



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

SIDMARA BEDIN

**EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO FARELO DE ARROZ:
PROCESSO ALCALINO, POR ULTRASSOM E MICRO-ONDAS.**

CAMPINAS

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

SIDMARA BEDIN

**EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO FARELO DE ARROZ:
PROCESSO ALCALINO, POR ULTRASSOM E MICRO-ONDAS.**

*Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
Química da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Doutora em
Engenharia Química.*

Orientador: Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA SIDMARA BEDIN E
ORIENTADA PELO PROF. DR.
OSVALDIR PEREIRA TARANTO.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 33003017034P8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

B39e Bedin, Sidmara, 1988-
Extração de proteína do farelo de arroz : processo alcalino, por ultrassom e micro-ondas / Sidmara Bedin. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Osvaldir Pereira Taranto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Proteína. 2. Farelo de arroz. 3. Extração assistida por ultrassom. 4. Extração assistida por micro-ondas. I. Taranto, Osvaldir Pereira, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Rice bran protein extraction : alkaline, ultrasound and microwave process

Palavras-chave em inglês:

Protein

Rice bran

Ultrasound-assisted extraction

Microwave-assisted extraction

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Osvaldir Pereira Taranto [Orientador]

Antonia Miwa Iguti

Wanderley Pereira de Oliveira

Louise Emy Kurozawa

Patricia Fazzio Martins Martinez

Data de defesa: 21-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese de doutorado defendida por Sidmara Bedin e aprovada em 21 de fevereiro de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto – Orientador
FEQ/UNICAMP

Profa. Dra. Antonia Miwa Iguti
Instituto Mauá de Tecnologia

Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira
FCFRP/USP

Profa. Dra. Louise Emy Kurozawa
FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Patricia Fazzio Martins Martinez
FEQ/UNICAMP

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me concedido força e proteção para desenvolver este trabalho e enfrentar todos os obstáculos.

Aos meus amados pais, Sidnei e Marly, e ao meu irmão Rafael, pelo amor, suporte, incentivo aos estudos e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto, pela oportunidade de desenvolvimento desse trabalho, apoio e orientação.

Às professoras Dra. Flávia Maria Netto e Dra. Neura Bragagnolo, da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp, pela disponibilidade de seus laboratórios para a realização de parte dos experimentos e pelos ensinamentos passados.

Aos queridos amigos do laboratório LPTF, da FEQ e de vida, Kah, Luizinha, Ciça, Dani, Re, Fer, Raul, Mari, Ju, Kaci, Adriano, Harrson, Mariana e Rodrigo, pela amizade, apoio, conhecimento compartilhado, paciência e ótima companhia, por terem sido minha família em Campinas, tornando a vivência e o trabalho muito mais prazerosos.

Aos amigos e colegas de casa, Thiago, Ana, Glau, Raphinha e Geo, pela amizade e por tornarem nossa casa realmente um lar.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química – Unicamp, pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES, pelo suporte financeiro concedido através da bolsa de doutorado.

E a todos que, embora não citados, de uma forma ou outra contribuíram com a realização desse trabalho.

RESUMO

O arroz é um dos alimentos mais produzidos e consumidos no mundo. Durante o beneficiamento do grão, uma gama de subprodutos de qualidade é gerada, dentre eles o farelo de arroz, o qual é comumente utilizado como ingrediente de ração animal ou é descartado de maneira inadequada, tornando-se sinônimo de poluição. Porém, o farelo de arroz apresenta rica composição, contendo proteína de excelente qualidade, isenta de glúten e lactose, que oferece grande potencial de aplicação em indústrias alimentícias e farmacêuticas. Devido a isso, a busca por novas alternativas de obtenção da proteína do farelo de arroz se torna uma atividade cada vez mais atrativa. Tradicionalmente, a proteína é obtida através de extração alcalina, porém, técnicas ambientalmente amigáveis capazes de reduzir o tempo de processo e gerarem maiores rendimentos de extração vêm ganhando espaço, dentre elas a extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi utilizar o farelo de arroz como fonte de extração de proteína através de três diferentes técnicas: alcalina, ultrassom e micro-ondas. Para a extração alcalina, as variáveis independentes estudadas foram o tempo de processo (30-60 min), pH (9-11) e temperatura (25-55 °C); para a extração assistida por ultrassom, as variáveis independentes foram tempo de processo (5-15 min), pH (9-11) e potência de ultrassom (180-300 W); para a extração assistida por micro-ondas, as variáveis independentes foram tempo de processo (60-120 s), pH (9-11) e temperatura (30-55 °C). As respostas avaliadas para os três planejamentos experimentais foram rendimento de extração e teor de proteína do extrato. Os resultados mostraram que maiores rendimentos e teores foram obtidos quando se usou maiores valores de pH, tempo de processo, temperatura e potência de ultrassom. Comparando-se os valores de rendimento e teor de proteína obtidos através da extração assistida por ultrassom e por micro-ondas, com os valores da extração alcalina, verificou-se aumento no rendimento e teor em tempo de processo significativamente menor. Assim, concluiu-se que as novas técnicas se mostraram mais eficientes para o sistema avaliado, proporcionando melhorias como maiores valores de rendimento, teor e ainda uma proteína que manteve suas características físicas e químicas, não apresentando danos devido à aplicação de ondas ultrassônicas e micro-ondas.

Palavras-chave: proteína de farelo de arroz, extração alcalina, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas.

ABSTRACT

Rice is one of the most produced and consumed foods in the world. During grain processing, a range of good quality by-products is generated, among them rice bran, which is commonly used as an animal feed ingredient or is improperly disposed of, becoming synonyms for pollution. However, rice bran presents good composition, with excellent quality protein, free from gluten and lactose, which offers great potential of application in the food and pharmaceutical industries. Because of this, the search for new alternatives to obtain rice bran protein becomes an increasingly attractive activity. Traditionally, the protein is obtained through alkaline extraction, however, environmentally friendly techniques capable of reducing the process time and waste generated, besides generating higher yields of extraction are acquiring space, among them the ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction. Thus, the objective of this work was to use rice bran as a source of protein extraction through three different techniques: alkaline, ultrasound and microwave. For alkaline extraction, the independent variables studied were process time (30-60 min), pH (9-11) and temperature (25-55 °C); for ultrasonic assisted extraction, the independent variables were process time (5-15 min), pH (9-11) and ultrasound power (180-300 W); for the microwave assisted extraction, the independent variables were process time (60-120 s), pH (9-11) and temperature (30-55 °C). The evaluated responses for the three experimental designs were extract yield and protein content of the extract. Statistical analysis showed that higher yields and protein levels were obtained when higher values of pH, process time, temperature and ultrasound power were used. Comparing the values of yield and protein content obtained by ultrasonic and microwave-assisted extraction with alkaline extraction values, there was an increase in yield and a significantly lower process time. Thus, it was concluded that the new techniques were more efficient for the evaluated system, providing improvements such as higher values of yield and protein content and still a protein that maintained its physical and chemical characteristics, not presenting damages due to the application of ultrasonic waves and microwaves.

Keywords: rice bran protein, alkaline extraction, ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Princípio de aquecimento por condução no método clássico de extração e por micro-ondas na extração assistida por micro-ondas	27
Figura 2.1- Estrutura básica de um aminoácido	30
Figura 2.2 - Estrutura do grão de arroz.....	33
Figura 2.3 - Morfologia do grão de arroz	34
Figura 4.1 - Termograma do FA e FAD.....	59
Figura 4.2 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o (a) FA (b) FAD.....	60
Figura 4.3 - (a) Distribuição granulométrica do FA e (b) Fração cumulativa das partículas do FA.....	61
Figura 4.4 - Diagrama de Pareto do rendimento de extração da extração alcalina	70
Figura 4.5 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta rendimento na extração alcalina	72
Figura 4.6 - Distribuição dos resíduos para o rendimento na extração alcalina.....	73
Figura 4.7 - Superfícies de resposta para o rendimento na extração alcalina.....	74
Figura 4.8 - Diagrama de Pareto do teor de proteína da extração alcalina.....	77
Figura 4.9 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta teor de proteína por extração alcalina.....	79
Figura 4.10 - Distribuição dos resíduos para o teor de proteína na extração alcalina.....	79
Figura 4.11 - Superfícies de resposta para o teor de proteína na extração alcalina.....	80
Figura 4.12 - Diagrama de Pareto do rendimento de extração da UAE	83
Figura 4.13 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta rendimento de extração por UAE	85
Figura 4.14 - Distribuição dos resíduos para o rendimento na UAE.....	85
Figura 4.15 - Superfícies de resposta para o rendimento na UAE	87
Figura 4.16 - Diagrama de Pareto do teor de proteína da UAE.....	90
Figura 4.17 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta teor de proteína por UAE.....	92
Figura 4.18 - Distribuição dos resíduos para o teor de proteína na UAE.....	92
Figura 4.19 - Superfícies de resposta para o teor de proteína na UAE.....	93
Figura 4.20 - Diagrama de Pareto do rendimento de extração da MAE	96
Figura 4.21 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta rendimento de extração por MAE	98

Figura 4.22 - Distribuição dos resíduos para o rendimento na MAE.....	99
Figura 4.23 - Superfícies de resposta para o rendimento na MAE.....	100
Figura 4.24 - Diagrama de Pareto do teor de proteína da MAE.....	102
Figura 4.25 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta teor de proteína por MAE.....	104
Figura 4.26 - Distribuição dos resíduos para o teor de proteína por MAE	104
Figura 4.27 - Superfícies de resposta para o teor de proteína na MAE.....	106
Figura 4.28 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o FAD após (a) extração alcalina (b) extração assistida por ultrassom e (c) extração assistida por micro-ondas	109
Figura 4.29 - Perfil eletroforético de peso molecular dos extratos proteicos de FA.....	112
Figura 4.30 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a proteína de FAD dos ensaios (a) A11 (b) A18 (c) U1 (d) U8 (e) M1 e (f) M8.....	117
Figura 4.31 - Solubilidade do extrato proteico do FAD obtida através do método alcalino para os ensaios A11 e A18	119
Figura 4.32 - Solubilidade do extrato proteico do FAD obtida através do método assistido por ultrassom para os ensaios U1 e U8.....	119
Figura 4.33 - Solubilidade do extrato proteico do FAD obtida através do método assistido por micro-ondas para os ensaios M1 e M8	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Constantes dielétricas e valores de momento dipolo de alguns solventes	26
Tabela 2.2 - Composição centesimal (%) do arroz bruto e suas frações após beneficiamento	33
Tabela 3.1 - Faixas de valores das variáveis utilizadas para a extração alcalina	51
Tabela 3.2 - Faixas de valores das variáveis utilizadas para a UAE	52
Tabela 3.3 - Faixas de valores das variáveis utilizadas para a MAE.....	53
Tabela 4.1 - Composição centesimal do FA e FAD da safra 2013/2014 (g/100 g _{amostra})	58
Tabela 4.2 - Influência da razão FAD:água nos rendimentos de extração e teor de proteína no material extraído através da extração alcalina.....	62
Tabela 4.3 - Influência do tamanho de partícula no rendimento de extração e teor de proteína no material extraído na extração alcalina	63
Tabela 4.4 - Influência da razão FAD:água nos rendimentos de extração e teores de proteínas no material extraído na UAE	64
Tabela 4.5 - Influência dos pulsos de potência on/off no rendimento de extração e teor de proteína no material extraído na UAE	65
Tabela 4.6 - Influência da razão FAD:água nos rendimentos de extração e teores de proteínas no material extraído na MAE	66
Tabela 4.7 - Valores de rendimento e teor de proteína no material extraído para a extração alcalina, UAE e MAE.....	67
Tabela 4.8 – Matriz do planejamento de experimentos e valores de rendimento de extração e teor de proteína no material extraído para a extração alcalina	69
Tabela 4.9 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 99,22\%$) para o rendimento na extração alcalina.....	70
Tabela 4.10 - Análise de variância para o rendimento na extração alcalina	71
Tabela 4.11 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 90,27\%$) para o teor de proteína na extração alcalina.....	76
Tabela 4.12 - Análise de variância para o teor de proteína na extração alcalina.....	78
Tabela 4.13 – Matriz do planejamento de experimentos e valores de rendimento de extração e teor de proteína no material extraído para a UAE	82
Tabela 4.14 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 99,06\%$) para o rendimento na UAE.....	83
Tabela 4.15 - Análise de variância para o rendimento na UAE	84
Tabela 4.16 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 83,57\%$) para o teor de proteína na UAE..	89
Tabela 4.17 - Análise de variância para o teor de proteína na UAE	91

Tabela 4.18 – Matriz do planejamento de experimentos e valores de rendimento de extração e teor de proteína no material extraído para a MAE	95
Tabela 4.19 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 98,99\%$) para o rendimento na MAE.....	96
Tabela 4.20 - Análise de variância para o rendimento na MAE.....	97
Tabela 4.21 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 98,70\%$) para o teor de proteína na MAE	102
Tabela 4.22 - Análise de variância para o teor de proteína na MAE.....	103
Tabela 4.23 - Rendimento de extração, teor de proteína e tempo de processo para a extração alcalina, UAE e MAE.....	107
Tabela 4.24 - Composição centesimal do extrato proteico obtido através da extração alcalina (g/100 g _{extrato}).....	110
Tabela 4.25 - Composição centesimal do extrato proteico obtido através da UAE (g/100 g _{extrato})	111
Tabela 4.26 - Composição centesimal do extrato proteico obtido através da MAE (g/100 g _{extrato})	111
Tabela 4.27 - Composição de aminoácidos dos extratos proteicos de FAD (g/100 g _{extrato}) ...	114
Tabela 4.28 – Composição de aminoácidos totais (g/100 g _{proteína}) e escore de aminoácidos essenciais	115
Tabela 4.29 - Digestibilidade proteica <i>in vitro</i>	118
Tabela 4.30 - Composição centesimal do FA e FAD da safra 2016/2017	122
Tabela 4.31 - Rendimento de extração e teor de proteína para os FAD das safras 2013/2014 e 2016/2017	123

NOMENCLATURA

Abreviatura

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
FA	Farelo de arroz
FAD	Farelo de arroz desengordurado
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
MAE	Extração assistida por micro-ondas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida - Dodecil sulfato de sódio
UAE	Extração assistida por ultrassom

Letras Latina

A	Concentração proteica no sobrenadante	[M/ L ³]
A11	Amostra referente ao nível inferior do planejamento estatístico referente à extração alcalina	[-]
A18	Amostra referente ao nível superior do planejamento estatístico referente à extração alcalina	[-]
b.u.	Amostra em base úmida	[-]
b.s.	Amostra em base seca	[-]
d ₅₀	Diâmetro da partícula no qual 50% do material possui diâmetro inferior	[L]
dp	Diâmetro de partícula	[L]
F	F de Fisher	[-]
M1	Amostra referente ao nível inferior do planejamento estatístico referente à MAE	[-]
M8	Amostra referente ao nível superior do planejamento estatístico referente à MAE	[-]
<i>m_{amostra}</i>	Massa da amostra	[M]
<i>m_{amostra sol}</i>	Massa da amostra para a solubilidade	[M]
<i>m_{extratoproteico FAD}</i>	Massa de extrato proteico FAD obtido	[M]
<i>m_{FAD}</i>	Massa de FAD	[M]
<i>m_{lipídios}</i>	Massa de lipídios	[M]
<i>N_{amostra}</i>	Teor de nitrogênio na amostra	[-]
<i>N_{branco}</i>	Teor de nitrogênio no branco	[-]
<i>N_{HCl}</i>	Normalidade real do HCl	[M/ L ³]
<i>N_{sobrenadante}</i>	Teor de nitrogênio no sobrenadante	[-]
<i>V_{Branco}</i>	Volume de HCl utilizado na titulação do branco	[L ³]
<i>V_{HCl}</i>	Volume de HCl utilizado na titulação da amostra	[L ³]
R ²	Coefficiente de determinação	[-]
U1	Amostra referente ao nível inferior do planejamento estatístico referente à UAE	[-]
U8	Amostra referente ao nível superior do planejamento estatístico referente à UAE	[-]

X_i	Variável independente do processo	[-]
$Y_{Al,R}$	Modelo empírico proposto para estimar o rendimento de extração através do método alcalino	[-]
$Y_{Al,T}$	Modelo empírico proposto para estimar o teor de proteína através da extração pelo método alcalino	[-]
$Y_{M,R}$	Modelo empírico proposto para estimar o rendimento de extração através do método MAE	[-]
$Y_{M,T}$	Modelo empírico proposto para estimar o teor de proteína através da extração pelo método MAE	[-]
$Y_{U,R}$	Modelo empírico proposto para estimar o rendimento de extração através do método UAE	[-]
$Y_{U,T}$	Modelo empírico proposto para estimar o teor de proteína através da extração pelo método UAE	[-]

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
NOMENCLATURA	XII
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	18
1.1 INTRODUÇÃO.....	18
1.2 OBJETIVOS.....	19
1.2.1 Objetivos Específicos	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 EXTRAÇÃO.....	21
2.1.1 Extração Alcalina	22
2.1.2 Extração Assistida por Ultrassom	23
2.1.3 Extração Assistida por Micro-ondas	25
2.2 PROTEÍNA.....	28
2.2.1 Aminoácidos	30
2.3 ARROZ.....	31
2.3.1 Farelo de Arroz	33
2.3.2 Estabilidade do Farelo de Arroz	35
2.3.3 Proteína do Arroz	37
2.3.4 Caracterização de Extratos Proteicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 MATÉRIA-PRIMA.....	42
3.2 REAGENTES.....	42
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....	43
3.3.1 Composição Centesimal do Farelo de Arroz	43
3.3.1.1 Proteína.....	43
3.3.1.2 Fibra Alimentar Total.....	44
3.3.1.3 Umidade.....	45
3.3.1.4 Lipídios.....	45
3.3.1.5 Cinzas.....	46
3.3.1.6 Carboidratos Totais.....	47

3.3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	47
3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
3.4 DESENGORDURAMENTO DO FARELO DE ARROZ	47
3.5 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO FAD	48
3.6 ENSAIOS PRELIMINARES.	48
3.6.1 Extração Alcalina Preliminar	49
3.6.2 Extração Assistida por Ultrassom Preliminar	49
3.6.3 Extração Assistida por Micro-ondas Preliminar	50
3.7 EXTRAÇÃO ALCALINA	51
3.8 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	51
3.9 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	52
3.10 MEV DO FAD APÓS A EXTRAÇÃO	53
3.11 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO PROTEICO DO FAD	53
3.11.1 Composição Centesimal	53
3.11.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	53
3.11.3 Determinação dos Aminoácidos	54
3.11.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	55
3.11.5 Digestibilidade Proteica <i>in vitro</i>	55
3.11.6 Solubilidade Proteica	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	58
4.1.1 Composição Centesimal do Farelo de Arroz	58
4.1.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	59
4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	60
4.2 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO FAD	61
4.3 ENSAIOS DE EXTRAÇÃO PRELIMINARES	62
4.3.1 Extração Alcalina Preliminar	62
4.3.2 Extração Assistida por Ultrassom Preliminar	64
4.3.3 Extração Assistida por Micro-ondas Preliminar	66
4.4 EXTRAÇÃO ALCALINA	68
4.5 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	81
4.6 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	94
4.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	107
4.8 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ APÓS A EXTRAÇÃO	108

4.9 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO PROTEICO DO FARELO DE ARROZ	110
4.9.1 Composição Centesimal do Extrato Proteico do Farelo de Arroz	110
4.9.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	112
4.9.3 Determinação de Aminoácidos	113
4.9.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	116
4.9.5 Digestibilidade Proteica <i>in vitro</i>	117
4.9.6 Solubilidade Proteica	118
4.10 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FARELO DA SAFRA 2016/2017	121
4.11 EXTRAÇÃO COM O FARELO DE ARROZ DA SAFRA 2016/2017	123
5. CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
ANEXO	147

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A inclusão de alimentos saudáveis, funcionais e nutritivos na alimentação é uma prática que vem sendo estimulada entre a população, uma vez que bons hábitos alimentares são fortemente indicados, pois proporcionam ao organismo humano condições para uma vida mais saudável, possibilitando a prevenção precoce de doenças (SICHERI et al., 2000). Além disso, muitas pessoas apresentam alergias e intolerâncias, o que as impossibilita o consumo de glúten e lactose. Com base nisso, diversos grãos e cereais como o milho, chia, soja, lentilha e linhaça têm recebido um espaço cada vez maior na alimentação humana, pois são valiosas fontes de nutrientes e proteínas. E dentre esses cereais, destaca-se ainda o grão de arroz.

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, sendo o principal componente da dieta básica de cerca de 2,4 bilhões de pessoas (EMBRAPA, 2005). A Ásia é a maior produtora mundial de arroz e o Brasil se destaca em nono lugar, sendo o Rio Grande do Sul o estado com maior produção (CONAB, 2016).

O grão de arroz é uma excelente fonte de energia, pois apresenta elevada concentração de amido, proteínas e lipídios. Durante o beneficiamento do grão de arroz, grandes quantidades de subprodutos de boa qualidade como a casca, quirera e o farelo são produzidos e o aproveitamento desses subprodutos se torna uma necessidade cada vez maior, não apenas para agregar valor à produção de arroz, mas também tentando minimizar o descarte desses subprodutos (KENNEDY et al., 2002).

