

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

EDIANEZ UMBELINA FERRAZZO DO CARMO

**EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA DO FARELO DE ARROZ POR
TRATAMENTO ULTRASSÔNICO E ENZIMÁTICO E
CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS**

DISSERTAÇÃO

MEDIANEIRA

2020

EDIANEZ UMBELINA FERRAZZO DO CARMO

**EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA DO FARELO DE ARROZ POR
TRATAMENTO ULTRASSÔNICO E ENZIMÁTICO E
CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS**

**EXTRACTION OF PROTEIN FRACTION FROM RICE BRAN BY
ULTRASONIC AND ENZYMATIC TREATMENT AND
CHARACTERIZATION OF FUNCTIONAL PROPERTIES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eliane Colla

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Canan

MEDIANEIRA

2020



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



TERMO DE APROVAÇÃO

EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA DO FARELO DE ARROZ POR TRATAMENTO ULTRASSÔNICO E ENZIMÁTICO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS

Por

EDIANEZ UMBELINA FERRAZZO DO CARMO

Esta dissertação foi apresentada às quinze horas, do dia quinze de outubro de dois mil e dezanove como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Processos Tecnológicos na Indústria de Alimentos, 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.

Prof^ª. Dr^ª. Eliane Colla (Orientadora–PPGTA)

Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Silveira Simões (Membro Externo – IFPR)

Prof^ª. Dr^ª. Deisy Alessandra Drunkler (Membro Interno – UTFPR)

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa.

“Não se compreende todo o caminho num grande e único passo: novas estradas se abrem quando se persiste no caminhar.”
(Paulo Freire)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade de chegar até aqui e por sempre colocar pessoas especiais em minha vida.

Dedico a vocês, meus pais, Iris e Orlando, essa dissertação, que por inúmeras vezes acreditaram mais em mim, que eu mesma. Sem vocês nada disso seria possível, minha eterna Gratidão e amor por vocês. Obrigado por tudo!

À minha irmã, que sempre me motivou, que esteve ao meu lado e ajudou a tornar tudo possível. Você é minha luz!

À minha orientadora, profa. Dra. Eliane Colla, por toda orientação conduzida, competência, apoio e confiança depositada. O agradecimento se estende à minha coorientadora, Cristiane Canan.

Aos amigos que fiz nessa jornada, em especial aos que motivaram, apoiaram e ensinaram, Danielly, Thaís, Jaciara e Djonatham.

Às alunas de iniciação científica, Thayná, Ana Lídia e Maria Luiza.

Aos professores que colaboram com minha formação e aos que me ampararam em momentos de dificuldade, Ilton, Rosana, Daneysa, Arcangelo e Paulo, minha Gratidão.

À UTFPR – Toledo e ao IFPR – Foz do Iguaçu, em permitir o uso de seus laboratórios e equipamentos.

Agradeço aos membros da banca examinadora pelas contribuições para melhoria do meu trabalho, por meio de sugestões, correções e por aceitarem participar da minha banca.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

DO CARMO, E. U. F. **Extração da fração proteica do farelo de arroz por tratamento ultrassônico e enzimático e caracterização das propriedades funcionais.** 75f. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia De Alimentos. Universidade Tecnológica Federal Do Paraná - Campus Medianeira.

Novas técnicas de extração de 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. O uso do ultrassom vem sendo testado para a extração de proteínas de vegetais devido ao efeito mecânico e térmico da cavitação. O isolamento das proteínas através da remoção enzimática pode ser realizado com diversas enzimas, entres elas, encontram-se a pancreatina, as proteases alcalinas, fúngicas ou bacterianas, em conjunto ou não com a ação de amilases e carboidrases. A fim de obter um Concentrado Proteico de Farelo de Arroz (CPFA) e um Hidrolisado Proteico de Farelo de Arroz (HPFA) com alto rendimento e propriedades tecnológicas adequadas, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a extração de proteínas do Farelo de Arroz Desengordurado (FAD) por tratamento em sonda ultrassônica e por via enzimática. Foi aplicada uma estratégia sequencial de planejamento experimental, composto por um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF) seguido de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para determinação das variáveis de influência nos processos e para a otimização dos métodos de extração. O rendimento proteico do processo de extração por sonda ultrassônica foi de 6,01%, e o CPFA apresentou 76,01% de proteínas. Já o rendimento proteico do processo de extração enzimática foi de 4,63%, sendo que o HPFA apresentou 71,19% de proteínas. O HPFA apresentou solubilidade de 96,06%, já o CPFA de 95,34%, ambos em pH 9. O HPFA apresentou capacidade de absorção de água de 5,08 g.g⁻¹, sendo superior ao do CPFA (3,21 g.g⁻¹) e não diferiu significativamente na capacidade de absorção de óleo (11,56 g.g⁻¹ e 11,38 g.g⁻¹, respectivamente), valores estes superiores ao da referência Albumina Bovina Sérica (BSA). A maior formação de espuma ocorreu em pH 8 (CPFA: 46,66%; HPFA: 36,00%), e a estabilidade das espumas formadas foi baixa em todos os pHs; em ambos os casos, a BSA apresentou característica espumante superior. A capacidade de formação de emulsão do CPFA não apresentou diferença significativa quando comparada a da BSA em pH 6 (76,27% e 75,46%), assim como a estabilidade da emulsão, que foi de 56,60% (CPFA) e 58,40% (BSA) em pH 8. As análises térmicas demonstraram que os métodos de extração influenciaram na estabilidade térmica e nas estruturas das proteínas, a proteína extraída por sonda ultrassônica apresentou estruturas secundárias do tipo α -hélice, que favorecem a formação de emulsão. Já as proteínas extraídas pelo método enzimático apresentaram maior sensibilidade à degradação térmica. Os tratamentos demonstraram ter aceitável rendimento proteico de extração. As propriedades funcionais demonstraram que o CPFA e HPFA tem potencial de aplicação como ingrediente, com atributos funcionais importantes às necessidades da indústria alimentícia.

Palavras-chave: Cavitação. Eficiência de extração. Propriedades funcionais. Proteínas de resíduos agroindustriais. Tratamento enzimático.

ABSTRACT

DO CARMO, E. U. F. **Extraction of protein fraction from rice bran by ultrasonic and enzymatic treatment and characterization of functional properties.** 75 f. Project (Master's Degree) - Post-Graduate Program in Food Technology, Federal Technological University of Paraná. Medianeira, 2020.

New techniques for protein extraction from rice bran have been studied to increase the process yield by reducing the extraction time, volume of organic solvents, reducing costs and environmental pollution. The use of ultrasound has been tested for the extraction of proteins from vegetables due to the mechanical and thermal effect of cavitation. The isolation of proteins through enzymatic removal can be carried out with several enzymes, including pancreatin, alkaline, fungal or bacterial proteases, together or not with the action of amylases and carbohydrases. In order to obtain a Rice Bran Protein Concentrate (RBPC) and a Rice Bran Protein Hydrolyzate (RBPH) with high yield and adequate technological properties, the main objective of this work was to evaluate the protein extraction from Defatted Rice Bran (DRB) by ultrasonic probe treatment and by enzymatic route. A sequential strategy of experimental design was applied, consisting of a Fractional Factorial Design (FFD) followed by a Central Composite Rotatable Design (CCRD) to determine the variables of influence on the processes and to optimize the extraction methods. The protein yield of the ultrasonic probe extraction process was 6.01%, and the RBPC presented 76.01% of proteins. The protein yield of the enzymatic extraction process was 4.63%, and the RBPH presented 71.19% of proteins. The RBPH showed a solubility of 96.06%, while the RBPC was 95.34%, both at pH 9. The RBPH had a water absorption capacity of 5.08 gg⁻¹, being higher than that of the RBPC (3.21 gg⁻¹) and did not differ significantly in the oil absorption capacity (11.56 gg⁻¹ and 11.38 gg⁻¹, respectively), values higher than those of the reference Serum Bovine Albumin (SBA). The greatest foaming occurred at pH 8 (RBPC: 46.66%; RBPH: 36.00%), and the stability of the foams formed was low at all pHs; in both cases, the SBA showed superior sparkling characteristics. The emulsion formation capacity of RBPC showed no significant difference when compared to that of SBA at pH 6 (76.27% and 75.46%), as well as the stability of the emulsion, which was 56.60% (RBPC) and 58.40% (SBA) at pH 8. The thermal analyzes showed that the extraction methods influenced the thermal stability and the structures of the proteins, the protein extracted by ultrasonic probe showed secondary structures of the α -helix type, which favor the emulsions formation. The proteins extracted by the enzymatic method showed greater sensitivity to thermal degradation. The treatments showed to have an acceptable protein extraction yield. The functional properties demonstrated that RBPC and RBPH have potential for application as an ingredient, with important functional attributes to food industry.

Keywords: Cavitation. Extraction efficiency. Functional properties. Agro-industrial waste proteins. Enzymatic treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Corte longitudinal de um grão de arroz.....	16
Figura 02 - Ultrassom tipo banho (Indireta).....	21
Figura 03 - Sonda ultrassônica/ <i>probe</i> (Direta).....	21
Figura 04 - Fluxograma do processo de obtenção do hidrolisado proteico do farelo de arroz através de extração assistida por sonda ultrassônica.....	30
Figura 05 - Fluxograma do processo de obtenção do hidrolisado proteico do farelo de arroz através de extração enzimática.....	31
Figura 06 - Superfície de resposta (A) e Curvas de curvas de contorno (B) do teor de proteína extraído do farelo de arroz (g de proteína.100g ⁻¹ de farelo) em função do pH e da razão farelo:água (g/L).....	42
Figura 07 - Superfície de resposta (A) e Curvas de curvas de contorno (B) do teor de proteína extraído do farelo de arroz (g de proteína.100g ⁻¹ de farelo) em função do tempo (minutos) e temperatura (°C).....	48
Figura 08 - Curva de solubilidade para o concentrado proteico (CPFA) e hidrolisado proteico (HPFA) de farelo de arroz em função do pH.....	52
Figura 09 - Curvas DTA (análise térmica diferencial) das amostras de proteínas extraídas por método enzimático (HPFA) e por ultrassom (CPFA).....	58
Figura 10 - Curvas TG (a) e suas derivadas correspondentes DTG (b) para proteínas extraídas pelo método enzimático (HPFA) e por ultrassom (CPFA).....	59
Figura 11 - Espectros FTIR-ATR das amostras de proteínas extraídas pelo método enzimático (HPFA) e por ultrassom (CPFA).....	60
Figura 12 - Espectros de FTIR-ATR de amostras de proteínas extraídas por ultrassom (a) e por método enzimático (b) na faixa de número de onda de 1720 a 1570 cm ⁻¹ , correspondente a banda de amida I.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração em sonda ultrassônica.....	26
Tabela 02 - Matriz do DCCR com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração em sonda ultrassônica.....	27
Tabela 03 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração enzimática.....	27
Tabela 04 - Matriz do DCCR com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração em sonda ultrassônica.....	28
Tabela 05 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração em sonda ultrassônica e resposta experimental.....	38
Tabela 06 - Efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento da extração das proteínas do farelo de arroz por ultrassom.....	39
Tabela 07 - Matriz do DCCR com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração em sonda ultrassônica.....	40
Tabela 08 - Coeficientes de regressão para a resposta de teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g ⁻¹ de farelo).....	41
Tabela 09 –Análise de variância do modelo para predição do teor de proteínas extraídas do farelo de arroz por ultrassom.....	41
Tabela 10 - Resposta da extração (g de proteína.100 g ⁻¹ de farelo), obtida em pH 10, 40% de amplitude de potência em 5 minutos.....	43
Tabela 11 – Comparação do teor de proteína extraída em diferentes alturas de imersão.....	43
Tabela 12 – Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração enzimática e resposta experimental.....	44
Tabela 13 – Efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento da extração enzimática das proteínas do farelo de arroz desengordurado.....	45
Tabela 14 – Matriz do DCCR com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração enzimática.....	46
Tabela 15 – Coeficientes de regressão para a resposta g de proteína.100 g ⁻¹ de farelo.....	47

Tabela 16 – Análise de variância do modelo para predição do teor de proteínas extraídas do farelo de arroz desengordurado pelo método enzimático.....	47
Tabela 17 – Resposta da extração (g de proteína.100 g ⁻¹ de farelo), obtida em pH 9, 3% de protease em 150 minutos.....	48
Tabela 18 – Composição centesimal do farelo de arroz desengordurado, do concentrado proteico do farelo de arroz e do hidrolisado proteico do farelo de arroz.....	49
Tabela 19 – Teores de proteínas e de umidade do FAD, do CPFA e do HPFA para determinação do rendimento do processo de extração.....	50
Tabela 20 – Capacidade de absorção de água e óleo pelo concentrado proteico de farelo de arroz, hidrolisado proteico de farelo de arroz e pela albumina bovina sérica.....	53
Tabela 21 – Capacidade de formação de espuma do CPFA, HPFA e BSA, em diferentes pHs.....	54
Tabela 22 – Estabilidade da espuma do CPFA, HPFA e BSA, em diferentes pHs.....	55
Tabela 23 – Capacidade de formação de emulsão do CPFA, HPFA e BSA, em diferentes pHs.....	56
Tabela 24 - Estabilidade de emulsão do CPFA, HPFA e BSA, em diferentes pHs.....	57
Tabela 25 – Comparação da proporção das estruturas secundárias das proteínas (%) em amostras de proteínas extraídas por método de ultrassom e método enzimático, determinado por espectroscopia FTIR-ATR a partir da deconvolução da banda amida I (1720 - 1570 cm ⁻¹).....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	ARROZ: COMPOSIÇÃO E PRODUÇÃO MUNDIAL.....	16
3.1.1	<i>Farelo de arroz desengordurado (FAD)</i>	18
3.2	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS: MÉTODOS CONVENCIONAIS E EMERGENTES	20
3.2.1	<i>Extração alcalina</i>	20
3.2.2	<i>Extração assistida por ultrassom</i>	20
3.2.3	<i>Extração enzimática</i>	22
3.3	PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES	25
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	25
4.3	ESTRATÉGIAS DE EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO.....	25
4.3.1	<i>Extração assistida por sonda ultrassônica</i>	25
4.3.2	<i>Extração enzimática</i>	27
4.4	CONDUÇÃO DOS ENSAIOS DE EXTRAÇÃO	28
4.4.1	<i>Extração assistida por sonda ultrassônica e obtenção do concentrado proteico</i>	28
4.4.2	<i>Extração enzimática e obtenção do hidrolisado proteico</i>	30
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO FAD	32
4.5.1	<i>Composição centesimal</i>	32
4.5.2	<i>Rendimento global e proteico dos métodos de extração</i>	32
4.6	PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO FARELO DE ARROZ.....	33
4.6.1	<i>Solubilidade</i>	33
4.6.2	<i>Capacidade de absorção de água e de óleo</i>	33
4.6.3	<i>Capacidade de formação e estabilidade de espuma</i>	34
4.6.4	<i>Capacidade de formação e estabilidade de emulsão</i>	35
4.7	ANÁLISES TÉRMICAS (DTA E TG) E ESTRUTURAIS (FTIR)	36

4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO FARELO DE ARROZ	38
5.1.1	<i>Extração assistida por sonda ultrassônica</i>	<i>38</i>
5.1.1.1	<i>Influência da profundidade de imersão da sonda.....</i>	<i>43</i>
5.1.2	<i>Extração enzimática.....</i>	<i>44</i>
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO E DO HIDROLISADO PROTEICO.....	49
5.2.1	<i>Composição centesimal.....</i>	<i>49</i>
5.2.2	<i>Rendimento global e proteico dos métodos de extração.....</i>	<i>50</i>
5.3	PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO.....	51
5.3.1	<i>Solubilidade.....</i>	<i>51</i>
5.3.2	<i>Capacidade de absorção de água e de óleo.....</i>	<i>53</i>
5.3.3	<i>Capacidade de formação e estabilidade de espuma</i>	<i>54</i>
5.3.4	<i>Capacidade de formação e estabilidade de emulsão.....</i>	<i>56</i>
5.4	ANÁLISES TÉRMICAS.....	58
5.4.1	<i>DTA e TG.....</i>	<i>58</i>
5.4.2	<i>Análise de infravermelho com transformada de Fourier em modo de refletância atenuada (FTIR-ATR).....</i>	<i>60</i>
6	CONCLUSÕES	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que as proteínas de origem animal possuem maior valor biológico quando comparadas às proteínas de origem vegetal; entretanto, o alto custo e o baixo poder aquisitivo limitam o acesso de uma parte da população às proteínas de origem animal. Com isso, o estudo e a identificação de espécies vegetais ricas em proteínas torna-se uma opção de consumo para toda a população, inclusive àquelas com dietas restritivas, como os vegetarianos (FERREIRA; BERGMAN, 2008).

Atualmente, o uso de resíduos agrícolas tem se destacado com o objetivo de minimizar o desperdício e, conseqüentemente, o dano ambiental causado (SALANTI et al., 2010). O farelo de arroz desengordurado é considerado um produto residual do processamento de arroz. Trata-se de um subproduto secundário muitas vezes descartado ou utilizado na alimentação animal a um preço reduzido (MARIOD et al., 2010). Porém, estudos indicam que se trata de uma boa fonte de proteínas, fibras alimentares, vitaminas B e E, antioxidantes, minerais e compostos fenólicos (MALEKIAN et al., 2000; JARIWALLA, 2001).

O farelo de arroz desengordurado é uma das partes mais nutritivas do grão de arroz. Contém cerca de 19,2% de proteínas, 5,7% de lipídios, 11,7% de cinzas, 47,1% de carboidratos e 7,1% de fibra bruta, dependendo das condições de processamento (SILVEIRA; FURLONG, 2007).

A proteína de farelo de arroz apresenta uma boa qualidade nutricional para o consumo humano, quando comparado com a maioria das proteínas de origem vegetal, e tem como vantagem, em relação a outros farelos (trigo, aveia, cevada e centeio) a ausência de glúten, podendo, portanto, ser consumida por indivíduos celíacos (HAMMOND, 1994; ZHANG et al., 2012).

Considerando que as proteínas influenciam nos atributos sensoriais dos alimentos e em algumas propriedades funcionais (capacidade de absorção de água e óleo, geleificante, solubilidade, emulsificante, espumante, entre outras), dependendo do método de extração, tais propriedades podem sofrer alterações, influenciando durante o processamento, armazenamento, preparo e consumo destes alimentos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Para que a proteína vegetal possa ser utilizada industrialmente é necessário a realização do rompimento da parede celular (VOET; VOET, 2006). A extração alcalina, seguida pela precipitação das proteínas pelo ajuste do pH no ponto isoelétrico é o método mais comum de produção de isolados proteicos de arroz (BIZZOTTO et al., 2006). No entanto, tal processo

pode causar reações secundárias indesejáveis e potencialmente tóxicas, reação de Maillard, desnaturação da proteína e perda do valor nutritivo (WANG et al., 1999).

Como alternativa, métodos como a extração assistida por ultrassom (EAU) de proteínas vegetais vem se destacando (VILKHU et al., 2011) por tratar-se de um processo que permite maior seletividade, redução do tempo de extração, maior transferência de calor, proporciona a obtenção de misturas mais homogêneas, menores gastos com solventes e apresenta melhor controle de processo (CHEMAT, 2011).

