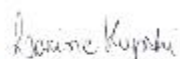
Dr.^a Eliana Badiale Furlong – FURG



Prof. Dr. Cristiano Schmidt – FURG



Prof. Dr. Mariano Michelin – FURG



Profa. Dra. Larine Kupski – UEM

RESUMO

O arroz, cereal que está presente na alimentação de mais da metade da população mundial, apresenta em sua composição aminoacídica o segundo maior conteúdo de lisina além de possuir proteínas hipoalergênicas. O farelo de arroz, subproduto do beneficiamento do arroz, é rico em nutrientes: proteína, fibra dietética, vitaminas do complexo B, ácidos graxos insaturados, minerais e fitoquímicos com propriedades nutracêuticas que agregam valor em formulações alimentícias. Para recuperação das proteínas presentes na matriz, podem ser aplicados pré-tratamentos como a hidrólise utilizando enzimas do complexo celulolítico; elas são promissoras para a hidrólise do material lignocelulósico e maior disponibilização de proteínas para extração. Como pré-tratamento físico destaca-se a extrusão que altera principalmente a conformação das proteínas contidas no material, promovendo um aumento de sua solubilidade e tornando-as mais propícias à extração. O objetivo do estudo foi obter concentrados proteicos de farelo de arroz desengordurado utilizando pré-tratamento físico de extrusão, pré-tratamento enzimático e a combinação de ambos; comparar suas propriedades nutricionais, tecnológicas e a viabilidade econômica do processo, visando aplicação na formulação de alimentos. As melhores condições para atuação do complexo celulolítico no farelo de arroz foram obtidas por planejamentos experimentais, valores de pH 3,8 e temperatura 55 °C; a hidrólise em batelada por 96 h foi responsável por proporcionar uma maior recuperação das proteínas em relação a batelada simples por 80 min. O pré-tratamento de extrusão resultou em um concentrado proteico com alto teor protéico (72,9%), recuperação de 72,0%, maior conteúdo de aminoácidos totais (97,3g_{aa}/100g_{proteína}) e aminoácidos essenciais (28,7g_{aa}/100g_{proteína}), dispersibilidade (97,3%) e digestibilidade (65,6%). O pré-tratamento enzimático resultou em um concentrado proteico com a melhor CAO (5,8g_{óleo}/g_{amostra}), maiores EE10 (15,5 min) e EE30 (12,0 min), aumento significativo na Turbidez, CAA, FE e EFE; porém a combinação dos pré-tratamentos enzimático e físico aumentou o teor proteico do concentrado (69,6%), melhorou o rendimento de extração (72,0%), teve o maior efeito positivo na CAA (4,6g_{água}/g_{amostra}), Turbidez (3,5), FE (120,5%), EFE (41,5 mL) e ainda contribuiu para aumento da digestibilidade (67,2%). O concentrado obtido pela combinação dos processos foi o que apresentou as melhores propriedades tecnológicas e o concentrado obtido por pré-tratamento enzimático como o melhor concentrado para formulações onde CAO e EE sejam altas. A viabilidade econômica indica que o projeto de implantação de uma linha industrial para obtenção de concentrados proteicos pré-tratados previamente com processos físicos e/ou enzimáticos pode ser lucrativo com um valor de investimento com alta taxa de *payback* e que apresenta poucos riscos, uma vez que na sua pior hipótese apresenta um retorno máximo de 1 ano. O custo comercial do kg dos quatro concentrados proteicos obtidos é competitivo com o preço dos produtos disponíveis atualmente no mercado.

PALAVRAS CHAVE: Digestibilidade. Propriedades Nutricionais. Propriedades tecnológicas. Cereal. Extrusão. Celulase.

PHYSICAL AND ENZYMATIC PRE-TREATMENTS FOR VALUATION OF DEFATTED RICE BRAN PROTEINS

ABSTRACT

Rice is a cereal present in the daily consumption of more than half of the world population. The amino acid composition of rice proteins has the second highest lysine content in cereals and they can be considered hypoallergenic. Rice bran is a nutrient-rich co-product with high contents of protein, dietary fiber, B vitamins, unsaturated fatty acids, minerals and phytochemicals with nutraceutical properties that can bring value in food formulations. To recover the proteins in the matrix, pre-treatments can be applied, such as hydrolysis using enzymes of the cellulolytic complex; they are promising in the breakdown of the matrix lignocellulosic material, providing greater protein content for extraction. Extrusion is a physical process that mainly changes the conformation of proteins contained in the material, promoting an increase of its solubility and making them more easily extracted. The objective of this study was to obtain protein concentrates from defatted rice bran using physical extrusion pretreatment, enzymatic pretreatment and the combination of both, in order to compare their nutritional, technological properties and the economic viability of the process, aiming their application in food formulation. The best conditions for the cellulolytic complex act in rice bran were obtained by experimental design, reaching values of pH 3.8 and temperature 55 ° C; the batch hydrolysis for 96h was responsible for providing a greater recovery of the proteins in relation to the simple batch for 80 min. The technological properties: water absorption capacity, oil absorption capacity, foam formation and stability and emulsion formation and stability were determined in the obtained protein concentrates. Nutritional properties were also evaluated: protein dispersibility index, amino acid profile and in vitro digestibility. The extrusion pretreatment resulted in a protein concentrate with a high protein content (72.9%), excellent recovery (72.0%), higher content of total amino acids (97.3g_{aa}/100g_{protein}) and essential amino acids (28.7g_{aa}/100g_{protein}), dispersibility (97.3%) and digestibility (65.6%). The enzymatic pretreatment resulted in a protein concentrate with the best CAO (5.8g_{oil}/g_{sample}), higher EE10 (15.5 min) and EE30 (12.0 min), significant increase in Turbidity, CAA, FE and EFE; however, the combination of enzymatic and physical pretreatments increased the protein content of the concentrate (69.6%), improved the extraction yield (72.0%), had the greatest positive effect on CAA (4.6g_{water}/g_{sample}), Turbidity (3.5), EF (120.5%), EFE (41.5 mL) and also contributed to increased digestibility (67.2%). The concentrate obtained by combining processes showed the best technological properties and the concentrate obtained by enzymatic pre-treatment can be considered the best one to apply in formulations where CAO and EE are demanded. The economic viability indicates that the project for the implantation of an industrial line for obtaining pre-treated protein concentrates with physical and/or enzymatic processes can be profitable with an investment value with a high payback rate and which presents few risks, since which in its worst case has a maximum return of 1 year. The commercial cost of the kg of the four protein concentrates obtained is competitive with the price of the products currently available on the market.

KEY WORDS: Digestibility. Nutritional Properties. Technological Properties. Cereal. Extrusion. Cellulase.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resultados obtidos para os parâmetros de atividade da Celulase.....	49
Quadro 2 – Resultados obtidos nos Ensaio do Planejamento para obtenção dos parâmetros do complexo celulolítico no substrato Farelo de Arroz.....	51
Quadro 3 – Resultados obtidos nos Ensaio do Planejamento dos Parâmetros para atuação das enzimas celulolíticas.....	55
Quadro 4 – Perfil de aminoácidos essenciais dos concentrados e recomendações da FAO.....	76
Quadro 5 – Perfil de aminoácidos não-essenciais dos concentrados protéicos.....	77
Quadro 6 – Perfil aminoacídico dos concentrados x Whey Comercial A.....	79
Quadro 7 – Perfil aminoacídico dos concentrados x Whey Comercial B.....	79
Quadro 8 – <i>Ranking</i> das determinações e propriedades avaliadas para os concentrados.....	83
Quadro 9 – Custos variáveis e bases de cálculo utilizados para Viabilidade Econômica.....	84
Quadro 10 – Custos de investimento para linha de produção dos concentrados protéicos.....	85
Quadro 11 – Custo de produção/kg de concentrado e preço sugerido de venda (R\$).....	86
Quadro 12 – Produção, receita e lucro anual para cada hipótese.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Influência de diferentes agentes precipitantes no rendimento de extração.....	48
Tabela 2 – Comparação do teor de proteína total e rendimento de extração dos processos de batelada simples (B_{simples}) e em batelada alimentada ($B_{\text{alimentada}}$).....	58
Tabela 3 – Composição proximal dos farelos estudados em base seca.....	59
Tabela 4 – Frações proteicas dos farelos com e sem extrusão.....	62
Tabela 5 – Teor de proteína total dos concentrados proteicos e seu rendimento de extração.....	63
Tabela 6 – Frações proteicas dos concentrados obtidos.....	64
Tabela 7 – Análise de <i>clusters</i> para as amostras por método de agrupamento hierárquico.....	65
Tabela 8 – CAA e CAO dos concentrados proteicos, albumina e PTS.....	67
Tabela 9 – Estabilidade da emulsão expressa após 10 e 30 min.....	70
Tabela 10 – <i>Scores</i> de aminoácidos e taxa de eficiência proteica dos concentrados.....	78
Tabela 11 – Digestibilidade dos farelos e dos concentrados proteicos extraídos destes.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de obtenção das amostras e extração de suas proteínas.....	38
Figura 2 – Curva de solubilidade das proteínas do FAD sob diferentes pHs.....	47
Figura 3 – Superfície de resposta para o planejamento dos parâmetros para atividade da celulase.....	50
Figura 4 – Superfície de resposta para as variáveis Temperatura x pH.....	52
Figura 5 – Superfície de resposta para as variáveis Temperatura x E:S.....	53
Figura 6 – Superfície de resposta para as variáveis E:S x pH.....	53
Figura 7 – Superfície de resposta para as variáveis Agitação x Tempo.....	55
Figura 8 – Superfície de resposta para as variáveis Tempo x Temperatura.....	56
Figura 9 – Superfície para as variáveis Agitação x Temperatura.....	56
Figura 10 - Etapas do processo de hidrólise por batelada simples e batelada alimentada.....	58
Figura 11 – Curva termogravimétrica do FAD e FADH.....	61
Figura 12 – Curva termogravimétrica do FADE e FADEH.....	61
Figura 13 – Dendograma dos <i>clusters</i> obtidos para as amostras estudadas.....	66
Figura 14 – Estabilidade da emulsão para os concentrados protéicos e padrões.....	69
Figura 15 – Estabilidade da formação de espuma para os concentrados protéicos e padrões....	71
Figura 16 – Curva termogravimétrica da proteína obtida do FAD, FADH e albumina.....	73
Figura 17 – Curva termogravimétrica da proteína obtida do FADE e FADEH e albumina.....	74
Figura 18 – Comparação dos perfis de aminoácidos da proteína extraída do CFAD (preto) e CFADH (azul).....	75
Figura 19 – Taxa de retorno de investimento para o CFAD.....	88

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVO	21
2.1. OBJETIVO GERAL.....	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. FARELO DE ARROZ.....	23
3.2. PROTEÍNAS: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, FUNCIONAIS E NUTRICIONAIS.....	24
3.2.1. Propriedades Físico-químicas.....	24
3.2.2. Propriedades Tecnológicas (Funcionais).....	25
3.2.3. Propriedades Nutricionais	26
3.3. MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	28
3.4. PRÉ-TRATAMENTOS.....	29
3.4.1. Tratamento físico: Extrusão	29
3.4.2. Tratamento enzimático: Hidrólise com celulase.....	31
3.5. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	32
3.6. ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS	33
3.6.1. Termogravimetria (TGA).....	34
3.6.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	35
3.7. APLICAÇÃO DO FARELO DE ARROZ	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. MATERIAL	37
4.2. MÉTODOS.....	37
4.3. PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS	38
4.3.1. Extração protéica.....	38
4.3.2. Atividade enzimática do complexo celulolítico	39
4.4. PRÉ-TRATAMENTOS NO FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO	39
4.4.1. Extrusão.....	39
4.4.2. Hidrólise enzimática em batelada simples.....	40
4.4.3. Hidrólise enzimática em batelada alimentada	40
4.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FONTES PROTÉICAS	40
4.6. DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS	41
4.7. OBTENÇÃO DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS	41
4.8. CARACTERIZAÇÃO DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS	42
4.8.1 Análise Termogravimétrica	42
4.8.2. Propriedades Tecnológicas (Funcionais).....	42
4.8.3. Propriedades Nutricionais	43
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	45
4.10. VIABILIDADE ECONÔMICA	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO PROTÉICA	47
5.2. PADRONIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CELULASE	48
5.3. ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	51
5.4. COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS FONTES PROTÉICAS	59
5.5. PROPRIEDADES TÉRMICAS DAS FONTES PROTÉICAS	60
5.6. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS DOS FARELOS	61
5.7. OBTENÇÃO DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS	62
5.8. PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS	66

5.9. PROPRIEDADES TÉRMICAS DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS	72
5.10. PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS	74
5.10.1. Perfil de aminoácidos.....	74
5.10.2. IDP e Digestibilidade dos farelos e concentrados protéicos	79
5.11. VIABILIDADE ECONÔMICA	83
6. CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da importância nutricional e funcional das proteínas norteia a preocupação dos consumidores na busca de uma alimentação saudável e desafia a indústria a encontrar novas alternativas para seu emprego no processamento de alimentos que supram as necessidades proteicas e tecnológicas de formulações alimentícias (PINCIROLI et al., 2019; ZENG et al., 2016). No entanto, o que se observa no cenário mundial é que uma a cada sete pessoas não têm acesso a quantidade de proteína e energia suficiente para o funcionamento adequado de seu metabolismo (GODFRAY et al., 2010). Estudos mostram que o número de consumidores com restrições alimentares relacionadas a proteínas aumentou consideravelmente nos últimos anos (ALCOCER et al., 2016; TURNBULL; ADAMS; GORARD, 2015), principalmente em crianças, onde os casos de intolerância ou alergia alimentar aumentaram sete vezes nos últimos dez anos (ALCOCER et al., 2016). Portanto, a busca por alternativas de fontes proteicas são norteadas pela questão nutricional, tecnológica e social para garantir a segurança alimentar.

Fica evidente que, estudos e a obtenção de fonte proteica para elaboração de alimentos são necessários, com enfoque na qualidade da proteína obtida e que esta possa ser consumida sem restrições por indivíduos normais ou com dificuldades metabólicas. Neste cenário encontram-se as proteínas do grão do arroz, que estão principalmente localizadas no farelo (12%), um coproduto do beneficiamento do grão cujo valor comercial não reflete seu potencial nutricional e tecnológico. A composição aminoacídica das proteínas do arroz, em comparação com os outros cereais, se destaca pela presença de aminoácidos essenciais, pois apresenta o segundo maior conteúdo de lisina (aminoácido limitante em cereais), atrás apenas da aveia. Além disso, as proteínas do arroz são consideradas hipoalergênicas, podendo ser consumida por pessoas com diferentes tipos de restrições alimentares (ZHANG et al., 2012). Portanto, recuperá-las de sua fonte é importante para encontrar alternativas para mitigar dificuldades nutricionais e tecnológicas no sentido de promover a segurança alimentar.

A utilização de métodos físicos e enzimáticos pode aumentar o rendimento do processo de recuperação das proteínas do arroz para empregá-las como uma alternativa para a elaboração de alimentos com bom balanço proteico ou com ao menos uma porcentagem implementada pela adição destas biomoléculas nas formulações alimentícias. No entanto, a alternativa de processos envolvendo pré-tratamentos físicos e enzimáticos ainda é pouco explorada na cadeia produtiva deste cereal. Dentro dos tratamentos físicos a extrusão a quente que utiliza alta pressão e alta temperatura pode facilitar a solubilização das proteínas do farelo de arroz para separá-las dos demais componentes da matriz, porém cabe avaliar o risco de perda

de disponibilidade aminoacídica ou das propriedades tecnológicas usuais das proteínas submetidas ao processo (RATHOD; ANNAPURE, 2017).

A hidrólise enzimática empregando celulase, por sua vez, pode ser uma alternativa para o desafio de recuperar as proteínas de uma matriz com maior eficiência pois pode liberá-las de sua associação com a rede lignocelulósica, que dificulta a solubilização delas em meio aquoso, sem causar hidrólise da proteína (KUPSKI et al., 2018). Os dois tratamentos, físico e enzimático, juntos ou separados nas etapas prévias ao processo de extração podem influenciar tanto na recuperação das proteínas quanto nas propriedades funcionais, nutricionais e na bioacessibilidade de aminoácidos essenciais. Explorar esta possibilidade é uma forma inovadora de contribuir com fontes proteicas para a cadeia produtiva de alimentos com propriedades tecnológicas e nutricionais compensadoras para a formulação de alimentos.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de pré-tratamentos de extrusão e hidrólise com complexo enzimático celulolítico em farelo de arroz desengordurado nas propriedades nutricionais e tecnológicas de concentrados proteicos obtidos, visando empregá-los em formulações de alimentos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer condições de hidrólise enzimática (batelada simples ou batelada alimentada) para recuperar proteínas de farelo de arroz desengordurado;
 - Obter concentrados proteicos a partir do farelo de arroz desengordurado (controle), extrusado (pré-tratamento físico), hidrolisado (pré-tratamento enzimático) e extrusado-hidrolisado (combinação dos pré-tratamentos).
 - Avaliar o rendimento de extração de proteínas e caracterizar os concentrados proteicos obtidos quanto às suas propriedades funcionais (tecnológicas) e nutricionais;
- Realizar um estudo de viabilidade econômica para obtenção e comercialização dos concentrados proteicos obtidos;
- Recomendar aplicação dos concentrados proteicos obtidos para produtos alimentícios em função de suas propriedades funcionais (tecnológicas) e nutricionais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FARELO DE ARROZ

O arroz (*Oryza sativa* L.) está entre os três cereais mais consumidos no mundo (atrás do trigo e do milho) e sua produção pode chegar a 497,7 mil t no mundo inteiro na safra de 2019-2020 (USDA, 2019). É o cereal que possui o menor risco alergênico (considerado hipoalergênico) quando ingerido na dieta e está presente na alimentação de mais da metade da população mundial. O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional de arroz, contribuindo com 69% (equivalente a 7,9 mil t) na safra 2017/2018 segundo a (Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019).

O grão de arroz possui em torno de 70% de endosperma, 20% casca e 10% de farelo. A composição química, em média, apresenta de 63,6-73,2% de carboidratos (sendo de 7,2-10,4% fibras), 5,8-7,7% de proteína, 2,9-5,2% de cinzas e 1,5-2,3% de lipídeos (PHONGTHAI; HOMTHAWORNCHOO; RAWDKUEN, 2017).

O farelo de arroz é um coproduto de maior diversidade nutricional e baixo custo proveniente da moagem do arroz. Ele é rico em nutrientes (proteína, fibra dietética, vitaminas do complexo B, ácidos graxos essenciais insaturados, minerais e compostos fenólicos). Na sua composição química contém, em média, 50% de carboidratos (amido e fibras dietéticas), 20% de lipídeos e 15% de proteínas (SHARMA; SRIVASTAVA; SAXENA, 2015). Além destes componentes estão presentes ácidos graxos essenciais, compostos fenólicos e fibras dietéticas que promovem a diminuição do risco de doenças cardíacas, redução dos níveis de colesterol no sangue e melhoria da sensibilidade à insulina (TRUSWELL, 2002).

O farelo de arroz possui sabor suave, adocicado e levemente amargo e, apesar de seu conteúdo nutricional e potencial aplicação em formulações alimentícias, seu consumo na alimentação humana é limitado devido a sua alta propensão à rancidez oxidativa. Se o óleo não for extraído do farelo de arroz logo após a sua obtenção, ele é hidrolisado pelas lipases endógenas e exógenas formando ácidos graxos livres e glicerol, aumentando a acidez e reduzindo o pH, cuja consequência é a alteração do sabor e propriedades tecnológicas do material. O teor de ácidos graxos livres no farelo de arroz armazenado pelo período de 30 dias pode apresentar um aumento de 66% em relação ao conteúdo original (LAVANYA; VENKATACHALAPATHY; MANICKAVASAGAN, 2017).

O processo de extração do óleo possibilita reduzir as atividades das enzimas que causam a rancidez no farelo (lipases) e diminuir fatores anti-nutricionais; desta forma, o processo gera dois produtos com potencial econômico: o óleo de arroz e o farelo de arroz

desengordurado, sendo o segundo uma forma estabilizada, com menor quantidade de fatores anti-nutricionais e menos propenso à rancificação (SAIRAM; KRISHNA; UROOJ, 2011).

Algumas propriedades físicas (densidade aparente, tamanho de partícula, cor e atividade de água), químicas (composição e propriedades antioxidantes) e propriedades tecnológicas (principalmente absorção de água e óleo) do farelo de arroz influenciarão seu comportamento durante o processamento, auxiliando na sua aplicação destes potenciais em novos produtos (LAVANYA; VENKATACHALAPATHY; MANICKAVASAGAN, 2017).

3.2. PROTEÍNAS: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, FUNCIONAIS E NUTRICIONAIS

3.2.1. Propriedades Físico-químicas

A funcionalidade de uma proteína está diretamente ligada com as suas propriedades físico-químicas; sua capacidade de interagir com outros componentes do produto de interesse, tamanho e forma das moléculas, estruturas (secundárias, terciárias e quaternárias), composição e sequência aminoacídica, quociente entre sua hidrofobicidade e hidrofiliicidade, entre outros (DAMODARAN; PARKIN, 2019). Alguns fatores como pH (alteração da distribuição de cargas), força iônica, constante dielétrica do solvente e a temperatura de operação da determinação podem alterar a solubilidade da proteína. Em geral, as proteínas são mais solúveis quando submetidos a pHs extremos – menores do que 4 e maiores do que 8. No ponto isoelétrico, as proteínas têm sua menor solubilidade e precipitam (SGARBIERI, 1996).

Também no caso do farelo de arroz a composição química de macromoléculas e perfil de antioxidantes são exemplos das propriedades químicas que podem estar associadas ao perfil protéico. Essas propriedades, além de interferir no produto final, têm grande impacto na decisão de compra por parte dos consumidores, uma vez que estes estão cada vez mais exigentes e criteriosos quanto ao que consumir (SAIRAM; KRISHNA; UROOJ, 2011; SHARMA; SRIVASTAVA; SAXENA, 2015). O farelo de arroz é fonte de compostos antioxidantes, como orizanol (mistura de ésteres do ácido ferúlico), tocoferóis, tocotrienóis e fitoesteróis. A concentração destes antioxidantes e a quantidade e digestibilidade proteica está diretamente relacionada com o grau de moagem do arroz; à medida que vai ocorrendo o processo, o conteúdo de antioxidantes diminui e as proteínas podem ser alteradas quanto as suas composições em aminoácidos disponíveis e digestibilidade (LAVANYA; VENKATACHALAPATHY; MANICKAVASAGAN, 2017).

3.2.2. Propriedades Tecnológicas (Funcionais)

O índice de dispersibilidade de proteína (IDP) e o índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) são importantes parâmetros para avaliar as funcionalidades das proteínas. Altos teores de IDP e ISN podem formar emulsões reais em produtos cárneos; baixos índices podem apresentar boas funcionalidades, como, alta absorção de água, considerado um ponto positivo para estabilidade do sistema cárneo. Em geral, quanto maior os valores de IDP e ISN menor a desnaturação das proteínas; porém, solubilidade e desnaturação nem sempre estão relacionados. Proteínas completamente desnaturadas tendem a apresentar uma alta solubilidade (VISSER; THOMAS, 1987).

As propriedades tecnológicas (funcionais) das proteínas estão relacionadas com suas propriedades físico-químicas e como seu comportamento é afetado durante o processamento de sistemas alimentícios. Elas são reflexo de interações complexas entre a composição, estrutura, conformação, propriedades físico-químicas e o ambiente em que as proteínas são associadas ou medidas. A capacidade viscoelástica do glúten do trigo, as propriedades de aeração presentes da albumina do ovo, a facilidade de coalhar o leite durante a produção de queijo, bem como o amaciamento de produtos cárneos pela papaína são exemplos básicos de funções que as proteínas podem conferir a produtos alimentícios (REGENSTEIN; REGENSTEIN, 1984).

As propriedades tecnológicas das proteínas são responsáveis por alterar algumas propriedades dos produtos em que são empregadas ou naturalmente presentes, como por exemplo: propriedades organolépticas (determinações de cor, *flavor*, odor, textura), propriedades de hidratação (solubilidade, dispersibilidade, molhabilidade, capacidade de absorção de água), propriedades superficiais (emulsificação, capacidade de formação de espuma, geleificação, capacidade de retenção de água), propriedades estruturais (elasticidade, coesividade, mastigabilidade), propriedades reológicas (gelatinização, extrusabilidade, formação de fibras) e outras. Todas estas variáveis sofrem influência do pH, temperatura, concentração proteica do material de estudo, força iônica e constante dielétrica (KINSELLA; MELACHOURIS, 1976).

Belitz, Grosch e Schieberle (2009) definem cada uma das propriedades tecnológicas das proteínas e exemplificam como estas propriedades podem ser potencializadas: enquanto que a capacidade de formação de gel pode se beneficiar com a adição de pequenas quantidades de sal, a capacidade de emulsificação das proteínas pode ser melhorada aplicando o processo de hidrólise enzimática destas. Tratamentos químicos e modificações físicas das proteínas influenciam diretamente a sua capacidade de formar espuma e a estabilidade da mesma.

Damodaran e Parkin (2019) apresentam os métodos mais utilizados para determinação destas propriedades funcionais, bem como as equações necessárias para quantificá-las quanto a sua função em sistemas alimentares.

Para aplicação industrial de uma fonte proteica, algumas propriedades funcionais devem ser conhecidas, como a capacidade de absorção de água (CAA), capacidade de absorção de óleo (CAO) e sua solubilidade em água. No caso do farelo de arroz, estas propriedades variam de acordo com a fonte e das condições de processamento que tenham sido aplicadas. O alto teor de fibras do farelo de arroz desengordurado apresenta uma alta capacidade de retenção de água, pois ocorre a absorção de água pelas moléculas de amido presentes e também devido a mudança de porosidade do material após a retirada do óleo, que causa o rompimento dos vacúolos de gordura e, conseqüentemente, diminui sua absorção de óleo (LAVANYA; VENKATACHALAPATHY; MANICKAVASAGAN, 2017). Portanto, separar as proteínas do farelo pode alterar positiva ou negativamente seu papel tecnológico e sua aplicabilidade em produtos alimentícios.

3.2.3. Propriedades Nutricionais

O valor nutricional das proteínas é determinado pela sua composição aminoacídica (em especial a quantidade de aminoácidos essenciais), pela sua susceptibilidade a hidrólise durante a digestão, pureza e biodisponibilidade após processamento e preparo para consumo. O conceito da essencialidade de aminoácidos fundamenta todos os métodos de determinação de qualidade de proteínas (FRIEDMAN, 1996). A digestibilidade *in vitro* é um dos métodos utilizadas para determinar a qualidade da proteína ingerida na dieta; sua avaliação é dada pela capacidade que as proteínas do alimento possuem de satisfazer as demandas metabólicas de nitrogênio e aminoácidos (GILANI; XIAO; COCKELL, 2012). Além dela, ainda podem ser avaliados o teor de aminoácidos disponíveis, aminoácidos limitantes, balanço de nitrogênio, balanço proteico líquido e utilizado, entre outros (FRIEDMAN, 1996).