O farelo de arroz é um rico subproduto, que oferece elevado valor nutricional e boa composição, com cerca de 12 a 15% de proteínas (FAO, 2011). Porém, devido ao seu excesso de fibras, o farelo não costuma ser aplicado em grande escala na alimentação humana, sendo utilizado principalmente como ingrediente de ração animal. Dessa forma, este acaba sendo comercializado com baixo valor quando comparado a outros alimentos com características nutricionais semelhantes como, por exemplo, o farelo de trigo (DENARDIN et al., 2003).

A proteína do farelo de arroz apresenta elevado valor nutricional, propriedades nutritivas, nutracêuticas e funcionais (SAUNDERS, 1990), o que a torna um ingrediente apropriado para a formulação de alimentos infantis (WANG et al., 1999). Sua composição é rica em aminoácidos essenciais, dispõe de propriedades

hipoalergênicas, ausência de efeitos indesejáveis em indivíduos intolerantes ou alérgicos ao glúten (AGBOOLA et al., 2005; PARRADO et al., 2006) e ainda demonstra atividade anticancerígena (KAWAMURA; MURAMOTO, 1993).

Uma alternativa para incorporar a proteína do farelo de arroz na alimentação humana é o uso do farelo de arroz como fonte para a obtenção de extratos, concentrados ou isolados proteicos, os quais podem ser consumidos diretamente como suplemento proteico ou então aplicados na formulação de produtos de panificação, sorvetes, géis, pudins, dentre outros (CHRASTIL, 1992), devido à capacidade de formação de gel, espuma, estabilidade de emulsão e absorção de água que as proteínas desempenham nos alimentos (SILVA et al., 1997; WANG et al., 2000).

As proteínas do farelo de arroz podem ser extraídas por diferentes técnicas, como a convencional extração alcalina, que é uma técnica simples, porém em algumas situações pode causar a desnaturação indesejável da proteína (WANG et al., 1999), e as técnicas ambientalmente amigáveis, como a extração assistida por ultrassom e assistida por micro-ondas, que quando comparadas com outras técnicas apresentam vantagens como o baixo consumo de solvente, rapidez do processo, alta reprodutibilidade da técnica, dentre outros (CHEMAT et al., 2011).

Sendo assim, esse projeto teve como proposta estudar e avaliar o processo de extração da proteína do farelo de arroz desengordurado através de três diferentes técnicas: a extração alcalina, a assistida por micro-ondas e a assistida por ultrassom, e então realizar uma comparação quantitativa e qualitativa da proteína extraída por cada um dos métodos.

1.2 OBJETIVOS

O objetivo desse projeto foi a obtenção da proteína do farelo de arroz desengordurado, utilizando diferentes técnicas de extração, sendo elas a convencional extração alcalina, e as ambientalmente amigáveis extração assistida por ultrassom e assistida por micro-ondas. Teve também como objetivo, avaliar a composição, características e propriedades da proteína extraída.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a composição centesimal do farelo de arroz através de análises de características físico-químicas de proteína, fibra, umidade, lipídios, cinzas e carboidratos;
- Realizar a estabilidade do farelo de arroz por meio de desengorduramento;
- Determinar a composição centesimal do farelo de arroz desengordurado através de análises de características físico-químicas de proteína, fibra, umidade, lipídios, cinzas e carboidratos;
- Determinar em ensaios preliminares variáveis dos processos de extração (proporção farelo de arroz:solvente e granulometria do farelo);
- Determinar os melhores parâmetros para a obtenção da proteína do farelo de arroz através da extração alcalina, extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas;
- Quantificar e comparar o rendimento da proteína extraída em cada um dos métodos de extração;
- Avaliar e comparar a qualidade da proteína extraída em cada um dos métodos de extração, através de análises de composição de aminoácidos, e microscopia eletrônica de varredura perfil eletroforético, digestibilidade e solubilidade proteica;
- Avaliar a influência da safra de produção na composição do farelo de arroz;
- Avaliar a influência da safra de produção na extração da proteína do farelo de arroz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo será apresentada uma revisão da literatura relativa ao farelo de arroz, técnicas de caracterização, estabilidade, métodos de extração da proteína do farelo de arroz desengordurado e avaliação da proteína extraída.

2.1 EXTRAÇÃO

Extração é uma operação unitária que consiste na separação/purificação de produtos baseada em diferentes graus de solubilidade dos constituintes. Esses métodos podem ser convencionais ou não.

Durante o processo de extração ocorre a transferência de uma espécie de um soluto para um solvente, denominado solvente de extração. O soluto puro pode ser tanto um líquido quanto um sólido na temperatura de operação, e esses fatores determinam qual a forma de extração. Quando o soluto está em solução, o processo de extração é denominado extração líquido-líquido, e o solvente de extração deverá ser imiscível com o solvente original. Mas quando o soluto fizer parte de um sólido, o processo é denominado lixiviação (BLACKADDER; NEDDERMAN, 1971).

Em processos de extração, o solvente de extração apresenta fundamental importância. Na extração líquido-líquido o mesmo deve ter uma afinidade adequadamente seletiva pelo soluto apropriado, o qual algumas vezes ocorre na presença de outros materiais, que não o solvente original. Essa seletividade é muito importante devido à essência da extração líquido-líquido, que é a separação de um soluto em particular de outros materiais através da transferência seletiva para o solvente de extração (BLACKADDER; NEDDERMAN, 1971).

Uma gama de ferramentas de extração e fracionamento de proteínas e peptídeos estão disponíveis na literatura, baseados nas características físico-químicas e estruturais da matéria-prima, tais como a solubilidade, hidrofobicidade, massa molar, ponto isoelétrico, dentre outros (TOLDRÁ; NOLLET, 2013). Por isso, a escolha da melhor técnica de extração é de fundamental importância e está diretamente ligada com a finalidade da proteína a ser extraída.

Para se garantir uma boa extração, as etapas do processo devem ser as mais simples possíveis, permitindo assim a reprodutibilidade da técnica e a minimização de alterações nas estruturas das proteínas (MAGALHÃES, 2008).

2.1.1 Extração Alcalina

O método de extração alcalina de proteína é bastante aplicado devido a sua simplicidade e disponibilidade dos agentes necessários para o processo de extração (CONNOR et al., 1976; JIAMYANGYUEN et al., 2005; SEREEWATTHANAWUT et al., 2008).

A precipitação das proteínas no ponto isoelétrico se dá devido à interação das moléculas de água com as cargas das proteínas, sendo essas cargas positivas para valores de pH menores que o ponto isoelétrico, uma vez que grupos funcionais tendem a estar protonados (captam H^+), e negativas para valores de pH maiores, pois os grupos funcionais tendem a estar predominantemente desprotonados (perdem H^+). O ponto isoelétrico da proteína se dá com o pH de menor solubilidade proteica, geralmente valores na faixa de 3,5 a 6,5, mas que podem variar dependendo da matéria prima. No ponto isoelétrico, as proteínas apresentam carga nula, com igual número de cargas positivas e negativas nas moléculas, pois o número de radicais ácidos desprotonados ($-COO^-$) é igual ao número de radicais básicos protonados ($-NH_3^+$), assim as interações proteína-proteína aumentam, uma vez que as forças eletrostáticas moleculares estão em um mínimo, fazendo com que menos água interaja com as moléculas de proteína, formando uma condição favorável para que as moléculas de proteína se aproximem, tendam a se agregarem e a formar precipitados (SGARBIERI, 1996; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Porém, em determinadas condições, a extração alcalina pode causar a desnaturação da proteína devido à desestabilização das estruturas secundárias, terciárias ou quaternárias, bem como reações secundárias indesejáveis e potencial toxicidade. À medida que se inicia a desnaturação, a proteína passa do seu estado naturalmente dobrado e biologicamente ativo para um estado desdobrado e biologicamente inativo. Tal fenômeno pode causar agregação, coagulação, solubilidade reduzida e perda de propriedades funcionais da proteína, como gelificação e emulsificação (HAQUE et al., 2013).

A desnaturação proteica pode ser causada por diversos fatores, dentre eles o calor, pH, solventes orgânicos miscíveis em água, solutos e outros. O pH alcalino pode aumentar as chances de racemização dos aminoácidos, a ocorrência de reação de Maillard, a qual causa o escurecimento dos produtos, formação do composto tóxico lisinoalanina, destruição de aminoácidos e uma maior extração de componentes não proteicos que coprecipitam com a proteína, diminuindo a qualidade e pureza do extrato

proteico (SGARBIERI, 1996; WANG et al., 1999; SEREEWATTHANAWUT et al., 2008).

Diversos trabalhos na literatura expõem a extração da proteína do farelo de arroz por meio alcalino. Connor et al. (1976) obtiveram concentrados proteicos através de extração alcalina contendo 23-31% de proteínas, 33-48% de gordura, 15-23% de amido a partir do farelo de arroz, com um rendimento de 14-20%. Já com a maior parte do amido removido, os concentrados apresentavam 33-38% de proteína e 49-55% de gordura. Gnanasambandam e Hettiarachchy (1995) obtiveram concentrados proteicos a partir de farelo de arroz estabilizado e não estabilizado por extração alcalina seguida de precipitação isoelétrica. Como resultados, o concentrado proteico de farelo de arroz não estabilizado continha 71,5% de proteína e o concentrado proteico de farelo de arroz estabilizado continha 50,9% de proteína. Jiamyangyuen et al. (2005) obtiveram concentrados de proteína de farelo de arroz a partir de extração alcalina. Como resultados, conseguiram 69,16% de teor de proteína e 8,06% de rendimento de concentrado de proteína de farelo de arroz. Silva (2012), através do método de extração alcalino, obteve valor de 75,2% de proteína (b.s.) e um percentual de rendimento do isolado proteico de 35,6% para o farelo de arroz desengordurado. Através do método de extração enzimático, obteve 76,6% de proteína (b.s.) e percentual de rendimento do isolado proteico de 15,2%.

2.1.2 Extração Assistida por Ultrassom

A extração assistida por ultrassom está relacionada com fenômenos físicos e químicos fundamentalmente diferentes quando comparados com os fenômenos utilizados em técnicas de extração, transformação e preservação convencionais. É uma tecnologia com potencial emergente que pode acelerar a transferência de calor e massa e tem sido bastante estudada no campo da extração (CHEMAT et al., 2011).

O ultrassom faz uso da energia de ondas sonoras transmitidas a uma frequência superior à capacidade auditiva humana (LUZ, 1998) para separar o soluto de interesse da matriz. Essas ondas geram o fenômeno da cavitação acústica, o qual é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas ultrassônicas de baixa frequência (< 1 MHz). As ondas geram energia, alterando as propriedades físicas e químicas do material, capazes de romper as paredes celulares, facilitando a penetração do solvente na matriz, permitindo assim a liberação dos compostos extraíveis e melhorando a transferência de massa nas interfaces

(FRANCONY; PÉTRIER, 1996; KORN; ANDRADE, 2003; CHEMAT et al., 2011). Além disso, as ondas ultrassônicas geram o efeito mecânico de agitação do solvente utilizado, aumentando a área de contato superficial entre o solvente e o composto desejado, permitindo maior penetração do solvente na matriz (CORBIN et al., 2015).

A extração assistida por ultrassom é considerada um método não convencional de extração, dita ambientalmente amigável, com potencial para aumentar a eficiência de extração através de cavitação acústica e efeitos mecânicos (WU et al., 2001; ROSTAGNO et al., 2003). É uma técnica viável quando comparada com outros métodos de extração, oferecendo vantagens na produtividade, rendimento e seletividade. A técnica apresenta alta eficiência, baixo custo energético (MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2009), baixo tempo de processamento e quantidade de solvente requeridos, boa reprodutibilidade da técnica, baixo custo total (KOH, 1983; VINATORU, 2001), melhor qualidade do produto final, não necessita de pós-tratamento de águas residuais (CHEMAT et al., 2011), além de permitir a extração a temperaturas mais baixas, o que permite evitar danos térmicos ao extrato e minimizar a perda de compostos bioativos (CORBIN et al., 2015).

Para uma melhor eficiência no processo de extração por ultrassom, o uso de um solvente adequado e a garantia de que o material tenha um tempo de contato suficiente com o solvente são variáveis de fundamental importância (MASON et al., 2011). A constante otimização de parâmetros como tipo e composição do solvente, tempo de extração, teor de água e carga da amostra ajudam a garantir reprodutibilidade e maior eficiência durante o processo de extração (BERSET et al., 1999).

A aplicação de ultrassom vem sendo amplamente utilizada no processamento de alimentos, principalmente na área da extração. Cavalheiro (2013) realizou a extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea* L, obtendo rendimento de extração semelhante ao do método convencional e velocidade de extração quinze vezes mais rápida. Moulton e Wang (1982) analisaram a extração por ultrassom contínua e descontínua de proteína de flocos de soja desengordurados, obtendo como resposta rendimentos mais elevados dos processos quando comparados com o método convencional.

Oliveira et al. (2012) obtiveram concentrados proteicos a partir do farelo de arroz integral utilizando água destilada como solvente, obtendo concentrados proteicos com 32,39% de proteínas totais e $0,27 \pm 0,01$ g/100 g de proteínas solúveis (b.s.).

Chittapalo e Noomhorm (2009) conseguiram concentrados proteicos de farelo de arroz desengordurado através da extração alcalina e da extração assistida por ultrassom com água destilada como solvente, obtendo valores de rendimento de $2,70 \pm 0,32\%$ e $4,45 \pm 0,27\%$, respectivamente. Com a extração assistida por ultrassom, a quantidade de proteína extraída foi superior a $0,32 \text{ mg/mL}$ em um tempo inferior a 10 min para todas as potências aplicadas (40, 60, 80 e 100 W), enquanto que para a extração convencional nesse período de tempo, a quantidade extraída foi de $0,22 \text{ mg/mL}$.

O presente trabalho avaliará diferentes relações FAD:água, pulsos na emissão da potência, pH, tempos de processo e uma faixa maior de potência de ultrassom, com o intuito de alcançar maiores rendimentos de extração e teores de proteína, referentes aos encontrados na literatura.

2.1.3 Extração Assistida por Micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas com frequência na faixa de 0,3-300 GHz. Os primeiros pesquisadores a relatarem extração assistida por micro-ondas foram Ganzler et al. (1986) e Ganzler e Salgó (1987).

A técnica de extração assistida por radiação de micro-ondas consiste no aquecimento do solvente através de energia de micro-ondas, a fim de liberar o composto desejado da matriz para a fase líquida (MANDAL et al., 2007).

Devido à natureza eletromagnética das micro-ondas, as mesmas dispõem de campos elétricos e magnéticos perpendiculares um ao outro e são esses campos elétricos que provocam o aquecimento através de dois mecanismos, a condução iônica e a rotação dipolar, os quais, na maioria das vezes, ocorrem simultaneamente (THUÉRY, 1992; LETELLIER et al., 1999).

Ao utilizar a irradiação com micro-ondas em processos de extração, dois mecanismos principais atuam simultaneamente. Um deles é a rotação molecular, que neutraliza o potencial zeta, o qual é um fenômeno que reorganiza as cargas elétricas que envolvem as moléculas, resultando em maior movimento de íons que aumenta a eficiência do processo de extração. Outro é o rápido aumento da temperatura, que reduz a viscosidade da solução e quebra o filme exterior da amostra, melhorando assim o rendimento de extração (THIRUGNANASAMBANDHAM et al., 2014). O aquecimento realizado pelas micro-ondas gera o rompimento das fracas ligações de hidrogênio ocasionadas pela rotação das moléculas de dipolo (CAMEL, 2000). A rotação dipolar ocorre devido ao alinhamento no campo elétrico das moléculas que

possuem um momento dipolar, tanto no solvente quanto na amostra sólida. Essas oscilações geram colisões com as moléculas vizinhas e liberam energia térmica para o meio rapidamente (GANZLER et al., 1990; BARNABAS et al., 1995).

A potência de micro-ondas é comumente utilizada como uma variável independente controlada em sistemas de extração por micro-ondas, pois a temperatura e a potência de micro-ondas são parâmetros inter-relacionados, e a qualidade do produto a ser extraído está largamente relacionada com a temperatura à qual o material está exposto (COSTA et al., 2014). Dessa forma, a calibração do equipamento de micro-ondas é de fundamental importância, uma vez que a potência de saída geral é normalmente diferente da capacidade declarada pelo fabricante (CHENG et al., 2006; SWAIN et al., 2006).

Alguns parâmetros devem ser levados em conta para a realização da extração em micro-ondas, como a relação sólido-líquido, tempo de processo de extração, potência de micro-ondas, natureza das amostras, agitação do sistema (CHAN et al., 2011), solubilidade, constante dielétrica e o fator de dissipação. Faz-se necessário um solvente no qual o analito desejado seja solúvel, pois solventes com constantes dielétricas elevadas são capazes de absorver uma quantidade maior de energia de micro-ondas, sendo assim, quanto maior a constante dielétrica do solvente, melhor o aquecimento (JASSIE et al., 1997; CAMEL, 2000). Na Tabela 2.1 estão alguns solventes com suas constantes dielétricas e valores de momento dipolo. Outro fator importante é a polaridade do solvente, pois solventes polares são, geralmente, melhores que os não polares (WANG; WELLER, 2006).

Tabela 2.1 - Constantes dielétricas e valores de momento dipolo de alguns solventes.

<i>Solvente</i>	<i>Constante dielétrica (20 °C)</i>	<i>Momento dipolo (25 °C) (Debye)</i>
Hexano	1,89	< 0,10
Tolueno	2,40	0,36
Diclorometano	8,90	1,14
Acetona	20,70	2,69
Etanol	24,30	1,69
Metanol	32,60	2,87
Água	78,50	1,87

Fonte: Kaufmann e Christen (2002)

Uma série de vantagens é atribuída à extração em micro-ondas, como o tempo reduzido de extração, capacidade inerente para aquecer rapidamente e de maneira eficaz e uniforme a mistura amostra-solvente acelerando o processo, conforme mostrado na Figura 1.1, redução do tamanho do equipamento, aumento da produção, redução do consumo de solvente, redução de gradientes térmicos, eliminação de etapas do processo, além de permitir o uso de uma ampla gama de solventes, incluindo solventes não tóxicos (PARE; BELANGER, 1997; CHEMAT; LUCCHESI, 2006; PARTHASARATHI et al., 2013; BAIANO, 2014).

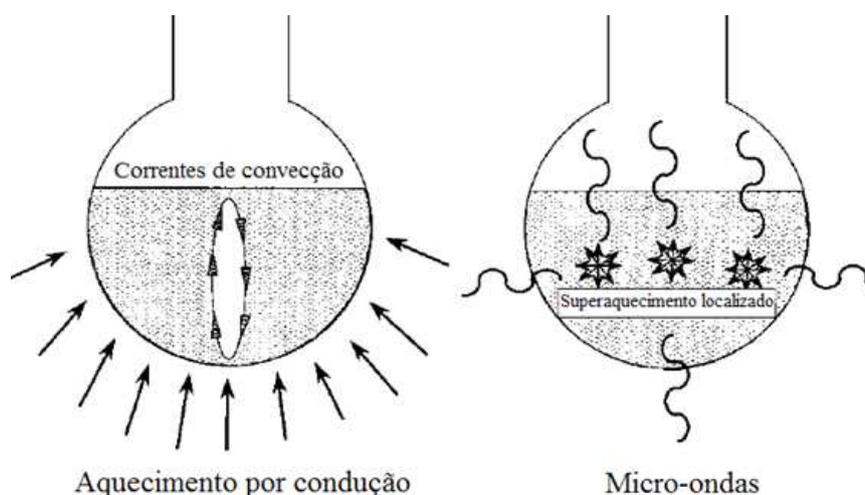


Figura 1.1 - Princípio de aquecimento por condução no método clássico de extração e por micro-ondas na extração assistida por micro-ondas. Fonte: adaptado de Kaufmann e Christen (2002)

Dois principais fatores limitam a extração assistida por micro-ondas, sendo eles o solvente e a natureza do material sólido. No caso do solvente, a eficácia da extração pode ser relativamente baixa se o mesmo não for adequado, por exemplo, se o solvente não possuir um momento dipolo significativo para a absorção da energia de micro-ondas (CHEMAT et al., 2011).

O interesse de pesquisadores na extração assistida por micro-ondas vem crescendo nos últimos anos. Tsukui (2013) fez uso de micro-ondas e éter de petróleo como solvente para extrair óleo de café verde (*Coffea arabica* L.) com foco nos diterpenos e obteve tempo reduzido de extração (10 minutos) comparado com o método de extração por Soxhlet (4 horas). Xiao et al. (2008) extraíram flavonóides da *Radix Astragali* através de micro-ondas e etanol como solvente, e obtiveram flavonoides sem nenhuma degradação utilizando o protocolo de extração desenvolvido. Zhu et al. (2013) extraíram proteína de trincas de arroz através de extração assistida por micro-ondas e

alcançaram uma taxa de 71,2% de extração da proteína. Moreira et al. (2017) realizaram extração convencional e por micro-ondas de polifenóis de resíduos de macieira, utilizando como solventes água, metanol, etanol e misturas destes solventes em várias proporções, e verificaram que a técnica mais eficiente foi extração assistida por micro-ondas, gerando maior teor fenólico, flavonoides e atividade antioxidante. Phongthai et al. (2016), através de extração assistida por micro-ondas, utilizando água destilada como solvente, obteve rendimento de extração de proteína do farelo de arroz de $4,37 \pm 0,05\%$ nas condições ótimas de operação (potência de micro-ondas: 1000 W, tempo: 90 s, relação sólido:líquido: 0,98 g/10 mL de água destilada)

Nesse trabalho serão avaliados diferentes relações FAD:água, pH, tempos de processo e temperatura do sistema (variando indiretamente a potência de micro-ondas emitida), com a finalidade de obter maiores rendimentos de extração e teores de proteína, uma vez que os resultados relatados na literatura descrevem valores relativamente baixos (PHONGTHAI et al., 2016; PHONGTHAI et al., 2017).