O ultrassom apresenta potencial benéfico para a extração e isolamento de compostos bioativos. A aplicação do ultrassom divide-se em duas áreas: baixa potência e alta frequência ($<1 \text{ W.cm}^{-2}$; 1-10 MHz) utilizado para fins de diagnóstico clínico; e alta potência e baixa frequência ($10\text{--}1000 \text{ W.cm}^{-2}$; 20-100 kHz) usado em reações químicas, sendo capaz de alterar as propriedades dos alimentos (físico-químicas, funcionais, biológicas) que são de interesse tecnológico (PICÓ, 2013). Este processo ocorre através da cavitação, que consiste na formação, crescimento e colapso de microbolhas no centro de uma solução aquosa, causando a ruptura das paredes celulares, reduzindo o tamanho das partículas e facilitando a transferência de massa através das membranas celulares (SHIRSATHA; SONAWANEA; GOGATE, 2012).

A obtenção de isolado proteico de farinha ou farelo de arroz, tem sido estudado através da remoção enzimática de conteúdos não proteicos. Algumas enzimas como pancreatina, proteases alcalinas, fúngica ou bacteriana, podem ser utilizadas na extração enzimática de proteínas (FISCHER et al., 2001; EUBER, 1991). Em outros casos, métodos enzimáticos foram desenvolvidos com o principal objetivo de isolar apenas o amido do arroz, utilizando proteases alcalinas e/ou neutras; no entanto, os baixos conteúdos de proteína obtidos no amido indicam que é possível obter subprodutos ricos em proteína (LUMDUBWONG; SEIB, 2000; WANG; WANG, 2001; WANG; WANG, 2004).

Bernardi (2015) avaliou a extração de proteínas do farelo de arroz em meio alcalino sob agitação, assistida por tratamento em banho ultrassônico, observando um rendimento de 4,74% e teor de proteínas do CPFA de 83,36%, quando utilizado pH 10, 30 min de ultrassom, 100% de amplitude da potência (30°C).

Considerando a importância econômica, a influência do arroz na dieta da população e a qualidade de sua proteína, torna-se de grande interesse a continuação do estudo da extração das proteínas do farelo de arroz, através da combinação de outras técnicas, com a possibilidade de geração de concentrado proteico de elevado rendimento e alta qualidade nutricional, funcional e tecnológica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o processo de extração de proteínas do farelo de arroz por tratamento ultrassônico e tratamento enzimático e caracterizar a fração proteica quanto as propriedades funcionais tecnológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a matéria-prima farelo de arroz desengordurado quanto à composição centesimal;
- Avaliar o efeito das variáveis pH, tempo de processo, temperatura, amplitude da potência, razão farelo:água na resposta de percentual de proteínas extraídas em ultrassom (sonda), pela aplicação de um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF);
- Avaliar o efeito das variáveis concentração de protease, tempo de processo, temperatura, pH, na resposta de percentual de proteínas extraídas por método enzimático, pela aplicação de um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF);
- Com as variáveis selecionadas nos PFFs, aplicar Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR) para a otimização dos processos;
- Caracterizar o CPFA e o HPFA por meio de análise térmica diferencial (DTA) e termogravimétrica (TG) e analisar a estrutura proteica de ambos pela técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).
- Caracterizar o CPFA e o HPFA por meio da determinação da composição centesimal e propriedades funcionais tecnológicas (solubilidade, capacidade de absorção de água e óleo, de formação e estabilidade de espuma, de formação e estabilidade de emulsão).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

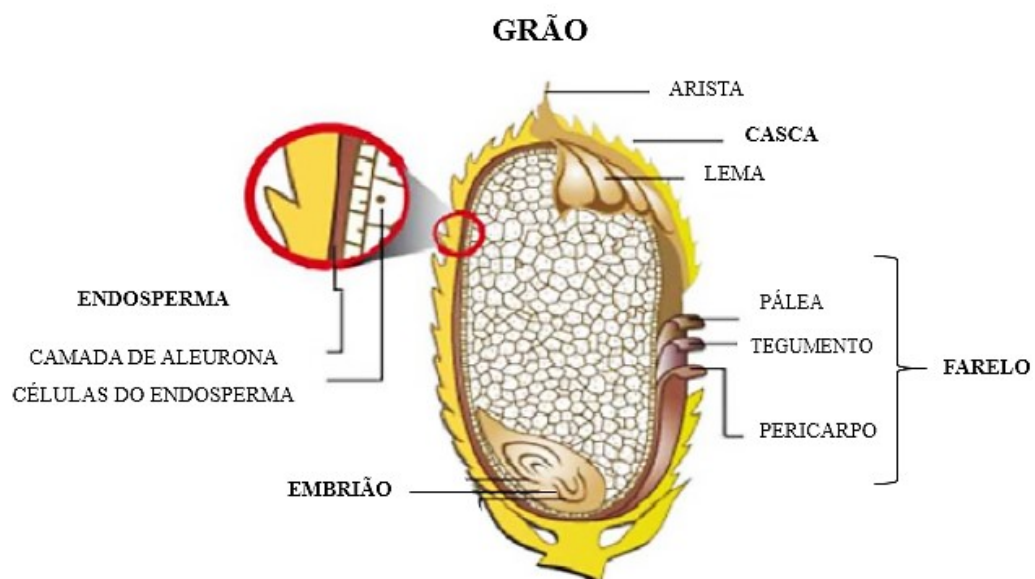
3.1 ARROZ: COMPOSIÇÃO E PRODUÇÃO MUNDIAL

O arroz (*Oryza sativa*), pertence à família *Poaceae* (VAUGHAN; LU; TOMOOKA, 2008). Necessita de calor e umidade para crescer. Pode medir de 30 cm a 180 cm de altura, é uma planta lisa, tem pontos de floração e hastes arredondadas, nas quais são produzidos os grãos de arroz (MCLEAN et al., 2002). É uma gramínea cultivada inicialmente na Ásia e expandiu-se para os outros continentes, exercendo um importante papel social e econômico (HARDY, 2002).

Na sua forma natural, o arroz é um alimento rico em carboidratos, importante fonte de proteínas, vitaminas, ferro, cálcio, fósforo (HEINEMANN et al., 2005). Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*, 2016), o arroz é considerado um dos alimentos de grande importância tratando-se de segurança alimentar no mundo, uma vez que possui ótimas características nutricionais e uma cultura rústica, contribuindo para o combate à fome.

O grão de arroz (Figura 1) é composto pelo núcleo interior (cariopse) e por tecidos de cobertura externa (casca) (JULIANO, 1985).

Figura 01 – Corte longitudinal de um grão de arroz



Fonte: Adaptado de MATOS (2014)

A casca é formada por duas folhas (pálea e lema), que corresponde cerca de 20% do peso do grão. Já a cariopse, porção comestível, é formada por diferentes camadas (pericarpo, tegumento e a aleurona). Através do descascamento, separa-se a casca da cariopse, obtendo-se o arroz integral. Ao polir o arroz integral, pode-se obter o farelo de arroz, que representa 8,5-14,8% do arroz integral (JULIANO, 1985), e assim, obtêm-se o arroz branco polido. Os grãos podem ainda, ser submetidos à parboilização (OKO et al., 2012).

O pericarpo corresponde de 1 a 2% da massa do grão integral, nesta camada estão localizados os polifenóis responsáveis pela pigmentação do grão, durante a etapa de beneficiamento a maior parte desta camada é removida (TIAN; NAKAMURA; KAYAHARA, 2004). O tegumento é uma camada protetora que, além de delimitar a semente, age como barreira protetora contra microrganismos, choques e abrasões. A camada de aleurona é responsável pelo armazenamento de corpos proteicos e de corpos lipídicos. Já o embrião ou gérmen é rico em proteínas e lipídios. O endosperma constitui cerca de 89-94% do arroz integral e consiste de células ricas em grânulos de amido e com alguns corpos proteicos (JULIANO, 1985).

O conteúdo proteico do grão é, em média, de 7%, porém uma grande variação é observada, entre 4,3 a 18,2 %, este fato está correlacionado às características genotípicas, radiação solar, temperatura durante o desenvolvimento do grão e adubação nitrogenada (JULIANO, 1985).

As proteínas encontradas no grão são classificadas como de reserva, sendo acumuladas durante o desenvolvimento da semente em grande quantidade. Podem ser classificadas conforme a solubilidade em: glutelinas, solúveis em ácidos ou bases; as albuminas, solúveis em água; as globulinas, solúveis em sais; e as prolaminas, solúveis em álcool (SILVEIRA et al., 2011).

O arroz é classificado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), conforme a Instrução Normativa N.º 6 de 16/02/2009, como arroz em casca natural e beneficiado (integral, polido, parboilizado), sendo dividido em classes: longo fino, longo, médio, curto e misturado. Após a colheita, o arroz é seco para atingir o grau de umidade de 12%, armazenado em silos e encaminhado para o beneficiamento (BRASIL, 2009).

O arroz é um dos cereais mais consumidos no mundo, fazendo parte da dieta de milhões de pessoas (KATSURAYAMA; TANIWAKI, 2017). Estima-se que o consumo médio mundial é de 60 kg/pessoa/ano. Porém, em países asiáticos, as médias são superiores, cerca de 100 kg à 150 kg/pessoa/ano. Em média, são consumidos, na América Latina, 30 kg/pessoa/ano. O Brasil destaca-se, com média de 45 kg/pessoa/ano (FAO, 2016).

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial, destacando-se como o maior produtor do Mercosul. O arroz evidencia seu valor no meio rural, principalmente na região Sul do País, nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. As lavouras irrigadas garantem a maior parte das demandas nacionais. As variedades de terras altas, ou de sequeiro, seguem tendo importância preservada em estados como o Mato Grosso, historicamente um dos grandes produtores nacionais. Em outro extremo nacional, no Maranhão, no litoral Norte do País, amplas extensões de várzeas são aproveitadas no cultivo desse grão (SANTOS, et al. 2017).

Segundo dados da *United States Department of Agriculture* (USDA), a produção mundial de arroz (beneficiado), será de aproximadamente, 487,8 milhões de toneladas na Safra de 2018/2019. Estima-se que a produção brasileira de arroz beneficiado na Safra 2019/2020, será de 10,56 milhões de toneladas (CONAB, 2020). Do beneficiamento do arroz resulta o farelo, que representa de 8,5-14,8% do peso total do grão, portanto, para este período calcula-se, a nível mundial, a geração de até 72,19 milhões de toneladas de farelo de arroz.

3.1.1 Farelo de arroz desengordurado (FAD)

Durante o processo de beneficiamento do grão de arroz, realiza-se o processo de descasque, onde separa-se a casca do restante do bago para obter o arroz integral; em seguida, realiza-se a brunição, onde o pericarpo, o tegumento, a camada de aleurona e o embrião são eliminados, gerando o farelo de arroz. Finalmente, efetua-se o polimento do grão, resultando no arroz branco polido, que constitui a maior fração da produção (TIAN; NAKAMURA; KAYAHARA, 2004).

O farelo representa 4,5-14,8% do peso total do grão de arroz (JULIANO, 1985). A composição química é influenciada por diversos fatores, dependendo diretamente da variedade do arroz, das condições climáticas e dos métodos de processamento (FREEMAN, 2016). O farelo é altamente nutritivo, podendo conter entre, 11,3-14,9% de proteínas, 15,0-19,7% de lipídios, 13,8% de amido, 6,6-9,9% de cinzas e 7,0-14,4% de fibra bruta (JULIANO; BECHTEL, 1985; POMERANZ; ORY, 1982).

Apresenta uma ampla variedade de nutrientes essenciais como minerais, aminoácidos et al., 2011) e antioxidantes, devido à presença de compostos bioativos como os fenólicos (DEVI; ARUMUGHAN, 2007; MARIOD et al., 2010).

Estudos relatam impacto benéfico do farelo de arroz em inúmeras doenças, incluindo câncer de cólon, doença cardiovascular (HENDERSON, et al., 2012; KIM et al., 2014; KUMAR et al., 2012), controle de diabetes, prevenção da aterosclerose, redução do colesterol e potencial antialérgico (PERES-TERNERO et al., 2015; CHENG et al., 2010; FORSTER et al., 2013; GOUFO; TRINDADE, 2014; OKA et al., 2010).

O farelo de arroz *in natura* apresenta alto teor lipídico, este fator reduz a vida útil do produto, uma vez que a presença de enzimas (lipases) desencadeia o processo de rancificação oxidativa, gerando sabor desagradável e perda de vitaminas (MALEKIAN et al., 2000). Este fator limita o uso deste subproduto, fazendo com que a maior parte da produção seja destinada a ração animal, fertilizantes ou combustível (GARRIDO 2015; PARRADO, 2006).

A fim de solucionar este problema, diversas tecnologias estão sendo desenvolvidas. Após a extração do óleo, realiza-se uma etapa de estabilização, resultando no farelo de arroz desengordurado estabilizado (FADE), garantindo assim o emprego em produtos alimentícios como cereais matinais, *snacks*, salsichas, produtos de panificação e confeitaria (PESTANA et al., 2008; PRASAD et al., 2011; DANG, 2015; SAIKIA; DEKA, 2011.).

A proteína presente no farelo de arroz desengordurado apresenta uma boa qualidade nutricional para o consumo humano quando comparada com as obtidas de outros cereais (farelo de trigo e de milho), principalmente quando considerado seu alto valor em lisina (JULIANO, 1985; PESTANA et al., 2008).

Vale ressaltar que esta proteína apresenta ainda diversas vantagens: são hipoalergênicas, portanto podem ser consumidas por indivíduos intolerantes ou alérgicos ao glúten (OSZVALD et al., 2008). Seu perfil de aminoácidos a torna ingrediente adequado para formulações de alimentos infantis hipoalergênicos (WANG et al., 1999; HAN; CHEE; CHO, 2015) e hipocolesterolêmicos (CHRASTIL, 1992). Possui propriedades anticancerígenas (SHOJI et al., 2001) e antioxidantes (CHANPUT; THEERAKULKAIT; NAKAI, 2009). Sua digestibilidade é superior a 90% (ZHANG et al., 2012).

As proteínas influenciam diretamente as características sensoriais e as propriedades funcionais (solubilidade, absorção de água e óleo, capacidade de formação de espuma, emulsificante, geleificante, entre outras) de um produto (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010)

Para que possam ser utilizadas industrialmente, deve-se realizar a extração através do rompimento celular dos corpos proteicos (PAN; CATHCART; WANG, 2005; VOET; VOET, 2006). Considerada uma etapa crítica, este processo afeta o rendimento total, assim como, a atividade biológica, podendo promover a degradação proteolítica (BECERRA et al., 2001).

3.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS: MÉTODOS CONVENCIONAIS E EMERGENTES

3.2.1 Extração alcalina

A extração alcalina é um método convencional para obtenção de concentrados proteicos (CONNOR et al., 1976; JIAMYANGYUEN et al., 2005; SEREEWATTHANAWUT et al., 2008; XIA et al., 2012; SOUZA et al., 2016; BERNARDI, 2015; BEDIN, 2018), devido a sua simplicidade e disponibilidade dos reagentes. Sequencialmente a extração, realiza-se o ajuste do pH para o ponto isoelétrico, geralmente na faixa de 3,5 a 6,5, podendo variar conforme a matéria-prima, acarretando na precipitação das proteínas (CHANDI; SOGI, 2007).

No método de extração alcalina, faz-se necessária a utilização de métodos que auxiliam na ruptura das paredes celulares, os quais podem ser mecânicos - como agitação e ultrassom (SILVA, 2012; CHEMAT et al., 2011) e não mecânicos - como o uso de solventes orgânicos (GECIOVA et al., 2002).

3.2.2 Extração assistida por ultrassom

O ultrassom é uma técnica emergente viável para extração de proteínas, utilizado como alternativa na redução do tempo de extração, volume de solvente e controle do processo (CHITTAPALO; NOOMHORM, 2009; KARKI et al., 2010; O'SULLIVAN et al., 2015). Trata-se de uma tecnologia capaz de acelerar a transferência de calor e de massa (CHEMAT et al., 2011). Além disso, os efeitos mecânicos são favorecidos, promovendo a agitação da solução, o que permite maior interação entre o solvente na matriz, facilitando assim, a liberação dos compostos. Outra vantagem, é a extração em temperaturas mais brandas, minimizando assim a perda de compostos bioativos (CORBIN et al., 2015). Jambrak et al. (2009) indicam ainda, que as ondas ultrassônicas podem proporcionar mudanças em algumas propriedades das proteínas (funcionais, biológicas e fisico-químicas) que podem ser de interesse tecnológico (JAMBRAK et al., 2009).

O ultrassom utiliza energia de ondas sonoras transmitidas a uma frequência de oscilação de pressão acima de 20 kHz (20.000 oscilações por segundo), induzindo o fenômeno de cavitação (KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011; SORIA; VILLAMIEL, 2010).

Por definição física, a cavitação consiste na formação de bolhas de vapor ou gás, num líquido devido a redução da pressão total; portanto, as bolhas originadas no processo são capazes de gerar energia, alterando assim as propriedades físicas e químicas do material, acarretando a ruptura da parede celular (CHEMAT et al., 2011).

Existem duas formas de empregar o ultrassom em alimentos, de forma direta ou indireta. Para a aplicação de forma indireta (Figura 2), utiliza-se banhos ultrassônicos; as ondas formadas neste equipamento, atingem primeiramente o líquido contido em seu interior, para em seguida atravessar o recipiente onde está contida a amostra. Portanto, não são capazes de aplicar grande intensidade ultrassônica na amostra (CAPELO-MARTÍNEZ, et al., 2009). A aplicação de forma direta (Figura 3) utiliza a sonda ou *probe* imersa na solução; esta técnica proporciona maior intensidade cavitacional (JAMBRAK et al., 2014), porém pode ocorrer a contaminação por metais e perda de elementos voláteis devido ao acréscimo de temperatura ocasionado pela cavitação (CAPELO-MARTÍNEZ, et al., 2009).

Figura 02 – Ultrassom tipo banho (Indireta)



Fonte: Autoria própria, 2020.

Figura 03 – Sonda ultrassônica/*probe* (Direta)



Fonte: Autoria própria, 2020.

Além do tipo de aplicação, outras variáveis influenciam o desempenho da extração assistida por ultrassom, como a quantidade de amostra, pH da solução, solvente adequado, volume do solvente, frequência, potência, tempo e temperatura (RIAL-OTERO, 2009).

3.2.3 Extração enzimática

As enzimas podem ser produzidas e extraídas de células animais, microbianas ou vegetais e são amplamente utilizadas industrialmente, principalmente como substituto aos catalizadores químicos, pois são consideradas ambientalmente sustentáveis e de maior eficiência (LI et al., 2012; LIU et al., 2016; MONTEIRO, 2009).

Diversos tipos de enzimas são comercialmente disponíveis, a fim de satisfazer diferentes aplicações, produtos e processos. São classificadas de acordo com seu mecanismo de ação, determinado pela União Internacional da Bioquímica (UIB). De todos os grupos de enzimas, as mais utilizadas industrialmente são as hidrolases (LIU et al., 2016; MONTEIRO, 2009; WHITEHURST; OORT 2010).