O valor nutritivo de uma proteína também pode ser estimado pela determinação da digestibilidade *in vitro*, que consiste em avaliar a razão entre o teor de nitrogênio absorvido pelo nitrogênio ingerido na dieta. As proteínas de origem animal apresentam os maiores percentuais de digestibilidade (acima de 95%); e nas fontes vegetais, os índices variam de 54-82%, sendo este valor de 75% para as proteínas obtidas do farelo arroz. Isto se deve a formação de derivados proteicos de menor digestibilidade pela reação entre componentes naturalmente presentes nos vegetais que formam complexo com as proteínas, tal como a matriz

lignocelulósica. Além disto, os vegetais podem possuir compostos anti-nutricionais que causam a inibição digestiva, contribuindo para a diminuição da digestibilidade proteica (TOMÉ, 2013).

A qualidade da proteína pode influenciar de três maneiras diferentes o nosso organismo. As respostas fisiológicas/metabólicas afetadas são absorção e digestibilidade de macro e micronutrientes, utilização metabólica, balanço de nitrogênio e reparação de tecidos. Os resultados, a curto prazo, são a capacidade de melhorar o esforço físico e performance atlética, desintoxicação de agentes químicos, mudança de comportamento e estímulos mentais. Os resultados a longo prazo estão ligados a diminuição das perdas funcionais relacionados a idade (músculo, resistência óssea, imunidade e perda cognitiva) e doenças crônicas relacionadas a nutrição (hipertensão, câncer, danos oxidativos e outros). Por este e outros motivos que se emprega um *score* mínimo de aminoácidos que são recomendados para cada faixa etária, desde crianças recém-nascidas até idosos (FAO, 2013).

A qualidade de uma proteína depende de três fatores: sua composição de aminoácidos essenciais, digestibilidade e ingesta diária que supra as necessidades proteicas do organismo (CAIRE-JUVERA; VÁZQUEZ-ORTIZ; GRIVALJA-HARO, 2013). Os aminoácidos considerados essenciais não são sintetizados pelo nosso organismo e necessariamente deverão ser ingeridos na dieta. A deficiência de proteínas pode causar efeitos adversos aos órgãos humanos e seus sistemas, incluindo funções cerebrais em recém-nascidos e crianças, aumento do risco de infecção devido a falhas no sistema imunológico, funcionamento e permeabilidade da mucosa do intestino que afeta absorção e vulnerabilidade, além de funções renais (USDA, 2014). Combinações de legumes e cereais podem suprir à quantidade adequada de aminoácidos essenciais e representam um perfil aminoacídico balanceado (OSIBONA; KUSEMIJU; AKANDE, 2009). Em geral esta associação é a base do suprimento proteico em muitas dietas típicas de diferentes regiões.

A tendência é buscar alternativas para que os testes *in vivo* da digestibilidade e valor biológico de proteínas, que empregam animais, sejam substituídos por testes mais rápidos, baratos e com a mesma eficiência. O método *in vitro* de simulação da digestão no trato gastrointestinal tem atraído a atenção de pesquisadores desde a década de 1970 (XIAO et al., 2014). Foram comparados os métodos *in vitro* e *in vivo* para determinação de proteínas e aminoácidos em sementes de feijão e ervilha por Swiech e Buraczewska (2001). Embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre os resultados obtidos por cada método, os autores salientaram, na época, que deveriam ser desenvolvidos métodos para aprimorar as técnicas existentes para determinação *in vitro*.

3.3. MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Muitos processos vêm sendo estudados para realizar a extração de proteínas de diferentes matrizes alimentícias; porém, algumas informações básicas precisam ser conhecidas, como a informação de solubilidade e peso molecular dos diferentes tipos de proteínas que as constituem. A partir disto, é escolhido o método que melhor se adequa a composição proteica e gera os maiores rendimentos (PHONGTHAI; HOMTHAWORNCHOO; RAWDKUEN, 2017). As proteínas podem ser fracionadas quanto ao seu perfil de solubilidade, conforme método proposto por Osborne (1924). As frações das proteínas resultantes da metodologia que fundamenta esta classificação são: albumina (solúvel em água), globulina (solúvel em solução salina) glutelina (solúvel em solução alcalina) e prolamina (solúvel em álcool). Essa especificação é importante pois seus teores influenciam em suas propriedades tecnológicas. As proteínas obtidas do farelo de arroz possuem, em média, 32,5% glutelina, 30,9% albumina, 24,9% globulina e 11,6% prolamina. Estes teores são afetados pelos diferentes tipos de cultivares e formas de beneficiamento do grão (CHANPUT; THEERAKULKAIT; NAKAI, 2009). Em caso de extração das proteínas de sua matriz o tipo de processo também pode afetar este perfil.

As propriedades funcionais e tecnológicas das proteínas são melhor aproveitadas quando passam por extrações específicas, como variação de pH e mudança na concentração dos solventes, por exemplo, tendo sua solubilidade aumentada (AL-DOURY; HETTIARACHCHY; HORAX, 2018). Flanagan et al. (2006) realizaram estudos sobre a eficiência de precipitação de proteínas do plasma humano, utilizando diferentes agentes precipitantes, utilizando o pH do sobrenadante e a relação entre volume de agente precipitante e volume de plasma como variáveis e avaliando como resposta a porcentagem de proteínas precipitadas. Foi possível verificar também a influência da técnica de precipitação empregando solvente orgânico, ácidos, sal e íon metálico. A partir da relação 1,5 entre agente precipitante e plasma foi possível precipitar, no mínimo, 91,4% das proteínas.

Os principais métodos utilizados para ruptura de células de matrizes alimentícias são: homogeneização mecânica, homogeneização assistida por ultrassom, utilização de equipamentos de alta pressão, tratamentos térmicos e lise química ou osmótica. Além disto, diversas enzimas lignocelulósicas apresentam bons rendimentos de extração das proteínas de fontes vegetais, devido a maior disponibilização deste macronutriente no meio (TOLDRÁ; NOLLET, 2013; KUPSKI et al., 2018).

Uma das técnicas mecânicas que podem ser utilizadas para assistir extrações de proteínas é a moagem coloidal; estudo realizado por Anderson e Guaraya (2001) tornou

possível a recuperação de 75,2% das proteínas do farelo de arroz estabilizado, com a adição de etapas de homogeneização e liofilização após moagem.

Khan et al. (2011) avaliaram o efeito de três tratamentos térmicos nas propriedades tecnológicas de isolados proteicos obtidos a partir do farelo de arroz estabilizado, sendo eles o aquecimento seco, micro-ondas e parboilização. Os resultados obtidos pelos autores demonstram que ocorre a diminuição de 66% da solubilidade destes isolados quando submetidos a longos períodos de aquecimentos.

A homogeneização via ultrassom foi estudada por Toorchi et al. (2008) como alternativa para assistir à extração de proteínas proveniente de fontes vegetais (soja e arroz); a ultrassonicação promove a ruptura da parede celular do material, fazendo com que as proteínas fiquem menos impedidas para extração. Esta exposição também modifica estruturalmente as proteínas com consequência nas suas propriedades funcionais.

Phongthai et al. (2018) obtiveram resultados de 65,8% de rendimento de extração das proteínas do farelo de arroz, utilizando a solubilização em meio alcalino seguido de precipitação no ponto isoelétrico; o ultrassom como método de ruptura celular do material lignocelulósico presente nas paredes do farelo vem sendo preterido mas pode ser uma boa alternativa para extração de proteínas deste coproduto.

3.4. PRÉ-TRATAMENTOS

3.4.1. Tratamento físico: Extrusão

O processo de extrusão se tornou importante para a fabricação de massas, cereais prontos para o consumo, rações animais e proteínas vegetais texturizadas. Em muitas destas aplicações, a extrusão utiliza alta temperatura por curto período de tempo (HTST, *High Temperature Short Time*), o que possibilita diminuição na perda de vitaminas e aminoácidos. A cor, o sabor, a forma do produto e a textura são fatores que sofrem alterações durante este processo. A extrusão é aplicada também na busca de produtos mais nutritivos, uma vez que o uso deste processo pode causar a desnaturação de fatores anti-nutricionais, bem como aumentar a qualidade e a digestibilidade das proteínas. O processo de extrusão pode ainda acarretar na gelatinização do amido, desnaturação das proteínas, além de modificar os lipídeos presentes e inativar enzimas (BHATTACHARYA; PRAKASH, 1994).

Podem ser elencadas diversas vantagens no processo de extrusão, como: alta produtividade, custo relativamente baixo, variedade de formas dos produtos obtidos gerando versatilidade para desenvolvimento de novos produtos, pouca ou nenhuma perda de nutrientes, resultando em produto de qualidade, sem a produção de efluentes, o que o caracteriza como um

processo ambientalmente seguro, portanto, uma tecnologia “limpa” (GUY, 2001; HARPER; CLARK, 1979).

O processo de extrusão pode ser conduzido de duas maneiras: a primeira, extrusão a frio, é pouco utilizada industrialmente para produção de alguns tipos de massas, salsichas e produtos de confeitaria; a segunda, é chamada de extrusão a quente ou cozimento por extrusão, que é amplamente utilizada na indústria e, devido as elevadas pressões e temperaturas, é empregada para elaboração de produtos expandidos (FELLOWS, 2006).

O arroz tem sido um cereal de destaque para produção de *snacks* devido à sua capacidade tecnológica de expansão e de formar produtos com estrutura (textura) porosa, que são atrativos devido à sua facilidade de digestão, cor e sabor. Pode ser utilizado para desenvolver produtos de alto valor nutricional e com balanço aminoacídico suficiente para dieta humana (KADAN; BRYANT; PEPPERMAN, 2003). Diferentes formulações foram avaliadas no estudo de Chaiyakul et al. (2008), onde os parâmetros de temperatura de extrusão, conteúdo de umidade inicial do produto e teor total de proteínas foram avaliados quanto a suas respostas sensoriais de dureza, mastigabilidade, crocância e cor; o teor de umidade inicial influenciou significativamente no aumento das três primeiras variáveis, mas apresentou uma perda de coloração na faixa estudada (20-30%), enquanto que o teor de proteínas melhorou todas as variáveis sensoriais estudadas nas amostras que apresentavam 30% de proteína em sua formulação em comparação com as amostras que apresentavam 20%.

Para obtenção de um produto com características específicas, alguns parâmetros de processo como velocidade da rosca, temperatura, pressão e conteúdo de umidade inicial do produto podem influenciar nas características de expansão, volume específico, solubilidade em água, absorção de água, dureza e parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), conforme demonstrado por Mesquita, Leonel e Mischon (2013). As propriedades reológicas do produto dependem diretamente de seu conteúdo de umidade inicial; quanto menor a quantidade de água presente, mais viscoso será o produto, devido à resistência de escoamento do mesmo dentro do equipamento, que necessita uma maior tensão cisalhante e aumenta o tempo de retenção e do processo, conseqüentemente (HASHIMOTO; GROSSMANN, 2003). Mudanças físicas nos extrusados podem ser relacionadas com a temperatura de extrusão e umidade inicial do produto, variando a gelatinização do amido presente no material (SINGH; SEKHON; SING, 2007).

Rani et al. (2018) verificaram o melhoramento das propriedades físico-químicas, sensoriais e bioativas de produto fermentado a base de blenda de farinha de arroz e feijão após o processo de extrusão.

3.4.2. Tratamento enzimático: Hidrólise com celulase

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, que, combinados, formam a parede celular dos vegetais e dificultam a biodisponibilidade de alguns macros e micronutrientes da matriz, tais como as proteínas (STEFFIEN; AUBEL; BERTAU, 2014). Abundância destes compostos pode ser encontrada nas porções externas de produtos agrícolas, aonde fazem papel de barreira física nos tecidos de proteção dos mesmos; a combinação destes polímeros e proteínas, carboidratos, lipídeos e outros compostos causam dificuldades tecnológicas (principalmente na capacidade de absorção de água e na formação de gel), nutricionais (digestibilidade de proteínas e amido) e funcionais (atividade antioxidante) devido a estas associações influenciarem negativamente na disponibilidade de outros constituintes pela diminuição da interação com água, solventes e enzimas digestivas (REYES; PERALTA-ZAMORA; DURAN, 1998).

Propriedades tecnológicas e nutricionais de proteínas de matrizes alimentícias lignocelulósicas podem ser recuperadas pela hidrólise enzimática, que é uma alternativa para melhorar a qualidade tecnológica de produtos alimentícios e a biodisponibilidade de seus nutrientes, pois tratamentos físicos e químicos podem afetar estas duas propriedades. Os métodos enzimáticos, por serem mais específicos e seguirem condições modeladas de processo, também podem ser mais apropriados quando se deseja combinar o valor biológico, as propriedades tecnológicas e buscar aplicação em novos produtos (WANG et al., 2015).

Com o intuito de contornar o problema da qualidade nutricional do farelo de arroz ser afetado pelos fatores anti-nutricionais e baixa digestibilidade, diversos estudos e inovações na tecnologia enzimática estão sendo propostos; a adição de enzimas lignocelulósicas é uma alternativa para degradar as ligações formadas pela celulose, hemicelulose e lignina e, desta maneira, aumentar o valor nutricional deste coproduto (LAMID; KUSRININGRUM; SUNARAYO, 2015).

A hidrólise enzimática da celulose acontece em 5 etapas: transferência das enzimas da fase aquosa para superfície das partículas de celulose, adsorção das enzimas e formação de complexo enzima-substrato (ES), hidrólise da celulose, transferência de celodextrina, celobiose e glicose da superfície das partículas celulósicas para fase aquosa e hidrólise da celodextrina e celobiose em glicose nesta mesma fase (BELDMAN et al., 1988).

Para tornar a hidrólise enzimática um processo competitivo industrialmente, estudos envolvendo a utilização de reações assistidas por ultrassom visam reduzir a quantidade de enzima e tempo de reação, pelo aumento da porosidade do material lignocelulósico e taxas de transferência de massa (SUBHEDAR; GOGATE, 2013). O ultrassom pode ser considerado

uma técnica verde de alta eficiência, repetibilidade e que requer pouca instrumentação, quando comparado com técnicas convencionais. Ainda é possível citar uma grande eficiência para redução dos tempos de processo (DELGADO-POVEDANO; CASTRO, 2015).

Estudo realizado por Silvello, Martínez e Goldbeck (2019) mostraram o aumento em 42,4% da atividade enzimática da celulase quando assistida por ultrassom quando comparado ao controle sem utilização de ultrassom para hidrólise de material lignocelulósico. Os autores relacionaram estas mudanças estruturais na enzima pela cavitação do ultrassom; o mecanismo de cavitação acelera a reação enzimática com o emprego de energia do ultrassom, aumentando o movimento das moléculas no líquido e o acesso da enzima ao sítio ativo do substrato (DELGADO-POVEDANO; CASTRO, 2015). Parâmetros como frequência, intensidade do ultrassom, número de ciclos e tempo de aplicação influenciam o processo. Subhedar e Gogate (2013) e Wang et al. (2012) estudaram o efeito positivo que baixas frequências, 20 kHz e 24 kHz respectivamente, causam na atividade de celulases que possuem um alto conteúdo de endoglucanases em seu complexo.

Diversos estudos mostraram alto rendimento (acima de 80%) na recuperação das proteínas do farelo de arroz utilizando hidrólise enzimática. Wang et al. (1999) utilizando xilanase obtiveram 82% de recuperação; ainda no mesmo estudo, uma blenda de xilanase e fitase foi testado e acabou apresentando uma diminuição na recuperação para 75%. Tang et al. (2003), utilizando pectinase e protease P, obtiveram um rendimento de 80% de recuperação de proteínas. Hamada (2000) utilizando alcalase, recuperou 81% das proteínas presentes no mesmo coproduto.

Lamid, Kusriiningrum e Sunarayo (2015) estudaram a variação de concentração de enzimas lignocelulósicas na hidrólise do farelo de arroz. Os melhores resultados foram obtidos quando o farelo de arroz foi adicionado com 8% de enzimas lignocelulósicas, onde o conteúdo de fibra bruta, cinzas e celulose decresceram significativamente em relação ao padrão de farelo de arroz sem hidrólise enzimática. Consequentemente o teor de proteínas aumentou e pode ter se tornado mais digerível.

3.5. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O interesse social e econômico quanto as determinações de proteínas estão relacionadas ao valor de mercado da maior parte das *commodities* da agricultura (cereais, legumes, sementes, leite e outros) é parcialmente determinado pelo seu conteúdo de proteínas. Análises quantitativas são necessárias para o controle de qualidade e pré-requisito da rotulagem de produtos alimentícios. Desta forma, os métodos para determinação de proteínas estão

vinculados a implicações legais, nutricionais, econômicas e de saúde e segurança para indústria de alimentos (OWUSU-APENTEN, 2002). A quantificação direta da proteína pode ser realizada quando o conteúdo proteico é analisado pela base de aminoácidos residuais, enquanto que a determinação indireta pode ser inferida pela determinação do teor de nitrogênio ou pelas reações químicas com alguns grupos funcionais presentes nas proteínas (WILSON; WALKER, 2010).

Owusu-Apenten (2002) descreveu a evolução dos métodos de análise de proteínas ao longo dos anos descritos na seguinte linha do tempo: Método de Dumas (1831), Reagente de Nessler (1843), Método do Biureto (1849), Método de Bethelot (1859), Kjeldahl (1883), Folin-Ciocalteau (1927), Lowry (1951), Destilação alcalina direta e *Near-infrared reflectance* (1960), Método de Bradford (1976) e Método do BCA (1985). As técnicas para determinação de proteína em matrizes alimentícias precisam ser robustas, ou seja, compatíveis com produtos frescos e processados, em diferentes estados físicos (pós, líquidos, emulsões, géis e pastas), para fontes vegetais e animais.

Um dos métodos mais comuns e utilizados para determinar proteínas em amostras alimentícias é o método de Kjeldahl que quantifica nitrogênio total, ou seja, não apenas o nitrogênio proveniente das proteínas, mas também o nitrogênio que está presente nas substâncias nitrogenadas não-proteicas (bases purínicas e pirimidínicas, creatina, vitaminas, uréia, aminas e amidas). Em geral, o valor obtido por esta determinação superestima o conteúdo total de proteínas (SGARBIERI, 1996). O fator de correção utilizado para converter o teor de nitrogênio total determinado no método de Kjeldahl para teor total de proteínas é baseado no teor dos aminoácidos das fontes alimentícias pelo peso dos aminoácidos nitrogenados; para o arroz e seus derivados é utilizado o fator 5,95 (OWUSU-APENTEN, 2002).

Existem ainda métodos colorimétricos que determinam grupos cromóforos naturais ou decorrentes de reações químicas, como a reação de biureto, método de Lowry e a complexação de corantes (Coomassie Azul Brilhante G 250) do método de Bradford. Os resultados obtidos são comparados a uma curva padrão, geralmente preparada usando faixas de concentração conhecida de albumina como proteína padrão (MARTÍN-HERNÁNDEZ; BÉNET; OBERT, 2008).

3.6. ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS

O grupo de técnicas capaz de mensurar as propriedades físicas de uma substância e/ou seus produtos de reação utilizando os efeitos da temperatura e uma atmosfera conhecida são denominadas de análises térmicas. São necessários que três critérios sejam satisfeitos para

podermos considerar estas técnicas de termoanalíticas: uma propriedade física (mensurável) de interesse, que seja medida direta ou indiretamente em função da temperatura, que seja controlada para garantir exatidão nas medidas (HAINES, 1995).

As principais técnicas para avaliar as propriedades físicas massa e entalpia são, respectivamente, a Termogravimetria (TGA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Estas técnicas são empregadas para avaliar a estabilidade térmica relativa de um material, bem como verificar mudanças de estado, grau de cristalinidade, calor específico, cinéticas de reação, desidratação e/ou dessolvatação (GIOLITO; IONASHIRO, 1988). A partir da TGA é possível utilizar métodos matemáticos para transformar as respostas de variação de massa em função do tempo obtidas em variação de energia (entalpia), alcançando de forma indireta o que seria a resposta de um DSC do mesmo material (CANEVAROLO, 2004).

3.6.1. Termogravimetria (TGA)

A Termogravimetria pode ser descrita como a análise térmica responsável por mensurar a variação de massa de um material (amostra) em função do emprego de temperatura, variável ou não, de forma controlada ao longo de um período conhecido de tempo. Toda e qualquer alteração causada à massa do material dentro desta programação de aquecimento é registrada e possibilita conhecer algumas características do mesmo, bem como: determinar a faixa de temperatura em que o material adquire composição química fixa, definida e constante; temperatura de decomposição e acompanhamento de reações, como desidratação, combustão e oxidação, por exemplo (CANEVAROLO, 2004).

Os três tipos de análises termogravimétricas mais empregadas são a Termogravimetria Isotérmica, Termogravimetria quase-isotérmica e a Termogravimetria Dinâmica também chamada de Convencional; enquanto que a primeira delas utiliza uma única temperatura durante todo o tempo de duração da análise, a segunda varia a temperatura sempre que a balança do equipamento detecta uma variação de massa do material; a última, mais comumente empregada para diversos tipos diferente de materiais, utiliza uma rampa linear de aquecimento ou resfriamento de maneira pré-determinada e controlada. No método dinâmico (convencional) são obtidas curvas que demonstram a variação da massa em função da temperatura ou do tempo; estas curvas são chamadas de curvas termogravimétricas (WENDLANDT, 1986).

Considerando as fontes de erros instrumentais e aqueles que estão relacionados às características da amostra, minimizando-os ao máximo, as curvas termogravimétricas obtidas no TGA refletirão de forma representativa os processos químicos que ocorrem no material e

que podem ser interpretados a partir da perda ou ganha de massa, análise do resíduo, detecção ou análise de dos produtos voláteis (CANEVAROLO, 2004).

3.6.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os dois tipos de análise térmica que utilizam a DSC são diferenciados apenas nas configurações dos instrumentos utilizadas para mensurar a variação de entalpia, capacidade calorífica ou resistência térmica total de um material. Enquanto a DSC de fluxo de calor mede a diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência, a DSC de compensação de potência mede de forma direta a energia presente nos eventos térmicos que ocorrem dentro do equipamento (McNAUGHTON; MORTIMER, 1975). Enquanto que no DSC de fluxo de calor a diferença de temperatura da amostra e do material de referência baseia o calor liberado ou absorvido, valores negativos serão encontrados para eventos endotérmicos enquanto que valores positivos determinarão eventos exotérmicos, exatamente o inverso do DSC de compensação de potência, uma vez que neste é adotado a convenção termodinâmica que determina que eventos endotérmicos têm variação positiva de sua entalpia, gerando picos ascendentes para curvas endotérmicas e descendentes para curvas exotérmicas (CANEVAROLO, 2004).

Como fatores instrumentais que influenciam nas curvas DSC, podem ser citados: o material e tipo de cadinho utilizado, geometria do forno de aquecimento, localização e pontos de solda dos termopares. Quando são utilizadas taxas de aquecimento lentas são gerados picos de alta resolução, enquanto que a utilização de taxas rápidas de aquecimento promove um aumento da sensibilidade do método. Gases inertes não interferem nas reações das amostras, enquanto gases reativos promovem reações de oxidação ou redução da amostra. Quanto ao material do cadinho, são utilizados cadinhos de alumínio para amostras que não reagem com alumínio e registram os eventos térmicos que acontecem durante a análise até uma temperatura máxima de 600 °C; para amostras que reagem com alumínio ou que sofrem transições até 750 °C, são utilizados cadinhos de materiais inertes – platina, aço ou ouro (WENDLANDT, 1986).

Características da amostra como quantidade de massa utilizada e forma (pó, pasta, fibras ou corpo único) tem efeitos conhecidos nas curvas obtidas; enquanto que uma amostra em pó oferece uma maior superfície e gera picos bem resolvidos (alta resolução), cortar o material em fibras melhora o contato do mesmo com o sensor e, conseqüentemente, a sensibilidade da análise. Com relação à massa de amostra, grandes massas tendem a deslocar os picos para temperaturas mais elevadas e com menor resolução, enquanto que massas pequenas melhoram a resolução de picos próximos (WENDLANDT, 1986).

Piotrowicz e Salas-Mellado (2017) realizaram análises de DSC em amostras de concentrados proteicos obtidos a partir do farelo de arroz desengordurado com a finalidade de avaliar a sua estabilidade térmica, verificando a existência de uma grande diferença na entalpia de desnaturação do material (~ 12 J/g) entre as amostras que foram desengorduradas laboratorialmente e as amostras desengorduradas por processo industrial.

3.7. APLICAÇÃO DO FARELO DE ARROZ

As proteínas do farelo de arroz apresentam potencial promissor para aplicação em produtos alimentícios devido as suas características nutricionais e funcionais, não só como suplementação básica, mas como diversificação na formulação de produtos já existentes e desenvolvimento de novos produtos (FABIAN; JU, 2011).

O farelo de arroz é um produto bastante versátil, pode ser facilmente incluído em produtos como fonte de fibras e também como substituto de matrizes farináceas. Um levantamento realizado por Gul et al. (2015) mostrou que o farelo de arroz já foi utilizado em pizza com alto conteúdo de fibras dietéticas estabilizadas com farinha de farelo de arroz (alterar propriedades químicas e funcionais durante o armazenamento), pão sem glúten com frações de fibras dietéticas (aumentar a qualidade do produto), *cookies* com farinha de trigo e farelo de arroz (efeito nas propriedades funcionais), macarrão com adição de farelo de arroz (incrementar a cor, cozimento, qualidade sensorial e aumento da vida útil) *muffins* de banana e *cookies* com farelo de arroz desengordurado e óleo de arroz (substituir a margarina e a farinha).

O farelo de arroz também é adequado para coberturas para bolos, sobremesas e salsichas devido a sua alta capacidade de reter água e óleo, reduzindo a perda de água destes produtos e mantendo a sua textura agradável (CAO et al., 2009).

Schmidt et al. (2015), utilizando blendas de proteínas de farelo de arroz, galactomanas de *Caesalpinia pulcherima* e extrato fenólico de farelo de arroz fermentado, elaboraram filmes e coberturas comestíveis, contribuindo para redução de poluentes no meio ambiente e apresentando vantagens tecnológicas em relação a filmes sintéticos.

Cipolatti et al. (2012) estudaram a aplicação de películas a base de compostos proteicos e fenólicos provenientes de farelo de arroz fermentado em tomates. Os resultados mostraram que o filme protéico foi uma boa barreira a vapores de água e, portanto, constituiria uma alternativa para conservação do tecido vegetal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

O farelo de arroz desengordurado com partículas menores que 0,149 mm foi coletado na Indústria Riograndense de Óleos Vegetais (Irgovel), situada na cidade de Pelotas/RS. As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas sob refrigeração até o momento das análises.

O mix de enzimas do complexo celulolítico comercial Cellic[®] CTec2 foi obtido da Novozymes[®]. O complexo possui uma blenda de celulasas, β -glicosidases e hemicelulase, com atividade específica de 0,3 U. A enzima foi armazenada sob refrigeração a 4 °C, dentro da faixa ideal de 0-8 °C estipulada pelo fabricante.