2.2 PROTEÍNA

Proteínas são macromoléculas que apresentam aminoácidos como unidades constituintes fundamentais. São compostos orgânicos extremamente complexos e apresentam natureza coloidal (SIENKO; PLANE, 1976).

Quimicamente, as proteínas se dividem em dois grupos, as proteínas simples, também denominadas homoproteínas, que são constituídas apenas de polipeptídeos, e as proteínas conjugadas ou heteroproteínas, que além dos aminoácidos contêm grupamentos adicionais, como carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos. Quanto à sua forma, elas podem ser globulares, as quais apresentam cadeias polipeptídicas dobradas ou envolvidas de maneira compacta em um arranjo tridimensional, assumindo sua forma globular ou esférica, ou proteínas fibrosas, que são compostas de fibras ou lâminas longitudinais caracterizadas por um grupo de cadeias polipeptídicas envolvidas em espiral ou hélice (HARPER et al., 1982).

Os níveis de organização estrutural das proteínas se dividem em primária, secundária, terciária e quaternária. O primeiro nível de organização estrutural, denominado estrutura primária é o nível estrutural mais simples e se refere à sequência de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas. Essa união peptídica permite apenas a formação de estruturas lineares, sendo assim, as cadeias não apresentam

ramificações. A estrutura secundária está relacionada com a conformação das cadeias e representa a disposição espacial, repetitiva e regular, que a cadeia polipeptídica pode adotar. Essa estrutura é geralmente mantida por ligações de pontes de hidrogênio. A estrutura terciária é tridimensional completa e é onde a proteína começa a sofrer um maior grau de conformação. Essa estrutura resulta de diversos tipos de ligações, dentre elas estão as pontes de dissulfeto ou pontes de enxofre. Quanto à estrutura quaternária, são estruturas de caráter oligomérico, sendo compostas por duas ou mais moléculas separadas, entrelaçadas em estrutura terciária (HARPER et al., 1982; FARFÁN, 1990; PINHEIRO et al., 2005).

Segundo Farfán (1990), quando ocorrem alterações nas estruturas secundárias, terciárias ou quaternárias das proteínas, diz-se que houve a desnaturação da mesma. Porém, a extensão da desnaturação é algo difícil de ser determinado e a avaliação de inúmeros fatores como a quantidade e quais interações hidrofóbicas, iônicas, polares dentre outras, originais que foram desfeitas ou então restabelecidas de forma diferente seriam necessárias.

As proteínas contribuem diretamente para o valor nutricional e propriedades funcionais do sistema alimentício, pois são ingredientes chave em vários alimentos (WANG et al., 1999). Porém, a qualidade nutricional de uma proteína depende de vários fatores, como a sua composição, digestibilidade, absorção, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e de nitrogênios totais (SARWAR, 1997; PIRES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2012), sendo a digestibilidade um dos mais importantes, pois é o primeiro fator que reflete a eficiência da utilização proteica em uma dieta, representando a quantidade de proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e então absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos ou outro composto nitrogenado (SGARBIERI, 1987).

Devido à grande diversidade de estruturas e conformações das proteínas, bem como possíveis interações com outros componentes dos alimentos como os lipídeos, carboidratos, água, íons e outras proteínas, a avaliação das proteínas quanto às suas propriedades funcionais é um problema bastante complexo, porém, tal análise é de fundamental importância para a incorporação dos extratos proteicos na formulação de alimentos (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

2.2.1 Aminoácidos

Os aminoácidos são definidos como unidades monoméricas estruturais que possuem em um mesmo carbono, denominado carbono α , as ligações de um átomo de hidrogênio, um grupo amina, um grupo carboxílico e uma cadeia lateral R. São ditos blocos construtores das proteínas e são produtos da hidrólise das mesmas (RAVINDRAN; BRYDEN, 1999). A Figura 2.1 representa a estrutura básica de um aminoácido.

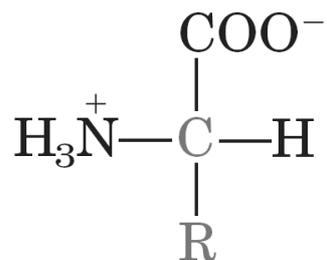


Figura 2.1- Estrutura básica de um aminoácido

Os aminoácidos podem ser classificados segundo as características de seus grupos R, em alifáticos não polares, sendo alguns exemplos a glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina e prolina; polares não carregados, como é o caso da serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina e glutamina; aromáticos como a fenilalanina, tirosina, e triptofano, carregados positivamente como a lisina, arginina e histidina e carregados negativamente como o aspartato e glutamato (LEHNINGER et al., 1995).

Todos os aminoácidos são considerados fisiologicamente essenciais, mas para os seres humanos essa categoria se divide em aminoácidos essenciais, que são aqueles que o organismo não consegue sintetizar e por isso necessitam ser ingeridos diariamente através de determinados alimentos, e os aminoácidos não essenciais, que são sintetizados pelo organismo (RAVINDRAN; BRYDEN, 1999).

Em torno de 20 aminoácidos constituem as proteínas, sendo eles o ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano e valina (RODWELL, 1996). Desses, os aminoácidos denominados essenciais são a fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano e valina (RAVINDRAN; BRYDEN, 1999).

Aminoácidos desempenham uma série de funções metabólicas importantes no organismo como, por exemplo, a constituição dos novos tecidos, ação no transporte de moléculas, funcionalidade como anticorpos nas reações inflamatórias, atuação como

fonte de calor e energia, função hormonal, manutenção da pressão osmótica e coloidal do plasma, importância na contração muscular e também são responsáveis pela transmissão do código genético através das histonas presas aos ácidos nucleicos (ANDRIGUETTO; PERLY, 1983; KRAUSE; MAHAN, 1989).

O estudo dos aminoácidos é de fundamental importância em diversas atividades, tanto na área alimentícia quanto na médica, sendo alguns exemplos a nutrição, composição, metabolismo de alimentos, determinação da estrutura de proteínas, química proteica, no mecanismo de ação de enzimas, na investigação da evolução celular, investigação de fisiologia celular, detecção e controle de desordens metabólicas e também para datar sítios arqueológicos e geológicos (AMBLER, 1981).

2.3 ARROZ

O arroz é uma gramínea anual semiaquática que se originou nos trópicos úmidos da Ásia, é um dos cereais mais consumidos no mundo, considerado um alimento de primeira necessidade, que apresenta um importante valor econômico (JULIANO, 1993; EMBRAPA, 2005; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014).

Em torno de vinte espécies do gênero *Oryza* são conhecidas, porém, a *Oryza sativa* L. é a espécie de arroz predominante no mundo. A espécie *Oryza glaberrima*, a qual apresenta um longo ciclo de vida, é cultivada em pequena quantidade na África, e outra pequena quantidade da espécie *Zizania aquatica* é cultivada na região dos Grandes Lagos, nos Estados Unidos (JULIANO, 1993). Ao longo do tempo, o *Oryza sativa* adquiriu uma ampla adaptabilidade, devido ao processo evolutivo e de domesticação, podendo agora ser cultivado tanto em água quanto em solo, variando entre terras inundadas e encostas íngremes e secas (LU; CHANG, 1980).

Na Grécia Antiga, o arroz era utilizado como um alimento medicinal para doenças dos rins, ginecológicas, dos intestinos, cólicas menstruais, sintomas da menopausa, hemorragia, doenças da pele, dentre outros, além de ser utilizada como produto de beleza (NASCIMENTO, 2007). Atualmente, o arroz é consumido principalmente na forma de grão cozido, mas nas últimas décadas vários produtos contendo arroz como ingrediente surgiram no mercado.

Segundo a EMBRAPA (2005), cerca de 590 milhões de toneladas de arroz são produzidas mundialmente em 150 milhões de hectares, em que predomina o sistema de cultivo irrigado, abrangendo mais de 75% da produção. O cultivo do arroz se dá em

mais de 100 países ao redor do mundo, exceto na Antártida, sendo considerado um produto de grande relevância na economia de países em desenvolvimento na Ásia, Oceania e América Latina. O maior produtor mundial de arroz é a Ásia, abrangendo 90% da produção e em segundo lugar está a América Latina. A China é o país de maior produção mundial, com 186 milhões de toneladas, a Índia o país de maior área cultivada, com 43 milhões de hectares, e a África é o continente que mais importa arroz (FAO, 2004).

O Brasil ocupa a nona posição na produção mundial de arroz, sendo o maior produtor fora do continente Asiático. A estimativa da produção de grãos na safra de 2013/2014 no Brasil foi de mais de 11 milhões de toneladas de arroz, sendo predominante a orizicultura irrigada, a qual é pouco influenciada por fatores climáticos (CONAB, 2016). Os estados brasileiros que cultivam o arroz são Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro, responsável por cerca de 50% da produção nacional (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014). O consumo do arroz no Brasil se dá principalmente na forma de grãos inteiros, como arroz branco, arroz integral e arroz parboilizado (VIEIRA; RABELO, 2006).

O arroz é um alimento muito rico, sendo a parte mais importante da dieta humana em várias regiões do mundo. Sua composição varia de acordo com fatores como variedade, tipo de processamento e grau de extração durante a etapa de brunimento (LUH et al., 1991), mas em geral, o arroz contém vitaminas, sais minerais, fósforo, cálcio, ferro e é capaz de suprir 20% da energia e 15% da proteína da necessidade diária de um adulto (FAO, 2004; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014). Os nutrientes presentes no grão de arroz não estão distribuídos de maneira uniforme. Proteínas, lipídios, fibra, minerais e vitaminas se encontram em concentrações maiores nas camadas mais externas do grão, enquanto que no endosperma se concentra o amido e apenas 7% de proteína (LUMEN; CHOW, 1995). A Tabela 2.2 contém dados da composição centesimal do arroz bruto e de suas frações após o beneficiamento a 14% de umidade

De acordo com a agroindústria, o arroz pode ser classificado de inúmeras formas como, por exemplo, as suas dimensões ou processamento submetido. Segundo as dimensões, ele pode ser longo fino, longo, médio, curto e misturado. Quanto ao processamento submetido, pode ser integral, polido ou parboilizado (BARATA, 2005; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014).

Tabela 2.2 - Composição centesimal (%) do arroz bruto e suas frações (b. u.) após beneficiamento

	<i>Arroz Bruto</i>	<i>Arroz Integral</i>	<i>Arroz Polido</i>	<i>Farelo de Arroz</i>	<i>Casca de Arroz</i>
Proteína	5,8 – 7,7	7,1 – 8,3	6,3 – 7,1	11,3 – 14,9	2,0 – 2,8
Lipídios	1,5 – 2,3	1,6 – 2,8	0,3 – 0,5	15,0 – 19,7	0,3 – 0,8
Fibras	7,2 – 10,4	0,6 – 1,0	0,2 – 0,5	7,0 – 11,4	34,5 – 45,9
Cinzas	2,9 – 5,2	1,0 – 1,5	0,3 – 0,8	6,6 – 9,9	13,2 – 21,0
Carboidratos	64,0 – 73,0	73,0 – 87,0	77,0 – 89,0	34,4 – 62,0	22,0 – 34,0

Fonte: FAO (2011)

O grão de arroz é composto por aproximadamente 20% de casca, 10% de farelo e germe e 70% de endosperma (ORTHOEFER, 1996), conforme exemplificado na Figura 2.2.

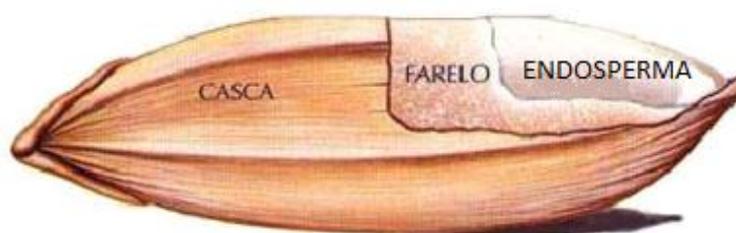


Figura 2.2 - Estrutura do grão de arroz. Fonte: adaptado de Chaud et al. (2009)

Durante o processo de beneficiamento do arroz, uma gama de subprodutos é gerada, dentre eles a casca, o farelo e a quirera (PIMENTEL; PEIXOTO, 1983), os quais estão ganhando um espaço cada vez maior no mercado de alimentos. As operações aplicadas durante o beneficiamento do arroz são secagem, descascamento, moagem e polimento (WANG; LUH, 1991). Na primeira etapa do processo de beneficiamento é retirada a camada mais externa do arroz, a casca, obtendo-se o arroz integral. Em seguida, através da brunição do grão se retira a segunda camada, o farelo de arroz, e então se obtém o arroz polido (EMBRAPA, 2004; PARRADO et al., 2006).

2.3.1 Farelo de Arroz

Segundo a Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005), farelos “são os produtos resultantes do processamento de grãos de cereais e ou

leguminosas, constituídos principalmente de casca e ou gérmen, podendo conter partes do endosperma”, apresentando umidade máxima de 15,0% (g /100 g).

Várias subcamadas compõem o farelo de arroz, estando elas entre o pericarpo e a aleurona (FONSECA, 1984), conforme mostrado na Figura 2.3. O farelo de arroz apresenta consistência que varia de um pó fino à de flocos, oriunda do seu processo de estabilização, gosto doce com sabor de noz, cor clara, alto teor de óleo, entre 15 a 20%, e ainda um baixo teor de umidade, na faixa de 6 a 7% (SAUNDERS, 1985; MESSIAS, 2005).

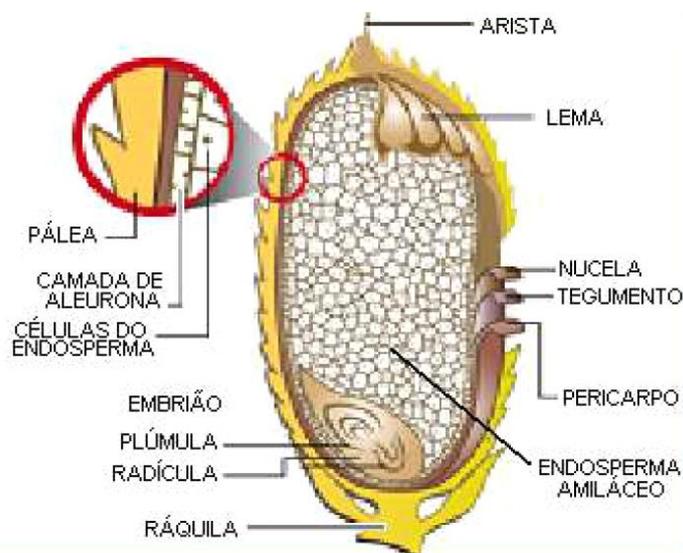


Figura 2.3 - Morfologia do grão de arroz. Fonte: adaptado de Fonseca (1984)

O farelo de arroz é um excelente alimento funcional com potencial nutritivo elevado, produzido em larga escala e de baixo custo quando comparado a outros alimentos com características nutricionais semelhantes como, por exemplo, o farelo de trigo (DENARDIN et al., 2003).

Como constituintes, o farelo de arroz apresenta ótima composição proteica, vitaminas do complexo B e E, bem como minerais, que apresenta nutrientes como o fósforo, ferro, magnésio, manganês, zinco, cobre e potássio (EMBRAPA, 2004; DANIELSKI et al., 2005). Em relação aos carboidratos, contém entre 9,6 e 12,8% de celulose, 8,7 e 11,4% de hemiceluloses e entre 2 e 20% de amido. Quanto às fibras, o farelo de arroz parboilizado apresenta valores na faixa de 2,0 a 2,5% de fibras solúveis e 31 a 33% de fibras insolúveis (MESSIAS, 2005).

Também apresenta elevado teor lipídico, o que caracteriza, em partes, seu alto valor energético, tendo como principais constituintes o ácido palmítico, o ácido linoleico e o ácido oleico. Em relação à saturação, o óleo apresenta em torno de 40% de ácidos graxos poli-insaturados, 40% de monoinsaturados e 20% de saturados (MESSIAS, 2005; OLIVEIRA et al., 2011). Contém fitoquímicos como o gama-ozanol e tocoferol, os quais são substâncias associadas a propriedades antioxidantes e apresenta ainda propriedades benéficas à saúde, como a atenuação dos níveis de colesterol sanguíneo (EMBRAPA, 2004; DANIELSKI et al., 2005).

Além disso, o farelo de arroz também é rico em enzimas como, por exemplo, a α e β -amilase, oxidase, catalase, desidrogenase, invertase, fitase, dentre outras, sendo a lipase, lipoxigenase e peroxidase as enzimas mais importantes relacionadas com a estabilidade do farelo de arroz (LUH et al., 1991).

O Brasil produz anualmente cerca de um milhão de toneladas de farelo de arroz (EMBRAPA, 2004), porém, este apresenta baixo valor comercial e sua principal aplicação costumava ser como ingrediente de ração para bovinos, suínos e frangos (JULIANO, 1985; SAUNDERS, 1990; LUH et al., 1991). Apesar das limitações causadas pelo alto teor de fibras do farelo de arroz, hoje em dia uma pequena quantidade do mesmo já é utilizada em multimisturas, fertilizante orgânico, emulsificante, ingrediente nutracêutico, aditivo na fabricação de pães, alimentação infantil, bem como para se extrair óleo (ABDUL-HAMID; LUAN, 2000; TANG et al., 2003; SILVA et al., 2006). Após a extração do óleo, o farelo de arroz é denominado desengordurado, e pode ser aplicado como matéria prima de uma série de alimentos processados, extrusados, produtos de panificação, suplementos minerais, bebidas isotônicas, dentre outros (PESTANA et al., 2008).

Sendo assim, o conhecimento de características como cor, sabor, propriedades nutritivas, absorção de água e gordura, emulsificação e capacidade espumante são de fundamental importância, pois esses são fatores fundamentais para a utilização do farelo na indústria alimentícia (MESSIAS, 2005).

2.3.2 Estabilidade do Farelo de Arroz

A estabilização do farelo de arroz é uma etapa fundamental para a comercialização desse produto, pois evita a degradação causada pela enzima lipase e conserva o valor alimentício do mesmo. A lipase é uma enzima capaz de hidrolisar rapidamente os triacilgliceróis, gerando ácidos graxos livres, os quais produzem um

sabor ácido e desagradável, diminuindo a qualidade do farelo (ENOCHIAN et al., 1981; RODRIGUES et al., 2006).

Logo após o beneficiamento do arroz, ocorre o rompimento de células individuais. As lipases entram em contato com os lipídios do farelo, iniciando sua decomposição em ácidos graxos e glicerol, dando início à rancificação (ENOCHIAN et al., 1981; RAMEZANZADEH et al., 1999). A lipólise gera um sabor desagradável e rançoso ao farelo, comprometendo a sua utilização como alimento (LAKKAKULA et al., 2004). Em locais com temperatura elevada, a hidrólise ocorre de maneira mais rápida, aumentando a acidez livre do óleo e dando início à oxidação, agregando odores e sabores rançosos, bem como perdas de componentes alimentícios valiosos como vitaminas e antioxidantes (PESTANA et al., 2008).

Diferentes tecnologias para a estabilização do farelo de arroz estão dispostas na literatura, como, por exemplo, a peletização, extrusão, desengorduramento (MARAGNO; KUHN, 2013) e métodos alternativos como tratamento por micro-ondas e aquecimento ôhmico (PESTANA et al., 2008).

Na peletização faz-se uso de temperatura e pressão amenas e um tempo de processo relativamente maior quando comparado com a extrusão. É feita a aglomeração das partículas moídas através de processos mecânicos, combinados com umidade, pressão e calor. Como os extratos proteicos apresentam tamanho de partícula pequeno, a peletização dos mesmos se torna uma alternativa que acrescenta vantagens às características do alimento (BERNARD; AMOS, 1985).

A extrusão termoplástica consiste em uma rápida aplicação de calor com uma faixa de temperatura de 125 a 135 °C, sendo importante que o material apresente umidade entre 11 e 15%. Deve-se tomar cuidado durante a extrusão, pois juntamente com a estabilidade do farelo podem ocorrer alterações não desejadas no material, como perdas de vitaminas e ainda a desnaturação indesejável da proteína (CARVALHO; VIEIRA, 1999).

No tratamento por micro-ondas, os tempos de tratamento são menores, ocorre a instantânea penetração no produto e rápida conversão da energia eletromagnética em calor, resultando em um aquecimento mais homogêneo, gerando uma otimização do processo e da qualidade do produto (ROCHA, 2002).