Durante o processo de extração e/ou transformação de biomoléculas, diversos tipos de enzimas podem ser empregados. No processo de extração de proteína de diferentes matrizes vegetais, as hidrolases como as proteases e as carboidrases são geralmente muito utilizadas.

As carboidrases agem na degradação da parede celular vegetal, liberando os componentes intracelulares na solução, facilitando a recuperação destes. Estas enzimas atuam facilitando o processo de extração, podendo ser utilizadas isoladamente, ou de forma combinada, como pré-processamento (MIRANDA, 2012; NASCIMENTO, 2015).

Pertencem ao grupo das carboidrases enzimas como as amilases (α e β - amilases, glicoamilases), celulasas, pectinases e hemicelulasas. São utilizadas em processos de extração e de transformação e aproveitamento dos carboidratos de origem vegetal, nas indústrias de alimentos e bebidas, cosméticos, têxtil, química e fármacos (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; LIU et al., 2016; MONTEIRO, 2009).

As proteases atuam na extração de aminoácidos e peptídeos favorecendo a solubilidade, devido ao processo de proteólise, onde as proteínas são degradadas a peptídeos ou aminoácidos. Logo, os hidrolisados proteicos possuem propriedades nutricionais e funcionais distintos (LIU et al., 2016; SARI, 2015; WHITEHURST; OORT, 2010).

Pode-se classificar as proteases em exopeptidases, que atuam nos grupos funcionais ativos localizados na extremidade das cadeias polipeptídicas das moléculas de proteínas, e endopeptidases, que atuam em grupos ativos não terminais da cadeia polipeptídica. As endopeptidases são mais empregadas, pois atuam em toda a extensão da molécula de proteína, garantindo maior eficiência no processo e maior rendimento na extração de proteínas,

influenciando principalmente na solubilidade dos polipeptídios obtidos (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; LIU et al., 2016).

As proteases também são empregadas em diferentes tipos de indústrias com a finalidade de extrair e/ou transformar as proteínas presentes em diversas fontes vegetais, modificando suas propriedades e aplicações (LI et al., 2012; LIU et al., 2016; TABTALBAEI; DIOSADY, 2013).

3.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS

As propriedades funcionais tecnológicas de um ingrediente influenciam seu aspecto físico e desempenho perante o consumo. Não estão relacionadas à fatores nutricionais, mas sim à componentes químicos, como as proteínas (MIZUBUTI et al., 2010).

Uma das mais importantes propriedades funcionais das proteínas é a solubilidade (NAKAI; CHAN, 1985; CÂNDIDO, 1998). A proteína deve ter a capacidade de interagir com o solvente por pontes de hidrogênio, interações iônicas e dipolo-dipolo para ser considerada solúvel em água (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). Diversos fatores influenciam a solubilidade das proteínas em meio aquoso, entre eles a temperatura, pH e força iônica (DAMODARAN, 1997).

Ter boa solubilidade é essencial para concentrados proteicos, pois possibilita sua utilização como ingrediente funcional em diversos alimentos como cremes, molhos, bebidas, coberturas, chantilis, entre outros (CHANDI; SOGI, 2007), uma vez que proteínas com alta solubilidade apresentam a capacidade de absorção de água e de óleo, formação e estabilidade de emulsões, formação e estabilidade de espumas e formação de géis (CÂNDIDO, 1998; HEYWOOD et al., 2002; MOHAMED et al., 2009; LIU et al., 2011).

A capacidade de absorção de água e de óleo das proteínas é extremamente importante para a indústria de alimentos, pois além de determinar a aceitabilidade sensorial do produto, define sua margem de lucro. Formulações com baixa capacidade de absorção de água ou óleo tendem a perder líquido durante o processamento; além do mais, os consumidores evitam produtos que apresentam exsudação na embalagem (BARBUT, 1996).

A interação da proteína com a água está relacionada com diversas propriedades funcionais como viscosidade, emulsificação, geleificação e textura; podendo ainda, ser alterada

por fatores como a polaridade, temperatura, pH, composição de aminoácidos, ligação iônica, estrutura e conformação das proteínas (LIU et al., 2011).

A capacidade de emulsão está relacionada com a habilidade da proteína em formar e estabilizar a interface água-óleo durante o processo de homogeneização. Já a estabilidade da emulsão está relacionada com a capacidade que a proteína tem em formar a emulsão e se manter inalterada durante um período de tempo em condições específicas, gerando um filme coeso e com propriedades viscoelásticas (DIFTIS; KIOSSEOGLU, 2003; CHANDI; SOGI, 2007; AIDER; BARBANA, 2011). As proteínas que apresentam melhores propriedades emulsificantes são as de maior solubilidade, estrutura dissociada e separada e boa hidrofobicidade. (ORDÓÑEZ, 2005).

Proteínas de origem vegetal possuem boas propriedades emulsificantes que podem ser utilizadas por indústrias alimentícias como fonte alternativa e natural aos emulsionantes comumente utilizados, os monoglicérides, que são considerados sintéticos (YUN; HONG, 2007).

A capacidade de formação de espuma das proteínas refere-se à expansão do volume da dispersão proteica através da incorporação de ar por métodos mecânicos como batimento, agitação ou aeração. A estabilidade da espuma está correlacionada com a retenção do volume máximo de espuma formada em função do tempo de repouso sendo, geralmente, medida pela liberação de fluido da espuma (SGARBIERI, 1996).

As espumas alimentícias são bastante instáveis, porque apresentam grande superfície de interface. Para que proteína tenha boa capacidade espumante sua molécula deve ser flexível e se estender pela sua interface rapidamente e apresentar alto grau de hidrofobicidade, tornando melhor sua orientação. Porém, para que seja estável, é necessário que em torno de cada bolha de gás se forme uma película proteica espessa, contínua, elástica e impermeável ao ar. Tais propriedades estão relacionadas com a concentração de proteínas, as interações intermoleculares e a capacidade de hidratação (ORDÓÑEZ, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES

O farelo de arroz desengordurado (FAD) na forma peletizada, cedido pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais (IRGOVEL – Pelotas/RS), foi padronizado por moagem em moinho de facas (Solab, SL 31, Willye, Brasil) com granulometria média de 70 *mesh*, embalado em sacos de polietileno e congelado (-20°C) até a realização dos ensaios.

A enzima utilizada para a hidrólise enzimática do farelo de arroz foi a protease (ALCALASE 2.4 L Food Grade) cedida pela empresa LNF – Latino Americana, Bento Gonçalves - RS. Os demais reagentes foram de grau analítico.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O FAD foi caracterizado quanto ao teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (multiplicando-se pelo fator de 5,95 para conversão do teor de nitrogênio em proteínas totais), lipídios totais pelo método de Soxhlet, umidade (estufa à 105 °C), cinzas (incineração à 550 °C) e carboidratos totais (por diferença), segundo a metodologia da AOAC (2005).

4.3 ESTRATÉGIAS DE EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO

4.3.1 Extração assistida por sonda ultrassônica

A fim de determinar as melhores condições de extração assistida por sonda ultrassônica, realizou-se uma estratégia sequencial de planejamento experimental; inicialmente

foi aplicado um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF) 2^{4-1} (2 níveis, 4 repetições no ponto central, 12 ensaios) para seleção das variáveis de influência significativa no processo, conforme Tabela 01.

Tabela 01 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração em sonda ultrassônica.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	x ₃ ^c	x ₄ ^d
1	-1(8)	-1(5)	-1(40)	-1(100)
2	1(10)	-1(5)	-1(40)	1(180)
3	-1(8)	1(15)	-1(40)	1(180)
4	1(10)	1(15)	-1(40)	-1(100)
5	-1(8)	-1(5)	1(80)	1(180)
6	1(10)	-1(5)	1(80)	-1(100)
7	-1(8)	1(15)	1(80)	-1(100)
8	1(10)	1(15)	1(80)	1(180)
9	0(9)	0(10)	0(60)	0(140)
10	0(9)	0(10)	0(60)	0(140)
11	0(9)	0(10)	0(60)	0(140)
12	0(9)	0(10)	0(60)	0(140)

^a pH; ^b Tempo (minutos); ^c Amplitude de potência (%); ^d Razão farelo:água (g/L);

Fonte: Autoria própria, 2020.

As faixas de estudo das variáveis foram definidas com base em trabalhos anteriores (GNANASAMBANDAM; HETTIARACHCHY, 1995; GUPTA, CHANDI; SOGI, 2008; ZHANG et al., 2012; BERNARDI, 2015), com frequência fixa em 20 KHz. A influência da profundidade de imersão da sonda também foi avaliada (SOUZA, 2015). Considerou-se a melhor condição de extração, aquela com maior teor proteico (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo), determinado pelo teor de nitrogênio total, multiplicando-se pelo fator 5,95 para conversão em proteínas totais conforme descrição da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

Após definidas as variáveis significativas para a extração proteica, a citar o pH e a Razão farelo/água, foi realizado um DCCR 2^2 (4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central), totalizando 11 ensaios em ordem aleatória, conforme Tabela 02. O tempo foi fixado em 5 minutos, a amplitude da potência em 40% e a frequência em 20 KHz, conforme definido pela análise de efeitos do PFF. Considerou-se a melhor condição de extração, aquela que resultou em maior percentual de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo).

Tabela 02 - Matriz do DCCR com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração em sonda ultrassônica.

Ensaio	x_1^a	x_2^b
1	-1 (9,3)	-1 (64)
2	-1 (9,3)	1 (136)
3	1 (10,7)	-1 (64)
4	1 (10,7)	1 (136)
5	-1,41 (9)	0 (100)
6	1,41 (11)	0 (100)
7	0 (10)	-1,41 (50)
8	0 (10)	1,41 (150)
9	0 (10)	0 (100)
10	0 (10)	0 (100)
11	0 (10)	0 (100)

^a pH; ^b Razão farelo:água (g/L).
Fonte: Autoria própria, 2020.

4.3.2 Extração enzimática

Para determinar as melhores condições de extração enzimática, realizou-se uma estratégia sequencial de planejamento experimental; inicialmente foi aplicado um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF) 2^{4-1} (2 níveis, 4 repetições no ponto central, 12 ensaios) para seleção das variáveis do processo, conforme Tabela 03.

Tabela 03 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração enzimática.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	x_4^d
1	-1 (0,5)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (7)
2	1 (5)	-1 (30)	-1 (30)	1 (9)
3	-1 (0,5)	1 (60)	-1 (30)	1 (9)
4	1 (5)	1 (60)	-1 (30)	-1 (7)
5	-1 (0,5)	-1 (30)	1 (120)	1 (9)
6	1 (5)	-1 (30)	1 (120)	-1 (7)
7	-1 (0,5)	1 (60)	1 (120)	-1 (7)
8	1 (5)	1 (60)	1 (120)	1 (9)
9	0 (2,8)	0 (45)	0 (75)	0 (8)
10	0 (2,8)	0 (45)	0 (75)	0 (8)
11	0 (2,8)	0 (45)	0 (75)	0 (8)
12	0 (2,8)	0 (45)	0 (75)	0 (8)

^a Concentração de protease (%); ^b Temperatura (°C); ^c Tempo (Minutos); ^d pH;
Fonte: Autoria própria, 2020.

As faixas de estudo das variáveis foram definidas com base em trabalhos anteriores (BIZZOTTO et al., 2006b, CAPOBIANGO et al., 2006, VIEIRA et al., 2008, GÖRGÜÇ; BIRCAN; YILMAZ, 2019), com adaptações. Considerou-se a melhor condição de extração, aquela com maior teor proteico (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo), determinado pelo teor de nitrogênio total, multiplicando-se pelo fator 5,95 para conversão em proteínas totais conforme descrição da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

Após definidas as variáveis significativas para a extração proteica, a citar o tempo e a temperatura, foi realizado um DCCR 2² (4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central), totalizando 11 ensaios em ordem aleatória, conforme Tabela 04. A concentração de protease foi fixada em 3% e o pH em 9, conforme definido pela análise de efeitos do PFF. Considerou-se a melhor condição de extração, aquela que resultou em maior percentual de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo).

Tabela 04 - Matriz do DCCR com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração em sonda ultrassônica.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b
1	-1 (73)	-1 (43)
2	-1 (73)	1 (57)
3	1 (137)	-1 (43)
4	1 (137)	1 (57)
5	-1,41 (60)	0 (50)
6	1,41 (150)	0 (50)
7	0 (105)	-1,41 (40)
8	0 (105)	1,41 (60)
9	0 (105)	0 (50)
10	0 (105)	0 (50)
11	0 (105)	0 (50)

^a Tempo (Minutos); ^b Temperatura (°C);
Fonte: Autoria própria, 2020.

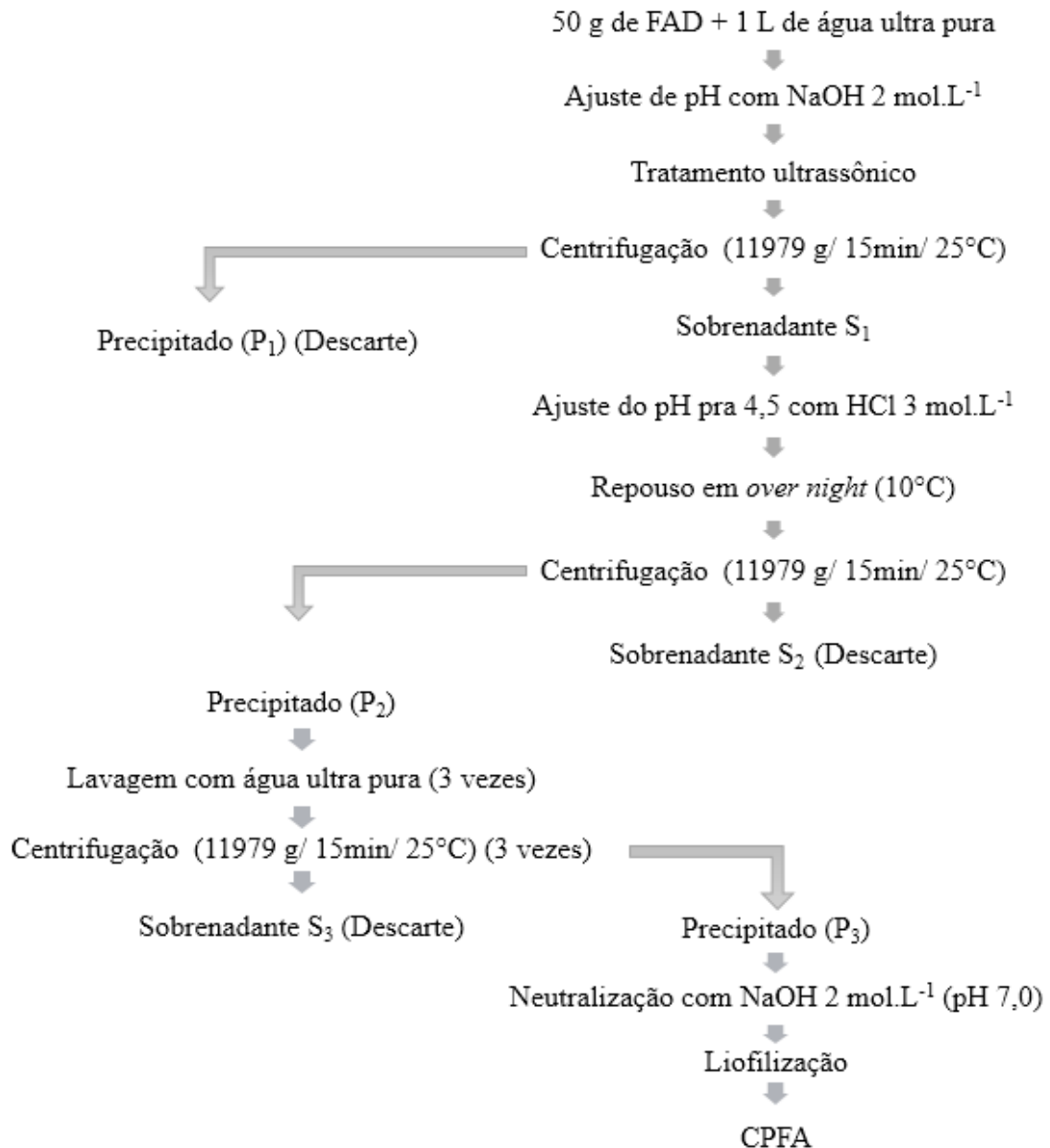
4.4 CONDUÇÃO DOS ENSAIOS DE EXTRAÇÃO

4.4.1 Extração assistida por sonda ultrassônica e obtenção do concentrado proteico

Para a produção do concentrado proteico do farelo de arroz (CPFA), o FAD foi submetido a extração assistida por ultrassom conforme indicado no item 4.3.1. Para a realização

dos ensaios, pesou-se 50 g de FAD e homogeneizou-se em 1 L de água ultra pura e o pH foi ajustado para 10 (pH21 pH/mV, Meter Hanna, Brasil) com solução de NaOH 2 mol.L⁻¹; em seguida a solução foi submetida a sonicação direta em sonda ultrassônica (QR550W, Ultronique, Brasil) (40%/5 min). Após ser submetida às condições de extração, as amostras foram centrifugadas a 11979 × g durante 15 minutos (25 °C) (Rotina 420 R, Hettich Zentrifugen, Alemanha). O sobrenadante (S₁) teve seu pH ajustado para 4,5 com solução de HCl 3 mol.L⁻¹, que é o ponto isoelétrico das proteínas do arroz (GUPTA; CHANDI; SOGI, 2008). A solução foi deixada em repouso *over night* para precipitação a 10 °C, seguida de centrifugação nas mesmas condições. O precipitado contendo a proteína foi lavado três vezes com água purificada e armazenado nos próprios tubos da centrífuga, para nova centrifugação a 11979 × g por 15 min à 25 °C. Os sobrenadantes S₂ e S₃ foram descartados. A amostra foi neutralizada (pH 7,0, NaOH 2 mol.L⁻¹) seguida de congelamento a -18 °C e liofilização (Labconco, FreeZone, EUA) em pressão absoluta menor que 0,5 mBar, temperatura de aquecimento de 40 °C por 24 horas. O fluxograma do processo pode ser visualizado na Figura 04.