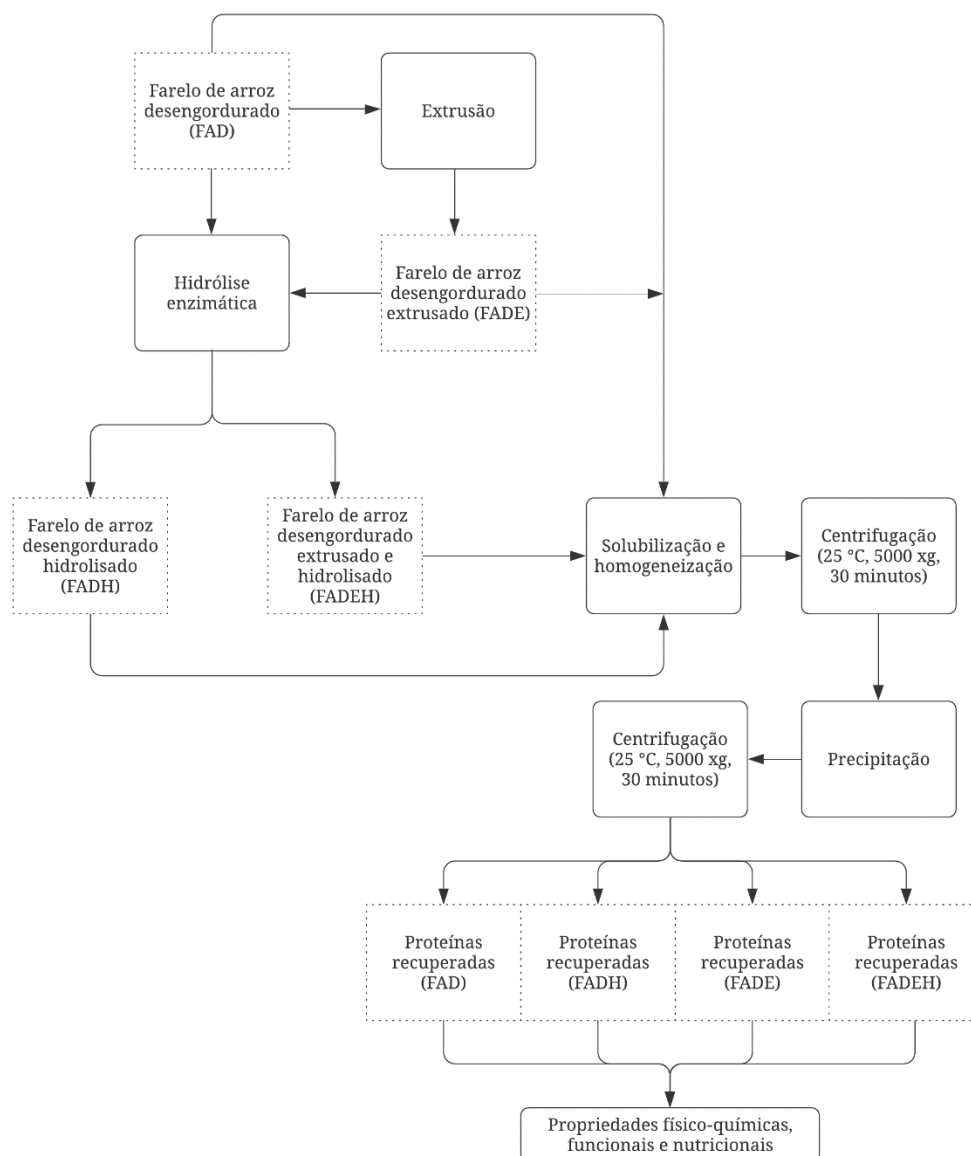
O padrão de albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*) foi obtido da Sigma-Aldrich[®] e o padrão de proteína texturizada de soja (PTS) foi obtido em comércio local.

Todos os reagentes utilizados para as análises e determinações foram de grau analítico. Todos os cuidados laboratoriais necessários foram tomados para que os analistas tivessem a menor exposição e risco possível durante o desenvolvimento da dissertação.

4.2. MÉTODOS

O desenvolvimento experimental foi conduzido no Laboratório de Micotoxinas e Análise de Alimentos (LAMCA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

A Figura 1 apresenta o método de obtenção das amostras e as operações para recuperação das proteínas do farelo de arroz submetido a diferentes pre-tratamentos. Ao final do processo foram obtidos quatro concentrados protéicos provenientes de cada uma das fontes estudadas: farelo de arroz desengordurado (FAD), farelo de arroz desengordurado hidrolisado (FADH), farelo de arroz desengordurado extrusado (FADE) e farelo de arroz extrusado hidrolisado (FADEH). As análises que foram realizadas para caracterização destes concentrados também estão descritas no fluxograma.

Figura 1 – Fluxograma de obtenção das amostras e extração de suas proteínas

4.3. PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS

4.3.1. Extração protéica

A curva de solubilidade foi determinada a partir da determinação de proteínas solúveis do FAD pelo método de Lowry (1951) utilizando uma faixa de pH entre 2 e 10. O resultado foi quantificado utilizando curva padrão de albumina em água (0,05 até 0,30 mg de albumina por mL, $R^2 = 0,9922$).

A extração das proteínas do FAD foi realizada conforme método proposto por Phongthai, Lim e Rawdkuen (2016) com modificações. As amostras foram solubilizadas em meio alcalino com carbonato de sódio 3M, seguida por precipitação no ponto isoelétrico

utilizando ácido cítrico 3M. Também foram testados ácido acético P.A. e acetona P.A. para precipitar as proteínas. O precipitado foi seco em estufa à 55 °C para obtenção dos concentrados protéicos e a escolha do método foi realizada através da determinação do conteúdo proteico dos concentrados, bem como o rendimento em proteína (razão entre a massa total de proteína contida no material e a massa de proteína extraída).

4.3.2. Atividade enzimática do complexo celulolítico

A avaliação da hidrólise enzimática foi realizada através da atividade específica da celulase conforme método proposto por Ghose (1987), pela quantificação dos açúcares redutores liberados em mistura reacional do extrato enzimático bruto e 50 g de papel filtro Whatman® em condições de temperatura, pH e tempo otimizadas em um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³, com 17 ensaios (3 pontos centrais e com pontos axiais). Para isso, foram quantificados os açúcares redutores liberados pelo método do 3,5-DNS proposto por Miller (1959), estimando açúcares redutores por curva padrão de glicose (0,01 até 0,08 mg de glicose por mL, R² = 0,9894). O conteúdo de proteínas solúveis no complexo enzimático foi determinado pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951)

Uma unidade (U) de celulase é a massa (mg) de glicose liberada por min; a atividade específica da enzima foi expressa em U/mg de proteína presente no extrato enzimático. Também foi determinada a atividade enzimática em FPU (*filter paper unit*), ou seja, a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por mL a cada minuto em condições padrão de ensaio.

4.4. PRÉ-TRATAMENTOS NO FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO

4.4.1. Extrusão

O tratamento físico do farelo consistiu em extrusão em uma extrusora industrial. Foram adicionados 7 L de água à 59 kg de farelo de arroz desengordurado, homogeneizando e alimentando a extrusora com uma vazão de alimentação de 17 g/s. A rotação utilizada foi de 20 rpm e a temperatura do forno foi estabilizada em 130 °C. A rampa de temperatura utilizada iniciou em 48 °C, com aumento gradual até 120 °C, permanecendo nesta temperatura durante o seu tempo de retenção (contato com rosca) e saindo à 150 °C pela trefila moldadora com 92 orifícios e cortados por 4 facas. Após a extrusão, o farelo extrusado foi resfriado, embalado e armazenado sob refrigeração (4 °C) até o momento das análises.

4.4.2. Hidrólise enzimática em batelada simples

Para o tratamento enzimático, as condições de pH, temperatura, concentração mínima e tempo utilizadas foram adaptadas de Kupski et al. (2018) e otimizadas a partir de um delineamento composto central rotacional (DCCR), para atuação deste complexo enzimático no FAD como substrato.

O primeiro planejamento foi realizado para otimização das condições de atuação do mix de enzimas do complexo celulolítico utilizando o FAD como substrato. Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , com 11 ensaios (3 pontos centrais e nenhum ponto axial). Foram avaliadas as variáveis temperatura, concentração de enzima-substrato e pH. A resposta avaliada foi liberação de açúcares redutores, determinada pelo método de Miller (1959).

O segundo planejamento foi realizado para otimização das condições de hidrólise enzimática no farelo de arroz desengordurado. Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , com 17 ensaios (3 pontos centrais e com pontos axiais). Foram avaliadas as variáveis rotações por minuto, tempo e temperatura; tendo como variável resposta a liberação de açúcares redutores, determinada pelo método de Miller (1959). Todos os ensaios realizados nos planejamentos tiveram ensaio em branco conduzido em paralelo. As condições otimizadas para FAD foram aplicadas na hidrólise do FAE.

4.4.3. Hidrólise enzimática em batelada alimentada

O processo de hidrólise em batelada alimentada consistiu em submeter o substrato (25 g de FAD ou FADE) juntamente com 10 mL da celulase (55 FPU) em agitação orbital (150 rpm) por 96 horas, à 55 °C. A cada 24 h foram adicionados 5 g de farelo e 2 mL de enzima, totalizando 96 h de processo. A atividade enzimática manteve a proporção 0,4 mL de enzima para cada 1 g de farelo. Um ensaio sem adição de enzima (controle) foi realizado.

4.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FONTES PROTÉICAS

A composição química dos FAD, FADH, FADE e FADEH foi determinada conforme métodos oficiais da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000): cinzas por incineração (942.05), proteína por volumetria conforme Kjeldahl (981.10), lipídeos por gravimetria de Soxhlet (945.16), umidade por gravimetria (934.01) e fibra bruta (973.18). O teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol-sulfúrico proposto por Dubois (1956). O teor de amido total foi determinado pelo método espectrofotométrico proposto por Martínéz e Cuevas (1989).

A análise térmica termogravimétrica (TGA) foi realizada em TG 50 da Shimadzu®, utilizando uma tampa de temperatura de 15 até 200 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio a 50 mL/min, no Centro Integrado de Análises (CIA) da FURG. Os dados foram transformados em curvas termogravimétricas. A partir destes resultados foi empregada a primeira derivada dos resultados para determinação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), conforme a equação descrita por Canevarolo (2004).

4.6. DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEÍCAS

As frações protéicas do FAD, FADH, FADE e FADEH foram determinadas pelo método de Osborne (1924) e adaptado por Silva, Kupski e Badiale-Furlong (2018). Para isso, 1 g de amostra foi solubilizado em 10 mL de água destilada e homogeneizado em sonda ultrassônica a 24 kHz por 10 min. A fração solúvel foi separada por centrifugação à 4 °C e 2240 x g por 20 min e o sobrenadante foi recolhido. O procedimento foi repetido três vezes. Os volumes de sobrenadante foram recolhidos e avolumados com água destilada em balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se a fração solúvel albumina (F1). No precipitado resultante da F1, foram adicionados 10 mL de solução NaCl 0,9%, homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições da fração anterior. O procedimento foi repetido três vezes, recolhendo os sobrenadantes e avolumando-os em balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se a fração solúvel de globulina (F2). No precipitado resultante da F2, foram adicionados 10 mL de solução etanol 70%, homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições da fração anterior. O procedimento foi repetido três vezes, recolhendo os sobrenadantes e avolumando-os em balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se a fração solúvel prolamina (F3). Por fim, no precipitado resultante da F3, foram adicionados 10 mL de solução de NaOH 0,1 M, homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições da fração anterior. O procedimento foi repetido três vezes, recolhendo os sobrenadantes e avolumando-os em balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se a fração solúvel glutelina (F4). As proteínas solubilizadas em cada fração foram quantificadas pelo método de Lowry (1951), usando curvas padrões de albumina em água ($R^2 = 0,9922$), albumina em NaOH 0,1M ($R^2 = 0,9969$), albumina em NaCl 0,9% ($R^2 = 0,9925$) e albumina em etanol 70% ($R^2 = 0,9773$), todas com linearidade de 0,05 a 0,30 mg/mL.

4.7. OBTENÇÃO DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS

A extração das proteínas do FAD, FADH, FADE e FADEH, foi realizada conforme método proposto por Phongthai, Lim e Rawdkuen (2016) com modificações.

O procedimento consistiu em pesar 3,0 g das amostras, diluir em 30 mL de água para as amostras FAD e FADE e 30 mL de tampão citrato-sódico 100 µmol pH 4,2 para as amostras submetidas à hidrólise; homogeneizar por 30 min em agitador orbital a 150 rpm e 25 °C. Para solubilização das proteínas foi adicionada solução de carbonato de sódio 3M até pH 9,5 seguindo com agitação em vórtex por 2 min e centrifugação à 25 °C e 5000 x g por 30 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga aonde foi adicionada solução de ácido cítrico 3M até pH 4,2. O tubo foi agitado em vórtex por 2 min e centrifugado nas mesmas condições, 25 °C e 5000 x g por 30 min. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi seco em estufa à 55 °C para obtenção dos concentrados protéicos.

4.8. CARACTERIZAÇÃO DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS

4.8.1 Análise Termogravimétrica

A análise térmica termogravimétrica (TGA) foi realizada em TG 50 da Shimadzu®, utilizando uma tampa de temperatura de 15 até 200 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio a 50 mL/min, no Centro Integrado de Análises (CIA) da FURG. Os dados foram transformados em curvas termogravimétricas. A partir destes resultados foi empregada a primeira derivada dos resultados para determinação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), conforme a equação descrita por Canevarolo (2004).

4.8.2. Propriedades Tecnológicas (Funcionais)

A atividade emulsificante (AE) e a estabilidade da emulsão (EE) das proteínas extraídas foram determinadas pelo método proposto por Pearce e Kinsella (1978). O procedimento consistiu em tomar 8 mL de óleo de soja e misturar com 24 mL de solução 0,1% (m/v) de solução do concentrado protéico. A emulsão foi obtida após homogeneização em agitador mecânico a 10000 rpm por 1 min. Para o estudo da estabilidade, foram retirados 50 µL da emulsão logo após homogeneização (tempo 0) e outros 50 µL após 10 min de repouso; adicionou-se 5 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% para realizar a quantificação da absorbância das emulsões em espectrofotômetro UV-VIS a 500 nm; a absorbância medida logo após a formação da emulsão é descrita como AE, enquanto que a EE após 10 minutos (EE₁₀) e EE após 30 minutos (EE₃₀) foram calculadas pela Equação 1 e Equação 2, respectivamente:

$$EE_{10} = (AE \times \Delta t) / (AE - AE_{10}) \quad (1)$$

$$EE_{30} = (AE \times \Delta t) / (AE - AE_{10}) \quad (2)$$

A turbidez (T) também foi medida como forma de avaliar a formação de emulsão das amostras, dado pela razão de 2,303 vezes o valor da absorbância (A) determinada e o caminho óptico da cubeta (l), em cm, utilizada para quantificação, conforme a Equação 3:

$$T = (2,303^a) / l \quad (3)$$

A capacidade de formação de espuma (FE) e estabilidade da formação de espuma (EFE) foram determinados pelo método proposto por Bandyopadhyay, Misra e Ghosh (2008). Foram colocados 20 mL de uma solução de concentrado protéico 2% (m/v) (pH 3, 5, 7 e 9) seguido por agitação em agitador mecânico a 10000 rpm por 3 min. O percentual da FE foi calculado pela diferença de volume após a homogeneização e antes da homogeneização divididos pelo volume antes da homogeneização; enquanto que o EFE foi calculado pela razão entre o volume final após 30 min e o volume logo após a homogeneização (em temperatura ambiente).

A capacidade de absorção de água (CAA) e a capacidade de absorção de óleo (CAO) foram determinados pelo método proposto por Sathe e Salunkhe (1981) com modificações propostas por Zhang et al. (2012). Foram misturados 0,5 g do concentrado protéico ou proteína padrão em tubo de centrífuga com 20 mL de água destilada e, em outro tubo, outros 0,5 g da mesma proteína foi misturado com 30 mL de óleo de soja. Os tubos foram homogeneizados com auxílio de bastão de vidro e logo após centrifugados a 3000 x g por 30 min. O volume dos fluidos contidos no sobrenadante foram medidos e a quantidade de água/óleo absorvidos pelas amostras foram calculados.

4.8.3. Propriedades Nutricionais

As propriedades nutricionais das proteínas recuperadas foram avaliadas, em termos de Índice de Dispersibilidade de Proteína (IDP) perfil de aminoácidos e digestibilidade. O IDP, indicativo de funcionalidade de proteína, foi determinado pelo método oficial “Ba 10-65” (*Protein Dispersibility Index*) descrito pela *American Oil Chemists’ Society* (AOCS, 1987). O método consistiu em pesar 13,5 g da proteína, adicionar 100 mL de água em liquidificador e homogeneizar por 1 min. Adicionar mais 100 mL de água para lavar as paredes do copo e homogeneizar durante 9 min em liquidificador a 8500 rpm. Foram transferidos 50 mL desta

solução para tubo de centrífuga e centrifugado à 25 °C, por 10 min e 1500 xg. Foram retirados 15 mL do líquido sobrenadante para determinação de proteínas totais pelo método de Kjeldahl.

O perfil aminoacídico foi determinado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu modelo LC-20AD) acoplado a detector de fluorescência e derivatizador pós-coluna, nas mesmas condições descritas por Denardi-Souza et al. (2017). Inicialmente, as amostras foram submetidas a hidrólise ácida, utilizando ácido clorídrico 6M, na proporção 1:25 de amostra:ácido (p/v). A mistura foi autoclavada por 8 min a 121 °C e 1,1 atm, posteriormente filtrada em filtro de celulose com abertura de 0,45 µm. O meio reacional foi evaporado em banho de areia a 110 °C. As amostras foram lavadas 5 vezes adicionando com 5 mL de água mili-Q e evaporando nas mesmas condições. Durante a última lavagem, a amostra foi colocada em banho ultrasônico por 3 min e ressuspensa em 10 mL com água mili-Q, utilizando filtro de celulose 0,45 µm para balão volumétrico de 10 mL. Os extratos foram quantificados, utilizando as seguintes condições cromatográficas: vazão das fases móveis de 0,6 mL/min, vazão dos derivatizantes de 0,2 mL/min, temperatura do forno de 60 °C, tempo de corrida de 45 min, comprimento de onda de excitação e emissão de 350 e 450 nm, respectivamente.

Os scores de aminoácidos essenciais e aminoácidos totais são determinados a partir da soma da quantificação dos aminoácidos presentes no perfil cromatográfico obtido e expressados em $g_{aa}/100g_{proteína}$. O cálculo da taxa de eficiência protéica (TEP) foi determinado a partir da Equação 4, proposta por Alsmeyer, Cunningham e Happich (1974), sendo Leu = teor de leucina quantificada e Tyr = teor de tirosina quantificada, ambos em $g_{aa}/100g_{proteína}$:

$$TEP = -0,468 + 0,454.Leu - 0,105.Tyr \quad (4)$$

A determinação da digestibilidade proteica foi realizada segundo o método proposto por Versantvoort et al. (2005) que simula o processo de digestão gastrointestinal. Para isso, 4,5 g de proteína foram misturados a 6 mL de solução de saliva sintética (pH 6,8), agitados a 55 rpm, a 37°C por 5 min. Após esse período, foram adicionados 12 mL de solução de suco gástrico (pH 2) e novamente incubando nas mesmas condições citadas previamente, por mais 2 h. Por fim, foram adicionados, simultaneamente, 12 mL de uma solução de suco duodenal, 6 mL de bile e 2 mL de bicarbonato de sódio (1 M) e mantidos por mais 2 h, nas mesmas condições citadas anteriormente. O pH variou entre 6,5 e 7. Após a simulação da digestão estar completa, as amostras foram centrifugadas por 5 min, a 37 °C e 2750 x g e o conteúdo de proteínas totais no sobrenadante e no precipitado foi determinado pelo método de Kjeldhal.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados foram estatisticamente tratados (a um nível de significância de 95%) por análise de variância (ANOVA); foram satisfeitos os pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência. Os dados residuais não-normais foram transformados matematicamente e novos testes de normalidade foram aplicados. Os resultados experimentais que diferenciarem significativamente entre si foram submetidos ao Teste “*t-student*” quando o número de tratamentos foi igual a 2 e ao Teste de Tukey para determinar a diferença mínima significativa (DMS) quando o número de tratamentos foi maior ou igual a 3. Foram utilizados os *softwares* Statistica 7.0 e Past 4.0. A análise multivariada de agrupamento hierárquico foi realizado no software Action Stat[®].

4.10. VIABILIDADE ECONÔMICA

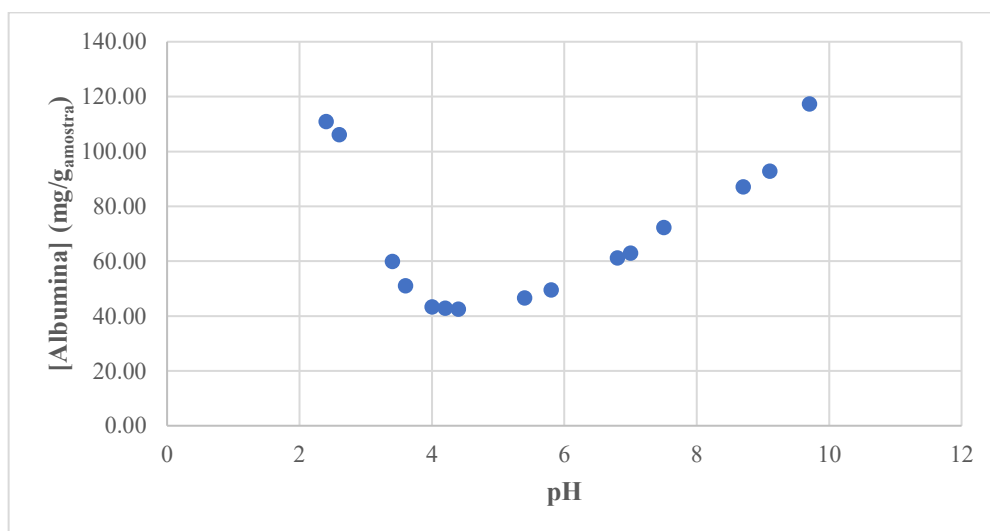
Para realizar uma estimativa da viabilidade econômica dos processos de obtenção dos concentrados protéicos foi realizada a projeção de custos fixos e variáveis, projeção dos custos de despesas e custos de investimentos, bem como as projeção de receitas, projeções de fluxos de caixa (hipótese otimista, neutra e pessimista) e dois indicadores de viabilidade: a TIR (taxa interna de retorno) que representa a viabilidade do projeto e o *payback*, que é o tempo em que o projeto pagará o investimento realizado (SEBRAE, 2017).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO PROTÉICA

Para realizar a extração de proteínas, primeiro foi feito o ensaio de solubilidade para determinar qual o melhor pH de solubilização e precipitação das proteínas presentes no farelo de arroz desengordurado. A curva elaborada está representada na Figura 2:

Figura 2 – Curva de solubilidade das proteínas do FAD sob diferentes pHs



Em pH 9,7 estão solúveis 72,9% (117,3 mg/g_{amostra}) das proteínas e ao reduzi-lo para 4,2 apenas 26,4% (42,6 mg/g_{amostra}) permaneceram solúveis. A extração de proteínas por solubilização utilizando solventes alcalinos e precipitação ácida nortearam os testes que seguiram a partir deste ensaio de solubilidade.

Comparando os resultados deste estudo com os encontrados por Charoen, Tipkanon e Savedboworn (2017) cujo teor de proteínas solúveis a pH 4 foi de 27,2% para a proteína hidrolisada por uma protease, fica demonstrada a consistência entre nossos dados sem hidrólise prévia. Este valor encontrado pelos autores mencionados também é consistente com o encontrado no nosso experimento quanto a solubilidade do FAD. Resultados similares também foram observados para os pHs 5 e 6. Bandyopadhyay, Misra e Ghosh (2008) obtiveram um percentual de 94,8% de proteínas solúveis em pH 9 ao avaliar a curva de solubilidade das proteínas hidrolisados de FAD utilizando papaína. Estas informações sugerem que a faixa de pH de maior recuperação de proteínas de FAD não é afetada pela hidrólise enzimática prévia. Sendo assim, esta região de pH foi adotada para a sequência do estudo.

Foram realizados testes preliminares para verificar se há a influência de diferentes agentes precipitantes e mecanismos de ação, ponto isoelétrico (ácido cítrico 3M e ácido acético

P.A.) ou mudança de constante dielétrica (acetona P.A.) para inferir sobre os mais promissores para o rendimento na extração de proteínas para obtenção dos concentrados. A Tabela 1 apresenta os resultados de proteína total e rendimento de extração nestes ensaios.

Tabela 1 – Influência de diferentes agentes precipitantes no rendimento de extração

Agente precipitante/Determinação	Proteína _{Total} (%)		Rendimento (%)	
	CFAD	CFADH	CFAD	CFADH
Acetona (P. A.)	50,7 ^b ± 1,05	57,2 ^b ± 0,83	58,9 ^b ± 0,72	60,2 ^b ± 0,21
Ácido Acético (P. A.)	55,2 ^a ± 0,29	60,0 ^a ± 0,57	62,9 ^a ± 0,70	64,7 ^a ± 0,38
Ácido Cítrico (3M)	54,9 ^a ± 0,84	59,6 ^a ± 1,06	63,2 ^a ± 0,96	64,6 ^a ± 1,22

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A utilização de ácido acético (P.A.) ou ácido cítrico (3M) como agentes precipitantes reduziram o ponto isoelétrico das proteínas presentes no FAD, sem promover diferenças, tanto na recuperação de proteína total quanto no rendimento de extração. A utilização da acetona (P.A.) para alteração da constante dielétrica do meio como agente de precipitação mostrou menores valores tanto em recuperação de proteína quanto em rendimento de extração quando comparado com os outros agentes precipitantes.

O agente precipitante ácido cítrico (3M) foi escolhido para continuidade do estudo porque: tem custo de menor do que o ácido acético (P.A.), a adição do ácido acético (P.A.) para precipitação reage com as proteínas formando volume grande de espuma atrapalhando a operação e possivelmente afetando as propriedades tecnológicas das proteínas. O mesmo efeito de formação de espuma foi observado quando foi utilizada a acetona (P.A.) para realizar a precipitação das proteínas.

O ácido cítrico (3M) apresenta vantagem econômica, operacional e também ecológica do ponto de vista comercial em relação aos demais agentes estudados, uma vez que a proteína obtida utilizando não necessita de posteriores processos de purificação ou lavagem para utilização.

5.2. PADRONIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CELULASE

O complexo enzimático comercial pode sofrer alterações da atividade das enzimas ao longo de seu armazenamento e manuseio laboratorial ou industrial, portanto é importante caracterizar este complexo quanto ao seu poder hidrolítico previamente aos experimentos. Por este motivo, foi conduzido um experimento fatorial DCCR 2³, utilizando o método de

determinação de atividade do complexo celulolítico utilizando papel filtro como substrato padrão de resposta, tendo como as variáveis temperatura, pH e tempo de reação e como resposta a liberação de glicose por mL de extrato enzimático. Os níveis estudados e as respostas obtidas em cada um dos ensaios estão representados no Quadro 1.