O tratamento ôhmico nada mais é do que o aquecimento da amostra através da passagem de uma corrente elétrica alternada. Esse aquecimento depende da

resistência elétrica do material. Para o tratamento ôhmico do farelo de arroz são alcançadas temperaturas superiores a 100 °C (LAKKAKULA et al., 2004).

Outro método que vem ganhando destaque na estabilidade do farelo de arroz é o desengorduramento. No desengorduramento é realizada a extração do óleo do farelo através do uso de solventes (KUNRATH, 2010). O óleo extraído apresenta alto valor comercial, contém inúmeros componentes minoritários, enquadrados na categoria de biofenóis, e é utilizado na alimentação humana (RODRIGUES et al., 2004).

2.3.3 Proteína do Arroz

A proteína do farelo de arroz é uma proteína de alta qualidade, rica em aminoácidos essenciais, hipoalergênica, com ausência de efeitos indesejáveis em indivíduos intolerantes ou alérgicos ao glúten (PARRADO et al., 2006).

A excelente qualidade e composição de aminoácidos da proteína do farelo de arroz supera a do trigo e do milho, sendo inferior apenas à da aveia. Dessa forma, devido ao seu perfil de aminoácidos, a mesma se torna um ingrediente apropriado para formulações de alimentos infantis (WANG et al., 1999).

Dependendo da região do grão de arroz, a composição da proteína difere. No endosperma a proteína é composta por 77 a 80% de glutelina, 10% de globulina, 5 a 8% de prolamina e 5% de albumina. Em relação ao farelo de arroz, esse é composto por 60% de albumina, 27% de glutelina e prolamina e ainda 7% de globulina (JULIANO, 1993). Para o arroz, o fator de conversão de nitrogênio em proteína está diretamente relacionado com a glutelina do grão, o qual contém 16,8% de nitrogênio. Essa fração de glutelina apresenta teores mais elevados do aminoácido essencial lisina em relação às frações globulina e prolamina (TAIRA, 1995; SGARBIERI, 1996).

O teor de proteína do grão de arroz, em base úmida, pode oscilar entre 4,5 e 15,9%, dependendo da variedade do mesmo (JULIANO; VILLAREAL, 1993; KENNEDY; BURLINGAME, 2003). O International Rice Research Institute (IRRI) avaliou o conteúdo proteico de 2674 variedades de *Oryza sativa* e 195 variedades *Oryza glaberrima*, obtendo uma variação do teor de proteína da *Oryza sativa* entre 4,5 e 15,9%; para a *Oryza glaberrima* a variação ficou entre 10,2 e 15,9% (JULIANO; VILLAREAL, 1993).

A qualidade da proteína depende do seu conteúdo de aminoácidos e, como ocorre com a maioria dos cereais, a lisina é o aminoácido limitante. Porém, a proteína oriunda do arroz apresenta uma das maiores concentrações de lisina entre os cereais,

resultando em um balanço de aminoácidos mais completo (JULIANO, 1993). Para as variedades mais comuns de arroz, o teor de lisina está entre 30 e 40 mg/g de proteína (SOTELO et al., 1994). O teor de lisina da proteína do arroz é de 3,5 a 4,0%, uma das mais altas entre as proteínas de cereais (JULIANO, 1993).

Devido à sua elevada qualidade nutricional e propriedades funcionais, a proteína do farelo de arroz vem se tornando um produto competitivo no mercado de ingredientes alimentares, podendo ser utilizada como uma alternativa à proteína do soro do leite (JU et al., 2001). A proteína pode ser consumida como suplemento proteico ou então aplicada na formulação de produtos de panificação, sorvetes, géis, pudins, dentre outros (CHRASTIL, 1992). Devido à sua estabilidade térmica, a proteína tem sido utilizada como ingrediente nutracêutico (TANG et al., 2003).

2.3.4 Caracterização de Extratos Proteicos

Informações sobre composição, características físico químicas e morfológicas dos extratos proteicos são de fundamental importância, pois é através de tais referências que se avalia a qualidade dos mesmos. As técnicas de caracterização mais amplamente utilizadas são a composição centesimal, calorimetria diferencial de varredura, microscopia eletrônica de varredura, eletroforese, determinação de aminoácidos, digestibilidade e solubilidade proteica.

A composição centesimal do extrato permite o conhecimento dos principais componentes do alimento, permitindo assim sua classificação adequada.

A técnica de calorimetria diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC) permite medir a diferença de energia calorífica fornecida à amostra e a um material de referência em função da temperatura, enquanto a amostra e o material de referência são submetidos a uma variação de temperatura sob atmosfera controlada (IONASHIRO; GIOLITO, 1980). Através da técnica de DSC, efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra, como transições de fase ou reações de desidratação, dissociação, decomposição, óxido-redução, dentre outros, podem ser acompanhados, devido às variações de calor. A técnica ainda permite avaliar transições que envolvem variações de entropia (IONASHIRO; GIOLITO, 2004).

A microscopia eletrônica de varredura é uma análise que permite a observação de características microestruturais de objetos sólidos. Fornece informações sobre a morfologia da amostra através de imagens de alta resolução. Segundo Nagatani et al. (1987), o microscópio eletrônico de varredura é um dos mais versáteis

instrumentos disponíveis para análises, devido a sua alta resolução, a técnica ser relativamente simples e requerer mínima preparação da amostra.

A eletroforese é uma técnica versátil para a análise de proteínas que consiste na migração de proteínas em campo elétrico devido à diferença de potencial. A velocidade de deslocamento dessas moléculas pode ser influenciada pela carga elétrica líquida de sua superfície externa, o tamanho e forma das mesmas (STEWART et al., 1965). Faz-se uso de corantes para a revelação das bandas, as quais indicam o tamanho, intensidade da cor e distância do ponto de aplicação, e então são utilizados para a comparação entre as amostras. A eletroforese em gel de poliacrilamida vem sendo amplamente utilizada para o estudo de proteínas, sendo elas nativas ou desnaturadas (WEBER; OSBORN, 1975).

Segundo Benson et al. (1981), a determinação precisa dos aminoácidos contidos nas amostras é uma das análises mais importantes para a pesquisa biológica. A análise dos aminoácidos é uma metodologia complexa e dispendiosa, que fornece informações referentes à qualidade da proteína presente na amostra, que para ser considerada biologicamente de boa qualidade, necessita de um bom balanço dos aminoácidos essenciais. Habitualmente, a análise de aminoácidos é realizada por cromatografia de troca iônica.

A digestibilidade é um parâmetro nutricional determinante da qualidade da proteína, pois avalia o aproveitamento de uma fonte proteica. É a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e então absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos ou compostos nitrogenados (SGARBIERI, 1987; CHEFTEL; CHEFTEL, 1976). As proteínas que não são aproveitadas devido às ligações peptídicas não hidrolisadas no processo digestivo são excretadas do organismo ou transformadas em produtos do metabolismo pelos micro-organismos do intestino grosso (SGARBIERI, 1987). Muitos fatores podem afetar a digestibilidade da proteína, como tratamentos térmicos, presença de polifenóis, inibidores de tripsina e lectinas (CHEFTEL; CHEFTEL, 1976), genética, processamento da planta, características do solo e do clima da região onde foi feito o plantio, dentre outros (GOFF; NOBLET, 2001).

Segundo Borderías e Monteiro (1988), definir solubilidade proteica não é uma tarefa simples, pois as proteínas em meio aquoso podem formar soluções coloidais, soluções verdadeiras ou suspensões estáveis de partículas insolúveis. A definição termodinâmica de solubilidade proteica é a concentração de proteínas no solvente em

um sistema com uma ou mais fases no estado de equilíbrio (VOJDANI, 1996). Segundo Hall (1996), a solubilidade proteica pode ser expressa como a quantidade de proteína presente na fase líquida em relação à quantidade total de proteína da fase sólido-líquido no equilíbrio. Em sistemas com baixas concentrações salinas, a solubilidade proteica costuma aumentar, fenômeno conhecido como *salting in*. Fato que ocorre devido à tendência dos íons salinos de se associar as proteínas, contribuindo para uma maior hidratação e/ou repulsão entre as moléculas de proteína, gerando maior solubilidade da proteína. Em soluções com concentrações salinas elevadas, as moléculas de água disponíveis se tornam insuficientes para a solvatação da proteína e a interação proteína-proteína se torna mais importante que a interação água-proteína, ocorrendo a precipitação das mesmas, fenômeno conhecido como *salting out* (SGARBIERI, 1996). A solubilidade é uma das propriedades funcionais mais importantes das proteínas e pode afetar outras propriedades da mesma, como as hidrodinâmicas e reológicas. É considerada a propriedade funcional primária na determinação das demais propriedades (NAKAI; CHAN, 1985; CÂNDIDO, 1998). Proteínas com boa solubilidade apresentam características gelatinizantes, espumantes e emulsificantes (CÂNDIDO, 1998; HEYWOOD et al., 2002; MOHAMED et al., 2009; LIU et al., 2011). Para ser considerada solúvel, a proteína deve ser capaz de interagir com o solvente por pontes de hidrogênio, interações iônicas e dipolo-dipolo (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). Vários são os fatores capazes de influenciar a solubilidade das proteínas em meio aquoso, sendo alguns deles o pH, a temperatura e a força iônica. A solubilidade de uma proteína depende da proporção entre grupos hidrofóbicos, normalmente situados na parte central da molécula proteica, e de grupos hidrofílicos, situados na superfície da molécula proteica (DAMODARAN, 1997). O balanço entre as forças intermoleculares repulsivas e atrativas do sistema, o qual depende das estruturas das proteínas e da água e são afetadas pelo tipo de solventes, é o que controla a solubilidade proteica (PHILLIPS et al., 1994). A classificação mais utilizada para proteínas vegetais é quanto a sua solubilidade, sendo elas definidas como solúveis em água (albuminas), solúveis em soluções salinas (globulinas), solúveis em etanol (prolaminas), solúveis em soluções ácidas (glutelinas ácidas), e solúveis em soluções alcalinas (glutelinas básicas) (OSBORNE, 1924). Para concentrados proteicos, a alta solubilidade é um fator primordial, permitindo assim que os mesmos possam ser utilizados como ingredientes funcionais em diversos alimentos como bebidas, molhos, cremes, chantilis, coberturas dentre outros (CHANDI; SOGI, 2007).

Nesse contexto, o farelo de arroz desengordurado será utilizado como fonte de obtenção de proteína através de três diferentes técnicas. Em seguida, os extratos proteicos obtidos serão caracterizados e comparados, conforme descrito a seguir.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse capítulo se refere ao desenvolvimento da parte experimental, em que estão descritas as metodologias que foram empregadas nos processos de extração da proteína do farelo de arroz, bem como o desengorduramento do farelo e a análise e a caracterização da proteína extraída.

3.1 MATÉRIA PRIMA

O farelo de arroz (*Oriza sativa* L.) *in natura* foi cedido pela empresa Broto Legal, localizada na cidade de Campinas – SP, em julho de 2014. Este foi produzido no Rio Grande do Sul, na safra de 2013/2014. Um segundo farelo (*Oryza sativa* L.) *in natura* oriundo da safra 2016/2017 foi adquirido da empresa Mococa, localizado na cidade de Mococa – SP, em julho de 2017. O material adquirido foi acondicionado em sacos plásticos herméticos e armazenado em freezer a -18 °C. Em seguida foi realizado o desengorduramento do farelo de arroz.

3.2 REAGENTES

A mistura catalítica de sulfato de cobre (CuSO₄) e sulfato de potássio (K₂SO₄), os indicadores vermelho de metila e azul de metileno, papel manteiga, água destilada, hidróxido de sódio, etanol, bem como os ácidos sulfúrico, bórico e clorídrico foram utilizados para a determinação das proteínas através do método de micro-Kjeldahl.

As enzimas α -amilase, protease e amiloglucosidase, a solução tampão MES-TRIS, éter etílico, lâ de vidro, água destilada, ácido clorídrico, acetona e etanol foram utilizados para a análise de fibras alimentares totais.

Clorofórmio, água destilada, papel de filtro, sulfato de sódio e metanol foram utilizados para a determinação de lipídios.

Hexano foi utilizado para o desengorduramento do farelo de arroz.

Água destilada, hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram utilizados para as extrações alcalina, assistidas por micro-ondas e por ultrassom.

O β -mercaptoetanol, acrilamida, ácido acético, metanol, água Milli-Q, solução tampão Tris, azul de bromofenol, dodecil sulfato de sódio (SDS), Comassie

brilhante G-250 e placas de gel de poliacrilamida foram utilizados nas análises de eleforese em gel.

Os reagentes ácido clorídrico, fenol, acetato de sódio trihidratado, metanol grau HPLC, trietilamina, padrões PIERCE amino acid Standard H - HCl 0,1 - 2,5 umols, padrões SIGMA amino acid Standard physiological – acidics and neutrals e amino acid Standard physiological; fenilisotilcianato; ácido alfa-aminobutírico [(AAAB) Padrão Interno AAtotais]; metionina sulfona (padrão interno AAlivres); ácido acético glacial; acetonitrila grau HPLC; hidrogeno fosfato de sódio, solução A (acetato de sódio, trietilamina e acetonitrila), solução B (acetonitrila e água) foram utilizadas para a determinação de aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Gás nitrogênio e tampão de fosfato 0,06 M (pH 7,0) contendo NaCl 0,1 M foram utilizados para a calorimetria diferencial exploratória.

As enzimas pepsina e tripsina, a proteína caseína, bem como o ácido tricloroacético, ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram utilizados na determinação da digestibilidade proteica.

Cloreto de sódio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram utilizados na análise de solubilidade proteica.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

3.3.1 Composição Centesimal do Farelo de Arroz

As análises de características físico-químicas do farelo de arroz, apresentando sua composição centesimal foram realizadas em triplicata segundo as normas elaboradas pela *Association of Official Agricultural Chemists – AOAC* (1997a); AOAC (1997b), com exceção do teor de lipídios, que foi obtido segundo o Método de Bligh e Dyer (1959).

3.3.1.1 Proteína

O teor de proteínas foi determinado através do método de micro-Kjeldahl nº 960.52 da AOAC (1997a). Foi analisado o conteúdo de nitrogênio total da amostra, utilizando o fator de conversão nitrogênio-proteína para o arroz de 5,95 (MERRILL; WATT, 1973), conforme convencionado, uma vez que não há relatos na literatura sobre o fator de conversão nitrogênio-proteína para o farelo de arroz. A análise foi dividida

em três etapas, sendo elas digestão, destilação e titulação. Foram pesadas 0,05 g de amostra em papel manteiga que foram transferidas juntamente com o papel para o tubo de Kjeldahl. Foram adicionados 0,5 g de mistura catalítica (K_2SO_4 e $CuSO_4$) e 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida foi realizada a digestão da amostra; o processo foi iniciado a 50 °C e foi realizado um aumento na temperatura de 50 °C a cada 30 minutos, até que a temperatura atingisse 350 °C. A digestão foi mantida até que fosse obtido um líquido transparente, fato que deve acontecer em torno de 4 horas. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, foi iniciado o processo de destilação. Foi adicionada uma pequena quantidade de água destilada no tubo de Kjeldahl contendo a amostra digerida e 15 mL de solução de NaOH 60%. Posteriormente, foram coletados 100 mL do destilado em 15 mL de solução saturada de ácido bórico contendo 4 gotas de indicador (4 partes de vermelho de metila 0,1% em etanol 50% com 1 parte de azul de metileno 0,1% em etanol 50%). O destilado foi titulado com solução HCl 0,02 N padronizada. Em seguida, foi calculada a porcentagem de teor de nitrogênio

$$\% \text{ Teor de N} = \frac{(V_{HCl} - V_{branco}) \cdot N_{HCl} \cdot 14,007}{m_{amostra}} \cdot 100 \quad (3.1)$$

$$\% \text{ Proteína Bruta} = \% \text{ Teor de N} \cdot 5,95 \quad (3.2)$$

sendo: V_{HCl} = volume de HCl utilizado na titulação da amostra (mL);

V_{Branco} = volume de HCl utilizado na titulação do branco (mL);

N_{HCl} = normalidade real do HCl (g/mL);

$m_{amostra}$ = massa da amostra (g).

3.3.1.2 Fibra Alimentar Total

As frações insolúvel e solúvel de fibra alimentar foram dadas de acordo com a metodologia oficial nº 991.43 da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1997b), através do princípio enzimático e gravimétrico. A fibra alimentar total foi obtida pela soma das frações insolúvel e solúvel.

Foram pesados 2 g de amostra e então levados ao aparelho de Soxhlet para extração com éter etílico por 8 h. A seguir, foram adicionados 40 mL de solução tampão MES-TRIS e a amostra foi homogeneizada com agitador magnético. Foram adicionados 50 µL de solução α -amilase termoestável na solução, a qual foi constantemente agitado a 95 °C por 30 minutos em banho-maria. A amostra foi esfriada até 60 °C, foram adicionados 100 µL de solução de protease e foi agitado constantemente por 30 minutos. Foram adicionados 5 mL de HCl 0,561 N e o pH da solução foi ajustado para 4,0-4,7, mantendo a solução a 60 °C. Foram adicionados 300 µL de solução amiloglucosidase e agitado por 30 minutos a 60 °C. Para a determinação das fibras insolúveis, a amostra digerida foi filtrada com auxílio de um sistema de vácuo em cadinho filtrante, contendo lã de vidro. O resíduo foi lavado duas vezes com 10 mL de água a 70 °C. O líquido filtrado contendo as fibras solúveis foi transferido para um béquer de 600 mL para posterior determinação. O resíduo foi lavado duas vezes em cadinho filtrante contendo lã de vidro com etanol 78%, etanol 95% e acetona. O resíduo do cadinho foi seco e sua massa determinada. Os valores obtidos pelo método enzimático foram corrigidos por meio da análise de proteína e a análise de cinzas segundo os métodos oficiais da AOAC (1997). Para as fibras solúveis, um quarto de solução de etanol 95% pré-aquecida a 60 °C e o líquido filtrado contendo as fibras solúveis do béquer de 600 mL foram misturados. A precipitação foi realizada a temperatura ambiente durante 60 min. A fibra alimentar total foi obtida pela soma das frações insolúveis e solúveis.

3.3.1.3 Umidade

A determinação do teor de umidade foi dada de acordo com a metodologia oficial nº 925.09 da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1997b). Foram pesados 2 g de amostra em placa de Petri previamente seca em estufa a 105 °C. A amostra foi seca em estufa a 105 °C por 5 horas ou até peso constante da amostra. Em seguida, foi calculada a porcentagem de umidade da amostra.

3.3.1.4 Lipídios

A determinação do teor de lipídios totais foi dada pelo Método de Bligh e Dyer (1959). Esse método se mostra mais eficiente que os demais métodos utilizados, pois permite tanto a extração de lipídios polares quanto apolares, sem aquecimento.

Foram pesados 3 g de amostra em tubo de 70 mL com tampa. Foram adicionados 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada, a solução foi homogeneizada e agitada por 30 minutos em agitador rotativo. Em seguida, foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de sulfato de sódio 1,5% e a solução foi homogeneizada por 2 minutos. A amostra foi centrifugada a 1000 rpm por 2 minutos para que ocorra a separação das fases. O líquido superior contendo o metanol foi separado e descartado, a camada inferior foi filtrada em papel de filtro contendo 1 g de sulfato de sódio. Foram transferidos 5 mL do filtrado para um béquer; o solvente foi evaporado em estufa a 100 °C por 1 hora; o restante foi esfriado em dessecador e a massa foi medida. O cálculo da porcentagem de lipídios totais se dará conforme a Equação 3.3.

$$\% \text{ Lipídios Totais} = \frac{m_{\text{lipídios}}}{m_{\text{amostra}}} \cdot 4.100 \quad (3.3)$$

sendo: $m_{\text{lipídios}}$ = massa de lipídios (g);

m_{amostra} = massa da amostra (g).

3.3.1.5 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado de acordo com a metodologia oficial nº 923.03 da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1997b). Foram pesados 3 g de amostra em um cadinho previamente seco em mufla a 250 °C. Inicialmente, a amostra foi queimada em chama até toda a fumaça colorida ser eliminada, com o intuito de evitar combustão no interior da mufla. A amostra foi então incinerada em mufla a 550 °C por um período de 6 a 8 horas. Após a incineração, a mufla foi desligada e quando a temperatura atingir 250 °C, o cadinho foi transferido para um dessecador até atingir temperatura ambiente. Em seguida, o cadinho com a amostra foi pesado e o teor de cinzas determinado.

3.3.1.6 Carboidratos totais

A quantificação dos carboidratos foi realizada através de cálculos de diferença entre a porcentagem total da amostra (100%) e as porcentagens de proteína, fibra, umidade, lipídios e cinzas.

3.3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura do Farelo (DSC)

As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas com o intuito de obter a temperatura de desnaturação das amostras. O equipamento utilizado foi o calorímetro MDSC-2920 (TA Instruments, EUA), com refrigeração controlada através de um acessório de refrigeração refrigerada (RCS), operando com gás nitrogênio a 150 mL/min. A metodologia utilizada foi adaptada de Wang et al. (1999), em que 0,36 mg de amostra foram dissolvidos em 6 µL de tampão de fosfato 0,06 M (pH 7,0) contendo NaCl 0,1 M. O procedimento foi realizado em panela de alumínio hermeticamente selada. A faixa de temperatura analisada foi de 25 a 100 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio. Uma panela de alumínio hermeticamente fechada com solução tampão de fosfato 0,06 M (pH 7,0) contendo NaCl 0,1 M foi utilizada como referência.