Figura 04 – Fluxograma do processo de obtenção do hidrolisado proteico do farelo de arroz através de extração assistida por sonda ultrassônica



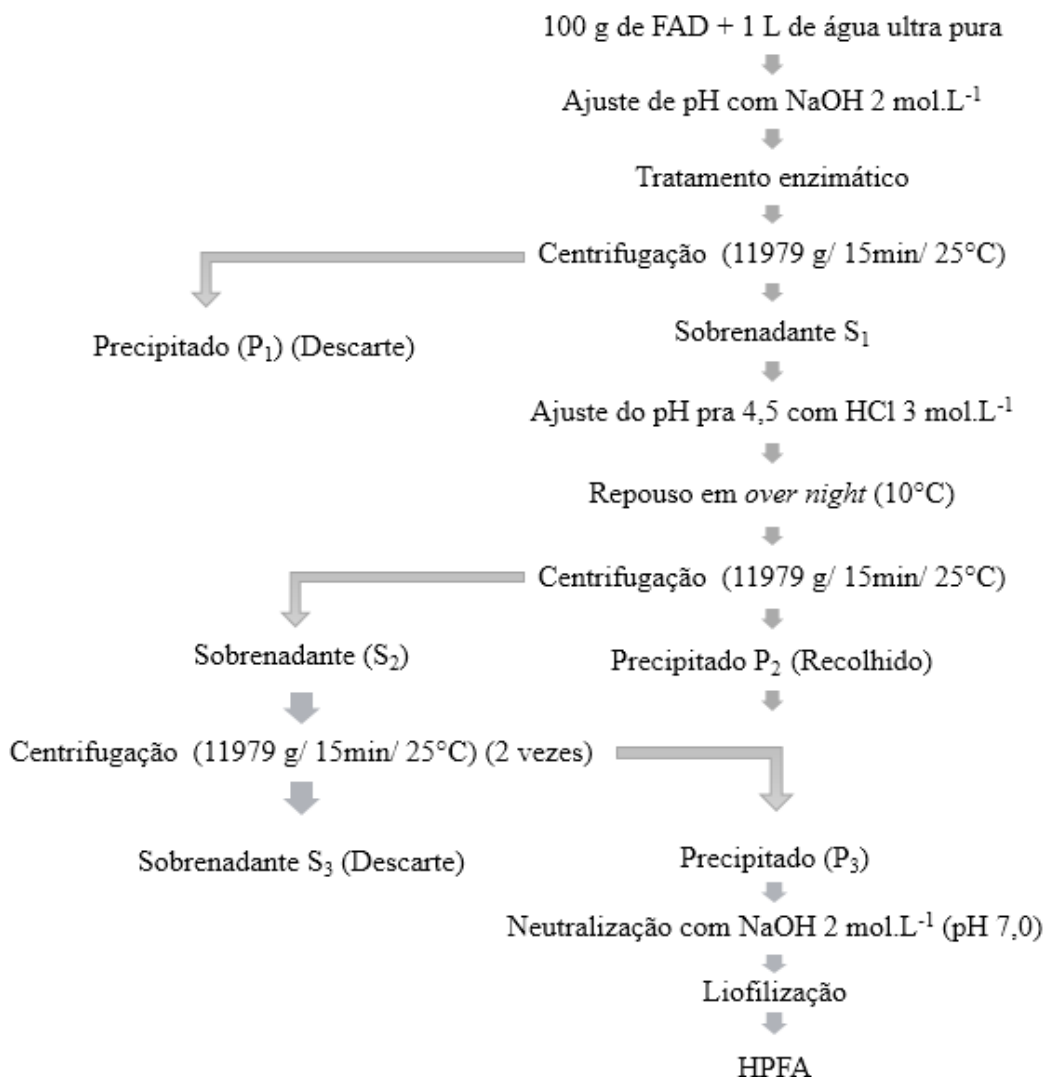
Fonte: Aatoria própria, 2020.

4.4.2 Extração enzimática e obtenção do hidrolisado proteico

Para elaboração do hidrolisado proteico do farelo de arroz (HPFA), o FAD foi submetido às condições de extração enzimática conforme item 4.3.2. Pesou-se 100 g de FAD e homogeneizou-se em 1 L de água ultra pura, o pH foi ajustado para 9 (pH21 pH/mV, Meter Hanna, Brasil) com solução de NaOH 2 mol.L⁻¹ e adicionou-se 3% de protease; em seguida a

solução foi submetida a incubação em estufa com agitação (TECNAL, TE4080) (55 °C/150 minutos/ 160 RPM). Sequencialmente a amostra foi centrifugada a $11979 \times g$ durante 15 minutos (25 °C) (Rotina 420 R, Hettich Zentrifugen, Alemanha). O sobrenadante (S_1) teve seu pH ajustado para 4,5 (solução de HCl 3 mol.L^{-1}) que é o ponto isoelétrico das proteínas do arroz (GUPTA; CHANDI; SOGI, 2008). A solução foi deixada em repouso *over night* a 10 °C, seguida de centrifugação nas mesmas condições. O precipitado foi recolhido e o sobrenadante foi novamente centrifugado ($11979 \times g$, 15 min, 25 °C), recolhendo-se o precipitado a cada centrifugação. Ao fim, a amostra foi neutralizada (pH 7,0, NaOH 2 mol.L^{-1}), congelada (-18 °C) e liofilizada (Labconco, FreeZone, EUA) (pressão absoluta menor que 0,5 mBar, temperatura de 40 °C, 24 h). O fluxograma do processo pode ser visualizado na Figura 05.

Figura 05 – Fluxograma do processo de obtenção do hidrolisado proteico do farelo de arroz através de extração enzimática



4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO FAD

4.5.1 Composição centesimal

O concentrado proteico do farelo de arroz (CPFA) e o hidrolisado proteico do farelo de arroz (HPFA) foram caracterizados quanto ao teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (multiplicando-se pelo fator de 5,95 para converter o teor de nitrogênio em proteínas totais), lipídios totais, umidade, cinzas e carboidratos totais (por diferença), segundo a metodologia da AOAC (2005).

4.5.2 Rendimento global e proteico dos métodos de extração

O rendimento global do processo de obtenção do CPFA e HPFA obtido a partir do farelo de arroz foi determinado conforme a Equação 01. A pesagem das massas foi realizada em balança analítica (Marte, AW220, São Paulo, Brasil).

$$\text{Rendimento global (\%)} = \frac{\text{Massa CPFA ou HPFA (g)}}{\text{Massa FAD (g)}} \times 100 \quad (01)$$

Para determinar o rendimento proteico das extrações seguiu-se a metodologia proposta por SELLING et al. (2013), conforme descrito na Equação 2:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{(g_0 \times PT_0) \times (100 - U_0)}{(g_{\text{inicial FAD}} \times PT_{\text{FAD}}) \times (100 - U_{\text{FAD}})} \times 100 \quad (02)$$

Onde: g_0 = Massa de CPFA ou HPFA inicial (g); $g_{\text{inicial FAD}}$ = Massa de farelo de arroz inicial (g); PT_{FAD} = Proteína total no farelo de arroz (%); PT_0 = Proteína total no CPFA ou HPFA (%); U_0 = Umidade do CPFA OU HPFA (%); U_{FAD} = Umidade do farelo de arroz (%).

4.6 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO FARELO DE ARROZ

4.6.1 Solubilidade

O teor de proteínas solúveis do CPFA e do HPFA foi determinado conforme Glória e Regitano-d'Arce (2000) e Morr et al. (1985), com modificações. Preparou-se uma solução de 0,5 % (m/v) e agitou-se em agitador magnético (Fisatom, 752A, São Paulo, Brasil) por 10 min. Em seguida, o pH foi ajustado em 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, adicionando-se solução de HCl 0,5 mol.L⁻¹ ou solução de NaOH 0,5 mol.L⁻¹. Posteriormente, a amostra foi transferida para tubos graduados tipo Falcon de 50 mL e centrifugada a 4097 x g (25°C) por 15 min (Cientec, CT 5000-R, São Paulo, Brasil). Da mesma forma, foi elaborada uma amostra controle a qual não foi submetida ao ajuste de pH nem a centrifugação. Os conteúdos de proteínas dos sobrenadantes obtidos durante a centrifugação e da solução controle foram determinados de acordo com o método de Lowry et al. (1951), utilizando solução de albumina 1,5 g.L⁻¹ como padrão; as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (PerkinElmer, UV-Vis Lambda XLS HP9 2FX, Estados Unidos) a 730 nm. Os resultados foram expressos pelo percentual de proteínas solúveis (PS) contido nas amostras (Equação 03).

$$PS (\%) = \frac{\text{Proteína solúvel no sobrenadante (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{Proteína solúvel na solução controle (g.L}^{-1}\text{)}} \times 100 \quad (03)$$

4.6.2 Capacidade de absorção de água e de óleo

As capacidades de absorção de água ($CA_{\text{água}}$) e de óleo ($CA_{\text{óleo}}$) foram determinadas seguindo a metodologia de Lin; Humbert e Sosulski (1974). Para a análise, preparou-se uma dispersão de 2% de CPFA ou HPFA em um tubo graduado tipo Falcon, e adicionou-se em água ultra pura (MS 2000, Gehaka, Brasil) ou óleo de milho. Agitou-se por 1 min (Vortex, IKA, Staufen, Alemanha). Posteriormente, as amostras foram deixadas em repouso por 30 min, em

seguida realizou-se 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 e deste, considerou-se o conteúdo de água ou óleo absorvido. Os resultados foram expressos como a $CA_{\text{água}}$ ou $CA_{\text{óleo}}$ por grama de CPFA ou HPFA ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), conforme as equações 04 e 05, respectivamente.

$$CA_{\text{água}} (\text{g de água} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de amostra}) = \frac{\text{Água absorvida pelo CPFA (g)}}{\text{Peso da amostra (g)}} \quad (04)$$

$$CA_{\text{óleo}} (\text{g de óleo} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de amostra}) = \frac{\text{Óleo absorvido pelo CPFA (g)}}{\text{Peso da amostra (g)}} \quad (05)$$

4.6.3 Capacidade de formação e estabilidade de espuma

De acordo com a metodologia de Mohanty; Mulvihill e Fox (1988), com adaptações, preparou-se dispersões contendo 0,4% g de CPFA ou HPFA e 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 auxílio de um *mixer* manual com batedor espiral (Britânia, mod. BMM2 China).

Para a determinação da capacidade de formação de espuma (CF_{Espuma}), fez-se imediatamente a leitura do volume da espuma formada e do líquido residual (equação 06). O resultado foi expresso em porcentagem de CF_{Espuma} .

$$CF_{\text{Espuma}} (\%) = \frac{\text{Volume final de espuma (mL)}}{\text{Volume inicial da dispersão (mL)}} \times 100 \quad (06)$$

Para a determinação da estabilidade da espuma (E_{Espuma}), a espuma formada para a determinação da CF_{Espuma} foi deixada em repouso por 30 min a 25°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_{Espuma} (equação 07).

$$E_{Espuma} (\%) = 100 - \left[\left(\frac{\text{Volume líquido drenado após 30 min (mL)}}{\text{Volume inicial da dispersão (mL)}} \right) \times 100 \right] \quad (07)$$

4.6.4 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 0,4 % de CPFA ou HPFA e adicionou-se em 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 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 08).

$$CF_{Emulsão} (\%) = \frac{\text{Volume da camada emulsionada (mL)}}{\text{Volume total (mL)}} \times 100 \quad (08)$$

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 g (Cientec, CT 5000 R, Brasil) por 5 min. Pelo volume da camada emulsionada centrifugada, determinou-se a porcentagem de $E_{Emulsão}$ (equação 09).

$$E_{Emulsão} (\%) = \frac{\text{Volume da camada emulsionada (mL)}}{\text{Volume total (mL)}} \times 100 \quad (09)$$

4.7 ANÁLISES TÉRMICAS (DTA E TG) E ESTRUTURAIS (FTIR)

As análises térmicas foram realizadas através de Análise Térmica Diferencial (DTA) e termogravimétrica (TG), para verificar o comportamento e estabilidade térmica do CPFA e do HPFA. Para obtenção das curvas de DTA e TG, $1,0 \pm 0,2$ mg dos ensaios liofilizados foram acondicionadas em cadinhos de alumínio, dispostos em equipamento DTA aquecidos de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e mantidos sob fluxo constante de N_2 ($20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). O equipamento foi previamente calibrado com padrão de referência de índio. O comportamento térmico foi avaliado mediante comparação do comportamento das curvas DTA e TG obtidas.

A análise da estrutura proteica do CPFA e do HPFA foi realizada pela técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). O concentrado proteico e o hidrolisado proteico liofilizados foram submetidos à análise em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (PerkinElmer, FT-IR Spectrum 100S, Estados Unidos), acoplado com o acessório de reflexão total atenuada (ATR), no intervalo de número de onda de $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

As estruturas secundárias das proteínas foram avaliadas por meio da deconvolução da região de interesse (1720 a 1570 cm^{-1} , correspondente à região da amida I), por meio da segunda derivativa e do *curve-fitting* (ajuste das curvas por deconvolução espectral). Os picos foram ajustados e a área medida por funções gaussianas tendo sido observados os centros e áreas dos mesmos.

4.8 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 11.0* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). O teste de Tukey foi usado para avaliar as diferenças entre as médias considerando um valor-p menor que $0,05$ ($p \leq 0,05$) como estatisticamente significativo. 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), 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 Equação (10).

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_1x_1^2 + \beta_2x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 + e \quad (10)$$

Onde:

\hat{y} = resposta,

x_1, x_2 = variáveis independentes codificadas,

β 's = coeficientes de regressão estimados pelo modelo de superfície de resposta,

e = resíduo (erro experimental).

Os ajustes dos dados experimentais para as análises TG, DTA e FTIR foram tratados com o programa ORIGINPRO 7.0 (*OriginLab Corporation, Ma, USA*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO FARELO DE ARROZ

5.1.1 Extração assistida por sonda ultrassônica

Inicialmente foi estudado o efeito do pH, tempo de ultrassom (minutos), amplitude da potência (%) e da razão farelo:água (g/L) na extração de proteínas do farelo de arroz. As variáveis estudadas e as respostas experimentais estão apresentadas na Tabela 05.

Tabela 05 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração em sonda ultrassônica e resposta experimental.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	x_4^d	Y^e
1	-1(8)	-1(5)	-1(40)	-1(100)	$6,04 \pm 0,02$
2	1(10)	-1(5)	-1(40)	1(180)	$5,57 \pm 0,02$
3	-1(8)	1(15)	-1(40)	1(180)	$2,63 \pm 0,01$
4	1(10)	1(15)	-1(40)	-1(100)	$6,34 \pm 0,04$
5	-1(8)	-1(5)	1(80)	1(180)	$3,86 \pm 0,02$
6	1(10)	-1(5)	1(80)	-1(100)	$6,21 \pm 0,02$
7	-1(8)	1(15)	1(80)	-1(100)	$4,63 \pm 0,01$
8	1(10)	1(15)	1(80)	1(180)	$5,01 \pm 0,01$
9	0(9)	0(10)	0(60)	0(140)	$3,99 \pm 0,01$
10	0(9)	0(10)	0(60)	0(140)	$3,84 \pm 0,06$
11	0(9)	0(10)	0(60)	0(140)	$4,04 \pm 0,02$
12	0(9)	0(10)	0(60)	0(140)	$4,20 \pm 0,05$

^a pH; ^b Tempo (minutos); ^c Amplitude de potência (%); ^d razão farelo:água (g/L); ^e Resposta Experimental (média \pm erro padrão) para o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo).

Fonte: Autoria própria, 2020.

Pela análise de efeitos (Tabela 06) observa-se que as variáveis pH (x_1) e razão farelo:água (x_4) apresentaram efeitos significativos. Quando o pH (x_1) passou do menor nível (-1) para o maior (+1), ou seja, quando ocorreu o aumento de 8 para 10, esta mudança gerou um efeito positivo sobre o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo). Já para a razão farelo:água (x_4), quando o nível inferior (-1) passou para o superior (+1), ou seja, quando

ocorreu o aumento de 100 para 180 g/L, houve um efeito negativo sobre o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo). As variáveis tempo (x₂) e amplitude da potência (x₃) não apresentaram efeitos significativos sobre a resposta, na faixa estudada.

Tabela 06 - Efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento da extração das proteínas do farelo de arroz por ultrassom.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	4,69	0,22	21,30	0,0000*
(X₁) pH	1,49	0,54	2,76	0,0280*
(X₂) Tempo (minutos)	-0,77	0,54	-1,42	0,1980
(X₃) Amplitude da potência (%)	-0,22	0,54	-0,49	0,7020
(X₄) razão farelo:água (g/L)	-1,54	0,54	-2,85	0,0240*

* p ≤ 0,05; R² = 0,73

Fonte: Autoria própria, 2020.

A solubilidade dos compostos está diretamente relacionada com as variações do pH. Elevados valores de pH facilitam a extração pois alteram a carga líquida das proteínas, resultando na repulsão eletrostática e rompimento de algumas ligações de hidrogênio (NELSON; COX, 2014). Portanto, pode-se dizer que o efeito positivo gerado pelo aumento do pH, observado neste estudo, está relacionado a este fato. Outros pesquisadores também notaram o efeito benéfico do maior valor de pH sobre o rendimento da extração de proteínas do farelo de arroz. Jiamyangyuen et al. (2005) e Theerakulkait et al. (2006) verificaram um efeito favorável com o emprego de pH próximo a 10. Vieira et al. (2008) avaliaram o rendimento de extração em farinha de arroz para pH 9,5, 10,5 e 11 e observaram maiores rendimentos de extração com o acréscimo do pH. Bernardi (2015) aplicou pH 9, 10 e 11 para extrair proteínas do farelo de arroz através de banho ultrassônico e no pH 10, obteve concentrado proteico com teor de proteína de 83,36%. Bedin (2018) obteve um concentrado proteico de farelo de arroz com teor de proteína na faixa de 75,56 até 79,75%, com a variação do pH de 9 a 11.

Em alguns casos, em meio viscosos, por exemplo, a resistência para o movimento ultrassônico é maior, fazendo-se necessária elevada amplitude. Porém, para atingir o limiar de cavitação uma intensidade mínima é necessária. Portanto, o aumento da amplitude pode não ser necessário (CAPELO-MARTÍNEZ, 2009), o que pode explicar a não significância da variável amplitude de potência observada neste estudo. Além disso, a deterioração do transdutor pode ocorrer mais rapidamente em altas amplitudes, resultando apenas na agitação do líquido, em vez de cavitação (CAPELO-MARTÍNEZ, 2009).

Os maiores teores de proteína extraída nos níveis inferiores da variável razão farelo:água (efeito negativo) pode ser explicado pelo princípio da transferência de massa e pela interação entre a proteína e o solvente, respectivamente. Ao se utilizar mais solvente, uma força motriz maior pode ser gerada, aumentando o gradiente de concentração entre o sólido e o mesmo, resultando em uma maior transferência de massa do sólido para o meio (MEIRELES, 2008); além disso, pode ocorrer maior interação entre a proteína e o solvente, substituindo a interação proteína-proteína (DAMODARAN, 1997). Assim, pode-se sugerir que, com menores volumes de solvente observados nas maiores razões farelo:água, a interação proteína-água não foi completa e, portanto, não permitiu obter maiores quantidades de proteína no material extraído.

Com base nos efeitos das variáveis do processo observados no PFF, para a realização da segunda etapa (DCCR), o tempo foi fixado em 5 minutos e a amplitude de potência em 40%. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 07. O menor teor de proteínas ($4,03 \pm 0,01$ g de proteína.100 g⁻¹ de farelo) foi obtido no ensaio 8, onde utilizou-se 150 g/L para a variável razão farelo:água e pH 10. A maior extração foi obtida no ensaio 7 ($7,48 \pm 0,04$ g de proteína.100 g⁻¹ de farelo) onde utilizou-se pH 10 e 50 g/L.