Quadro 1 – Resultados obtidos para os parâmetros de atividade da Celulase

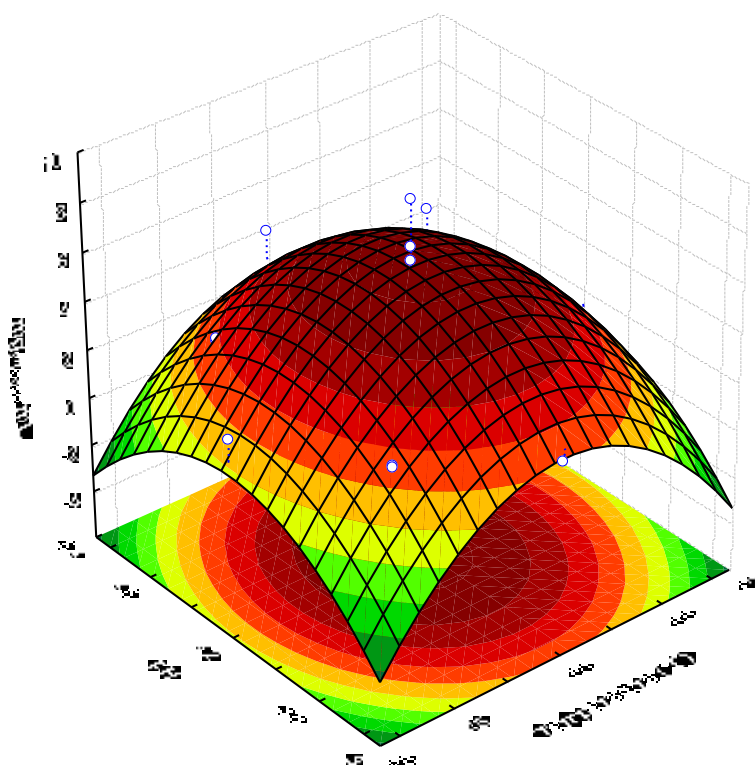
Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Tempo (min)	mg _{glicose} /mL
1	45 (-1)	3,8 (-1)	25 (-1)	2,3
2	55 (+1)	3,8 (-1)	25 (-1)	1,4
3	45 (-1)	4,8 (+1)	25 (-1)	2,7
4	55 (+1)	4,8 (+1)	25 (-1)	2,2
5	45 (-1)	3,8 (-1)	35 (+1)	2,2
6	55 (+1)	3,8 (-1)	35 (+1)	1,6
7	45 (-1)	4,8 (+1)	35 (+1)	2,7
8	55 (+1)	4,8 (+1)	35 (+1)	4,3
9	38 (-1,68)	4,2 (0)	30 (0)	2,3
10	62 (+1,68)	4,2 (0)	30 (0)	0,8
11	50 (0)	3 (-1,68)	30 (0)	2,1
12	50 (0)	5,4 (+1,68)	30 (0)	3,8
13	50 (0)	4,2 (0)	18 (-1,68)	5,5
14	50 (0)	4,2 (0)	42 (+1,68)	8,7
15	50 (0)	4,2 (0)	30 (0)	5,7
16	50 (0)	4,2 (0)	30 (0)	6,9
17	50 (0)	4,2 (0)	30 (0)	6,3

O valor de glicose liberada por mL de enzima variou de 0,8 até 8,7. As variáveis temperatura e pH foram significativas a um nível de confiança de 95% neste planejamento, apresentando p-valor igual a 0,007 e 0,012, respectivamente. A variável tempo não foi significativa e, por este motivo, foi desconsiderada na elaboração da superfície de resposta deste planejamento (Figura 3).

O coeficiente de determinação para a resposta estudada foi igual a 75,7% e o p-valor = 0,0015. O teste F foi significativo, sendo o modelo adequado para descrever os resultados pela superfície de resposta construída. A resposta de liberação de glicose resultou em um modelo de segunda ordem. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos. A equação preditiva, sendo y a resposta em mg de glicose por mL, x_1 = temperatura e x_2 = pH, pode ser descrita conforme Equação 5:

$$y = 6,39 - 1,97x_1^2 - 1,47x_2^2 \quad (5)$$

Figura 3 – Superfície de resposta para o planejamento dos parâmetros para atividade da celulase



O coeficiente de determinação para a resposta estudada foi igual a 75,7% e o p-valor = 0,0015. O teste F foi significativo, sendo o modelo adequado para descrever os resultados pela superfície de resposta construída. A resposta de liberação de glicose resultou em um modelo de segunda ordem. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos. A equação preditiva, sendo y a resposta em mg de glicose por mL, x_1 = temperatura e x_2 = pH, pode ser descrita conforme Equação 5:

$$y = 6,39 - 1,97x_1^2 - 1,47x_2^2 \quad (5)$$

A temperatura ótima da enzima foi 50 °C e o pH ótimo compreende uma faixa de 4 até 4,6, diferindo assim das instruções sugeridas pelo fabricante (Novozymes®), que indica pH 5,0 e temperatura 37 °C. Este fato indica possíveis alterações no perfil enzimático durante o armazenamento. Sendo assim, um ensaio de atividade enzimática foi conduzido antes de cada

experimento para que fossem empregadas as combinações mais eficientes do complexo enzimático.

5.3. ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O primeiro planejamento realizado consistiu em um DCC 2³, sem pontos axiais, para determinar a temperatura, tempo e proporção de enzima:substrato utilizando o substrato de farelo de arroz desengordurado (FAD), tendo-se como referência os melhores parâmetros do complexo enzimático celulolítico no substrato de papel filtro. A resposta avaliada foi quantidade de mg de glicose liberada por minuto por mL de enzima, demonstrado no Quadro 2.

Quadro 2 – Resultados obtidos nos Ensaios do Planejamento para obtenção dos parâmetros do complexo celulolítico no substrato Farelo de Arroz

Ensaios	Temperatura (°C)	pH	E:S	mg _{glicose} /mL
1	45 (-1)	3,8 (-1)	1:5 (-1)	0,9
2	45 (-1)	3,8 (-1)	1:15 (+1)	0,6
3	45 (-1)	4,6 (+1)	1:5 (-1)	0,2
4	45 (-1)	4,6 (+1)	1:15 (+1)	0,3
5	50 (0)	4,2 (0)	1:10 (0)	0,2
6	50 (0)	4,2 (0)	1:10 (0)	0,1
7	50 (0)	4,2 (0)	1:10 (0)	0,3
8	50 (0)	3,8 (-1)	1:5 (-1)	0,2
9	50 (0)	3,8 (-1)	1:15 (+1)	2,3
10	50 (0)	4,6 (+1)	1:5 (-1)	0,2
11	50 (0)	4,6 (+1)	1:15 (+1)	0,6

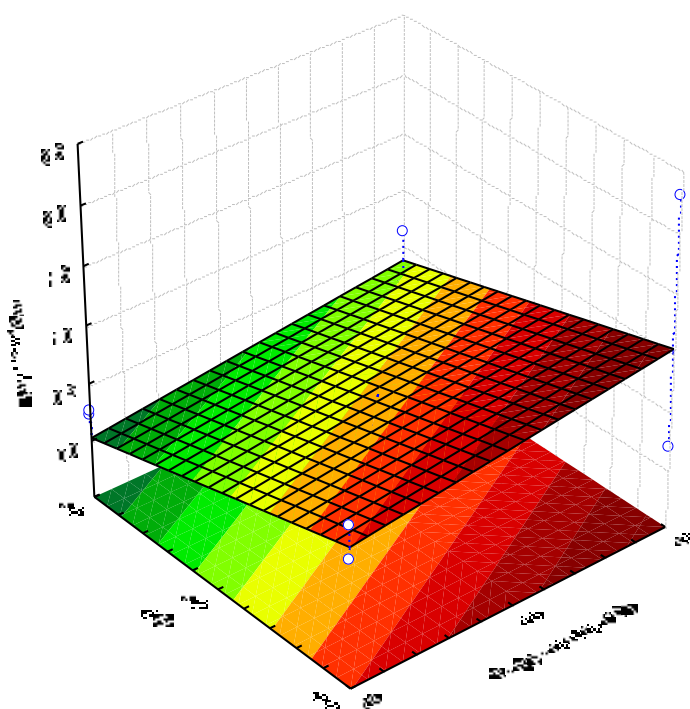
O valor de glicose liberado por mL de enzima variou de 0,1 a 2,3. As três variáveis estudadas neste planejamento foram significativas a um nível de confiança de 95%, apresentando p-valor para temperatura = 0,029, pH = 0,008 e E:S = 0,011. As relações entre as variáveis T-E:S (p = 0,436) e pH-E:S (p = 0,031) também foram significativas.

O coeficiente de determinação para a resposta estudada foi igual a 74% e o p-valor = 0,0023. O teste F foi significativo, sendo possível gerar as superfícies de resposta (Figuras 4, 5 e 6). As melhores condições foram determinadas a partir destas superfícies.

A partir desta superfície demonstrada na Figura 4 é possível destacar que o emprego da temperatura em seu nível mais alto (+1) foi significativa para a atividade do complexo, bem como o emprego do menor valor de pH (-1). Portanto, no substrato farelo de arroz a maior atuação do mix de enzimas tende a aumentar a liberação de glicose no meio. Temperaturas mais

brandas e pHs que tendem a neutralidade e alcalinidade acabam não propiciando uma boa liberação de glicose e, conseqüentemente, indicam que as enzimas não estão em suas melhores condições de atuação, causando a hidrólise parcial (ou incompleta) do material lignocelulósico.

Figura 4 – Superfície de resposta para as variáveis Temperatura x pH



Na Figura 5, destaca-se que a concentração de enzima:substrato no seu nível máximo (+1) requereu uma maior quantidade de substrato (material lignocelulósico) para que o mix de enzimas conseguisse utilizar todo o seu poder hidrolítico e fornecer os melhores resultados para liberação de glicose; a temperatura ideal continua em seu nível máximo (+1).

Para a resposta de liberação de glicose obteve-se um modelo de primeira ordem. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos. A equação preditiva para este planejamento, sendo y a resposta em mg de glicose por mL, x_1 = temperatura, x_2 = pH e x_3 = E:S, pode ser descrita por:

$$y = 0,53 + 0,17x_1 - 0,34x_2 + 0,29x_3 + 0,34x_1x_3 - 0,17x_2x_3 \quad (6)$$

Os melhores parâmetros para a atividade do complexo enzimático foram obtidos quando houve um aumento da relação de concentração enzima:substrato. O complexo

celulolítico atuando no FAD apresentou maior atividade em pH menor (3,8) do que o seu pH ótimo determinado em ensaio padrão com papel filtro (4,2), mostrando a diferença de aplicação em uma matriz padrão e uma matriz complexa com outros constituintes que podem requerer uma outra conformação espacial da enzima para sua maior eficiência. As condições adotadas para a atuação da celulase no farelo de arroz desengordurado foram fixadas em: proporção enzima:substrato 1:15 (+1), pH 3,8 (-1) e temperatura 55 °C (+1).

Uma vez determinada as melhores condições de atuação do complexo celulolítico no FAD foi realizado outro experimento para determinar as melhores condições de hidrólise, fixando o pH e a concentração de enzima:substrato obtidas no planejamento anterior, para melhorar o desempenho da enzima neste substrato, de modo a obter o máximo de rendimento durante os experimentos de extração de proteína da matriz lignocelulósica; Neste experimento foi realizado um DCC 2³, ampliando a faixa de variação de temperatura para buscar um menor gasto de energia caso o processo se mostre promissor para aplicação em maior escala. Foram avaliados três parâmetros: agitação (RPM), tempo (min) e temperatura (°C). A resposta avaliada foi a massa em mg de glicose liberada por minuto por mL de enzima. Os resultados obtidos estão apresentados no Quadro 3.

Figura 5 – Superfície de resposta para as variáveis Temperatura x E:S

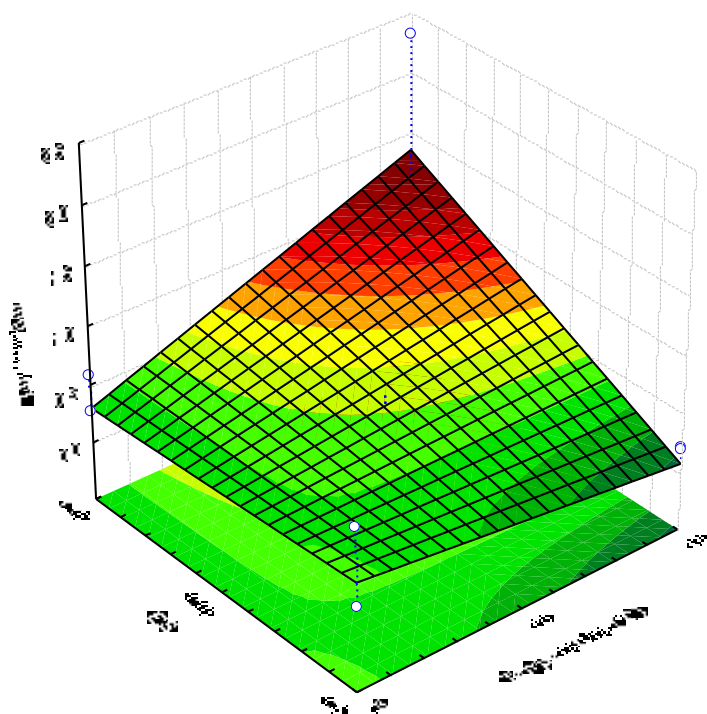
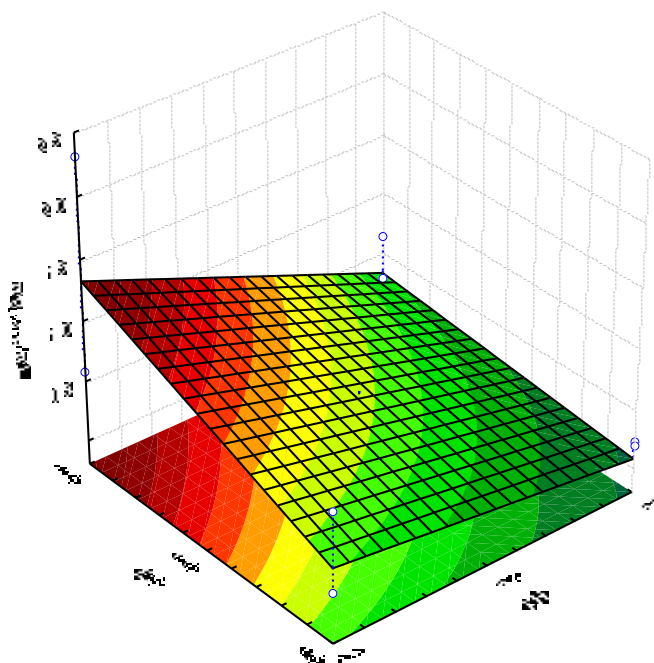


Figura 6 – Superfície de resposta para as variáveis E:S x pH



Quadro 3 – Variáveis estudadas, níveis e resposta para os ensaios do Planejamento

Ensaio	Agitação (RPM)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	mg _{glicose} /mL
1	150 (-1)	40 (-1)	45 (-1)	0,3

2	150 (-1)	40 (-1)	55 (+1)	0,1
3	150 (-1)	80 (+1)	45 (-1)	1,1
4	150 (-1)	80 (+1)	55 (+1)	1,6
5	200 (0)	60 (0)	50 (0)	0,1
6	200 (0)	60 (0)	50 (0)	0,1
7	200 (0)	60 (0)	50 (0)	0,1
8	250 (+1)	40 (-1)	45 (-1)	0,2
9	250 (+1)	40 (-1)	55 (+1)	0,2
10	250 (+1)	80 (+1)	45 (-1)	0,3
11	250 (+1)	80 (+1)	55 (+1)	1,1

As três variáveis estudadas neste planejamento foram significativas a um nível de confiança de 95%, apresentando p-valor para agitação, tempo e temperatura $< 0,001$. As relações entre as variáveis agitação-tempo, tempo-temperatura ($p < 0,001$) e agitação-temperatura ($p = 0,003$) também foram significativas.

Figura 7 – Superfície de resposta para as variáveis Agitação x Tempo x atividade enzimática

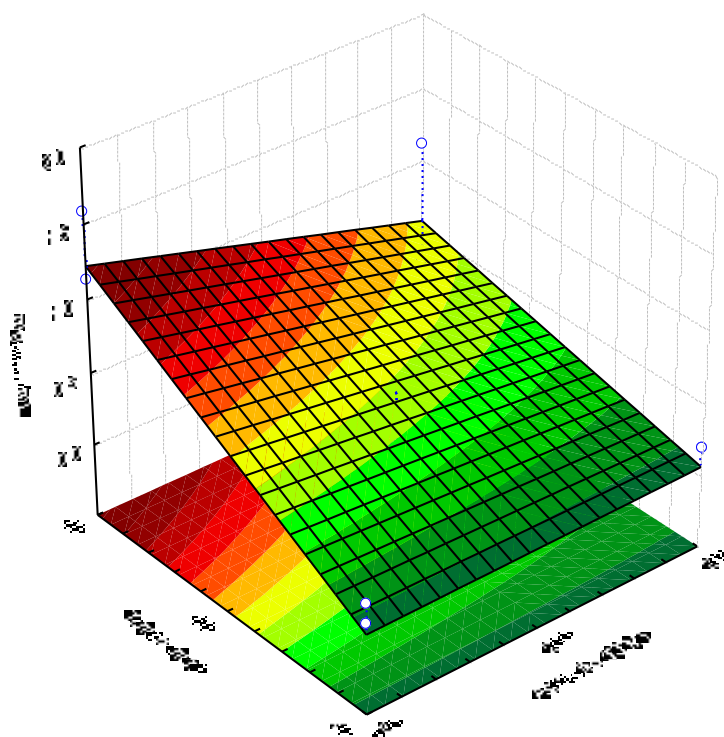


Figura 8 – Superfície de resposta para as variáveis Tempo x Temperatura x atividade enzimática

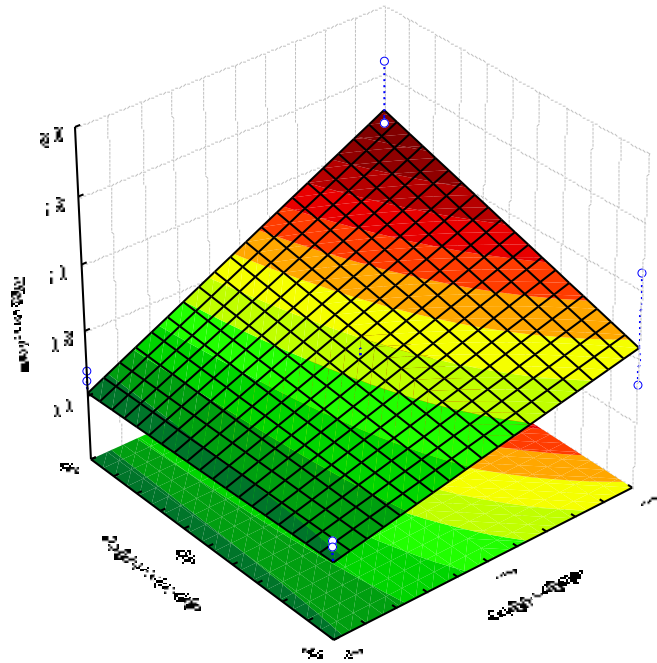
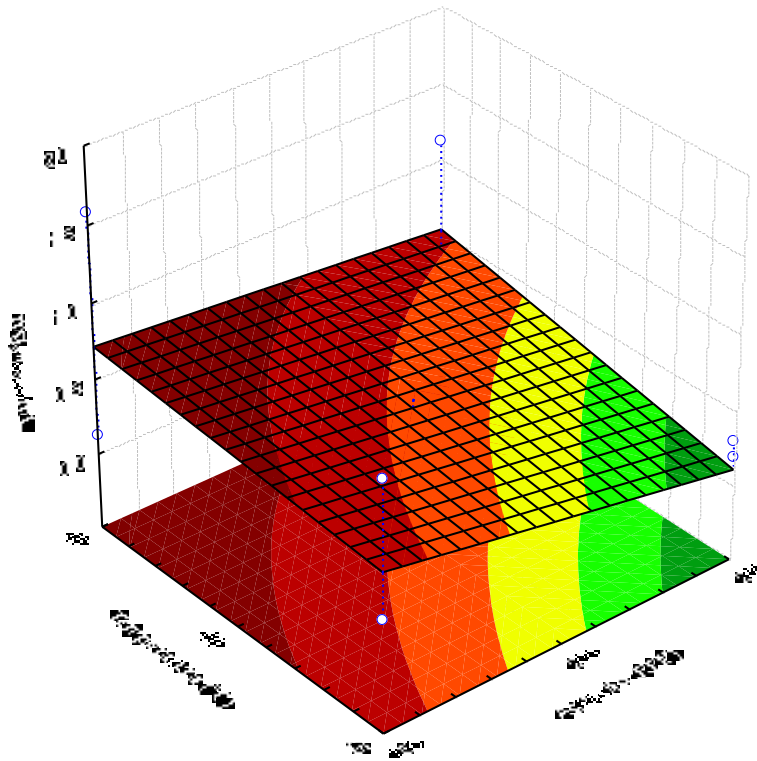


Figura 9 – Superfície para as variáveis Agitação x Temperatura x atividade enzimática



O coeficiente de determinação para a resposta estudada foi igual a 80,4% e o p-valor < 0,0001. O teste F foi significativo, sendo o modelo adequado para descrever os resultados pela superfície de resposta construída. Para a resposta de liberação de glicose obteve-se um modelo de primeira ordem. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos. A equação preditiva para este planejamento, sendo y a resposta em mg de glicose por mL, x_1 = agitação, x_2 = tempo e x_3 = temperatura, pode ser descrita por:

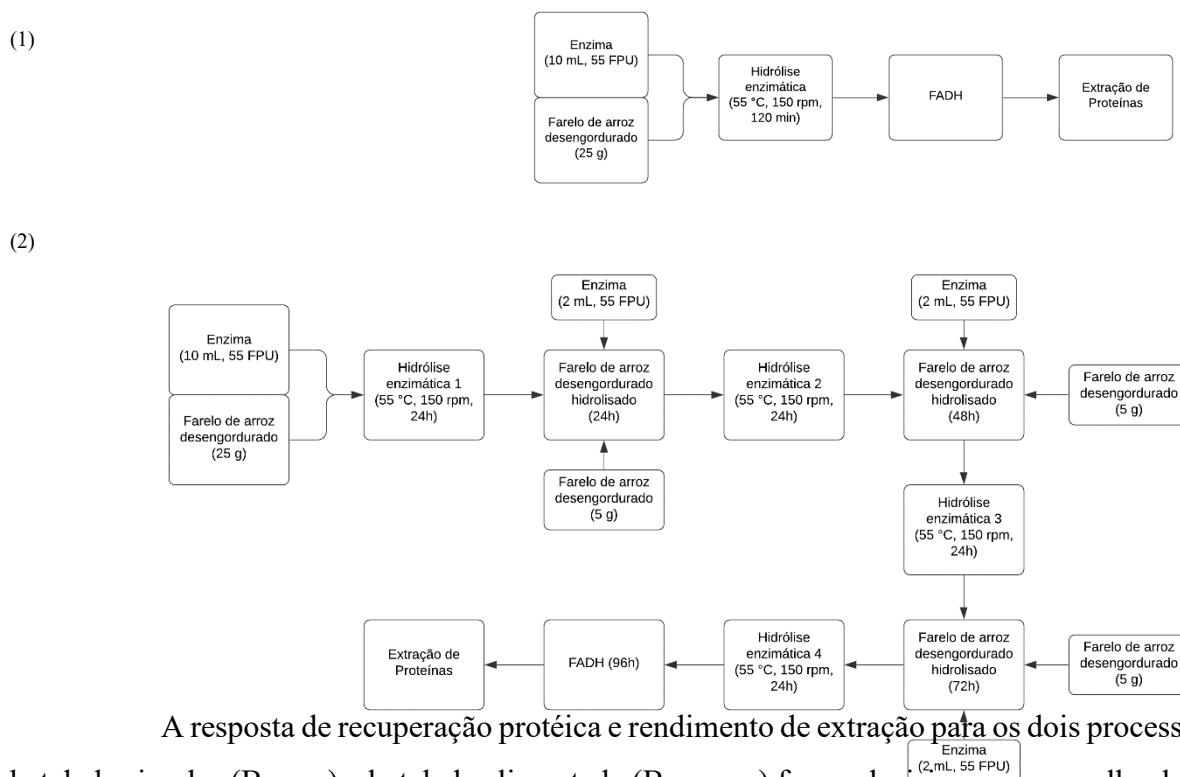
$$y = 0,48 - 0,16x_1 + 0,42x_2 + 0,14x_3 - 0,17x_1x_2 + 0,06x_1x_3 + 0,17x_2x_3 \quad (7)$$

O tempo foi significativo para atuação do complexo enzimático em um substrato diferente do que seu padrão (papel filtro). Os maiores tempos de hidrólise empregados no substrato FAD, quando submetidas às menores agitações orbitais (150 rpm) à 55 °C, resultaram na maior atividade do complexo enzimático. Avaliando as três superfícies de respostas geradas, as condições de hidrólise do farelo de arroz desengordurado foram fixadas em: temperatura de 55 °C, agitação orbital em 150 rpm e 80 min de hidrólise. Kupski et al. (2018) realizaram estudos com emprego de hidrólise enzimática utilizando celulase em diferentes substratos e também encontraram suas melhores condições de agitação em 150 rpm. Este comportamento é esperado, pois a agitação pode alterar a conformação nativa das proteínas e a estabilidade do complexo enzima-substrato.

Com a utilização dos planejamentos experimentais foi possível caracterizar o complexo celulolítico quanto às suas condições de atuação no substrato complexo (farelo de arroz desengordurado) e otimizar as condições de hidrólise deste substrato complexo para que a maior quantidade de celulose seja convertida em açúcar, afim de verificar a sua influência na extração de proteínas posteriormente. Todos os experimentos de hidrólise realizados neste trabalho utilizaram as melhores condições obtidas na sequência das respostas dos planejamentos e o tratamento otimizado para FAD foi aplicado no farelo de arroz extrusado (FADE) para a avaliação do efeito sinérgico do tratamento físico e enzimático (FADEH).

Além disto, foi estudada a influência da implementação da batelada alimentada ao processo de hidrólise e avaliado a interferência desta estratégia na recuperação das proteínas do FADH e FADEH. A Figura 10 mostra dois fluxogramas que exemplificam os dois processos de hidrólise enzimática avaliados neste trabalho para o FAD; os mesmos processos foram testados com o substrato FADE para obtenção do FADEH.