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura do Farelo (MEV)

As microscopias do FAD foram realizadas a fim de analisar a superfície das partículas. As microscopias dos extratos proteicos de FAD foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia Dispersiva de raios X, modelo Leo 440i, da marca MEV/EDS LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra) com aumento de 1000 X para cada amostra. Para a preparação da amostra foi realizado um recobrimento com uma fina camada de ouro por um metalizador e as mesmas foram fixadas no porta amostra por uma fita adesiva de carbono.

3.4 DESENGORDURAMENTO DO FARELO DE ARROZ

O procedimento de desengorduramento do farelo de arroz foi adaptado de Wang et al. (1999), em que o farelo de arroz foi desengordurado duas vezes, utilizando hexano em uma proporção de 1:3 (p/p) de farelo para solvente, com agitação de 500 rpm em agitador mecânico durante 30 min e centrifugação a 4000 g durante 10 minutos à temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). O farelo de arroz desengordurado

(FAD) foi seco ao ar livre durante 10 horas, moído em pistilo, peneirado através de um conjunto de peneiras e armazenado a 4 °C.

3.5 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO FAD

A distribuição de tamanho de partícula do farelo de arroz foi determinada através de conjunto de peneiras em sistema de agitação mecânico Bertel, por 15 minutos, com massa de amostra inicial de 200 g, utilizando um conjunto de peneiras Tyler (8, 10, 14, 20, 24, 28, 35, 42, 65, 80, 100, 150, 200 e 400 mesh).

3.6 ENSAIOS PRELIMINARES

Inicialmente foram realizados ensaios preliminares para a definição de algumas variáveis do processo, sendo elas:

- Extração alcalina: proporção FAD:água (0,5:10, 1:10 e 2:10) e faixa granulométrica do farelo de arroz (lote original, sem separação granulométrica, com diâmetro da partícula no qual 50% do material possui diâmetro inferior $d_{50} = 175 \mu\text{m}$; $385 \mu\text{m}$, $128 \mu\text{m}$), com tempo de processo de 45 minutos e temperatura ambiente.;
- Extração assistida por ultrassom: proporção FAD:água (0,5:10, 1:10 e 2:10) e aplicação de pulsos de potência on/off (60/0 s, 60/15 s e 60/30 s), com potência de ultrassom de 100 W e tempo total de processo de 10 minutos;
- Extração assistida por micro-ondas: proporção FAD:água (0,5:10, 1:10 e 2:10), com temperatura de 40 °C e tempo de processo de 90 segundos;

As variáveis respostas dos ensaios preliminares foram o rendimento e a qualidade do extrato proteico obtido. O cálculo do rendimento percentual de extração foi realizado através da Equação 3.4.

O cálculo do rendimento percentual de extração foi realizado através da Equação 3.4.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{extratoproteico FAD}}}{\text{massa}_{\text{FAD}}} \cdot 100 \quad (3.4)$$

sendo: $m_{\text{extratoproteico FAD}}$ = massa de extrato proteico FAD obtido (g);

m_{FAD} = massa de FAD (g).

3.6.1 Extração Alcalina Preliminar

O procedimento de extração alcalina foi baseado na metodologia de Silva (2012).

Para avaliar a relação FAD:água:

1. Em diferentes ensaios, o FAD do lote original ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$) foi disperso em água destilada em diferentes proporções de farelo e água destilada (0,5:10; 1:10; 2:10 m/m);
2. Em seguida, o pH foi ajustado para 10 com solução de hidróxido de sódio NaOH 1 M e a mistura foi homogeneizada com agitador magnético durante 45 minutos à temperatura ambiente;
3. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 8000 g por 30 minutos e filtrada em peneira de nylon, a fim de separar o resíduo sólido do sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas.
4. O pH do sobrenadante foi ajustado para 4,7 e a solução novamente centrifugada a 8000 g durante 30 minutos.
5. O precipitado foi ressuspenso em água destilada, neutralizada até pH 7,0, seco em liofilizador e armazenado na temperatura de 4 °C.
6. Após, foi calculado o rendimento de extração e determinado o teor de proteínas através do método de micro-Kjeldahl número 960.52 da AOAC (1997a), utilizando o fator de conversão de nitrogênio para a proteína de arroz de 5,95 (MERRILL; WATT, 1973).

Para avaliar a granulometria, o procedimento foi semelhante ao descrito acima, no entanto, variou-se o tamanho de partícula do FAD entre amostras do lote original (com $d_{50} = 175 \mu\text{m}$), $d_p = 385 \mu\text{m}$ (retido entre as peneiras 35 e 42 mesh) e $d_p = 128 \mu\text{m}$ (retido entre as peneiras 100 e 150 mesh). Neste caso, a relação FAD:água 0,5:10 foi fixada. As extrações foram realizadas em triplicata.

3.6.2 Extração Assistida por Ultrassom Preliminar

O procedimento de extração assistida por ultrassom foi baseado na metodologia de Chittapalo et al. (2009). Foi utilizado um gerador de ultrassom (ECO-

SONICS, Ultronique, QR300, Brasil) a uma frequência padrão de 20 kHz, equipado com uma macrossonda de titânio de 13 mm de diâmetro.

1. Para cada um dos ensaios, o FAD na granulometrias do lote original ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$) foi disperso em água destilada em diferentes proporções de farelo e água destilada (0,5:10; 1:10; 2:10 m/m).
2. Em seguida, o pH foi ajustado para 10 com solução de hidróxido de sódio NaOH 1 M e uma potência de ultrassom de 100 W foi emitida durante 10 minutos, sendo a temperatura controlada e mantida ambiente através de banho de gelo.
3. Os procedimentos seguintes foram semelhantes aos passos 3 a 6, descritos no item 3.6.1.

Para avaliar a influência de pulsos na potência, o procedimento foi semelhante ao descrito acima. No entanto, foi avaliada a aplicação de pulsos de potência de ultrassom on/off de 60/0 s, 60/15 s e 60/30 s. Neste caso, a relação FAD:água 0,5:10 e granulometria do lote original ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$) foram fixadas. As extrações foram realizadas em triplicata.

3.6.3 Extração Assistida por Micro-ondas Preliminar

O procedimento de extração assistida por micro-ondas foi baseado na metodologia de Phongthai et al. (2016). Foi utilizado um sistema de extração de micro-ondas (Start-E, Milestone, Sorisole, Itália) a uma frequência padrão de 50-60 Hz, previamente calibrado. O equipamento foi equipado com 8 vasos de teflon que formam um sistema fechado de carrossel.

1. Para cada um dos ensaios, o FAD na granulometria do lote original ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$) foi disperso em água destilada em diferentes proporções de farelo e água destilada (0,5:10; 1:10; 2:10 m/m).
2. Em seguida, o pH foi ajustado para 10 com solução de hidróxido de sódio NaOH 1 M e a temperatura foi mantida a 40 °C através de um sensor inserido em um recipiente de controle durante 90 s, gerando uma faixa de potência de 350 a 400 W.
3. Os demais procedimentos realizados foram semelhantes aos passos 3 a 6, descritos no item 3.6.1.

3.7 EXTRAÇÃO ALCALINA

Em diferentes ensaios, 20 g de FAD ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$) foram dispersos em 400 mL de água destilada (FAD:água 0,5:10), o pH foi ajustado (X_2 : 9-11) com solução de hidróxido de sódio NaOH 1 M e a mistura homogeneizada com agitador magnético por um tempo predeterminado (X_1 : 30-60 min), a temperatura controlada (X_3 : 25-55 °C). O procedimento a seguir foi semelhante aos passos 3 a 6, apresentado no item 3.6.1, referentes à extração alcalina preliminar.

Um planejamento experimental 2^3 com três pontos centrais foi utilizado para analisar os melhores valores das variáveis de entrada pH, tempo de agitação e temperatura, sendo as variáveis de resposta o rendimento e a qualidade da proteína a ser extraída. O design completo consiste em 11 combinações, incluindo três repetições do ponto central (Tabela 3.1) e valores das variáveis foram escolhidos considerando os limites de pH e temperatura do processo.

Tabela 3.1 - Faixas de valores das variáveis utilizadas para a extração alcalina

<i>Variáveis</i>	<i>Fatores</i>	<i>Níveis</i>		
		<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
Tempo (min)	X_1	30	45	60
pH	X_2	9	10	11
Temperatura (°C)	X_3	25	40	55

3.8 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Para a extração assistida por ultrassom, foi utilizado um gerador ultrassônico (ECO-SONICS, Ultronique, QR300, Brasil) a uma frequência padrão de 20 kHz, equipado com uma macro sonda de titânio de 13 mm de diâmetro. Em ensaios independentes, o 20 g de FAD ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$) foram misturados com 400 mL de água destilada (FAD:água 0,5:10) em um béquer de vidro. O pH da solução foi ajustado (X_2 : 9-11) com solução de hidróxido de sódio NaOH 1 M, e a temperatura foi mantida ambiente através de um banho de gelo. Com a sonda, foram emitidas potências de ultrassom até a capacidade máxima do equipamento (X_3 : 180-300 W) em determinados intervalos de tempo (X_1 : 5-15 min), com aplicação de pulsos de potência de ultrassom on/off de 60/30 s. A sonda geradora de ondas ultrassônicas foi imersa em torno de 2 cm

na solução. As próximas etapas foram semelhantes às descritas nos itens 3 a 6, mencionados na metodologia da extração alcalina preliminar.

Um planejamento experimental 2^3 com três pontos centrais foi realizado para a escolha dos melhores valores das variáveis de entrada pH, tempo de processo e potência de ultrassom emitida, tendo-se como variáveis de resposta o rendimento e a qualidade da proteína a ser extraída. O design completo consiste em 11 combinações, incluindo três repetições do ponto central (Tabela 3.2) e os valores das variáveis foram escolhidos considerando os limites de pH e potência de ultrassom do processo.

Tabela 3.2 - Faixas de valores das variáveis utilizadas para a UAE

<i>Variáveis</i>	<i>Fatores</i>	<i>Níveis</i>		
		<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
Tempo (min)	X ₁	5	10	15
pH	X ₂	9	10	11
Potência (W)	X ₃	180	240	300

3.9 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Para a extração assistida por micro-ondas, foi utilizado um sistema de extração por micro-ondas previamente calibrado (Start-E, Milestone, Sorisole, Itália), que opera a uma frequência padrão de 50-60 Hz. Em diferentes ensaios, 20 g do FAD ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$) e 400 mL de água destilada (FAD:água 0,5:10) foram distribuídos em tubos de teflon que compõem o carrossel do equipamento de micro-ondas. O pH foi ajustado (X₂: 9-11) com solução de hidróxido de sódio NaOH 1 M. A temperatura foi variada (X₃: 30-55 °C) e a faixa de potência de micro-ondas correspondente foi observada observado para intervalos de tempo pré-definidos (X₁: 60-120 s). O procedimento seguinte foi semelhante ao descrito nos passos 3 a 6, do item 3.6.1, da extração alcalina preliminar.

Um planejamento experimental 2^3 com três pontos centrais foi realizado para a escolha dos melhores valores das variáveis de entrada pH, tempo de processo e temperatura, tendo como variáveis de resposta o rendimento e a qualidade da proteína a ser extraída. O design completo consiste em 11 combinações, incluindo três repetições do ponto central (Tabela 3.3) e os valores das variáveis foram escolhidos considerando os limites de pH e temperatura do processo.

Tabela 3.3 - Faixas de valores das variáveis utilizadas para a MAE

Variáveis	Níveis			
	Fatores	-1	0	1
Tempo (s)	X ₁	60	90	120
pH	X ₂	9	10	11
Temperatura (°C)	X ₃	30	42,5	55

3.10 MEV DO FAD APÓS A EXTRAÇÃO

As microscopias do FAD após a extração foram realizadas a fim de analisar as alterações na superfície do FAD após a aplicação de ondas ultrassônicas e microondas. As microscopias foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia Dispersiva de raios X, modelo Leo 440i, da marca MEV/EDS LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra) com aumento de 500 X para cada amostra. Para a preparação da amostra foi realizado um recobrimento com uma fina camada de ouro por um metalizador e as mesmas foram fixadas no porta amostra por uma fita adesiva de carbono.

3.11 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO PROTEICO DO FAD

O extrato proteico obtido do farelo de arroz foi analisado através da composição centesimal, eletroforese em gel, perfil aminoacídico, morfologia de superfície, digestibilidade e solubilidade proteica.

3.11.1 Composição Centesimal

A análise de características físico-químicas do extrato proteico de farelo de arroz foram realizadas em triplicata segundo as normas elaboradas pela *Association of Official Agricultural Chemists* – AOAC (1997a); AOAC (1997b), com exceção do teor de lipídios, que foi obtido segundo o Método de Bligh e Dyer (1959).

3.11.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise de eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970). As soluções de extrato proteico foram misturadas na proporção de 1:1 (v/v) com o tampão tris 1,5 M e

SDS 10% (p/v). A análise foi realizada em uma unidade de eletroforese vertical e em gel com 12% de gel de separação e 4% em gel de concentração. Uma mistura contendo 1,5 mL de água destilada e 0,2% de proteína foi colocada em um tubo de ensaio, onde foram adicionados 1,5 mL de solução tampão tris 0,5 M. O tubo de ensaio foi agitado em vórtex até a dissolução da mistura. Em um tubo de Eppendorf foi pipetado 1 mL da solução e foram adicionados 100 µL de β-mercaptoetanol. O tubo contendo a solução foi colocado em água fervente por 4 minutos para desnaturação das proteínas. Após o arrefecimento da amostra, foram adicionadas 3 gotas de azul de bromofenol. Uma alíquota contendo 20 µL de amostra foi colocada no poço de corrida e então foram adicionados 10 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS). Em seguida foi montado o aparato de eletroforese, que foi coberto com solução tampão. Foi realizada a aplicação de uma corrente de 120 V durante 3 horas e depois o gel foi retirado da placa e colocado em solução corante de Coomassie Brilliant Blue G-250 por 2 horas sob agitação constante. Posteriormente, as bandas de proteínas presentes na amostra foram reveladas através da solução descorante de metanol, ácido acético e água.

3.11.3 Determinação dos Aminoácidos

Para a determinação de aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com ácido clorídrico 6 M durante 24 horas. Os aminoácidos liberados na hidrólise ácida foram reagidos com fenilisotilcianato (PITC), separados por HPLC em fase reversa e detectados por UV a 254 nm. A quantificação foi realizada por calibração interna multinível, com auxílio do ácido alfa-aminobutírico (AAAB) como padrão interno, conforme descrito por White et al. (1986), utilizando uma coluna Luna C18 100 Å 5u 250x4,6 mm 00G-4252-EQ. Os equipamentos utilizados para a determinação dos aminoácidos foram o degassificador Spectra System (Thermo Separation Products); módulo de bomba quaternária Spectra System P4000 (Thermo Separation Products); válvula de injeção Rheodyne; forno Thermasphere TS-130 HPLC (Phenomenex - USA Torrance, CA.); módulo de detecção UV Spectra System UV 2000 (Thermo Separation Products); e coluna Luna C18 100 Å 5u, 250x4,6 mm 00G-4252- EQ (Phenomenex – USA Torrance, CA.) módulos e Software Thermo Fisher Scientific Inc. 81 Wyman Street/Waltham, MA 02454.

A vazão total da fase móvel utilizada foi de 1,0 mL/min, temperatura da coluna de 50 °C e comprimento de onda do detector UV de 254 nm. A fase móvel foi composta pelas soluções A e B (A: composta por 940 ml de acetato de sódio 0,14 M,

pH 6,40, contendo 0,05% de trietilamina, misturado com 60 ml de acetonitrila; B: constituída por 60% de acetonitrila e 40% de água) em um gradiente conforme descrito a seguir:

- 100% da solução A até 5 minutos.
- 5% da solução B aos 5 minutos.
- 22,5% da solução B aos 10 minutos.
- 32 % da solução B aos 11,80 minutos.
- 11 % da solução B aos 20,80 minutos.
- 60 % da solução B aos 20,00 minutos.
- 100 % da solução B aos 23,00 minutos.
- 100 % da solução B aos 28,00 minutos.
- 100 % da solução A aos 28,10 minutos.
- 100 % da solução A aos 35 minutos.

3.11.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias dos extratos proteicos do FAD foram realizadas a fim de verificar a superfície das partículas, bem como possível desintegração das mesmas. O equipamento utilizado foi o microscópio eletrônico de varredura da marca LEO, modelo LEO 440i, com aumento de 100 e 500 X para cada amostra. Para a preparação da amostra foi realizado um recobrimento com uma fina camada de ouro por um metalizador e as mesmas foram fixadas no porta amostra por uma fita adesiva de carbono.

3.11.5 Digestibilidade Proteica *in vitro*

A metodologia aplicada para a digestibilidade proteica *in vitro* foi baseada em Xia et al. (2012). O extrato proteico de FAD (1%, m/v) foi misturada com água destilada e pepsina (enzima: proteína de 1:100, m/m), e o pH ajustado para 1,5. A mistura foi incubada a 37 °C durante 120 min sob leve agitação. Em seguida, a mistura foi neutralizada com NaOH 1,0 M para parar a reação de digestão. A digestão foi seguida pela adição de tripsina (enzima: proteína de 1:100, m/m). Após incubação a 37 °C durante 120 min, a mistura foi aquecida a 95 °C durante 10 min para finalizar a atividade da tripsina. Um volume igual de 10% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado à mistura e centrifugado a 5500 g durante 10 min. O precipitado de TCA foi recolhido e liofilizado, e o teor de proteína foi determinado utilizando o método de

micro-Kjeldahl. A caseína foi usada como padrão (AKESON; STAHMANN, 1964). O valor da digestibilidade da caseína obtido foi considerado como 100%, e o valor da digestibilidade obtido para a proteína do farelo de arroz foi calculado em função do valor obtido para a caseína. A digestibilidade das proteínas foi calculada através da Equação 3.5.

$$Digestibilidade\ Proteica\ (\%) = \frac{N_{sobrenadante} - N_{branco}}{N_{amostra}} \cdot 100 \quad (3.5)$$

sendo: $N_{sobrenadante}$ = teor de nitrogênio no sobrenadante (%);

N_{branco} = teor de nitrogênio no branco (%)

$N_{amostra}$ = teor de nitrogênio na amostra (%).

3.11.6 Solubilidade Proteica

A porcentagem da solubilidade proteica foi dada em função da metodologia descrita por Morr et al. (1985), em solução salina para que ocorra a indução de interações iônicas e agregação das moléculas de proteína. Em um béquer, foram agitados 100 mg de extrato proteico de FAD e volume suficiente de NaCl 0,1 M para formar uma pasta homogênea. Após, foi adicionado NaCl 0,1 M até completar um volume de 8 mL. A mistura foi agitada com agitador magnético, com velocidade menor que a de formação de vórtice. O pH de cada amostra foi ajustado com soluções de NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N, e irá variar na faixa de 3 a 11. A dispersão foi agitada por 1 hora com o pH controlado e então foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com solução NaCl 0,1 M. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 8000 g por 30 minutos e então filtrada em papel filtro. Foi determinado o valor de proteínas solúveis no sobrenadante através de micro-Kjeldahl. Posteriormente, foi calculada a porcentagem da solubilidade através da Equação 3.6.

$$Solubilidade\ Proteica\ (\%) = \frac{A \cdot 10}{m_{amostra\ sol} \cdot \frac{S}{100}} \cdot 100 \quad (3.6)$$

sendo: A = concentração proteica no sobrenadante (mg/mL);

S = concentração de proteína na amostra (%);

$m_{amostra\ sol}$ = massa da amostra para a solubilidade (mg).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo serão apresentados e discutidos os resultados das atividades experimentais.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A fim de caracterizar o farelo de arroz *in natura* da safra 2013/2014, foi determinada a composição centesimal, realizada a distribuição granulométrica, análise de calorimetria diferencial de varredura e microscopia eletrônica de varredura.

4.1.1 Composição Centesimal do Farelo de Arroz

Na Tabela 4.1 estão representados os valores de composição centesimal do FA e FAD, em gramas por 100 g de material.

Tabela 4.1 - Composição centesimal do FA e FAD da safra 2013/2014 (g/100 g_{amostra})

<i>Composição</i>	<i>FA (%)</i>	<i>FAD (%)</i>
Umidade	10,17 ± 0,02 ^B	11,77 ± 0,03 ^A
Cinzas	10,73 ± 0,05 ^B	12,04 ± 0,22 ^A
Lipídios	18,20 ± 0,21 ^A	2,84 ± 0,11 ^B
Fibras totais	22,06 ± 0,40 ^B	27,08 ± 0,30 ^A
Proteína	13,82 ± 0,62 ^B	15,67 ± 0,38 ^A
Carboidrato ^{**}	25,02 ± 0,64 ^B	30,60 ± 0,55 ^A

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os parâmetros analisados nas colunas.

**Por diferença.

Observando-se os dados da Tabela 4.1, verifica-se a eficácia do processo de desengorduramento do FA, uma vez que o teor de lipídios do FAD reduziu em torno de 85% em relação ao valor do FA. Sirikul et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes ao desengordurarem farelo de arroz convencional e farelo de arroz orgânico, utilizando hexano como solvente, e também Jiamyangyuen et al. (2005), ao desengordurar FA com o solvente hexano.

