



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA  
FEDERAL DO PARANÁ**  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

**OBTENÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO DO  
FARELO DE ARROZ E AVALIAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES QUÍMICAS E FUNCIONAIS**

**Sílvia Bernardi**

Medianeira

2015

**Sílvia Bernardi**

**OBTENÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO DO  
FARELO DE ARROZ E AVALIAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES QUÍMICAS E FUNCIONAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Medianeira

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B523o Bernardi, Sílvia.

Obtenção de concentrado proteico do farelo de arroz e avaliação das propriedades químicas e funcionais. / Sílvia Bernardi. – 2015.  
100 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Cristiane Canan.

Co-orientadora: Eliane Colla.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2015.

Inclui bibliografias.

1. Cavitação. 2. Agroindústria. 3. Farelo de arroz. 4. Alimentos – Dissertação. I. Canan, Cristiane, orient. II. Colla, Eliane, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664 - Ed. 22

Biblioteca Câmpus UTFPR Medianeira  
Marci Lucia Nicodem Fischborn 9/1219



## TERMO DE APROVAÇÃO

### OBTENÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E FUNCIONAIS

Por

**SILVIA BERNARDI**

Essa dissertação foi apresentada às treze horas e trinta minutos, do dia nove de julho de dois mil e quinze, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Profa. Dra. Cristiane Canan (Orientadora - PPGTA)

---

Profa. Dra. Renata Hernandez Barros Fuchs (Membro Externo – UTFPR)

---

Profa. Dra. Cristina Tostes Filgueiras (Membro Externo – UFGD)

A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

**Orientadora:**  
**Professora Dra. Cristiane Canan**  
**Co-Orientadora:**  
**Professora Dra. Eliane Colla**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pela dádiva da saúde e do entusiasmo durante esse período.

Ao meu querido Cristiano Rodrigo Baronio por sua paciência e presença constante, que permitiram a manutenção do meu foco. Sem você, o caminho teria sido mais difícil.

Aos meus pais e familiares pela compreensão por minha constante ausência durante essa jornada.

A Cristiane Canan, que além de orientadora, uma grande amiga que acreditou em mim e com paciência, compreendeu minhas deficiências e dificuldades durante essa jornada.

A Irgovel – Indústria Riograndense de Óleos Vegetais, pela doação do farelo de arroz desengordurado, possibilitando a realização desta pesquisa.

Minha gratidão ao Mauro Strey Kramer da Frimesa Cooperativa Central, pelo apoio sempre que necessário.

Aos meus colegas de trabalho Evandro Correa, Catia Benevides, Sarah Castanheira e Elizangela Krumennauer, que deram conta do recado nos momentos de ausência, e a amiga Catiucia Giraldi pelo apoio e compartilhamento de experiências.

Aos professores Cleonice Pereira Mendes Sarmento, Eliane Colla, Éder Lisandro de Moraes Flores, Ilton Baraldi, Marines Corso e Rochele Sogari Picoloto pela disponibilidade e solicitude de sempre.

Ao Alessandro Golff da Costa, Diego Ricardo Nunes Noguez e Stephany Rezende pela valiosa colaboração durante as extrações de proteína e análises.

A Frimesa Cooperativa Central, pelo fornecimento da análise de carboidratos e a Cooperativa Lar pela doação de farelo de arroz e análises.

Enfim, agradeço a todos que de uma forma ou outra ajudaram a construir esse sonho.

# GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION AND OBJECTIVES:** Rice is the cereal most consumed in the world and during the processing, it is obtained the rice bran which represents 8% of the total weight of the grain. The defatted rice bran contains approximately 15% of protein of high nutritional value. The extraction techniques permit besides to extract, also to select and to separate substances. The extraction of rice bran proteins by alkaline medium is often used because they reach the maximum solubility in the pH and to assist in rupture of cell walls of a food. Mechanical and non-mechanical methods may be used. Mechanical stirring with the movement of liquid through rotating impellers assists in the disruption of the cell walls during extraction processes. The extraction assisted by the ultrasound (EAU) uses frequencies above 20 kHz to generate cavitation in liquids, which is the collapse of microbubbles of gas and vapor that occurs when the pressure changes in the middle are large enough to literally lacerate it under the influence of ultrasound. With this collapse, there is the cell disruption and the mass transfer to the environment. A rice bran protein concentrate (RBPC) should have good solubility, appropriate functional properties, acceptable sensory characteristics to be used as a food ingredient e to have essential amino acids. The objectives of this study were evaluate the effects of pH, temperature, speed of stirring, stirring time, time in ultrasonic bath and amplitude of the power in the extraction of rice bran protein, and analyzing the color, RBPC functionality (water and oil retention capacity, foaming, foam stability, emulsifying capacity, emulsion stability and gel formation), solubility, amino acid profile and its acceptability when applied in cashew juice.

**METHODS** — It was verified the protein yield in three types of alkaline extraction: agitation, ultrasonic bath at 37 kHz and ultrasonic bath at 80 kHz. As a first step, it was applied the Fractional Factorial Planning  $2^{4-1}$  (with two levels, three replicates in the central point), totaling 11 trials, with the independent variables for extraction with stirring: pH, agitation time (min), speed stirring (rpm) and temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and for the extraction in an ultrasound bath (37 and 80 kHz): pH, ultrasound time (min) temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and power range (%). In the second stage, the variables with significant effects ( $p < 0.05$ ) of each type of extraction were subjected to Design Central Composite Rotational (DCCR)  $2^2$  (four axial points, three repetitions at the central point), totaling 11 trials. The dependent variables, the experimental and predicted response were expressed in  $\text{g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$  extract  $\pm$  average standard deviation. The effects were validated by analysis of variance, using *software* Statistica 8.0, being considered the best extraction condition one with the highest protein content and thus, obtained the concentrate. The crude protein content was determined by Kjeldahl and multiplied by 5.95. The yield was calculated as the ratio of the total content of protein in rice bran by the one found in the RBPC. The color of the concentrate extracted by stirring and by ultrasound was checked by instrumental colorimetry and from the latter extraction method, it was determined the chemical composition (%), minerals ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), soluble protein (%), water and oil retention capacity ( $\text{g water}\cdot\text{g}^{-1}$  sample;  $\text{g oil}\cdot\text{g}^{-1}$  sample), foaming capacity (%), foam stability (%), emulsifying capacity (%), stability of emulsion (%), ability to form gel and amino acid profile ( $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ ). The applicability was checked by sensory evaluation of cashew juice (preference and acceptability of attributes as taste, color, smell and global impression).

**MAIN RESULTS** — The optimal response in the alkaline extraction with monitoring of stirring was of 48.53% protein (DB), at pH 10, stirring speed of 80 rpm, stirring time of 300 min and temperature of  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , representing the yield of 34.51% in extraction. The interaction between the independent variables as pH, stirring time and temperature promoted favorable effects on protein extraction technique while the stirring speed does not interfere significantly. The experimental planning used was adequate to study the effects of the combination of mechanical stirring to alkaline extraction process of

rice bran protein. Under these conditions, RBPC obtained presented as a fine powder and velvety texture, with values of  $L^* 78.29 \pm 0.95$ ,  $a^* -4.97 \pm 0.05$  and  $b^* 16.51 \pm 0.10$  for the instrumental color measurement. When assessing the alkaline extraction associated with the ultrasonic bath, it was compared the performance of the frequencies of 37 and 80 kHz, and it was proved that the lower frequencies have shown higher extraction. In the test with increased yield obtained a protein concentrate with a protein content of 83.36% (DB), when used pH 10, 30 min of ultrasound, 100% power range (30 °C), representing a yield of 4,74% extraction. Therefore, the UAE can be used as an alternative method for extracting rice bran protein, reducing the extraction time and consuming less power. UAE is a promising and advanced technique for extracting substances from food interest, offering potential for the development of new products. The RBPC presented in the crystalline form with values  $L^* 60.42 \pm 2.15$ ,  $a^* -1.31 \pm 0.53$  and  $b^* 20.29 \pm 1.39$  for instrumental measurement of color. It was observed a lower solubility at pH 2, 3, 4 and 5, but greater solubility in the pH range 6 to 10. The water and oil absorption capacity was  $1.04 \pm 0.07 \text{ g.g}^{-1}$  and  $11.75\% \pm 0.67 \text{ g.g}^{-1}$ , respectively, higher to reference Bovine Serum Albumin (BSA). The greater amount of foam was formed in pH 4 and 8 ( $41.17\% \pm 2.30$ ,  $48.47\% \pm 1.15$ ) and lower at pH 6 ( $9.96\% \pm 0.00$ ), but the stability of the formed foam was low at all pHs and in both cases, and BSA showed higher foaming characteristics. RBPC showed good emulsifying capacity at pH 2, 4, 6 and 8 ( $56.20\% \pm 5.39$ ,  $66.19\% \pm 6.57$ ,  $67.86\% \pm 0.19$ ,  $72.92\% \pm 2.95$ ) comparable to BSA, but less stable emulsions at pH 2 ( $32.50\% \pm 3.54$ ). In temperature of 30 °C and 8 °C, the RBPC showed low gelling capacity with a fragile gel and little consistent. The amino acid profile of the RBPC presented good amounts of glutamic acid, glycine, histidine, arginine, threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine and lysine, essential for protein synthesis. The sensory performance of the RBPC was evaluated in formulations of sweetened cashew juice containing 0.1%; 0.3% and 0.5% RBPC and ordered according to the preference of 60 untrained panelists. It was observed that there was no significant difference between the samples ( $p > 0.05$ ). Due to this result, an acceptance test was applied to 64 untrained panelists using a formula of sweetened cashew juice added with 0.5% of RBPC and the control formula (without RBPC). It was found that there was a significant difference ( $p < 0.05$ ) between samples in attributes as taste, color, smell and overall impression. Tasters liked moderately the control formula, but were indifferent to the formula with 0.5% RBPC because the sensory characteristics of the rice were accentuated. The RBPC presented excellent functional properties that make it a promising ingredient for the food industry.



## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS:** O arroz é um dos cereais mais consumidos no mundo e durante o seu beneficiamento, obtém-se o farelo que representa cerca de 8% do peso total do grão. O farelo de arroz desengordurado contém aproximadamente 15% de proteínas de alto valor nutricional. As técnicas de extração permitem além de extrair, selecionar e separar e determinadas substâncias. A extração das proteínas do farelo de arroz em meio alcalino é muito utilizada porque neste pH sua solubilidade é máxima e há a ruptura das paredes celulares. Podem ser usados métodos mecânicos e não mecânicos. A agitação mecânica com a movimentação de líquidos por meio de impulsores giratórios auxilia no rompimento das paredes celulares durante processos de extração. A extração assistida por ultrassom (EAU) utiliza frequências acima de 20 kHz para gerar cavitação em meios líquidos, que nada mais é que o colapso de microbolhas de gás e vapor que ocorre quando as mudanças de pressão no meio são grandes o suficiente, para literalmente dilacerá-lo sob a influência do ultrassom. Com este colapso, há o rompimento celular e a transferência de massa para o meio. Um concentrado de proteína do farelo de arroz (CPFA) deve ter boa solubilidade, propriedades funcionais apropriados, características organolépticas aceitáveis para serem utilizados como um ingrediente alimentar, e possuir aminoácidos essenciais. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do pH, temperatura, velocidade da agitação, tempo de agitação, tempo em banho ultrassônico e amplitude da potência na extração das proteínas do farelo de arroz, além de analisar a cor, funcionalidade do CPFA (capacidade de absorção de água e óleo, formação de espuma, estabilidade da espuma, capacidade emulsificante, estabilidade da emulsão e formação de gel), solubilidade, perfil de aminoácidos e sua aceitabilidade quando aplicado em suco de caju.

**MÉTODOS** — Verificou-se o rendimento proteico em três tipos de extração alcalina: agitação, banho ultrassônico a 37 kHz e banho ultrassônico a 80 kHz. Numa primeira etapa, aplicou-se o planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  (com dois níveis, três repetições no ponto central), totalizando 11 ensaios, tendo como variáveis independentes para a extração com agitação: pH, tempo de agitação (min), velocidade da agitação (rpm) e temperatura (°C), e para a extração em banho de ultrassom (37 e 80 kHz): pH, tempo de ultrassom (min), temperatura (°C) e amplitude da potência (%). Na segunda etapa, as variáveis com efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) de cada tipo de extração foram submetidas ao Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^2$  (quatro pontos axiais, três repetições no ponto central), totalizando 11 ensaios. As variáveis dependentes, resposta experimental e predita, foram expressas em  $\text{g.100 mL}^{-1}$  de extrato  $\pm$  desvio padrão médio. Os efeitos foram validados pela Análise de Variância, por meio do *software* Statistica 8.0, sendo considerada a melhor condição de extração aquela com maior teor proteico e desta, obtido o concentrado. O teor de proteína bruta foi determinado por Kjeldahl e multiplicado por 5,95, e o rendimento, razão do conteúdo total da proteína no farelo de arroz pelo encontrado no CPFA. A cor do concentrado extraído por agitação e por ultrassom foi verificada por colorimetria instrumental e deste último método de extração, determinou-se a composição centesimal (%), minerais ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), proteínas solúveis (%), capacidade de absorção de água e óleo ( $\text{g de água.g}^{-1}$  de amostra;  $\text{g de óleo.g}^{-1}$  de amostra), capacidade de formação de espuma (%), estabilidade da espuma (%), capacidade emulsificante (%), estabilidade da emulsão (%) e capacidade de formar gel, perfil de aminoácidos ( $\text{g.100 g}^{-1}$ ). A aplicabilidade foi verificada por avaliação sensorial de suco de caju (ordenação por preferência e aceitabilidade dos atributos: sabor, cor, aroma e impressão global).

**PRINCIPAIS RESULTADOS** — A resposta ótima na extração alcalina com acompanhamento de agitação foi do teor de proteína de 48,53 % (b.s.), em pH 10, velocidade de agitação de 80 rpm, tempo de agitação de 300 min e temperatura de 45 °C, representando o rendimento de 34,51% na extração. A interação entre as variáveis independentes pH, tempo de agitação e temperatura promoveram efeitos

favoráveis para a técnica de extração das proteínas, enquanto que a velocidade de agitação não interfere de modo significativo. O planejamento experimental utilizado foi adequado para estudar os efeitos da associação da agitação mecânica ao processo de extração alcalina das proteínas do farelo de arroz. Nessas condições, o CPFA obtido apresentou forma de pó fino e textura aveludada, com valores de  $L^*$  de  $78,29 \pm 0,95$ ,  $a^*$   $-4,97 \pm 0,05$  e  $b^*$   $16,51 \pm 0,10$  para a medida instrumental de cor. Quando se avaliou a extração alcalina associada ao banho ultrassônico, comparou-se o desempenho das frequências de 37 e 80 kHz, comprovou-se que na menor frequência houve maior extração. No ensaio com maior rendimento obteve-se um concentrado proteico com teor de proteína de 83,36% (b.s.), quando utilizado o pH 10, 30 min de ultrassom, 100% de amplitude da potência (30°C) representando um rendimento de 4,74 % na extração. Portanto, a extração assistida por ultrassom pode ser utilizada como um método alternativo para extrair proteínas do farelo de arroz, reduzindo o tempo de extração e consumindo menos energia. A EAU é uma técnica promissora e avançada para a extração de substâncias de interesse alimentar, oferecendo potencial para o desenvolvimento de novos produtos. O CPFA apresentou-se na forma cristalina com valores de  $L^*$  de  $60,42 \pm 2,15$ ,  $a^*$   $-1,31 \pm 0,53$  e  $b^*$   $20,29 \pm 1,39$  para a medida instrumental de cor, observou-se menor solubilidade em pH 2, 3, 4 e 5, e maior solubilidade na faixa de pH 6 a 10. A capacidade de absorção de água e de óleo de  $1,04 \pm 0,07 \text{ g.g}^{-1}$ , e  $11,75 \pm 0,67 \text{ g.g}^{-1}$ , respectivamente, superior ao da referência Albumina Bovina Sérica (BSA). A maior quantidade de espuma formada ocorreu em pH 4 e 8 ( $41,17\% \pm 2,30$ ;  $48,47\% \pm 1,15$ ) e menor em pH 6 ( $9,96\% \pm 0,00$ ), porém a estabilidade das espumas formadas foi baixa em todos os pHs, e em ambos os casos, a BSA apresentou característica espumante superior. CPFA apresentou boa capacidade emulsificante em pH 2, 4, 6 e 8 ( $56,20\% \pm 5,39$ ;  $66,19\% \pm 6,57$ ;  $67,86\% \pm 0,19$ ;  $72,92\% \pm 2,95$ ) comparáveis a BSA, mas emulsões menos estáveis em pH 2 ( $32,50\% \pm 3,54$ ). Em temperatura de 30 °C e 8 °C, o CPFA apresentou baixa capacidade geleificante, com um gel frágil e pouco consistente. O perfil de aminoácidos do CPFA indicou a presença de ácido glutâmico, glicina, histidina, arginina, treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina e lisina, essenciais para a síntese das proteínas. O desempenho sensorial do CPFA foi avaliado em formulações de suco de caju adoçado contendo 0,1%; 0,3% e 0,5% de CPFA e ordenadas de acordo com a preferência de 60 provadores não treinados. Constatou-se que não houve diferença significativa entre as amostras ( $p > 0,05$ ). Em função deste resultado, um teste de aceitação foi aplicado a 64 provadores não treinados, utilizando uma fórmula de suco de caju adoçado adicionada de 0,5% de CPFA e a Controle (sem CPFA). Verificou-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras nos atributos cor, sabor, aroma e impressão global. Os provadores gostaram moderadamente do Controle, mas foram indiferentes a fórmula com 0,5% de CPFA, uma vez que acentuou as características sensoriais do arroz ao suco de caju. O CPFA apresentou excelentes propriedades funcionais que o tornam um ingrediente promissor para a indústria alimentícia.

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por cinco (5) artigos científicos, a citar:

1. Sílvia BERNARDI; Eliane COLLA; Cristiane CANAN. Extração de proteínas assistida por ultrassom – Revisão.
2. Sílvia Bernardi, Marines Paula Corso, Cleonice Pereira Mendes Sarmento, Eliane Colla, Cristiane Canan. Obtaining Rice Bran Protein Concentrate by Alkaline Extraction and Stirring. Artigo científico submetido à revista *Food Research International* em 21 de junho de 2015.
3. Sílvia BERNARDI; Eliane COLLA; Cristiane CANAN. Extração assistida por ultrassom de proteínas do farelo do arroz para obtenção de concentrado.
4. Sílvia BERNARDI; Eliane COLLA; Cristiane CANAN. Propriedades funcionais do concentrado proteico de farelo de arroz obtido por extração assistida por ultrassom.
5. Sílvia BERNARDI; Eliane COLLA; Cristiane CANAN. Qualidade nutricional do concentrado proteico de farelo de arroz obtido por extração assistida por ultrassom e sua aplicação em suco de caju.

# ARTIGO CIENTÍFICO 1

## EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSISTIDA POR ULTRASSOM – REVISÃO

Sílvia BERNARDI<sup>1</sup>, Eliane COLLA<sup>2</sup>, Cristiane CANAN<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Núcleo de Alimentos. Avenida Brasil, 4232, 85884-000 – Medianeira, Paraná, Brasil.

### RESUMO

A extração assistida por ultrassom (EAU) utiliza frequências acima de 20 kHz para gerar cavitação em meios líquidos, que nada mais é que o colapso de microbolhas de gás e vapor que ocorre quando as mudanças de pressão no meio são grandes o suficiente, para literalmente dilacerá-lo sob a influência do ultrassom. A existência de cavitação facilita a interação de solvente com material sólido, extraindo compostos como proteínas com maior rendimento em tempos e temperaturas reduzidas, podendo modificar positivamente propriedades dos compostos extraídos como hidrofobicidade e propriedades reológicas. A EAU é um processo com grande potencial de aplicações na indústria de alimentos.

Palavras chaves: Cavitação, Microbolhas, Rompimento celular.

## 1 INTRODUÇÃO

A tecnologia em alimentos tem como diretriz melhorar os processos produtivos, torná-los mais eficazes e seguros, de modo que o produto final apresente o máximo de qualidade. E isto deve ser feito pelo uso de tecnologias limpas e aplicáveis (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

Usando esse conceito aos processos de extração de substâncias alimentícias, nota-se a necessidade de pesquisar tecnologias que tragam novos benefícios (PATIST; BATES, 2008; PATIST; BATES, 2011). A extração tem por objetivo selecionar e separar uma determinada substância do seu meio original. Técnicas contemporâneas que utilizam ultrassom, micro-ondas, fluido supercrítico, entre outros, estão sendo cada vez mais avaliadas, com a finalidade

de encontrar procedimentos seguros que melhorem o rendimento e seletividade do processo de extração, mantendo ao máximo as propriedades funcionais da substância extraída.

O ultrassom é uma tecnologia limpa e consideravelmente nova em alimentos. Nos últimos 100 anos, sua aplicação esteve concentrada principalmente nas áreas naval, médica e química. A Extração Assistida por Ultrassom (EAU) para diferentes materiais de origem vegetal tem sido estudada desde 1950 e apenas recentemente surgiram pesquisas aprofundadas relacionando seu uso na ciência dos alimentos (VILKHU et al., 2011).

Estudos que comprovem as vantagens da aplicação do ultrassom e seus efeitos na extração, preservação e processamento de substâncias de interesse alimentar, bem como as técnicas e precauções necessárias quanto ao uso seguro (PATIST; BATES, 2008; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011), seus efeitos sob os microrganismos em alimentos (GAO et al., 2014a; GAO et al., 2014b), esterilização de alimentos (PIYASENA; MOHAREB; MCKELLAR, 2003), na sonocristalização de gorduras (MARTINI, 2013) e no amaciamento de carnes (DOLATOWSKI; STASIAK; LATOCH, 2000; JAYASOORIYA et al., 2007; ALVES et al., 2013) devem continuar sendo alvo de estudos.

Os estudos são principalmente direcionados a matérias primas de origem vegetal devido ao maior interesse na purificação e isolamento destas substâncias, sem que ocorram efeitos prejudiciais no processo de extração. Poucos ainda são os estudos em tecidos animais. Outras vantagens da EAU incluem redução do tempo de extração, de energia, de volume de solvente, obtenção de uma mistura mais homogênea, maior transferência de energia, redução de gradientes de temperatura, extração seletiva, redução do tamanho de equipamentos, resposta mais rápida e controle do processo (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

## **2 FUNDAMENTOS DO ULTRASSOM**

A faixa normal da audição humana está entre 20 Hz e aproximadamente 20 kHz (ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011). Uma onda acústica (som) é uma propagação de oscilação de pressão em meio, tal como ar ou água líquida com a velocidade do som. O ultrassom é um som inaudível e sua frequência de oscilação de pressão é superior a 20 kHz (20.000 oscilações por segundo) (YASUI, 2011). O limite superior da frequência de ultrassons é de aproximadamente 5 MHz para os gases e 500 MHz para líquidos e sólidos

(SWAMY; NARAYANA, 2001). O ultrassom pode ser útil no processamento de alimentos porque quando aplicado em baixas frequências (acima de 20 kHz), induzem a cavitação (POVEY; MASON, 1998; SORIA; VILLAMIEL, 2010).

Na prática, os núcleos das bolhas já presentes no líquido crescem, e a interface entre líquido e as bolhas de cavitação aumentam acentuadamente (MARGULIS, 1995). O método eficiente de produção de cavidade é o principal critério para diferenciar os tipos de cavitação, sendo os principais: acústica, hidrodinâmico, ótico e de partícula (GOGATE, 2011).

Dos quatro principais tipos de cavitação, apenas o acústico e hidrodinâmico geram a intensidade desejada e adequada para o processamento químico ou físico. No caso dos reatores ou equipamentos cavitacionais, dois aspectos da dinâmica da cavidade são de primordial importância: o tamanho máximo atingido pela cavidade antes do colapso violento, o qual determina a magnitude do impulso de pressão/temperatura produzido no colapso e consequentemente na intensidade da cavitação que pode ser obtida no sistema, e o tempo de vida da cavidade, que determina a distância percorrida pela cavidade antes do colapso a partir do ponto em que é gerada. Nesta revisão, o interesse é na cavitação acústica, na qual as variações de pressão no líquido são efetuadas usando as ondas de som chamadas de ultrassons (16 kHz a 100 MHz). As alterações químicas ocasionadas pela indução da cavitação pela passagem de ondas de som são comumente conhecidas como sonoquímica (GOGATE, 2011).

É muito mais fácil gerar uma onda acústica de alta amplitude (alta pressão acústica) em frequências mais baixas. Em frequências mais altas ( $> 1$  MHz), as pressões acústicas são mais baixas e esta amplitude é mais facilmente dissipada dentro do fluido (ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011). Quando a amplitude de uma onda de pressão acústica no líquido ou sólido excede a pressão atmosférica, a pressão instantânea torna-se negativa durante a fase de rarefação de uma onda acústica. Nesse momento, bolhas são geradas porque o gás tal como ar dissolvido no líquido já não pode ser dissolvido nesse meio em pressão negativa, ocasionando o colapso das bolhas. Uma bolha gerada expande durante a fase de rarefação e cai durante a fase de compressão (YASUI, 2011).

Por definição física, a cavitação é a ruptura de um líquido em que pressões negativas são nele produzidos. Em gases, como o ar, que são fluidos compressíveis, o movimento do fluido nos padrões de fluxo contínuo é sempre suficiente para acomodar variações de pressão. No entanto, a maioria dos líquidos são inelásticos e incompressíveis e, portanto, não se comportam da mesma maneira que os gases (ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011).

Durante cada fase de “alongamento” (rarefação), se a pressão negativa for forte o suficiente para superar as forças intermoleculares de ligação, um meio fluido pode ser dilacerado e produzir pequenas cavidades (microbolhas). Em sucessivos ciclos, essas cavidades podem crescer até entrar em violento colapso e liberar grandes quantidades de energia (alta temperatura e pressão) (Figura 01) (MASON, 2009; ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011).

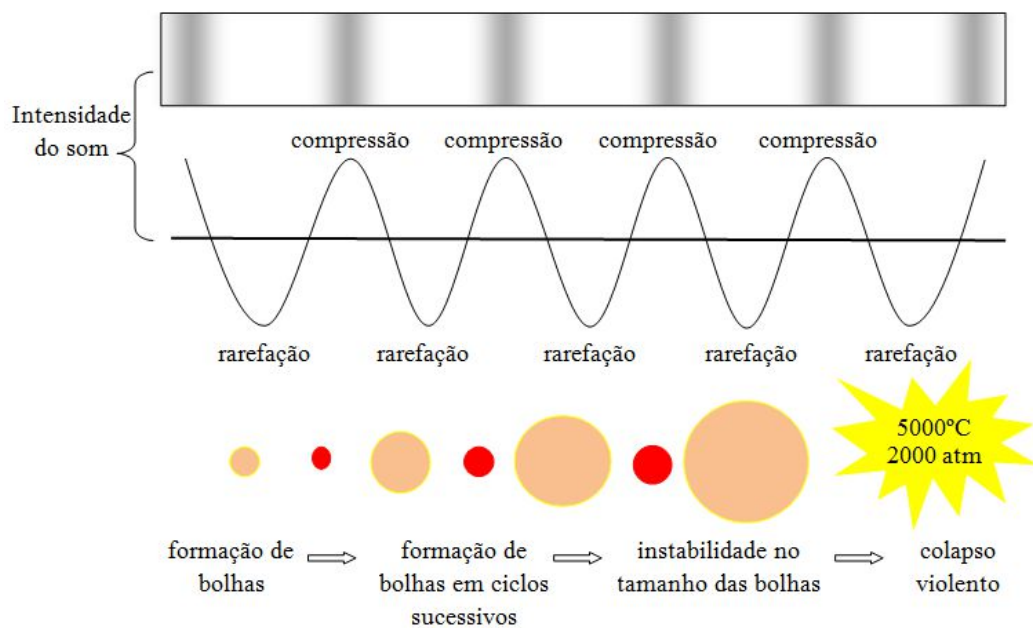


Figura 01 - Esquema da geração e colapso de uma bolha de cavitação acústica (MASON, 2009).

A teoria sugere que a variação da pressão acústica necessária para a formação das microbolhas é muito grande, até 3000 MPa. No entanto, na prática, as microbolhas formam-se a pressões acústicas relativamente suaves. Acredita-se que isso se deve ao fato de que qualquer líquido já contenha cavidades de gás ou nanobolhas que servem de núcleos auxiliares na formação das microbolhas. A existência destas nanobolhas somente foi comprovada recentemente, pelo menos, na interface entre água e uma superfície hidrofóbica (ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011).

A cavitação induzida por ultrassom é muito útil, pois pela formação, crescimento e colapso de microbolhas no centro de uma solução aquosa, há o rompimento celular e a transferência de massa para o meio. Em frequências de ultrassom a 20 kHz, as bolhas geradas no campo de som são relativamente grandes e seu colapso resulta em fortes ondas de choque,

que podem ser úteis em aplicações de cortes mecânicos (LEONG; ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011). Esse colapso celular é muito desejável quando se objetiva extrair substâncias de um determinado meio e o ultrassom é um sistema com potencial benefício para a extração e isolamento de componentes bioativos.

A aplicação do ultrassom dentro de uma grande faixa de frequência pode dividir-se em duas áreas: baixa potência e alta frequência ( $<1 \text{ W/cm}^2$ ; 1-10 MHz) utilizado para fins de diagnóstico; e alta potência e baixa frequência ( $10\text{--}1000 \text{ W/cm}^2$ ; 20-100 kHz) usado em reações químicas, limpeza, lixiviação, etc. (SWAMY; NARAYANA, 2001; PICÓ, 2013) podendo alterar as propriedades dos alimentos (PICÓ, 2013) pois induzem a cavitação (POVEY; MASON, 1998; SORIA; VILLAMIEL, 2010).