Figura 10 – Etapas do processo de hidrólise por batelada simples (1) e batelada alimentada (2)



A resposta de recuperação protéica e rendimento de extração para os dois processos, batelada simples (B_{simples}) e batelada alimentada ($B_{\text{alimentada}}$) foram decisivas para escolha deste pré-tratamento. A Tabela 2 mostra os dois parâmetros avaliados para as amostras de FADH e FADEH:

Tabela 2 – Comparação do teor de proteína total e rendimento de extração dos processos de batelada simples (B_{simples}) e em batelada alimentada ($B_{\text{alimentada}}$)

Amostra (Processo)/Determinação	Proteína _{Total} (%)	Rendimento (%)
FADH (B_{simples})	48,4 ^d ± 0,78	45,3 ^c ± 0,63
FADH ($B_{\text{alimentada}}$)	59,6 ^b ± 1,06	64,6 ^b ± 1,22
FADEH (B_{simples})	53,1 ^c ± 0,75	45,7 ^c ± 0,70
FADEH ($B_{\text{alimentada}}$)	72,0 ^a ± 0,62	69,6 ^a ± 0,61

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A partir dos resultados é possível afirmar que a hidrólise em batelada alimentada foi responsável por promover uma maior recuperação das proteínas presentes no FAD e no FADE, bem como aumentar o teor total de proteínas do concentrado obtido, uma vez que promove um maior tempo de interação entre as enzimas e o material lignocelulósico das fontes

protéicas estudadas e ainda promove a renovação de material não-hidrolisado no meio a cada 24 h, concentrando o teor de proteínas e disponibilizando-as para extração.

O aumento de rendimento de extração de 19,3% e 23,9% para o FADH e FADEH, respectivamente, justifica a escolha da batelada alimentada para prosseguimento deste trabalho, uma vez que aumenta a quantidade de proteína obtida por extração e torna os números interessantes do ponto de vista econômico para uma possível replicação em escala industrial posteriormente.

O número total de bateladas (quatro, uma a cada 24 h), a quantidade de material hidrolisado (45 g) e enzima (18 mL) foram adaptados para a realidade de operação dentro do laboratório, bem como na velocidade de obtenção do concentrado para realizar as demais propriedades físico-químicas, nutricionais e tecnológicas.

5.4. COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS FONTES PROTÉICAS

A composição proximal em base seca está apresentada no Tabela 3 para FAD; farelo de arroz desengordurado extrusado (FADE); farelo de arroz hidrolisado (FADH) e farelo de arroz desengordurado, extrusado e hidrolisado (FADEH)

Tabela 3 – Composição proximal dos farelos estudados em base seca

Composição/Fonte	FAD	FADE	FADH	FADEH
Umidade (%)	12,4 ^a ± 0,32	8,7 ^b ± 0,31	12,6 ^a ± 0,29	8,3 ^b ± 0,26
Proteínas (%)	16,1 ^d ± 0,38	17,9 ^c ± 0,64	19,9 ^b ± 0,26	21,3 ^a ± 0,23
Lipídeos (%)	1,7 ^a ± 0,12	1,1 ^b ± 0,21	0,8 ^b ± 0,17	0,4 ^d ± 0,06
Cinzas (%)	8,5 ^c ± 0,38	12,0 ^a ± 0,44	6,0 ^d ± 0,23	7,4 ^b ± 0,25
Carboidratos (%)	66,4 ^c ± 0,12	62,0 ^d ± 0,35	71,7 ^a ± 0,47	68,4 ^b ± 0,23
Fibras (%)	10,4 ^b ± 0,38	11,8 ^a ± 0,32	5,3 ^c ± 0,45	5,9 ^c ± 0,26
Amido (%)	26,4 ^b ± 0,26	29,4 ^a ± 0,98	5,5 ^d ± 0,31	7,9 ^c ± 0,15

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente (p < 0,05).

Cabe salientar que após os tratamentos enzimáticos as enzimas foram inativadas, separando-se a fração líquida e secando as frações sólidas resultantes. A hidrólise enzimática do FAD e do FADE afetou significativamente o teor de proteínas dos farelos, apresentando um aumento de 23,6% e 19,0%, respectivamente. Possivelmente isto tenha ocorrido porque com a ação enzimática do material lignocelulósico acabou transformando-o em açúcares menores mais solúveis e, ao ser recuperado o material tratado na fração sólida, as proteínas passaram a representar maior proporção. O teor de cinzas diminuiu significativamente após a hidrólise do FAD e do FADE em 29,4% e 38,3%, respectivamente, confirmando o que foi mencionado com

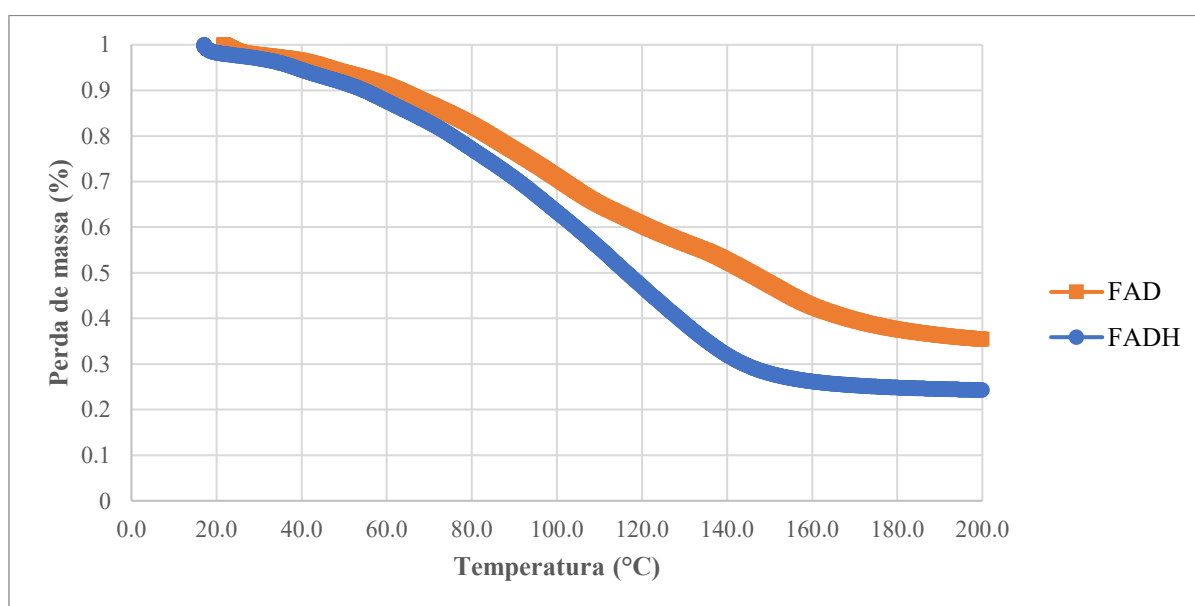
relação a proporcionalidade entre os componentes das amostras alterados pela solubilização dos carboidratos.

A hidrólise também afetou significativamente o teor de fibras contido nos FAD e FADE, como era esperado pela degradação do material lignocelulósico; houve a diminuição em 51,0% e 50%, respectivamente. Houve ainda uma diminuição drástica do teor de amido presente nas amostras hidrolisadas de FAD e FADE em 79,2% e 73,1%, respectivamente. A hidrólise do material lignocelulósico do farelo e transformação do amido em açúcares menores foi confirmada pelos percentuais significativamente maiores dos teores de carboidratos totais estimados no FAD e FADE em 8% e 10,3%, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as amostras de FAD e FADE e seus respectivos hidrolisados quanto ao teor de umidade.

5.5. PROPRIEDADES TÉRMICAS DAS FONTES PROTÉICAS

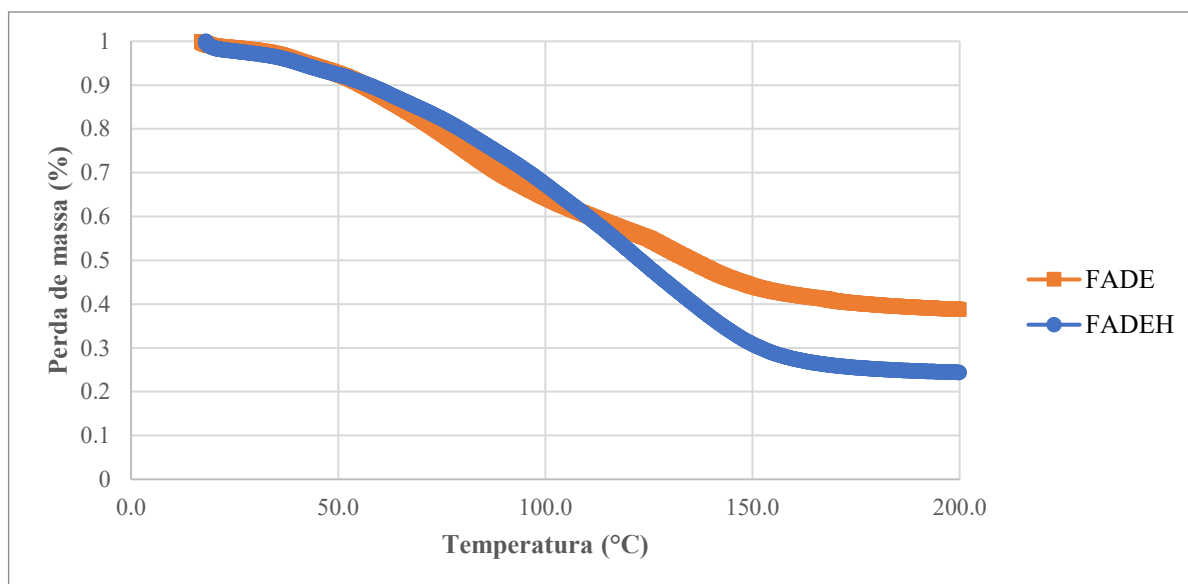
As propriedades térmicas de uma fonte protéica indicam quais as condições de estabilidade térmica dela, permitindo inferir qual ou quais processos podem ser aplicáveis sem alteração significativa nas propriedades nutricionais e tecnológicas do polímero (CANEVAROLO, 2004). As Figuras 11 e 12 mostram as curvas termogravimétricas obtidas dos farelos e seus hidrolisados, afim de verificar a influência do processo enzimático e físico nesta propriedade térmica.

Figura 11 – Curva termogravimétrica do FAD e FADH



É possível verificar que a hidrólise do FAD promove uma diminuição acentuada da perda de massa do material a partir da temperatura de 100 °C. O material não hidrolisado (FAD) atingiu uma perda de massa de 64%, enquanto que o FADH chegou a 75%.

Figura 12 – Curva termogravimétrica do FADE e FADEH



O mesmo comportamento foi verificado no FADE submetido a hidrólise aonde o material mais estável a temperatura de 100 °C mas que diminuiu acentuadamente após 110 °C, chegando a uma perda de massa de 77%, enquanto o FADE teve uma perda de massa total de 61%. Estes comportamentos sugerem que as matrizes cujo material celulósico não foi hidrolisado são mais estáveis frente aos processos térmicos.

5.6. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS DOS FARELOS

As fontes protéicas foram submetidas a tratamento enzimático, que afeta as interações das proteínas com outros componentes da matriz (PHONGTHAI; LIM; RAWDKUEN, 2016) e tratamento físico (extrusão), que afeta a conformação das proteínas (OMOSEBI; OSUNDAHUNSI; FAGBEMI, 2018).

O estudo prévio da distribuição das frações protéicas dos farelos é importante para verificar se os pré-tratamentos empregados antes do processo de extração das proteínas estão promovendo um rearranjo da solubilidade delas, bem como avaliar posteriormente se estas estão diretamente relacionadas de alguma forma a possíveis alterações das propriedades tecnológicas e nutricionais. Na Tabela 4 está demonstrada a distribuição percentuais das frações

protéicas dos farelos tratados e controle (FAD), determinados conforme o método de Osborne (1924).

Tabela 4 – Frações protéicas das fontes estudadas

Amostra/Fração	Albumina (%)	Globulina (%)	Glutelina (%)	Prolamina (%)
FAD	30,5 ^c ± 0,75	36,4 ^{bc} ± 0,31	24,3 ^a ± 0,18	8,8 ^a ± 0,34
FADH	32,4 ^b ± 0,18	35,9 ^c ± 0,11	24,0 ^a ± 0,31	7,7 ^b ± 0,38
FADE	34,7 ^a ± 0,71	37,1 ^{ab} ± 0,40	21,8 ^b ± 0,35	6,4 ^c ± 0,40
FADEH	34,7 ^a ± 0,54	37,9 ^a ± 0,75	22,4 ^b ± 0,42	5,0 ^d ± 0,85

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

O pré-tratamento responsável por alterar significativamente a composição das frações protéicas do FAD foi o processo de extrusão. O FADE apresentou alteração em todas as frações, tendo aumento significativo na albumina e globulina e diminuição significativa na glutelina e prolamina. A hidrólise afetou apenas a fração albumina, provendo um aumento do percentual e da prolamina diminuindo. O efeito combinado dos pré-tratamentos, FADEH, mostrou que a única fração afetada em relação ao FADE é a diminuição da prolamina. Possivelmente a interação entre os polímeros nos farelos sem hidrólise do material lignocelulósico ocorria de forma a propiciar uma menor solubilidade das proteínas em meio aquoso, por terem seus grupamentos hidrofílicos comprometidos nas interações com carboidratos.

5.7. OBTENÇÃO DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS

Os concentrados foram denominados: CFAD (concentrado protéico de farelo de arroz desengordurado), CFADH (concentrado protéico de farelo de arroz desengordurado e hidrolisado), CFADE (concentrado protéico de farelo de arroz desengordurado extrusado) e CFADEH (concentrado protéico de farelo de arroz desengordurado extrusado e hidrolisado).

A Tabela 5 apresenta o teor total de proteína obtida dos concentrados extraídos utilizando ácido cítrico 3M como agente precipitante e o rendimento de extração. Com esta estimativa é possível inferir a quantidade de massa protéica que permanece no resíduo fibroso desta extração, passível de um novo estudo para melhor aproveitamento total do FAD e seus derivados pré-tratados (FADE, FADH e FADEH). Teores de proteína total menores que 80% caracterizam produtos como concentrados protéicos, assim como os obtidos neste trabalho, enquanto teores maiores que 80% caracterizam isolados protéicos.

Tabela 5 – Teor de proteína total dos concentrados protéicos e seu rendimento de extração

Amostra/Determinação	Proteína_{Total} (%)	Rendimento (%)
CFAD	54,9 ^c ± 0,84	63,2 ^c ± 0,96
CFADH	59,6 ^b ± 1,06	64,6 ^c ± 1,22
CFADE	72,9 ^a ± 0,42	72,3 ^a ± 0,41
CFADEH	72,0 ^a ± 0,62	69,6 ^b ± 0,61

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A partir dos resultados será possível desenvolver um processo onde se destine um coproduto abundante da agroindústria para elaboração de dois novos produtos, com possíveis aplicações industriais em alimentos: um concentrado protéico e um resíduo com alto teor de fibras.

A escolha do complexo enzimático celulolítico para atuar no FAD resultou em concentrados com maior teor protéico do que sua fonte original, pois que a degradação do material lignocelulósico do farelo tornou as proteínas mais acessíveis para a recuperação delas no ponto isoelétrico. Entretanto, a obtenção do concentrado protéico do FADE e do FADEH não mostrou diferença significativa quanto ao teor de proteína, mas apresentou diferença significativa no rendimento de extração delas.

Tang et al. (2003) realizaram três experimentos combinando pré-tratamentos físico de alta pressão e enzimático (amilase e protease) para avaliar o rendimento de extração de proteínas de FAD. O experimento que combinou alta pressão e a hidrólise resultou em 67,0% de rendimento na extração; alterando o processo físico para mistura em alta velocidade, os autores obtiveram 66% e, alterando para sonicação, 56%.

Charoen, Tipkanon e Savedboworn (2017) obtiveram um concentrado com 37% de proteína a partir da hidrólise enzimática com protease de farelo de arroz integral, pois as proteínas foram hidrolisadas e o rendimento na extração foi menor.

Wang et al. (2015) obtiveram um rendimento de extração das proteínas do farelo de arroz integral de 49,4%; é possível que o conteúdo de lipídeos da matriz seja um interferente para obtenção de concentrados protéicos, uma vez que o farelo de arroz desengordurado em nosso estudo apresentou um rendimento 27,9% maior. Apesar das diferenças no método de extração (pH de solubilização menor e pH de precipitação maior), a solução alcalina e o ácido utilizados para extração (NaOH e HCl) por Wang et al. (2015), em geral, são responsáveis por aumentar o rendimento de extração devido à sua força, sem considerar a viabilidade da aplicação industrial e com o posterior efeito nutricional e sensorial no produto pronto para consumo. Os agentes empregados na solubilização e precipitação das proteínas dos

concentrados foram adotados considerando o uso e aplicação em elaboração de alimentos sem comprometimento da segurança destes.

Após a obtenção dos concentrados protéicos foi realizado um novo estudo do perfil de solubilidade das proteínas, buscando compreender as alterações que podem ser proporcionadas a partir da separação do macronutriente de interesse de suas diferentes fontes de extração. A Tabela 6 apresenta a distribuição das frações protéicas dos concentrados protéicos

Tabela 6 – Frações protéicas dos concentrados obtidos

Amostra/Fração	Albumina (%)	Globulina (%)	Glutelina (%)	Prolamina (%)
CFAD	31,2 ^c ± 0,80	35,8 ^b ± 0,11	24,0 ^a ± 0,11	9,0 ^a ± 0,08
CFADH	32,7 ^b ± 0,22	35,4 ^b ± 0,28	23,7 ^a ± 0,13	8,2 ^b ± 0,20
CFADE	35,0 ^a ± 0,75	36,7 ^a ± 0,35	22,2 ^b ± 0,56	6,1 ^c ± 0,30
CFADEH	35,1 ^a ± 0,80	36,4 ^a ± 0,21	22,1 ^b ± 0,70	6,4 ^c ± 0,14

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

O emprego da hidrólise enzimática para obtenção do CFADH mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) nas frações albumina e prolamina em relação ao CFAD, enquanto que a extrusão para obtenção do CFADE alterou significativamente todas as frações em comparação com o CFAD. O pré-tratamento que mais influenciou na distribuição das frações protéicas nos concentrados foi a extrusão. A combinação dos dois processos não trouxe alterações significativas na distribuição das frações protéicas dos concentrados. Fato que pode ser interessante para a aplicação deles. O tratamento térmico de extrusão ao aumentar os espaços inter e intra cadeias poliméricas é um fator que afeta diretamente a solubilidade das proteínas, pois estes espaços promovem a melhor penetração dos solventes extratores.

Considerando as características das alterações da distribuição percentual das frações protéicas foi aplicada uma análise multivariada de agrupamento, selecionando as quatro frações protéicas como variáveis. Esta estratégia foi adotada para verificar se os concentrados mantêm o padrão de fracionamento por solubilidade de sua fonte original. No processo de divisão dos *clusters* das amostras de farelo (fontes protéicas) e seus respectivos concentrados, obtidos pelo processo de extração, foi escolhido o método de agrupamento hierárquico sem *clusters* iniciais definidos. Ao final do tratamento foi possível segregar as amostras de farelo e seus respectivos concentrados em 5 grupos (*clusters*), conforme mostrado na Tabela 7. Os dados foram padronizados e geraram um dendograma, conforme mostrado na Figura 13:

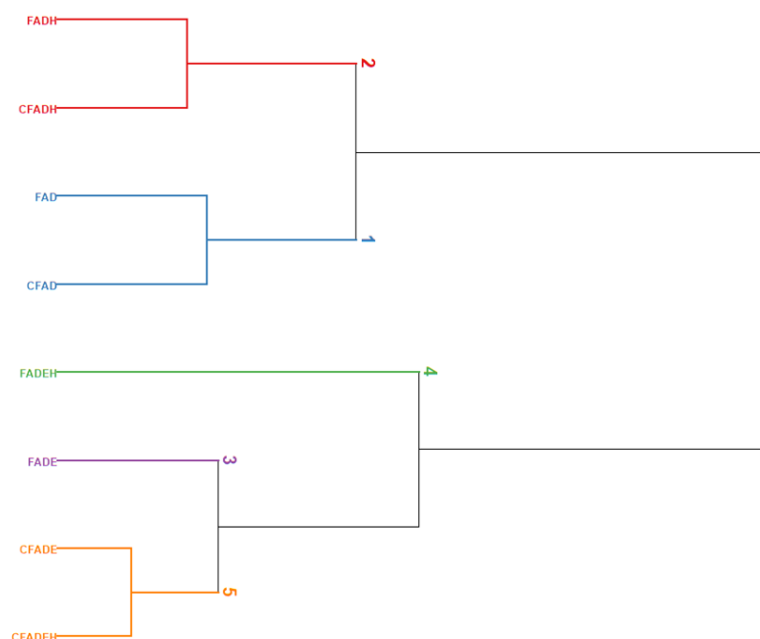
Tabela 7 – Análise de *clusters* para as amostras por método de agrupamento hierárquico

<i>Clusters</i>	1	2	3	4	5
<i>Amostra</i>	FAD CFAD	FADH CFADH	FADE	FADEH	CFADE CFADEH

Ficou demonstrado que os concentrados obtidos a partir do FADE e FADEH apresentaram diferença estatística em suas frações protéicas, indicando que, após a extração, a solubilidade protéica difere de suas fontes originais. O CFADE e CFADEH também apresentaram diferença de composição quando em comparação com o CFAD e CFADH; a hidrólise promoveu mudança significativa das proporções entre as classes protéicas do FAD mas não em relação ao FADE. Fato que comprova que a interação da proteína com o material lignocelulósico original foi alterada por ação do complexo celulolítico, e ainda confirma a possibilidade de se obter dois insumos diferentes ao final do processo hidrolítico, um rico em proteína e outro em fibras. Duas demandas importantes para a cadeia produtiva do arroz.

O dendograma (Figura 13) mostra a distribuição hierárquica das amostras em relação às suas frações protéicas que mais se assemelham entre si. O processo físico e enzimático empregado neste estudo afetam significativamente as frações dos concentrados obtidos das diferentes fontes estudadas, porém, esta afirmação não é verdadeira quanto utiliza-se a combinação dos dois métodos.

Figura 13 – Dendograma dos *clusters* obtidos para as amostras estudadas



O FAD e o CFAD se encontram no *cluster* 1, FADH e CFADH agrupados no *cluster* 2, FADE e o FADEH se encontram sozinhos no *cluster* 3 e *cluster* 4, respectivamente, enquanto que o CFADE e CFADEH se encontram no *cluster* 5. Os cinco *clusters* formados estão representados pelos números nas linhas horizontais do dendograma; os clusters que apresentam a maior diferença entre as frações protéicas estudadas se encontram mais distantes dentro desta representação gráfica. Ou seja, o CFADE e CFADEH apresentam a maior diferença em relação às frações do FADH e CFADH e estão mais próximas da composição do FADE.

O FAD e o FADH não diferiram em fracionamento de seus respectivos concentrados; porém, o FADE e o FADEH geraram concentrados protéicos semelhantes entre si, mas que diferiram de sua matriz original.

Portanto o processo de obtenção do concentrado que influenciou a solubilidade das proteínas do farelo foi o processo físico de extrusão (FADE) e a combinação dos dois processos, físico e enzimático (FADEH). Isto indica que o tratamento enzimático utilizando o mix de enzimas do complexo celulolítico por si só não tem a característica de alterar a distribuição percentual das frações protéicas presentes no farelo, porém, o processo físico acaba diferenciando o produto e pode ser indicativo de alteração das propriedades tecnológicas do concentrado obtido em função desta alteração de solubilidade.

Wang et al. (2015) realizaram o fracionamento das proteínas obtidas de farelo de arroz integral e encontraram 34,4% de albumina, 30,7% de globulina, 23,4% de glutelina e 5,5% de prolamina. Em comparação com o fracionamento do concentrado obtido do FAD obtido neste trabalho, o teor de albumina é menor, os teores de globulina e prolamina são maiores e a glutelina permanece inalterada, indicando a exposição de grupamentos laterais de aminoácidos diferente da matriz original.

5.8. PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS

A avaliação das propriedades tecnológicas dos concentrados protéicos busca a comparação com duas proteínas padrão: uma de origem animal (albumina bovina) e outra de origem vegetal (proteína texturizada de soja – PTS) (Tabela 8), sendo a segunda a fonte mais utilizada para extração de proteína vegetal atualmente e largamente empregada na cadeia produtiva para diferentes formulações.

Tabela 8 – CAA e CAO dos concentrados protéicos, albumina e PTS.

Amostra/Propriedade	CAA (gágua/gamostra)	CAO (góleo/gamostra)
---------------------	----------------------	----------------------

PTS	3,8 ^{de} ± 0,18	4,7 ^c ± 0,20
Albumina	7,3 ^a ± 0,17	6,0 ^a ± 0,11
CFAD	3,5 ^e ± 0,12	4,7 ^c ± 0,04
CFADH	4,1 ^{cd} ± 0,08	5,8 ^a ± 0,10
CFADE	3,6 ^e ± 0,06	5,1 ^b ± 0,14
CFADEH	4,6 ^b ± 0,20	5,9 ^a ± 0,08

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$). PTS = Proteína texturizada de soja.

A semelhança entre as propriedades CAA e CAO dos concentrados protéicos obtidos de FAD e do PTS mostram que o CFAD pode ser utilizado para os mesmos fins adotados para PTS, com a vantagem de possuir proteínas consideradas hipoalergênicas.

Todos os tratamentos mostraram menores valores de CAA e CAO em relação albumina, porém, os concentrados obtidos submetidos a pré-tratamentos melhoraram estas propriedades em relação ao concentrado de FAD e PTS, foram especialmente efetivos para aumentar a CAO. Houve um aumento de CAA e CAO de 17,1% e 23,4% para o CFADH e 27,8% e 15,7% para o CFADEH, respectivamente. Portanto, ficou demonstrado que a hidrólise enzimática pode ser uma alternativa para melhorar estas propriedades tecnológicas em FAD

Estudo realizado por Zhang et al. (2012) avaliaram a CAA e a CAO de duas amostras de concentrados protéicos, o primeiro extraído de maneira convencional (solubilização em meio alcalino e precipitação em meio ácido) e o segundo utilizando uma hidrólise enzimática prévia com protease. Os autores verificaram que a hidrólise enzimática aumentou em 18,6% a CAA e 21% a CAO. Cabe salientar que a hidrólise com proteases altera a massa molar das proteínas e no caso deste estudo as proteínas são apenas liberadas da rede lignocelulósica sem alteração de seu tamanho.

Zhao et al. (2012) também verificaram que as proteínas extraídas do endosperma e as proteínas extraídas de farelo não apresentaram diferença significativa em relação à sua CAA e CAO; como o endosperma apresenta um teor de proteínas muito menor, a obtenção de proteínas a partir do FAD se torna mais vantajoso do ponto de vista econômico, uma vez que o rendimento se torna maior com as mesmas qualidades tecnológicas, especialmente se forem empregados os tratamentos desenvolvidos no presente trabalho, que propiciaram um aumento de rendimento em x,y e z..