Tabela 07 - Matriz do DCCR com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração em sonda ultrassônica.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	Y ^c	Ŷ ^d	Desvio relativo ^e (%)
1	-1 (9,3)	-1 (64)	6,39 ± 0,01	6,76	5,70
2	-1 (9,3)	1 (136)	6,10 ± 0,03	6,76	10,90
3	1 (10,7)	-1 (64)	7,24 ± 0,00	4,95	-31,63
4	1 (10,7)	1 (136)	5,17 ± 0,02	4,95	-4,34
5	-1,41 (9)	0 (100)	6,32 ± 0,02	6,87	8,66
6	1,41 (11)	0 (100)	5,32 ± 0,02	4,31	-19,06
7	0 (10)	-1,41 (50)	7,48 ± 0,04	6,12	-18,10
8	1 (10)	1,41 (150)	4,03 ± 0,01	6,12	52,03
9	2 (10)	0 (100)	5,14 ± 0,02	5,59	8,65
10	3 (10)	0 (100)	5,50 ± 0,01	5,59	1,47
11	4 (10)	0 (100)	4,90 ± 0,03	5,59	13,96

^a pH; ^b razão farelo:água (g/L); ^{c,d} Respostas Experimental (média ± erro padrão) e Predita para o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo), respectivamente; ^e Desvio Relativo para teor de proteínas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo) = $((Y - \hat{Y})/Y) * 100$; onde Y = resposta experimental e \hat{Y} = resposta predita pelo modelo.

Fonte: Autoria própria, 2020.

Na Tabela 08 estão apresentados os coeficientes de regressão para a resposta de extração proteica. A variável razão farelo:água apresentou efeito significativo sobre a quantidade de proteína extraída, confirmando os resultados obtidos no PFF, ou seja, o acréscimo

de 50 g/L (nível inferior) para 150 g/L (nível superior) causou uma diminuição no teor de proteína extraída. Verificou-se que a variável pH não apresentou efeito significativo na faixa estudada, podendo ser fixada em 10.

Tabela 08 - Coeficientes de regressão para a resposta de teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo)

Fatores	Coefficientes de Regressão	Erro padrão	t (5)	p – valor
Média	5,18	0,32	15,95	0,0000*
x₁^a (L)	-0,19	0,20	-0,94	0,3920
x₁^a (Q)	0,43	0,24	1,81	0,1304
x₂^b (L)	-0,91	0,20	-4,55	0,0061*
x₂^b (Q)	0,39	0,24	1,67	0,1564
x₁^a. x₂^b	-0,44	0,28	-1,57	0,1777

x₁^a – pH; x₂^b – razão farelo:água (g/L); L – termo linear; Q – termo quadrático; * p ≤ 0,05; R²=0,85; Fonte: Autoria própria, 2020.

Considerando-se os parâmetros significativos (p≤0,05) obteve-se a Equação 11, que representa o modelo para o teor de proteínas extraídas em função das variáveis estudadas. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 09. Como o $F_{calculado}$ para a regressão foi significativo (p= 0,0149), sendo maior que o $F_{tabelado}$, podemos concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta da Figura 06.

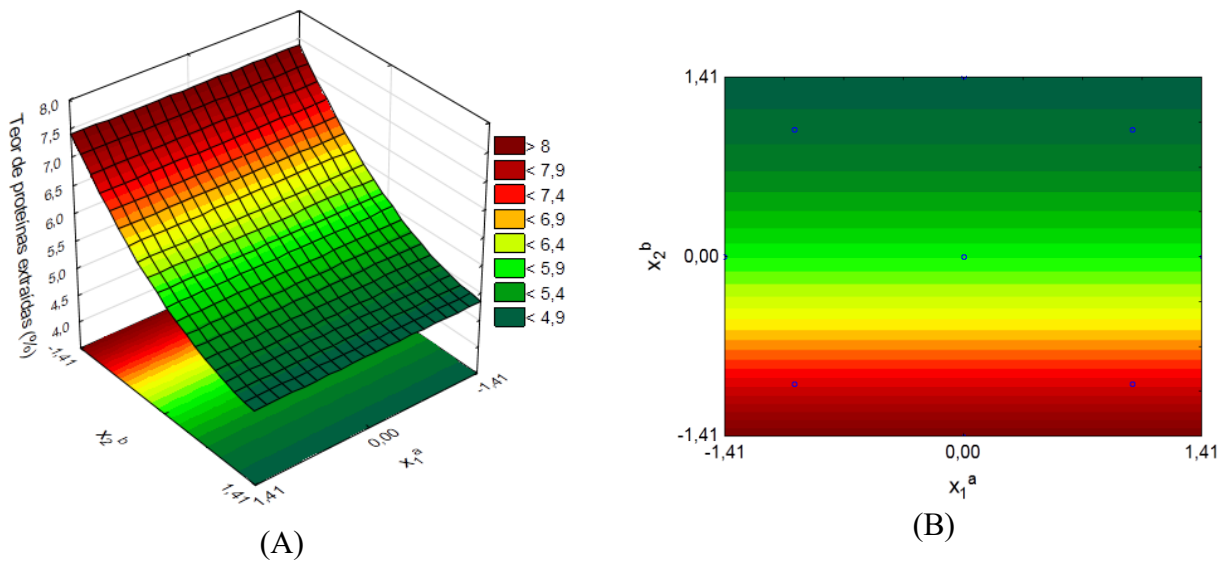
$$Y = 5,58 - 0,91.x_2 + 0,27.x_2^2 \quad (11)$$

Tabela 09 - Análise de variância do modelo para predição do teor de proteínas extraídas do farelo de arroz por ultrassom

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F _{calculado}	p – valor
Regressão	7,00	2	3,50	7,62	0,0149
Resíduos	3,68	8	0,46		
Total	10,68	10			

^a soma dos quadrados; ^b grau de liberdade; ^c quadrado médio; R² = 0,66; F_{Tabelado} = 4,459
Fonte: Autoria própria, 2020.

Figura 06- Superfície de resposta (A) e Curvas de curvas de contorno (B) do teor de proteína extraído do farelo de arroz (g de proteína.100g⁻¹ de farelo) em função do pH e da razão farelo:água (g/L).



x_1^a pH, x_2^b razão farelo:água (g/L); % Teor de proteínas extraídas do farelo de arroz (g de proteína.100g⁻¹ de farelo).
Fonte: Autoria própria, 2020.

Pela análise da superfície de resposta pode-se verificar que o acréscimo na razão farelo:água resulta em decréscimo do teor de proteína extraída. Assim, menores razões farelo:água (50 e 64 g/L), proporcionaram maior eficiência do processo.

O pH não apresentou efeito significativo dentro da faixa estudada (9 - 11), sendo assim, para a sequência do estudo e realização das extrações, o pH foi fixado em 10, pois observou-se o maior teor proteico neste pH ($7,48 \pm 0,04$ g de proteína.100 g⁻¹ de farelo). O aumento do pH pode ocasionar a hidrólise parcial de ligações peptídicas, destruição de grupos sulfidril ou agregação que podem levar a desnaturação irreversível das mesmas, racemização de aminoácidos, formação de compostos tóxicos, redução de digestibilidade, perda de aminoácidos essenciais e diminuição do valor nutritivo (DAMODARAN, 1997; MARTÍNEZ-MAQUEDA et al., 2013).

Para validar os resultados obtidos no DCCR e confirmar o efeito da razão farelo:água, foram realizados dois ensaios, em triplicata, mantendo fixo o pH em 10, tempo em 5 minutos, amplitude da potência em 40% e variando a concentração em 50 g/L e 65 g/L. Na Tabela 10 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 10 – Resposta da extração (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo), obtida em pH 10, 40% de amplitude de potência em 5 minutos.

Ensaio	g de proteína.100g ⁻¹ de farelo
50 g/L	7,44 ^a ± 0,29
65 g/L	5,84 ^b ± 0,33

Médias ± desvio padrão (n = 3 repetições), letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste-t (p ≤ 0,05).

Fonte: Autoria própria, 2020.

Em relação ao teor de proteína no material extraído, pode-se notar que o teor de proteínas extraída foi significativamente superior (p ≤ 0,05) no ensaio com razão farelo:água de 50 g/L. Portanto, para o processo de extração proteica, as melhores condições para a obtenção do CPFA foram 50 g/L, pH 10, 5 minutos, com amplitude de potência em 40%.

5.1.1.1 *Influência da profundidade de imersão da sonda*

Durante a realização das análises observou-se ainda, que a profundidade de imersão da sonda tem influência sobre o rendimento da extração, devido à turbulência gerada no líquido estar mais próxima das partículas que tendem a permanecer no fundo da célula, mesmo com a agitação prévia. Os resultados do teor de proteína extraída à 5 mm e 20 mm de profundidade de imersão da sonda, estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11 – Comparação do teor de proteína extraída em diferentes alturas de imersão

Ensaio	Y ^a	Y ^b
1	0,16 ^b ± 0,05	6,39 ^a ± 0,01
2	0,31 ^b ± 0,01	6,10 ^a ± 0,03
3	-	7,24 ^a ± 0,00
4	0,20 ^b ± 0,08	5,17 ^a ± 0,02
5	0,17 ^b ± 0,03	6,32 ^a ± 0,02
6	0,26 ^b ± 0,02	5,32 ^a ± 0,02
7	0,17 ^b ± 0,04	7,48 ^a ± 0,04
8	0,27 ^b ± 0,04	4,03 ^a ± 0,01
9	0,15 ^b ± 0,05	5,14 ^a ± 0,02
10	0,15 ^b ± 0,01	5,50 ^a ± 0,01
11	0,12 ^b ± 0,00	4,90 ^a ± 0,03

^a Resposta experimental do teor de proteína extraída à 5 mm; ^b Resposta experimental do teor de proteína extraída à 20 mm; Médias ± desvio padrão (n = 3 repetições), letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem entre si, pelo Teste-t (p ≤ 0,05).

Fonte: Autoria própria, 2020.

Souza (2015) observou que a imersão de 3 cm aumenta a quantidade de compostos fenólicos extraídos de uvas quando comparada com a imersão de 1 cm. Liu et al. (2013) utilizaram o ultrassom como auxiliar na microfiltração de extratos de bagaço de uva. A imersão da sonda de ultrassom foi avaliada em relação à distância da membrana de microfiltração. O resultado obtido demonstrou que quanto mais imersa a sonda, mais forte era o efeito de turbulência gerado pelas ondas de ultrassom no líquido.

5.1.2 Extração enzimática

Foi estudado o efeito da concentração de protease (%), temperatura (°C), tempo (minutos) e pH na extração enzimática de proteínas do farelo de arroz desengordurado. As variáveis estudadas e as respostas experimentais estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração enzimática e resposta experimental.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	x ₃ ^c	x ₄ ^d	Y ^e
1	-1 (0,5)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (7)	3,44 ± 0,00
2	1 (5)	-1 (30)	-1 (30)	1 (9)	4,69 ± 0,41
3	-1 (0,5)	1 (60)	-1 (30)	1 (9)	5,61 ± 0,06
4	1 (5)	1 (60)	-1 (30)	-1 (7)	6,95 ± 0,01
5	-1 (0,5)	-1 (30)	1 (120)	1 (9)	6,40 ± 0,00
6	1 (5)	-1 (30)	1 (120)	-1 (7)	6,70 ± 0,00
7	-1 (0,5)	1 (60)	1 (120)	-1 (7)	8,54 ± 0,01
8	1 (5)	1 (60)	1 (120)	1 (9)	9,03 ± 0,00
9	0 (2,8)	0 (45)	0 (75)	0 (8)	8,35 ± 0,01
10	0 (2,8)	0 (45)	0 (75)	0 (8)	8,40 ± 0,01
11	0 (2,8)	0 (45)	0 (75)	0 (8)	8,24 ± 0,04

^a Concentração de protease (%); ^b Temperatura (°C); ^c Tempo (Minutos); ^d pH; ^e Resposta Experimental (média ± erro padrão) para o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo).

Fonte: Autoria própria, 2020.

Pela análise de efeitos (Tabela 13) observa-se que as variáveis temperatura (x₂) e tempo (x₃) apresentaram efeitos significativos. Quando a temperatura (x₂) passou do menor nível (-1) para o maior (+1), ou seja, quando ocorreu o aumento de 30 para 60 °C, esta mudança

gerou um efeito positivo sobre o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo). Assim como para o tempo (x₃), quando o nível inferior (-1) passou para o superior (+1), ou seja, com o acréscimo de 30 para 120 minutos, houve um efeito positivo sobre o rendimento da extração (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo). As variáveis concentração de protease (x₁) e pH (x₄) não apresentaram efeitos significativos sobre a resposta, na faixa estudada.

Tabela 13 - Efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento da extração enzimática das proteínas do farelo de arroz desengordurado.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	6,94	0,36	19,46	0,0000*
(X₁) Concentração de protease (%)	0,85	0,84	1,01	0,3510
(X₂) Temperatura (°C)	2,22	0,84	2,66	0,0376*
(X₃) Tempo (minutos)	2,49	0,84	2,98	0,0246*
(X₄) pH	0,02	0,84	0,02	0,9811

* $p \leq 0,05$; $R^2 = 0,74$

Fonte: Autoria própria, 2020.

Cada enzima possui uma faixa ótima de temperatura de trabalho onde sua atividade catalítica é máxima, da mesma forma, fora desta faixa a enzima pode ser inativada (desnaturada) ou ter sua atividade diminuída (LIU et al., 2016; SARI, 2015). A protease possui condições ótimas de ação na faixa de pH 7 a 9 (NOVOZYMES, 2014), faixa escolhida para o estudo. Apesar de não apresentar efeito significativo no teor proteico, observou-se que com o aumento do pH, a separação das fases (sobrenadante 1 e precipitado 1) era favorecida; portanto, fixou-se o pH em 9. Da mesma maneira, embora o efeito da concentração da enzima não tenha se mostrado significativo na faixa estudada (0,5 a 5,0%), optou-se por fixar este parâmetro em 3,0% (próximo ao ponto central do PFF) em função dos resultados de trabalhos anteriores BIZZOTTO et al., 2006b, CAPOBIANGO et al., 2006, VIEIRA et al., 2008, GÖRGÜÇ; BIRCAN; YILMAZ, 2019).

Outro fator que influencia a ação das enzimas é o tempo de processo, quando muito longo pode afetar o rendimento e o custo industrial, inviabilizando o processo; no entanto, quando muito curto, afeta diretamente a eficiência da enzima. O tempo ideal está relacionado com outros parâmetros do processo como a concentração de enzima e temperatura (BOYE; BARBARA, 2015; DAMODARAN et al., 2010; SARI, 2015). Observou-se que o aumento do tempo de extração apresentou efeito significativo positivo no teor de proteínas extraídas, portanto a faixa estudada foi ampliada na segunda etapa do estudo.

Os resultados obtidos no DCCR estão demonstrados na Tabela 14. O menor teor de proteínas ($7,12 \pm 0,01$ g de proteína.100 g⁻¹ de farelo) foi obtido no ensaio 7, onde utilizou-se 105 minutos e 40 °C. A maior extração foi obtida no ensaio 4 ($9,59 \pm 0,01$ g de proteína.100 g⁻¹ de farelo) onde utilizou-se 137 minutos e 57 °C.

Tabela 14 - Matriz do DCCR com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração enzimática.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	Y ^c	Ŷ ^d	Desvio relativo ^e (%)
1	-1 (73)	-1 (43)	8,41 ± 0,01	7,59	9,72
2	-1 (73)	1 (57)	8,36 ± 0,01	8,62	-3,18
3	1 (137)	-1 (43)	8,43 ± 0,03	8,33	1,26
4	1 (137)	1 (57)	9,59 ± 0,01	9,36	2,43
5	-1,41 (60)	0 (50)	7,72 ± 0,00	8,02	-3,86
6	1,41 (150)	0 (50)	8,91 ± 0,01	9,05	-1,66
7	0 (105)	-1,41 (40)	7,12 ± 0,01	7,68	-7,87
8	0 (105)	1,41 (60)	9,25 ± 0,02	9,14	1,25
9	0 (105)	0 (50)	8,31 ± 0,01	8,18	1,55
10	0 (105)	0 (50)	8,24 ± 0,00	8,18	0,71
11	0 (105)	0 (50)	8,00 ± 0,00	8,18	-2,34

^a Tempo (Minutos); ^b Temperatura (°C); ^{c,d} Respostas Experimental (média ± erro padrão) e Predita para o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo), respectivamente; ^e Desvio Relativo para teor de proteínas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo) = $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta predita pelo modelo.

Fonte: Autoria própria, 2020.

Na Tabela 15 estão apresentados os coeficientes de regressão para a resposta do teor de proteínas extraídas pelo método enzimático. A variável temperatura apresentou efeito significativo sobre a resposta, ou seja, quando o nível passou do inferior (-1,41, 40 °C) para o superior (+1,41, 60° C) o teor de proteína extraída aumentou. Verificou-se que a variável tempo também apresentou efeito significativo na faixa estudada, ou seja, quando o nível passou do inferior (-1,41, 60 minutos) para o superior (+1,41, 150 minutos) o teor de proteína extraída aumentou.

Tabela 15 - Coeficientes de regressão para a resposta g de proteína.100 g⁻¹ de farelo

Fatores	Coefficientes de Regressão	Erro padrão	t (5)	p – valor
Média	8,18	0,25	32,83	0,0000*
x₁^a (L)	0,73	0,31	2,41	0,0612*
x₁^a (Q)	0,35	0,36	0,97	0,3767
x₂^b (L)	1,03	0,301	3,37	0,0198*
x₂^b (Q)	0,23	0,36	0,63	0,5576
x₁^a. x₂^b	0,61	0,43	1,40	0,2200

x₁^a – Tempo (minutos); x₂^b – Temperatura (°C); L – termo linear; Q – termo quadrático; * p ≤ 0,10; R²=0,80;
Fonte: Aatoria própria, 2020.

Considerando-se os parâmetros significativos (p≤0,10) obteve-se a Equação 12, que representa o modelo para o teor de proteínas extraídas em função das variáveis estudadas. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 16. Como o $F_{calculado}$ para a regressão foi significativo (p= 0,080), sendo maior que o $F_{tabelado}$, podemos concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta da Figura 07.

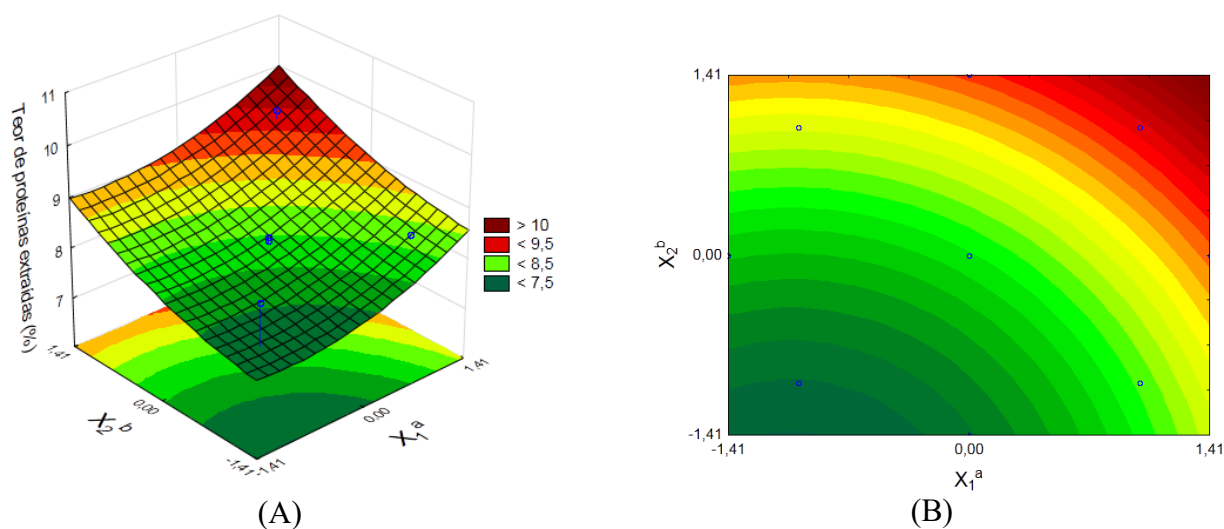
$$Y = 8,18 + 0,367 \cdot x_1 + 0,176 \cdot x_1^2 + 0,51 \cdot x_2 + 0,11 \cdot x_2^2 \quad (12)$$

Tabela 16 - Análise de variância do modelo para predição do teor de proteínas extraídas do farelo de arroz desengordurado pelo método enzimático.