O desempenho da cavitação é afetado por vários fatores. Em baixas frequências (20 kHz) são produzidas bolhas de maior tamanho e quando em colapso, produzem maior energia. Em frequências mais altas, a formação de bolhas se torna cada vez mais difícil e acima de 2,5 MHz, a cavitação não ocorre (EARNSHAW, 1998). Em frequência na ordem de MHz, torna-se mais difícil a produção de bolhas de cavitação que na ordem de kHz. Aumentando a frequência, se faz necessário aumentar a intensidade do som para assegurar que as forças de coesão dos meios líquidos sejam ultrapassadas e sejam criados espaços vazios. Nessas condições, os ciclos de compressão e rarefação tornam-se tão curtos que as moléculas dos líquidos não se separam para formar espaços vazios, não obtendo a cavitação (SANTOS; LODEIRO; CAPELO-MARTÍNEZ, 2009).

A intensidade de ultrassom é proporcional ao quadrado da amplitude de vibração da fonte ultrassônica e, como tal, levará ao aumento dos efeitos sonoquímicos. Para atingir o limiar de cavitação uma intensidade mínima é necessária. Isto significa que as amplitudes mais elevadas nem sempre são necessárias para obter os resultados desejados. Além disso, altas amplitudes de ultrassons podem levar à rápida deterioração do transdutor do ultrassom, resultando em agitação do líquido em vez de cavitação e em má transmissão do ultrassom pelo meio líquido. Em meios muito viscosos, como o sangue, por exemplo, a amplitude deve ser aumentada, pois quando a viscosidade da amostra aumenta, também aumenta a sua resistência para o movimento do dispositivo de ultrassom. Conseqüentemente, elevada intensidade (alta amplitude) será necessária para que o dispositivo de ultrassom obtenha vibrações mecânicas necessárias para promover a cavitação na amostra (SANTOS; LODEIRO; CAPELO-MARTÍNEZ, 2009). Como citado anteriormente, os efeitos



sonoquímicos são diretamente proporcionais à intensidade, no entanto, a energia que um sistema de ultrassom pode ter é limitada. Em frequências mais altas, as bolhas de cavitação inicialmente são difíceis de serem criadas, mas são possíveis pelo resultado da menor duração dos ciclos de rarefação em virtude do tempo, temperatura e pressão em colapso, sendo mutuamente dependentes. No entanto, a intensidade ultrassônica não pode ser aumentada indefinidamente. À medida que a amplitude da pressão é aumentada, as bolhas podem crescer tanto em rarefação que o tempo disponível para o colapso será inadequado (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO CAPOTE, 2007).

Os solventes utilizados com as amostras submetidas à cavitação devem ser cuidadosamente escolhidos. A água é o mais comum, mas dependendo do propósito, solventes orgânicos podem ser usados. Os viscosos e com tensão superficial dificultam a cavitação (SANTOS; LODEIRO; CAPELO-MARTÍNEZ, 2009). A escolha do solvente deve ser baseada na alta afinidade molecular entre solvente e soluto (VILKHU et al., 2011).

Em produtos altamente viscosos, a propagação do ultrassom é facilmente rompida, reduzindo o efeito da cavitação. Ultrassom em baixas frequências e alta potência penetra melhor em produtos viscosos do que ultrassom de alta frequência, que se propaga mais facilmente dentro de um líquido viscoso e efetivamente reduz o nível de ultrassom recebido. Maneiras de superar os efeitos da viscosidade é o uso de maior intensidade e menor frequência de ultrassom. (EARNSHAW, 1998).

A pressão atmosférica é a mais utilizada nos experimentos com ultrassom, mas se a pressão externa for aumentada, maior energia de ultrassom será necessária para induzir a cavitação, ocasionando aumento na intensidade do colapso das bolhas (SANTOS; LODEIRO; CAPELO-MARTÍNEZ, 2009).

Quanto à temperatura, de um lado a aplicação de altas temperaturas contribuem para perturbar as fortes interações entre soluto e matriz, que envolvem forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio e atrações dipolo entre as moléculas de soluto e sítios ativos da matriz. Além disso, em temperaturas mais altas, as taxas de difusão ocorrem mais rapidamente. Por outro lado, a cavitação tem melhor resultado em temperaturas mais baixas, uma vez que a temperatura do solvente não se eleva como a sua pressão de vapor. Em temperaturas elevadas, mais vapor do solvente enche as bolhas de cavitação que em seguida, entram em colapso menos violentamente, ocasionando efeitos menos intensos que o esperado (SANTOS; LODEIRO; CAPELO-MARTÍNEZ, 2009).

A forma de aplicação do ultrassom também influencia no desempenho da cavitação. Pode ser diretamente na amostra ou indiretamente através das paredes do recipiente da amostra (Figura 2 e 3). A aplicação direta ocorre por meio de sondas imersas na amostra. Esta abordagem tem algumas desvantagens como, por exemplo, a contaminação da amostra com metais despreendidos da sonda/*probe* e a perda de elementos voláteis onde a aplicação da sonda ocorreu em processo aberto sem a devida proteção da amostra (SANTOS; LODEIRO; CAPELO-MARTÍNEZ, 2009). Por outro lado, quando a sonda de ultrassom é utilizada, devido a sua ação direta há maior intensidade cavitacional (JAMBRAK et al., 2014). Na aplicação indireta são usados banho de ultrassons, onde a onda ultrassônica primeiramente atravessa o líquido contido no interior do equipamento para posteriormente, atravessar a parede do recipiente da amostra. Portanto, a intensidade do ultrassom no interior do recipiente da amostra é menor do que o esperado. Sua desvantagem é que os banhos não são dispositivos tão poderosos e suas aplicações ficam limitadas pela falta de intensidade ultrassônica (SANTOS; LODEIRO; CAPELO-MARTÍNEZ, 2009). Quando utilizado o banho de ultrassom há o efeito de turbulência, tensão de cisalhamento e cavitação (JAMBRAK et al., 2014).

Um dos parâmetros básicos em engenharia de ultrassons é a densidade de potência, a qual é definida como a potência elétrica fornecida ao transdutor (que transforma uma magnitude física num sinal elétrico) dividido pela área radiante da superfície do transdutor (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO CAPOTE, 2007).

Pela quantidade de energia gerada, o ultrassom é classificado em: potência do som (W); intensidade do som ( $W/m^2$ ) e intensidade da energia do som ( $W/m^3$ ) (PICÓ, 2013). A potência (W) é a energia necessária para movimentar as massas mecânicas utilizadas para criar a cavitação de líquidos a uma determinada amplitude de vibração, de encontro a uma carga específica na frequência de ressonância fixa do dispositivo. A energia ultrassônica é expressa como uma fonte de energia por unidade de volume de material tratado ( $W/m^3$ ). A intensidade é uma medida da energia disponível por unidade de volume de líquido e está diretamente relacionada à amplitude. Refere-se à intensidade da potência de saída por área de superfície do sonotrodo (*probe*) ( $W/m^2$ ) (JAMBRAK et al, 2014).

Acredita-se que o estresse celular é causado pela cavitação (EARNSHAW, 1998). Os efeitos mecânicos do ultrassom proporcionam maior penetração do solvente nos materiais celulares e melhora a transferência de massa, devido aos efeitos de *microstreaming*

(GOGATE; KABADI, 2009) causado por cavitação simétrica que cria ondas de choque, que se propagam ao circundante sólido causando turbulência microscópica e/ou afinamento da película de sólido-líquido (HAGENSON; DORAISWAMY, 1998). Combinado a isto, uma vantagem adicional é o rompimento das paredes das células a fim de facilitar a libertação do conteúdo biológico (GOGATE; KABADI, 2009). Importantes vantagens deste método são a redução do tempo e aumento do rendimento de extração, preservando moléculas sensíveis ao calor (BETANCOURT; 2008).

A extração assistida por ultrassom (EAU) é um método eficiente e confiável, e de modo geral, sua utilização promove bons resultados na extração porque fornece um contato eficiente entre a matriz sólida e o solvente; reduz o tempo de extração e o volume de solvente; as amostras podem ser de vários tamanhos; várias extrações podem ser realizadas simultaneamente; é uma técnica reprodutível e eficaz (RIAL-OTERO, 2009).

Pouco se conhece ainda sobre suas desvantagens, mas sabe-se que existe uma degradação sonoquímica, resultante da cavitação, onde temperaturas e pressões extremas podem ser desenvolvidas dentro das bolhas durante seu colapso e com isso, operaram como micro reatores (RIAL-OTERO, 2009). Nesse momento é possível a geração de radicais  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}^+$  no meio líquido e possibilitando o seu acúmulo na superfície da bolha de cavitação, podendo ser responsável por iniciar a formação de produtos de degradação que podem desencadear reações em cadeia e provocar defeitos de qualidade nos produtos, como ausência de aromas, modificações da estrutura, radicais livres e sabor metálico. Pesquisas indicam que a mudança de cor é uma das modificações mais estudadas, juntamente com atividade antioxidante, físico-química e comportamento funcional. Alimentos com elevado teor de gorduras e submetidos a EAU mostraram alterações em suas características organolépticas e instabilidade oxidativa (PINGRET; FABIANO-TIXIER; CHEMAT, 2013).

O desempenho da EAU é influenciado pela quantidade da amostra, tamanho das partículas da amostra, solvente da extração, pH da solução a ser extraída, volume do solvente, potência sônica, frequência, tempo e temperatura da extração, aplicação direta (Figura 2) ou indireta do ultrassom (Figura 3) na amostra (RIAL-OTERO, 2009).

O ultrassom induz a mudanças estruturais nas proteínas associadas à clivagem parcial das interações hidrofóbicas intermoleculares, ao invés de ligações peptídicas e com pontes dissulfetos. Quando as partículas proteicas são submetidas a tensão de corte, ocorre o aumento da velocidade de agregação, devido a maior colisão das moléculas. A sonicação não tem

influência sobre a carga superficial das partículas, mas cria uma nova superfície ao reduzir o tamanho e aumentando a área superficial das partículas, devido as forças de cavitação, que inclui a destruição dos aglomerados moleculares, violando as forças de Van der Waals (JAMBRAK et al., 2014).



Figura 02 – Ultrassom por sonda ou *probe* (direta)



Figura 03 – Ultrassom por banho (indireta)

### 3 **PROTEÍNAS DE INTERESSE ALIMENTAR EXTRAÍDAS POR ULTRASSOM**

Concentrados e isolados proteicos tem ampla aplicação na indústria alimentícia. Com isso, nos últimos anos, estudos utilizando o ultrassom com o objetivo de melhorar as condições de obtenção, rendimento e características reológicas destes ingredientes tem sido realizados (Tabela 01).

Tabela 01 – Ultrassom aplicado na tecnologia de alimentos proteicos

| <b>Analito</b>                                       | <b>Aplicação do ultrassom</b>                                                                                  | <b>Resultado</b>                                                                                                                                             | <b>Referência</b>             |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Proteína do soro de leite                            | Por sonda - 20 kHz, por 15 e 30 min.<br>Por banho - 40 kHz e 500 kHz, por 15 e 30 min.                         | Melhor desempenho da solubilidade e capacidade de formação de espuma das proteínas de soro, a 20 kHz e 15 min                                                | Jambrak et al. (2008)         |
| Proteína de soja                                     | Por sonda – 20 kHz                                                                                             | Redução do tamanho das partículas da soja pelo efeito da cavitação. Aumento da solubilidade da proteína                                                      | Jambrak et al. (2009)         |
| Proteína de gérmen de trigo                          | Por sonda – Potência: 363 W – pulso 2,4 s: 2 s / 24 min                                                        | Aumento no rendimento de 37% para 57%                                                                                                                        | Zhu et al. (2009)             |
| Proteína de flocos de soja                           | Por banho com temperatura controlada – amplitude: 84 $\mu\text{m}_{pp}$ por 120 s                              | Aumento em 50% em açúcares e 46% em proteínas                                                                                                                | Karki et al. (2010)           |
| Proteína de gérmen de trigo                          | Sonda – 20 kHz, 20 min, 50 $\pm$ 5°C, em potências de 0 W, 900 W, 1200 W, 1500 W e 1800 W                      | Facilitar a hidrólise enzimática                                                                                                                             | Jia et al. (2010)             |
| Proteína de clara de ovo                             | Por sonda - Potência de 750 W - frequência de 20 kHz - amplitude de 20%                                        | Aumento da hidrofobicidade da superfície proteica, na rapidez da agregação térmica. Redução na viscosidade e capacidade de formação e estabilidade da espuma | Arzeni; Pérez; Pilosof (2012) |
| Proteína do soro de leite                            | Por sonda - 20 kHz, amplitude de 50%, por 1, 5, 10, 20, 30 e 60 min, 10 °C                                     | Alteração na hidrofobicidade proteica e exposição do grupo tiol                                                                                              | Chandrapala et al. (2012)     |
| Soro de leite                                        | Por sonda                                                                                                      | Redução; na turbidez, sem degradação das proteínas                                                                                                           | Martini; Potter; Walsh (2010) |
| Isolado e concentrado de soro de leite               | Por sonda - 20 kHz/ 15 ou 30 min. Por banho - 40 kHz/15 ou 30 min                                              | Menor frequência provocou maior redução do peso molecular da proteína. Maior frequência promoveu mudanças significativas no peso molecular                   | Jambrak et al. (2014)         |
| Isolado proteico de feijão preto                     | Por sonda - Frequência (20 kHz) – potências: 150, 300, 450 W /12 ou 24 min                                     | Mudança no comportamento das estruturas secundárias e terciárias da proteína                                                                                 | Jiang et al. (2014)           |
| Isolado proteico de amendoim                         | Potência superior a 120 W                                                                                      | Redução em 53,88% no tamanho da partícula                                                                                                                    | Zhang et al. (2014)           |
| $\beta$ -conglícinina (7S) e glicínina (11S) da soja | 20 kHz/400 W - tempo 5, 20 ou 40 min                                                                           | Aumento da hidrofobicidade superficial, solubilidade, capacidade e estabilidade emulsificante                                                                | Hu et al. (2015)              |
| Aminoácidos em uvas                                  | Por sonda - 200 W, 24 kHz – 10 a 70°C, amplitude de saída do transdutor (30-70%), ciclo (0,2-0,7 s) e pH 2 a 7 | Método reprodutível e quantitativo de extração de aminoácidos de uvas                                                                                        | Carrera et al.(2015)          |

O uso do ultrassom na obtenção e seu efeito nas propriedades reológicas de concentrados e isolados proteicos de soja foi avaliado por Jambrak et al. (2009). Os principais componentes das proteínas da soja são a  $\beta$ -conglícinina e a glicina, que representam 65-80% das proteínas totais do grão. Durante a extração das proteínas, diferentes frações são separadas por centrifugação, as quais são classificadas como 2S, 7S, 11S e 15S. Cada fração apresenta características específicas de solubilidade, gelificação, emulsificação, dispersibilidade e viscosidade. Neste estudo, Jambrak et al. (2009) observaram a redução do tamanho das partículas da soja devido ao efeito da cavitação promovido pelo ultrassom, conseqüente houve aumento da área superficial de contato da fase sólida (proteína de soja) com a fase líquida (água), promovendo o aumento da solubilidade do concentrado e isolado proteico de soja quando comparado a mesma amostra não submetida ao ultrassom. A principal razão para o aumento da solubilidade destas proteínas se deveu ao grande número de bolhas de cavitação produzidas e ao aumento da temperatura e pressão ao redor das bolhas que levam ao colapso

da mesma, e ao desdobramento das proteínas e quebra de ligações peptídicas por hidrólise. A alta intensidade do ultrassom (sonda com 20 kHz) aumentou a solubilidade da proteína por alterar a conformação da cadeia proteica de modo que os resíduos de aminoácidos hidrofílicos permaneçam orientados para a água, levando a diminuição do peso molecular das proteínas, e maior recobrimento das moléculas proteicas pela água.

Hu et al. (2015) ao tratarem isolado proteico de soja com ultrassom também observaram aumento da solubilidade, e atribuíram ao desdobramento parcial e redução de interações intermoleculares, através do aumento dos grupos sulfidrilas livres e aumento da hidrofobicidade superficial, o que conduziu a uma melhor solubilidade e caráter fluido (viscoso) das soluções de isolado proteico de soja, enquanto que dispersões de isolado proteico de soja não tratados com ultrassom, formaram uma solução mais elástica (natureza sólida).

Em relação à textura, Jambrak et al. (2009) observaram alterações na condutividade, aumento da capacidade emulsificante e suspensões com maior consistência nas amostras de isolado e concentrados proteicos de soja. Porém, não observaram melhoria na capacidade de formação de espuma. Os produtos finais obtidos do concentrado proteico de soja após o tratamento com ultrassom (20 kHz / 15 min ou 40 kHz, 15 min) resultaram em gel, e a proteína isolada de soja após tratamento com ultrassom (20 kHz / 15 min) formou um creme. Estas características podem ser muito úteis na elaboração de alimentos, como pastas, molhos e cremes.

Zhu et al. (2009) extraíram proteína de germen de trigo utilizando ultrassom por sonda e verificaram o aumento no rendimento de 37% para 57%. As condições empregadas foram frequência 20 kHz, aplicando potência de saída do ultrassom de 363 W, modo de pulso 2,4 s: 2 s, durante 24 min. O uso do ultrassom para aumentar o rendimento da extração foi também avaliado por Karki et al. (2010) para proteínas de soja simultaneamente à extração de açúcares a partir de flocos de soja desengordurados. Os flocos desengordurados de soja foram dispersos em água e submetidos a uma câmara de ultrassom em aço inoxidável e encamisada para controle de temperatura com circulação de água (4 °C). Foram usadas as amplitudes do ultrassom: 0, 21, 42, 63 e 84  $\mu\text{m}_{pp}$  (pico-a-pico) e as respectivas potências foram 0,30, 0,87, 1,53 e 2,56  $\text{W}\cdot\text{mL}^{-1}$ , designadas como muito baixa, baixa, média e alta amplitude, respectivamente. Os autores observaram ruptura estrutural nos flocos de soja e diminuição do tamanho das partículas, de aproximadamente 10 vezes nas amostras submetidas a grandes

amplitudes. A sonicação na maior amplitude durante 120 s foi responsável pelo maior rendimento da extração de açúcares totais e proteínas. Ao testarem as mesmas condições de sonicação sem controle de temperatura, foi possível concluir que o calor gerado não teve nenhum efeito significativo sobre a extração de proteínas e açúcares.

Estudos posteriores realizados por Zhang et al. (2014) afirmam que altas temperaturas podem alterar o tamanho das partículas, bem como a estrutura secundária, a hidrofobicidade superficial das proteínas e afetar as propriedades emulsificantes, sendo esta última devido principalmente as temperaturas e pressões extremas que ocorrem simultaneamente durante a exposição da amostra ao ultrassom, sendo a estrutura terciária a principal responsável pelas alterações nas propriedades emulsificantes, e não as estruturas secundárias e primárias.

Karki et al. (2010) afirmaram que a energia de ultrassom, o tempo, o volume, propriedades do substrato e a pressão são variáveis que influenciam no processo de extração. Os autores obtiveram aumento de 46% de proteínas e 50% na extração de açúcares em relação a amostra sem sonicação e afirmaram que, o ultrassom tem potencial para melhorar a extração de proteínas e açúcares e ainda, com redução do custo destes componentes, podendo ser utilizado em plantas industriais.

Martini; Potter; Walsh (2010) avaliaram o uso de ultrassom (sonda) em suspensões de soro de leite (teor de sólido entre 7 e 28% e teor de proteínas entre 13 e 36%) e observaram a diminuição da turbidez em todas as amostras e ainda, afirmaram que não houve degradação das proteínas como consequência do ultrassom.

Estudos anteriores realizados por Jambrak et al. (2008) também demonstraram que o ultrassom pode alterar significativamente as propriedades estruturais das proteínas do soro do leite. Utilizando ultrassom a frequência 20 kHz, 40 kHz e 500 kHz, estes autores avaliaram o comportamento funcional de amostras de isolado proteico de soro de leite; concentrado de proteína de soro de leite; hidrolisado de proteína de soro de leite tratados com sonda de ultrassom (20 kHz, por 15 e 30 min) e banhos de ultrassom (40 kHz e 500 kHz, por 15 e 30 min). A intensidade de 20 kHz teve efeito superior a 40 kHz na solubilidade e na capacidade de formação de espuma das proteínas de soro de leite. A 500 kHz não houve efeito significativo sobre a capacidade espumante, mas afetou a solubilidade e condutividade. Com 15 min de tratamento, os resultados obtidos foram melhores que em 30 min.

Avaliando o efeito do ultrassom na estrutura das proteínas, Jambrak et al. (2014) estudaram dois tipos de ultrassom (sonda, 20 kHz/ 15 ou 30 min e banho, 40 kHz/15 ou 30 min) sobre o tamanho e peso molecular das proteínas de isolados e concentrados de soro de leite. Para o preparo das amostras, suspensões do isolado e do concentrado proteico de soro de leite a 10% em água foram elaboradas, e posteriormente submetidas aos tratamentos com ultrassom. Os pesquisadores observaram que no tratamento com sonda a 20 kHz, houve diminuição significativa no peso molecular e na distância entre as partículas proteicas e, perceberam o aumento da superfície específica livre. O tratamento com sonda de 20 kHz por 15 min foi mais eficaz em termos de redução de peso molecular quando comparado aos demais tratamentos. O banho ultrassônico a 40 kHz acarretou mudanças significativas no peso molecular das frações proteicas, mas não houve maior proximidade das partículas. O tratamento prolongado das proteínas do soro de leite com banho ultrassônico a 40 kHz induziu a formação de agregados moleculares.

Redução do tamanho das partículas proteicas após tratamento com ultrassom também foi observado por Zhang et al. (2014) ao compararem a proteína nativa e a proteína sonificada do isolado proteico de amendoim. O tamanho médio de partícula também diminuiu significativamente de 474,7 nm para 255,8 nm quando aplicada energia de ultrassom superior a 120 W. Jambrak et al. (2014) afirmaram que intensidades de ultrassom inferiores a 1 W/cm<sup>2</sup> são incapazes de provocar alterações químicas e físicas nas propriedades do material pelo qual a onda passa.

Hu et al. (2015) avaliaram o efeito do ultrassom de alta intensidade (20 kHz a 400 W durante 5, 20 ou 40 min) sobre as frações  $\beta$ -conglucina (7S) e glicina (11S) da soja. Observaram diminuição da turvação e tamanho das partículas da fração 7S em tampão Tris-HCl 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, a qual apresentou ainda, aumento da hidrofobicidade superficial, solubilidade, capacidade e estabilidade emulsificante. Da mesma forma, a fração 11 S apresentou tais características, porém com mudanças mínimas no tamanho da partícula e na estabilidade emulsificante quando comparada a fração 7S e a amostra sem tratamento com ultrassom. Estas características podem ser atribuídas a maior agregação da fração 11S no tampão estudado. Por outro lado, os efeitos do ultrassom sobre as propriedades emulsificantes da fração 7S poderiam ser devido a dissociação parcial de seus agregados proteicos.

Alterações nas propriedades emulsificantes da proteína isolada de amendoim tratada por ultrassom foi verificada, e as causas estão relacionada às temperaturas e pressões



extremas que ocorrem instantaneamente durante o processo, que podem alterar o tamanho de partícula, estrutura secundária e superfície hidrofóbica das proteínas, que se desdobram pela interrupção de interações hidrofóbicas e a formação de ligações dissulfetos (ZHANG et al., 2014). As proteínas desnaturadas expõem os grupos hidrofóbicos, que geralmente levam a agregação de proteínas. Portanto, há um equilíbrio entre a agregação e a exposição de grupos hidrofóbicos (SORIA; VILLAMIEL, 2010).

Jiang et al. (2014) verificaram que suspensões de isolado proteico de feijão preto submetidas a baixa frequência (20 kHz) em diferentes potências (150, 300 e 450 W) e tempos (12 ou 24 min), resultaram em proteínas com mudanças estruturais e físicas. Não foram observadas mudanças no perfil eletroforético das proteínas (SDS-PAGE), mas análises de espectroscopia de dicroísmo circular e espectro-fluorescência revelaram que a indução ultrassônica mudou as estruturas secundárias e terciárias da proteína. Concluíram que variando as condições de potência, as proteínas comportam-se de modo diferente: em baixa potência ultrassônica, aumentou a destruição das interações hidrofóbicas internas das moléculas de proteína e acelerou seu movimento molecular, resultando em associação das proteínas; pelas forças da cavitação em média potência, os aglomerados instáveis de proteínas foram violentamente divididos em pequenos agregados solúveis; quando tratadas com alta potência, ocorreu repolimerização de agregados através de interações não covalentes. A hidrofobicidade e a solubilidade da proteína aumentaram após o tratamento com ultrassom, principalmente em média potência.

Mudanças na hidrofobicidade também foram observadas no estudo de Chandrapala et al. (2012). As estruturas secundárias e terciárias de amostras de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) e  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA) puras e misturadas, nas condições testadas no experimento (sonda, frequência de 20 kHz, amplitude de 50%, por 1, 5, 10, 20, 30 e 60 min, 10 °C), apresentaram exposição do grupo tiol e das regiões hidrofóbicas do  $\beta$ -LG puro, mas com um mínimo de interferência na estrutura da proteína. Por outro lado, o  $\alpha$ -LA parece ter a hidrofobicidade da superfície proteica mais afetada. Nas misturas das duas proteínas, o tiol exposto do  $\beta$ -LG foi capaz de interagir com a ligação de dissulfeto de  $\alpha$ -LA conduzindo a uma diminuição na hidrofobicidade e ao aumento no tamanho da partícula agregada quando em níveis mais elevados de sonicação. Em períodos mais curtos de tempo (até 10 min) as mudanças foram reversíveis e quando prolongadas, levaram a alterações irreversíveis.

Amostras de clara de ovo tiveram a hidrofobicidade da superfície proteica aumentada após tratamento ultrassônico por sonda (frequência de 20 kHz, potência de 750 W e amplitude de 20%), além de agregação térmica mais rápida. Considerando que as proteínas da clara de ovo possuem múltiplas propriedades funcionais, observou-se que o tratamento com ultrassom aumentou a estabilidade da emulsão formada por esta proteína. O conteúdo de grupos sulfidrilas não foi afetado e não se constatou variação nos parâmetros derivados da dinâmica de gelificação ou mesmo na força do gel. Houve redução da viscosidade e consequente redução da capacidade de formação e estabilidade da espuma (ARZENI; PÉREZ; PILOSOF, 2012).

A extração de aminoácidos de uvas em mistura de etanol com água (0,25%), a temperatura (10-70 °C), amplitude de saída do transdutor (30-70%), ciclo (0,2-0,7 s) e pH do solvente (2-7) foi testada por Carrera et al. (2015), com isso foi possível desenvolver um método reprodutível e quantitativo de extração de aminoácidos de uvas, usando um curto período de tempo (6 min).

A proteína desengordurada do germe de trigo (PDGT) é um recurso proteico potencial para a preparação de peptídeos inibidores da ACE (Enzima Angiotensina I- Conversão). O trabalho avaliou os impactos do ultrassom (20 kHz, 20 min,  $50 \pm 5$  °C), em potências de 0 W, 900 W, 1200 W, 1500 W e 1800 W, durante o pré-tratamento sobre a libertação de peptídeos do PDGT e na preparação da hidrólise enzimática, concluindo que a exposição ao ultrassom promoveu a proteólise, facilitou a hidrólise enzimática e pode promover a liberação de peptídeos da PDGT, inibidores da ACE (JIA et al., 2010).

#### **4 PERSPECTIVAS**

A extração assistida por ultrassom (EAU) é uma técnica promissora para a extração de substâncias de interesse alimentar, com aumento do rendimento, menor tempo de processo e redução dos custos. Durante a cavitação acústica, bolhas são geradas até o colapso celular pela oscilação da pressão (compressão e rarefação) e pelo aumento da temperatura, sendo desejável para extrair substâncias de um determinado meio. Os estudos indicam que os resultados obtidos com essa técnica dependem de fatores como: tempo de exposição ao ultrassom, temperatura, amplitude, frequência e potência. Como uma técnica avançada,

oferece potencial para o desenvolvimento de novos produtos. Estudos mostram que o ultrassom promove mudanças na: estrutura e tamanho das proteínas, hidrofobicidade, solubilidade, textura e capacidade de emulsificação. As pesquisas relacionadas ao uso da EAU para proteínas se concentra para as proteínas de soja e lácteas e são muito escassas para proteínas de outros cereais e matrizes cárneas. Investigações são necessárias sobre os efeitos mais abrangentes causados pela EAU nas propriedades funcionais das proteínas extraídas, bem como os possíveis efeitos indesejáveis deste processo.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, L.L.; CICHOSK, A.J.; BARIN, J.S.; RAMPELOTTO, C.; DURANTE, E.C. O ultrassom no amaciamento de carnes. **Ciência Rural**, v.43, n.8, p.1522-1528, 2013.
- ARZENI, C.; PÉREZ, O.E.; PILOSOFF, A.M.R. Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v.29, p.308-316, 2012.
- ASHOKKUMAR, M.; KENTISH, S. The physical and chemical effects of ultrasound. **In: Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. Feng, H.; Barbosa-Cánovas, G. V.; Weiss, J. editores, 2011, Springer: USA, p.1-105.
- BETANCOURT, A.O. Analyse, extraction et recuperation de poly-3-hydroxybutyrate present dans la biomasse. 2008. 154 f. **Dissertação** (La Maîtrise em Chimie), Université Du Québec, Montréal, 2008.
- CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Ultrasound-assisted extraction of amino acids from grapes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.22, p.499–505, 2015.
- CHANDRAPALA, J.; ZISU, B.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. The effects of high-intensity ultrasound on the structural and functional properties of  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin and their mixtures. **Food Research International**, v. 48, p.940–943, 2012.
- CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, p.813–835, 2011.
- DOLATOWSKI, Z.; STASIAK, D.M.; LATOCH, A. Effect of ultrasound processing of meat before freezing on its texture after thawing. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. **Agricultural Engineering**, v. 3, n. 2, 2000.
- EARNSHAW, R. G. Ultrasound: a new opportunity for food preservation. **In: Ultrasound in Food Processing**. Povey, M. J. W.; Mason, T. J. 1998, Blackie Academic & Professional: London, 1.ed., p. 183-192.
- GAO, S.; LEWIS, G.D.; ASHOKKUMAR, M.; HEMAR; Y. Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 446–453, 2014a.
- GAO, S.; HEMAR; Y.; ASHOKKUMAR, M.; PATUREL, S; LEWIS, G.D. Inactivation of bacteria and yeast using high frequency ultrasound treatment. **Water Research**, v.60, p.93-104, 2014b.
- GOGATE, P.R; KABADI, A.M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.60–72, 2009.