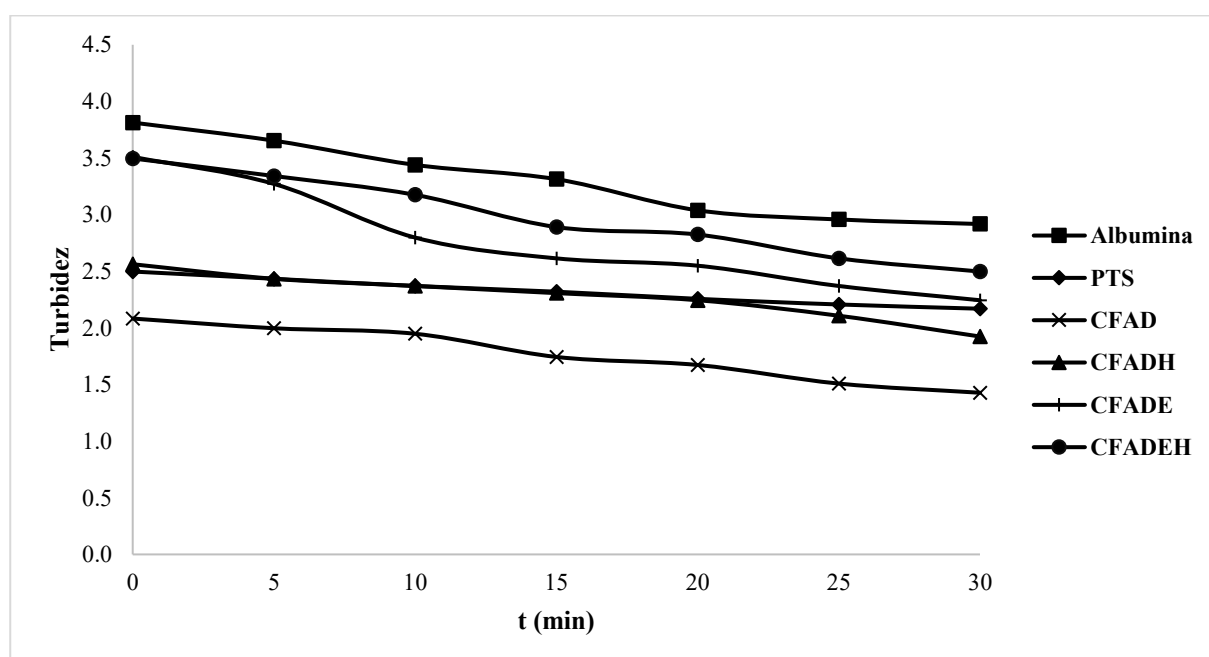
Amagliani et al. (2017) reportaram em sua revisão que a CAA dos concentrados protéicos podem chegar a apresentar valores de 3,9 até 5,6 g_{água}/g_{amostra}, enquanto que a CAO pode chegar de 3,7 até 9,2 g_{óleo}/g_{amostra}.

A CAA está diretamente relacionada com a redução de perda de umidade em produtos de panificação embalados, auxiliando na conservação do frescor e sensação de molhabilidade após fornecimento destes produtos. Os concentrados protéicos que apresentam maior CAO são preferidos para produção de maionese, molhos para salada, salsichas e massas de bolo em geral (CHANDI; SOGI, 2007). A partir disto pode-se indicar que o CFADH e o CFADEH podem ser adotados para melhorar as propriedades em formulações de produtos de panificação, como pães e bolos.

Géis protéicos, prontos para consumo de atletas, que apresentam maior turbidez estão diretamente relacionados com baixa capacidade de absorção de água (CAA). Três isolados protéicos obtidos a partir de ervilha foram estudados por Stone et al. (2015) empregando diferentes métodos de extração: precipitação no ponto-isoeletrico, precipitação micelar e precipitação salina; os melhores resultados de CAA e CAO foram observados para o primeiro experimento, com valores de 3,5 e 3,6 respectivamente. Neste trabalho, também utilizando precipitação no ponto isoeletrico, foi possível obter resultados melhores para estas duas propriedades, mostrando que a fonte (farelo de arroz com diferentes pré-tratamentos) pode gerar concentrados com capacidade de aplicação e produção de géis protéicos translúcidos.

A Figura 14 mostra a comparação das curvas de estabilidade da emulsão dos concentrados protéicos extraídos dos farelos e dois padrões, albumina (fonte animal) e proteína texturizada de soja (fonte vegetal).

Figura 14 – Estabilidade da emulsão para os concentrados protéicos e padrões



A capacidade da formação de emulsão de uma proteína está diretamente relacionada com a sua função de adsorver e estabilizar a interface óleo-água; quando a proteína possui a capacidade de revestir esta interface, obtém-se uma emulsão mais estável (PEARCE; KINSELLA, 1978). A medida de turbidez é uma forma rápida de avaliar de forma mais objetiva a estabilidade desta emulsão, quantificando a interface óleo-água, usando uma medida sensível, rápida e com repetibilidade confiável para avaliar a propriedade.

A estabilidade da emulsão obtida nos concentrados de FAD foi comparada com os resultados descritos por Charoen, Tipkanon e Savedboworn (2017); que encontraram uma estabilidade de 53,3 min para uma proteína extraída do farelo de arroz integral hidrolisado com protease comercial. Outro estudo realizado por Hamada (2000) corrobora para afirmar que a utilização de enzimas no tratamento prévio de fontes vegetais pode melhorar a estabilidade da formação de emulsões pelas proteínas presentes no concentrado. Outros fatores, como grau de hidrólise, conformação das proteínas, tamanho molecular e a carga líquida das proteínas contribuem com este efeito (SINGTHONG; ONSAARD; THONGKAEW, 2008). Para comparar com resultados obtidos de Charoen, Tipkanon e Savedboworn (2017), neste estudo foi determinado a EE₁₀ e EE₃₀ dos concentrados protéicos obtidos após os pré-tratamentos, bem como dos padrões utilizados. Os valores estão demonstrados na Tabela 9:

Tabela 9 – Estabilidade da emulsão expressa após 10 e 30 min

Amostra	CFAD	CFADH	CFADE	CFADEH	Albumina	PTS
EE₁₀ (min)	13,4 ^c ± 0,6	15,5 ^b ± 0,7	4,93 ^c ± 0,9	10,9 ^d ± 0,7	10,2 ^d ± 0,6	19,6 ^a ± 0,3
EE₃₀ (min)	9,5 ^{cd} ± 0,5	12,0 ^b ± 0,5	8,32 ^d ± 0,5	10,5 ^c ± 0,4	12,8 ^b ± 0,4	22,8 ^a ± 0,6

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$). EE₁₀ = Estabilidade da emulsão após 10 min; EE₃₀ = Estabilidade da emulsão após 30 min; PTS = Proteína texturizada de soja.

É possível verificar que a hidrólise enzimática do FAD e FADE resultou na obtenção de CFADH e CFADEH com uma maior estabilidade (EE₁₀) nesta propriedade tecnológica avaliada. A extrusão resultou numa diminuição acentuada da EE₁₀ formada pelo seu concentrado, porém, utilizando este processo físico com a hidrólise enzimática combinada foi obtida uma proteína tão estável quanto o padrão de albumina de soro bovino. A proteína texturizada de soja apresentou a maior estabilidade de emulsão (EE₁₀ e EE₃₀) em relação a todas as proteínas estudadas neste trabalho, porém, indiscutivelmente o uso de pré-tratamento enzimático pode ser explorado para melhorar esta propriedade nos concentrados de FAD.

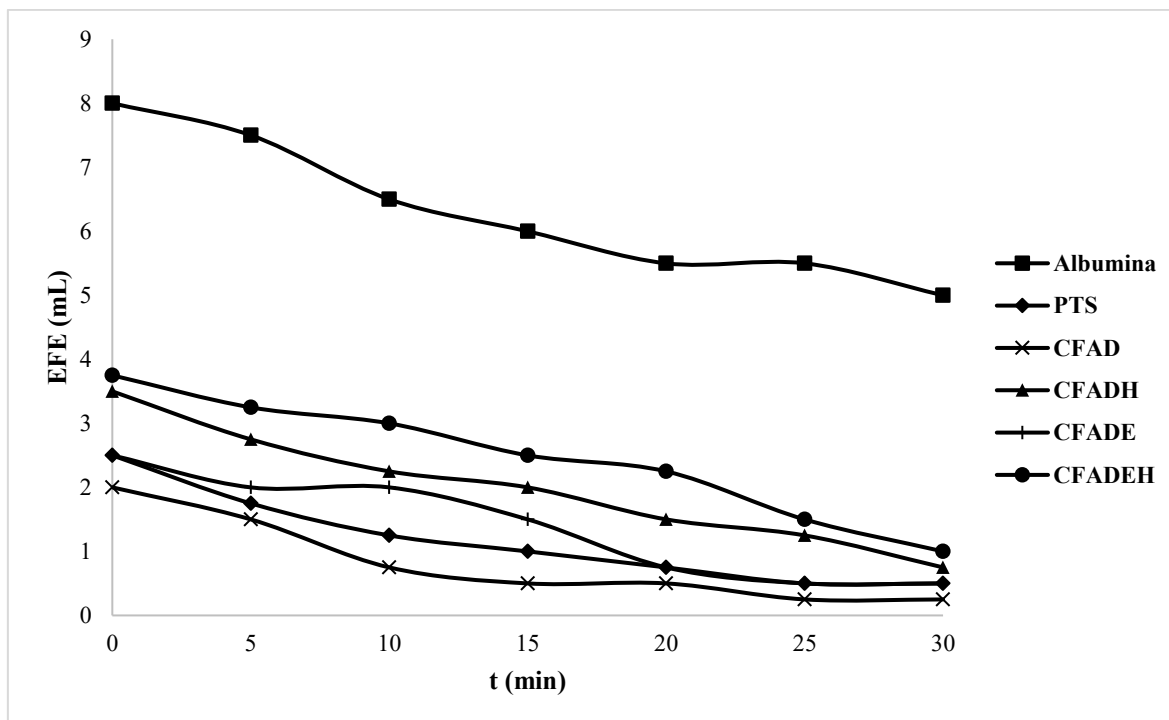
A estabilidade (EE_{30}) do CFAD e CFADH diminuem significativamente enquanto que o CFADE e os padrões de albumina e PTS se mostraram mais estáveis por um intervalo de tempo maior. O CFADEH não apresentou diferença estatística nesta propriedade em 10 e 30 min, o que é promissor, reafirmando o comentário sobre a possibilidade de obter melhora nesta propriedade estudando outras condições de pré-tratamento enzimático.

Bandyopadhyay, Misra e Ghosh (2008) avaliaram a utilização de papaína para hidrólise do farelo de arroz desengordurado comparando com a de um isolado protéico desta mesma fonte, encontrando que a maior EE_{10} foram obtidos com aqueles isolados em que o tempo de hidrólise foi maior. A maior estabilidade obtida (48 min) foi observada no maior tempo de hidrólise, representando um aumento de 30% em relação a estabilidade do isolado protéico não hidrolisado. Tang et al. (2003) avaliaram a EE_{10} de amostras de isolado protéico de soja e concentrado protéico obtido do farelo de arroz desengordurado hidrolisado com protease; os autores encontraram valores de 27,5 min e 16,5 min, respectivamente. É possível afirmar que a hidrólise do farelo melhora a capacidade de formar emulsões estáveis, melhorando esta característica para valores próximos ao padrão vegetal utilizado (soja).

Os resultados obtidos com CFADE e o CFADEH mostram que, não só a extrusão é eficaz para melhorar a capacidade de emulsificação e estabilidade da emulsão, mas a combinação dos pré-tratamentos torna esta propriedade tecnológica atraente do ponto de vista de aplicabilidade em processos alimentícios, destacando-se da proteína padrão vegetal mais utilizada comercialmente (PTS) e ficando não muito distante da albumina.

A Figura 15 mostra a comparação das curvas de estabilidade de formação de espuma dos concentrados protéicos extraídos dos farelos e dois padrões, albumina e PTS.

Figura 15 – Estabilidade da formação de espuma para os concentrados protéicos e padrões



A hidrólise enzimática das fontes proteicas FAD e FADE influenciaram positivamente na capacidade de formação de espuma, conforme demonstrado na Figura 15, aumentando não só a sua estabilidade, mas também a capacidade em volume. A comparação dos concentrados hidrolisados CFADH e CFADEH com o padrão vegetal (PTS) mostra que ambos podem ser uma alternativa válida para aplicação em produtos alimentícios que busquem esta propriedade tecnológica como característica marcante, como em coberturas ou sorvetes. Tanto o processo de extrusão quanto a hidrólise beneficiaram a formação de espuma e sua estabilidade em relação ao CFAD (sem tratamento prévio).

Stone et al. (2015) avaliaram a estabilidade de formação de espuma de um isolado protéico obtido a partir de ervilha por precipitação no ponto-isoelétrico e encontraram valores de 68%, maior do que os 38% obtido neste trabalho para o CFAD. Com o tratamento enzimático, o CFADH passou a ter 64% de estabilidade, o que representa uma melhora desta propriedade enquanto que a extrusão prévia resultou em CFADE e CFADEH com 80%. O tratamento enzimático não afetou a propriedade no CFADE, mostrando que o processo físico tem um efeito maior nesta propriedade da hidrólise do material lignocelulósico. Para formulações que buscam apenas estabilidade na formação de espuma, a combinação dos métodos é dispensável; porém, processos que necessitem da formação mais rápida e com maior volume da espuma ela é interessante, como por exemplo para produtos em pó indicados para o preparo doméstico rápido.

A estabilidade da formação de espuma, em relação ao volume inicial e o volume após 30 min de repouso, foi avaliada por Charoen, Tipkanon e Savedboworn (2017) para uma proteína obtida de farelo de arroz submetida a hidrólise com Flavourzyme, uma protease, encontrando que a estabilidade do hidrolisado protéico, após 30 min, foi de 16,6%. Neste trabalho os concentrados obtidos por pré-tratamento enzimático apresentaram 21% de espuma no mesmo intervalo. Combinando o processo físico de extrusão e a hidrólise enzimática, foi obtida uma estabilidade de 27%. Comparando com o padrão de albumina de soro bovino, pode-se atingir 42,8% desta estabilidade; porém, em relação ao PTS, a proteína extrusada e hidrolisada apresentou maior estabilidade.

5.9. PROPRIEDADES TÉRMICAS DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS

As curvas termogravimétricas dos concentrados protéicos obtidos foram estudadas e comparadas com um padrão de albumina, para avaliar os efeitos da alteração com os pré-tratamentos aplicados (Figuras 16 e 17).

A temperatura máxima desta análise foi de 200 °C, por ser esta comumente empregada em processos e preparo de alimentos. Desta forma as modificações estruturais das proteínas refletiriam melhor o que ocorre durante o preparo de alimentos protéicos. O emprego de temperaturas que excedem este valor tende a desnaturar drasticamente as proteínas e alterar suas propriedades tecnológicas, nutricionais e sensoriais do produto.

O CFAD apresentou a mesma perda de massa do que o padrão de albumina (7,7%); porém, o concentrado obtido neste estudo permaneceu estável durante um tempo maior de aplicação de calor (havendo queda brusca somente acima de 150 °C). O CFADH teve a maior perda de massa em relação às outras amostras analisadas, chegando a 11% de perda. A primeira perda de massa acentuada foi percebida ao chegar na temperatura de 100 °C, onde o CFAD atingiu a perda de 4%. Este valor foi 2% menor em comparação com o padrão de albumina, e 3% menor em relação ao CFADH.

Figura 16 – Curva termogravimétrica da proteína obtida do FAD, FADH e albumina

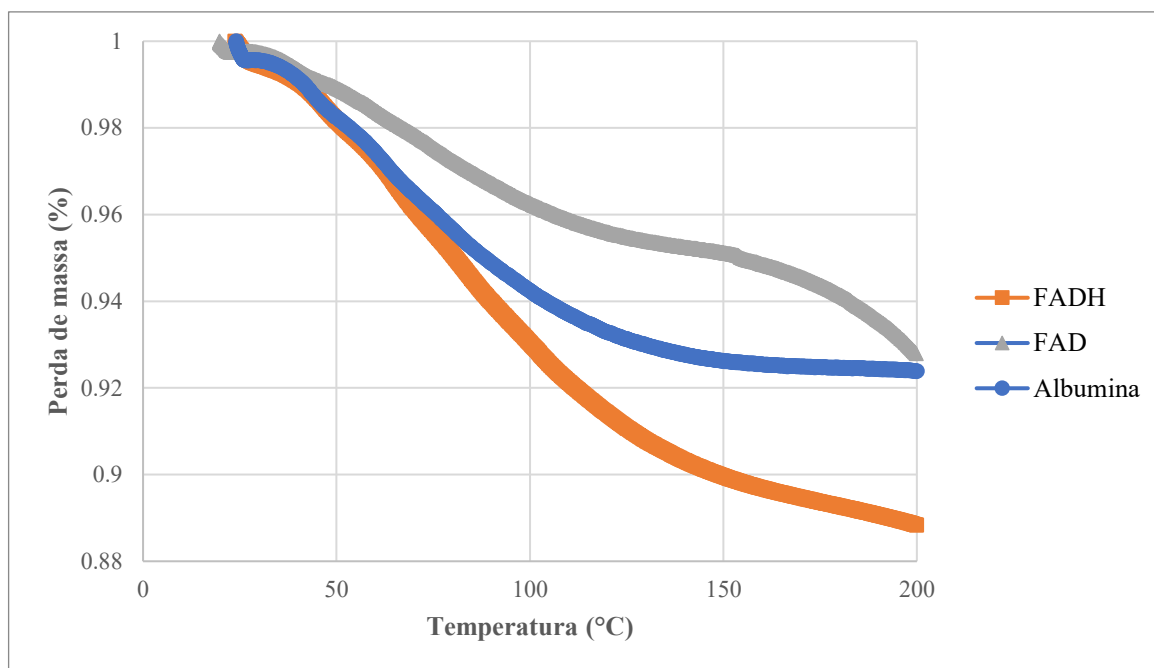
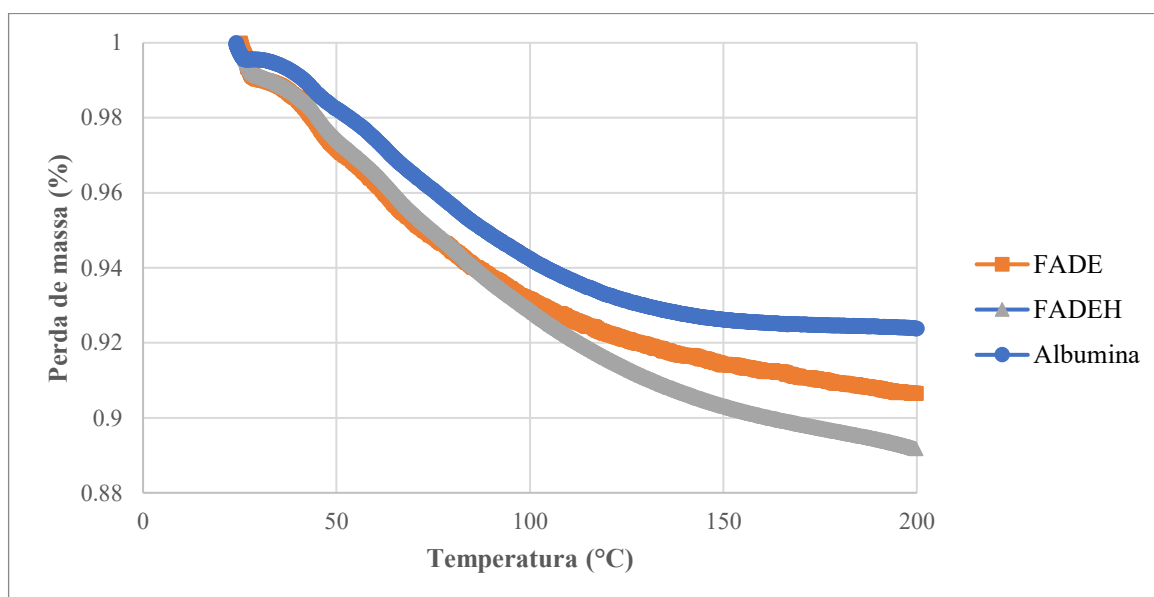


Figura 17 – Curva termogravimétrica da proteína obtida do FADE e FADEH e albumina



O CFADE apresentou uma perda de massa de 9%, mostrando uma estabilidade térmica menor do que o padrão de albumina analisado. Embora o perfil termogravimétrico do CFADEH não tenha apresentado diferença em relação ao CFADE nos primeiros 100 °C, é possível verificar uma perda acentuada de massa até o final do processo.

O comportamento de ambos materiais hidrolisados (CFADH e CFADEH) apresentaram perfis semelhantes e mostraram o mesmo valor de perda de massa. Novamente este comportamento pode ser atribuído ao fato de que a hidrólise do material lignocelulósico

presente na fonte de origem possibilita que haja uma maior transferência de calor para a cadeia protéica do concentrado promovendo maiores perdas em função provavelmente da capacidade de retenção de água no material.

O CFAD se mostrou mais estável do que o concentrado obtido de sua fonte extrusada (CFADE) e indicou que, tanto o processo físico quanto o processo enzimático são capazes de modificar o perfil termogravimétrico do material. Portanto para aplicação destes materiais em formulações alimentícios precisa ser levado em consideração este efeito.

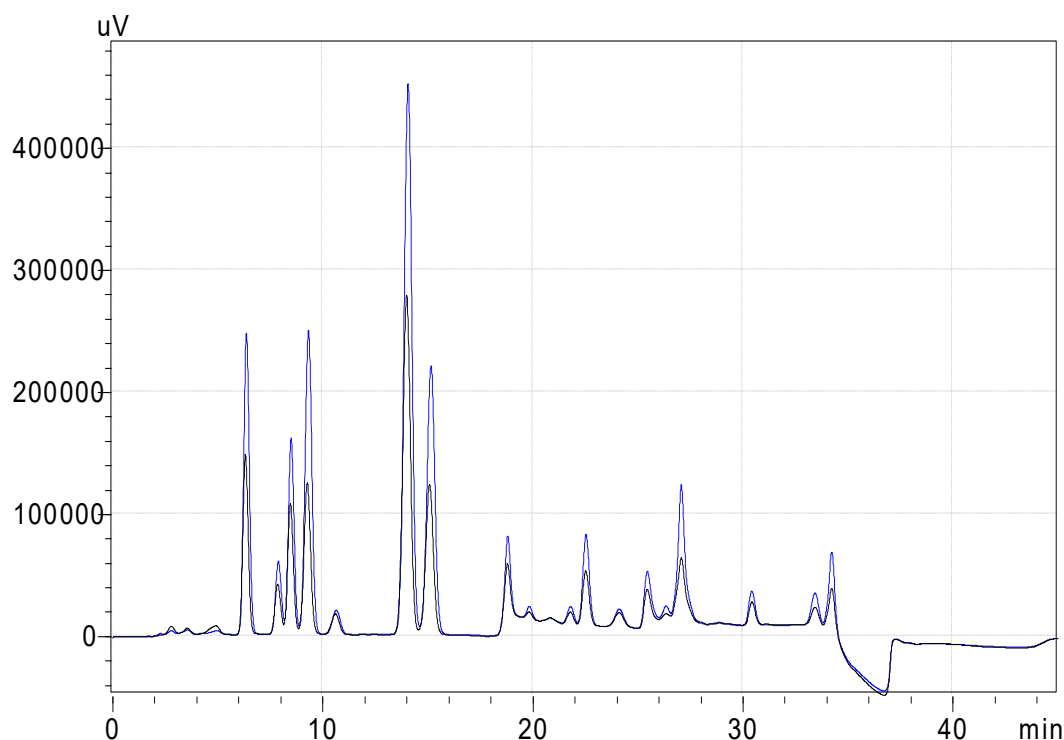
5.10. PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS

5.10.1. Perfil de aminoácidos

Na avaliação do perfil de aminoácidos dos concentrados obtidos foi enfatizada a separação e quantificação dos aminoácidos essenciais (lisina, metionina, cisteína, treonina, isoleucina, leucina, valina, histidina, tirosina e fenilalanina) e não-essenciais (arginina, ácido aspártico, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina e alanina), de modo a compreender qual a influência dos pré-tratamentos empregados nos perfis aminoacídicos de seus concentrados. Para a discussão dos resultados foi adotado considerar grupos de aminoácidos separados pelas características de polaridade de suas cadeias laterais: cadeia lateral apolar – hidrofóbicos (alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeia lateral carregada negativamente (ácido aspártico), cadeia lateral carregada positivamente (lisina, arginina e histidina) e cadeia lateral polar (serina, treonina e tirosina). As características de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade dos aminoácidos está relacionada com as interações inter e intra cadeias e com outras macromoléculas que determinam as propriedades tecnológicas e nutricionais delas (DAMODARAN; PARKIN, 2019).

A Figura 18 mostra a comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra de concentrado protéico obtido do FAD com seu respectivo concentrado obtido do material hidrolisado (FADH), ilustrando a influência deste processo enzimático em seu perfil de aminoácidos.

Figura 18 – Comparação dos perfis de aminoácidos do CFAD (preto) e CFADH (azul)



Fica sugerido pelo cromatograma que a hidrólise promoveu um aumento nas concentrações dos aminoácidos, sem promover a formação de outros tipos de aminoácidos que poderiam ser visualizados como picos não identificados.

A FAO (2013) desenvolveu um documento para avaliação da qualidade de uma proteína com base na alimentação humana e suas necessidades de ingesta diária recomendada para diferentes fases do ciclo biológico de humanos, bem como formas de avaliar quantitativamente esta qualidade. A base para inferências de valor nutricional são as determinações nutricionais via perfil aminoacídico de fontes protéicas e métodos práticos para avaliação das mesmas. A FAO (2013) apresenta valores de ingesta diária para seis aminoácidos essenciais: lisina, treonina, isoleucina, leucina, histidina e valina.

Os Quadros 4 e 5 mostram as médias da quantificação dos aminoácidos essenciais e não-essenciais, respectivamente, presentes nos concentrados protéicos obtidos das diferentes matérias-primas estudadas.

Ao comparar o CFADH com o CFAD, houve um aumento significativo nas concentrações de lisina, isoleucina, fenilalanina. Houve uma diminuição dos aminoácidos valina, leucina e histidina. Os aminoácidos metionina e tirosina não apresentaram diferença significativa em suas concentrações. Em relação CFADH com o CFADH, percebe-se que, com exceção da isoleucina que não houve diferença significativa, nos demais aminoácidos

essenciais. O aumento de aminoácidos essenciais carregado positivamente como a lisina e os apolares sugere que estes podem estar associados a interações com outros compostos poliméricos da matriz lignocelulósicas. Este comportamento sugere que a combinação dos pré-tratamentos não promoveu uma grande alteração no perfil das cadeias laterais dos aminoácidos essenciais presentes no FAD.