Apesar de a legislação brasileira não estabelecer padrões de qualidade para o farelo de arroz, as indústrias de transformação do arroz recomendam como parâmetros

os valores de 16% para lipídios, 13% para proteína, 29% de fibras, 10% de cinza, 12% de umidade, dentre outros componentes minoritários para o farelo de arroz estabilizado (SAUNDERS, 1990). Assim, pode-se considerar que o farelo de arroz estabilizado através do desengorduramento está de acordo com o preconizado pelas indústrias. Além disso, os valores de composição do FA e FAD são consistentes com os encontrados na literatura, uma vez que Lima et al. (2000) e Chaud et al. (2009) encontraram valores similares da composição química ao analisarem FA e FAD. Também Faria (2008), ao analisar a composição centesimal do farelo de arroz irrigado e de sequeiro, obteve valores de composição centesimal similares.

Observa-se que o FA tradicional escolhido para a realização desse trabalho apresenta teor de proteína de 13,82%, valor maior do que para o arroz integral cru e o arroz branco cru, 6,7 e 7,3%, respectivamente (McKEVITH, 2004), bem como de rações de moagem de grãos de arroz marrom e moído, dispondo de teores de proteína na faixa de 7,1 – 8,3 e 6,3 – 7,1%, respectivamente (JULIANO; BECHTEL, 1985), confirmando que o farelo de arroz tradicional é uma boa fonte para obtenção da proteína de arroz.

4.1.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Na Figura 4.1 está o termograma do farelo de arroz antes e depois do desengorduramento.

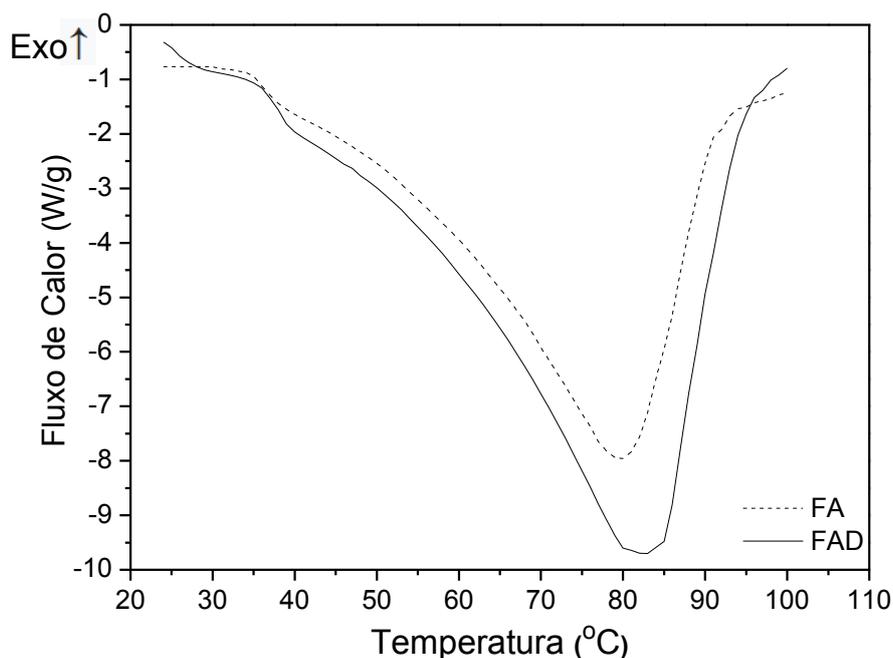


Figura 4.1: Termograma do FA e FAD

Analisando-se a Figura 4.1, observa-se o pico de desnaturação das proteínas do FA e FAD, os quais podem ser usados como indicador da estabilidade térmica das proteínas. Tais picos se deram em torno da temperatura de 80,16 e 82,69 °C, respectivamente. Esses resultados estão próximos aos encontrados na literatura, uma vez que Normand e Marshall (1989), ao avaliarem a temperatura de desnaturação de diferentes variedades de grãos de arroz inteiros, encontraram valores na faixa de 82 a 90 °C e Zhou et al. (2016) encontraram temperatura de desnaturação da proteína do farelo de arroz de 79,9 °C, ao avaliar as mudanças estruturais na proteína do farelo de arroz em diferentes temperaturas de extrusão. Amagliani et al. (2016), analisando propriedades de pós de proteína de arroz obtiveram temperatura de pico de desnaturação para duas amostras de farelo de arroz em 55,6 e 72,8 °C. Tal diferença nas temperaturas pode ser atribuída ao fato de diferentes variedades do arroz terem sido analisadas, bem como variadas formas e regiões de cultivo.

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias eletrônicas de varredura para farelo de arroz antes e depois do processo de desengorduramento são mostradas nas Figuras 4.2 (a) e (b), respectivamente.

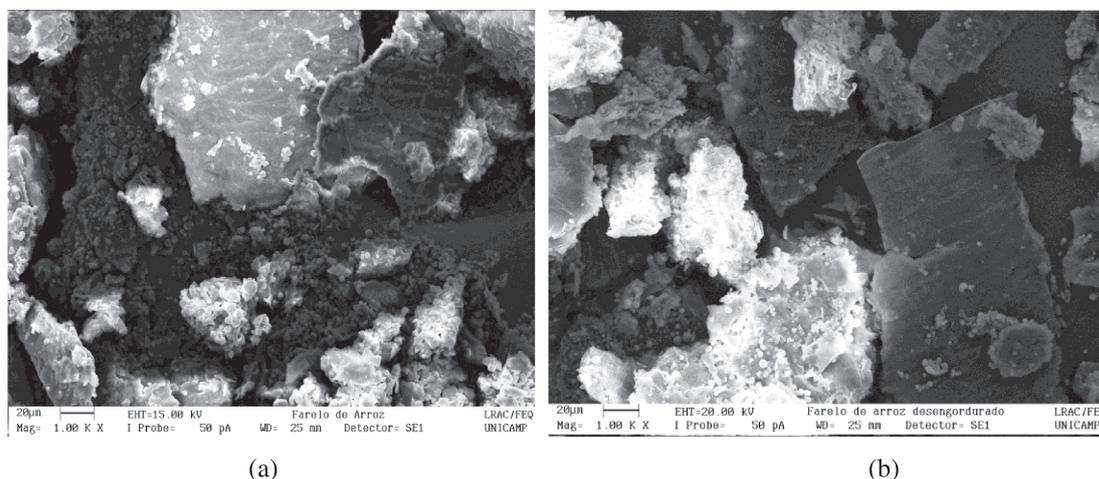


Figura 4.2: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o (a) FA (b) FAD

Através da Figura 4.2 (a) e (b), verificou-se que as micrografias de FA e FAD são muito similares, apresentando em sua estrutura uma superfície laminar, compacta e bem organizada, fato esse que também foi observado por Hou et al. (2014) e Lamid et al. (2015). Além disso, observou-se o tamanho de partícula irregular, a

estrutura dos poros e a presença de grânulos de amido em forma de polígono, como também verificado por Chittapalo e Noomhorm (2009).

4.2 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO FAD

Nas Figuras 4.3 (a) e (b) estão representadas a distribuição granulométrica do farelo de arroz e a fração cumulativa das partículas do farelo de arroz, respectivamente.

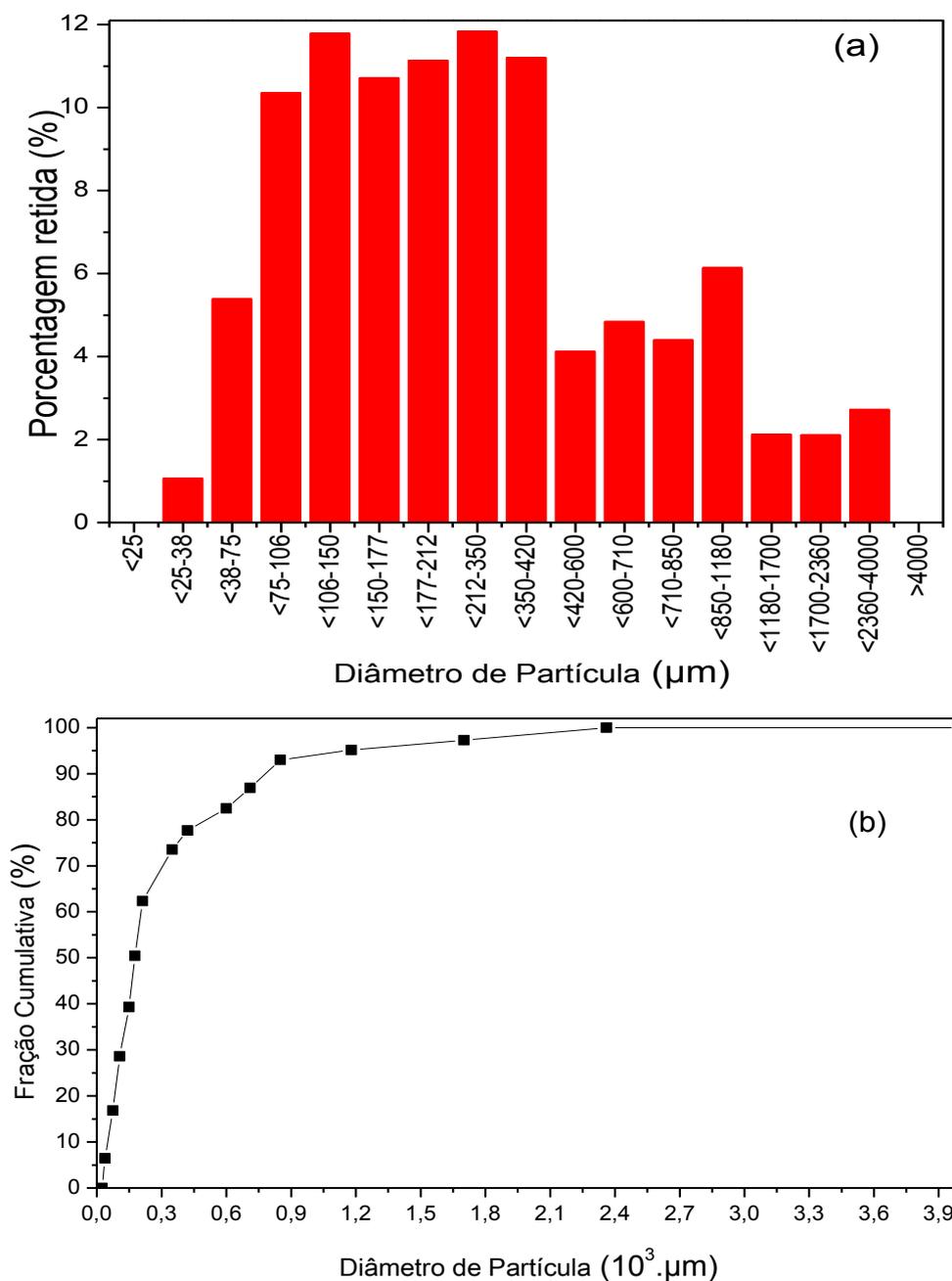


Figura 4.3 – (a) Distribuição granulométrica do FA e (b) Fração cumulativa das partículas do FA

Analisando-se os dados da Figura 4.3 (a), observa-se que o farelo de arroz se caracteriza como um pó, uma vez que maior parte de suas partículas varia na faixa de diâmetro de 1 μm até 500 μm (CREMASCO, 2012), com uma maior fração de partículas na faixa de 75 a 420 μm .

Na Figura 4.3 (b), observa-se a fração cumulativa do farelo, a qual apresenta diâmetro médio de partículas (d_{50}) de 175 μm . Dessa forma, os diâmetros 128, 175 e 385 μm foram escolhidos para análise da influência do tamanho de partícula no processo de extração.

Resultados semelhantes de distribuição de tamanho de partícula foram observados por Luh et al. (1991), ao analisar a distribuição de tamanho de partícula de farelo estabilizado por calor. Amagliani et al. (2016) obtiveram valores de d_{50} para duas variedades de farelo de arroz de 214 e 67,2 μm .

4.3 ENSAIOS DE EXTRAÇÃO PRELIMINARES

Ensaio preliminares de extração de proteína foram realizados para a definição de algumas variáveis do processo. Os resultados estão apresentados a seguir.

4.3.1 Extração Alcalina Preliminar

Avaliou-se a influência da razão FAD:água, para o tamanho de partícula do lote original ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$), nos rendimentos de extração e conteúdo proteico das amostras extraídas. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Influência da razão FAD:água nos rendimentos de extração e teor de proteína no material extraído através da extração alcalina.

<i>Razão FAD:água</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Teor de proteína (%)</i>
2:10	10,23 \pm 0,34 ^A	70,02 \pm 0,73 ^A
1:10	10,76 \pm 1,40 ^A	70,14 \pm 0,40 ^A
0,5:10	11,04 \pm 0,56 ^A	74,07 \pm 1,20 ^B

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os parâmetros analisados nas colunas.

**Dados em base seca (b.s.).

Em relação ao teor de proteína no material extraído, observou-se um aumento estatístico do mesmo com o aumento da quantidade de solvente. Este fato pode ser explicado pelo princípio da interação entre a proteína dissolvida, uma vez que a proteína foi dissolvida em água e a interação proteína-proteína entre moléculas foi substituída pela interação proteína-água (DAMODARAN, 1997). Assim, pode-se supor que, com menores volumes de solvente, a interação proteína-água não foi completa e, portanto, não permitiu obter maiores quantidades de proteína no material extraído.

Sendo assim, observou-se que as melhores condições operacionais do parâmetro FAD:água, dentro dos limites avaliados, foi o valor de 0,5:10, o qual resultou em um rendimento de extração de 11,04% (b.s.) e teor de proteína de 74,07%. Os resultados se mostram satisfatórios, uma vez que apresentaram maior teor proteico que o valor obtido por Stone et al. (2015), ao extrair proteína da ervilha (*Pisum sativum* L.) através da extração de sal - diálise (SE), o qual conseguiu teor de proteína de 71,50%. Bandyopadhyay et al. (2012), ao extrair proteínas de farinha de farelo de arroz desengordurado indiano sob condições similares, conseguindo valor de rendimento de extração de 10,2%. Jiamyangyuen et al. (2005), obtendo valores de rendimento de extração e teor de proteína de 9,6% e 72,63%, respectivamente, com pH de 9,5 e tempo de extração de 58 minutos para farelo de arroz.

Desta forma, a razão 0,5:10 foi escolhida para avaliar a influência do tamanho de partícula sobre os rendimentos de extração e os teores de proteínas das amostras extraídas seguintes. Os resultados são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Influência do tamanho de partícula no rendimento de extração e teor de proteína no material extraído na extração alcalina.

<i>Granulometria</i>	<i>Rendimento</i> (%)	<i>Teor de Proteína</i> (%)
dp = 385 µm	9,82 ± 0,59 ^A	71,25 ± 1,99 ^A
Lote original (d ₅₀ = 175 µm)	10,93 ± 0,52 ^A	71,71 ± 2,35 ^A
dp = 128 µm	11,28 ± 0,73 ^A	71,71 ± 1,58 ^A

*Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste de Tukey entre os parâmetros analisados nas colunas.

**Dados em base seca (b.s.).

Analisando-se os dados na Tabela 4.3, verifica-se que estatisticamente nenhuma diferença significativa foi observada entre os valores, a um nível de confiança de 95%. Esperava-se que o rendimento de extração aumentasse significativamente com a diminuição do tamanho de partícula, uma vez que houve um aumento da área de superfície de FA disponível para o transporte molecular, que contribuiria para uma transferência de massa mais extensa de solutos entre as fases. Resultados semelhantes foram observados por Betschart et al. (1977), ao extrair proteína de farelo de germe oriundos dos EUA e da Espanha e Russin et al. (2007), ao extrair proteína de soja.

Em relação ao teor de proteína, observou-se que os três tamanhos de partículas resultaram em valores semelhantes de teor de proteína, estatisticamente. Resultados semelhantes foram observados por Gnanasambandam e Hettiarachchy (1995), ao analisar o teor de proteína extraída de FA estabilizado e não estabilizado. Dessa forma, o lote original ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$) foi definido como a melhor granulometria, uma vez que não requer a seleção de um diâmetro de partícula específico, evitando mais um passo no processo, resultando em rendimento de extração e teor de proteína de 10,93% (b.s.) e 71,71%, respectivamente.

Devido aos valores gerados em função das diferentes granulometrias, o FA do lote original ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$) foi utilizado para a análise dos demais parâmetros para a UAE e MAE.

4.3.2 Extração Assistida Por Ultrassom Preliminar

A influência da razão FAD:água nos rendimentos de extração e nos teores de proteínas nas amostras extraídas, com o tamanho de partícula do lote original, são mostrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Influência da razão FAD:água nos rendimentos de extração e teores de proteínas no material extraído na UAE.

<i>Razão FAD:água</i>	<i>Rendimento</i> (%)	<i>Teor de Proteína</i> (%)
2:10	$11,07 \pm 0,08^B$	$73,30 \pm 0,92^B$
1:10	$11,45 \pm 0,45^{AB}$	$73,80 \pm 1,70^B$
0,5:10	$12,01 \pm 0,30^A$	$75,58 \pm 0,55^A$

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os parâmetros analisados nas colunas.

**Dados em base seca (b.s.).

Através dos dados da Tabela 4.4 é possível observar que tanto o rendimento de extração quanto o teor de proteína foram maiores para a relação FAD:água 0,5:10. Assim como foi verificado para a extração alcalina, isso se deve ao princípio da transferência de massa e ao princípio da interação entre a proteína dissolvida em solvente, respectivamente. Ao se utilizar mais solvente, uma força motriz maior foi 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, 2009). Resultados semelhantes de rendimento de extração foram observados por Moulton e Wang (1982), ao extrair proteína de flocos de soja desengordurados, usando sonicação contínua e em batelada e por Klein et al. (2015) ao obterem extratos de uvaia (*Eugenia pyriformis* C.) utilizando UAE. Desta forma, a relação 0,5:10, a qual proporcionou um rendimento de extração de 12,01% (b.s.) e teor de proteína de 75,58% no material extraído, foi escolhida para avaliar a influência de aplicação de pulsos sem emissão de potência nos rendimentos de extração e nos teores de proteínas das próximas amostras. Os resultados são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Influência dos pulsos de potência on/off no rendimento de extração e teor de proteína no material extraído na UAE.

<i>Pulsos on/off</i> (s)	<i>Rendimento</i> (%)	<i>Teor de Proteína</i> (%)
60/0	11,32 ± 0,51 ^A	73,82 ± 1,64 ^A
60/15	11,61 ± 0,59 ^A	73,80 ± 1,10 ^A
60/30	11,71 ± 0,40 ^A	74,77 ± 1,61 ^A

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os parâmetros analisados nas colunas.

**Dados em base seca (b.s.).

Avaliando os dados contidos na Tabela 4.5 é possível notar que eles não apresentaram diferença estatística a um nível de confiança de 95%. No entanto, era esperado que a emissão de ondas ultrassônicas com pulsos sem emissão de potência fosse mais eficiente do que a emissão de ondas ultrassônicas de forma contínua. Isso porque, à medida que o tempo de emissão de onda aumenta, o tempo de dissipação das bolhas de cavitação formadas é reduzido, fato indesejado, uma vez que as bolhas de cavitação quando oscilam de forma estável formam uma espécie de campo, gerando maior transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de

velocidade e a criação de uma força capaz de romper as células do farelo de arroz, favorecendo a extração da proteína (FLOROS; LIANG, 1994). Por fim, visando economia de energia, a aplicação de pulsos de potência on/off de 60/30 s foi definida como a melhor condição de operação dentro dos limites avaliados, o que resultou em um rendimento de extração de 11,71% (b.s.) e teor de proteína de 74,77%.

4.3.3 Extração Assistida Por Micro-Ondas Preliminar

A influência da razão FAD:água, com tamanho de partícula do lote original ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$), nos rendimentos de extração e nos teores de proteínas nas amostras extraídas são mostrados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Influência da razão FAD:água nos rendimentos de extração e teores de proteínas no material extraído na MAE.

<i>Razão FAD:água</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Teor de proteína (%)</i>
2:10	11,03 ± 0,46 ^B	75,18 ± 1,46 ^A
1:10	11,02 ± 0,08 ^B	74,98 ± 0,37 ^A
0,5:10	12,20 ± 0,39 ^A	75,90 ± 0,28 ^A

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os parâmetros analisados nas colunas.

**Dados em base seca (b.s.).

Analisando-se os dados na Tabela 4.6, verificou-se que a relação FAD:água 0,5:10 resultou em um maior rendimento de extração. Semelhante ao observado anteriormente, isso se deve ao princípio da transferência de massa, uma vez que uma proporção maior de FA para água gera um maior gradiente de concentração entre as fases sólida e líquida, facilitando a extração da proteína. Resultados semelhantes foram observados por Phongthai et al. (2016), ao extraírem proteína de FAD. Em relação ao teor de proteína no material extraído, embora os valores não apresentem diferença estatística a um nível de confiança de 95%, observou-se que o aumento do gradiente de concentração resultou em maiores quantidades de proteínas no material extraído. Portanto, a relação 0,5:10 foi considerada a melhor condição de operação, dentro do limite avaliado, proporcionando um rendimento de extração de 12,20% (b.s.) e teor de proteína de 75,90% no material extraído.