GOGATE, P.R. Theory of cavitation and design aspects of cavitation reactors. **In: Theoretical and Experimental Sonochemistry Involving Inorganic Systems**. Pankaj, Muthupandian Ashokkumar. 2011, Springer: USA, p.31-68.

HAGENSON, L.C; DORAISWAMY, L.K. Comparison of the effects of ultrasound and mechanical agitation on a reacting solid-liquid system. **Chemical Engineering Science**, v.53, n.1, p.131-148, 1998.

HU, H.; CHEUNG, I.W.Y.; PAN, S.; LI-CHAN. E.C.Y. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of aggregated soybean  $\beta$ -conglycinin and glycinin. **Food Hydrocolloids**, v.45, p.102 -110, 2015.

KARKI, B.; LAMSAL, B.P.; VAN LEEUWEN, S.J.(H); POMETTO III, A.L.; GREWELL, D.; KHANAL, S.K. Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.270–278, 2010.

JAMBRAK, A.R.; MASON, T.J.; LELAS, L.; HERCEG, Z.; HERCEG, I.L. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p.281–287, 2008.

JAMBRAK, A.R.; LELAS; V.; MASON, T.J.; KREŠIĆ, G.; BADANJAK, M. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p.386–393, 2009.

JAMBRAK, A.R.; MASON, T.J.; LELAS, V.; PANIWNKY, L.; HERCEG, Z. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. **Journal of Food Engineering**. V.121, p.15–23, 2014.

JAYASOORIYA, S.D.; BHANDARI, B.R.; TORLEY, P.J.; D'ARCY, B.R. Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine *Semitendinosus* and *Longissimus muscles*. **Meat Science**, n. 75, p. 628-639, 2007.

JIA, J.; MA, H.; ZHAO, W.; WANG, Z.; TIAN, W.; LUO, L.; HE, R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. **Food Chemistry**, v.119, p.336–342, 2010.

JIANG, L.; WANG, J.; LI, Y.; WANG, Z.; LIANG, J.; WANG, R.; CHEN, Y.; MA, W.; QI, B.; ZHANG, M. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. **Food Research International**, v.62, p.595–601, 2014.

LEONG, T.; ASHOKKUMAR, M.; KENTISH, S. The fundamentals of power ultrasound – a review. **Acoustics Australia**, v.39, n.2, 2011.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO CAPOTE, F. **Analytical applications of ultrasound – Techniques and instrumentation in analytical chemistry**. Elsevier: Amsterdam, 2007.

MARGULIS, M. A. **Sonochemistry and cavitation**. Gordon and Breach Publishers: Amsterdam. 1995.

MARTINI, S. **Sonocrystallization of fats**. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition, DOI: 10.1007/978-1-4614-7693-1\_2, 2013.

MARTINI, S.; POTTER, R.; WALSH, M.K. Optimizing the use of power ultrasound to decrease turbidity in whey protein suspensions. **Food Research International**, v. 43, p. 2444–2451, 2010.

MASON, T.J. Sonochemistry - Beyond Synthesis. **E-Magazine**. Royal Society of Chemistry, v.46, n.5, 2009. Disponível em: <<http://www.rsc.org/Education/EiC/issues/2009Sept/Index.asp>> Acesso em 18 Nov 2014.

PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science and Emerging Thecnologies**, n.9, p. 147-154, 2008.

PATIST, A.; BATES, D. **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. Feng, H.; Barbosa-Cánovas, G. V; Weiss, J., 2011, Springer: USA, p.599-616.

PICÓ, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 43, 2013.

PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; CHEMAT, F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. **Food Control**, n.31, p.593-606, 2013.

PIYASENA, P., MOHAREB, E.; MCKELLAR, R. C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, n.3, p.207-216, 2003.

POVEY, M.J.W.; MASON, T.J. **Ultrasound in food processing**, 1.ed., Springer Science & Business Media: London, 1998.

RIAL-OTERO, R. Ultrasonic Assisted Extraction for the analysis of organic compounds by chromatographic techniques. **In: Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications**. Capelo-Martínez, J.-L. 2009, Wiley-VCH: Germany, p.55-77.

SANTOS, H.M.; LODEIRO, C.; CAPELO-MARTÍNEZ, J-L. The Power ultrasound. **In: Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications**. Capelo-Martínez, J.-L. 2009, Wiley-VCH: Germany, p.1-15.

SORIA, A.C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, p.323-331, 2010.

SWAMY, K.M.; NARAYANA, K.L. Ultrasonically assisted leaching. **In: Advances in sonochemistry**. Mason, T. J.; Tiehm, A. 2001, Elsevier Science B. V.: Amsterdam, v.6, p.141-180.

VILKHU, K.; MANASSEH, R.; MAWSON, R.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic recovery and modification of food ingredients. **In: Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. Feng, H.; Barbosa-Cánovas, G. V; Weiss, J. 2011, Springer: USA, p.1-105.

YASUI, K. Fundamentals of acoustic cavitation and sonochemistry. **In: Theoretical and Experimental Sonochemistry Involving Inorganic Systems**. Pankaj; Ashokkumar, M. 2011, Springer: USA, p.1-30.

ZHANG, Q.-T.; TU, Z.-C.; XIAO, H.; WANG, H.; HUANG, X.-Q.; LIU, G.-X.; LIU, C.-M.; SHI, Y.; FAN, L.-L.; LIN, D.-R. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate. **Food and Bioproducts Processing**. v. 92, p.30-37, 2014.

ZHU, K.-X.; SUN, X.-H.; ZHOU, H.-M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. **Journal of Cereal Science**, v.50, p.266–271, 2009.

## ARTIGO CIENTÍFICO 2

### Artigo científico submetido ao periódico Food Research International: OBTAINING RICE BRAN PROTEIN CONCENTRATE BY ALKALINE EXTRACTION AND STIRRING

#### Versão em português: OBTENÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ POR EXTRAÇÃO ALCALINA E AGITAÇÃO

Sílvia Bernardi, Marines Paula Corso, Cleonice Pereira Mendes Sarmento, Eliane Colla,  
Cristiane Canan\*

Departamento Acadêmico de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Avenida Brasil, 4232, 85884-000, Medianeira, Paraná, Brasil.

\* Correspondência para o autor: Tel.: +55 45 3240 8062; fax: +55 45 3240 8108. E-mail: [canan@utfpr.edu.br](mailto:canan@utfpr.edu.br) (C. Canan).

#### RESUMO

O farelo do arroz desengordurado possui um teor de proteínas de alto valor nutricional que corresponde a aproximadamente 15%. Nos cereais estão entre as mais nobres, porém são de difícil obtenção. Este estudo buscou estudar as condições de extração das proteínas do farelo de arroz a fim de obter um concentrado proteico do farelo de arroz (CPFA). Para isso o estudo foi dividido em duas etapas: 1) Planejamentos Fatorial Fracionário  $2^{4-1}$  (variáveis independentes:  $x_1$  (pH: 8, 9, 10),  $x_2$  (temperatura: 25, 35, 45 °C),  $x_3$  (velocidade da agitação: 80, 100, 120 rpm) e  $x_4$  (tempo de agitação: 60, 120, 180 min)), e 2) Delineamento Composto Central Rotacional  $2^2$  (variáveis independentes:  $x_1$  (temperatura: 35, 38, 45, 52, 55 °C) e  $x_2$  (tempo de agitação: 120, 146, 210, 274, 300 min)). O CPFA obtido na forma de pó fino, com textura aveludada, apresentou os valores de  $L^*$  de  $78,29 \pm 0,95$ ,  $a^*$   $-4,97 \pm 0,05$  e  $b^*$   $16,51 \pm 0,10$  para a medida instrumental de cor. O CPFA com maior teor de proteínas foi de 48,53% (b.s.), quando se usou pH 10, velocidade de agitação de 80 rpm, tempo de agitação de 300 min e temperatura de 45 °C.

Palavras chaves: subproduto, extração alcalina, metodologia de superfície de resposta.

#### 1. Introdução

Segundo a FAO (2014), a previsão global de produção de arroz safra 2014/2015 é de 744,6 milhões de toneladas (496,6 milhões toneladas, base beneficiado). Do beneficiamento do arroz resulta o farelo, que representa de 8% a 11% do peso total do grão (Parrado et al., 2006), ou seja, para este período estima-se a nível mundial a geração de 59,6 a 81,9 milhões de toneladas de farelo.

O farelo de arroz é produzido em larga escala e utilizado somente para extração de óleo e o resíduo utilizado como ingrediente para elaboração de ração (Silva, Sanches, &



Amante, 2006). Apresenta aspecto farináceo, fibroso e suave ao tato (Lakkakula et al., 2004). Constituído de pericarpo, aleurona e germe apresenta elevado teor de proteínas, em torno de 15% (Hoogenkamp, 2012), conseqüentemente, o farelo de arroz desengordurado contém teor de proteínas superior a 15% (Hamada, 2000), chegando a 17% (Gupta, Chandi, & Sogi, 2008).

As proteínas do farelo de arroz são hipoalergênicas e contém quantidades apreciáveis de lisina. Seu perfil de aminoácidos a torna ingrediente apropriado para formulações de alimentos infantis hipoalergênicos (Wang et al., 1999) e hipocolesterolêmicas (Chrastil, 1992). Suas propriedades anticancerígenas (Shoji et al., 2001) e antioxidantes (Chanput, Theerakulkait, & Nakai, 2009) também têm sido reportadas. Algumas semelhanças foram encontradas entre as seqüências de aminoácidos das globulinas de arroz com as glutelinas do trigo, mas as proteínas do arroz não contém o epítipo, porção de um antígeno que combina com os produtos de uma resposta imune específica, tóxico responsável pela doença celíaca. Este fato é de especial importância do ponto de vista nutricional (Oszwald et al., 2008). A digestibilidade da proteína do farelo de arroz é superior a 90% (Zhang et al., 2012).

O farelo de arroz antes de ser usado como um ingrediente alimentar para o consumo humano deve ser tratado para essa aplicação (Pan, Cathcart, & Wang, 2005). No arroz, a proteína está presente na forma de corpos proteicos encapsulados encontrados em todo o endosperma, que podem ser grandes ou pequenos. São insolúveis e permanecem intactos durante o cozimento (Deman, 1999).

Para estarem disponíveis para aplicação industrial, primeiramente a proteína deve ser liberada de suas células e para isso, se faz necessário o rompimento das células (Voet & Voet, 2006). Essa fase tem grande influência não só sobre o rendimento total da proteína recuperada, mas também na sua atividade biológica, na associação com outros componentes celulares, e na possível presença de degradação proteolítica e contaminantes que podem influenciar no processo posterior de purificação (Becerra et al., 2001).

A extração das proteínas do farelo de arroz por meio alcalino é muito utilizada (Gupta, Chandi, & Sogi, 2008; Hyun-Jun et al., 2009; Han, Chee, & Cho, 2015) porque a solubilidade máxima de quase todas as proteínas alimentares é em pH alcalino (Damodaran, 1996) e para auxiliar na ruptura das paredes celulares de um alimento, podem ser usados métodos mecânicos e não mecânicos (Geciova et al., 2002). Além de solventes orgânicos, muitas células vegetais precisam de ação mecânica para ser rompidas. O lisado bruto pode ser filtrado ou centrifugado para a remoção dos fragmentos celulares, ficando a proteína de interesse na solução sobrenadante (Voet & Voet, 2006). A parede celular dos vegetais é difícil de ser rompida porque é formada por conteúdo celulósico.

Nesse estudo, o objetivo foi avaliar os efeitos do pH, temperatura, velocidade da agitação e tempo de agitação na extração das proteínas, a partir do farelo de arroz desengordurado.

## **2. Metodologia**

### *2.1. Preparo da amostra*

O farelo de arroz desengordurado (FAD) fornecido pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais (IRGOVEL - Pelotas/RS) - safra 2013/2014 na forma peletizada, foi previamente moído em moinho de facas (Solab, SL 31, Tipo Willye, Brasil) com granulometria média de 70 mesh, embalado em sacos de polietileno e congelado (-20 °C) até a realização dos ensaios. Para extração das proteínas do farelo de arroz, o tradicional método

alcalino teve o acompanhamento da agitação mecânica com auxílio de um agitador ultraturrax (Fisatom, 713D, Brasil) com haste hélice-pá (Fisatom, 200.380, Brasil) para auxiliar o rompimento celular. Para cada ensaio, 60 g de FAD foram suspensos em 340 mL de água ultrapura (MS 2000, Gehaka, Brasil) e o pH corrigido (pH 21 pH/mV, Hanna Instruments, Brasil) com solução NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>. As amostras durante a agitação tiveram a temperatura controlada em banho-maria (Quimis, Brasil). As condições (pH, temperatura, tempo e velocidade de agitação) para cada ensaio estão apresentadas a seguir.

## 2.2. Planejamento experimental para determinação da melhor condição para a extração das proteínas do farelo de arroz

Na primeira etapa realizou-se o Planejamento Fatorial Fracionário (PFF) 2<sup>4-1</sup> (2 níveis, 3 repetições no ponto central) totalizando 11 ensaios, em ordem casualizada. Quatro variáveis independentes foram avaliadas: x<sub>1</sub> (pH: 8, 9, 10), x<sub>2</sub> (temperatura: 25, 35, 45 °C), x<sub>3</sub> (velocidade da agitação: 80, 100, 120 rpm) e x<sub>4</sub> (tempo de agitação: 60, 120, 180 min). As variáveis independentes e os níveis de variação foram selecionados em função de estudos preliminares e condições de extração de proteínas descritas na literatura (Gnanasambandam & Hettiarachchy, 1995; Gupta, Chandi, & Sogi, 2008; Zhang et al., 2012).

A amostra depois de submetida às condições de extração, foi centrifugada a 11979 g por 15 min (25 °C) (Cientec, CT5000R, Brasil). De cada ensaio, o sobrenadante (S<sub>1</sub>) foi coletado e determinado o teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (n=3) e multiplicou-se pelo fator 5,95 para conversão em proteínas totais (AOAC, 2005). Considerou-se a melhor condição de extração àquela com maior teor proteico (g de proteína.100 mL<sup>-1</sup> de extrato aquoso).

Após definidas as variáveis significativas para a extração proteica, foi realizado em uma segunda etapa, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> (4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central), totalizando 11 ensaios em ordem casualizada, com as variáveis x<sub>1</sub> (temperatura: 35, 38, 45, 52, 55 °C) e x<sub>2</sub> (tempo de agitação: 120, 146, 210, 274, 300 min). O pH foi fixado em 10 e a velocidade de agitação em 80 rpm. Após a extração, os 11 extratos foram submetidos a centrifugação e determinação de nitrogênio total conforme descrito anteriormente.

## 2.3 Análise estatística

Todos os experimentos dos PFF e do DCCR foram realizados de forma aleatória e os dados foram tratados com o auxílio do *software Statistica 8.0* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média (DPM) e considerado significativamente diferente quando p < 0,05. O ajuste da equação do modelo de segunda ordem foi expresso pelo coeficiente de determinação R<sup>2</sup>, e a significância estatística foi determinada pelo Teste F (análise de variância - ANOVA), sendo considerada a melhor condição de extração aquela com maior teor proteico e desta, obtido o concentrado.

O modelo de superfície de resposta obtido na segunda fase foi expresso conforme a Eq. (1).

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + e \quad (1)$$

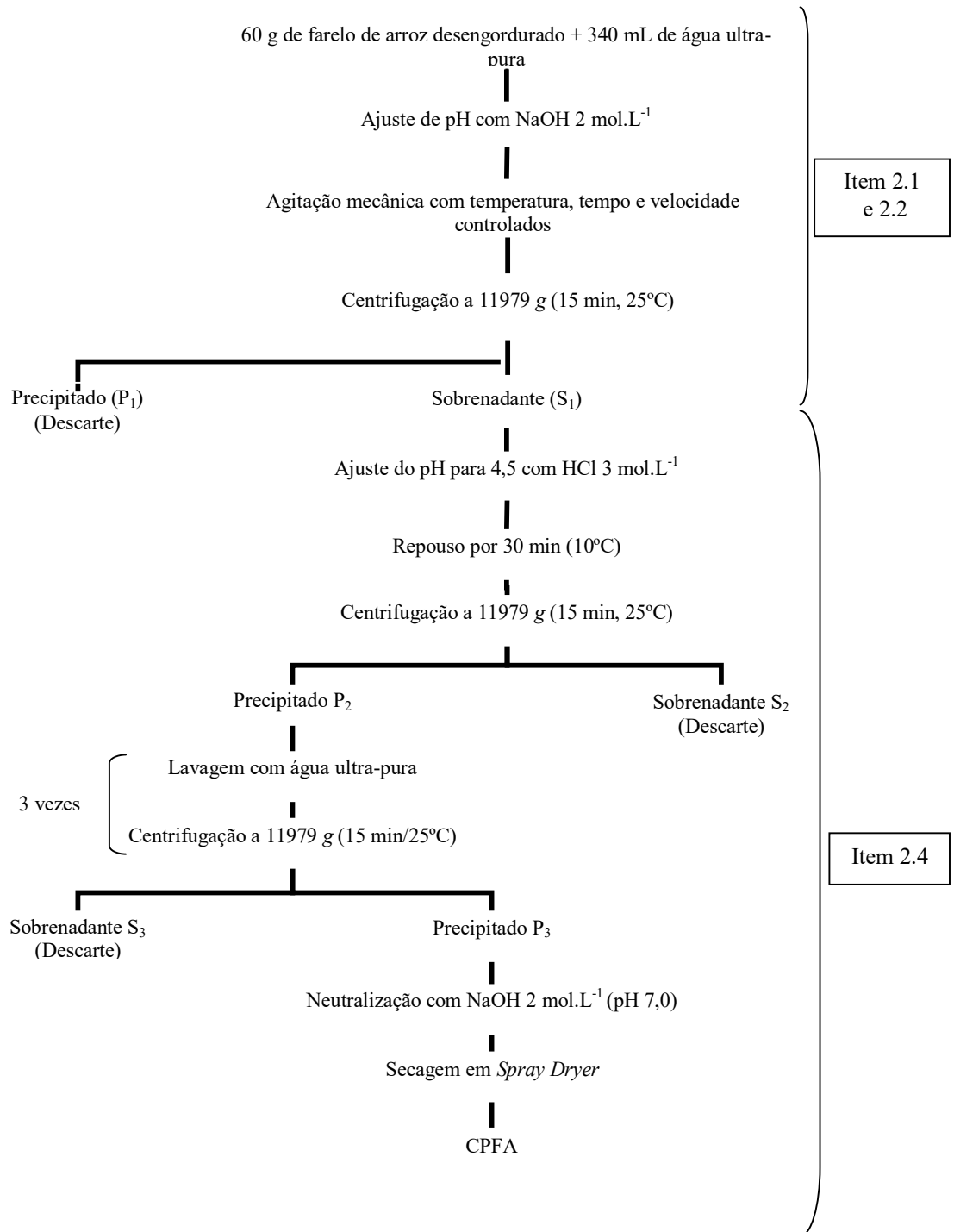
Onde:  $\hat{Y}$  = resposta,  $X_1$ ,  $X_2$  = variáveis independentes codificadas,  $\beta$ 's = coeficientes de regressão estimados pelo modelo de superfície de resposta,  $e$  = resíduo (erro experimental)

## 2.4 Obtenção e caracterização do CPFA

As etapas de extração, purificação e secagem do CPFA estão apresentadas na Fig. 1. O extrato aquoso ( $S_1$ ) com o maior teor proteico obtido no item 2.2, teve seu pH ajustado para 4,5 com HCl 3 mol.L<sup>-1</sup> (pH 21 pH/mV, Hanna Instruments, Brasil), que é o ponto isoelétrico das proteínas do arroz (Gupta, Chandi, & Sogi, 2008). A solução foi deixada em repouso por 30 min para precipitação a 10 °C, seguida de centrifugação a 11979 g (15 min, 25 °C). O sobrenadante ( $S_2$ ) foi descartado e o precipitado contendo a proteína, lavado com água purificada e armazenado nos próprios tubos da centrífuga, para posterior centrifugação a 11979 g (15 min, 25 °C). Após o procedimento de lavagem que foi realizado 3 vezes, a amostra foi neutralizada (pH 7) com NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>) e posteriormente secada em *Spray Dryer* (MSDi 1.0, Labmaq do Brasil), com câmara de secagem de 500 mm × 150 mm e bico atomizador do tipo duplo fluido, com orifício de 1,2 mm de diâmetro. A alimentação foi feita através de uma bomba peristáltica, com vazão de 0,7 (L.h<sup>-1</sup>) e temperatura do ar de entrada de 90 °C.

O teor de nitrogênio total (b.s.) do farelo de arroz, do extrato aquoso ( $S_1$ ) e do CPFA foi determinado utilizando o método de Kjeldahl (n = 3) e multiplicado pelo valor do fator de conversão de nitrogênio-proteína de 5,95 (AOAC, 2005). A umidade foi determinada como descrito na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

A cor do CPFA foi determinada por colorímetro Minolta® (Chroma Meter, CR410, Japão) com esfera de integração e ângulo de visão de 45°, ou seja, iluminação d/45 e iluminante D e os valores de luminosidade  $L^*$ ,  $a^*$  (componente vermelho-verde),  $b^*$  (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema de cor CIELAB (*Commission International for Illumination*). Uma placa padrão branca foi utilizada para a calibragem. O uso de \* caracteriza os padrões determinados por esta Comissão. As medidas de cor foram realizadas na superfície das amostras do CPFA acondicionadas em placas em Petri, tomando três pontos diferentes de leitura por amostra.



**Fig. 1.** Fluxograma do processo de extração proteica e obtenção do concentrado proteico do farelo de arroz.

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Extração das proteínas do farelo de arroz

Na primeira etapa (PFF), as variáveis estudadas, a resposta experimental (Y) e a resposta predita ( $\hat{Y}$ ) estão apresentadas na Tabela 01.

**Tabela 01**

Matriz do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração de proteínas do farelo de arroz por tratamento alcalino e rompimento celular por agitação mecânica

| Ensaio | $x_1^a$ | $x_2^b$ | $x_3^c$  | $x_4^d$  | Y <sup>e</sup> | $\hat{Y}^f$ |
|--------|---------|---------|----------|----------|----------------|-------------|
| 1      | -1 (8)  | -1 (25) | -1 (80)  | -1 (60)  | 0,276 ± 0,006  | 0,270       |
| 2      | +1 (10) | -1 (25) | -1 (80)  | +1 (180) | 0,400 ± 0,008  | 0,396       |
| 3      | -1 (8)  | +1 (45) | -1 (80)  | +1 (180) | 0,403 ± 0,008  | 0,393       |
| 4      | +1 (10) | +1 (45) | -1 (80)  | -1 (60)  | 0,382 ± 0,006  | 0,403       |
| 5      | -1 (8)  | -1 (25) | +1 (120) | +1 (180) | 0,299 ± 0,004  | 0,320       |
| 6      | +1 (10) | -1 (25) | +1 (120) | -1 (60)  | 0,341 ± 0,002  | 0,331       |
| 7      | -1 (8)  | +1 (45) | +1 (120) | -1 (60)  | 0,330 ± 0,008  | 0,327       |
| 8      | +1 (10) | +1 (45) | +1 (120) | +1 (180) | 0,459 ± 0,024  | 0,453       |
| 9      | 0 (9)   | 0 (35)  | 0 (100)  | 0 (120)  | 0,360 ± 0,002  | 0,362       |
| 10     | 0 (9)   | 0 (35)  | 0 (100)  | 0 (120)  | 0,345 ± 0,002  | 0,362       |
| 11     | 0 (9)   | 0 (35)  | 0 (100)  | 0 (120)  | 0,383 ± 0,009  | 0,362       |

<sup>a</sup> pH; <sup>b</sup> Temperatura (°C); <sup>c</sup> Velocidade de agitação (rpm); <sup>d</sup> Tempo (min); <sup>e,f</sup> Respostas Experimental (média ± erro padrão) e Predita para o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 mL<sup>-1</sup> de extrato aquoso), respectivamente.

**Tabela 02**

Efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento da extração das proteínas do farelo de arroz por agitação mecânica

| Fatores                                        | Efeitos | Erro padrão | t (6)  | p – valor |
|------------------------------------------------|---------|-------------|--------|-----------|
| Média                                          | 0,362   | 0,005       | 65,926 | 0,000*    |
| (X <sub>1</sub> ) pH                           | 0,068   | 0,013       | 5,312  | 0,002*    |
| (X <sub>2</sub> ) Temperatura (°C)             | 0,065   | 0,013       | 5,029  | 0,002*    |
| (X <sub>3</sub> ) Velocidade de Agitação (rpm) | -0,008  | 0,013       | -0,590 | 0,577     |
| (X <sub>4</sub> ) Tempo de agitação (min)      | 0,058   | 0,013       | 4,509  | 0,004*    |

\*  $p \leq 0,05$ ;  $R^2 = 0,93$

Quando o pH ( $x_1$ ), a temperatura ( $x_2$ ) e tempo de agitação ( $x_4$ ) passaram do menor nível (-1) para o maior (+1), ou seja, o pH aumentou de 8 para 10, a temperatura de 25 a 45 °C e o tempo de 60 para 180 min ocorreu aumento significativo no rendimento da extração (g de proteína.100 mL<sup>-1</sup> de extrato aquoso). Enquanto que para a variável velocidade da agitação ( $x_3$ ), observou-se efeito negativo e não significativo no teor de proteína extraída quando a rotação passou de 80 para 120 rpm. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi de 0,93 (Tabela 02).

Desta forma, na segunda etapa, para a realização do DCCR a velocidade de agitação foi fixada em 80 rpm e para o pH o valor foi fixado em 10, apesar do efeito significativo

observado no PFF e de Chen & Houston (1970) demonstrarem que em valores acima de 10 há maior rendimento na extração proteica do farelo de arroz. Observou-se nas condições estudadas que em pH superior a 10 o volume de NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup> necessário para elevar o pH em 0,1 aumentou significativamente se comparado ao volume necessário quando o pH era inferior a este valor, ocasionando ainda, alteração da cor do extrato aquoso que passava de um tom amarelo claro para um tom esverdeado. Sabe-se que quanto maior o pH, maior o desdobramento da proteína e pode ocorrer hidrólise parcial de ligações peptídicas, desaminação da Asn e Gln, destruição de grupos sulfidril ou agregação que podem levar a desnaturação irreversível das mesmas (Damodaran, 1996), e ainda, reações indesejáveis que envolvem a racemização de aminoácidos, formação de compostos tóxicos, tais como lisinoalanina, redução de digestibilidade, perda de aminoácidos essenciais e diminuição do valor nutritivo (Martínez-Maqueda et al., 2013). Desta forma, a fim de evitar possíveis alterações indesejáveis, evitou-se pH superior a 10.

Anderson & Guraya (2001) avaliaram a extração de proteínas do farelo de arroz sem o uso de solventes químicos, utilizaram água como diluente, agitação por 30 min com velocidade de 7500 rpm (38-39 °C) e concluíram que os processos físicos por si só não são capazes de romper a extensa rede dissulfeto e agregação das proteínas, sendo de extrema importância para a extração das proteínas as condições do meio. Com a alcalinização do meio pela adição de NaOH ocorre a quebra das pontes dissulfetos ocorrendo mudanças estruturais, tornando as proteínas mais solúveis, e conseqüentemente com melhor capacidade emulsificante e de formação de espuma (Damodaran, 1996).

Em vários estudos realizados em condições similares de extração proteica de vegetais como as deste trabalho, a alcalinidade do meio favoreceu a liberação das proteínas, e ainda as variáveis importantes que influenciaram na extração foram o tipo de matriz vegetal, o tempo e a temperatura utilizados. Alguns autores que utilizaram a extração alcalina (pH 9,5) e enzimática, a 55 °C, verificaram que a 5 h, 15 h e 24 h de extração, não houve diferença significativa no rendimento e no teor de proteínas em fubá de milho (Capobiango et al., 2006). Wani et al. (2006) verificaram que o aumento da concentração de NaOH promoveu maior extração proteica de sementes de melancia, enquanto que o aumento da temperatura e do tempo de agitação foram limitados para melhorar a extração. No processo de extração de proteínas de sementes de pimentão vermelho, o aumento do pH (9) e do tempo promoveu maior efeito na extração proteica, enquanto que o aumento da temperatura teve efeito limitante (Firatligil-Durmus & Evranuz, 2010).

Na segunda etapa (DCCR), as variáveis estudadas, a resposta experimental (Y) e a resposta predita ( $\hat{Y}$ ) estão representadas na Tabela 03.