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F _{calculado}	p – valor
Regressão	3,810	5,000	0,762	4,089	0,080
Resíduos	0,932	5,000	0,186		
Total	4,694	10,000	0,469		

^a soma dos quadrados; ^b grau de liberdade; ^c quadrado médio; R² = 0,80; F_{Tabelado} = 3,453
Fonte: Aatoria própria, 2020.

Figura 07- Superfície de resposta (A) e Curvas de curvas de contorno (B) do teor de proteína extraído do farelo de arroz (g de proteína.100g⁻¹ de farelo) em função do tempo (minutos) e temperatura (°C).



X_1^a tempo (minutos), X_2^b Temperatura (°C); %Teor de proteínas extraídas do farelo de arroz (g de proteína.100g⁻¹ de farelo).

Fonte: Autoria própria, 2020.

Pela análise da superfície de resposta pode-se verificar que a elevação da temperatura e do tempo resultaram em acréscimo do teor de proteína extraída. Assim, maiores temperaturas (57 e 60 °C) e maior tempo (137 e 150 minutos), proporcionaram maior eficiência do processo.

Para validar os resultados obtidos no DCCR e confirmar o efeito da temperatura, foram realizados quatro ensaios, em triplicata, mantendo fixo o pH em 9, a concentração da enzima em 3%, o tempo em 150 minutos e variando a temperatura em 50, 55, 60 e 65 °C. Na Tabela 17 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 17 – Resposta da extração (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo), obtida em pH 9, 3% de protease em 150 minutos.

Ensaio	g de proteína.100g ⁻¹ de farelo
50 °C	8,94 ^a ± 0,03
55 °C	9,66 ^b ± 0,04
60 °C	9,95 ^b ± 0,07
65 °C	8,80 ^a ± 0,15

Médias ± desvio padrão (n = 3 repetições), letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si, pelo

Teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Fonte: Autoria própria, 2020.

Em relação ao teor de proteína no material extraído, pode-se notar que o teor de proteínas extraída foi significativamente superior ($p \leq 0,05$, teste de Tukey) nos ensaios com temperatura de 55 °C e 60 °C, sendo os resultados estatisticamente semelhantes nestas duas temperaturas, de modo que optou-se por fixar a temperatura em 55 °C, devido ao menor gasto energético. Portanto, para o processo de extração proteica, as melhores condições para a obtenção do HPFA foram 3% de protease, em pH 9, durante 150 minutos, a 55 °C.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO E DO HIDROLISADO PROTEICO.

5.2.1 Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal do farelo de arroz desengordurado, do concentrado proteico e do hidrolisado proteico estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Composição centesimal do farelo de arroz desengordurado, do concentrado proteico do farelo de arroz e do hidrolisado proteico do farelo de arroz

	FAD	CPFA	HPFA
Proteína (%)	14,93 ± 0,05	76,01 ± 0,06	71,19 ± 0,10
Umidade (%)	9,89 ± 0,05	5,68 ± 0,07	8,77 ± 0,05
Lipídeos (%)	1,43 ± 0,02	4,12 ± 0,06	4,00 ± 0,06
Cinzas (%)	12,36 ± 0,05	5,89 ± 0,09	6,54 ± 0,04
Carboidratos totais (%)	61,39	8,30	9,50

Média ± desvio padrão (n = 3). Carboidratos determinados por diferença.

Fonte: Autoria própria, 2020.

Bernardi (2015) obteve, com banho ultrassônico, um concentrado proteico com 83,36 ± 3,10% de proteínas quando utilizado pH 10, 30 minutos de ultrassom, 100% de amplitude da potência, a 30 °C, superior ao observado neste estudo (76,01 ± 0,06%). Bedin (2018), ao estudar as extrações alcalina, por ultrassom e por micro-ondas, observou semelhança entre as composições das amostras analisadas (75,32 ± 0,15 %, 79,72 ± 0,17 % e 79,96 ± 0,19 %, respectivamente), indicando que a aplicação de ultrassom e micro-ondas na extração da proteína não afetou negativamente a composição dos extratos obtidos. Resultados similares foram observados por Chittapalo e Noomhorm (2009), que produziram um CPFA com teor proteico

de 76,09% através de extração alcalina assistida por ultrassom, valor semelhante ao obtido neste estudo. Fatores como o local e o período de cultivo do arroz, podem influenciar a composição centesimal do FAD e a extração das proteínas (PRAKASH; RAMANATHAM, 1994; KHAN et al., 2011). Han; Chee e Cho (2015), 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

Vieira et al. (2008) estudaram a extração enzimática (protease alcalina e neutra) das proteínas de uma farinha comercial de arroz e obtiveram hidrolisados proteicos com 63,4% de proteínas, empregando 100 g/L de matéria-prima, pH 10,5, 0,1% de protease alcalina a 50 °C. Ao estudar a influência da hidrólise enzimática e da ultrafiltração na obtenção de uma proteína hidrolisada de endosperma de arroz, SOUZA et al. (2017) observou $71,28 \pm 0,94$ % de proteína no hidrolisado proteico. Zhang et al. (2012) obtiveram 44,79% de teor de proteína ao estudar tratamento alcalino, seguido de tratamento enzimático com Alcalase 2,4 L nas condições otimizadas de 1:10 (p/v) de farelo de arroz e água, concentração 250 u/g, pH 10,0, incubando a 50 °C por 2 h, resultados que são inferiores aos obtidos neste trabalho.

5.2.2 Rendimento global e proteico dos métodos de extração

O rendimento global do processo de extração do concentrado proteico do farelo de arroz desengordurado aplicando tratamento por sonda ultrassônica foi de 1,13%, ou seja, em 100 g de FAD foi possível obter 1,13 g de concentrado proteico. Já pelo método de extração enzimática o rendimento global foi de 0,96%, deste modo pode-se afirmar que em 100 g de FAD foi possível obter 0,96 g de hidrolisado proteico.

Na Tabela 19 estão apresentados os rendimentos proteico dos processos de extração por ultrassom em sonda ultrassônica e pelo método enzimático.

Tabela 19 – Teores de proteínas e de umidade do FAD, do CPFA e do HPFA para determinação do rendimento do processo de extração.

	FAD*	CPFA*	HPFA*
Teor de proteínas	14,93 ± 0,05	76,01 ± 0,06	71,19 ± 0,10
Umidade	9,89 ± 0,05	5,68 ± 0,07	8,77 ± 0,05
Rendimento (%)		6,01	4,63

*g de proteína.100 g⁻¹ de farelo; Médias ± desvio padrão (n = 3)

Fonte: Autoria própria, 2020.

O baixo rendimento da extração proteica 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).

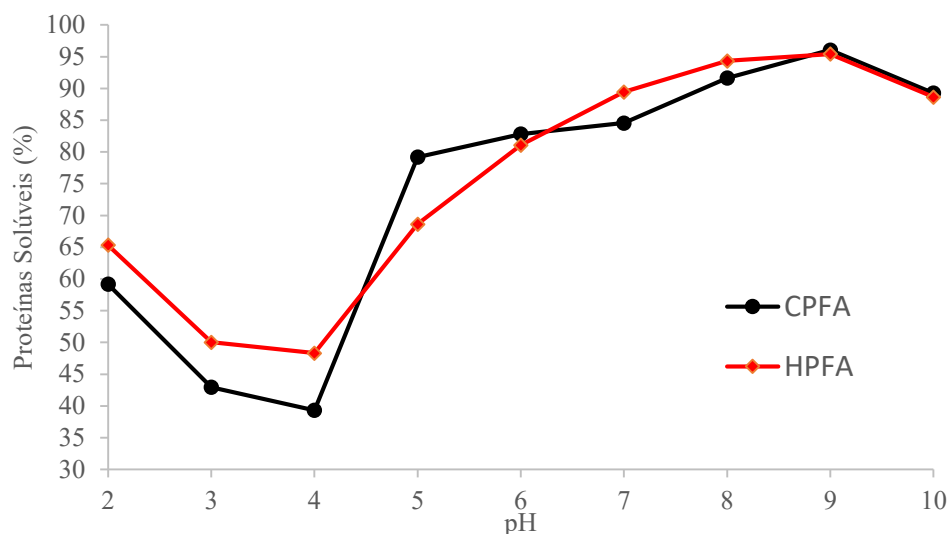
Mesmo considerando a complexidade do processo, o rendimento obtido neste estudo via extração por sonda ultrassônica obtido em 5 minutos de tempo de processo, é superior ao relatado por diversos autores e similar ao obtido via extração enzimática. Bernardi (2015) relatou um rendimento proteico de 4,74% com extração assistida por banho ultrassônico nas condições de pH 10, 30 minutos em ultrassom e 100 % de amplitude da potência à 30°C. Chittapalo e Noomhorm (2009) 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%. Phongthai et al. (2016), ao extraírem proteína de farelo de arroz, ao aumentarem o tempo de extração de 60 para 120 segundos, observaram variação do rendimento de extração de $3,55 \pm 0,04\%$ para $4,08 \pm 0,00\%$, respectivamente.

5.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO

5.3.1 Solubilidade

Na Figura 08 estão representados os perfis de solubilidade dos extratos proteicos do CPFA e do HPFA em função da variação do pH, obtidos através de extração por sonda ultrassônica e extração enzimática.

Figura 08 – Curva de solubilidade para o concentrado proteico (CPFA) e hidrolisado proteico (HPFA) de farelo de arroz em função do pH.



Fonte: A autoria própria, 2020.

Analisando a Figura 08, observa-se que a solubilidade mínima dos ensaios se dá em pH 4 (39,32% para o CPFA e 48,31% para o HPFA), possivelmente pelo fato de que, para a maioria das proteínas do farelo de arroz, a menor solubilidade se dá no ponto isoelétrico (4,5), devido a equivalência no número de cargas elétricas das proteínas, gerando a interação hidrofóbica máxima e repulsão eletrostática e hidratação iônica mínimas, formando então agregados e precipitação das moléculas (ORDÓÑEZ et al., 2005; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Por outro lado, verificou-se que a solubilidade aumentou com o acréscimo do pH, sendo a máxima solubilidade, obtida em pH 9, atingindo 96,06% para o CPFA e 95,43% para o HPFA. O aumento da solubilidade em função do aumento do pH ocorre devido à predominância de cargas negativas que geram forças de repulsão eletrostáticas capazes de promover a dissociação dos complexos e consequente solubilização da proteína, devido a maior interação entre proteína e solvente (SGARBIERI, 1996; DENG et al., 2011).

Ao estudarem o hidrolisado proteico do endosperma do arroz, Souza et al. (2017) obtiveram solubilidade de 99,8% a pH 6. Bernardi (2015) observou crescimento gradativo da solubilidade com o aumento do pH, obtendo 99,7% de solubilidade em pH 7 no concentrado proteico do farelo de arroz extraído por banho ultrassônico. Wang et al. (2015), ao avaliarem a solubilidade do concentrado proteico do farelo de arroz, alcançaram valor máximo de solubilidade de 80%. Jambrak et al. (2008) relatou que o uso de ondas ultrassônicas em

proteínas pode afetar suas propriedades funcionais; ao avaliarem a solubilidade de isolado proteico de soro de leite, verificaram que amostras sem tratamento apresentaram 66,8% de solubilidade, enquanto as que foram submetidas ao tratamento ultrassônico apresentaram solubilidade máxima de 85%. Neste trabalho, no entanto, não foram observadas diferenças significativas na solubilidade máxima alcançada para o HPFA e CPFA.

5.3.2 Capacidade de absorção de água e de óleo

Na Tabela 20 estão expressos os resultados de capacidade de absorção de água e de óleo. O HPFA apresentou $CA_{\text{água}}$ superior ($5,08 \pm 0,48 \text{ g.g}^{-1}$) ao CPFA ($3,21 \pm 0,02 \text{ g.g}^{-1}$) e ao BSA ($0,57 \pm 0,01 \text{ g.g}^{-1}$), diferenciando-se significativamente ($p \leq 0,05$). Já a $CA_{\text{óleo}}$ não apresentou diferença significativa entre o CPFA ($11,38 \pm 0,06 \text{ g.g}^{-1}$) e o HPFA ($11,56 \pm 0,16 \text{ g.g}^{-1}$), porem foram superiores quando comparados ao BSA ($4,15 \pm 0,03 \text{ g.g}^{-1}$).

Tabela 20 – Capacidade de absorção de água e óleo pelo concentrado proteico de farelo de arroz, hidrolisado proteico de farelo de arroz e pela albumina bovina sérica

	CPFA	HPFA	BSA
CAA (g de água.g⁻¹ de amostra)	3,21 ^{bb} ± 0,02	5,08 ^{ba} ± 0,48	0,57 ^{bc} ± 0,01
CAO (g de óleo.g⁻¹ de amostra)	11,38 ^{aa} ± 0,06	11,56 ^{aa} ± 0,16	4,15 ^{ab} ± 0,03

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

Fonte: Aatoria própria, 2020.

Chandi; Sogi (2007) observaram que o concentrado proteico do farelo de arroz obtido em pH 9, com agitação por 1 h, a 25 °C, apresentou $CA_{\text{água}}$ de 3,87 g.g^{-1} e $CA_{\text{óleo}}$ de 3,74 g.g^{-1} . O CPFA obtido por banho ultrassônico (BERNARDI, 2015) mostrou ser capaz de absorver $1,04 \pm 0,07 \text{ g.g}^{-1}$ de água e $11,75 \pm 0,67 \text{ g.g}^{-1}$ óleo. Cao et al. (2009) obtiveram isolado proteico de farelo de arroz (pH 8,5; 30 °C; agitação por 2 h) que apresentou $CA_{\text{água}}$ de 3,54 g.g^{-1} e $CA_{\text{óleo}}$ de 3,83 g.g^{-1} .

Dench, Rivas e Caygill (1981) propuseram que, provavelmente, a absorção de gordura ocorre em função da composição da proteína e dos números de grupos lipofílicos disponíveis. Além disso, Lin, Humbert e Sosulski (1974) mencionam que as cadeias não polares das

proteínas possam ter maior afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de gordura, contribuindo para absorção de mesma. Com isso, é possível justificar o fato de que a CAóleo foi maior quando comparado com a capacidade de absorção de água. Além disso, a capacidade de ligação das proteínas alimentares com a água varia conforme a composição de aminoácidos, polaridade/hidrofobicidade da superfície e conformação da proteína (KUMAR et al., 2014).

5.3.3 Capacidade de formação e estabilidade de espuma

Os resultados da capacidade de formação de espuma e estabilidade da espuma estão expressos nas Tabelas 21 e 22, respectivamente.

Tabela 21 – Capacidade de formação de espuma do CPFA, HPFA e BSA, em diferentes pHs.

pH	CPFA (%)	HPFA (%)	BSA (%)
4	19,3 ^{cb} ± 1,15	13,00 ^{ec} ± 0,58	141 ^{aA} ± 1,41
6	28,00 ^{bb} ± 0,00	18,67 ^{bc} ± 0,00	85 ^{bA} ± 1,41
8	46,66 ^{ab} ± 1,15	36,00 ^{ac} ± 0,58	68 ^{cA} ± 0,00

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

Fonte: Aatoria própria, 2020.

Em pH 4, 6 e 8 (Tabela 21), a CF_{Espuma} do CPFA foi inferior ao BSA e superior ao HPFA, diferindo significativamente ($p \leq 0,05$). Em pH 4 e 6, o desempenho do CPFA e do HPFA foi baixo, favorecendo nessas condições, 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 8, o CPFA mostrou boa capacidade espumante, podendo ser avaliado como agente de formação de espuma na indústria de alimentos. Os percentuais observados atestam sua alta capacidade espumante.

Tabela 22 – Estabilidade da espuma do CPFA, HPFA e BSA, em diferentes pHs.

pH	CPFA (%)	HPFA (%)	BSA (%)
4	8,00 ^{cb} ± 0,00	2,33 ^{cc} ± 0,58	19,00 ^{ba} ± 1,41
6	13,33 ^{bb} ± 2,31	7,00 ^{bc} ± 0,00	18,00 ^{ca} ± 2,82
8	26,00 ^{aa} ± 0,00	14,33 ^{ac} ± 0,58	20,00 ^{ab} ± 0,00

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

Fonte: Autoria própria, 2020.

Na Tabela 22, a estabilidade da espuma do HPFA foi baixa e significativamente diferente ($p \leq 0,05$) entre os pH 4, 6 e 8. A BSA foi mais estável que o HPFA em todos os pHs, diferenciando significativamente ($p \leq 0,05$). Já a estabilidade da espuma do CPFA foi baixa e significativamente diferente ($p \leq 0,05$) entre os pH 4 e 6 quando comparado ao BSA e superior em pH 8. O CPFA foi mais estável que o HPFA ($p \leq 0,05$) em todos os pHs.

O aumento do pH de 4 para 6 e 8, ocasionou melhora no aumento da estabilidade da espuma do CPFA. Chandi e Sogi (2007) observaram 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. Bernardi (2015), constatou o maior poder espumante da BSA quando comparado com CPFA obtido por banho ultrassônico. Avaliando CPFA, Zhang et al. (2012) obtiveram espumas mais estáveis em pH 9 que a pH 3 ($p \leq 0,05$). 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).

Normalmente as espumas são mais estáveis próximo ao pH correspondente ao seu ponto isoelétrico 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). Assim, proteínas vegetais em pH próximo ao seu ponto isoelétrico podem apresentar propriedades funcionais limitadas (PATINO; SÁNCHEZ; NIÑO, 2008). O teor lipídico acima de 0,5% em concentrados e isolados proteicos pode ser um fator de desestabilização de espumas, pois são mais ativos na superfície que as proteínas, atuando na interface ar-água (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; CANO-MEDINA et al., 2011).

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 causado 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 passam a ser parcialmente desdobradas em estruturas que promovem o aumento do poder de formação de espuma (JAMBRAK et al., 2008).

Proteínas com boa capacidade de formação de espuma não apresentam necessariamente boa capacidade de estabilidade de espuma. Essas propriedades não influenciam por fatores diferentes. Enquanto a espumabilidade está relacionada com a taxa de adsorção, hidrofobicidade e flexibilidade, a estabilidade depende das propriedades reológicas da proteína (DAMODARAM; PARKIN; FENEMMA, 2010).

5.3.4 Capacidade de formação e estabilidade de emulsão

Os resultados da capacidade de formação de emulsão estão expressos na Tabela 23.