Uma comparação entre os melhores valores obtidos na extração alcalina, UAE e MAE é apresentada na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Valores de rendimento e teor de proteína no material extraído para a extração alcalina, UAE e MAE

<i>Método</i>	<i>Condições</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Teor de proteína (%)</i>
	Diâmetro de partícula: $d_{50} = 175 \mu\text{m}$		
Alcalino	Razão FAD:água: 0,5:10 Tempo: 45 min	$10,93 \pm 0,52^{\text{B}}$	$71,71 \pm 2,35^{\text{B}}$
	Diâmetro de partícula: $d_{50} = 175 \mu\text{m}$		
UAE	Razão FAD:água: 0,5:10 Pulso on/off: 60/30 s Tempo: 10 min	$11,71 \pm 0,40^{\text{AB}}$	$74,77 \pm 1,61^{\text{A}}$
	Diâmetro de partícula: $d_{50} = 175 \mu\text{m}$		
MAE	Razão FAD:água: 0,5:10 Tempo: 1,5 min	$12,20 \pm 0,39^{\text{A}}$	$75,90 \pm 0,23^{\text{A}}$

Realizando-se uma comparação entre os valores obtidos na UAE e na MAE com os valores da extração alcalina, verifica-se um aumento de 9,92% no rendimento de extração e 5,40% no teor de proteína (tamanho de partícula do lote original e proporção de FAD:água de 0,5:10) em tempo de processo 4,5 vezes menor para a UAE, e um aumento de 11,62% no rendimento de extração e 5,86% em teor de proteína (tamanho de partícula do lote original e proporção de FAD:água de 0,5:10) em tempo de processo 30 vezes menor para a MAE, ambos em relação ao que foi obtido na extração alcalina. Esses fatos confirmam que os UAE e MAE são técnicas mais completas e com seletividade maior, uma vez que geram uma maior dispersão das partículas, gerada pela emissão das ondas ultrassônicas e pela irradiação das amostras que estão imersas em solvente, respectivamente, causando a ruptura das paredes celulares mais rapidamente, facilitando a penetração do solvente na matriz, permitindo a liberação dos compostos extraíveis e melhorando a transferência de massa nas interfaces (CHEMAT et al., 2011).

Assim, observa-se que as técnicas de UAE e MAE apresentam vantagens como a redução significativa no tempo de extração, quantidade reduzida de solvente requerida e de resíduos gerados, maior seletividade e rendimento do material extraído,

alta reprodutibilidade em um curto período de tempo, dentre outros (KAUFMANN; CHRISTEN, 2002; CHEMAT et al., 2011; MASON et al., 2011).

Os resultados estão de acordo com Ochoa-Rivas et al. (2017), os quais extraíram quantidades maiores de proteína de farinha de amendoim através dos métodos de extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas, em comparação com os valores conseguidos com o método alcalino, obtendo uma redução no tempo de extração de 4 vezes para o método por ultrassom e 7,5 vezes para o método por micro-ondas. Chittapalo e Noomhorm (2009) ao extraírem proteína de FA por UAE e extração alcalina obtiveram maiores rendimentos de extração por UAE (10 minutos) em comparação o processo de extração alcalina (60 minutos). Choi et al. (2006) ao extraírem proteína solúvel de soja por MAE, obtiveram maiores rendimentos de extração de proteína em comparação com os valores obtidos com extração alcalina.

Após a finalização dos ensaios preliminares de extração de proteína, concluiu-se que os melhores parâmetros encontrados e que seriam utilizados para os processos de extração seguintes foram a granulometria do lote original ($d_{50} = 175 \mu\text{m}$), a razão FAD:água de 0,5:10 e aplicação de pulso de potência on/off de 60/30 s.

4.4 EXTRAÇÃO ALCALINA

Os valores de rendimento de extração e teor de proteína obtidos através da extração alcalina, avaliando-se as variáveis tempo de processo, pH e temperatura do sistema estão apresentados na Tabela 4.8.

Analisando-se os valores contidos na Tabela 4.8, verifica-se boa reprodutibilidade no ponto central, com valor de desvio padrão de 0,01 para o rendimento de extração e 0,60 para o teor de proteína. Os rendimentos de extração variaram na faixa de 10,21 a 12,85% e teores de proteína de 66,31 a 75,32%. Os resultados estão condizentes com Jiamyangyuen et al. (2005), que ao extraírem proteína do farelo de arroz em pH 9,5 e 12 e tempo de extração de 32 a 58 minutos, encontrando rendimentos de extração variando de 9,58 a 12,20% e teores de 70,43 a 72,63%. Connor et al. (1976), ao extraírem proteína de farelo de arroz integral a pH 9 e 24 °C obtiveram valores de rendimento levemente superior, na faixa de 14 a 20%, fato que pode ser explicado pela maior quantidade de proteína contida no grão inteiro em comparação apenas ao farelo.

Tabela 4.8 – Matriz do planejamento de experimentos e valores de rendimento de extração e teor de proteína no material extraído para a extração alcalina

<i>Ensaio</i>	<i>Valores das Variáveis</i>			<i>Variáveis Resposta</i>	
	<i>Tempo (X₁) (min)</i>	<i>pH (X₂)</i>	<i>Temperatura (X₃) (°C)</i>	<i>Rendimento de Extração (%)</i>	<i>Teor de Proteína (%)</i>
A11	30 (-1)	9 (-1)	25 (-1)	10,25	66,31
A12	60 (+1)	9 (-1)	25 (-1)	10,21	72,50
A13	30 (-1)	11 (+1)	25 (-1)	12,04	75,30
A14	60 (+1)	11 (+1)	25 (-1)	12,04	74,60
A15	30 (-1)	9 (-1)	55 (+1)	10,84	72,92
A16	60 (+1)	9 (-1)	55 (+1)	11,13	74,03
A17	30 (-1)	11 (+1)	55 (+1)	12,78	74,87
A18	60 (+1)	11 (+1)	55 (+1)	12,85	75,32
9(PC)	45 (0)	10 (0)	40 (0)	11,35	73,14
10(PC)	45 (0)	10 (0)	40 (0)	11,36	73,93
11(PC)	45 (0)	10 (0)	40 (0)	11,37	74,27

A análise dos efeitos principais e de suas interações para um limite de confiança de 95 % ($p < 0,05$) estão representados na Tabela 4.9, em que o rendimento de extração é a variável resposta, variando-se tempo (1), pH (2) e temperatura do sistema (3). Os efeitos padronizados estão ilustrados no gráfico de Pareto por meio da Figura 4.4.

Analisando-se os dados da Tabela 4.9, verifica-se que os resultados de valor de p apresentaram probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$), com exceção da interação entre tempo e pH (2 e 3), ou seja, apresentaram significância estatística. Através da Figura 4.4 é realizada uma análise comparativa de cada um dos efeitos através do gráfico de Pareto, onde percebe-se mais uma vez que as variáveis pH, temperatura, tempo e interação entre tempo e temperatura (1 e 3) e interação entre tempo e pH (1 e 2) foram significativos a 95% de confiança, uma vez que as repostas aparecem à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula, para a qual os efeitos das fontes de variação são nulos. Com exceção da interação entre tempo e pH (1 e 2), todos os efeitos exercidos foram positivos, indicando que um aumento do rendimento é

observado quando se muda as três variáveis avaliadas de um nível inferior para um superior.

Tabela 4.9 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 99,22\%$) para o rendimento na extração alcalina

<i>Fator</i>	<i>Efeito</i>	<i>Erro Puro</i>	<i>Valor de p*</i>	<i>-95% Limite de Confiança</i>	<i>+95% Limite de Confiança</i>
Média/Interações	11,4744	0,0035	0,0000	11,4595	11,4894
(1) Tempo (min)	0,0785	0,0081	0,0106	0,0435	0,1135
(2) pH	1,8170	0,0081	0,0000	1,7820	1,8520
(3) Temperatura (°C)	0,7640	0,0081	0,0001	0,7290	0,7990
(1) e (2)	-0,0420	0,0081	0,0355	-0,0770	-0,0070
(1) e (3)	0,1000	0,0081	0,0066	0,0650	0,1350
(2) e (3)	0,0065	0,0081	0,5081	-0,0285	0,0415

Valor de p: probabilidade de significância

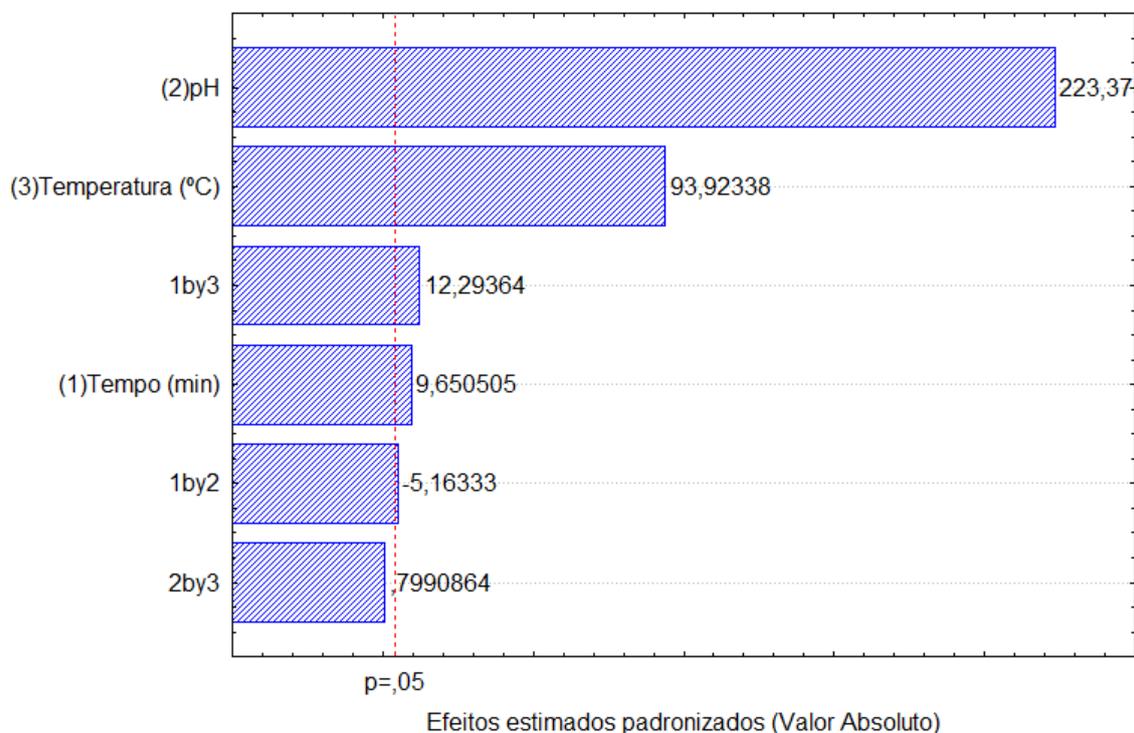


Figura 4.4 – Diagrama de Pareto do rendimento de extração da extração alcalina

A significância do modelo estatístico foi verificada através da análise de variância (ANOVA), valores de F de Fisher calculados e tabelados para a regressão e os resíduos, bem como para a falta de ajuste e o erro puro. Os dados estão apresentados na Tabela 4.10.

Para um modelo ser considerado estatisticamente significativo, o valor de F calculado para análise da significância da regressão deve ser maior do que o F tabelado, assim, o modelo poderá ser usado para fins de predição, e o F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo deve apresentar um valor menor que o valor tabelado.

Para a construção do modelo, primeiramente foram considerados todos os fatores, e em seguida foram eliminados do menos significativo para o mais significativo (interações 2 e 3 e também 1 e 2), conforme o gráfico de Pareto, avaliando-se o valor do R^2 ajustado. O modelo é significativo quando o valor do R^2 ajustado atinge seu valor máximo com a eliminação dos fatores não significativos.

Tabela 4.10 - Análise de variância para o rendimento na extração alcalina.

	<i>Soma</i> <i>Quadrática</i>	<i>Graus de</i> <i>Liberdade</i>	<i>Média</i> <i>Quadrática</i>	<i>F</i> _{calculado}	<i>F</i> _{tabelado}
Regressão	7,803	4	1,951	180,250	4,534
Resíduos	0,065	6	0,011		
Falta de Ajuste	0,065	4	0,065	122,168	19,247
Erro Puro	0,000	2	0,000		
Total	7,868				

O modelo empírico proposto para estimar o rendimento de extração através do método alcalino ($Y_{Al,R}$), como uma função de parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$), em variáveis codificadas, com o valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9918 pode ser observado na Equação 4.1.

$$Y_{Al,R} = 11,47445 + 0,03925X_1 + 0,90850X_2 + 0,38200X_3 + 0,05000X_1X_3 \quad (4.1)$$

Em que: X_1 = variável codificada correspondente ao tempo (min)

X_2 = variável codificada correspondente ao pH

X_3 = variável codificada correspondente à temperatura ($^{\circ}C$).

Observando-se os dados da Tabela 4.10, verifica-se que o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão é maior que o F_{tabelado} , indicando que o modelo é significativo a 95% de confiança e que os dados se ajustam bem à regressão. Já em relação à falta de ajuste, verifica-se que o $F_{\text{calculado}}$ também é maior que o F_{tabelado} , indicando que o modelo não é preditivo a 95% de confiança. Porém, acredita-se que a não preditividade do modelo é devido à proximidade dos valores de repetição no ponto central e erro consideravelmente pequeno, e não devido à falta de ajuste dos dados.

Os gráficos de valores preditos pelo modelo empírico *versus* valores experimentais observados, bem como o gráfico da distribuição dos resíduos estão apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6.

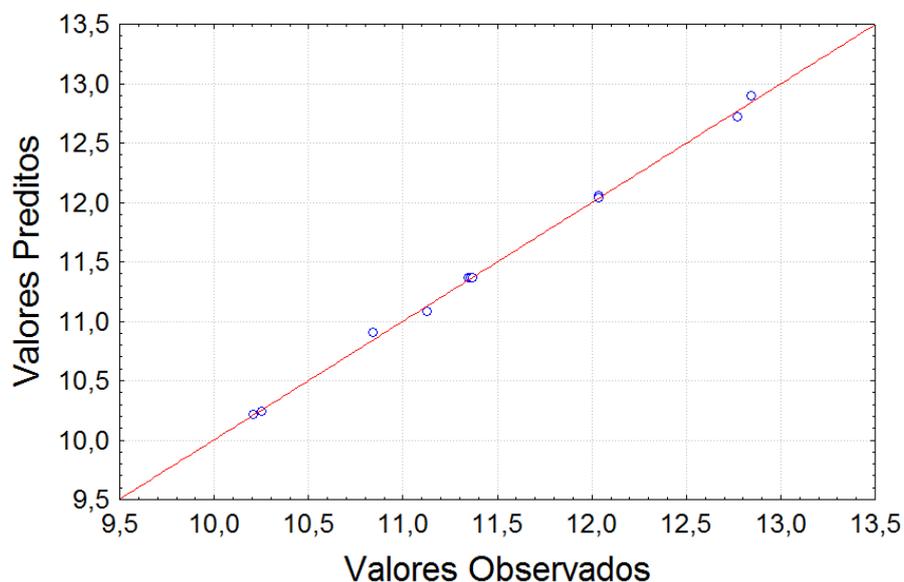


Figura 4.5 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta rendimento na extração alcalina.

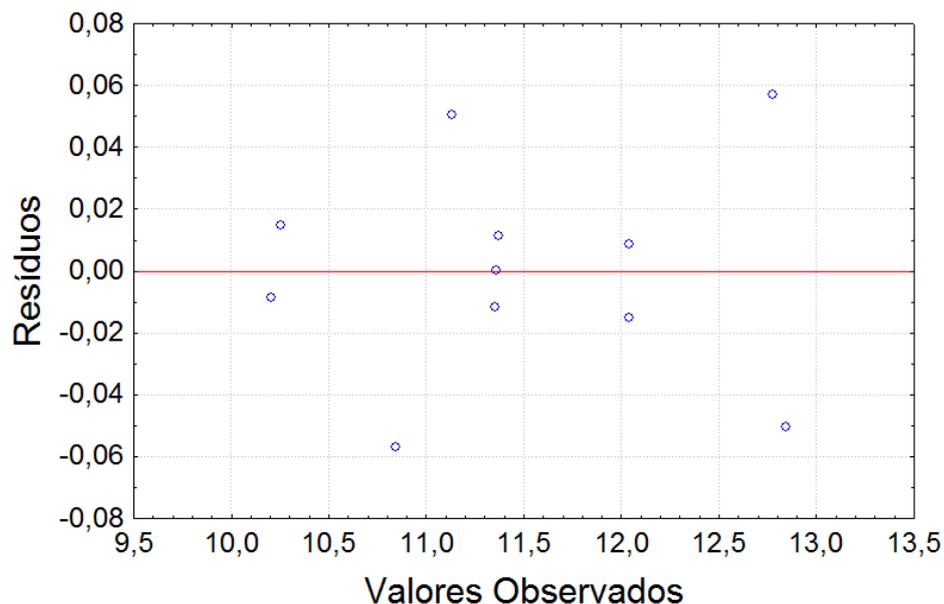


Figura 4.6 – Distribuição dos resíduos para o rendimento na extração alcalina

Na Figura 4.5 se observa a comparação entre os valores experimentais observados e os preditos pelo modelo empírico, onde se verifica a capacidade do modelo em descrever os resultados experimentais. Para a Figura 4.6, que contém a distribuição dos resíduos da eficiência do processo, se observa uma distribuição não aleatória em torno de zero, com tendência espelhada, o que não valida a análise estatística realizada.

Porém, para fins de predição de resultados, com a intenção de ser apontada uma tendência da variável resposta em função das variáveis dependentes, as superfícies de resposta foram geradas e estão representadas nas Figuras 4.7 (a), (b) e (c), com o auxílio do software Statistica v. 7.0.

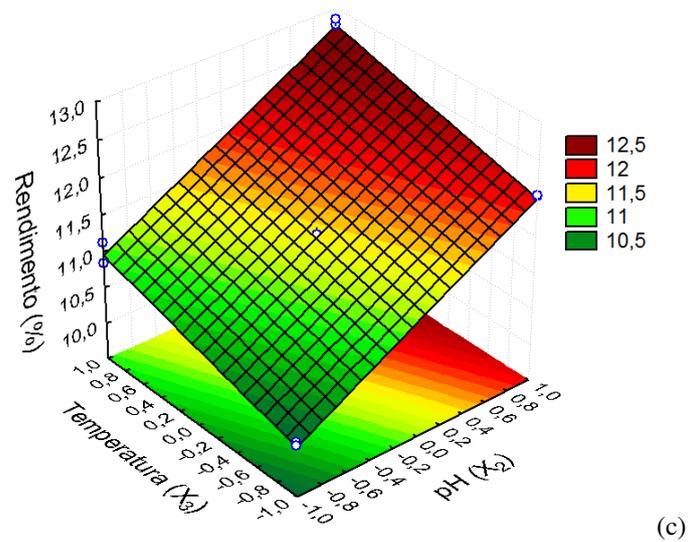
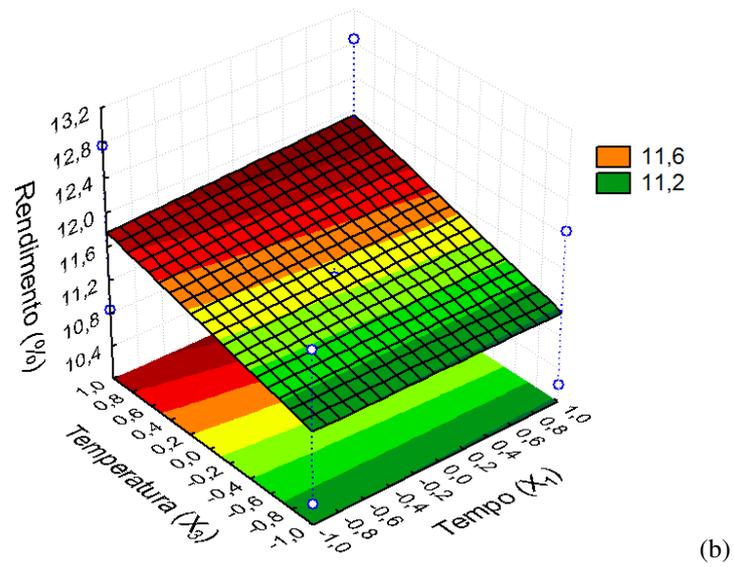
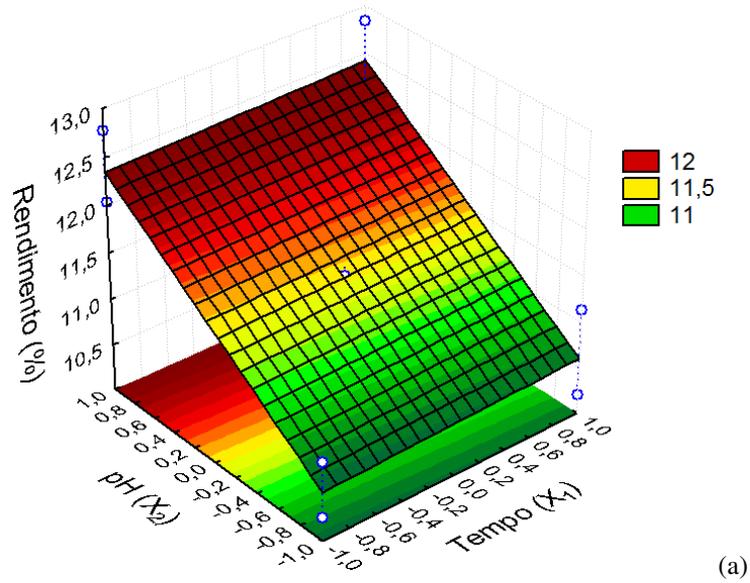


Figura 4.7 – Superfícies de resposta para o rendimento na extração alcalina

Na Figura 4.7 (a) é possível observar a relação entre variáveis independentes e valor de resposta através de gráficos tridimensionais de superfície. Duas variáveis foram retratadas, tempo e pH, enquanto a terceira variável foi mantida. Observou-se que o rendimento de extração aumentava à medida que o pH aumentava, sem grande influência do tempo. Uma possível razão poderia ser que as proteínas extraídas a pH alcalinos apresentam uma preponderância de espécies carregadas negativamente devido à ionização dos grupos carboxílicos e à desprotonação dos grupos amina, o que faz com que a interação proteína-solvente aumente, uma vez que a repulsão eletrostática resultante entre as proteínas facilita sua separação, bem como incentiva sua interação com o solvente, facilitando assim a extração em pH elevados (KINSELLA; PHILLIPS, 1989; LAWAL, 2004). Resultados semelhantes foram obtidos por Tecson et al. (1971), ao extraírem 98% da fração glutelina do endosperma do arroz em pH 11,8 e apresentando redução drástica da solubilidade dessa fração em pH abaixo de 10,0. Theerakulkait et al. (2006) verificaram que o emprego de valor mais elevado de pH foi benéfico para o rendimento de extração em ensaios preliminares de extração de proteína do farelo de arroz. Jiamyangyuen et al. (2005) também obtiveram aumento no rendimento de extração ao extraírem proteína do farelo de arroz em diferentes valores de pH, chegando a 9,6% de rendimento de extração para pH 9,5 e 58 minutos. Vieira et al. (2008) avaliaram rendimento de extração em farinha de arroz para pH 9,5, 10,5 e 11 e observaram maiores rendimentos de extração à medida que o pH aumentava. Bora e Ribeiro (2004) também obtiveram maiores rendimentos de extração de extratos proteicos de macadâmia (*Macadamia integrifolia*) para pH mais elevados.