**Tabela 03**

Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração das proteínas do farelo de arroz por tratamento alcalino e rompimento celular por agitação mecânica

| Ensaio | $x_1^a$    | $x_2^b$     | $Y^c$         | $\hat{Y}^d$ |
|--------|------------|-------------|---------------|-------------|
| 1      | -1 (38)    | -1 (146)    | 0,386 ± 0,005 | 0,392       |
| 2      | 1 (52)     | -1 (146)    | 0,449 ± 0,009 | 0,440       |
| 3      | -1 (38)    | 1 (274)     | 0,418 ± 0,005 | 0,446       |
| 4      | 1 (52)     | 1 (274)     | 0,488 ± 0,006 | 0,500       |
| 5      | -1,41 (35) | 0 (210)     | 0,409 ± 0,002 | 0,388       |
| 6      | 1,41 (55)  | 0 (210)     | 0,458 ± 0,010 | 0,460       |
| 7      | 0 (45)     | -1,41 (120) | 0,418 ± 0,022 | 0,425       |
| 8      | 0 (45)     | 1,41 (300)  | 0,531 ± 0,007 | 0,505       |
| 9      | 0 (45)     | 0 (210)     | 0,473 ± 0,005 | 0,447       |
| 10     | 0 (45)     | 0 (210)     | 0,423 ± 0,003 | 0,447       |
| 11     | 0 (45)     | 0 (210)     | 0,445 ± 0,005 | 0,447       |

<sup>a</sup> Temperatura (°C); <sup>b</sup> Tempo (min); <sup>c, d</sup> Respostas Experimental (média ± erro padrão, base úmida) e Predita para o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 mL<sup>-1</sup> de extrato aquoso), respectivamente.

**Tabela 04**

Coefficientes de regressão para a resposta g de proteína.100 g<sup>-1</sup> de extrato aquoso

|                                                | Coefficiente de Regressão | Erro padrão | t (6)  | p – valor |
|------------------------------------------------|---------------------------|-------------|--------|-----------|
| Média                                          | 0,447                     | 0,014       | 32,336 | 0,000*    |
| (X <sub>1</sub> ) Temperatura (L)              | 0,025                     | 0,008       | 3,005  | 0,024*    |
| (X <sub>1</sub> <sup>2</sup> ) Temperatura (Q) | -0,012                    | 0,010       | -1,145 | 0,296     |
| (X <sub>2</sub> ) Tempo (L)                    | 0,029                     | 0,008       | 3,376  | 0,015*    |
| (X <sub>2</sub> <sup>2</sup> ) Tempo (Q)       | 0,009                     | 0,010       | 0,889  | 0,408     |

\* p ≤ 0,05; R<sup>2</sup> = 0,80

Os resultados (Tabela 04) mostram contribuição positiva significativa (p < 0,05) de ambas as variáveis (temperatura e tempo de agitação) sobre o rendimento de extração, para os termos lineares, sendo esta contribuição maior para o tempo de agitação. Os termos quadráticos, com contribuição positiva para o tempo de agitação e negativa para a temperatura, apesar de não significativos (p > 0,05), mostraram-se importantes para o ajuste, portanto, mantidos no modelo (Eq. (3)). Verificou-se que, o aumento na variável tempo de agitação (x<sub>2</sub>) do menor (-1,41, 120 min) para o maior nível (1,41, 300 min), bem como o aumento na variável temperatura do menor nível (-1,41, 35 °C) até o nível 1 (52 °C) promoveu um aumento na quantidade de proteína extraída.

$$Y = 0,447 + 0,025 X_1 + 0,029 X_2 - 0,012 X_1^2 + 0,009 X_2^2 \quad (3)$$

A qualidade de ajuste do modelo está apresentada na Tabela 05. A regressão foi significativa ( $p = 0,0289$ ) com variação explicada em 80%. O parâmetro de interação das variáveis (temperatura x tempo), não significativo ( $p > 0,05$ ), foi incorporado aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA).

**Tabela 05**

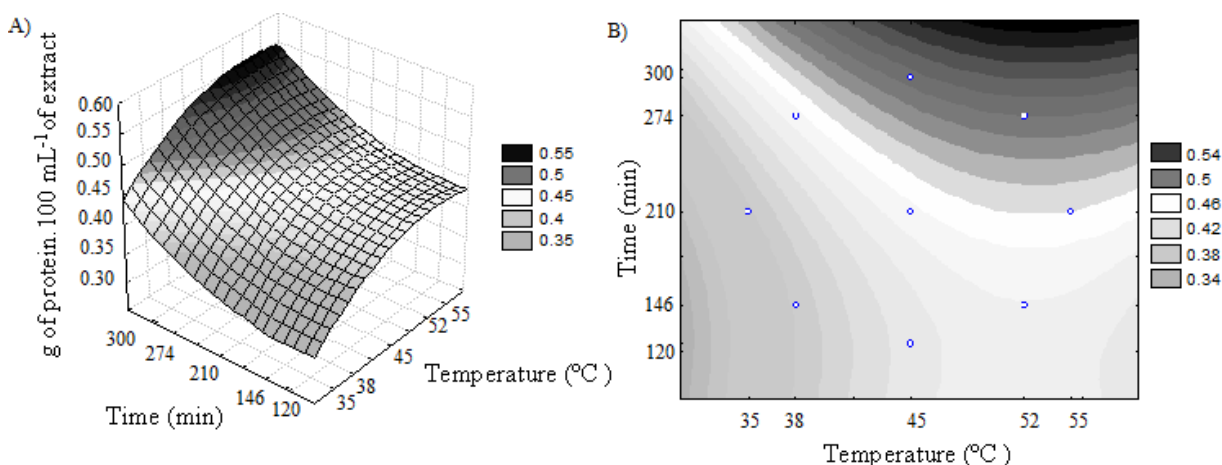
Análise de variância do modelo linear para predição do teor de proteínas extraídas do farelo de arroz por agitação mecânica

| Fonte de Variação | SQ <sup>a</sup> | GL <sup>b</sup> | MQ <sup>c</sup> | F <sub>calculado</sub> | p – valor |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----------|
| Regressão         | 0,0134          | 4               | 0,0034          | 5,8443                 | 0,0289    |
| Resíduos          | 0,0034          | 6               | 0,0006          |                        |           |
| Total             | 0,0168          | 10              |                 |                        |           |

$$R^2 = 0,7957; \quad F_{0,05,4,6} = 4,5337$$

<sup>a</sup> soma dos quadrados, <sup>b</sup> grau de liberdade, <sup>c</sup> quadrado médio

A partir dos resultados obtidos, foi possível construir a superfície de resposta e a curva de contorno para o conteúdo de proteína obtido no processo (de extração alcalina com o rompimento de células por meio de agitação mecânica) (Fig. 2. (A) e (B)). Verificou-se que, quando o extrato aquoso foi submetido a tempos mais curtos de agitação (120 e 146 min) e a temperaturas mais baixas (35 a 38 °C), o rendimento de extração foi também menor. O oposto foi observado em tempos de agitação e temperaturas mais elevadas, proporcionando maior eficiência no teor de proteína extraída de farelo de arroz, otimizando o processo. Deve-se notar, no entanto, que para obter as condições ótimas de extração, pode, ser incluídos ensaios com aumento de ambas as variáveis. Os resultados sugerem que um aumento maior do tempo de agitação e mais sutilmente na variável de temperatura, isto é, uma pequena mudança no centro da região experimental até os valores máximos estudados, pode ser recomendado. As mudanças na temperatura podem afetar a solubilização de proteínas e, no caso de aquecimento, provocar uma mudança irreversível para o estado desnaturado (Cunha, Aires-Barros & Cabral, 2003; Damodaran, 1996).



**Fig. 2.** Teor de proteína extraído do farelo de arroz (g de proteína.100 mL<sup>-1</sup> de extrato aquoso) em função do tempo (min) e temperatura (°C). A) Superfície de resposta. B) Curvas de contorno.



### 3.2 Obtenção do concentrado proteico

O CPFA obtido na forma de pó fino, com textura aveludada (Fig.3), apresentou para a medida instrumental de cor os valores de  $L^*$   $78,29 \pm 0,95$ ,  $a^*$   $-4,97 \pm 0,05$  e  $b^*$   $16,51 \pm 0,10$  de acordo com os valores obtidos no trabalho realizado por Kaewka, Therakulkait, & Cadwallader (2009). Os autores citados avaliaram a cor do CPFA hidrolisado, obtido por extração alcalina e secagem em liofilizador ou *Spray Dryer*, seguido de hidrólise ácida, neutralização e novamente secagem em liofilizador ou *Spray Dryer*. Os valores obtidos foram para  $L^*$   $64,28 \pm 0,18$  e  $86,25 \pm 0,03$ ; para  $a^*$   $4,57 \pm 0,14$  e  $0,61 \pm 0,02$  e para  $b^*$   $23,59 \pm 0,13$  e  $14,59 \pm 0,06$ , respectivamente e concluíram que o método de secagem influencia diretamente na cor do CPFA. A temperatura utilizada para a secagem pode promover o escurecimento dos pigmentos via reação de Maillard, porém esta característica não influenciaria se aplicado em formulações de alimentos como pães (Jiamyangyuen, Srijesdaruk & Harper) e biscoitos (Yadav, Yadav & Chaudhary, 2011).



**Fig 3.** Concentrado proteico do farelo do arroz obtido por agitação.

Considerando o teor de umidade do farelo de arroz, do sobrenadante  $S_1$  e do CPFA de 11,09%, 97,67% e 4,65%, respectivamente, o teor de proteínas (b.s.) destas amostras está apresentado na Tabela 06.

**Tabela 06**

Teor de proteína do farelo do arroz, sobrenadante ( $S_1$ ) e concentrado proteico do farelo de arroz

| <b>Amostras</b>                                                  | <b>Teor de proteínas*</b>                   |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Farelo de arroz ( $g \cdot 100 g^{-1}$ )                         | $14,89 \pm 0,29$<br>$16,75 \pm 0,33$ (b.s.) |
| Sobrenadante ( $S_1$ ) ( $g \cdot 100 mL^{-1}$ )                 | $0,53 \pm 0,01$<br>$22,78 \pm 0,30$ (b.s.)  |
| Concentrado Proteico do Farelo de Arroz ( $g \cdot 100 g^{-1}$ ) | $46,28 \pm 1,98$<br>$48,53 \pm 2,08$ (b.s.) |

\* Média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). Base seca (b.s.).

Alguns estudos mostram a obtenção CPFA com teor proteico de 33,5%, em extração a pH 9,5, sem agitação da amostra de farelo arroz estabilizado e moído em granulometria menor que 100 *mesh* (Gnanasambandam & Hettiarachchy, 1995); CPFA com teor de proteína de 42,6% em extração a pH 9, com 2 h de agitação e adição de  $\alpha$ -amilase para hidrólise de carboidratos (Yeom et al., 2010) e CPFA com 32,9 % de proteínas utilizando extração alcalina, pH 9,5, agitação de 300 rpm e 50 °C (Zhang et al., 2012). Neste estudo, foi possível obter um CPFA com teor de proteínas de  $48,53 \pm 2,08$  (b.s.), superior aos obtidos pelos autores citados, nas condições: pH 10; velocidade de agitação, 80 rpm; tempo de agitação, 300 min (5 h) e temperatura, 45 °C.

#### **4 Conclusão**

As variáveis independentes: pH, tempo de agitação e temperatura promoveram efeitos favoráveis para a técnica de extração das proteínas, enquanto que a velocidade de agitação não interfere de modo significativo. A metodologia de superfície de resposta gerou graficamente o conjunto de variáveis operacionais e os níveis adequados ao processo. Entre as condições estudadas, em pH 10, velocidade de agitação de 80 rpm, tempo de agitação de 300 min e temperatura de 45 °C, foi possível obter um concentrado proteico com teor de proteína de 48,53% (b.s.), valor este superior ao obtido em outros trabalhos. Futuros estudos podem focar em outros intervalos ou variáveis para a obtenção de concentrado proteico de farelo de arroz.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o suporte financeiro do CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Processo 478503/2011-3, e a Indústria Riograndense de Óleos Vegetais (IRGOVEL - Pelotas/RS) pela doação do farelo de arroz.

## Referências

- AOAC (2005). *Official methods of analysis of AOAC international* (18th ed.). Maryland, United States: Association of Analytical Communities.
- Anderson, A.K., & Guraya, H.S. (2001). Extractability of protein in physically processed rice bran. *AOCS*, 78(9), 969-972.
- Becerra, M., Belmonte, E.R., Cerdán, M.E., & Siso, M.I.G. (2001). Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*. *Food Technology Biotechnology*, 39(2), 135–139.
- Capobiango, M., Vieira, C.R., Santiago e Silva, A.L., Coelho, J.V., Segall, S.D., & Silvestre, M.P.C. (2006). Extração química e enzimática das proteínas do fubá de milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(4), 884-890.
- Chanput, W., Theerakulkait, C., & Nakai, S. (2009). Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. *Journal of Cereal Science*, 49, 422-428.
- Chen, L.; & Houston, D.F. (1970). Solubilization and recovery of protein from defatted rice bran. *Cereal Chemistry*, 47, 72-79.
- Chrastil, J. (1992). Correlations between the physicochemical and functional properties of rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1683-1689.
- Cunha, M.T., Aires-Barros, M.R., & Cabral, J.M.S. (2003). Protein Isolation. In: Hatti-Kaul, R., & Mattiasson, B. (Eds.), *Isolation and Purification of Proteins* (pp 299-345). New York: Marcel Dekker Inc.
- Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides, and proteins. In: Fennema, O. R. (Eds.), *Food Chemistry* (pp 321-4283). New York: Marcel Dekker Inc.
- Demam, J.M. (1999). *Principles of Food Chemistry*. (3th ed.). Gaithersburg: An Aspen Publication.
- FAO (2014). Food and Agriculture Organization. *Rice Market Monitor*, 18(4), 1-33.
- Firatligil-Durmus, E., & Evranuz, O. (2010). Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). *LWT - Food Science and Technology*, 43, 226–231.
- Geciova, J., Bury, D., & Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in dairy industry - a review. *International Dairy Journal*, 12, 541–553.
- Gnanasambandam, R., & Hettiarachchy, N.S. (1995). Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. *Journal of Food Science*, 60(5), 1066-1074.

Gupta, S., Chandi, G.K., & Sogi, D.S. (2008). Effect of extraction temperature on functional properties of rice bran protein concentrates. *International Journal of Food Engineering*, 4 (2), 1556-3758.

Hamada, J.S. (2000). Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases. *Journal of Food Science*, 65(2), 305-310.

Han, S., Chee, K., & Cho, S. (2015). Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry*, 172, 766-769.

Hoogenkamp, H. (2012). *Rice bran protein: Biotechnology of Ecologically Sustainable Food and Nutraceutical Products; Food Security, Health, Social Demographic Marketing of Formulated Food, Meat-Hybrids and Beverages*. USA: CreateSpace Independent Publishing Platform.

Hyun-Jun, P., Sung-Wook, H., Dong-Yun, L., Hong-Ki, K., Hyun-Chul, J., Hyun-Ho, P., & Sang-Hoon, S. (2009). A method for preparing protein concentrate from rice bran. *Patents WO 2009035186 A1*.

Kaewka, K., Therakulkait, C., & Cadwallader, K.R. (2009). Effect of preparation conditions on composition and sensory aroma characteristics of acid hydrolyzed rice bran protein concentrate. *Journal of Cereal Science*, 50, 56-60.

Jiamyangyuen, S., Srijesdaruk, V., & Harper, J.W. (2005). Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 27(1), 55-64.

Lakkakula, N.R., Lima, M.H, & Walker, T. (2004). Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. *Bioresource Technology*, 92, 157–161.

Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez-Ruiz, J.A. (2013). Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. In: Toldrá, F., & Nolle, L.M.L. (Eds.), *Proteomics in Foods: Principles and Applications* (pp 21-50). Londres: Springer.

Oszvald, M., Tömösközi, S., Larroquec, O., Keresztényi, E., Tamás, L., & Békés, F. (2008). Characterization of rice storage proteins by SE-HPLC and micro z-arm mixer. *Journal of Cereal Science*, 48, 68–76.

Pan, Z., Cathcart, A., & Wang D. (2005). Thermal and chemical treatments to improve adhesive property of rice bran. *Industrial Crops and Products*, 22, 233–240.

Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J.F., Terán, L.C., & Bautista, J. (2006). Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chemistry*, 98, 742-748.

Shoji, Y., Mita, T., Isemura, M., Mega, T., Hase, S., Isemura, S., & Aoyagi, Y. (2001). A Fibronectin-binding protein from rice bran with cell adhesion activity for animal tumor cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(5), 1181–1186.

Silva, M.A., Sanches, C., & Amante, E.R. (2006). Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. *Journal of Food Engineering*, 75, 487–491.

Voet, D., & Voet, J. G (2006). *Bioquímica*. (3th ed.). Porto Alegre: Artmed.

Yadav, R.B., Yadav, B.S & Chaudhary, D. (2011). Extraction, characterization and utilization of rice bran protein concentrate for biscuit making. *British Food Journal*, 113(9), 1173-1182.

Yeom, H.-J., Lee, E.-H., Ha, M.-S., Ha, S.-D., & Ba, D.-H. (2010). Production and physicochemical properties of rice bran protein isolates prepared with autoclaving and enzymatic hydrolysis. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 53(1), 62-70.

Wang, M., Hettiarachchy, N.S., Qi, M., Burks, W., & Siebenmogen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 411–416.

Wani, A.A., Sogi, D.S., Grover, L., & Saxena, D.C. (2006). Effect of temperature, alkali concentration, mixing time and meal/solvent ratio on the extraction of watermelon seed proteins—a response surface approach. *Biosystems Engineering*, 94(1), 67–73.

Zhang, H.-J., Zhang, H., Wang, L., & Guo, X.-N. (2012). Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. *Food Research International*, 47, 359–363.

## **Highlights**

The extraction of rice bran proteins was influenced by pH, temperature and stirring time.

Most alkaline pH increases the solubility of the rice bran protein.

Higher stirring time and temperature, increased the extracted protein content.

## ARTIGO CIENTÍFICO 3

### EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE PROTEÍNAS DO FARELO DE ARROZ PARA OBTENÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO

Sílvia BERNARDI<sup>1</sup>, Eliane COLLA<sup>2</sup>, Cristiane CANAN<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Departamento de Tecnologia e Engenharia de Alimentos. Avenida Brasil, 4.232, 85884-000 – Medianeira, Paraná, Brasil.

#### RESUMO

A extração assistida por ultrassom (EAU) foi associada ao tradicional método alcalino para melhorar o rendimento de extração das proteínas do farelo do arroz. Primeiramente foram realizados dois Planejamentos Fatoriais Fracionários 2<sup>4-1</sup> (2 níveis, 3 repetições no ponto central, total de 11 ensaios cada), sendo um a 37 kHz e outro a 80 kHz. As variáveis independentes foram pH, temperatura, tempo de ultrassom e amplitude da potência. Após definidas as variáveis significativas sobre a resposta de extração protéica (pH e tempo de ultrassom), aplicou-se um Delineamento Composto Central Rotacional 2<sup>2</sup> (4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios) somente a 37 kHz, com as variáveis significativas. A variável resposta foi expressa como o teor de proteína bruta (g.100 mL<sup>-1</sup> de extrato), determinada por Kjeldahl. No ensaio com maior rendimento obteve-se um concentrado proteico com teor de proteína de 83,36% (b.s.) quando utilizado pH 10, 30 min de ultrassom, 100% de amplitude da potência (30°C) representando um rendimento de 4,74% na extração. O CPFA apresentou-se na forma cristalina com valores de L\* de 60,42 ± 2,15, a\* -1,31 ± 0,53 e b\* 20,29 ± 1,39 para a medida instrumental de cor.

Palavras chaves: Delineamento Fatorial, Tecnologias limpas, Subproduto.

#### 1 INTRODUÇÃO

Para boa parte da população mundial, o arroz (*Oryza sativa*) é a base da alimentação. Estima-se que em 2014, o mundo produziu 2.534 milhões de toneladas de cereais (FAO, 2015) e destes, 744,6 milhões de toneladas foram de grãos de arroz (FAO, 2014).

O arroz em casca consiste de uma porção comestível (arroz integral, 72 a 82%) e de estruturas de revestimento (casca e palha, 18 a 28%). O arroz integral é composto por 1% a

2% de pericarpo, 4% a 6% do núcleo do tegumento, 2% a 3% do embrião e 89 a 94% do endosperma (MATZ, 1991). Do pericarpo é que se obtém o farelo durante o beneficiamento do arroz, e representa de 8% a 11% do peso total do grão (PARRADO et al., 2006).

O farelo de arroz possui excelente qualidade nutricional, porque é nas camadas do grão que se origina o farelo que estão as maiores quantidades de proteínas, vitaminas, fibras e minerais do grão (PESTANA; MENDONÇA; ZAMBIAZI, 2008). O conteúdo de proteína chega a 15% (MASSARO; PINTO, 2002; HOOGENKAMP, 2012), as quais apresentam adequada composição de aminoácidos para o metabolismo humano (WANG et al., 1999), sua digestibilidade é superior a 90% (ZHANG et al., 2012; HAN; CHEE; CHO, 2015). Estudos relataram suas características hipoalergênica (WANG et al., 1999), hipocolesterolêmica (CHRASIL, 1992), anticancerígena (SHOJI et al., 2001; TOMITA et al., 2008) e antioxidante (CHEN; BERGMAN, 2005; CHANPUT; THEERAKULKAIT; NAKAI, 2009; THANONKAEWA et al., 2012).

Novas técnicas de extração das proteínas do farelo de arroz têm sido estudadas para aumentar o rendimento do processo com redução do tempo de extração, volume de solventes orgânicos, redução dos custos e da poluição ambiental (HUANG et al., 2013). Na tecnologia de alimentos, recursos físicos ou mecânicos podem ser combinados com as técnicas clássicas de extração de modo a favorecer a liberação do conteúdo proteico de suas células, pois sua liberação exige o rompimento celular (VOET; VOET, 2006).

A extração das proteínas do arroz comumente é realizada em meio alcalino associado a técnica de agitação (YADAV; YADAV; CHAUDHARY, 2011; ZHANG et al., 2012; RAFF; MOUSAVI; SHAHIDI, 2014; HAN; CHEE; CHO, 2015). Entretanto, a Extração Assistida por Ultrassom (EAU) para diferentes materiais vegetais tem sido estudada desde 1.950 e apenas recentemente surgiram pesquisas aprofundadas relacionando seu uso na ciência dos alimentos (VILKHU et al., 2011). Trata-se de uma tecnologia limpa que pode ser útil na indústria de processamento de alimentos (PATIST; BATES, 2011). Os efeitos mecânicos do ultrassom proporcionam maior penetração do solvente nos materiais celulares e melhor transferência de massa pelo efeito *microstreaming* (GOGATE; KABADI, 2009).

Dentre os efeitos mecânicos, ocorre a cavitação que é muito útil, a qual induz a formação, crescimento e colapso de microbolhas no centro de uma solução aquosa, gerando o rompimento celular e a transferência de massa para o meio (LEONG; ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011). Isto pode ser causado quando a forte pressão negativa no sistema é

suficiente para superar as forças intermoleculares de ligação e um meio fluido pode ser dilacerado produzindo pequenas cavidades que crescem até entrar em violento colapso e liberar grandes quantidades de energia (MASON, 2009; ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011).

O ultrassom induz a mudanças estruturais nas proteínas associadas à clivagem parcial das interações hidrofóbicas intermoleculares, ao invés de ligações peptídicas e pontes dissulfetos. Quando as partículas proteicas são submetidas à tensão de corte, ocorre o aumento da velocidade de agregação, devido a maior colisão das moléculas. A sonicação não tem influência sobre a carga superficial das partículas, mas cria uma nova superfície ao reduzir o tamanho e aumentando a área superficial das partículas, devido às forças de cavitação, que inclui a destruição dos aglomerados moleculares, violando as forças de Van der Waals (JAMBRAK et al., 2014).

Considerando diversos fatores que influenciam na EAU das proteínas do farelo de arroz, este estudo avaliou os efeitos decorrentes das variáveis pH, tempo de ultrassom, amplitude da potência e temperatura na obtenção de um concentrado proteico, contribuindo para agregar valor a este subproduto por meio de novas tecnologias e para que suas proteínas sejam mais acessíveis aos consumidores e de maior aplicação em sistemas alimentares.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 PREPARO DA AMOSTRA**

O farelo de arroz desengordurado (FAD) na forma peletizada, fornecido pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais (IRGOVEL - Pelotas/RS) - safra 2013/2014, foi previamente moído em moinho de facas (Solab, SL 31, Tipo Willye, Brasil) com granulometria média de 70 *mesh*, embalado em sacos de polietileno e congelado (-20 °C) até a realização dos ensaios. Para a diluição da amostra tomou-se como base a patente de Hyun-Jun et al. (2009), com algumas modificações. Para cada ensaio, 30 g de FAD foram suspensos em 170 mL de água ultrapura, o pH corrigido (pH 21 pH/mV, Hanna Instruments, Brasil) com solução NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup> e submetido a sonicação indireta em banho ultrassônico (Elmasonic, P60H, Alemanha) nas condições (pH, temperatura, tempo e amplitude da potência) apresentadas a seguir.



## 2.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO PARA A EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO FARELO DE ARROZ

Como estudo exploratório para verificar as tendências de rendimento da extração de proteínas do FAD, foram realizados dois Planejamentos Fatoriais Fracionários (PFF)  $2^{4-1}$  (2 níveis, 3 repetições no ponto central) totalizando 11 ensaios, realizados em ordem casualizada, sendo um a 37 kHz e outro a 80 kHz. As variáveis independentes foram selecionadas com base na literatura e testes preliminares:  $x_1$  (pH; 8, 9, 10),  $x_2$  (temperatura, °C; 25, 35, 45),  $x_3$  (tempo de ultrassom, min; 5, 17,5, 30) e  $x_4$  (amplitude da potência, %; 40, 70, 100) (GNANASAMBANDAM; HETTIARACHCHY, 1995; GUPTA; CHANDI; SOGI, 2008; ZHANG et al., 2012).

Após a amostra ser submetida às condições de extração, foi centrifugada a 11979 g por 15 min (25 °C) (Cientec, CT5000R, Brasil). De cada ensaio, o sobrenadante ( $S_1$ ) foi coletado e determinado o teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (n=3) e multiplicou-se pelo fator 5,95 para conversão em proteínas totais (AOAC, 2005). Considerou-se a melhor condição de extração àquela em que o sobrenadante ( $S_1$ ) apresentou maior teor proteico (g de proteína.100 mL<sup>-1</sup> de extrato aquoso).

Após definidas as variáveis significativas sobre a resposta de extração proteica, aplicou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^2$  (4 pontos axiais, 3 repetições no ponto central) totalizando 11 ensaios, realizados em ordem casualizada, com as variáveis  $x_1$  (pH; 8, 8,3, 9, 9,7, 10) e  $x_2$  (tempo ultrassom, min; 15, 19, 30, 41, 45). E ainda, em uma etapa posterior à realização dos PFF e DCCR avaliou-se a influencia dos tempos de 15 e 30 min de ultrassom sobre o teor de proteínas extraídas do FAD.

## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos dos PFF e do DCCR foram realizados de forma aleatória e os dados foram tratados com o auxílio do *software Statistica* 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). Pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) verificou-se a frequência em que se obteve o melhor desempenho quantitativo na extração. O ajuste da equação do modelo de segunda ordem foi expresso pelo coeficiente de determinação  $R^2$  e a significância estatística foi determinada pelo Teste F

(análise de variância - ANOVA). O Teste-t ( $p < 0,05$ ) foi utilizado para avaliar a diferença entre os tempos de 15 e 30 min de ultrassom para extração de proteínas do FAD.

## 2.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CPFA

As etapas de extração, purificação e secagem do CPFA estão apresentadas na Figura 1. O sobrenadante ( $S_1$ ) com o maior teor proteico obtido no item 2.2 teve seu pH ajustado para 4,5 com  $\text{HCl } 3 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH21 pH/mV, Meter Hanna, Brasil), que é o ponto isoelétrico das proteínas do arroz (GUPTA; CHANDI; SOGI, 2008). A solução foi deixada em repouso *overnight* para precipitação a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguida de centrifugação a  $11979 \text{ g}$  por  $15 \text{ min}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). O precipitado contendo a proteína foi lavado três vezes com água purificada e armazenado nos próprios tubos da centrífuga, para nova centrifugação a  $11979 \text{ g}$  por  $15 \text{ min}$  ( $25^\circ\text{C}$ ). Os sobrenadantes  $S_2$  e  $S_3$  foram descartados. A amostra foi neutralizada (pH 7,0,  $\text{NaOH } 2 \text{ mol.L}^{-1}$ ) seguida de congelamento a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  e liofilização (Labconco, FreeZone<sup>6</sup>, EUA) em pressão absoluta menor que  $0,5 \text{ mBar}$ , temperatura de aquecimento de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $24 \text{ h}$ .

Para a determinação do teor de proteínas do FAD, do extrato aquoso ( $S_1$ ) e do CPFA em base seca, determinou-se o teor de nitrogênio total, proteínas totais (fator 5,95) e umidade conforme descrição da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). Pelo teor de umidade e proteína total em base seca ( $n=3$ ), determinou-se o rendimento conforme SELLING et al. (2013), descrito na equação 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{(\text{g}_{\text{CPFA}} \times \text{PT}_{\text{CPFA}}) \times (100 - \text{U}_{\text{CPFA}})}{(\text{g}_{\text{inicial FAD}} \times \text{PT}_{\text{FAD}}) \times (100 - \text{U}_{\text{FAD}})} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$\text{g}_{\text{CPFA}}$  = Massa de concentrado proteico de farelo de arroz obtido (g)

$\text{g}_{\text{inicial FAD}}$  = Massa de farelo de arroz inicial (g)

$\text{PT}_{\text{FAD}}$  = Proteína total no farelo de arroz (b.s.) (%)

$\text{PT}_{\text{CPFA}}$  = Proteína total no concentrado proteico de arroz de arroz (b.s.) (%)

$\text{U}_{\text{CPFA}}$  = Umidade do concentrado protéico de farelo de arroz (%)

$\text{U}_{\text{FAD}}$  = Umidade do farelo de arroz (%)

A cor do CPFA foi determinada por medida instrumental utilizando o colorímetro Minolta® (Chroma Meter, CR410, Japão), com esfera de integração e ângulo de visão de 45°, ou seja, iluminação d/45 e iluminante D e os valores de luminosidade  $L^*$ ,  $a^*$  (componente vermelho-verde),  $b^*$  (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema de cor CIELAB (*Commission International for Illumination*). O uso de \* caracteriza os padrões determinados por esta Comissão. As medidas de cor foram realizadas na superfície das amostras do CPFA acondicionadas em placas em Petri, tomando três pontos diferentes de leitura por amostra.