Quadro 4 – Perfil de aminoácidos essenciais dos concentrados e recomendações da FAO

Aminoácidos (g_{aa}/100g_{proteína})	CFAD	CFADH	CFADE	CFADEH	Fase 1 *	Fase 2 **	Fase 3 ***
Lisina	4,6 ^b	5,3 ^a	5,4 ^a	3,3 ^c	6,9	5,7	4,8
Metionina	0,9 ^a	0,9 ^a	1,0 ^a	0,6 ^b	NA	NA	NA
Cisteína	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	NA	NA	NA
Treonina	2,0 ^{ab}	1,8 ^b	2,1 ^a	1,4 ^c	4,4	3,1	2,5
Isoleucina	0,8 ^b	1,5 ^a	0,6 ^c	0,5 ^c	5,5	3,2	3,0
Valina	1,8 ^b	1,2 ^c	2,3 ^a	1,4 ^c	5,5	4,3	4,0
Leucina	5,9 ^b	4,2 ^d	6,4 ^a	4,8 ^c	9,6	6,6	6,1
Histidina	3,2 ^b	2,2 ^c	4,5 ^a	2,4 ^c	2,1	2,0	1,6
Tirosina	3,8 ^a	3,6 ^a	3,0 ^b	2,6 ^c	NA	NA	NA
Fenilalanina	4,0 ^b	4,6 ^a	3,5 ^c	2,6 ^d	NA	NA	NA

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$). LOQ = limite de quantificação. Recomendações de ingesta mínima: * (Recém-nascidos até 6 meses de idade); ** (6 meses até 3 anos) e *** (3 anos até fase adulta). NA: Nenhuma.

Os dados no Quadro 4 permitem inferir que o consumo de 100 g de qualquer um dos concentrados obtidos é capaz de suprir mais de 100% da necessidade de ingesta diária de histidina de recém-nascidos até a fase adulta. Indivíduos maiores que 3 anos ingerindo 100 g do CFADE também supre em mais de 100% a necessidade de ingesta diária de lisina e leucina, bem como 84% e 57,5% de treonina e valina, respectivamente. Dentre os concentrados obtidos, o CFADE é o que mais contribui para o aporte aminoacídico durante boa parte da vida humana.

Os concentrados para serem utilizados na elaboração de *baby food*, por exemplo, precisam ser associados a outras fontes protéicas para atender a demanda metabólica deles. No entanto, para indivíduos acima desta faixa, um público-alvo que corresponde a uma grande faixa da etária da população é possível suprir as necessidades aminoacídicas recomendadas pela FAO. O aminoácido essencial que aparece em menor quantidade nos concentrados protéicos é a isoleucina e, mesmo em pequenas quantidades, o consumo de 100 g de CFADH contribuiu para 50% da ingesta diária recomendada para este aminoácido.

Quadro 5 – Perfil de aminoácidos não-essenciais dos concentrados protéicos

Aminoácidos (g _{aa} /g _{proteína})	Fonte			
	CFAD	CFADH	CFADE	CFADEH
Arginina	4,1 ^c	6,5 ^b	8,8 ^a	2,5 ^d
Ácido Aspártico	7,5 ^b	8,5 ^a	8,4 ^a	5,2 ^c
Serina	5,6 ^b	5,6 ^b	6,1 ^a	4,0 ^c
Ácido Glutâmico	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Prolina	0,6 ^c	4,5 ^b	9,4 ^a	0,5 ^c
Glicina	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Alanina	12,0 ^c	12,9 ^b	15,8 ^a	9,2 ^d

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os valores de quantificação dos aminoácidos essenciais e não-essenciais dos concentrados foi empregado para determinar o *score* de aminoácidos totais, *score* de aminoácidos essenciais e a taxa de eficiência protéica (TEP), afim de comparar as proteínas obtidas com outros trabalhos e com o aporte protéico sugerido pela FAO. Os valores estão descritos no Tabela 10:

Tabela 10 – *Scores* de aminoácidos e taxa de eficiência protéica dos concentrados

<i>Scores/Fonte</i>	CFAD	CFADH	CFADE	CFADEH
Aminoácidos totais (g_{aa}/100g_{proteína})	68,9 ^c ± 1,02	76,6 ^b ± 0,87	92,9 ^a ± 1,29	50,3 ^d ± 0,99
Aminoácidos essenciais (g_{aa}/100g_{proteína})	27,1 ^b ± 0,28	25,7 ^c ± 0,11	28,7 ^a ± 0,23	19,6 ^d ± 0,19
Taxa de eficiência protéica	1,8 ^b ± 0,19	1,1 ^d ± 0,21	2,1 ^a ± 0,06	1,4 ^c ± 0,08

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

O pré-tratamento da extrusão promoveu um aumento no percentual de aminoácidos essenciais e aminoácidos totais (aumento de 34,8%) presentes no CFADE em relação ao CFAD. Esta quantificação determinou ainda uma maior TEP em relação a matriz sem pré-tratamento. O CFADH, apesar do aumento da quantificação de aminoácidos totais, teve diminuição no teor de aminoácidos essenciais, refletidos também na TEP deste concentrado. Os dois pré-tratamentos aplicando em conjunto acabaram resultando em um concentrado que não apresentou uma boa disponibilização de aminoácidos para quantificação, principalmente em relação aos aminoácidos não-essenciais, tendo uma diminuição de 27% em relação ao CFAD.

Produtos comerciais, como Whey A (R\$134,90/kg) e Whey B (R\$92,80/kg), concentrados obtidos de soro de leite, apresentam a composição aminoacídica do Quadro 6 e Quadro 7, respectivamente. Em comparação com ao perfil de aminoácidos encontrados para

CFAD, CFADH, CFADE e CFADEH, foram salientados: na cor verde escura os aminoácidos que apresentam valores no mínimo duas vezes maior do que o Whey, verde claro valores iguais ou maiores, em amarelo valores que representam entre 50 e 100% do quantificado no Whey e valores em vermelho, que representam valores menores que 50% do apresentado na tabela dos concentrados comerciais avaliados. A cor branca refere-se ao valor padrão de comparação presente nas formulações das marcas de Whey A e B.

Quadro 6 – Perfil aminoacídico dos concentrados x Whey Comercial A

Aminoácidos (g_{aa}/g_{proteína})/Fonte	CFAD	CFADH	CFADE	CFADEH	WHEY A
Arginina	4,1	6,5	8,8	2,5	2,0
Ácido Aspártico	7,5	8,5	8,4	5,2	7,0
Serina	5,6	5,6	6,1	4,0	3,8
Prolina	0,6	4,5	9,4	0,5	4,8
Alanina	12,0	12,9	15,8	9,2	3,5
Lisina	4,6	5,3	5,4	3,3	7,0
Metionina	0,9	0,9	1,0	0,6	1,5
Treonina	2,0	1,8	2,1	1,4	5,0
Isoleucina	0,8	1,5	0,6	0,5	4,3
Valina	1,8	1,2	2,3	1,4	3,5
Leucina	5,9	4,2	6,4	4,8	7,3
Histidina	3,2	2,2	4,5	2,4	1,3
Tirosina	3,8	3,6	3,0	2,6	2,0
Fenilalanina	4,0	4,6	3,5	2,6	1,5

Quadro 7 – Perfil aminoacídico dos concentrados x Whey Comercial B

Aminoácidos (g_{aa}/g_{proteína})/Fonte	CFAD	CFADH	CFADE	CFADEH	WHEY B
Arginina	4,1	6,5	8,8	2,5	2,3
Ácido Aspártico	7,5	8,5	8,4	5,2	4,0
Serina	5,6	5,6	6,1	4,0	3,8
Prolina	0,6	4,5	9,4	0,5	3,5
Alanina	12,0	12,9	15,8	9,2	2,0
Lisina	4,6	5,3	5,4	3,3	5,0
Metionina	0,9	0,9	1,0	0,6	0,8
Treonina	2,0	1,8	2,1	1,4	1,8
Isoleucina	0,8	1,5	0,6	0,5	2,5
Valina	1,8	1,2	2,3	1,4	2,5
Leucina	5,9	4,2	6,4	4,8	5,0
Histidina	3,2	2,2	4,5	2,4	1,0
Tirosina	3,8	3,6	3,0	2,6	1,5
Fenilalanina	4,0	4,6	3,5	2,6	3,5

Comparando o perfil de aminoácidos das duas marcas comerciais de Whey avaliadas (A e B, obtidos a partir de soro de leite) com o perfil obtido para os concentrados deste trabalho, pode-se afirmar que CFAD, CFADH e CFADE apresentaram conteúdo superior dos aminoácidos arginina, ácido aspártico, serina, alanina, histidina, tirosina e fenilalanina quando comparados com A; e maior conteúdo de metionina, treonina e prolina quando comparados com B. Os aminoácidos que apresentaram resposta abaixo das marcas comerciais foram lisina, metionina, treonina, isoleucina, valina e leucina em comparação com a marca A e apenas isoleucina e valina quando comparados com a marca B. Esta diferença pode ser explicada pela fonte de obtenção dos concentrados. O Whey A apresenta em sua composição proteína concentrada, hidrolisada e isolada de soro de leite, proteína concentrada de leite e proteína da carne em menor teor; enquanto que o Whey B apresenta apenas proteína concentrada do soro de leite; além da diferença no perfil aminoacídico, é possível verificar a diferença no valor de comercialização destes produtos no mercado: quanto maior e mais completo o aporte aminoacídico, maior valor agregado.

Os concentrados obtidos a partir dos pré-tratamentos de hidrólise e extrusão podem ser utilizados em formulações para atletas e suplementar dietas protéicas devido a sua grande quantidade de aminoácidos totais, estando relacionado ainda como auxiliador na síntese muscular. O BCAA (*Branched-chain amino acids*), que compreende os aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina também faz parte da dieta de atletas e encontra-se em quantidades consideráveis Whey A ($11,2\text{g}_{\text{bcaa}}/100\text{g}_{\text{proteína}}$) e Whey B ($10\text{g}_{\text{bcaa}}/100\text{g}_{\text{proteína}}$), bem como nos concentrados obtidos: CFADE ($9,3\text{g}_{\text{bcaa}}/100\text{g}_{\text{proteína}}$), CFAD ($8,5\text{g}_{\text{bcaa}}/100\text{g}_{\text{proteína}}$), CFADH ($6,9\text{g}_{\text{bcaa}}/100\text{g}_{\text{proteína}}$) e CFADEH ($6,7\text{g}/100\text{g}_{\text{proteína}}$).

Cabe salientar que a determinação do perfil aminoacídico empregando a técnica cromatográfica usando detector de fluorescência requer uma hidrólise ácida prévia empregando condições drásticas (HCl 6M) que pode ter afetado as cadeias laterais dos aminoácidos valina, leucina e histidina bem como outros não essenciais. No entanto, este não será a condição de hidrólise destas proteínas durante o processo digestivo, aonde as condições são brandas. Uma melhor avaliação desta eficiência protéica pode ser feita a partir da estimativa deles nas proteínas submetidas a um estudo de digestibilidade simulando as condições do trato digestivo humano.

5.10.2. IDP e Digestibilidade dos farelos e concentrados protéicos

O Índice de Dispersibilidade de Proteína (IDP) e a digestibilidade dos farelos e concentrados são dois parâmetros nutricionais de interesse para alimentação humana; o

primeiro, indica qual o percentual de proteína dispersa que pode auxiliar em uma formulação alimentícia devido a sua alta solubilidade e a digestibilidade indica quanto da proteína presente na formulação estará disponível para absorção pelo organismo humano após ação das enzimas do sistema digestório humano.

Na Tabela 11 estão os resultados das determinações do IDP e a digestibilidade *in vitro* para as amostras de farelo e seus respectivos concentrados protéicos.

Tabela 11 – Digestibilidade dos farelos e dos concentrados protéicos extraídos destes

Amostra/Determinação	IDP (%)	Digestibilidade (%)
FAD	30,4 ^d ± 0,59	25,0 ^f ± 0,72
FADH	32,8 ^c ± 0,44	31,0 ^e ± 0,76
FADE	35,9 ^b ± 0,27	36,5 ^d ± 1,20
FADEH	36,2 ^b ± 0,65	38,2 ^d ± 1,05
CFAD	97,4 ^a ± 0,11	51,7 ^c ± 0,77
CFADH	97,1 ^a ± 0,17	54,4 ^b ± 0,85
CFADE	97,3 ^a ± 0,27	65,6 ^a ± 1,10
CFADEH	97,8 ^a ± 0,30	67,2 ^a ± 1,21

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os concentrados apresentaram IDP semelhantes, independentemente do pré-tratamento aplicado. Independente da fonte da qual a proteína foi extraída, todas apresentaram elevados teores de proteína dispersa. As proteínas do FAD submetidas a extrusão, antes da obtenção dos concentrados, apresentaram um IDP maior que as que foram só hidrolisadas. Fato que indica uma mudança de conformação das proteínas com os 2 tratamentos tornando as já mais dispersas antes da obtenção do concentrado. A combinação dos dois processos não promove benefício significativo em relação ao farelo apenas pré-tratado fisicamente, porém promove um aumento de quase 6% em relação ao FAD.

A alta dispersibilidade dos concentrados obtidos com ou sem pré-tratamento influencia diretamente na forma como estas proteínas possuem facilidade de solubilização para seu emprego em processos alimentícios que busquem homogeneização/incorporação destas proteínas em uma formulação ou ainda uma maior facilidade na hora de empregar processos de secagem e/ou desidratação não-convencional, devido a menor interação da cadeia protéica com os demais componentes do concentrado.

Bandyopadhyay, Misra e Ghosh (2008) avaliaram o IDP de FAD, mesma matriz utilizada neste trabalho, encontrando valor de 30%, portanto sem tratamento prévio e com

interferência dos outros componentes, mais de 70% desta proteína se mostrou indispersível e que os pré-tratamentos, enzimático e físico empregados no nosso estudo, melhoram o IDP significativamente.

O pré-tratamento enzimático do FAD ocasionou aumento significativo na digestibilidade *in vitro* das proteínas do farelo antes e após a obtenção dos concentrados. O processo de extrusão aplicado no farelo desengordurado e a combinação do processo físico e do enzimático promoveu maiores teores de digestibilidade nos farelos e nos concentrados protéicos obtidos destas fontes. Houve um aumento significativo da digestibilidade das proteínas de 1,8 vezes em relação ao FADE, FADEH e seus concentrados CFADE e CFAEH. Fato importante para ser associado com o perfil aminoacídico dos concentrados.

Hooper, Glahn e Cichy (2019) estudaram a digestibilidade *in vitro* de proteínas de grãos secos e massas elaboradas a partir deles; porém não encontraram diferença significativa entre a digestibilidade das proteínas contidas na matéria-prima e no produto final, submetidos a cocção. Foram encontrando teores de 81 a 83%.

Os farelos e seus concentrados não foram aplicados em produtos e nem submetidos a processos posteriores de preparo, porém seus valores de ID e digestibilidade sugerem que eles podem influenciar de maneira positiva o valor biológico dos produtos elaborados com eles. Naves et al. (2010) avaliariam a digestibilidade *in vitro* das proteínas da farinha de sementes de abóbora com e sem aplicação de tratamento térmico (cozido e cru, respectivamente); o aumento de 27% foi observado na digestibilidade do produto cozido para o produto cru. Os mesmos 27% de aumento foi observado por Piotrowicz e Salas-Melado (2017) em relação ao FAD e o concentrado protéico obtido dele.

Os pré-tratamentos aumentaram significativamente a digestibilidade protéica no estudo de Omosibi, Osundahunsi e Fagbemi (2018), que atribuíram esse efeito a ação do cisalhamento, ação do calor e perda da integridade estrutural do material durante o processo de extrusão, como consequência disso, aumenta a suscetibilidade do material às enzimas utilizadas durante o ensaio de digestibilidade protéica, corroborando com os maiores valores de digestibilidade encontrados para os farelos e concentrados submetidos ao processos de extrusão (individual ou combinado).

Alguns processos podem influenciar negativamente a digestibilidade das proteínas presentes no farelo de arroz e seus concentrados. Embora diversos trabalhos mostrem que processos fermentativos podem contribuir para o aumento do teor de proteínas de um material e aumentar a sua solubilidade, Silveira e Badiale-Furlong (2009) demonstraram uma diminuição significativa da digestibilidade *in vitro* das proteínas de 49% para o FAD e 64%

para o farelo de trigo ao fermentá-los com *Rhizopus* sp por 72h, atribuindo isto a baixa digestibilidade das proteínas produzidas pela biomassa fúngica desenvolvida no FAD durante a fermentação.

O Quadro 8 apresenta um resumo qualitativo do *ranking* do teor total de proteínas e rendimento de extração dos concentrados obtidos, bem como quais destes apresentaram as melhores propriedades tecnológicas (funcionais) e nutricionais.

Quadro 8 – *Ranking* de todas as determinações e propriedades avaliadas para os concentrados

Propriedade/Amostra	CFAD	CFADH	CFADE	CFADEH
Proteína_{total} (%)	54,9 ^c ± 0,8	59,6 ^b ± 1,1	72,9 ^a ± 0,4	72,0 ^a ± 0,6
Rendimento (%)	63,2 ^c ± 1,0	64,6 ^c ± 1,2	72,0 ^a ± 0,6	69,6 ^b ± 0,6
CAA (g_{água}/g_{amostra})	3,5 ^c ± 0,1	4,1 ^b ± 0,1	3,6 ^c ± 0,1	4,6 ^a ± 0,2
CAO (g_{óleo}/g_{amostra})	4,7 ^c ± 0,0	5,8 ^a ± 0,1	5,1 ^b ± 0,1	5,9 ^a ± 0,1
Turbidez	2,1 ^c ± 0,2	2,6 ^b ± 0,1	3,5 ^a ± 0,2	3,5 ^a ± 0,1
EE₁₀ (min)	13,4 ^b ± 0,6	15,5 ^a ± 0,7	4,9 ^d ± 0,9	10,9 ^c ± 0,7
EE₃₀ (min)	9,5 ^c ± 0,5	12,0 ^a ± 0,5	8,3 ^d ± 0,5	10,5 ^b ± 0,4
FE (%)	65,5 ^d ± 2,5	105,0 ^b ± 3,0	90,5 ^c ± 3,5	120,5 ^a ± 1,5
EFE (mL)	29,0 ^c ± 0,5	35,0 ^b ± 0,8	29,4 ^c ± 0,8	41,5 ^a ± 0,6
Perda de massa (%)	7,7 ^a ± 0,2	11,0 ^c ± 0,1	9,0 ^b ± 0,1	11,0 ^c ± 0,0
AA_{totais} (g_{aa}/100g_{proteína})	68,9 ^c ± 1,0	76,6 ^b ± 0,9	92,9 ^a ± 1,3	50,3 ^d ± 1,0
AA_{essenciais} (g_{aa}/100g_{proteína})	27,1 ^b ± 0,3	25,7 ^c ± 0,1	28,7 ^a ± 0,2	19,6 ^d ± 0,2
TEP	1,8 ^b ± 0,2	1,1 ^d ± 0,2	2,1 ^a ± 0,1	1,4 ^c ± 0,1
IDP	97,4 ^a ± 0,1	97,1 ^a ± 0,2	97,3 ^a ± 0,3	97,8 ^a ± 0,3
Digestibilidade	51,7 ^c ± 0,8	54,4 ^b ± 0,8	65,6 ^a ± 1,1	67,2 ^a ± 1,2

Verde = 1º lugar; Amarelo = 2º lugar; Branco = 3º lugar e Vermelho = 4º lugar. Cores iguais e letras minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A partir do resumo apresentado no Quadro 8 é possível afirmar que o CFADE apresentou os melhores resultados de proteína total, rendimento de extração e também as melhores propriedades nutricionais dentre os concentrados obtidos. O pré-tratamento enzimático pela hidrólise do FAD para obtenção CFADH promoveu uma melhora na EE₁₀, enquanto que o pré-tratamento físico da extrusão por si só acabou promovendo a perda de funcionalidade da proteína em todos os aspectos. A combinação dos pré-tratamentos, entretanto, resultou num concentrado com as melhores propriedades tecnológicas e, possivelmente, tenha um melhor desempenho quando aplicado em formulações alimentícias que necessitem de proteínas que tenham boas propriedades de CAA, CAO e FE.

5.11. VIABILIDADE ECONÔMICA

Com a produção estimada de 24 mil toneladas de farelo, tomando como exemplo a empresa Irgovel de Pelotas/RS, é possível estimar, a partir do preço atual de venda da tonelada do FAD (R\$580,00), o preço de venda de uma proteína extraída deste material, cujos teores permitem classificá-los como concentrados. Em um cenário ideal, o FAD poderia resultar em dois produtos de valor agregado: o concentrado protéico e o resíduo fibroso. Como este resíduo ainda não foi estudado, será considerado apenas a obtenção do concentrado e sua comercialização sempre partindo do pressuposto que o retorno sobre o investimento deste projeto será subestimado, uma vez que é possível aproveitar o FAD proveniente da extração de óleo de arroz pela indústria para transformá-lo em produtos de alto valor comercial.

Para isto, foram estimados os custos necessários para obtenção de material, equipamento, energia e recursos humanos com base em pesquisa das informações necessárias para conferir o valor monetário de cada um deles na produção. O intuito foi realizar uma projeção, em anos, do retorno deste investimento, projetando a viabilidade (ou não) da comercialização de concentrados protéicos obtidos a partir do FAD submetido aos diferentes pré-tratamentos. O Quadro 9 apresenta os custos variáveis e bases de cálculo utilizados para realização destas projeções:

Quadro 9 – Custos variáveis e bases de cálculo utilizados para Viabilidade Econômica

Custos variáveis e bases de cálculo	R\$
kW/h (Pelotas/RS) - CEEE	0,62
Cellic® CTec2 (1L) - Novozymes	11,75
Ácido Cítrico P.A. (5 kg) - Synth	146,20
Carbonato de Sódio P.A. (5 kg) - Dinamica	250,00
Citrato de Sódio P.A. (5 kg) - Synth	147,84
Água destilada (L) - Quimidrol	3,98
m ³ água (Pelotas/RS) - SANEP	3,83
Embalagem Plástico Primária (100 und.)	136,00
Embalagem Papelão Secundária (500 und.)	4.128,00

Os custos de alguns itens do quadro, como por exemplo a enzima, cujo valor estimado foi considerando que para aplica-la no processo deve passar por uma diluição em tampão na proporção de 1:1000 a partir do custo do L dela para aquisição. Outro exemplo é o da embalagem primária de plástico que acomoda 1 kg de concentrado protéico e cada

embalagem secundária de papelão acomoda 34 sacos de 1 kg. Estes valores foram considerados no cálculo de custo unitário de embalagem.

Os custos estimados de todos os concentrados levaram em consideração que a água destilada necessária para diluições de soluções e homogeneização do material será comprada. No entanto, a aquisição de um destilador de água é uma possibilidade que, a longo prazo, se torna um investimento que impacta positivamente no custo de produção dos concentrados.

Como custo fixo temos o pagamento de, no mínimo, 4 funcionários que trabalhariam em turnos alternados de 6 h/dia para realizar a demanda diária de produção do concentrado. O salário foi fixado em um valor mensal de R\$2.000,00 e custará, anualmente, R\$208.000,00 à empresa. Para o preparo do ácido cítrico 3 M, carbonato de sódio 3 M e tampão citrato-sódico 0,1 M foi considerado o custo da obtenção os reagentes e o peso molecular (g/mol) destes. O custo (R\$/L) da solução de carbonato de sódio 3 M para solubilização das proteínas é de R\$19,88; a solução de ácido cítrico 3 M para precipitação das proteínas é de R\$20,83 e o tampão citrato-sódico 0,1 M pH 4,2 é R\$5,41. O custo do litro da água destilada está embutido no custo final obtido.

Para os custos de investimento necessário foi considerado que todos os equipamentos necessários para obtenção dos concentrados protéicos seriam adquiridos. O valor da cotação do dólar adotado para conversão dos orçamentos foi de R\$5,49 conforme consultado no dia 2 de maio de 2019. O Quadro 10 mostra os orçamentos realizados para delimitar a capacidade de produção:

Quadro 10 – Custos de investimento para linha de produção dos concentrados protéicos

Custo de investimento	R\$
Extrusora industrial	R\$ 285.480,00
Destilador de água	R\$ 968,00
Centrífuga Industrial	R\$ 175.680,00
pHmetro	R\$ 2.558,21
Aagitador Orbital	R\$ 27.820,00
Secador de fluxo contínuo	R\$ 240.000,00
TOTAL	R\$ 732.506,21

A partir da capacidade dos equipamentos e na jornada de trabalho dos funcionários alocados para atividade de obtenção dos concentrados, foram criadas três hipóteses: a primeira delas operando na menor capacidade de centrifugação (1 m³/h); a segunda operando com capacidade intermediária (2 m³/h) e a terceira utilizando a maior capacidade de centrifugação

do equipamento (3 m³/h). Trabalhando 12 horas por dia durante 20 dias por mês, anualmente podem ser processadas 432 ton, 864 ton e 1,29 mil ton de farelo, respectivamente. O Quadro 11 apresenta o custo total de produção de cada concentrado por kg.

Quadro 11 – Custo de produção por kg de concentrado e preço sugerido de venda (R\$)

Concentrado	Custo de Produção/kg	Preço de venda/kg
CFAD	R\$ 51,42	R\$ 154,25
CFADH	R\$ 71,08	R\$ 213,23
CFADE	R\$ 45,62	R\$ 136,85
CFADEH	R\$ 66,67	R\$ 200,00

É recomendável que o preço de venda de um produto deve ser considerado três vezes maior o seu custo de produção para se obter uma boa margem de lucro e chegar a um *payback* satisfatório (SEBRAE, 2017). Desta forma, foi realizada uma estimativa de preço de venda dos concentrados de FAD. No Quadro 12, estão os valores da receita e do lucro anual a partir do rendimento da recuperação das proteínas do FAD para gerar os 4 tipos de concentrados.

Quadro 12 – Produção, receita e lucro anual para cada hipótese

Hipótese I - Centrífuga (1 m³/h)			
Concentrado	Produção anual (ton)	Receita anual (milhões de reais)	Lucro anual (milhões R\$)
CFAD	273,0	42,1	27,7
CFADH	279,1	59,5	39,3
CFADE	312,3	42,7	28,1
CFADEH	300,7	60,1	39,7
Hipótese II - Centrífuga (2 m³/h)			
Concentrado	Produção anual (ton)	Receita anual (milhões de reais)	Lucro anual (milhões de reais)
CFAD	546,0	84,2	55,4
CFADH	558,1	119,0	78,6
CFADE	624,7	85,5	56,1
CFADEH	601,3	120,3	79,4
Hipótese III - Centrífuga (3 m³/h)			
Concentrado	Produção anual (ton)	Receita anual (milhões de reais)	Lucro anual (milhões de reais)
CFAD	819,1	126,3	83,1
CFADH	837,2	178,5	117,9
CFADE	937,0	128,2	84,2
CFADEH	902,0	180,4	119,0

O lucro anual foi calculado a partir somatória dos custos de produção de cada concentrado protéico e dedução dos gastos com embalagem primária e secundária do valor da receita anual. Para o cálculo do custo de produção de cada concentrado respeitou-se a proporção de 1 kg de farelo para 6 L de água e os volumes de carbonato de sódio 3 M e ácido cítrico 3 M para solubilização e precipitação, respectivamente, das proteínas. Os processos de obtenção dos concentrados que envolvem hidrólise enzimática também tiveram a proporção 0,4 L de enzima para cada 1 kg de farelo. O agitador orbital cotado possui capacidade até 40 kg; desta forma, o valor informado no Quadro 8 representa a aquisição de 13 modelos de igual capacidade, baseado hipótese de maior produção.