Tabela 23 – Capacidade de formação de emulsão do CPFA, HPFA e BSA, em diferentes pHs.

pH	CPFA (%)	HPFA (%)	BSA (%)
2	59,27 ^{dA} ± 0,29	45,78 ^{cC} ± 0,24	54,82 ^{cB} ± 0,74
4	68,47 ^{cA} ± 0,20	53,09 ^{bC} ± 0,45	65,52 ^{bB} ± 1,74
6	76,27 ^{aA} ± 0,39	53,44 ^{bB} ± 0,82	75,46 ^{aA} ± 0,35
8	72,29 ^{bA} ± 0,19	58,30 ^{aB} ± 0,54	66,54 ^{bC} ± 1,67

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

Fonte: Autoria própria, 2020.

Verificou-se (Tabela 23) que o pH influencia as propriedades emulsificantes e as estabilidades de emulsão. Os resultados de $CF_{Emulsão}$ mostram que nos diferentes pHs, o volume emulsionado do CPFA apresenta diferença significativa ($p \leq 0,05$). Em pH 6, o CPFA apresentou maior poder emulsificante (76,27%) e o menor em pH 2 (59,27%). O HPFA não apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos ensaios com pH 4 e 6 (53,09% e 53,44%,

respectivamente), mas teve diferença significativa nos ensaios com pH 2 e 8 (45,78% e 58,30, respectivamente). O BSA diferiu-se significativamente nos ensaios com pH 2 e 6, sendo que o pH 6 apresentou o maior poder emulsificante (75,46%), estatisticamente semelhante ao ensaio com pH 6 do CPFA. Hamada (2000) observou que a capacidade de emulsão de hidrolisados proteicos aumentava em consequência da elevação do pH (pH 5,0, 7,0 e pH 9,0 estava entre 10% e 51%).

A capacidade de emulsão está relacionada com a capacidade de difusão de peptídeos nas interfaces óleo-água. Hidrolisados com moléculas menores e alta solubilidade, tendem a facilitar a difusão e a interação entre proteínas e lipídios (BANDYOPADHYAY et al., 2008). Porém, estudos relatam que peptídeos de cadeias menores podem apresentar baixa capacidade emulsificante, devido à baixa capacidade em diminuir a tensão superficial e reduzida capacidade de interações estéricas (WAGNER; SORGENTINI; ANON, 2000).

Segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2010) grande parte das proteínas alimentares proporcionam maior eficiência de capacidade de emulsão quando o pH da solução se distancia do ponto isoelétrico, pois neste pH as proteínas são pouco solúveis e hidratadas. Jambrak et al. (2008) relatam que o tratamento ultrassônico pode melhorar a capacidade de formação de espuma, devido a homogeneização, que favorece a dispersão uniforme das partículas de proteínas e de gordura.

Os resultados da estabilidade de emulsão estão expressos na Tabela 24.

Tabela 24 – Estabilidade de emulsão do CPFA, HPFA e BSA, em diferentes pHs.

pH	CPFA (%)	HPFA (%)	BSA (%)
2	45,57 ^{cC} ± 0,85	25,91 ^{cB} ± 2,17	50,28 ^{dA} ± 0,63
4	59,80 ^{bC} ± 1,99	49,22 ^{bB} ± 1,07	88,29 ^{aA} ± 1,15
6	67,88 ^{aB} ± 0,08	52,81 ^{aC} ± 1,57	74,32 ^{bA} ± 1,23
8	56,60 ^{bA} ± 1,51	48,09 ^{bB} ± 0,51	58,40 ^{eA} ± 1,21

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

Fonte: Autoria própria, 2020.

Na Tabela 25 verificou-se que o CPFA não diferiu estatisticamente ($p \leq 0,05$) do BSA em pH 8, 56,60% e 58,40%, respectivamente. Nos pHs 4 e 6 o BSA apresentou boa estabilidade de emulsão, sendo que a maior estabilidade foi obtida no pH 4 (88,29%) e a menor em pH 2 (50,28%). O HPFA apresentou diferença significativa em relação aos outros ensaios, sendo que sua maior capacidade de estabilização de emulsão foi encontrada em pH 6 (52,81%) e a menor

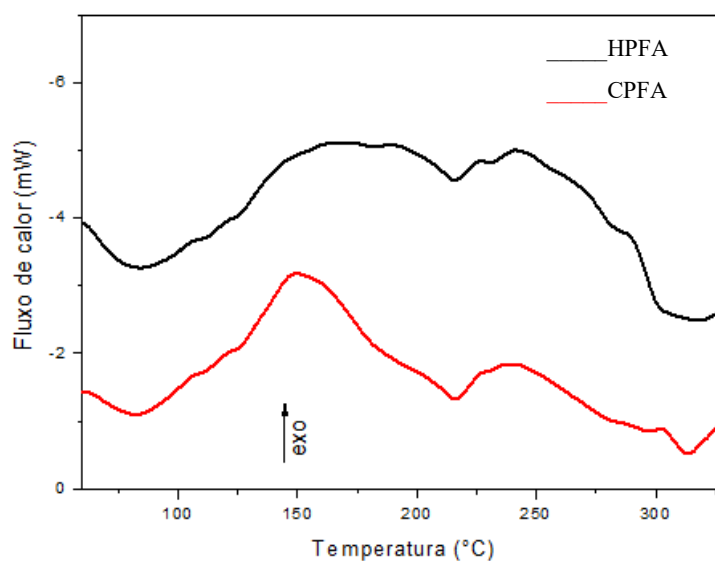
em pH 2 (25,91%), já os pHs 4 e 8 não apresentaram diferença significativa (49,22% e 48,09%). O CPFA apresentou diferença significativa superior quando comparado ao HPFA, e obteve sua maior estabilidade em pH 6 (67,88%). Zang et al. (2012) verificou que a estabilidade da emulsão do hidrolisado proteico em pH 3,0, 5,0, 7,0 e 9,0 aumentou cerca de 9%, 7%, 19% e 8%, respectivamente, em comparação com o concentrado proteico. Alguns pesquisadores relataram que emulsões produzidas com proteínas derivadas de soja apresentaram maiores formação de emulsão quando os valores de pH estavam próximos ao ponto isoelétrico (ROUDSARI et al., 2006).

5.4 ANÁLISES TÉRMICAS

5.4.1 DTA e TG

A Figura 09 apresenta as curvas da análise térmica diferencial (DTA) do concentrado proteico obtido por extração assistida por sonda ultrassônica (CPFA) e do hidrolisado proteico obtido por extração enzimática (HPFA).

Figura 09 - Curvas DTA (análise térmica diferencial) das amostras de proteínas extraídas por método enzimático (HPFA) e por ultrassom (CPFA).

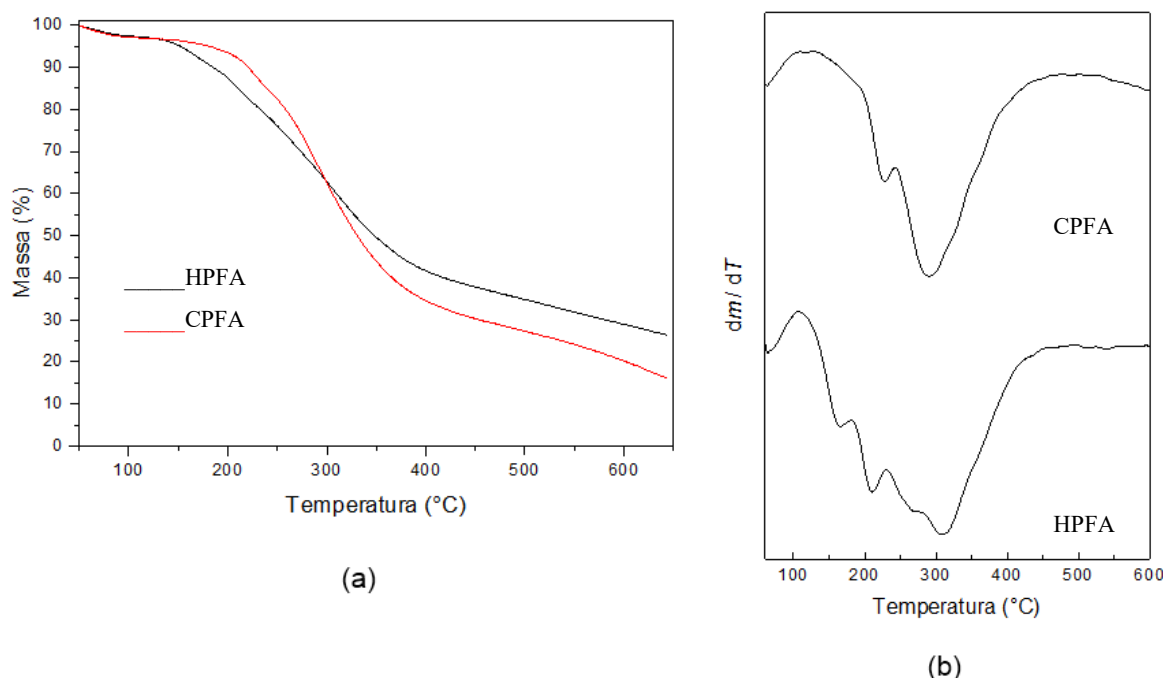


Fonte: A autoria própria, 2020.

As curvas da análise térmica diferencial (DTA) para ambas as amostras exibiram picos exotérmicos a partir de 150 °C, demonstrando o aumento da mobilidade das moléculas em virtude da perda de umidade e, com o aumento da temperatura, o processo de degradação das proteínas (Figura 09).

A Figura 10 apresenta as curvas de TG (a) e suas derivadas DTG (b) dos ensaios obtidos (HPFA e CPFA).

Figura 10 - Curvas TG (a) e suas derivadas correspondentes DTG (b) para proteínas extraídas pelo método enzimático (HPFA) e por ultrassom (CPFA).



Fonte: Autoria própria, 2020.

As curvas termogravimétricas (TG) (Figura 10 (a)) demonstraram que a amostra de proteína extraída pelo método enzimático exibiu perda de massa em temperaturas abaixo de 200 °C, se comparada aquela extraída por ultrassom. Para melhor compreensão do comportamento térmico das amostras, curvas derivadas dos termogramas correspondentes (DTG) foram obtidas (Figura 10 (b)).

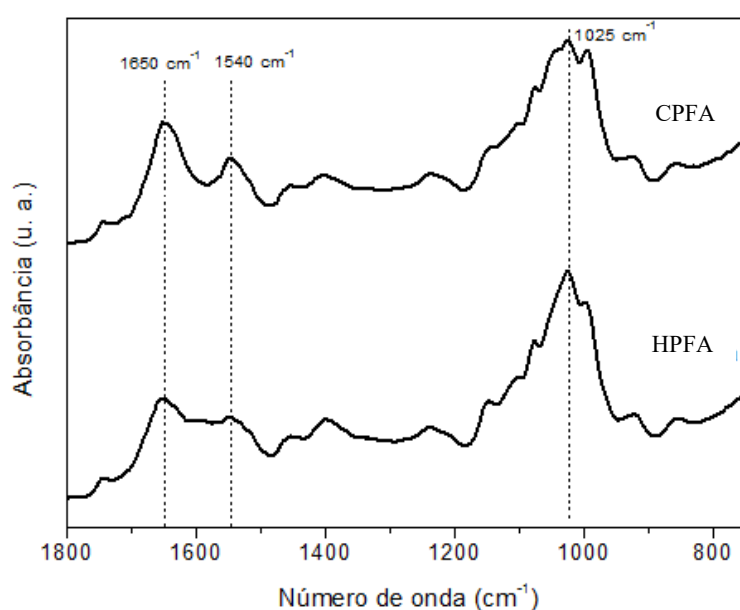
A proteína extraída pelo método enzimático exibiu três eventos térmicos principais, a 164 °C, 211 °C e a 309 °C; enquanto que a proteína extraída por ultrassom exibiu apenas dois eventos térmicos, um a 225 °C e outro a 288 °C. Os diferentes eventos térmicos observados em função do método de extração demonstram que o processo de extração influenciou a

estabilidade térmica da proteína. O início da degradação da proteína obtida pelo método enzimático a temperatura inferior (164 °C) e o deslocamento do segundo pico (211 °C – enzima; 225 °C – ultrassom) indicam variação na estabilidade térmica, sendo que a proteína extraída pelo método enzimático foi mais sensível a degradação.

5.4.2 Análise de infravermelho com transformada de Fourier em modo de refletância atenuada (FTIR-ATR)

Os espectros de FTIR-ATR das amostras de proteínas extraídas pelo método enzimático e por ultrassom exibiram diferenças com relação a intensidade de bandas características (Figura 11). Em 1650 cm^{-1} e em 1540 cm^{-1} observa-se a bandas correspondentes a amida I (estiramentos N-H e C-N) e amida II, respectivamente (KONG, FU, 2007). As referidas bandas foram mais intensas na amostra de proteína obtida por ultrassom do que aquelas provenientes da extração enzimática. Ademais, em 1025 cm^{-1} observa-se uma banda mais intensa na amostra de proteína extraída pelo método enzimático, que pode corresponder a glicopeptídeos presentes na amostra (FILIP, et al. 2008).

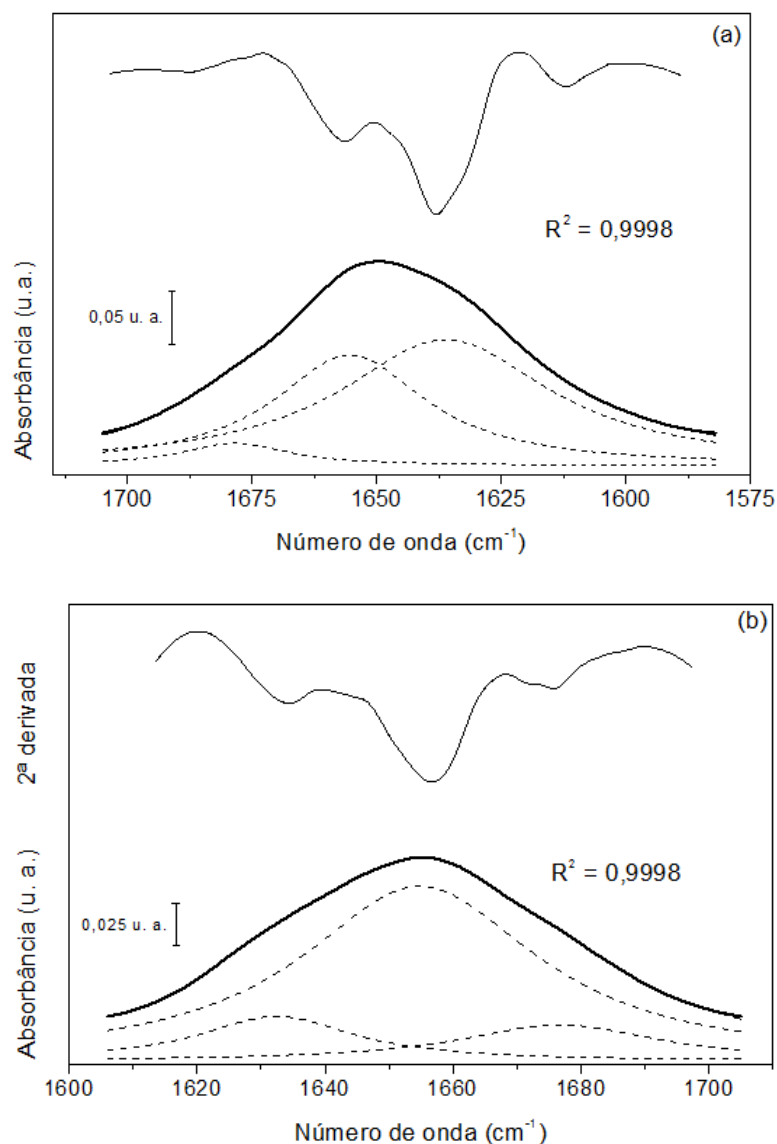
Figura 11 - Espectros FTIR-ATR das amostras de proteínas extraídas pelo método enzimático (HPFA) e por ultrassom (CPFA).



Fonte: Autoria própria, 2020.

Com o intuito de avaliar estruturas secundárias das proteínas em função do método de extração, a banda de amida I foi avaliada. A Figura 12 mostra a banda de amida I (1720 a 1570 cm^{-1}) que corresponde a vibração C=O e, em menor proporção, da vibração C-N. A região correspondente a banda de amida I em cada um dos dois tratamentos (enzima e ultrassom) foi deconvoluída e três áreas de pico foram obtidas, correspondentes as estruturas secundárias do tipo folha- β , α -hélice e curva- β (KONG, FU, 2007). As percentagens de cada uma das estruturas secundárias identificadas para cada tratamento são apresentadas na Tabela 25.

Figura 12 - Espectros de FTIR-ATR de amostras de proteínas extraídas por ultrassom (a) e por método enzimático (b) na faixa de número de onda de 1720 a 1570 cm^{-1} , correspondente a banda de amida I.



Espectro FTIR-ATR original (linha sólida em negrito), ajuste gaussiano da curva (linha sólida), picos obtidos na análise de deconvolução (linhas tracejadas).

Fonte: Autoria própria, 2020.

Tabela 25 - Comparação da proporção das estruturas secundárias das proteínas (%) em amostras de proteínas extraídas por método de ultrassom e método enzimático, determinado por espectroscopia FTIR-ATR a partir da deconvolução da banda de amida I (1720 – 1570 cm^{-1}).

Estruturas secundárias (número de onda cm^{-1})	Enzima	Ultrassom
Folha- β (1624)	74,5%	36,6%
α -hélice (1643)	12,5%	58,1%
Curva- β (1689)	13,0%	5,3%

Fonte: A autoria própria, 2020.

A percentagem de estruturas secundárias do tipo de α -hélice foi superior nas amostras de proteínas extraídas pelo método de ultrassom do que pelo método enzimático, o que pode explicar a melhor capacidade de emulsão do CPFA quando comparado ao HPFA (NELSON; COX, 2000). E, as percentagens de folha- β e curva- β foram superiores nas amostras extraídas pelo método enzimático. Em virtude da constituição de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos, estruturas proteicas do tipo α -hélice são anfifílicas, enquanto que as estruturas do tipo folha- β e curva- β são consideradas mais hidrofóbicas do que as do tipo α -hélice (DAMODARAN, 2010).

6 CONCLUSÕES

A aplicação de sonda ultrassônica para a ruptura das paredes celulares do farelo de arroz mostrou-se um método eficiente e vantajoso, quando comparado à métodos convencionais de extração, como a agitação mecânica. O estudo da variável razão farelo:água, demonstrou que em menores concentrações de farelo, o rendimento da extração é favorecido, enquanto que pH, tempo e amplitude de potência não interferiram 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, os melhores resultados foram obtidos no menor tempo (5 min), na menor amplitude de potência (40%) e em pH 10, sendo possível obter um concentrado proteico com teor de proteína de 76,01% com rendimento no processo de 6,01%, destacando-se a importância da profundidade de imersão da sonda na obtenção destes resultados (20 mm).