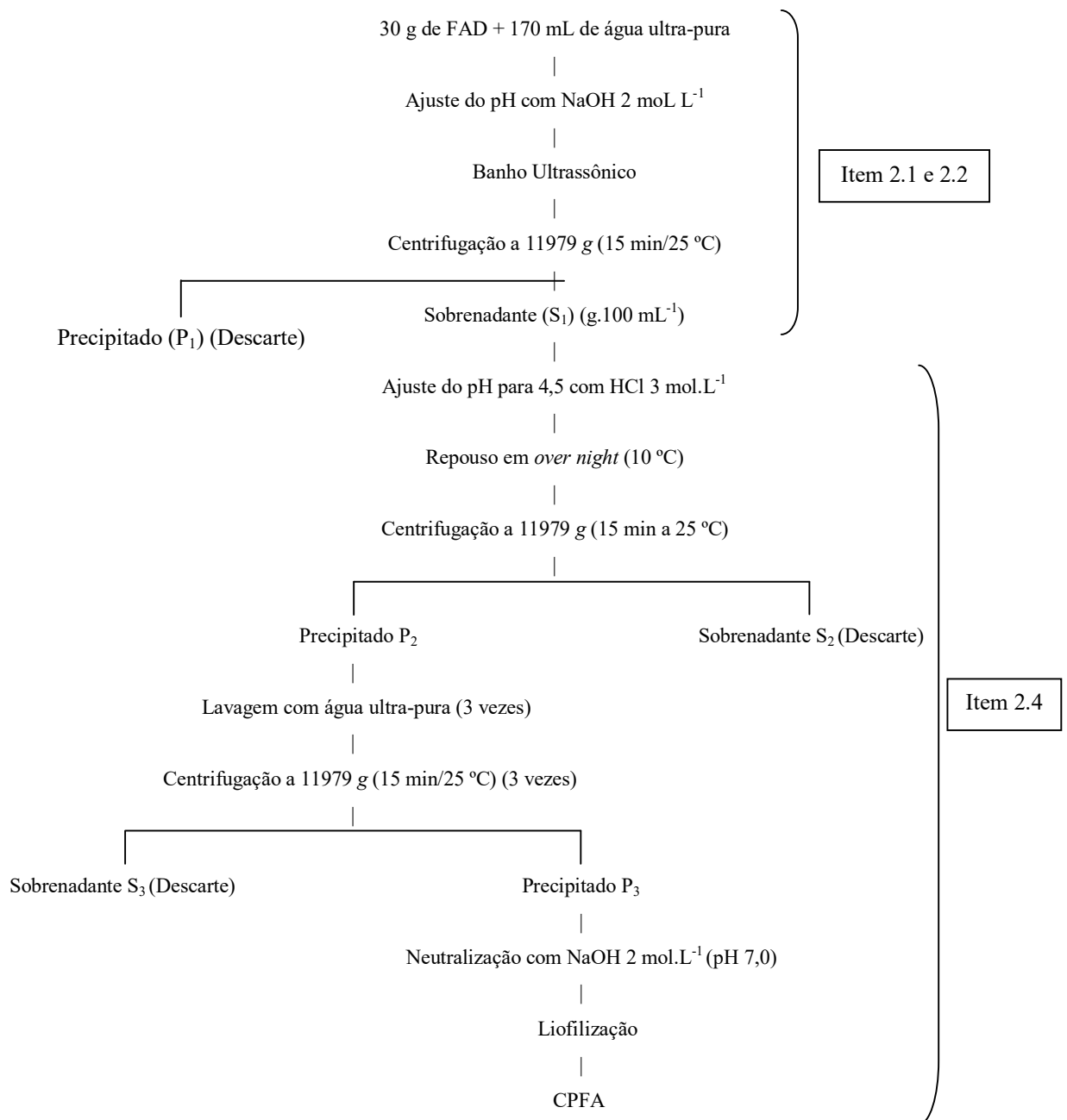


Figura 1. Fluxograma do processo de extração e obtenção do concentrado proteico do farelo de arroz.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO FARELO DE ARROZ

Como investigação inicial, utilizando a frequência 37 ou 80 kHz, avaliou-se o efeito do pH, temperatura (°C), tempo de ultrassom (min) e amplitude da potência (%) na extração de proteínas do farelo de arroz. As variáveis estudadas e as respostas experimentais estão apresentadas na Tabela 01.

Tabela 01 - Matriz do planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração por tratamento alcalino e rompimento celular por ultrassom

| Ensaio | $x_1^a$ | $x_2^b$ | $x_3^c$  | $x_4^d$  | $Y^e$               | $\hat{Y}^f$         |
|--------|---------|---------|----------|----------|---------------------|---------------------|
| 1      | -1 (8)  | -1 (25) | -1 (5)   | -1 (40)  | $0,322^a \pm 0,015$ | $0,263^b \pm 0,004$ |
| 2      | +1 (10) | -1 (25) | -1 (5)   | +1 (100) | $0,368^a \pm 0,006$ | $0,269^b \pm 0,013$ |
| 3      | -1 (8)  | +1 (45) | -1 (5)   | +1 (100) | $0,317^a \pm 0,00$  | $0,265^b \pm 0,004$ |
| 4      | +1 (10) | +1 (45) | -1 (5)   | -1 (40)  | $0,378^a \pm 0,000$ | $0,332^b \pm 0,007$ |
| 5      | -1 (8)  | -1 (25) | +1 (30)  | +1 (100) | $0,323^a \pm 0,005$ | $0,299^b \pm 0,007$ |
| 6      | +1 (10) | -1 (25) | +1 (30)  | -1 (40)  | $0,377^a \pm 0,002$ | $0,351^b \pm 0,005$ |
| 7      | -1 (8)  | +1 (45) | +1 (30)  | -1 (40)  | $0,328^a \pm 0,007$ | $0,297^b \pm 0,007$ |
| 8      | +1 (10) | +1 (45) | +1 (30)  | +1 (100) | $0,444^a \pm 0,016$ | $0,381^b \pm 0,005$ |
| 9      | 0 (9)   | 0 (35)  | 0 (17,5) | 0 (70)   | $0,356^a \pm 0,010$ | $0,316^b \pm 0,005$ |
| 10     | 0 (9)   | 0 (35)  | 0 (17,5) | 0 (70)   | $0,373^a \pm 0,010$ | $0,325^b \pm 0,005$ |
| 11     | 0 (9)   | 0 (35)  | 0 (17,5) | 0 (70)   | $0,366^a \pm 0,002$ | $0,308^b \pm 0,001$ |

<sup>a</sup> pH; <sup>b</sup> Temperatura (°C); <sup>c</sup> Tempo de ultrassom (min); Amplitude de potência (%); <sup>e,f</sup> Respostas Experimentais (média  $\pm$  erro padrão) para a frequência de 37 kHz e 80 kHz (g de proteína.100 g<sup>-1</sup> de extrato), respectivamente. Letras diferentes na mesma linha para as respostas indicam diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

Em condições de pH 10, 45 °C, 30 min de ultrassom e 100% de amplitude da potência (ensaio 8), houve maior rendimento na extração (Tabela 01). Nestas condições, obteve-se o teor de proteínas de  $0,444 \pm 0,016$  g.100 mL<sup>-1</sup> de extrato. Estes resultados confirmaram que quanto mais elevado o pH, maior a extração das proteínas do FAD, devido a maior solubilidade das proteínas. Chen e Houston (1970) usaram pH 7 a 12, agitação por 1 h a 25 °C, observaram que faixas de pH superior a 10 aumentava o rendimento da extração proteica. Martínez-Flores et al. (2006) aplicaram pH 9, 10 e 11 para extrair proteínas de sementes de linhaça e no maior pH, obtiveram concentrado proteico com teor de proteína de 66,03%. Porém, nessas condições de pH acima de 10, proteínas globulares sofrem mudanças de conformação (GOTO; CALCIANO; FINK, 1990). Extraíndo proteína de farinha de lentilhas australianas, Lee et al. (2007) constataram as condições ótimas de extração para a variedade

*Matilda* em pH 9,0 (30 °C) e para *Digger*, em pH 8,5 (35 °C), mas apesar do maior valor proteico, verificaram que nessas condições, houve perda da maior parte das proteínas hidrofílicas, indicado pela ausência de globulina 11S e mudança na qualidade da proteína. De acordo com os resultados obtidos por estes autores, pHs elevados necessitam de atenção porque podem alterar a funcionalidade das proteínas.

Tabela 02 – Efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento da extração por ultrassom

| Fonte de variação                          | 37 kHz |             |        |           | 80 kHz |             |        |           |
|--------------------------------------------|--------|-------------|--------|-----------|--------|-------------|--------|-----------|
|                                            | Efeito | Erro padrão | t (6)  | p - valor | Efeito | Erro padrão | t (6)  | p - valor |
| Média                                      | 0,359  | 0,006       | 64,861 | 0,000*    | 0,310  | 0,006       | 55,109 | 0,000*    |
| (X <sub>1</sub> ) pH                       | 0,069  | 0,013       | 5,345  | 0,002*    | 0,052  | 0,013       | 3,940  | 0,008*    |
| (X <sub>2</sub> ) Temperatura(°C)          | 0,019  | 0,013       | 1,497  | 0,185     | 0,023  | 0,013       | 1,759  | 0,129     |
| (X <sub>3</sub> ) Tempo de Ultrassom (min) | 0,022  | 0,013       | 1,668  | 0,146     | 0,050  | 0,013       | 3,767  | 0,009*    |
| (X <sub>4</sub> ) Amplitude (%)            | 0,012  | 0,013       | 0,898  | 0,404     | -0,008 | 0,013       | -0,573 | 0,588     |

\*  $p \pm 0,05$ ;  $R^2 = 0,85$  para as duas frequências.

Foi possível determinar os efeitos das variáveis estudadas no PFF 2<sup>4-1</sup>, os quais estão apresentados na Tabela 02. Para a frequência de 37 kHz pode-se observar que o pH apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a resposta, sendo este positivo, de modo que a passagem do nível inferior (-1) para o nível superior (+1) do pH resultou em um acréscimo no teor de proteína de 0,069 g.100 mL<sup>-1</sup> de extrato. As variáveis: tempo de ultrassom, temperatura e amplitude do ultrassom apresentaram efeitos positivos sobre a resposta, entretanto estes não foram significativos ( $p > 0,05$ ) no processo de extração. Resultados semelhantes foram obtidos por Jarpa-Parra et al. (2014) que ao extraírem proteínas a partir de sementes de lentilha, verificaram que somente o pH alcalino influenciou na extração da proteína, enquanto que o tempo e a temperatura não tiveram efeito significativo sobre o processo.

Para a frequência de 80 kHz (Tabela 02), as variáveis pH e tempo de ultrassom, apresentaram efeitos significativos sobre a resposta, dentro das faixas estudadas, sendo estes positivos. A temperatura e a amplitude do ultrassom não tiveram efeito significativo para o aumento do rendimento no processo de extração. Porém, o teor de proteínas extraído foi significativamente menor ( $p < 0,05$ , teste de Tukey) em todos os ensaios, indicando que esta frequência não é viável quando comparada a 37 kHz. Portanto, os ensaios do DCCR foram conduzidos somente nesta frequência. Essa diferença está relacionada ao fato de que em

frequências mais baixas, a cavitação é maior (MASON, 2009). Em menores frequências de ultrassom, as bolhas geradas durante a cavitação são relativamente grandes e seu colapso resulta em fortes ondas de choque, que podem ser úteis em aplicações de cortes mecânicos (LEONG; ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011). Em frequências mais altas, é mais difícil criar bolhas de cavitação, mas elas são possíveis devido a menor duração dos ciclos de rarefação em virtude do tempo, temperatura e pressão em colapso, sendo mutuamente dependentes. No entanto, a intensidade ultrassônica não pode ser aumentada indefinidamente, pois as bolhas podem crescer tanto em rarefação que o tempo disponível para o colapso se torna inadequado (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO CAPOTE, 2007). Nas condições de extração assistida por ultrassom, os efeitos mecânicos, cavitacionais e térmicos podem resultar na ruptura das paredes das células, a redução do tamanho de partícula e a transferência de massa pelas membranas celulares, (SHIRSATHA; SONAWANEA; GOGATE, 2012).

Karki et al. (2010) ao extraírem proteína de soja com auxílio de banho de ultrassom, em pH 8,5, frequência de 20 kHz e potência de 1.280 W, observaram que a extração não foi afetada significativamente ( $p > 0,05$ ) pela oscilação de temperatura durante a sonicação (29 a 38 °C). O aumento da extração da proteína não ocorreu pelo efeito térmico do ultrassom, mas sim pela ruptura celular e redução da dimensão das partículas, evidenciado por análise de microscopia eletrônica de varredura. Por outro lado, Zhang; Sanders e Bruins (2014) verificaram que ao extrair proteínas de folhas de chá verde em pH alcalino e sem tratamento ultrassônico, o aumento na produção de proteína foi dependente da temperatura e não do tempo. Durante 4 horas (95 °C) aproximadamente 95% das proteínas puderam ser recuperadas, porém processos de extração proteica em altas temperaturas podem ser desfavoráveis porque podem produzir proteínas de baixa qualidade. Nesse mesmo estudo, demonstrou-se também que o efeito da baixa temperatura (25 °C) produziu apenas 35% das proteínas mesmo quando o processo de extração foi estendido por 3 dias.

Estudos com proteínas isoladas de arroz (PIA), soja (PIS) e ervilha (PIE), em condições neutras de pH, sem tratamento ultrassônico, mostraram que estes vegetais estão num estado altamente agregado devido à desnaturação da proteína a partir do processamento para a obtenção dos isolados. Ao ser incluído o tratamento com ultrassom, em frequência de 20 kHz, amplitude de 95% (intensidade da potência de  $\sim 34 \text{ cm}^{-2}$ ) por tempos de 15, 30, 60 e 120 s, constatou-se que o aumento do tempo de ultrassom provocou redução significativa ( $p <$

0,05) no tamanho da proteína do PIS e PIE, atribuída a uma ruptura das interações hidrofóbicas e eletrostáticas, que mantêm agregados proteicos não tratados provenientes das forças de cisalhamento hidrodinâmicos elevados, associados a cavitação ultrassônica. Por outro lado, para a proteína isolada do arroz, não houve nenhuma redução significativa ( $p > 0,05$ ) no tamanho dos aglomerados, independentemente do tempo de tratamento, pela estrutura altamente agregada do componente insolúvel da PIA, que pode ser atribuída tanto à presença de hidratos de carbono dentro da estrutura agregada e a desnaturação da proteína durante a preparação do isolado proteico, restringindo a redução de tamanho por meio do tratamento por ultrassom (O'SULLIVAN et al., 2015).

O efeito do tempo de ultrassom para a eficiência da extração de puerarin da *Radix Puerariae Lobatae*, uma substância que por muitos séculos tem sido frequentemente utilizada na China como agente antitérmico e antiemético, foi avaliado em frequência de 40 kHz, em tempos de 15, 20, 30, 40, 50 min, e constatou-se que houve aumento na extração com o aumento dos tempos de ultrassom até 30 min (FAN et al., 2012).

Pela análise dos efeitos (Tabela 02), na segunda fase do estudo (DCCR) considerou-se a frequência de 37 kHz, fixou-se a amplitude da potência em 100% e a temperatura em 30 °C. O pH foi uma variável com efeito significativo para o processo de extração, mas como em condições altamente alcalinas existe a possibilidade da geração de produtos indesejáveis oriundas das proteínas (DAMODARAN; PARKIN; FENEMMA, 2010), optou-se em não ampliar acima de 10, mas sim, faixas intermediárias de trabalho foram inclusas. O tempo de tratamento em ultrassom, anteriormente de 25 - 45 min no PFF 2<sup>4-1</sup>, para o DCCR foi deslocado de 15 - 45 min, a fim de verificar a possibilidade de reduzir o tempo de ultrassom do processo de extração proteica, sem causar diminuição na resposta. Industrialmente, o tempo é um fator importante a ser considerado, uma vez que influencia na produtividade e custo de processo (JACOBS; CHAS, 2011).

Os resultados da segunda fase do experimento (DCCR) são apresentados na Tabela 03. Os valores do rendimento da extração proteica (g.100 mL<sup>-1</sup> de extrato) demonstram a influência do pH e o tempo de ultrassom.



Tabela 03 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (codificados e reais) para extração por tratamento alcalino e rompimento celular por banho de ultrassom a 37 kHz

| Ensaio | $x_1^a$   | $x_2^b$    | $Y^c$                  | $\hat{Y}^d$ |
|--------|-----------|------------|------------------------|-------------|
| 1      | -1 (8,3)  | -1 (19)    | $0,335^T \pm 0,008$    | 0,337       |
| 2      | 1 (9,7)   | -1 (19)    | $0,397^b \pm 0,006$    | 0,400       |
| 3      | -1 (8,3)  | 1 (41)     | $0,361^e \pm 0,002$    | 0,378       |
| 4      | 1 (9,7)   | 1 (41)     | $0,381^{cd} \pm 0,005$ | 0,400       |
| 5      | -1,41 (8) | 0 (30)     | $0,354^e \pm 0,004$    | 0,345       |
| 6      | 1,41 (10) | 0 (30)     | $0,419^a \pm 0,002$    | 0,406       |
| 7      | 0 (9)     | -1,41 (15) | $0,367^{de} \pm 0,009$ | 0,367       |
| 8      | 0 (9)     | 1,41 (45)  | $0,419^a \pm 0,004$    | 0,397       |
| 9      | 0 (9)     | 0 (30)     | $0,385^{bc} \pm 0,002$ | 0,391       |
| 10     | 0 (9)     | 0 (30)     | $0,392^{bc} \pm 0,005$ | 0,391       |
| 11     | 0 (9)     | 0 (30)     | $0,397^b \pm 0,000$    | 0,391       |

<sup>a</sup> pH; <sup>b</sup> Tempo de ultrassom (min); <sup>c,d</sup> Resposta Experimental e Predita (média  $\pm$  erro padrão) para a frequência de 37 kHz (g de proteína.100 mL<sup>-1</sup> de extrato), respectivamente; letras diferentes na mesma coluna para as respostas indicam diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

O menor teor de proteínas ( $0,335 \pm 0,008$  g.100 mL<sup>-1</sup> de extrato) foi obtido no ensaio 1, em que o foi utilizado o pH 8,3 e 19 min de ultrassom. A maior extração foi obtida nos ensaios 6 e 8, em que o teor foi de  $0,419 \pm 0,002$  e  $0,419 \pm 0,004$  g.100 mL<sup>-1</sup> de extrato, respectivamente. Ambos os ensaios não diferiram significativamente (p < 0,05).

A análise dos resultados do DCCR permitiu a obtenção dos coeficientes de regressão para a resposta de extração proteica em função das variáveis estudadas (Tabela 04). Pode-se verificar que apenas a variável pH no modelo linear apresentou efeito significativo, sendo este positivo, confirmando os resultados obtidos no PFF. O tempo de ultrassom apresentou efeito positivo para o aumento da resposta mas não significativo.

Tabela 04 – Coeficientes de regressão para resposta de g de proteína.100 mL<sup>-1</sup> de extrato (frequência 37 kHz)

| Fonte de variação                     | Coefficiente de Regressão | Erro padrão | t (S)  | p – valor |
|---------------------------------------|---------------------------|-------------|--------|-----------|
| Média                                 | 0,391                     | 0,010       | 39,774 | 0,000*    |
| (X <sub>1</sub> ) pH (L)              | 0,021                     | 0,006       | 3,540  | 0,017*    |
| (X <sub>1</sub> ) pH (Q)              | -0,008                    | 0,007       | -1,095 | 0,323     |
| (X <sub>2</sub> ) Tempo (min) (L)     | 0,010                     | 0,006       | 1,737  | 0,143     |
| (X <sub>2</sub> ) Tempo (min) (Q)     | -0,005                    | 0,007       | -0,629 | 0,557     |
| (X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> ) | -0,010                    | 0,009       | -1,206 | 0,282     |

\* Diferem entre si (p < 0,05); L: termos lineares; Q: termos quadráticos.

Dessa forma, para validar os resultados do DCCR e confirmar o efeito do tempo de ultrassom, foram realizados dois ensaios em triplicata, mantendo o pH em 10 e a temperatura em 30 °C, nos tempos de 15 e 30 min de tratamento ultrassônico. Na Tabela 05, pode-se verificar que a concentração de proteínas no extrato foi significativamente superior ( $p < 0,05$ , teste de Tukey) no ensaio realizado com 30 min de tratamento. Portanto, para o processo de extração proteica as melhores condições para obtenção do CPFA foram pH 10, 30 min em ultrassom e 100 % de amplitude da potência (30 °C).

Tabela 05 – Resposta da extração (g de proteína. $100^{-1}$  mL de extrato) pelo tempo, obtida em pH 10, ultrassom a 37 kHz e 30 °C

| Ensaio | g de proteína. $100^{-1}$ mL de extrato | p-valor |
|--------|-----------------------------------------|---------|
| 15 min | 0,362 <sup>a</sup> ± 0,007              | 0,0048  |
| 30 min | 0,394 <sup>b</sup> ± 0,008              |         |

\* Médias ± desvio padrão (n = 3 repetições), seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste-t ( $p < 0,05$ ). Base úmida.

A utilização de soluções alcalinas tem sido amplamente utilizada como um método eficiente e prático para a extração de proteínas a partir de fontes vegetais. Em células de plantas, as proteínas dificilmente são solúveis em água devido à sua natureza hidrofóbica e às ligações dissulfetos entre as moléculas de proteína. Acredita-se que a concentração alcalina elevada ajuda a quebrar as ligações de hidrogênio e dissociá-lo do carbono e dos grupos sulfato. O aumento da carga superficial das moléculas de proteínas, leva ao aumento da solubilidade em água (SHEN et al., 2008).

Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA) (Tabela 06). O  $F_{\text{calculado}}$  não foi significativo ( $p=0,090$ ) e menor que o  $F_{\text{tabelado}}$ . O percentual de variação ( $R^2$ ) explicado pelo modelo foi de 0,79; portanto, não foi possível construir superfície de resposta.

Tabela 06 – ANOVA do modelo linear para predição da extração proteica do farelo de arroz

| Fonte de Variação | SQ <sup>a</sup> | GL <sup>b</sup> | QM <sup>c</sup> | Fcalculado | p - valor |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|-----------|
| Regressão         | 0,005           | 5               | 0,001           | 3,662      | 0,090     |
| Resíduos          | 0,002           | 5               | 0,000           |            |           |
| Total             | 0,007           | 10              |                 |            |           |

% variação explicada ( $R^2$ ) = 0,79 ( $F_{0,05, 5, 5} = 5,050$ )

<sup>a</sup> = soma dos quadrados, <sup>b</sup> = graus de liberdade, <sup>c</sup> = quadrados médios

### 3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CPFA

O CPFA obtido na forma de pó cristalino (Figura 2) apresentou para a medida instrumental de cor os valores de  $L^*$   $60,42 \pm 2,15$ ,  $a^*$   $-1,31 \pm 0,53$  e  $b^*$   $20,29 \pm 1,39$ , valores diferentes aos encontrados por Chittapalo e Noomhorm (2009), que avaliaram a cor de um CPFA extraído alcalinamente (pH 11) e tratamento direto com ultrassom (100 W, 5 min) que obtiveram um produto mais claro, com os valores de  $L^*$   $46,17 \pm 0,42$ ;  $a^*$   $5,37 \pm 0,16$  e  $b^*$   $10,7 \pm 0,41$ .



Figura 2. Concentrado proteico do farelo do arroz obtido por ultrassom.

Considerando o teor de umidade do farelo de arroz, sobrenadante  $S_1$ , CPFA de 11,09%, 97,67%, 4,59%, respectivamente. O teor de proteínas (b.s.) destas amostras é apresentado na Tabela 07.

Tabela 07 – Teor de proteínas do farelo de arroz, sobrenadante ( $S_1$ ), concentrado proteico do farelo de arroz e rendimento do processo de extração

| <b>Amostras</b>                                                  | <b>Teor de proteínas*</b>      |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Farelo de arroz (g.100 g <sup>-1</sup> )                         | 14,89 ± 0,29<br>16,75 ± 0,33** |
| Sobrenadante ( $S_1$ ) (g.100 mL <sup>-1</sup> )                 | 0,42 ± 0,00<br>17,93 ± 0,08**  |
| Concentrado Proteico do Farelo de Arroz (g.100 g <sup>-1</sup> ) | 81,43 ± 0,29<br>83,36 ± 3,10** |
| Rendimento (%)                                                   | 4,74                           |

\* Médias ± desvio padrão (n = 3). \*\* Base seca (b.s.).

O rendimento do processo de extração por ultrassom foi de 4,74%, sendo o teor de proteínas do CPFA 83,36%, sendo que em 30 g de FAD foi possível obter 0,2422 g de CPFA (b.u.). Esses valores foram superiores aos encontrados por Chittapalo e Noomhorm (2009) que obtiveram CPFA por extração alcalina (pH 11) e tratamento por ultrassom (100 W, 5 min) com teor proteico de 76,09% e rendimento de processo de 4,45%.

Na extração de vegetais, as sementes e os grãos constituem barreiras para a penetração do solvente e conseqüentemente baixo rendimento (PINGRET; FABIANO-TIXIER; CHEMAT, 2013). Pesquisas relacionadas à extração de polifenóis usando ultrassom a baixa frequência tem demonstrados rendimentos na faixa de 6 a 35% (VILKHU et al. 2011). Por outro lado, o teor de proteínas extraídas neste experimento foi 11,25% superior ao alcançado por Han; Chee e Cho (2015) que ao utilizarem apenas agitação mecânica por 1 h, pH 9,0 e 30 °C, obtiveram um concentrado proteico de arroz com 74,93% de proteínas. Yadav; Yadav e Chaudhary (2011) relataram obter um rendimento de 13,2 % e o teor proteico no CPFA de 37,6%, extraíndo proteínas do FAD a pH 11, agitação por 60 min (60 °C). Zhang et al. (2012) relataram obter o teor de proteínas de 32,9% tratando o farelo de arroz a pH 9,5, agitando durante 2 h (50 °C). Rafe; Mousavi e Shahidi (2014) obtiveram CPFA com teor de proteína de 76% e rendimento de 35,2% usando pH 9,5 e agitação por 30 min (25 °C).

O baixo rendimento desse estudo pode ser explicado porque as proteínas do arroz são extremamente complexas devido à ampla gama de pesos moleculares e diferentes tipos de proteínas presentes (albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas). Elas possuem diferentes graus de hidrogênio, hidrofobicidade e ligações dissulfetos que mantêm os polipeptídeos juntos. Essa complexidade é um grande desafio na extração e separação de proteínas de arroz (ROMERO, 2015).

#### **4 CONCLUSÃO**

A aplicação do ultrassom para a ruptura das paredes celulares do farelo de arroz é um método eficiente e vantajoso. A análise dos efeitos favoráveis ao processo de extração mostrou que o rendimento proteico na EAU foi mais eficiente em frequência de 37 kHz que a 80 kHz. O pH 10 promoveu maior liberação do conteúdo proteico que em pH 8 e 9. Ainda que não houvesse contribuição significativa ( $p > 0,05$ ), a amplitude da potência a 100% é

mais vantajosa que a 40% e 70%, e temperaturas de 30 °C estão em patamar favorável a extração de proteínas. Nestas condições, obteve-se um CPFA na forma de pó cristalino com teor proteico de 83,36 g.100<sup>-1</sup>g com rendimento no processo de 4,74%.

## REFERÊNCIAS

AOAC - **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Maryland, United States: Association of Analytical Communities, 18th ed., 2005.

ASHOKKUMAR, M.; KENTISH, S. The physical and chemical effects of ultrasound. **In: Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. Feng, H.; Barbosa-Cánovas, G. V.; Weiss, J. editores, 2011, Springer: USA, p.1-105.

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

CHEN, M. H.; BERGMAN, C.J. A rapid procedure for analyzing rice bran tocopherol, tocotrienol and  $\gamma$ -oryzanol contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.2-3, 2005.

CHEN, L.; HOUSTON, D.F. Solubilization and recovery of protein from defatted rice bran, v.47, p.72-79, 1970.

CHITTAPALO, T.; NOOMHORM, A. Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.1843–1849, 2009.

CHRASIL, J. Correlations between the physicochemical and functional properties of rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n.9, p.1683-1689, 1992.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FAN, J.-P.; CAO, J.; ZHANG, X.-H.; HUANG, J.-Z.; KONG, T.; TONG, S.; TIAN, Z.-Y.; XIE, Y.-L.; XU, R.; ZHU, J.-H. Optimization of ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of puerarin from *Radix Puerariae Lobatae* by response surface methodology. **Food Chemistry**, v.135, p.2299–2306, 2012.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Rice Market Monitor**, v.18, n.4, p.1-33, 2014.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Prospects for world cereal production in 2015 improve. **Release**. Date 04/06/2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>> Acesso em 21 jun 2015.

GNANASAMBANDAM, R.; HETTIARACHCHY, N.S. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. **Journal of Food Science**, v.60, n.5, p.1066-1074, 1995.

GOGATE, P.R.; KABADI, A.M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.60–72, 2009.