Considerando o custo de investimento de R\$732.506,21, mais o gasto com salário dos funcionários R\$208.000,00 e adicionando duas vezes o valor deste investimento como capital de giro para imprevistos, reparos de manutenção e novas aquisições, chegamos ao valor total de investimento de 2,8 milhões de reais. O lucro mensal esperado para cada concentrado a partir da hipótese I de produção (menor vazão de centrífuga) é de 2,3 milhões de reais para o CFAD/CFADE e 3,3 milhões de reais para o CFADH/CFADEH. Ou seja, o *payback* para o investimento, considerando 100% das vendas (hipótese otimista) é de 23 dias para os concentrados hidrolisados CFADH e CFADEH (devido ao seu maior preço de venda) e 36 dias para o CFAD e CFADE. O *payback* para o investimento, considerando 50% das vendas (hipótese neutra), é de 70 dias para o CFAD e CFADE e 56 dias para o CFADH e CFADEH.

Na pior hipótese, em um cenário com apenas 10% das vendas mensais (hipótese pessimista), o *payback* para ao CFAD e CFADE seria de 1 ano, enquanto que para o CFADH e CFADEH seria de 8 meses. A partir desta taxa de retorno de investimento indica que a implementação do projeto para uma linha de obtenção de concentrados protéicos é viável.

Considerando apenas a extração das proteínas do FAD para obtenção do CFAD, poderá ser comercializado um concentrado protéico estável termicamente (menor perda de massa quando submetida até 200 °C), com um bom aporte de aminoácidos essenciais, alta taxa de eficiência protéica e dispersibilidade, com custo de produção de R\$51,42 por kg do concentrado e preço sugerido de venda de R\$154,25/kg.

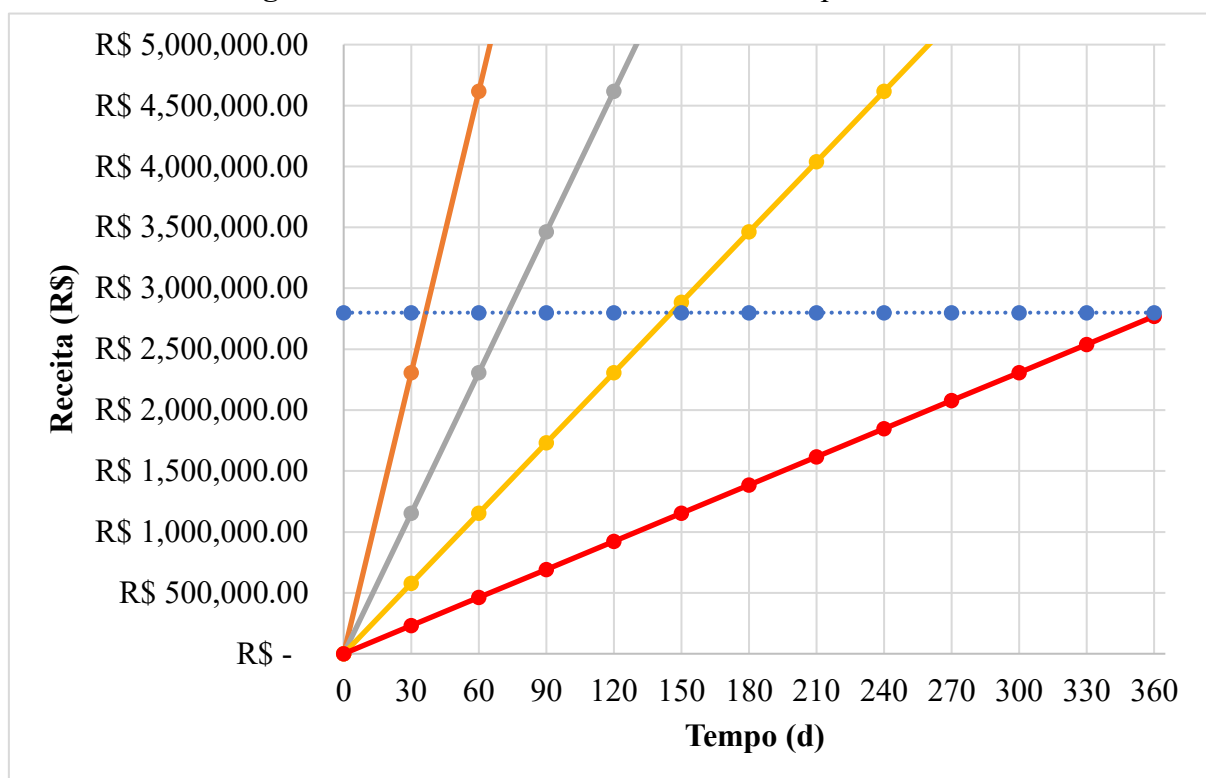
O pré-tratamento de extrusão para obtenção do CFADE, permite comercializar uma produto com maior teor protéico e maiores resultados de rendimento em massa de proteína, com alta capacidade de absorção de óleo e com as melhores propriedades nutricionais estudadas, ao custo de produção de R\$45,62 por kg do concentrado e preço sugerido de venda de R\$136,85/kg.

O pré-tratamento do FAD com enzima celulase para hidrolisar o material lignocelulósico utilizando mix de enzimas do complexo celulolítico para obtenção do CFADH, permite comercializar um produto de elevado teor protéico, ótimas propriedades tecnológicas, bom aporte de aminoácidos totais e alta digestibilidade, com custo de produção de R\$71,08 por kg do concentrado e preço sugerido de venda de R\$213,23/kg.

A combinação dos dois tipos de pré-tratamento do FAD, extrusão e tratamento enzimático, para obtenção do CFADEH, fornece um concentrado com proteína com alto rendimento de extração, com as melhores propriedades tecnológicas dentre os concentrados estudados, alta digestibilidade e dispersível, com custo de produção de R\$66,67 por kg do concentrado e preço sugerido de venda de R\$200,00/kg.

O ponto de equilíbrio foi obtido para todas as hipóteses levantadas, considerando o investimento total do projeto de R\$2,8 milhões de reais e levando em consideração os valores de lucro mensal e anual do concentrado protéico obtido do FAD (menor lucratividade em relação aos demais). A Figura 19 exemplifica a taxa de retorno do investimento (em dias):

Figura 19 – Taxa de retorno de investimento para o CFAD



Linha azul: valor de investimento total do projeto; Linha laranja: hipótese otimista (100% de vendas); Linha cinza: hipótese neutra (50% das vendas); Linha amarela: hipótese realista (25% das vendas); Linha vermelha: hipótese pessimista (10% das vendas).

Analisando as informações apresentadas na Figura 19 é possível afirmar que, mesmo na pior hipótese apresentada (10% das vendas) para o concentrado com menor preço de venda sugerido, o retorno do investimento pode ser feito em pouco menos de 1 ano de operação. O que torna o processo rentável é que, mesmo extrapolando os gastos em 2 ou 3 vezes o valor estipulado de R\$2,8 milhões de reais é possível projetar uma taxa de retorno de investimento de 3 anos na pior hipótese. Estratégias de vendas, marketing, colocação no mercado e demais investimentos podem corroborar para que as melhores hipóteses deste trabalho sejam alcançadas e que a linha de produção de concentrados protéicos provenientes do FAD, com ou sem pré-tratamento, possa ser implementada.

6. CONCLUSÃO

Para empregar a enzima celulolítica para degradar previamente o material lignocelulósico a melhor condição foi obtida quando a hidrólise foi realizada em batelada, empregando 1 mL de enzima (55 FPU) para cada 2,5 g de FAD/FADE, quatro repetições de alimentação do reator nas mesmas proporções, operando em pH 3,8, temperatura 55 °C e 96 h. A hidrólise em batelada alimentada promoveu um aumento de 19,3% e 23,9% no rendimento de extração do FADH e FADEH quando em comparação com o processo de batelada única, parâmetro decisivo para a escolha do processo em batelada alimentada.

Os concentrados foram obtidos por solubilização alcalina e precipitação no ponto isoelétrico das proteínas do FAD após a aplicação dos pré-tratamentos físico, enzimático e combinados. O pré-tratamento de extrusão resultou em um concentrado protéico com teor de proteínas elevado (72,9%), boa recuperação em massa de proteína (72,0%), baixa perda de massa (9%), maior conteúdo de aminoácidos totais (97,3 g_{aa}/100g_{proteína}) e aminoácidos essenciais (28,7 g_{aa}/100g_{proteína}), maior TEP (2,1), dispersibilidade (97,3%) e digestibilidade (65,6%), caracterizando-o como o concentrado com maior teor protéico, com a melhor recuperação e que apresenta as melhores propriedades nutricionais.

O pré-tratamento enzimático resultou em um concentrado protéico com a melhor CAO (5,8 g_{óleo}/g_{amostra}), maiores EE₁₀ (15,5 min) e EE₃₀ (12,0 min), aumento significativo na Turbidez, CAA, FE e EFE,

A combinação dos pré-tratamentos enzimático e físico para obtenção do CFADEH aumentou o teor protéico do concentrado (69,6%), melhorou o rendimento de extração (72,0%), teve o maior aumento das propriedades CAA (4,6 g_{água}/g_{amostra}), Turbidez (3,5), FE (120,5%), EFE (41,5 mL) e ainda contribuiu para aumento da digestibilidade do concentrado (67,2%). O concentrado obtido pela combinação dos processos foi o que apresentou propriedades tecnológicas de ampla aplicabilidade e o concentrado obtido por pré-tratamento enzimático foi mais adequado para formulações que precisem de alta CAO e alta EE.

A viabilidade econômica indica que o projeto de implantação de uma linha industrial para obtenção de concentrados protéicos pré-tratados previamente com processos físicos e/ou enzimáticos pode ser lucrativo com um valor de investimento com alta taxa de *payback* e que apresenta poucos riscos, uma vez que na sua pior hipótese apresenta um retorno máximo de 1 ano. O custo comercial do kg dos quatro concentrados protéicos obtidos é competitivo com o preço dos produtos disponíveis atualmente no mercado.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar o resíduo fibroso obtido da extração protéica do FAD e analisar a viabilidade de utilização em processos alimentícios ou de outras finalidades, a fim de tornar o processo de obtenção dos concentrados um processo “verde”, sem geração de resíduo, com 100% de aproveitamento de sua fonte original (farelo de arroz integral) e gerando três produtos: o óleo de arroz, o concentrado protéico e o resíduo fibroso.

- Avaliar se os pré-tratamentos (físico, enzimático e combinado) são eficazes na diminuição de conteúdos anti-nutricionais que possam estar presentes no farelo e se o processo de recuperação das proteínas por si só não é responsável por realizar esta diminuição, realizando ensaio controle com concentrado obtido do FAD sem pré-tratamento.

- Estudar um novo método de hidrólise para preparar o concentrado protéico antes da análise cromatográfica para avaliação do perfil de aminoácidos do mesmo; pois a combinação dos pré-tratamentos foi eficiente para determinação das propriedades tecnológicas, mas se requer melhor avaliação do perfil de aminoácidos totais e essenciais.

- Realizar efetivamente a aplicação dos concentrados protéicos em formulações alimentícias e realizar análise sensorial para verificar aceitação global e intenção de compra deste produto, bem como avaliar atributos sensoriais que sejam importantes quando comparados com produtos que já existem no mercado ou semelhantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DOURY, M. K.; W.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R. Rice-Endosperm and Rice-Bran Proteins: A Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 8, p. 943–956, 2018.
- ALCOCER, M. J. C.; ARES, S. C.; LÓPEZ-CALLEJA, I. Recent advances in food allergy. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, n. 1, p. 230-234, 2016.
- ALSMEYER, R. H.; CUNNINGHAM, A. E.; HAPPICH, M. L. Equations predict PER from amino acid analysis. **Food Technology**, v. 28, n. 1, p. 34-38, 1974.
- AMAGLIANI, L.; O'REGAN, J.; KELLY, A. L.; O'MAHONY, J. A. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 59, n. 1, p. 18-26, 2017.
- ANDERSON, A. K.; GURAYA, H. S. Extractability of protein in physically processed rice bran. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 1, p. 969-973, 2001.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17th ed., USA: Gaithersburg, 2000.
- AOCS. American Oil Chemists' Society. **Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society**, IL: Champaign, 1987.
- BANDYOPADHYAY, K.; MISRA, G.; GHOSH, S. Preparation and characterization of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal. **Journal of Oleo Science**, v. 57, n. 1, p. 47–52, 2008.
- BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G.; ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglycanases purified from *Trichoderma viride*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, n. 2, p. 173-178, 1988.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry – 4th ed.**, Springer, 2009.
- BHATTACHARYA, S.; PRAKASH, M. Extrusion of blends of rice and chick pea flours: A response surface analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 21, n. 3, p. 315-330, 1994.
- CAIRE-JUVERA, G.; VÁZQUEZ-ORTIZ, F. A.; GRIJALVA-HARO, M. I. Amino acid composition score and in vitro protein digestibility of foods commonly consumed in Northwest Mexico. **Nutricion Hospitalaria**, v. 28, n. 1, p. 365-371, 2013.
- CANEVAROLO, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004.
- CAO, L.; YU, W.; WU, Y.; YU, L. The evolution complex structures and function of septic proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 20, p. 3309-3323, 2009.

CHAIYAKUL, S.; JANGEHUD, K.; JANGEHUD, A.; WUTTIJUMMONG, P.; WINGER, R. Effect of Protein content and Extrusion Process on sensory and physical properties of extruded high-protein, glutinous rice-based snack. **Natural Science**, v. 42, n. 1, p. 182-190, 2008.

CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 1, p. 592-597, 2007.

CHANPUT, W.; THEERAKULKAI, C.; NAKAI, S. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science**, v. 49, n. 1, p. 422-428, 2009.

CHAROEN, R.; TIPKANON, S.; SAVEDBOWORN, W. Production of rice bran protein hydrolysates from traditional thai rice bran (Plai-Ngahm-Prachinburi). **International Food Research Journal**, v. 24, n. 6, p. 2304-2311, 2017.

CIPOLATTI, E. P.; KUPSKI, L.; ROCHA, M.; OLIVEIRA, M. S.; BUFFON, J. G.; BADIALE-FURLONG, E. Application of protein-phenolic based coating on tomatoes (*Lycopersicum esculentum*). **Food Science and Technology**, v. 32, n. 3, p. 594-598, 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento: Monitoramento Agrícola. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 5, n. 4, p. 1-132, 2019.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema – 5ª edição**. Porto Alegre: Artmed, 2019.

DELGADO-POVEDANO, M. M.; CASTRO, M. D. L. A review on enzyme and ultrasound: a controversial but fruitful relationship. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, n. 1, p. 1-21, 2015.

DENARDI-SOUZA, T.; MASSAROLO, K. C.; TRALAMAZZA, S. M.; BADIALE-FURLONG, E. Monitoring of fungal biomass changed by *Rhizopus oryzae* in relation to amino acid and essential fatty acids profile in soybean meal, wheat and rice. **CyTA: Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 156-164, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 350-356, 1956.

FABIAN, C.; JU, Y. A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 9, p. 816-827, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization: Dietary protein quality evaluation in human nutrition. **FAO Food and Nutrition Paper**, v. 92, 2013.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**. 2ª ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2006.

FLANAGAN, R. J.; MORGAN, P. E.; SPENCER, E. P.; WHELPTON, R. Microextraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomed Chromatography**, v. 20, n. 5, p. 530-538, 2006.

FRIEDMAN, M. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources - A Review. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, n. 1 p. 6–29, 1996.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GILANI, G. S.; XIAO, C. W.; COCKELL, K. A. Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and bioavailability of amino acids and on protein quality. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 2, p. 315-332, 2012.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica. **Cerâmica**, v. 34, n. 1, p. 163-164, 1988.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 812-818, 2010.

GUL, K.; YOUSUF, B.; SINGH, A. K.; SINGH, P.; WANI, A. A. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food - A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 1, p. 24–30, 2015.

GUY, R. **Extrusión de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2001.

HAINES, P. J. **Thermal methods of analysis principles, applications and problems**. Blackie Academic & Professional, 1995.

HAMADA, J. S. Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 1 p. 305–310, 2000.

HARPER, J. M.; CLARK, J. P. Food extrusion. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 11, p. 155-215, 1979.

HASHIMOTO, J. M.; GROSSMAN, M.V. E. Effects of extrusion conditions on quality of cassava bran/cassava starch extrudates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 511-517, 2003.

HOOPER, S. D.; GLAHN, R. P.; CICHY, K. A. Single varietal dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) pastas: nutritional profile and consumer acceptability. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 74, n. 3, p. 342-349, 2019.

KADAN, R. S.; BRYANT, R. J.; PEPPERMAN, A. B. Functional properties of extruded rice flours. **Cereal Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 1669-1672, 2003.

KHAN, S. H.; BUTT, M. S.; SHARIF, M. K.; SAMEEN, A.; MUMTAZ, S.; SULTAN, M. T. Functional properties of protein isolates extracted from stabilized rice bran by microwave, dry heat and parboiling. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, n. 1 p. 2416–2420, 2011.

KINSELLA, J. E.; MELACHOURIS, N. Functional properties of proteins in foods: a survey. **Critical Reviews in Food Science**, v. 7, n. 3, p. 219-280, 1976.

KUPSKI, L.; TELLES, A. C.; GONÇALVES, L. M.; NORA, N. S.; BADIALE-FURLONG, E. Recovery of functional compounds from lignocellulosic material: an innovative enzymatic approach. **Food Bioscience**, v. 22, n. 1, p. 26-31, 2018.

LAMID, M.; KUSRININGRUM, A. A.; SUNARAYO, H. W. Improving the quality of rice bran by utilization of lignocellulosic enzymes for broiler food. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**, v. 5, n. 12, p. 227-230, 2015.

LAVANYA, M. N.; VENKATACHALAPATHY, N.; MANICKAVASAGAN, A. Physicochemical characteristics of rice bran. **Brown Rice**, v.1, n. 1, p. 79-90, 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 265-275, 1951.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, C.; BÉNET, S.; OBERT, L. Determination of Proteins in Refined and Nonrefined Oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 4348-4351, 2008.

MARTÍNEZ, C.; CUEVAS, F. **Evaluación de la calidad culinaria y molinera del arroz: guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad auditorial sobre el mismo tema**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1989.

McNAUGHTON, J. L.; MORTIMER, C. T. Differential Scanning Calorimetry. **Physical Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 658-698, 1975.

MESQUITA, C. B.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Effects of processing on physical properties of extruded snacks with blends of sour cassava starch and flaxseed flour. **Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 404-410, 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NAVES, L. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P. Antinutritional components and protein digestibility in pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*) submitted to different processing methods. **Food Science and Technology**, v. 30, n.1, p. 180-184, 2010.

OMOSEBI, M. O.; OSUNDAHUNSI, O. F.; FAGBEMI, T. N. Effect of extrusion on protein quality, antinutritional factors, and digestibility of complementary diet from quality protein maize and soybean protein concentrate. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1-10, 2018.

OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins**. 2nd ed., London: Longmans Green and Co., 1924.

OSIBONA, A. O.; KUSEMIJU, K.; AKANDE, G. R. Fatty acid composition and amino acid profile of two freshwater species, African catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia zillii*). **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v. 9, n. 1, p. 609-621, 2009.

OWUSU-APENTEN, R. K. **Food Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing**. NY: Marcel Dekkers, Inc., 2002.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716-723, 1978.

PHONGTHAI, S.; D'AMICO, S.; SCHOENLECHNER, R.; RAWDKUEN, S. Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 240, n. 1, p. 156-164, 2018.

PHONGTHAI, S.; HOMTHAWORNCHOO, W.; RAWDKUEN, S. Preparation, properties and application of rice bran protein: a review. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 1, p. 25-34, 2017.

PHONGTHAI, S.; LIM, S. T. RAWDKUEN, S. Optimization of micro-wave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. **Journal of Cereal Science**, v. 70, n. 1, p. 146-154, 2016.

PINCIROLI, M.; APHALO, P.; NARDO, A. E.; AÑÓN, M. C.; QUIROGA, A. V. Broken rice as a potential functional ingredient with inhibitory activity of renin and angiotensin-converting enzyme (ACE). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 74, n. 1, p. 405-413, 2019.

PIOTROWICZ, I. B. B.; SALAS-MELLADO, M. M. Protein concentrates from defatted rice bran: preparation and characterization. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 165-172, 2017.

RATHOD, R. P.; ANNAPURE, U. S. Physicochemical properties, protein and starch digestibility of lentil-based noodle prepared by using extrusion processing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, n.1, p.121-130, 2017.

RANI, P.; KUMAR, A.; PUROHIT, S. R.; RAO, P. S. Impact of fermentation and extrusion processing on physicochemical, sensory and bioactive properties of rice-black gram mixed flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, n. 1, p. 155-163, 2018.

REGENSTEIN, J. M.; REGENSTEIN, C. E. **Food Protein Chemistry: An introduction for Food Scientists**. NY: Academic Press, Inc., 1984.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURAN, N. Enzymatic hydrolysis of rice hull using cellulases: Effect of chemical and photochemical treatments. **Química Nova**, v. 2, n.1, p. 140-143, 1998.

SAIRAM, S.; KRISHNA, A. G.; UROOJ, A. Physico-chemical characteristics of defatted rice bran and its utilization in a bakery product. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 478-783, 2011.

SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: Emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 1, p. 71–81, 1981.

SCHMIDT, C. G.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; BADIALE-FURLONG, E. Rice bran protein-based films enriched by phenolic extract of fermented rice bran and montmorillonite clay. **CyTA: Journal of Food (Online)**, v. 13, n. 2, p. 204-212, 2015.

SEBRAE. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **E-book: Viabilidade de Negócios**. 2017. Disponível em: <encurtador.com.br/dloV9>. Acesso em: 02 de maio de 2020.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela LTDA, 1996.

SHARMA, R.; SRIVASTAVA, T.; SAXENA, D. C. Studies on Rice Bran and its benefits - A Review. **Journal of Engineering Research and Applications**, v. 5, n. 52, p. 107–112, 2015.

SINGH, B.; SEKHON, K. S.; SING, N. Effects of moisture, temperature and level of pea grits on extrusion behavior and product characteristics of rice. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 198-202, 2007.

SINGTHONG, J.; ONSAARD, E.; THONGKAEW, C. Functional properties of protein concentrate from rice bran (Khao Dawk Mali 105). **Proceeding of TSB: Annual Meeting and International Conference**. Mahasarakhum: Thai Society of Biotechnology, 2008.

SILVA, B.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Central composite design-desirability function approach for optimum ultrasound-assisted extraction of daidzein and genistein from soybean and their antimycotoxigenic potential. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 1, p. 258-270, 2018.

SILVEIRA, C. M.; BADIALE-FURLONG, E. Characterization of nitrogenated compounds in solid state fermentation bran. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 805-811, 2009.

SILVELLO, M. A. C.; MARTÍNEZ, J.; GOLDBECK, R. Increase of reducing sugars release by enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse intensified by ultrasonic treatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, n. 1, p. 481-489, 2019.

STEFFIEN, D.; AUBEL, I.; BERTAU, M. Enzymatic hydrolysis of pre-treated lignocellulose with *Penicillium verrucosum* cellulases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 103, n. 1, p. 29-35, 2014.

STONE, A. K.; KARALASH, A.; TYLER, R. T.; WARKENTIN, T. D.; NICKERSON, M. T. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. **Food Research International**, v. 79, n. 1, p. 31-38, 2015.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Intensification of enzymatic hydrolysis of lignocellulose using ultrasound for efficient bioethanol production: a review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 1, p. 1816-1828, 2013.

SWIECH, E.; BURACZEWSKA, L. *In vivo* and *in vitro* protein and amino acid digestibility of legume seeds in pig diets. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 10, n. 2, p. 159-162, 2001.

TANG, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.; ESWARANANDAM, S. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolysate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1 p. 152–157, 2003.

TOLDRÁ, F.; NOLLET, L. M. L. **Proteomics in foods: principles and applications**. Food Microbiology and Food Safety 2. US: Springer, 2013.

TOMÉ, D. Digestibility issues of vegetable versus animal proteins: protein and amino acid requirements and functional aspects. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 272-274, 2013.

TOORCHI, M.; NOURI, M.; TSUMURA, M.; KOMATSU, S. Acoustic Technology for High-Performance Disruption and Extraction of Plant Proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 1, p. 3035-3041, 2008.

TRUSWELL, A. S. Cereal grains and coronary heart disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 1-14, 2002.

TURNBULL, J. L.; ADAMS, H. N.; GORARD, D. A. Review article: The diagnosis and management of food allergy and food intolerances. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 1, p. 3–25, 2015.

USDA. United States Department of Agriculture. Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements. **Institute of Medicine's Food and Nutrition Board**, 2014.

USDA. United States Department of Agriculture. Grain: World Markets and Trade. **Foreign Agricultural Service Office of Global Analysis**, 2019.

VERSANTVOORT, C. H. M.; OOMEN, A. G.; VAN DE KAMP, E.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, 2005.

VISSER, A.; THOMAS, A. Review - Soya protein products: their processing, functionality and application aspects. **Food Reviews International**, v. 3, n. 2, p. 1-32, 1987.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and Functional Properties of Rice Bran Protein Isolate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, n. 1 p. 411–416, 1999.

WANG, P.; CHANG, J.; YIN, Q. Q.; WANG, E. Z.; ZHU, Q.; SONG, A. D.; LU, F. S. Effects of thermo-chemical pretreatment plus microbial fermentation and enzymatic hydrolysis on saccharification and lignocellulose degradation of corn straw. **Bioresource Technology**, v. 194, n. 1, p. 165-171, 2015.

WANG, Z.; LIN, X.; LI, P.; ZHANG, J.; WANG, S.; MA, H. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 117, n. 1, p. 222-227, 2012.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Practical Biochemistry**. UK: Cambridge, 2010.

WENDLANDT, W. W. **Thermal analysis – 3rd ed.**, Wiley, 1986.

XIAO, P.; HUANG, H.; CHEN, Y.; CHEN, J.; LI, X.; SHI, H. Nutritional evaluation, characterization and antioxidant activity of radix isatidis protein hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 11, n. 1, p. 831–838, 2014.

ZENG, Z.; LIU, C.; LUO, S.; CHEN, J.; WANG, L.; GUO, X. The Profile and Bioaccessibility of Phenolic Compounds in Cereals Influenced by Improved Extrusion Cooking Treatment. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–11, 2016.

ZHAO, Q.; SELOMULYA, C.; XIONG, H.; CHEN, X. D.; RUAN, X.; WANG, S.; XIE, J.; PENG, H.; SUN, W.; ZHOU, Q. Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 1, p. 568-575, 2012.

ZHANG, H. J.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUO, X. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 359–363, 2012.