O emprego de protease para extração de proteína mostrou-se eficiente, porém menos vantajoso quando comparado ao ultrassom. O estudo das variáveis tempo e temperatura, demonstrou que em maiores períodos de extração e em temperaturas superiores, o rendimento da extração é favorecido, enquanto que o pH, e concentração de protease não interferiram 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, os melhores resultados foram obtidos em 150 minutos, à 55 °C, pH 9 e 3% de protease, sendo possível obter um concentrado proteico com teor de proteína de 71,19% com rendimento no processo de 4,63%.

As proteínas do farelo de arroz extraídas por sonda ultrassônica e por tratamento enzimático apresentaram propriedades funcionais comparáveis a albumina. O HPFA apresentou capacidade de absorção de água superior ao CPFA e BSA. Já a capacidade de absorção de óleo foi similar entre o HPFA e CPFA. O pH influenciou as propriedades funcionais tecnológicas em ambos os métodos de extração, sendo que a elevação do pH favoreceu a solubilidade proteica dos extratos. O CPFA apresentou maior capacidade espumante em pH 8 e capacidade de formação de emulsão comparada ao obtido para o BSA em pH 6, já a estabilidade da emulsão foi favorecida em pH 8. Com auxílio das análises térmicas foi possível observar a degradação das proteínas devido ao aumento da mobilidade das moléculas, a influência do método de extração na estabilidade térmica da proteína e nas estruturas. A

proteína extraída por sonda ultrassônica apresentou estruturas secundárias do tipo α -hélice, que favorecem a formação de emulsão. Já as proteínas extraídas pelo método enzimático apresentaram maior sensibilidade à degradação térmica e percentagens de folha- β e curva- β superiores.

Estes resultados demonstram que as proteínas obtidas do farelo de arroz, subproduto vegetal altamente disponível, tem potencial de aplicação como ingrediente com atributos funcionais importantes às necessidades da indústria alimentícia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. American Organization Of Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18. ed. Arlington: AOAC, 2005

BANDYOPADHYAY, Kakali; MISRA, Gautam; GHOSH, Santinath. Preparation and characterisation of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal. **Journal of Oleo Science**, v. 57, n. 1, p. 47-52, 2008.

BECCERA, M. et al. Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 135-140, 2001.

BEDIN, Sidmara et al. Extração de proteína do farelo de arroz: processo alcalino, por ultrassom e micro-ondas. 2018.

BERNARDI, Silvia. **Obtenção de concentrado proteico do farelo de arroz e avaliação das propriedades químicas e funcionais**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

BIZZOTTO, Carolina Schaper et al. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase PP e uso do carvão ativado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 308-316, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Arroz**. Brasília, 2009. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>. Acesso em: 08 nov. 2018.

CANO-MEDINA, A. et al. Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. **Food Research International**, v.44, p.684–692, 2011.

CAO, Xiaohong et al. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal of cereal science**, v. 50, n. 2, p. 184-189, 2009.

CAPELO-MARTÍNEZ, José-Luis (Ed.). **Ultrasound in chemistry: analytical applications**. John Wiley & Sons, 2009.

CAPOBIANGO, M. et al. Extração química e enzimática das proteínas do fubá de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 884-890, out./dez. 2006.

CHANDI, Gurpreet Kaur; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 2, p. 592-597, 2007.

CHANPUT, Wasaporn; THEERAKULKAIT, Chockchai; NAKAI, Shuryo. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science**, v. 49, n. 3, p. 422-428, 2009.

CHEMAT, Farid et al. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHENG, Hsing-Hsien et al. Ameliorative effects of stabilized rice bran on type 2 diabetes patients. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 56, n. 1, p. 45-51, 2010.

CHITTAPALO, Thutiyaporn; NOOMHORM, Athapol. Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates. **International journal of food science & technology**, v. 44, n. 9, 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.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Safra 2019/20 - Quarto levantamento, Brasília, v. 7, p. 1-104, 2020.

CONNOR, M. A.; SAUNDERS, R. M.; KOHLER, G. O. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. **Cereal Chemistry**, 1976.

CORBIN, Cyrielle et al. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 26, p. 176-185, 2015.

DAMODARAN, PARKIN. KL; FENNEMA, OR Química de Alimentos de Fennema, 4ª Edição. **Editora, Artmed SA**, 2010.

DAMODARAN, Sribivasan. Food protein: An overview. **Food proteins and their applications**, p. 1-24, 1997.

DANG, Tem. **Value-added processing of rice bran focusing on dietary fiber modification**. 2015. Tese de Doutorado. University of Alberta.

DE SOUZA, Daiana et al. Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method. **Food chemistry**, v. 191, p. 36-44, 2016.

DE SOUZA, Daiana et al. Obtaining and purification of a highly soluble hydrolyzed rice endosperm protein. **Separation and Purification Technology**, v. 183, p. 279-292, 2017.

DENCH, Jane E.; RIVAS R, Nilo; CAYGILL, John C. Selected functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) flour and two protein isolates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, n. 6, p. 557-564, 1981.

DENG, Q.; WANG, L.; WEI, F.; XIE, B.; HUANG, F. H.; HUANG, W.; SHI, J.; HUANG, Q.; TIAN, B.; XUE, S. Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from Ginkgo biloba seeds. **Food Chemistry**. v. 124, p. 1458–1465, 2011.

DEVI, R. Renuka; ARUMUGHAN, C. Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment. **Bioresource technology**, v. 98, n. 16, p. 3037-3043, 2007.

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

EL NASRI, Nazar A.; EL TINAY, A. H. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. **Food chemistry**, v. 103, n. 2, p. 582-589, 2007.

EUBER, John R.; PUSKI, Gabor; HARTMAN JR, Grant H. **Method for making soluble rice protein concentrate and the product produced therefrom**. U.S. Patent n. 4,990,344, 1991.

FAO. High-level expert forum - How to feed the world in 2050. Rome, Italy. 2009. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization. 2016. Obtido de <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>

FERREIRA K., Valdely; BERGMAN I. B., Ingrid. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, 2008.

FILIP, Z., HERMANN S., DEMNEROVÁ K. FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated *Escherichia coli*. **Czech J. Food Sci.**, v. 26, p. 458-463, 2008.

FISCHER, M. et al. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4463- 4469, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Food outlook: biannual report on global food markets. Rome, 139 p, 2016.

FORSTER, Genevieve M. et al. Rice varietal differences in bioactive bran components for inhibition of colorectal cancer cell growth. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1545-1552, 2013.

FRANZEN, Kay L.; KINSELLA, John E. Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 788-795, 1976.

FREEMAN, David W. et al. Use of by-product and nontraditional feeds for horses. 2016.

GARRIDO, Madalena Frias do Vale. **Avaliação in vivo do potencial de redução de colesterol, da capacidade antioxidante e anti-inflamatória de farelo de arroz**. 2015. Tese de Doutorado. ISA/UL.

GECIOVA, Jana; BURY, Dean; JELEN, Paul. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 6, p. 541-553, 2002.

GNANASAMBANDAM, Ravin; HELTIARACHCHY, N. S. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. **Journal of food science**, v. 60, n. 5, p. 1066-1069, 1995.

GÖRGÜÇ, Ahmet; BIRCAN, Cavit; YILMAZ, Fatih Mehmet. Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. **Food chemistry**, v. 283, p. 637-645, 2019.

GOUFO, Piebiep; TRINDADE, Henrique. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. **Food science & nutrition**, v. 2, n. 2, p. 75-104, 2014.

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.

HAMADA, Jamel S. Ultrafiltration of partially hydrolyzed rice bran protein to recover value-added products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 7, p. 779-784, 2000.

HAMMOND, N. Functional and nutritional characteristics of rice bran extracts. **American Cereal Chemists**, Saint Paul, v. 39, n. 10, p. 752-754, 1994.

HAN, Sung-Wook; CHEE, Kyu-Man; CHO, Seong-Jun. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. **Food chemistry**, v. 172, p. 766-769, 2015.

HARDY, Bill. **Rice almanac**: Source book for the most important economic activity on earth. Int. Rice Res. Inst., 2002.

HEINEMANN, R. J. B. et al. Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 4, p. 287-296, 2005.

HENDERSON, Angela J. et al. Chemopreventive properties of dietary rice bran: current status and future prospects. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 5, p. 643-653, 2012.

JAMBRAK, Anet Režek et al. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. **Journal of Food engineering**, v. 121, p. 15-23, 2014.

JAMBRAK, Anet Režek et al. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 2, p. 281-287, 2008.

JAMBRAK, Anet Režek et al. The effect of high power ultrasound and cold gas-phase plasma treatments on selected yeast in pure culture. **Food and bioprocess technology**, v. 8, n. 4, p. 791-800, 2015.

JARIWALLA, R. J. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 27, n.1, p. 17-26, 2001.

JEGANNATHAN, Kenthorai Raman; NIELSEN, Per Henning. Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. **Journal of cleaner production**, v. 42, p. 228-240, 2013.

JIAMYANGYUEN, Sudarat; SRIJESDARUK, Voranuch; HARPER, W. James. Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. **Extraction**, v. 27, n. 1, p. 56, 2005.

JULIANO, B. O.; BECHTEL, D. B. The rice grain and its gross composition. Rice Chemistry and Technology (BO Juliano ed.). 1985.

JULIANO, Bienvenido O. Rice. **Journal of Plant Foods**, v. 6, n. 3, p. 129-145, 1985.

KAEWKA, Kunwadee; THERAKULKAIT, Chockchai; CADWALLADER, Keith R. Effect of preparation conditions on composition and sensory aroma characteristics of acid hydrolyzed rice bran protein concentrate. **Journal of cereal science**, v. 50, n. 1, p. 56-60, 2009.

KARKI, Bishnu et al. Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 2, p. 270-278, 2010.

KATSURAYAMA, Aline Machado; TANIWAKI, Marta Hiromi. Fungos e aflatoxinas no arroz: ocorrência e significado na saúde do consumidor. **Braz. J. Food Technol.**, v. 20, n. e2017006, p. 1-12, 2017.

KENTISH, Sandra; ASHOKKUMAR, Muthupandian. The physical and chemical effects of ultrasound. In: **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. Springer, New York, NY. p. 1-12. 2011.

KHAN, Saima Hafeez et al. Functional properties of protein isolates extracted from stabilized rice bran by microwave, dry heat, and parboiling. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2416-2420, 2011.

KIM, Sung Phil et al. A Polysaccharide isolated from the liquid culture of *Lentinus edodes* (Shiitake) mushroom mycelia containing black rice bran protects mice against salmonellosis through upregulation of the Th1 immune reaction. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 11, p. 2384-2391, 2014.

KONG, J., YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochim Biophys Sin** (Shanghai), v. 39, p. 549-59, 2007.

KUMAR, Ajay et al. Dietary rice bran promotes resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonization in mice. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 71, 2012.

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

LI, Shuang et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. e201209017, 2012.

LIN, Matthew Jeng-Yen; 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.

LIU, Dan et al. Comparative study of ultrasound-assisted and conventional stirred dead-end microfiltration of grape pomace extracts. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 2, p. 708-714, 2013.

LIU, Jun-jun et al. Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 35, p. 184-193, 2016.

LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUMDUBWONG, N.; SEIB, P. A. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wetmilled rice flour. **Journal of Cereal Science**, v. 31, n. 1, p. 63-74, 2000.

MALEKIAN, Fatemeh et al. Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage. **Louisiana Agricultural Experiment Station Bulletin**, v.68, p.870, 2000.

MARIOD, Abdalbasit Adam et al. Antioxidative effects of stabilized and unstabilized defatted rice bran methanolic extracts on the stability of rice bran oil under accelerated conditions. **grasas y aceites**, v. 61, n. 4, p. 409-415, 2010.

MARTÍNEZ-MAQUEDA, Daniel et al. Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion. In: **Proteomics in Foods**. Springer, Boston, MA, 2013. p. 21-50.

MATOS, Amanda Dupas de. **Avaliação bioquímica nutricional de cultivares de arroz**. Dissertação de mestrado. 2014.

MCCASKILL, Don R.; ZHANG, Fan. Use of rice bran oil in foods. **Food Technology-Champaign Then Chicago-**, v. 53, p. 50-53, 1999.

MCLEAN, J. L. et al. **Rice almanac**, (p. 253). IRRI, Los Banos, Philippines, 2002.

MEIRELES, M. Angela A. **Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications**. CRC press, 2008.

MIRANDA, L. C. **Obtenção e caracterização de hidrolisados de proteínas de farelo de soja**. Dissertação de Mestrados, da Universidade Federal de São Carlos, 127f. São Carlos-SP, 2012.

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.

MONTEIRO, Valdirene N. et al. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MORR, C. V. et al. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

NASCIMENTO, Edilza Silva do et al. Obtenção de hidrolisado proteico de sementes de quiabo *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench e sua capacidade antioxidante. 2015.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Principios de bioquímica: Lehninger**. Omega, 2014.

- O'SULLIVAN, Jonathan et al. Comparison of batch and continuous ultrasonic emulsification processes. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 114-121, 2015.
- OKA, T. et al. Cycloartenyl ferulate, a component of rice bran oil-derived γ -oryzanol, attenuates mast cell degranulation. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 152-156, 2010.
- OKO, A. O. et al. Comparative analysis of the chemical nutrient composition of selected local and newly introduced rice varieties grown in Ebonyi State of Nigeria. **International Journal of Agriculture and Forestry**, v. 2, n. 2, p. 16-23, 2012.
- ORDOÑEZ, Juan A. et al. Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos. **Porto Alegre: Artmed**, v. 1, p. 203204, 2005.
- OSZVALD, Maria et al. Characterization of rice storage proteins by SE-HPLC and micro z-arm mixer. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 1, p. 68-76, 2008.
- PAN, Zhongli; CATHCART, Anna; WANG, Donghai. Thermal and chemical treatments to improve adhesive property of rice bran. **Industrial Crops and Products**, v. 22, n. 3, p. 233-240, 2005.
- PARRADO, Juan et al. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 742-748, 2006.
- PATINO, Juan M. Rodríguez; SANCHEZ, Cecilio Carrera; NIÑO, Ma Rosario Rodríguez. Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 140, n. 2, p. 95-113, 2008.
- PERES-TERNERO, C.; et al. Food supplementation with rice bran enzymatic extract prevents vascular apoptosis and atherogenesis in ApoE $-/-$ mice. **European Journal of Nutrition**, 2015.
- PESTANA, Vanessa Ribeiro; MENDONÇA, Carla RB; ZAMBIASI, Rui Carlos. Farelo de arroz: características, benefícios à saúde a aplicações. **Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment**, v. 26, n. 1, p. 29-40, 2008.
- PHONGTHAI, Suphat; LIM, Seung-Taik; RAWDKUEN, Saroat. Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 146-154, 2016.
- PICÓ, Yolanda. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 84-99, 2013.
- POMERANZ, Y.; ORY, R. L. Rice processing and utilization. **CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture**, v. 2, p. 139-186, 1982.
- PRAKASH, J.; RAMANATHAM, G. Effect of stabilization of rice bran on the extractability and recovery of proteins. **Food/Nahrung**, v. 38, n. 1, p. 87-95, 1994.
- PRASAD, M. N. et al. Health benefits of rice bran-a review. **J Nutr Food Sci**, v. 1, n. 3, p. 1-7, 2011.

RIAL-OTERO, R. Ultrasonic Assisted Extraction for the analysis of organic compounds by chromatographic techniques. Wiley-VCH: Germany, p.55-77, 2009.

ROMERO, M.V. Rice Protein. **In: Applied Food Protein Chemistry**. Ustunol, Z. 2015, John Wiley Blackwell: India, p. 305-322.

ROUDSARI, Mehrnaz et al. Stabilizing behavior of soy soluble polysaccharide or high methoxyl pectin in soy protein isolate emulsions at low pH. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1434-1441, 2006.

SADAHIRA, Mitie S. et al. Effect of pH and interaction between egg white protein and hydroxypropylmethylcellulose in bulk aqueous medium on foaming properties. **Carbohydrate polymers**, v. 125, p. 26-34, 2015.

SAIKIA, DandDekaSC; DEKA, S. C. Cereals: from staple food to nutraceuticals. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 1, 2011.

SALANTI, Anika et al. Structural characterization and antioxidant activity evaluation of lignins from rice husk. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 18, p. 10049-10055, 2010.

SANTOS, Cleiton Evandro dos et al. Anuário brasileiro do arroz 2017 – **Editora Gazeta**, Santa Cruz do Sul. p.6, 2017.

SARI, Yessie Widya. **Biomass and its potential for protein and amino acids: valorizing agricultural by-products**. Wageningen University, 2015.

SELLING, Gordon W. et al. Extraction of proteins from pennycress seeds and press cake. **Industrial crops and products**, v. 41, p. 113-119, 2013.

SEREEWATTHANAWUT, Issara et al. Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 99, n. 3, p. 555-561, 2008.

SGARBIERI, Valdemiro C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações. **In: Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. 1996.

SHIRSATH, 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: Process Intensification**, v. 53, p. 10-23, 2012.

SHOJI, Yutaka et al. 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.

SILVA, Priscila Missio da. **Isolado protéico de farelo de arroz: obtenção, propriedades funcionais e aplicação**. 2012. Dissertação de Mestrado.

SILVEIRA, C.; FURLONG, E. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p.805-811, 2007.

SILVEIRA, Ricardo Diógenes Dias et al. Proteínas de reserva de acessos de coleção nuclear de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1441-1447, 2011.

SORIA, Ana Cristina; VILLAMIEL, Mar. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in food science & technology**, v. 21, n. 7, p. 323-331, 2010.

SOUZA, Laura Maia de. **Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos do bagaço de uva**. Dissertação de mestrado. 2015.

TABTABAEI, Solmaz; DIOSADY, Levente L. Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow mustard flour. **Food research international**, v. 52, n. 2, p. 547-556, 2013.

THEERAKULKAIT, Chockchai; CHAISERI, Siree; MONGKOLKANCHANASIRI, Siritwat. Extraction and some functional properties of protein extract from rice bran. **Kasetsart J.(Nat. Sci.)**, v. 40, n. 5, p. 209-214, 2006.

TIAN, Su; NAKAMURA, Kozo; KAYAHARA, Hiroshi. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4808-4813, 2004.

VAUGHAN, Duncan A.; LU, Bao-Rong; TOMOOKA, Norihiko. The evolving story of rice evolution. **Plant science**, v. 174, n. 4, p. 394-408, 2008.

VIEIRA, Claudia Regina et al. Extração enzimática das proteínas da farinha de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, 2008.

VILKHU, Kamaljit et al. Ultrasonic recovery and modification of food ingredients. In: **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. Springer New York, p. 345-368, 2011.

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

WAGNER, Jorge R.; SORGENTINI, Delia A.; AÑÓN, M. Cristina. Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3159-3165, 2000.

WANG, Changyuan et al. Physico-chemical and structural properties of four rice bran protein fractions based on the multiple solvent extraction method. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 33, n. 3, p. 283-291, 2016.

WANG, L.; WANG, Y. J. Comparison of protease digestion at neutral pH with alkaline steeping method for rice starch isolation. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 6, p. 690-692, 2001.

WANG, L.; WANG, Y. J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 291-296, 2004.

WANG, M. et al. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 411-416, 1999.

WHITEHURST, Robert J.; VAN OORT, Maarten (Ed.). **Enzymes in food technology**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010.

XIA, Ning et al. Characterization and In Vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 482-489, 2012.

ZHANG, H. et al. -N. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. **Food Research International**, v.47, p. 359–363, 2012.