GOTO, Y., CALCIANO, L.J.; FINK, A.L. Acid-induced folding of proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.87, n.2, p. 573–577, 1990.

GUPTA, S.; CHANDI, G.K.; SOGI, D. S. Effect of extraction temperature on functional properties of rice bran protein concentrates. **International Journal of Food Engineering**, v.4, art. 8, 2008.

HAN, S.-W.; CHEE, K.-M.; CHO, S.-J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. **Food Chemistry**, v.172, p.766–769, 2015.

HOOGENKAMP, H. **Rice bran protein**. USA: CreateSpace, 2012.

HUANG, H.-W.; HSU, C.-P.; YANG, B.B.; WANG, C.-Y. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. **Trends in Food Science & Technology**, v.33, p.54-62, 2013.

HYUN-JUN, P.; SUNG-WOOK, H.; DONG-YUN, L.; HONG-KI, K.; HYUN-CHUL, J.; HYUN-HO, P.; SANG-HOON, S. A method for preparing protein concentrate from rice bran. **Patents WO 2009035186 A1**, 2009.

JACOBS, F.R.; CHAS, R.B. **Administração de Operações e da Cadeia de Suprimentos**, 13.ed., São Paulo: McGraw-Hill Education, 2011.

JAMBRAK, A.R.; MASON, T.J.; LELAS, V.; PANIWNKY, L.; HERCEG, Z. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. **Journal of Food Engineering**. V.121, p.15–23, 2014.

JARPA-PARRA, M.; BAMDAD, F.; WANG, Y.; TIAN, Z.; TEMELLI, F.; HAN, J.; CHEN, L. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. **LWT - Food Science and Technology**, v.57, p. 461-469, 2014.

KARKI, B.; LAMSAL, B.P.; VAN LEEUWEN, S.J.(H); POMETTO III,A.L.; GREWELL, D.; KHANAL, S.K. Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.270–278, 2010.

LEE, H.C.; HTOON, A.K.; UTHAYAKUMARAN, S.; PATERSON, J.L. Chemical and functional quality of protein isolated from alkaline extraction of Australian lentil cultivars: Matilda and Digger. **Food Chemistry**, v.102, p.1199–1207, 2007.

LEONG, T.; ASHOKKUMAR, M.; KENTISH, S. The fundamentals of power ultrasound – a review. **Acoustics Australia**, v.39, n.2, 2011.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO CAPOTE, F. **Analytical applications of ultrasound – Techniques and instrumentation in analytical chemistry**. Elsevier: Amsterdam, 2007.

MARTÍNEZ-FLORES, H.E.; BARRERA, E.S.; GARNICA-ROMO, M.G.; PENAGOS, C.J.C.; SAAVEDRA, J.P.; MACAZAGA-ALVAREZ, R. Functional Characteristics of

Protein Flaxseed Concentrate Obtained Applying a Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**, v.71, n.8, p. C495–C498, 2006.

MASON, T.J. Sonochemistry - Beyond Synthesis. **E-Magazine**. Royal Society of Chemistry, v.46, n.5, 2009. Disponível em:

<<http://www.rsc.org/Education/EiC/issues/2009Sept/Index.asp>> Acesso em 18 Nov 2014.

MASSARO, A.F.; PINTO, L.A. Enriquecimento proteico de farelo de arroz desengordurado com sangue bovino, utilizando a técnica de leite de jorro. **Revista - Instituto Adolf Lutz**, v.67, p.77-84, 2002.

MATZ, S.A. **Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed**. 2ed, p.242- 252, EUA, 1991.

O'SULLIVAN, J.; MURRAY, B.; FLYNN.; NORTON, I. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. **Food Hydrocolloids**, p.1-14, 2015.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J.F.; TERÁN, L.C.; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v.98, p.742-748, 2006.

PATIST, A.; BATES, D. **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. Feng, H.; Barbosa-Cánovas, G. V; Weiss, J. editores, 2011, Springer: USA, p.599-616.

PESTANA, V.R.; MENDONÇA, C. R.B.; ZAMBIÁZI, R.C. Farelo de arroz: características, benefícios à saúde e aplicações. **B. CEPPA**, v.26, p.29-40, 2008.

PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; CHEMAT, F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. **Food Control**, n.31, p.593-606, 2013.

RAFE, A.; MOUSAVI, S.S.; SHAHIDI, S.-A. Dynamic rheological behavior of rice bran protein (RBP): Effects of concentration and temperature. **Journal of Cereal Science**, v.60, p.514-519, 2014.

ROMERO, M.V. Rice proteins. In: **Applied Food Protein Chemistry**. Ustunol, Z., 2015. Wiley Blackweel: USA, p.305-322.

SELLING, G.W.; HOJILLA-EVANGELISTA, M.P.; EVANGELISTA, R.L.; ISBELL, T.; PRICE, N.; DOLL, K.M. Extraction of proteins from pennycress seeds and press cake. **Industrial Crops and Products**, v.41, p.113– 119, 2013.

SHEN, L.; WANG, X.; WANG, Z.; WU, Y.; CHEN, J. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. **Food Chemistry**, v.107, p. 929–938, 2008.

SHIRSATHA, S.R.; SONAWANE, S.H.; GOGATE, P.R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. **Chemical Engineering and Processing**, v.53, p.10–23, 2012.



SHOJI, Y.; MITA, T.; ISEMURA, M.; MEGA, T.; HASE, S.; ISEMURA, S.; AOYAGI, Y. A Fibronectin-binding protein from rice bran with cell adhesion activity for animal tumor cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 65, n. 5, p. 1181–1186, 2001.

THANONKAEWA, A.; WONGYAI, S.; MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Effect of stabilization of rice bran by domestic heating on mechanical extraction yield, quality, and antioxidant properties of cold-pressed rice bran oil (*Oryza sativa L.*). *Food Science and Technology*, 48, 231–236, 2012.

TOMITA, H.; KUNO, T.; YAMADA, Y.; OYAMA, T.; ASANO, N.; MIYAZAKI, Y.; BABA, S.; TAGUCHI, A.; HARA, A.; IWASAKI, T.; KOBAYASHI, H.; MORI, H. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Oncology Reports*, v.19,n.1, p.11–15, 2008.

VILKHU, K.; MANASSEH, R.; MAWSON, R.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic recovery and modification of food ingredients. **In: *Ultrasound technologies for food and bioprocessing***. Feng, H.; Barbosa-Cánovas, G. V; Weiss, J. 2011, Springer: USA, p. 345-368.

VOET, D., VOET, J.G. *Bioquímica*, 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N.S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMOGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.411–416, 1999.

YADAV, R.B.; YADAV, B.S.; CHAUDHARY, D. Extraction, characterization and utilization of rice bran protein concentrate for biscuit making. *British Food Journal*, DOI: 10.1108/00070701111174596, v. 113, n.9, p.1173-1182, 2011.

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

ZHANG, C.; SANDERS, J.P.M.; BRUINS, M.E. Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass and bioenergy*, v.67, p.466-472, 2014.

## ARTIGO CIENTÍFICO 4

### PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ OBTIDO POR EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Sílvia BERNARDI<sup>1</sup>, Eliane COLLA<sup>2</sup>, Cristiane CANAN<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Núcleo de Alimentos. Avenida Brasil, 4232, 85884-000 – Medianeira, Paraná, Brasil.

#### RESUMO

As proteínas do farelo do arroz estão entre as mais nobres das proteínas dos cereais. Neste trabalho, avaliou-se a solubilidade e as propriedades funcionais (capacidade de absorção de água e óleo, formação de espuma, estabilidade da espuma, capacidade emulsificante, estabilidade da emulsão e formação de gel) do concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA), obtido por extração alcalina (pH 10) associado de tratamento físico por ultrassom (37 kHz, 100% amplitude da potência, 30 min, 30 °C). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Observou-se que o CPFA é menos solúvel em pH 2, 3, 4 e 5, e muito solúvel na faixa de pH 6 a 10. A capacidade de absorção de água e de óleo foi  $1,04 \pm 0,07 \text{ g.g}^{-1}$  e  $11,75 \pm 0,67 \text{ g.g}^{-1}$ , respectivamente, superior ao da referência Albumina Bovina Sérica (BSA). A maior quantidade de espuma formada ocorreu em pH 4 e 8 ( $41,17\% \pm 2,30$ ;  $48,47\% \pm 1,15$ ) e menor em pH 6 ( $9,96\% \pm 0,00$ ), porém a estabilidade das espumas formadas foi baixa em todos os pHs, e em ambos os casos, a BSA apresentou característica espumante superior. CPFA apresentou boa capacidade emulsificante em pH 2, 4, 6 e 8 ( $56,20\% \pm 5,39$ ;  $66,19\% \pm 6,57$ ;  $67,86\% \pm 0,19$ ;  $72,92\% \pm 2,95$ ) comparáveis a BSA, mas emulsões menos estáveis em pH 2 ( $32,50\% \pm 3,54$ ). Em temperatura de 30 °C e 8 °C, o CPFA apresentou baixa capacidade geleificante, com um gel frágil e pouco consistente. O CPFA apresentou excelentes propriedades funcionais que o tornam um ingrediente promissor para a indústria alimentícia.

Palavras chaves: Subproduto; Solubilidade, Absorção de água e óleo, Espumas, Emulsão, Gel.

#### 1 INTRODUÇÃO

O farelo é um abundante subproduto do arroz (*Oryza sativa L.*) e rico nutricionalmente, característica que o tornou alvo de muitos estudos que buscam alternativas para isolar seus diferentes constituintes de interesse alimentar, especialmente as proteínas (GNANASAMBANDAM; HETTIARACHCHY, 1995; ZHANG et al., 2012; SOUZA et al.,

2015). As proteínas do arroz são moléculas complexas e com diferentes pesos moleculares (albuminas, 14 a 16 KDa; globulinas, 15 a superior a 299 KDa, dependendo do tipo; prolaminas, 12 a 17 KDa e glutelinas, 45 a 150 KDa) e por isso, é um grande desafio sua extração e separação (ROMERO, 2015). Tradicionalmente, a extração alcalina é a mais utilizada no preparo de concentrados proteicos de farelo de arroz (ANDERSON; GURAYA, 2001; XIA et al., 2012; SOUZA et al., 2015) e recursos físicos ou mecânicos podem ser combinados para auxiliar a liberação do conteúdo proteico das células (VOET; VOET, 2006).

O uso do ultrassom vem sendo testado para a extração de proteínas de vegetais (CHITTAPALO; NOOMHORM, 2009; KARKI et al., 2010; O'SULLIVAN et al., 2015) pois tem se mostrado uma alternativa para reduzir o tempo de extração, de energia e volume de solvente, promover maior transferência de energia e proporcionar a obtenção de uma mistura mais homogênea. Permite uma maior seletividade na extração e ainda, os equipamentos são menores e há melhor controle de processo (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

O mecanismo de extração assistida por ultrassom (EAU) é geralmente atribuído ao efeito mecânico e térmico da cavitação que pode resultar na ruptura das paredes celulares, na redução do tamanho das partículas e na transferência de massa através das membranas celulares, devido a implosão de bolhas de cavitação que gera microturbulência de alta velocidade e colisões entre partículas (SHIRSATHA; SONAWANEA; GOGATE, 2012).

A ideia básica da aplicação da sonoquímica no processamento de alimentos está no poder do ultrassom em causar mudanças em algumas propriedades (físico-químicas, funcionais, biológicas, entre outras) que são de interesse tecnológico (JAMBRAK et al., 2009). Desta forma, as propriedades funcionais de uma determinada proteína podem sofrer alterações dependendo do método de extração. Considerando que as proteínas tem grande influência sobre os atributos sensoriais dos alimentos e suas propriedades funcionais (solubilidade, absorção de água e óleo, capacidade espumante, emulsificante, geleificante, entre outras) influenciam no seu desempenho quando inseridas nos sistemas alimentares durante o processamento, armazenamento, preparo e consumo (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010), este trabalho teve por objetivo caracterizar quimicamente e avaliar as propriedades funcionais de um concentrado proteico do farelo de arroz obtido por extração alcalina e aplicação de ultrassom.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

O concentrado proteico do farelo de arroz (CPFA) com teor de proteínas totais de  $83,36 \pm 3,10\%$  (b.s.) foi obtido por extração alcalina a partir do farelo de arroz desengordurado (FAD) fornecido pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais (IRGOVEL - Pelotas/RS) - safra 2013/2014, conforme descrito no item 2.2. A Albumina Sérica Bovina (BSA) (Sigma, EUA) foi usada como padrão de comparação para a determinação da capacidade do CPFA em absorver água e óleo, emulsificar e espumar. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

### 2.2 OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DO FARELO DE ARROZ

O CPFA foi obtido tendo por base a patente de Hyun-Jun et al. (2009) com modificações, onde 30 g de FAD foram suspensos em 170 mL de água ultra pura (MS 2000, Gehaka, Brasil) e o pH ajustado para 10 com solução NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>. A dispersão foi submetida a sonicação em banho de ultrassom (Elmasonic, P60H, Alemanha) a 30 °C, em frequência 37 kHz, por 30 min e 100% de amplitude da potência. Após, foi centrifugada a 11979 g por 15 min (25 °C) (Rotina 420 R, Hettich Zentrifugen, Alemanha), o precipitado (P<sub>1</sub>) descartado e o sobrenadante (S<sub>1</sub>) coletado, sendo seu pH ajustado para 4,5 com HCl 3 mol.L<sup>-1</sup>, considerado o ponto isoelétrico das proteínas do arroz (GUPTA; CHANDI; SOGI, 2008). A solução foi deixada em *over night* para precipitação a frio (10 °C), seguida de centrifugação a 11979 g por 15 min (25 °C). O sobrenadante (S<sub>2</sub>) foi descartado e o precipitado (P<sub>2</sub>) contendo a proteína foi lavado 3 vezes com água ultra pura e armazenado nos próprios tubos da centrífuga, para nova centrifugação a 11979 g por 15 min (25 °C). Para neutralização, ajustou o pH para 7 com NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -18 °C, liofilizadas (Labconco, FreeZone 6, EUA) em pressão absoluta menor que 0,5 mBar, temperatura de aquecimento de 40 °C por 24 h. Posteriormente, o CPFA foi caracterizado quimicamente e suas propriedades funcionais avaliadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTEICO DO FARELO DE ARROZ

### 2.3.1 Composição Centesimal

Foi determinado o teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl e o fator de 5,95 foi utilizado para converter o teor de nitrogênio em proteínas totais, lipídios totais, umidade e cinzas do FAD e do CPFA, segundo a metodologia da AOAC (2005). O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença.

### 2.3.2 Determinação de Teor de Minerais

Adicionalmente, a determinação de elementos-traço nas amostras de concentrado proteico de arroz foi feita por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Previamente à determinação, as amostras foram submetidas ao procedimento de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD). Para esta etapa, foi utilizado um forno de micro-ondas modelo Multiwave 3000 (Anton Paar, Graz, Áustria) equipado com 8 frascos de quartzo. Esse sistema possui sensores que permitem que temperaturas e pressões de 280 °C e 80 bar, respectivamente, sejam atingidas durante a decomposição das amostras. Nesse procedimento, 0,3 g de amostra foram pesadas e adicionadas aos frascos de quartzo, seguido da adição de 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. Os frascos foram fechados e fixados no rotor. Após, o rotor foi inserido na cavidade do forno de micro-ondas e o seguinte programa de aquecimento foi empregado: 1400 W por 10 min (rampa de 15 min) seguidos de 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). Após, os frascos foram abertos e as soluções finais foram transferidas para frascos volumétricos de 25 mL, e o volume foi completado com água ultrapura.

Posteriormente, a determinação dos analitos nas soluções obtidas com a decomposição por MW-AD foi feita utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado modelo ELAN<sup>®</sup> DRC II (PerkinElmer, EUA) equipado com nebulizador pneumático tipo A (Meinhard<sup>®</sup>, EUA) com câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno. Argônio 99.996% (White Martins, São Paulo, Brazil) foi usado como gás principal do plasma,

gás de nebulização e gás auxiliar. As seguintes condições operacionais foram usadas: potência de radiofrequência (1400 W), fluxo de argônio no plasma (15 L min<sup>-1</sup>), fluxo de gás auxiliar (1.2 L min<sup>-1</sup>) e um fluxo de gás de nebulização (1.08 L min<sup>-1</sup>). Os isótopos 75, 112, 59, 52, 65, 55, 98, 58, 208, 121, 82, 120 e 88 foram monitorados para a determinação de As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn e Sr, respectivamente.

### 2.3.3 Determinação do Teor de Proteínas Solúveis

Foi determinado de conforme descrito por Morr et al. (1985), com modificações. Amostras contendo 0,2 g de CPFA foram dispersos em 40,0 mL de água destilada (m/v) e agitadas em agitador magnético (Fisatom, 952, n.12171, Brasil) por 10 min. Posteriormente, adicionou-se lentamente HCl 3 mol.L<sup>-1</sup> ou NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup> sob agitação constante para o ajuste do pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Centrifugou-se o conteúdo a 10000 g por 15 min (Rotina 420 R, Hettich Zentrifugen, Alemanha) a 25 °C. Reservou-se uma amostra mãe sem ajuste de pH e centrifugação. O conteúdo de proteína do sobrenadante e da solução mãe foi determinado segundo Lowry *et al.* (1951) em absorbância 660 nm (UV-Vis Lambda XLS HP9 2FX, Perkin – Elmer, Califórnia, Estados Unidos). O resultado foi expresso pelo teor de proteína solúvel (PS) contida na amostra (equação 1).

$$PS (\%) = \frac{\text{Proteína solúvel no sobrenadante (g)}}{\text{Proteína solúvel da amostra (mãe)}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

## 2.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO CONCENTRADO PROTEICO DO FARELO DE ARROZ

### 2.4.1 Capacidade de Absorção de Água e Óleo

As capacidade de absorção de água (CA<sub>água</sub>) e óleo (CA<sub>óleo</sub>) foram determinadas pela metodologia de Lin; Humbert e Sosulski (1974). Para cada análise pesou-se 0,1 g de CPFA em um tubo graduado tipo Falcon, e adicionou-se 5,0 mL de água ultra pura (MS 2000, Gehaka, Brasil) ou óleo de milho. Agitou-se por 1 min (Vortex, IKA, Staufen, Alemanha). Posteriormente, a amostra foi deixada em repouso por 30 min seguido de centrifugação a 3000 g por 15 min (Cientec, CT 5000 R, Brasil). O sobrenadante foi escorrido

cuidadosamente durante 25 min sobre um vidro relógio. Em seguida, pesou-se o conteúdo residual que permaneceu no tubo juntamente com a amostra de CPFA e deste, considerou-se o conteúdo de água ou óleo absorvido pelo CPFA. Os resultados foram expressos como a  $CA_{\text{água}}$  ou  $CA_{\text{óleo}}$  por grama de proteína ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), conforme as equações 1 e 2, respectivamente.

$$CA_{\text{água}} (\text{g de água} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de amostra}): \frac{\text{Água absorvida pelo CPFA (g)}}{\text{Peso amostra (g)}} \quad \text{Equação 2}$$

$$CA_{\text{óleo}} (\text{g de óleo} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de amostra}): \frac{\text{Óleo absorvido pelo CPFA (g)}}{\text{Peso amostra (g)}} \quad \text{Equação 3}$$

#### 2.4.2 Capacidade de Formação e Estabilidade de Espuma

De acordo com a metodologia de Mohanty; Mulvihill e Fox (1988), com algumas adaptações, preparou-se dispersões contendo 0,02 g de CPFA e 5,0 mL de solução tampão fosfato de sódio  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , com pHs de 4, 6 e 8. As amostras foram mantidas sob agitação por 10 min (Fisatom, 952, n.12171, Brasil), posteriormente colocadas em tubos tipo Falcon graduados e agitados por 1 min com mixer com batedor espiral (Britânia, mod. BMM2, China). Para a determinação da capacidade de formação de espuma ( $CF_{\text{Espuma}}$ ), fez-se a imediatamente a leitura do volume da espuma formada e do líquido residual (equação 4). O resultado foi expresso em porcentagem de  $CF_{\text{Espuma}}$ .

$$CF_{\text{Espuma}} (\%) = \frac{\text{Volume final de espuma (mL)} \times 100}{\text{Volume inicial da dispersão (mL)}} \quad \text{Equação 4}$$

Para a determinação da estabilidade da espuma ( $E_{\text{Espuma}}$ ), a espuma formada para a determinação da  $CF_{\text{Espuma}}$  foi deixada em repouso por 30 min a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e em seguida, o líquido foi drenado com auxílio de uma pipeta, conforme descrito por Díaz; Pereira; Cobos (2004). O resultado foi expresso em porcentagem de  $E_{\text{Espuma}}$  (equação 5).

$$E_{\text{Espuma}} (\%) = 100 - \frac{\text{Volume líquido drenado após 30 min (mL)} \times 100}{\text{Volume inicial da dispersão (mL)}} \quad \text{Equação 5}$$

### 2.4.3 Capacidade de Formação e Estabilidade de Emulsão

A capacidade de formação de emulsão ( $CF_{Emulsão}$ ) e a estabilidade de emulsão ( $E_{Emulsão}$ ) do CPFA foram determinadas conforme metodologia descrita por Cano-Medina et al. (2011), com adaptações. Pesou-se 0,04 g (0,1%) de CPFA e adicionou-se 10,0 mL de solução tampão fosfato de sódio  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  e o pH foi ajustado para pH 2, 4, 6 e 8. A suspensão foi agitada por 5 min (Fisatom, 952, n.12171, Brasil). O processo de emulsificação aconteceu em temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , com adição lenta de gotas de óleo de milho, e agitação vigorosa e contínua. O ponto de formação da emulsão foi verificado visualmente pela fase contínua e homogênea. O volume total da emulsão formada foi colocado em tubo tipo Falcon graduado e posteriormente centrifugado a  $2087 \text{ g}$  (Cientec, CT 5000 R, Brasil) por 5 min. Pelo volume da camada emulsionada após a centrifugação, determinou-se a porcentagem de  $CF_{Emulsão}$  (equação 6).

$$CF_{Emulsão} (\%) = \frac{\text{Volume da camada emulsionada (mL)}}{\text{Volume total (mL)}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Para determinar a  $E_{Emulsão}$ , após a verificação do ponto de emulsificação, a amostra foi submetida a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  conforme descrito por Cano-Medina et al (2011), em banho-maria (Novatécnica, NT245, Brasil) por 30 min. Em seguida, o volume total da emulsão aquecida foi colocado em tubo tipo Falcon graduado e centrifugado a  $2087 \text{ g}$  (Cientec, CT 5000 R, Brasil) por 5 min. Pelo volume da camada emulsionada centrifugada, determinou-se a porcentagem de  $E_{Emulsão}$  (equação 7).

$$E_{Emulsão} (\%) = \frac{\text{Volume da camada emulsionada (mL)}}{\text{Volume total (mL)}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

### 2.4.4 Capacidade de Formação de Gel

Para a determinação da capacidade de formação de gel ( $CF_{Gel}$ ) do CPFA foram pesados 4,0 g de amostra de CPFA e diluídos em 80,0 mL de água destilada. Seguiu-se de aquecimento em chama direta (aproximadamente  $1540 \text{ }^\circ\text{C}$ ) até a aparente gelatinização (aproximadamente 60 min). Após resfriamento ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a altura da amostra foi de cerca 30 mm. As análises foram realizadas com texturômetro (TA.HDPlus Texture Analyser,



Godalming, Surrey, England) e o *probe* cilíndrico A/BE-d35 foi utilizado para compressão da amostra (5 mm). As velocidades pré-teste, teste e pós-teste foram 1,0 mm/s, força do *trigger* de 5 g e célula de carga de 5 kg. Três parâmetros foram obtidos: firmeza (g), consistência (g.s) e coesividade (g).

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística por ANOVA dos resultados foi utilizado o STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) seguido pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) e considerado significativamente diferente quando  $p < 0,05$ .

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTEICO DO FARELO DE ARROZ

Os resultados da composição centesimal do FAD e do CPFA obtido por EAU são apresentados na Tabela 01. Resultados similares aos da composição do FAD deste trabalho foram encontrados por Yadav; Yadav e Chaudhary (2011), porém diferem do CPFA que esses autores obtiveram por extração em pH 11, agitação durante 60 min a 60 °C, possivelmente por diferenças na variedade da matriz ou no método utilizado na extração.

Por extração com auxílio de ultrassom, Chittapalo e Noomhorm (2009) produziram um CPFA com teor proteico de 76,09%, valor inferior aos  $83,36 \pm 3,10\%$  (b.s.) obtidos neste estudo. O teor de lipídeos foi de  $9,03 \pm 0,38\%$  e segundo Cano-Medina et al. (2011), o alto teor lipídico em concentrados e isolados proteicos pode se um fator de desestabilização de espumas. O conteúdo de cinzas do CPFA ( $5,49 \pm 0,37\%$ ) pode estar relacionado a quantidade de cloreto de sódio formado durante a neutralização do CPFA com NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>, conforme relatado por Kaewka; Therakulkait; Cadwallader (2009).

Tabela 01 - Composição química do farelo de arroz desengordurado e do concentrado proteico do farelo de arroz

|                         | Farelo de Arroz | Concentrado Proteico do Farelo de Arroz |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------------------|
| Proteína (%)            | 14,89 ± 0,29    | 81,43 ± 0,29                            |
| Umidade (%)             | 11,09 ± 0,12    | 3,93 ± 0,02                             |
| Lipídeos (%)            | 1,67 ± 0,04     | 9,03 ± 0,38                             |
| Cinzas (%)              | 11,31 ± 0,64    | 5,49 ± 0,37                             |
| Carboidratos totais (%) | 61,03           | ND                                      |

Média ± desvio padrão (n = 3). Base úmida. ND: não detectado.

As espécies de metais e traços presentes no CPFA extraído por uso de ultrassom são apresentadas na Tabela 02. Segundo Damodaram; Parkin e Fenemma (2010), a presença de pelo menos 25 minerais nos alimentos vegetais e animais conhecidos são essenciais para as reações enzimáticas do organismo. Outros elementos não essenciais podem estar presentes nos alimentos como contaminantes, podendo ser tóxicos. A composição mineral final das plantas é influenciada e controlada por sua genética, fertilidade do solo e do ambiente em que cresce.

Tabela 02 – Metais presentes no concentrado proteico do farelo de arroz e em farelo de arroz

| Elemento | Isótopo | CPFA                               |         |                          |                          | Farelo de arroz *                  |
|----------|---------|------------------------------------|---------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|
|          |         | Concentração (µg g <sup>-1</sup> ) | RSD (%) | LD (µg g <sup>-1</sup> ) | LQ (µg g <sup>-1</sup> ) | Concentração (µg g <sup>-1</sup> ) |
| As       | 75      | 2,7 ± 0,24                         | 8,9     | 0,006                    | 0,015                    | -                                  |
| Cd       | 112     | 0,1 ± 0,01                         | 12,6    | 0,0004                   | 0,001                    | -                                  |
| Co       | 59      | 0,95 ± 0,06                        | 6,6     | 0,001                    | 0,004                    | -                                  |
| Cr       | 52      | 0,32 ± 0,02                        | 6       | 0,058                    | 0,083                    | -                                  |
| Cu       | 65      | 25,5 ± 1,85                        | 7,2     | 0,141                    | 0,177                    | 0,37                               |
| Mn       | 55      | 34,4 ± 2,78                        | 8,1     | 0,061                    | 0,07                     | 110-877                            |
| Mo       | 98      | 1,96 ± 0,09                        | 4,5     | 0,005                    | 0,007                    | -                                  |
| Ni       | 58      | 2,4 ± 0,1                          | 4       | 0,032                    | 0,072                    | -                                  |
| Pb       | 208     | 0,46 ± 0,02                        | 3,9     | 0,054                    | 0,065                    | -                                  |
| Sb       | 121     | < 0,050                            | -       | 0,002                    | 0,05                     | -                                  |
| Se       | 82      | < 0,050                            | -       | 0,02                     | 0,05                     | 0,170                              |
| Sn       | 120     | < 0,050                            | -       | 0,006                    | 0,05                     | 17,6-41,3                          |
| Sr       | 88      | 1,5 ± 1,11                         | 7,4     | 0,012                    | 0,017                    | -                                  |
| V        | 51      | < 0,050                            | -       | 0,009                    | 0,05                     | -                                  |
| Zn       | 64      | 13 ± 0,44                          | 3,4     | 0,244                    | 0,395                    | 80                                 |

RSD: desvio padrão relativo; LD: limite detectável; LQ: limite quantificável.

\* Barber; Barber (1980).

No farelo do arroz, a quantidade de microelementos Zn, Mn e Cu pode apresentar diferentes variações, dependendo da composição do solo da área plantada (SHAR et al., 2003). No CPFA, do total de minerais analisados, o Mn foi predominante ( $34,4 \pm 2,78 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), seguido do Cu ( $25,5 \pm 1,85 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e Zn ( $13 \pm 0,44 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Segundo Damodaram; Parkin; Fenemma (2010), a deficiência de Zn gera diminuição da resposta imune, dificultando a cicatrização e a redução do apetite. Elementos como Se, Co, As, Mo estão presentes nos alimentos na forma ligada, formando complexos. A presença de metais pesados Pb ( $0,46 \pm 0,02 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e Cd ( $0,1 \pm 0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) segundo estes autores, podem ter origem do arraste durante a produção do arroz (solo e água com algum grau de contaminação). Nos alimentos, os metais pesados podem alterar as estruturas celulares, as enzimas e substituir minerais co-fatores de atividades enzimáticas (PASCALICCHIO, 2002).

Quanto a solubilidade do CPFA, esta é uma característica muito importante na indústria alimentícia (LI et al., 2010). O comportamento da solubilidade do CPFA quando submetido a diferentes pHs é mostrado na Tabela 03.

Tabela 03 – Índice de solubilidade das proteínas do concentrado proteico do farelo de arroz em diferentes pHs

| <b>pH</b> | <b>Absorbância (660 nm)</b> | <b>ISP (%)</b> |
|-----------|-----------------------------|----------------|
| 2         | $0,121^a \pm 0,002$         | 63,0           |
| 3         | $0,106^a \pm 0,004$         | 55,2           |
| 4         | $0,043^b \pm 0,003$         | 22,2           |
| 5         | $0,134^a \pm 0,004$         | 69,6           |
| 6         | $0,189^c \pm 0,008$         | 98,2           |
| 7         | $0,192^c \pm 0,005$         | 99,7           |
| 8         | $0,190^c \pm 0,013$         | 98,7           |
| 9         | $0,182^c \pm 0,004$         | 94,8           |
| 10        | $0,188^c \pm 0,008$         | 98,1           |

\*Média  $\pm$  desvio padrão seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ( $n = 3$ ). Absorbância da proteína total =  $0,190 \pm 0,007$  (em 660 nm).

Em pH 4, próximo ao ponto isoelétrico (PI) das proteínas do arroz (GUPTA; CHANDI; SOGI, 2008) a solubilidade foi mínima (SP: 22,2%) e diferenciou-se significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais pHs. Os resultados mostraram que em condições ácidas (pH 2, 3 e 5) a solubilidade do CPFA foi menor (SP: 63,0%, 55,2% e 69,6%, respectivamente) e não diferenciaram significativamente entre si ( $p > 0,05$ ). Nesse aspecto, a aplicação do CPFA nessas condições pode ser um pouco limitada se a solubilidade for a

característica principal necessária, exemplo, alimentos líquidos e bebidas (LI et al., 2010). Por outro lado, as proteínas do farelo de arroz obtidas com EAU mostraram ótima solubilidade em pH 6, 7, 8, 9 e 10 com SP de 98,2%, 99,7%, 98,7%, 94,8% e 98,1%, respectivamente, não diferenciando significativamente entre si ( $p > 0,05$ ). Damodaram; Parkin e Fenemma (2010) afirmaram que a solubilidade é mínima em valores próximos ao PI, pela falta de repulsão eletrostática, o que promove a agregação e a precipitação por meio de interações hidrofóbicas. Em valores de pH acima ou abaixo do PI, as proteínas possuem cargas positivas ou negativas, e a repulsão eletrostática e a hidratação dos resíduos carregados promovem a solubilidade das proteínas.

Ao estudarem o comportamento da solubilidade proteica em diferentes pHs, resultados similares a este estudo foram encontrados por Yeom et al. (2010) com isolado proteico de farelo de arroz pré-tratado por autoclavagem (121 °C, 30 min), obtido por extração em pH 9, agitação por 2 h, constatando menor solubilidade em pH 4 e crescimento gradativo com o aumento do pH (6, 7, 8, 9, 10). O mesmo foi observado por Zhang et al. (2012) com o concentrado proteico de farelo de arroz extraído a pH 9,5, agitação a 300 rpm por 2 h, 50 °C.

Em proteínas previamente extraídas com auxílio de ultrassom, verificou-se que a solubilidade de isolado proteico de soro de leite aumentou de 66,8% (sem ultrassom) para 85% quando tratadas em ultrassom a 20 kHz (sonda) e para 84% em ultrassom a 40 kHz (banho), ambos por 15 min (JAMBRAK et al., 2008). A solubilidade do isolado proteico de feijão preto aumentou após tratamento com ultrassom em diferentes potências (150, 300 e 450 W) e tempos (12 e 24 min) em comparação com uma amostra não tratada. Análises aprofundadas mostraram alteração na estrutura secundária e terciária das proteínas do feijão preto após o tratamento de ultrassom, resultando no aumento da hidrofobicidade superficial e na solubilidade proteica, ocasionando o rompimento das interações moleculares hidrofóbicas internas das proteínas e aumento do movimento molecular (JIANG et al., 2014).

## 3.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO CONCENTRADO PROTEICO DO FARELO DE ARROZ

### 3.2.1 Capacidade de Absorção de Água e Óleo

A capacidade de uma proteína se combinar com água ou óleo é uma importante propriedade funcional que muitas vezes implica no uso ou não como ingrediente alimentar e para a aceitabilidade do produto final (DAMODARAM; PARKIN; FENEMMA, 2010).

Tabela 04 – Capacidade de absorção de água e óleo pelo concentrado proteico de farelo de arroz e pela albumina bovina serica

|                                            | CPFA                      | BSA                      |
|--------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| CAA (g de água.g <sup>-1</sup> de amostra) | 1,04 <sup>a</sup> ± 0,07  | 0,40 <sup>b</sup> ± 0,02 |
| CAO (g de óleo.g <sup>-1</sup> de amostra) | 11,75 <sup>a</sup> ± 0,67 | 4,96 <sup>b</sup> ± 0,06 |

\*Média ± desvio padrão seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ( $n = 3$ ). CPFA: concentrado proteico de farelo de arroz / BSA: albumina bovina sérica.

O CPFA obtido por EAU apresentou melhores resultados na CA<sub>água</sub> e CA<sub>óleo</sub> do que a BSA, diferenciando significativamente ( $p < 0,05$ ) (Tabela 04). O CPFA mostrou ser capaz de absorver maior quantidade de água ( $1,04 \pm 0,07$  g de água.g<sup>-1</sup> de CPFA) e óleo ( $11,75 \pm 0,67$  g de óleo.g<sup>-1</sup> de CPFA). Relatos da literatura mostram certa variação nos resultados de CA<sub>água</sub> e CA<sub>óleo</sub> das proteínas estudadas em condições sem aplicação da EAU. Chandi; Sogi (2007) verificaram que o concentrado proteico de farelo de arroz da variedade Basmati 370 (pH 9; agitação por 1 h; 25 °C) apresentou CA<sub>água</sub> de 3,87 g.g<sup>-1</sup> e CA<sub>óleo</sub> de 3,74 g.g<sup>-1</sup>. El Nasri e El Tinay (2007) constataram que um concentrado proteico preparado a partir de sementes de feno grego (*Trigonella foenum graecum*) apresentou CA<sub>água</sub> de 1,68 g.g<sup>-1</sup> e CA<sub>óleo</sub> de 1,56 g.g<sup>-1</sup>. Cao et al. (2009) obtiveram isolado proteico de farelo de arroz (pH 8,5; 30 °C; agitação por 2 h) que apresentou CA<sub>água</sub> de 3,54 g.g<sup>-1</sup> e CA<sub>óleo</sub> de 3,83 g.g<sup>-1</sup>.

A alta absorção de óleo é essencial para a formulação de alimentos como salsichas, massa de bolo, maioneses e molhos para saladas (CHANDI; SOGI, 2007) e é um fator crítico na retenção de sabor (EL NASRI; EL TINAY, 2007). A alta absorção de água pela proteína ajuda reduzir a perda de umidade em produtos embalados de panificação. É uma propriedade essencial da proteína, para proporcionar espessamento e viscosidade em alimentos como sopas, massas, cremes e produtos de panificação. A capacidade de ligação da água com as proteínas alimentares é afetada pela composição de aminoácidos, conformação da proteína e polaridade/hidrofobicidade da superfície (KUMAR et al., 2014). A capacidade da maioria das proteínas em ligar-se a água é maior em pH 9-10 do que a qualquer outro valor, pela ionização da sulfidril e dos resíduos de tirosina. Acima de pH 10, ocorre redução da ligação

da proteína com a água devido a perda de grupos  $\epsilon$ -amino positivamente carregados de resíduos lisil (DAMODARAM; PARKIN; FENEMMA, 2010).

### 3.2.2 Capacidade de Formação e Estabilidade de Espuma

A propriedade de uma proteína em formar espuma refere-se a capacidade de criar uma película fina e resistente na interface gás-líquido, de modo que grandes quantidades de bolhas de gás possam ser incorporadas e estabilizadas na interface (DAMODARAM; PARKIN; FENEMMA, 2010).

Tabela 05.a – Capacidade de formação de espuma do CPFA e BSA, em diferentes pH<sub>s</sub>

| pH   | CF <sub>Espuma</sub> (%)   |                             |
|------|----------------------------|-----------------------------|
|      | CPFA                       | BSA                         |
| pH 4 | 41,17 <sup>aA</sup> ± 2,30 | 109,55 <sup>bA</sup> ± 0,00 |
| pH 6 | 9,96 <sup>aB</sup> ± 0,00  | 79,68 <sup>bB</sup> ± 0,00  |
| pH 8 | 48,47 <sup>aC</sup> ± 1,15 | 54,45 <sup>bC</sup> ± 1,15  |

Tabela 05.b – Estabilidade da espuma do CPFA e BSA, em diferentes pH<sub>s</sub>

|      | E <sub>Espuma</sub> (%)    |                            |
|------|----------------------------|----------------------------|
|      | CPFA                       | BSA                        |
| pH 4 | 0,40 <sup>aA</sup> ± 0,00  | 20,32 <sup>bA</sup> ± 0,00 |
| pH 6 | 14,34 <sup>aB</sup> ± 0,00 | 19,66 <sup>bA</sup> ± 1,15 |
| pH 8 | 12,35 <sup>aB</sup> ± 0,02 | 22,97 <sup>bB</sup> ± 1,15 |

\*Média ± desvio padrão seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Média ± desvio padrão seguidas de letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ( $n = 3$ ). CPFA: concentrado proteico de farelo de arroz / BSA: albumina bovina sérica.

Em pH 4, 6 e 8 (Tabela 05.a), a CF<sub>Espuma</sub> do CPFA foi inferior ao BSA, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ). Em pH 6, o desempenho do CPFA foi baixo, favorecendo nessa condição, sua utilização como aditivo ou complemento alimentar em produtos que não requerem espumas. Em pH 7, Chandi e Sogi (2007) verificaram valor similar na capacidade de formação de espuma do CPFA, variedade Basmati 386 e HBC 19 ( $8,70\% \pm 0,14$  e  $8,10 \pm 0,42$ , respectivamente). Em pH 4 e 8, o CPFA mostrou boa capacidade espumante, podendo ser avaliado como agente de formação de espuma na indústria de alimentos. Os percentuais da BSA atestam sua alta capacidade espumante.

Na Tabela 05.b, em pH 4 a E<sub>Espuma</sub> do CPFA foi baixa e significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação ao pH 6 e 8. A BSA foi mais estável que o CPFA em todos os pHs, diferenciando significativamente ( $p < 0,05$ ). O aumento do pH de 4 para 6 e 8, ocasionou melhora no aumento da estabilidade da espuma do CPFA. Chandi e Sogi (2007) notaram

baixa estabilidade na espuma do concentrado proteico do farelo de arroz, variedade Basmati 386 e Basmati 370 ( $0,65\% \pm 0,02$  e  $0$ , respectivamente), em pH 5. Avaliando CPFA, Zhang et al. (2012) obtiveram espumas mais estáveis em pH 9 que a pH 3 ( $p < 0,05$ ). Embora o aumento na solubilidade da proteína aumenta a capacidade de formação de espuma, a extensa hidrólise pode reduzir a formação de espuma devido a carga excessiva que impede a formação de uma espuma estável (FRANZEN; KINSELLA, 1976).

Neste estudo, constatou-se o maior poder espumante da BSA. Seu ponto isoelétrico é 5,7 e normalmente as espumas são mais estáveis no pH isoelétrico da proteína do que em qualquer outro valor, com exceção das proteínas de origem vegetal porque a falta de interações repulsivas promove interações favoráveis de proteína-proteína e a formação de uma película viscosa na interface (DAMODARAM; PARKIN; FENEMMA, 2010). Proteínas vegetais em pH próximo ao seu ponto isoelétrico podem apresentar propriedades funcionais limitadas (PATINO; SÁNCHEZ; NIÑO, 2008).

A literatura relata que o tratamento de ultrassom (20 kHz e 40 kHz, 15 min) em proteínas do soro, melhorou sua função de formar espumas. Isso se deve ao efeito da homogeneização causada pelo ultrassom, que geralmente dispersa mais uniformemente as partículas de proteína e de gordura, o que pode melhorar a capacidade espumante. Durante o tratamento de ultrassom, as proteínas passaram a ser parcialmente desdobradas em estruturas que promovem o aumento do poder de formação de espuma (JAMBRAK et al., 2008).

De modo geral, proteínas que apresentam boa espumabilidade não precisam ser bons estabilizadores de espuma. A espumabilidade e a estabilidade são influenciadas por dois conjuntos diferentes de propriedades moleculares das proteínas. Espumabilidade é influenciada pela taxa de adsorção, flexibilidade e hidrofobicidade. A estabilidade depende das propriedades reológicas da película da proteína. Para que uma proteína possua espumabilidade e boa estabilidade da espuma é necessário haver equilíbrio entre flexibilidade e rigidez, deve sofrer desdobramento com facilidade e envolver-se em um grande número de interações coesivas na interface (DAMODARAM; PARKIN; FENEMMA, 2010).

### 3.2.3 Capacidade de Formação e Estabilidade de Emulsão

Em muitas aplicações na indústria de alimentos (maionese, massas de bolo, sobremesas, molhos para salada, etc.) a capacidade das proteínas em auxiliar a formação e

estabilização das emulsões é de suma importância (KINSELLA, 1979). A atividade superficial de uma mistura proteína-lípideos é determinada pela proteína e esta satura a interface com maior concentração proteica na solução. No entanto, a atividade lipídica aumenta a atividade superficial do filme proteico com baixa concentração de proteína na solução.

Tabela 06.a – Capacidade de formação de emulsão da PCFA e BSA, em diferentes pH<sub>s</sub>

|      | CF <sub>Emulsão</sub> (%)  |                            |
|------|----------------------------|----------------------------|
|      | PCFA                       | BSA                        |
| pH 2 | 56,20 <sup>aA</sup> ± 5,39 | 55,04 <sup>aA</sup> ± 2,97 |
| pH 4 | 66,19 <sup>aA</sup> ± 6,57 | 66,96 <sup>aA</sup> ± 6,31 |
| pH 6 | 67,86 <sup>aA</sup> ± 0,19 | 75,00 <sup>aA</sup> ± 3,93 |
| pH 8 | 72,92 <sup>aA</sup> ± 2,95 | 65,85 <sup>aA</sup> ± 6,70 |

Tabela 06.b – Estabilidade da emulsão da PCFA e BSA, em diferentes pH<sub>s</sub> (80 °C)

|      | E <sub>Emulsão</sub> (%)   |                             |
|------|----------------------------|-----------------------------|
|      | PCFA                       | BSA                         |
| pH 2 | 32,50 <sup>aA</sup> ± 3,54 | 53,14 <sup>bA</sup> ± 0,28  |
| pH 4 | 58,17 <sup>aB</sup> ± 6,12 | 86,06 <sup>aB</sup> ± 10,29 |
| pH 6 | 66,00 <sup>aB</sup> ± 2,83 | 75,92 <sup>aAB</sup> ± 7,54 |
| pH 8 | 59,25 <sup>aB</sup> ± 4,60 | 61,11 <sup>aAB</sup> ± 7,86 |

\*Média ± desvio padrão seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Média ± desvio padrão seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ( $n = 3$ ). PCFA: concentrado proteico de farelo de arroz / BSA: albumina bovina sérica.

Os resultados de CF<sub>Emulsão</sub> mostram que nos diferentes pHs, o volume emulsionado da PCFA foi similar ao da BSA, não apresentando diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras. Em pH 8, a PCFA apresentou maior poder emulsificante (72,91%) e o menor em pH 2 (56,19%). Entretanto, verificou-se que o volume de emulsão formada pelo PCFA não foi significativamente diferente ( $p > 0,05$ ) entre os pHs 2, 4, 6 e 8 (Tabela 06.a). Nesse sentido, as proteínas vegetais são de qualidade equivalente as da carne, leite e ovos, e sua produção requer substancialmente menos recursos naturais. A popularidade destas proteínas e peptídeos derivados vem aumentando, principalmente por causa de seus benefícios para a saúde (PATINO; SÁNCHEZ; NIÑO, 2008).

Como visto neste trabalho, o pH tem influência na capacidade emulsificante das proteínas, o qual normalmente possuem alta solubilidade no pH isoeletrico (ex.: albumina sérica) e apresentam atividade emulsificante máxima nesse pH. A ausência de carga líquida e interações repulsivas eletrostáticas em pH isoeletrico ajudam a maximizar a carga proteica na interface, promovendo a formação de película altamente viscoelástica, contribuindo para a estabilidade da emulsão. Porém, a falta dessas características entre as partículas podem diminuir a estabilidade da emulsão (DAMODARAM; PARKIN; FENEMMA, 2010).



Em emulsões tipo água em óleo, a formação da estrutura é realizada por gotículas de água que são estabilizadas por interações de partículas como por exemplo, proteínas que se acumulam na interface água-lipídeo. Seu tamanho ou distribuição pode afetar as propriedades reológicas, sensoriais e estabilidade microbiológica. Ainda não surgiram métodos padronizados para se medir as propriedades emulsificantes das proteínas, sendo que os resultados podem ser imprecisos (DAMODARAM; PARKIN; FENEMMA, 2010). Isso pode ser constatado nesse estudo, pelo desvio padrão elevado em alguns ensaios.

Para Cano-Medina et al. (2011), a maior parte da variação nas propriedades funcionais está relacionada com modificações da estrutura das proteínas resultantes das condições de processamento, e ao submeter a emulsão a estresse térmico (80 °C) observou-se que a  $E_{Emulsão}$  do CPFA foi menor (32,50%) em pH 2, e significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) que da BSA (53,13%) nessa condição. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na  $E_{Emulsão}$  do CPFA e BSA nos pHs 4, 6 e 8, porém nas condições estudadas, o CPFA apresentou emulsão menos estável que as da BSA (Tabela 06.b). Entre as amostras de CPFA, constatou-se que o pH 2 é menos estável que pH 4, 6 e 8, diferenciando-se significativamente ( $p < 0,05$ ).

Jambrak et al. (2009) estudaram proteínas vegetais e animais, e avaliaram a  $CF_{Emulsão}$  e a  $E_{Emulsão}$  de emulsões preparadas a partir de proteína concentrada e isolada de soja tratadas com ultrassom (40 kHz – 30 min), observando-se o aumento na  $CF_{Emulsão}$  (43 a 119% superior) e na  $E_{Emulsão}$  (111 a 178% superior). Estas emulsões foram preparadas após tratamentos com ultrassom num sistema em que a proteína de soja foi reorientada para a interface água-óleo. O aumento do índice de estabilidade da emulsão pode ser explicado pela melhor orientação das proteínas, pela influência do comportamento turbulento produzido pelo ultrassom e a integração das bolhas de óleo na emulsão. Estudando as frações  $\beta$ -conglucina (7S) e glicina (11S) da soja, Hu et al. (2015) verificaram que a 40 min de tratamento com ultrassom (frequência 20 kHz), houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na atividade emulsificante da proteína do que a 20 min. O tratamento com ultrassom também aumentou a hidrofobicidade superficial e a solubilidade das frações. Emulsões de proteína de clara de ovo apresentaram maior estabilidade após serem tratadas por 20 min com ultrassom (20 kHz, 20% de amplitude) (ARZENI; PÉREZ; PILOSOF, 2012). Emulsões de proteínas  $\alpha$ -lactalbumina (ALA) sem cálcio, provenientes do soro de leite bovino, foram mais estáveis em pH 7 que a pH 5, pela presença de forças de repulsão eletrostáticas entre as gotículas revestidas de proteína. Antes de emulsioná-las, as amostras de ALA foram pré-tratadas a temperaturas de

25, 65 e 95 °C, e constatou-se que a 65 °C houve aumento da estrutura secundária da ALA, e consequente aumento na estabilidade da emulsão, presumido em partes pela desnaturação e desdobraimento nesta temperatura (LAM; NICKERSON et al. 2015).

### 3.2.4 Capacidade de Formação de Gel

O gel formado pelo CPFA a 30 °C apresentou firmeza e coesividade significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) que a 8 °C (Tabela 07). No atributo consistência, não houve diferença entre as amostras ( $p > 0,05$ ). Ghribi et al. (2015) obteve um gel com concentrado proteico de grão de bico com coesividade de  $0,27 \pm 0,06$  g, inferior a este estudo.

Tabela 07 – Características do gel elaborado com concentrado proteico de farelo de arroz, em diferentes temperaturas de resfriamento

| <b>Amostra</b> | <b>Firmeza (g)</b> | <b>Coesividade (g)</b> | <b>Consistência (g.sec)</b> |
|----------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|
| Gel a 30° C    | $7,30 \pm 0,56^a$  | $4,82 \pm 0,20^a$      | $57,94 \pm 1,43^a$          |
| Gel a 8° C     | $8,21 \pm 0,11^b$  | $5,22 \pm 0,03^b$      | $57,42 \pm 0,53^a$          |

\*Média  $\pm$  desvio padrão seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (n = 3 repetições).

Foi possível verificar visualmente que o gel formado é do tipo opaco (coágulo) o qual, segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2010) ocorre quando as proteínas com grandes quantidades de resíduos de aminoácidos não polares sofrem agregação hidrofóbica durante a desnaturação. Boa parte dos géis é formada por meio do aquecimento se uma solução proteica for moderadamente concentrada. Quando a temperatura do gel é reduzida para temperatura ambiente ou de refrigeração, a diminuição da energia cinética térmica facilita a formação de ligações não covalentes estáveis entre grupos funcionais expostos das diversas moléculas. Quando as redes de gel são sustentadas por ligações não covalentes, são termicamente reversíveis, e se fundirão ao serem aquecidas.

Matos et al. (2014) citam estudos realizados anteriormente por outros pesquisadores afirmando que as proteínas afetam a quantidade de água que o arroz absorve. As interações podem ocorrer através de uma rede de proteínas unidas por ligações dissulfetos, podendo assim inferir, que esse conjunto limita a interação de amido/água e a consequentemente adesão. Géis formulados com proteína costumam ser fracos e propensos a sinerese, confirmando os resultados constatados nesta pesquisa.

Nesse estudo, notou-se que com 5% de amostra, houve baixa capacidade geleificante. Resultado similar foi constatado por Rafe; Mousavi e Shahidi (2014) ao avaliar o comportamento reológico da proteína de farelo de arroz, verificaram que em concentrações de 10 a 15% de CPFA, o produto formado apresentou uma rede fraca e sem capacidade gelificante. Por outro lado, pode ser utilizado como ingrediente para ser incorporado a materiais gelificantes tais como gelatina, para formulações de alimentos nutracêuticos.

#### **4 CONCLUSÃO**

As proteínas do farelo de arroz extraídas por tratamento de ultrassom (37 kHz, 100 % de amplitude da potência, 30 min, 30 °C) possuem características funcionais comparadas a resultados de pesquisas citadas pela literatura que utilizaram agitação mecânica ou extração enzimática, destacando a elevada solubilidade em pH 6 a 10, capacidade de absorção de água e de óleo superior a BSA, boa qualidade espumante em pH 4 e 8 e apreciável capacidade emulsificante em pH 2, 4, 6 e 8. As proteínas obtidas do farelo de arroz, subproduto vegetal altamente disponível, são um ingrediente com atributos funcionais importantes às necessidades da indústria alimentícia da atualidade.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, A.K.; GURAYA, H.S. Extractability of protein in physically processed rice bran. **JAACS**, v.78, n.9, p.969-972, 2001.

AOAC. Official methods of analysis of AOAC international (18th ed.). Maryland, United States: Association of Analytical Communities, 2005.

ARZENI, C.; PÉREZ, O.E.; PILOSOF, A.M.R. Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v.29, p.308-316, 2012.

BARBER, S.; BARBER, C. B. (1980). Rice bran: Chemistry and technology. **In Rice: Production and Utilization**, B. S. Luh. 1991, 2ed, Westport, CT: AVI, p.790-862.

CANO-MEDINA, A.; JIMÉNEZ-ISLAS, H.; DENDOOVEN, L.; HERRERA, R.P.; GONZÁLEZ-ALATORRE, G.; ESCAMILLA-SILVA, E.M. Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. **Food Research International**, v.44, p.684-692, 2011.

CAO, X.; WEN, H.; LI, C.; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal of Cereal Science**, v.50, p.184-189, 2009.

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

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, p.813-835, 2011.

CHITTAPALO, T.; NOOMHORM, A. Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.1843-1849, 2009.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DÍAZ, O.; PEREIRA, C.D.; COBOS, A. Functional properties of ovine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese manufacture by-products. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.601-610, 2004.

EL NASRI, N.A.; EL TINAY, A.H. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. **Food Chemistry**, v.103, p.582-589, 2007.

FRANZEN, K. L.; KINSELLA, J.E. Functional proper-ties of succinylated and acetylated soy protein. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.24, p.788-795, 1976.

GNANASAMBANDAM, R., HETTIARACHCHY, N.S. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. **Journal of Food Science**, v.60, n.5, p.1066-1074, 1995.

GHRIBI, A.M.; GAFSI, I.G.; BLECKER, C.; DANTHINE, S.; ATTIA, H.; BESBES, S. Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. **Journal of Food Engineering**. 2015 , doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.021>.

GUPTA, S.; CHANDI, G.K.; SOGI, D.S. Effect of extraction temperature on functional properties of rice bran protein concentrates. **International Journal of Food Engineering**, v.4, art. 8, 2008.

HAN, S.-W.; JEONG, H.-C.; KIM, H.-K.; LEE, D.-Y.; PARK, H.-H.; PARK, H.-J.; SONG, S.-H. A method for preparing protein concentrate from rice bran. **KR PAT. EP 2061339 A1**, 27 mai 2009.

HU, H.; CHEUNG, I.W.Y.; PAN, S.; LI-CHAN, E.C.Y. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of aggregated soybean  $\beta$ -conglycinin and glycinin. **Food Hydrocolloids**, v.45, p.102 -110, 2015.

HYUN-JUN, P.; SUNG-WOOK, H.; DONG-YUN, L.; HONG-KI, K.; HYUN-CHUL, J.; HYUN-HO, P.; SANG-HOON, S. A method for preparing protein concentrate from rice bran. **Patents WO 2009035186 A1**, 2009.

KAEWKA, K.; THERAKULKAIT, C.; CADWALLADER, C.R. Effect of preparation conditions on composition and sensory aroma characteristics of acid hydrolyzed rice bran protein concentrate. **Journal of Cereal Science**, v.50, p.56–60, 2009.

KARKI, B.; LAMSAL, B.P.; VAN LEEUWEN, S.J.(H).; POMETTO III, A.L.; GREWELL, D.; KHANAL, S.K. Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.270–278, 2010.

KINSELLA, J.E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.56, n.3, p.242-258, 1979.

KUMAR, K.S.; GANESAN, K.; SELVARAJ, K.; SUBBA RAO, P.V. Studies on the functional properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. **Food Chemistry**, v.153, p.353–360, 2014.

JAMBRAK, A.R.; MASON, T.J.; LELAS, L.; HERCEG, Z.; HERCEG, I.L. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p.281–287, 2008.

JAMBRAK, A.R.; LELAS, V.; MASON, T.J.; KREŠIĆ, G.; BADANJAK, M. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p.386–393, 2009.

JIANG, L.; WANG, J.; LI, Y.; WANG, Z.; LIANG, J.; WANG, R.; CHEN, Y.; MA, W.; QI, B.; ZHANG, M. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. **Food Research International**, v.62, p.595–601, 2014.

- LAM, R.S.H.; NICKERSON, M.T. The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin. **Food Chemistry**, v.173, p.163–170, 2015.
- LI, X.; LIU, Y.; YI, C.; CHENG, Y.; ZHOU, S.; HUA, Y. Microstructure and rheological properties of mixtures of acid-deamidated rice protein and dextran. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p.7–12, 2010.
- LIN, M. J.Y.; HUMBERT, E.S.; SOSULSKI, F.W. Certain functional properties of sunflower meal products. **Journal of Food Science**, v.39, n.2, p.368-370, 1974.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biologic and Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MATOS, M.E.; SANZ, T.; ROSELL, C.M. Establishing the function of proteins on the rheological and quality properties of rice based gluten free muffins. **Food Hydrocolloids**, v.35, p. 150-158, 2014.
- MOHANTY, B.; MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. **Food Chemistry**, v.28, n.1, p.17-30, 1988.
- MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.P.; BUREN, V.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Food Science**, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.
- O'SULLIVAN, J.; MURRAY, B.; FLYNN.; NORTON, I. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. **Food Hydrocolloids**, xxx, p.1-14, 2015.
- PASCALICCHIO, A. A. E. **Contaminação por metais pesados. Saúde pública e medicina ortomolecular**. 1 ed. São Paulo: Annablume, 2002.
- PATINO, J. M.R.; SÁNCHEZ, C.C.; NIÑO, M.R. Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.140, p.95–113, 2008.
- RAFE, A.; MOUSAVI, S.S.; SHAHIDI, S.-A. Dynamic rheological behavior of rice bran protein (RBP): Effects of concentration and temperature. **Journal of Cereal Science**, v.60, p.514-519, 2014.
- ROMERO, M.V. Rice Protein. In: **Applied Food Protein Chemistry**. Ustunol, Z. 2015, John Wiley Blackwell: India, p. 305-322.
- SHAR, G. Q.; KAZI, T. G.; SAHITO, S. R.; HAQUE, Q. Comparative study of important macro and micro-nutrient elements between two varieties of rice (*Oryza sativa L.*) and its soil. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v.25, p.233-237, 2003.

SHIRSATHA, S.R.; SONAWANEA, S.H.; GOGATE, P.H. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – A review of current status. **Chemical Engineering and Processing**, v.53, p.10–23, 2012.

SOUZA, D.; SBARDELOTTO, A.F.; ZIEGLER, D.R.; MARCZAK, L.D.F.; TESSARO, I.C. Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method. **Food Chemistry**. xxx (2015) xxx–xxx.

VOET, D., VOET, J.G. **Bioquímica**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

YADAV, R.B.; YADAV, B.S.; CHAUDHARY, D. Extraction, characterization and utilization of rice bran protein concentrate for biscuit making. **British Food Journal**, DOI 10.1108/00070701111174596, v. 113, n.9, p.1173-1182, 2011.

YEOM, H.-J.; LEE, E.-H.; HA, M.-S.; HA, S.-D.; BA, D.-H. Production and physicochemical properties of rice bran protein isolates prepared with autoclaving and enzymatic hydrolysis. **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.**, v.53, n.1; p.62-70, 2010.

XIA, N.; WANG, J.-M.; GONG, Q.; YANG, X.-Q.; YIN, S.-W.; QI, J.-R. Characterization and In Vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction. **Journal of Cereal Science**, v.56, p.482-489, 2012.

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

## ARTIGO CIENTÍFICO 5

### QUALIDADE NUTRICIONAL DO CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ OBTIDO POR EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E SUA APLICAÇÃO EM SUCO DE CAJU

Sílvia BERNARDI<sup>1</sup>, Eliane COLLA<sup>2</sup>, Cristiane CANAN<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Núcleo de Alimentos. Avenida Brasil, 4232, 85884-000 – Medianeira, Paraná, Brasil.

#### RESUMO

Obteve-se o concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) por extração alcalina (pH 10) associado de tratamento por ultrassom (37 kHz, 100% amplitude da potência, 30 min, 30 °C). O perfil de aminoácidos do CPFA indicou a presença de ácido glutâmico, glicina, histidina, arginina, treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina e lisina. Avaliou-se o desempenho sensorial do CPFA aplicado a um suco de caju. Formulações de suco de caju adoçado contendo 0,1%; 0,3% e 0,5% de CPFA foram ordenadas de acordo com a sua preferência por 60 provadores não treinados e verificou-se que não houve diferença significativa entre as amostras ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Friedman. Em função deste resultado, um teste de aceitação foi aplicado a 64 provadores não treinados, utilizando uma fórmula de suco de caju adoçado adicionada de 0,5% de CPFA e uma Controle (sem CPFA). Pelo teste F (ANOVA), constatou-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras nos atributos cor, sabor, aroma e impressão global. Os provadores gostaram moderadamente do Controle, mas foram indiferentes a fórmula com 0,5% de CPFA, uma vez que acentuou as características sensoriais do arroz ao suco de caju.

Palavras chaves: Subproduto, Proteínas, Aminoácidos, Análise sensorial.

#### 1 INTRODUÇÃO

A proteína do arroz tem característica hipocolesterolêmica (CHRASIL, 1992), hipoalergênica e seu perfil de aminoácidos a torna ingrediente apropriado para formulações de alimentos infantis (WANG et al., 1999; HAN; CHEE; CHO, 2015). Embora a fração proteica do arroz seja quantitativamente pequena, apresenta boa composição de aminoácidos para o metabolismo humano e está entre as proteínas mais nobres provenientes dos cereais (WANG et al., 1999).



A sua baixa aplicação como ingrediente alimentar se deve a dificuldade em separá-las por possuírem diferentes graus de hidrogênio, ligações dissulfetos que mantêm unidos seus polipeptídeos e diferentes graus de hidrofobicidade (ROMERO, 2015). Por isso, a extração alcalina é tradicionalmente utilizada para preparar concentrados proteicos de farelo de arroz (XIA et al., 2012; SOUZA et al., 2015), seguida do ajuste do pH no ponto isoelétrico para a precipitação das proteínas (CHANDI; SOGI, 2007). A técnica física utilizando ultrassom pode ser uma alternativa para reduzir o tempo de extração das proteínas do farelo de arroz (CHITTAPALO; NOOMHORM, 2009). Em frequências na ordem de kHz, pode ocorrer com maior intensidade (SANTOS; LODEIRO; CAPELO-MARTÍNEZ, 2009), a formação, o crescimento e o colapso de microbolhas no centro de uma solução aquosa, resultando em rompimento celular que pode gerar a transferência de massa para o meio (LEONG; ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de aminoácidos do concentrado proteico do farelo de arroz (CPFA) e avaliar a aceitabilidade de suco de caju adicionado de CPFA.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

O concentrado proteico do farelo de arroz (CPFA) com teor de proteínas totais de  $83,36 \pm 3,10\%$  (b.s.) foi obtido por extração alcalina a partir do farelo de arroz desengordurado (FAD) fornecido pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais (IRGOVEL - Pelotas/RS) - safra 2013/2014, conforme descrito no item 2.2. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

### **2.2 OBTENÇÃO DO CPFA**

O CPFA foi obtido tendo por base a patente de Hyun-Jun et al. (2009) com modificações, onde 30 g de FAD foram suspensos em 170 mL de água ultra pura (MS 2000, Gehaka, Brasil) e o pH ajustado para 10 com solução NaOH  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ . A dispersão foi submetida a sonicação em banho de ultrassom (Elmasonic, P60H, Alemanha) a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , em

frequência 37 kHz, por 30 min e 100% de amplitude da potência. Após, foi centrifugada a 11979 g por 15 min (25 °C) (Rotina 420 R, Hettich Zentrifugen, Alemanha), o precipitado (P<sub>1</sub>) descartado e o sobrenadante (S<sub>1</sub>) coletado, sendo seu pH ajustado para 4,5 com HCl 3 mol.L<sup>-1</sup>, considerado o ponto isoelétrico das proteínas do arroz (GUPTA; CHANDI; SOGI, 2008). A solução foi deixada em *over night* para precipitação a frio (10 °C), seguida de centrifugação a 11979 g por 15 min (25 °C). O sobrenadante (S<sub>2</sub>) foi descartado e o precipitado (P<sub>2</sub>) contendo a proteína foi lavado 3 vezes com água ultra pura e armazenado nos próprios tubos da centrífuga, para nova centrifugação a 11979 g por 15 min (25 °C). Para neutralização, ajustou o pH para 7 com NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -18 °C, liofilizadas (Labconco, FreeZone 6, EUA) em pressão absoluta menor que 0,5 mBar, temperatura de aquecimento de 40 °C por 24 h. Posteriormente, o CPFA foi caracterizado quimicamente e suas propriedades funcionais avaliadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 2.3 PERFIL DOS AMINOÁCIDOS DO CPFA

Os aminoácidos Ácido Aspartico (Asp), Ácido Gutâmico (Glu), Serina (Ser), Glicina (Gli), Histidina (His), Arginina (Arg), Treonina (Tre), Alanina (Ala), Prolina (Pro), Tirosina (Tir), Valina (Val), Metionina (Mtn), Cistina (Cis), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Fenilalanina (Fen) e Lisina (Lis), além do Nitrogênio Proteico, foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência de ultra-violeta (HPLC-DAD/UV) (n=2), antecedida de hidrólise, derivatização e injeção automatizadas, pelo LAMIC - Laboratório de Análises Micotoxicológicas de Santa Maria/RS, Brasil. O Triptofano (Trp) não foi determinado. Para cada aminoácido essencial do CPFA calculou-se o Escore Químico com base na descrição de Damodaran; Parkin; Fennema (2010):

$$\text{Escore Químico} = \frac{\text{g de aminoácido} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ de proteína CPFA}}{\text{g do mesmo aminoácido} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ de proteína da referência FAO/WHO/UNU (1985)}} \quad \text{Equação 1}$$

### 2.4 AVALIAÇÃO SENSORIAL DE SUCO DE CAJU PREPARADO COM CPFA

Os procedimentos sensoriais deste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê

de Ética do Centro Educacional Integrado Ltda. (CEI), sob o Parecer n.732.996, aplicados em cabines individuais com iluminação fluorescente natural, no Laboratório de Análise Sensorial da UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira, em temperatura ambiente (25 °C).

Aplicou-se um teste de ordenação de preferência (ISO, 2006) para determinar o teor máximo de CPFA a ser adicionado em suco de caju pronto para beber. Cerca de 30 mL de cada amostra foram apresentadas ao mesmo tempo em ordem casualizada e balanceada, em copos descartáveis, codificados com dígitos aleatórios. Sessenta provadores (60) não treinados ordenaram as amostras de acordo com sua preferência global (1: menos preferida; 3: mais preferida). Três formulações foram preparadas contendo 80% de água mineral, 14% de suco de caju concentrado (marca Maguary, Brasil) adquirido no comércio local da cidade de Medianeira/PR e 5,5% de açúcar, e adicionadas de 0,1%, 0,3% e 0,5 % de CPFA.

Após a determinação do teor do CPFA a ser adicionado ao suco de caju pelo teste de ordenação de preferência, as formulações teste (com CPFA) e controle (sem CPFA) foram submetidas ao teste de aceitação (STONE; SIDEL, 2003), utilizando escala hedônica de 9 pontos (9: gostei extremamente; 1: desgostei extremamente) com 64 provadores não treinados, avaliando os atributos: cor, sabor, aroma e impressão global. Cerca de 30 mL de cada amostra, servidas em copos descartáveis previamente codificados, foram apresentadas aleatoriamente aos provadores, de forma monádica e sequencial.

Em ambas as análises, antes de provar cada amostra, os julgadores foram orientados a beber água mineral (25 °C). As fichas de avaliação sensorial são apresentadas nos Anexos 1 e 2.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise sensorial, para o Teste de Ordenação de Preferência a significância estatística foi verificada pelo teste de Friedman (CHRISTENSEN et al, 2006) e para o Teste de Aceitação, aplicou-se o teste F (ANOVA), sendo considerado significativamente diferente quando  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 PERFIL DE AMINOÁCIDOS DO CPFA

No organismo, os aminoácidos são elementos de construção para a síntese das proteínas e peptídeos, e como fonte de nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos e compostos nitrogenados. Para os sistemas biológicos, uma das principais dificuldades é obter nitrogênio numa forma facilmente utilizável. Os tecidos vegetais contêm quantidades consideráveis (20-75%) de nitrogênio não proteico. As plantas podem conter quantidades substanciais de aminas, purinas, pirimidinas, nucleosídeos, betaínas, alcaloides, porfirinas e aminoácidos não proteínogênicos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Estes autores afirmam que aminoácidos livres podem influenciar no sabor de frutas e hortaliças, e os seus derivados, no aroma. Kaewka; Therakulkait; Cadwallader (2009) sugerem que a utilização de hidrólise suave gera uma mistura de aminoácidos livres e peptídeos considerados importantes na formação do sabor. Guimarães e Lanfer-Marquez (2005) verificaram que as concentrações de proteína bruta presentes em sopas desidratadas foram de 5,2 vezes maiores que as concentrações protéicas reais, sendo possível comprovar a presença de N de origem não-protéica.

As utilizações primárias dos aminoácidos são elementos de construção para síntese de proteínas e peptídeos, e como fonte de nitrogênio para síntese de outros aminoácidos e compostos nitrogenados, como a base dos nucleotídeos. Os seres humanos sintetizam 11, chamados de não essenciais. Os essenciais devem ser fornecidos pela dieta e são formados por vias muito mais complexas do que os não essenciais (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004). Os cereais e vegetais costumam ser limitantes em pelo menos um aminoácido essencial. Adultos que consomem apenas esse tipo de proteína podem ter problemas em manter sua saúde (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Um processo de extração é eficiente, a partir do momento que o material extraído mantém sua qualidade nutricional e funcional. Proteínas de alta qualidade contêm todos os aminoácidos essenciais em maior nível do que a referência da FAO/OMS/UNU (1985). Apesar das necessidades de aminoácidos serem diferentes para cada indivíduo e depender de fatores variados, o padrão mínimo de segurança recomendado é o para crianças de 2 a 5 anos. Os resultados apresentados na Tabela 01 mostram que todos os aminoácidos do CPFA não possuem alto valor biológico porque seu escore químico é inferior a 1,0, sendo a leucina o

aminoácido limitante (0,42). A qualidade da proteína avaliada pelo escore químico é baseada no aminoácido essencial limitante, no qual valores maiores que 1,0 indicam que a proteína é de boa qualidade (PIRES et al., 2006).

Tabela 01 – Escore químico do concentrado proteico obtido no experimento

| Aminoácidos essenciais                                        | Teor de AA CPFA<br>(g aminoácido.100 g <sup>-1</sup> CPFA) | Proteína padrão<br>FAO/WHO/UNU<br>(2-5 anos)<br>(g aminoácido.100 g <sup>-1</sup><br>proteína) | Escore<br>Químico do<br>CPFA<br>(g aminoácido.100<br>g <sup>-1</sup> CPFA) |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Triptofano                                                    | Nd                                                         | 1,1                                                                                            | Nd                                                                         |
| Histidina                                                     | 1,55 ± 1,20                                                | 1,9                                                                                            | 0,82                                                                       |
| Metionina + cistina                                           | 1,95                                                       | 2,5                                                                                            | 0,78                                                                       |
| Treonina                                                      | 2,65 ± 1,06                                                | 3,4                                                                                            | 0,78                                                                       |
| Valina                                                        | 2,25 ± 0,21                                                | 3,5                                                                                            | 0,64                                                                       |
| Fenilalanina + tirosina                                       | 2,90                                                       | 6,3                                                                                            | 0,46                                                                       |
| Isoleucina                                                    | 1,25 ± 0,21                                                | 2,8                                                                                            | 0,45                                                                       |
| Lisina                                                        | 2,50 ± 0,00                                                | 5,8                                                                                            | 0,43                                                                       |
| Leucina                                                       | 2,80 ± 0,28                                                | 6,6                                                                                            | 0,42                                                                       |
| Ác. glutâmico                                                 | 8,75 ± 0,49                                                |                                                                                                |                                                                            |
| Glicina                                                       | 2,75 ± 0,64                                                |                                                                                                |                                                                            |
| Arginina                                                      | 5,55 ± 1,20                                                |                                                                                                |                                                                            |
| Metionina                                                     | 0,80 ± 0,14                                                |                                                                                                |                                                                            |
| Fenilalanina                                                  | 1,65 ± 0,07                                                |                                                                                                |                                                                            |
| Aminoácidos totais<br>(g aminoácido.100 g <sup>-1</sup> CPFA) | 45,60 ± 0,43                                               |                                                                                                |                                                                            |

AA: aminoácidos; Nd: não determinado; CPFA: concentrado proteico de farelo de arroz (dados experimentais - proteínas totais: 83,36 ± 3,10% (b.s.); Proteína padrão para pré-escolares (2-5 anos): FAO/WHO/UNU, 1985.

Tabela 02 – Perfil de aminoácidos do concentrado proteico obtido no experimento, comparado aos padrões do farelo de arroz, arroz integral, proteína isolada de soja, albumina sérica bovina e ao padrão recomendado de aminoácidos para proteínas alimentares para crianças (g aminoácido.100 g<sup>-1</sup> CPFA)

| Tipo | Aminoácidos *           | CPFA *      | CPFA<br>(Tang et al.,<br>2003) | CPFA<br>(Han; Chee;<br>Cho, 2015) | Arroz<br>Integral | PIS   | BSA   |
|------|-------------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------|-------|
| E    | Ác. glutâmico           | 8,75 ± 0,49 | 17,60                          | Ni                                | 12,87             | 20,20 | 17,70 |
| E    | Glicina                 | 2,75 ± 0,64 | 5,80                           | Ni                                | 3,12              | 4,00  | 2,40  |
| E    | Histidina               | 1,55 ± 1,20 | 3,10                           | 4,48                              | 1,56              | 2,50  | 0,43  |
| E    | Arginina                | 5,55 ± 1,20 | 9,80                           | Ni                                | 5,16              | 7,70  | 5,90  |
| E    | Treonina                | 2,65 ± 1,06 | 3,70                           | 3,68                              | 2,44              | 3,70  | 5,80  |
| E    | Valina                  | 2,25 ± 0,21 | 6,90                           | 5,53                              | 3,44              | 4,70  | 5,90  |
| E    | Metionina               | 0,80 ± 0,14 | Ni                             | Ni                                | 1,45              | 1,10  | 1,00  |
| E    | Isoleucina              | 1,25 ± 0,21 | 4,50                           | 3,61                              | 2,38              | 4,80  | 2,50  |
| E    | Leucina                 | 2,80 ± 0,28 | 7,90                           | 7,69                              | 5,14              | 7,60  | 11,70 |
| E    | Fenilalanina            | 1,65 ± 0,07 | 5,00                           | Ni                                | 3,22              | 5,30  | 6,70  |
| E    | Lisina                  | 2,50 ± 0,00 | 5,20                           | 4,55                              | 2,37              | 6,00  | 12,40 |
| E    | Triptofano              | Nd          | Ni                             | 1,17                              | Ni                | 1,40  | 0,80  |
| NE   | Ác. aspártico           | 4,05 ± 0,64 | 10,90                          | Ni                                | 6,41              | 11,70 | 11,60 |
| NE   | Serina                  | 2,25 ± 0,21 | 4,50                           | Ni                                | 3,39              | 5,40  | 5,00  |
| NE   | Alanina                 | 2,95 ± 0,07 | 7,10                           | Ni                                | 3,76              | 3,90  | 6,50  |
| NE   | Prolina                 | 1,45 ± 0,35 | Ni                             | Ni                                | 2,93              | 5,20  | 4,70  |
| NE   | Tirosina                | 1,25 ± 0,21 | 3,80                           | Ni                                | 2,18              | 3,70  | 5,10  |
| NE   | Cistina                 | 1,15 ± 0,35 | Ni                             | Ni                                | 6,70              | 1,20  | 5,10  |
|      | Metionina + cistina     | 1,95        | Ni                             | 2,70                              | 8,15              | 2,30  | 6,10  |
|      | Fenilalanina + tirosina | 2,9         | Ni                             | Ni                                | 5,40              | 9,00  | 11,80 |

E: Essencial; NE: Não essencial; Nd: não determinado; Ni: não informado.

\* aminoácidos não determinados: triptofano, asparagina, glutamina, selenocisteína.

CPFA: concentrado proteico de farelo de arroz (dados experimentais - Proteínas totais: 83,36 ± 3,10% (b.s.); Arroz Integral: FAO, 1981; PIS: proteína isolada de soja (Huff; Carroll, 1980); BSA: albumina sérica bovina (PRATA; SGARBIERI, 2008)

O perfil de aminoácidos do CPFA deste estudo apresentou maior teor de ácido glutâmico (8,750 ± 0,495), arginina (5,550 ± 1,202) e ácido aspártico (4,050 ± 0,636), g.100 g<sup>-1</sup> (Tabela 02). Os ácidos glutâmico e aspártico também foram os principais aminoácidos encontrados em uma bebida preparada a base de extrato aquoso de farelo de arroz orgânico (FACCIN et al., 2009). No estudo, a metionina + cistina e a fenilalanina + tirosina apresentaram teor de 1,950 e 2,900 g.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. A fenilalanina do CPFA foi de 1,650 ± 0,071 g.100 g<sup>-1</sup>, não sendo um ingrediente recomendado para fenilcetonúricos, uma patologia provocada por erro no metabolismo da fenilalanina e por isso, o paciente deve ser alimentado com alimentos pobres desse aminoácido (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004),

pois mesmo os indivíduos com fenilcetonúria devem consumir pequenas quantidades para evitar a inanição proteica ou estado catabólico (MCPHEE; GANONG, 2007).

O teor de aminoácidos do CPFA está em quantidade menor quando comparado ao do arroz integral, da proteína isolada de soja e da BSA (Tabela 02). Por outro lado, são aminoácidos extraídos de um subproduto altamente disponível e podem ser uma opção viável como ingrediente em formulações alimentares. É raro encontrar um vegetal que possua o perfil completo de aminoácidos e por isso, é importante complementar com outras fontes proteicas que ajudem a melhorar a qualidade nutricional final da alimentação. O CPFA obtido por extração alcalina com associação de ultrassom apresentou doze aminoácidos essenciais, ainda que com baixo valor nutricional, podem ser combinadas com outras proteínas vegetais para melhorar a qualidade da mistura proteica (HELLWIG; OTTEN; MEYERS, 2006).

Estudos anteriores (Tabela 02) apresentam variações no perfil de aminoácidos das proteínas do farelo de arroz, obtidas por extração alcalina. Tang et al. (2003) extraíram enzimaticamente proteínas do farelo de arroz, secas por *spray dryer*, e Han; Chee; Cho (2015) extraíram a pH 9, com agitação durante 1 h, 30 °C. As divergências constatadas nos resultados desse estudo frente aos dados da literatura precisam ser pesquisadas e aprofundadas na tentativa de elucidar as possíveis causas de variação.

### 3.2 AVALIAÇÃO SENSORIAL DE SUCO DE CAJU PREPARADO COM CPFA

O painel de provadores não treinados foi composto por estudantes e colaboradores da universidade, com idade entre 20 e 40 anos, sendo 58% mulheres e 42% homens.

A preferência das formulações de suco de caju acrescidas de diferentes percentuais de CPFA (0,1%, 0,3% e 0,5%), avaliadas da menos preferida (1) para a mais preferida (3) mostrou que a soma das ordens de cada amostra não diferiram significativamente entre si ( $p > 0,05$ ). Por esse motivo, para a próxima etapa optou-se em usar a formulação com maior concentração de CPFA (0,5%), tendo como referência a legislação brasileira de complementação dos padrões de identidade e qualidade para bebida composta, que estabelece para o extrato de soja em pó que equivale a 0,5% proteína de soja (BRASIL, 2013).

A aceitação da fórmula de suco de caju enriquecido com 0,5% de CPFA e da amostra Controle é apresentada na Tabela 03. Os provadores não treinados avaliaram cada atributo,

variando de “desgostei extremamente (1) para gostei extremamente (9)” e opinando sobre a impressão global das amostras.

Tabela 03 – Valores médios da aceitação dos atributos do suco de caju pelos provadores não treinados

| Atributos        | F-0,5%            | Controle          |
|------------------|-------------------|-------------------|
| Cor              | 5,28 <sup>a</sup> | 7,58 <sup>b</sup> |
| Sabor            | 5,56 <sup>a</sup> | 7,13 <sup>b</sup> |
| Aroma            | 5,72 <sup>a</sup> | 7,20 <sup>b</sup> |
| Impressão global | 5,88 <sup>a</sup> | 7,48 <sup>b</sup> |

\*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si ( $p > 0,05$ ) (n=64 provadores); F-0,5%: Fórmula de suco de caju adoçado e acrescido de 0,5% de CPFA.

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre F-0,5% e a amostra Controle em todos os atributos. Os provadores gostaram moderadamente do Controle, mas foram indiferentes a F-0,5%. O pH ácido do suco de caju (3,64) está próximo ao ponto isoelétrico das proteínas do arroz (pH 4,5) (GUPTA; CHANDI; SOGI, 2008), fazendo com que não ocorresse total solubilização do CPFA e levando a precipitação do mesmo. Essa característica também é observada em sucos comerciais adicionados de concentrados proteicos de soja. Pelos valores atribuídos ao quesito sabor, é possível afirmar que o CPFA é um ingrediente promissor para a tecnologia dos alimentos. O aroma característico da proteína do farelo de arroz é devido à presença de aminoácidos livres, pequenos peptídeos, sal e vários aromas compostos (KAEWKA; THERAKULKAIT; CADWALLADER, 2009). Avaliando globalmente as amostras, o comportamento dos provadores sobre a F-0,5% sugere valores próximos a “gostei ligeiramente” (5,88), mostrando que há potencial para sua aplicação como ingrediente, sendo necessárias pesquisas para avaliar seu desempenho sensorial em outras formulações alimentares. Este valor está de acordo ao obtido por Faccin et al. (2009) ao avaliar sensorialmente uma bebida preparada com extrato aquoso de farelo de arroz orgânico. Kaewka; Therakulkait; Cadwallader (2009) obtiveram hidrolisados proteicos de farelo de arroz secos em *spray dryer* e os submetem de forma pura, pó e líquido, a um painel de provadores treinados que detectaram aromas adocicados, com *flavor* semelhante a biscoito (pó), e notas salgadas e terrosas (líquido).



#### **4 CONCLUSÃO**

O perfil de aminoácidos do CPFA obtido por extração alcalina associado de ultrassom apresentou elevado conteúdo de ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico e baixo teor dos demais aminoácidos essenciais. Sensorialmente, o suco de caju enriquecido de 0,5% CPFA não apresentou diferença significativa em relação à preferência das formulações com concentrações inferiores de CPFA, porém, obteve notas menores ao ser comparado ao Controle, uma vez que acentuou as características sensoriais do arroz no suco de caju. O CPFA agrega valor ao farelo de arroz e pode ser utilizado como ingrediente complementar em sistemas alimentares.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa N° 19. Diário Oficial da União. Brasília, 19 jun. 2013.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5.ed., Porto Alegre: Guanabara Koogan, , 2004.
- CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p.592–597, 2007.
- CHITTAPALO, T.; NOOMHORM, A. Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.1843–1849, 2009.
- CHRASIL, J. Correlations between the physicochemical and functional properties of rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n.9, p.1683-1689, 1992.
- CHRISTENSEN, Z. T.; OGDEN, L. V.; DUNN, M. L.; EGGETT, D. L. Multiple Comparison Procedures for Analysis of Ranked Data. **Journal of Food Science**, v.71, n.2, p.132-143, 2006.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- FACCIN, G. L.; VIEIRA L. N.; MIOTTO, L. A.; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. Chemical, sensorial and rheological properties of a new organic rice bran beverage. **Rice Science**, v.16, n.3, p226–234, 2009.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Amino-acid content of Foods and Biological Data on Proteins. ISBN 92-5-001102-4: Italy, 3.ed. 1981.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation: Geneva, 1985.
- GUIMARÃES, C. P.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Estimativa do teor de fenilalanina em sopas desidratadas instantâneas: importância do nitrogênio de origem não-protéica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.3, 2005.
- GUPTA, S.; CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Effect of extraction temperature on functional properties of rice bran protein concentrates. **International Journal of Food Engineering**, v.4, art. 8, 2008.
- HAN, S.-W.; CHEE, K.-M.; CHO, S.-J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. **Food Chemistry**, v.172, p.766–769, 2015.

HELLWIG, J. P.; OTTEN, J. J.; MEYERS, L. D. (Ed). **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements**. National Academies Press, 2006, p.144-155.

HUFF, M. W.; CARROLL, A. K. Effects of Dietary Proteins and Amino Acid Mixtures on Plasma Cholesterol Levels in Rabbits. **J. Nutr.** v.110, p.1676-1685, 1980.

HYUN-JUN, P.; SUNG-WOOK, H.; DONG-YUN, L.; HONG-KI, K.; HYUN-CHUL, J.; HYUN-HO, P.; SANG-HOON, S. A method for preparing protein concentrate from rice bran. **Patents WO 2009035186 A1**, 2009.

ISO (2006). **Sensory analysis. Methodology**. Ranking (ISO 8587). Geneva (Switzerland): International Organization for Standardization.

KAEWKA, K.; THERAKULKAIT, C.; CADWALLADER, C.R. Effect of preparation conditions on composition and sensory aroma characteristics of acid hydrolyzed rice bran protein concentrate. **Journal of Cereal Science**, v.50, p.56–60, 2009.

LEONG, T.; ASHOKKUMAR, M.; KENTISH, S. The fundamentals of power ultrasound – a review. **Acoustics Australia**, v.39, n.2, 2011.

MCPHEE, S. J.; GANONG, W. F. **Fisiopatologia da Doença: Uma introdução à medicina clínica**. 5.ed, Mc Graw-Hill: Porto Alegre, 2007.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.1, p.179-187, 2006.

PRATA, A. S.; SGARBIERI, V. C. Composition and physicochemical properties of two protein fractions of bovine blood serum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4, p.964-972, 2008.

ROMERO, M. V. Rice proteins. **In: Applied Food Protein Chemistry**. Ustunol, Z., 2015. Wiley Blackweel: USA, p.305-322.

SANTOS, H. M.; LODEIRO, C.; CAPELO-MARTÍNEZ, J-L. **Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications**. José-Luis Capelo-Martínez, 2009, Wiley-VCH: Germany, p.1-15.

SOUZA, D.; SBARDELLOTTO, A. F.; ZIEGLER, D. R.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C. Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method. **Food Chemistry**, 2015.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. Academic Press: New York, 2003, p. 377.

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

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMOGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.411–416, 1999.

XIA, N.; WANG, J.-M.; GONG, Q.; YANG, X.-Q.; YIN, S.-W.; QI, J.-R. Characterization and In Vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction. **Journal of Cereal Science**, v.6, p. 482-489, 2012.

## ANEXOS – ARTIGO CIENTÍFICO 5

### TESTE DE ORDENAÇÃO DE PREFERÊNCIA

Nome: ..... Idade: ..... Data: .....

Você está recebendo quatro amostras de suco de caju.

Por favor, prove e ordene-as em ordem crescente de preferência.

Código

\_\_\_\_\_

1 - Menos preferida

\_\_\_\_\_

3 - Mais preferida

Comentários:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Anexo 1.** Modelo de ficha de avaliação sensorial para o teste de ordenação de preferência.

### TESTE DE ACEITAÇÃO

Nome: ..... Idade: ..... Data: .....

Você está recebendo duas amostras codificadas de Suco de Caju. Por favor, prove e avalie cada uma das amostras utilizando a escala de valores a seguir:

- (9) Gostei extremamente
- (8) Gostei muito
- (7) Gostei moderadamente
- (6) Gostei ligeiramente
- (5) Indiferente
- (4) Desgostei ligeiramente
- (3) Desgostei moderadamente
- (2) Desgostei muito
- (1) Desgostei extremamente

| Amostra | Cor | Sabor | Aroma | Impressão Global |
|---------|-----|-------|-------|------------------|
|         |     |       |       |                  |
|         |     |       |       |                  |

Comentários:

Observando a escala de valores acima, marque na tabela o número que representa o quanto você gostou ou desgostou do produto:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Anexo 2.** Modelo de ficha de avaliação sensorial para o teste de aceitação.