Para a Figura 4.7 (b), avaliou-se as variáveis tempo e temperatura. Foi possível observar que um aumento na temperatura gerou um aumento no rendimento de extração, enquanto a variável tempo resultou em pouca influência. O menor rendimento para temperaturas mais baixas possivelmente se deve ao fato de que o aquecimento foi insuficiente para a extração proteica. Com o aumento da temperatura, as moléculas começaram a se mover mais rapidamente e a taxa de transferência de massa da interface entre sólido e líquido aumentou. Assim, o aumento da temperatura promoveu maior transferência de massa e solubilidade, reduziu a viscosidade da solução e assim aumentou a taxa de extração (BIRD et al., 1976). Porém, temperaturas muito elevadas foram evitadas pois podem causar a desnaturação térmica das proteínas, a qual está na faixa de 75 a 95 °C (SGARBIERI, 1996) e ainda atingir a temperatura de gelatinização do amido do arroz, que está na faixa de 61 a 77 °C (BOBBIO; BOBBIO, 1992), uma

vez que parte das proteínas ligadas às moléculas de amido poderiam estar inacessível para a extração (CHRASIL, 1992). Resultados semelhantes foram observados por Kumoro et al. (2010) uma vez que alcançaram valores crescentes de rendimento de extração de proteína de resíduos ósseos de galinha ao analisarem a temperatura do sistema em 30, 55 e 80 °C. Batista (1999) também obteve similares resultados na extração de proteína dos resíduos ósseos dos peixes.

Para a Figura 4.7 (c), verifica-se que a influência da temperatura e do pH no rendimento de extração são diretamente proporcionais entre si, uma vez que tanto o aumento da temperatura quanto o aumento do pH geram um maior rendimento de extração. Resultado semelhante foi observado por Usman et al. (2014), ao avaliarem os efeitos da temperatura, pH e tempo de imersão na extração de amido do arroz paquistanês. Jarpa-Parra et al. (2014) obtiveram aumento do rendimento de extração ao avaliarem valores crescentes de pH alcalinos para a obtenção de proteína de lentilha. Nas condições ótimas do processo (pH 9,0 e razão sólido/solvente de 1:10 m/v), alcançaram rendimento de 14,5 g de extrato proteico/100 g de farinha com teor de proteína de 82 g/100 g (22 °C) após 1 h de extração.

A análise dos efeitos principais e de suas interações para um limite de confiança de 95 % ($p < 0,05$) estão representados na Tabela 4.11, em que o teor de proteína no material extraído é a variável resposta, variando-se tempo (1), pH (2) e temperatura do sistema (3).

Tabela 4.11 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 90,27\%$) para o teor de proteína na extração alcalina.

<i>Fator</i>	<i>Efeito</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Valor de p*</i>	<i>-95% Limite de Confiança</i>	<i>+95% Limite de Confiança</i>
Média/Interações	73,3800	0,1750	0,0000	72,6270	74,1330
(1) Tempo (min)	1,7618	0,4104	0,0502	-0,0041	3,5276
(2) pH	3,5802	0,4104	0,0129	1,8144	5,3461
(3) Temperatura (°C)	2,1062	0,4104	0,0359	0,3404	3,8721
(1) e (2)	-1,8932	0,4104	0,0439	-3,6591	-0,1274
(1) e (3)	-0,9812	0,4104	0,1393	-2,7471	0,7846
(2) e (3)	-1,9618	0,4104	0,0411	-3,7276	-0,1959

Valor de p: probabilidade de significância

Os efeitos padronizados estão ilustrados no gráfico de Pareto por meio da Figura 4.8.

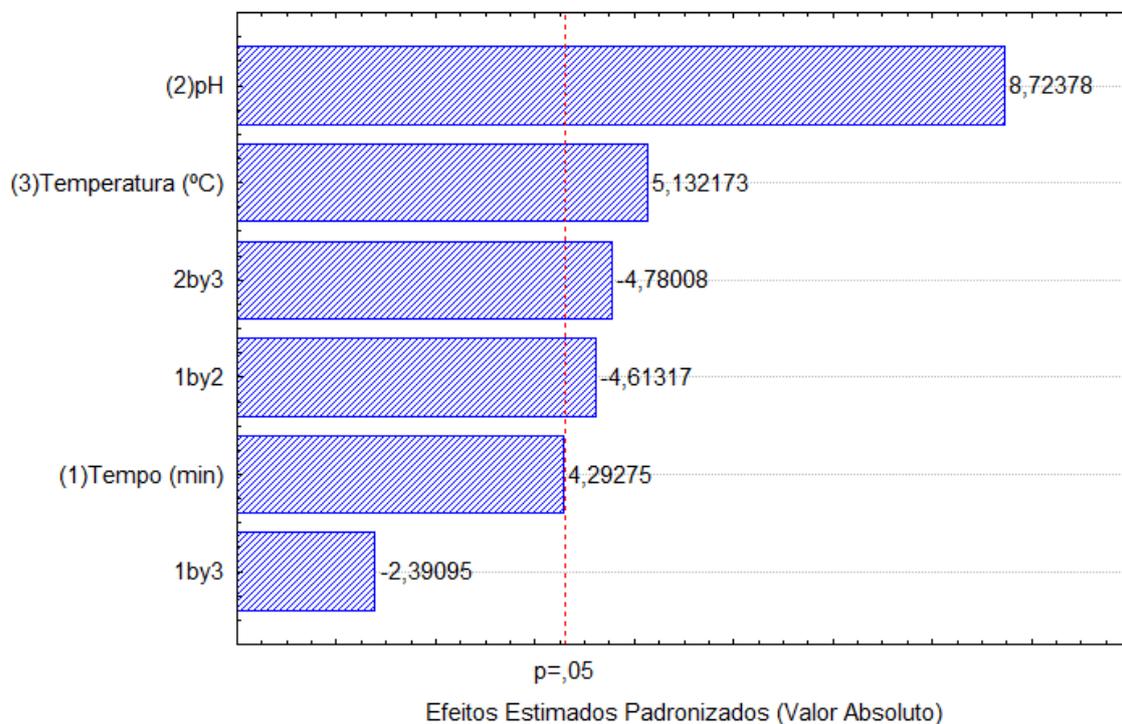


Figura 4.8 – Diagrama de Pareto do teor de proteína da extração alcalina

Observando-se os resultados de valor de p contidos na Tabela 4.11, se verifica que as variáveis isoladas pH e temperatura e as interações entre pH e temperatura (2 e 3) e entre tempo e pH (1 e 2) exibem probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$), apresentando significância estatística. Através do gráfico da Figura 4.8, confirma-se que as variáveis pH, temperatura e tempo foram significativos a 95% de confiança, visto que as respostas aparecem à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula. As variáveis pH e temperatura exercem efeito positivo, indicando que ocorre um aumento do rendimento quando se altera as mesmas de um nível inferior para um superior. As interações entre pH e temperatura (2 e 3) e entre tempo e pH (1 e 2) também foram significativas, porém com efeito negativo, sugerindo que ocorre uma redução do rendimento quando se altera as mesmas de um nível inferior para um superior.

A significância do modelo estatístico foi verificada através da análise de variância (ANOVA), conforme apresentado na Tabela 4.12. Para a construção do modelo, todos os fatores foram considerados.

Tabela 4.12 - Análise de variância para o teor de proteína na extração alcalina

	<i>Soma</i> <i>Quadrática</i>	<i>Graus de</i> <i>Liberdade</i>	<i>Média</i> <i>Quadrática</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>F_{tabelado}</i>
Regressão	57,508	6	9,585	6,185	6,163
Resíduos	6,198	4	6,198		
Falta de Ajuste	5,524	2	2,762	8,200	19,00
Erro Puro	0,674	2	0,337		
Total	63,706				

O modelo empírico proposto para estimar o teor de proteína através do método alcalino ($Y_{Al,T}$), como uma função de parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$), em variáveis codificadas, com o valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9027 pode ser observado na Equação 4.2.

$$Y_{Al,T} = 73,38000 + 0,88088X_1 + 1,79012X_2 + 1,05312X_3 - 0,94662X_1X_2 - 0,49062X_1X_3 - 0,98087X_2X_3 \quad (4.2)$$

Em que: X_1 = variável codificada correspondente ao tempo (min)

X_2 = variável codificada correspondente ao pH

X_3 = variável codificada correspondente à temperatura ($^{\circ}C$).

Observando-se os dados da Tabela 4.11, verifica-se que o $F_{calculado}$ para a regressão é maior que o $F_{tabelado}$, indicando que o modelo é significativo a 95% de confiança. Em relação à falta de ajuste, verifica-se que o $F_{calculado}$ é menor que o $F_{tabelado}$, indicando que o modelo é preditivo a 95% de confiança.

Para a confirmação do bom ajuste desses modelos foram construídos gráficos de valores preditos pelo modelo empírico *versus* valores observados experimentalmente, e o gráfico da distribuição dos resíduos, conforme mostrado nas Figuras 4.9 e 4.10.

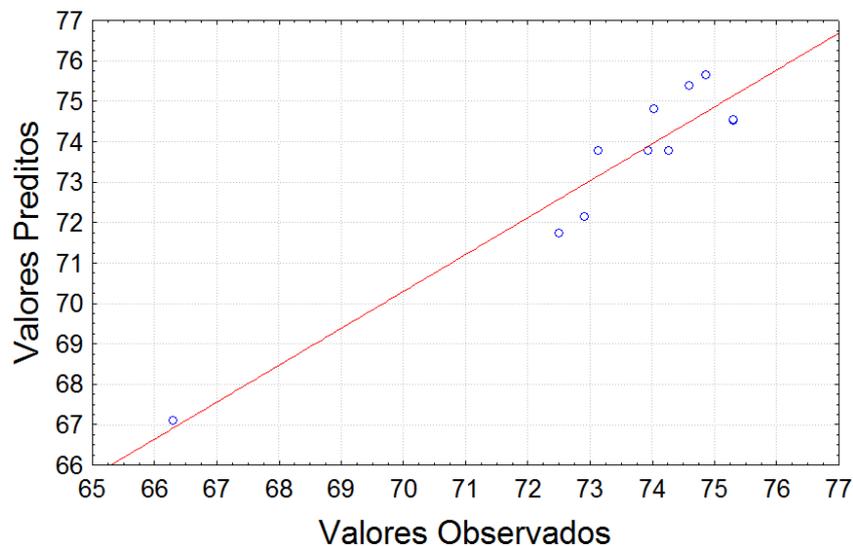


Figura 4.9 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta teor de proteína por extração alcalina.

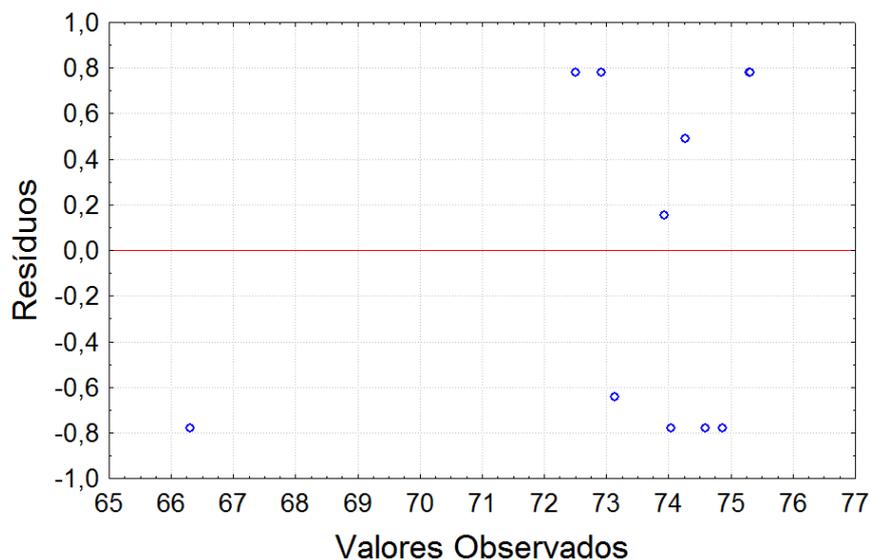


Figura 4.10 – Distribuição dos resíduos para o teor de proteína na extração alcalina

Na Figura 4.9 tem-se a confirmação dos resultados da ANOVA. Pode-se observar a comparação entre os valores experimentais observados e os preditos pelo modelo empírico, onde se verifica proximidade entre os valores preditos e observados, uma distribuição aleatória em torno da reta, confirmando a validade do modelo e um adequado ajuste. A Figura 4.10 apresenta a distribuição dos resíduos da eficiência do processo, onde se observa a distribuição aleatória em torno de zero, o que valida a análise estatística realizada.

Assim, os gráficos de superfície de resposta foram gerados e estão representados nas Figuras 4.11 (a), (b) e (c), com o auxílio do software Statistica v. 7.0.

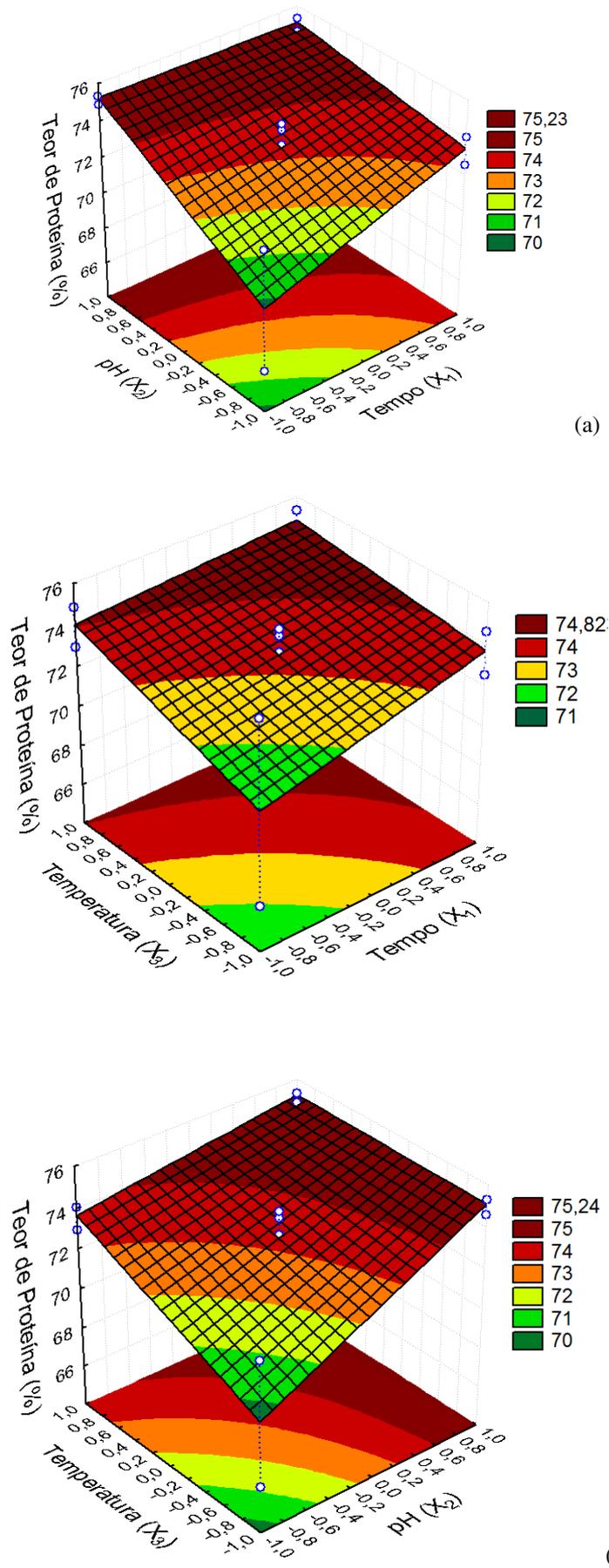


Figura 4.11 – Superfícies de resposta para o teor de proteína na extração alcalina

Observando-se a Figura 4.11 (a), verifica-se que o teor de proteína dos extratos aumenta à medida que se aumenta o pH, sem grande influência do tempo de reação. Tal fato pode ser atribuído a uma maior solubilização da fração glutelina que é solúvel em álcali, a qual corresponde à maior parte das proteínas do arroz e segunda maior parte das proteínas do farelo do arroz, sendo menor apenas que a fração de albumina, a qual é solúvel em água (JULIANO, 1993; SGARBIERI, 1996; HAMADA, 1997). Similares resultados foram relatados por Rhee et al. (1973), ao extraírem isolados proteicos e óleo de amendoim. Jiamyangyuen et al. (2005) ao extraírem proteína do farelo de arroz com pH variando entre 2 e 12 obtiveram crescimento linear de teores de proteína com o aumento do pH, com exceção do pH 12; Chen e Houston (1970) também obtiveram resultados similares ao extraírem proteína de farelo de arroz desengordurado. A redução no teor de proteína no maior pH se deve possivelmente à extração de nitrogênio não proteico, que solubilizam e contribuem para a qualidade e pureza das proteínas no pH 12 (JIAMYANGYUEN et al., 2005).

Na Figura 4.11 (b), observa-se que um aumento da temperatura resultou em aumento do teor de proteína no material extraído, sem grande influência do tempo de processo. Esse fato pode ser associado a propriedades intrínsecas ou a condições ambientais do farelo, tais como a localização celular da proteína ou a sua ligação a outros componentes, a qual é atingida mais facilmente com temperaturas mais elevadas, facilitando assim a liberação da proteína (CHEN; HOUSTON, 1970).

Na Figura 4.11 (c), afirma-se mais uma vez a influência positiva da temperatura e do pH no teor de proteína extraído, uma vez que tanto o aumento da temperatura quanto o aumento do pH geram maior teor de proteína no extrato.

4.5 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Os valores de rendimento de extração e teor de proteína obtidos através da extração assistida por ultrassom, avaliando-se as variáveis tempo de processo, pH e potência de ultrassom emitida estão apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Matriz do planejamento de experimentos e valores de rendimento de extração e teor de proteína no material extraído para a UAE

<i>Ensaio</i>	<i>Valores das Variáveis</i>			<i>Variáveis Resposta</i>	
	<i>Tempo (X₁) (min)</i>	<i>pH (X₂)</i>	<i>Potência (X₃) (W)</i>	<i>Rendimento de Extração (%)</i>	<i>Teor de Proteína (%)</i>
U1	5 (-1)	9 (-1)	180 (-1)	11,84	75,56
U2	15 (+1)	9 (-1)	180 (-1)	12,28	76,50
U3	5 (-1)	11 (+1)	180 (-1)	12,39	77,43
U4	15 (+1)	11 (+1)	180 (-1)	12,89	76,62
U5	5 (-1)	9 (-1)	300 (+1)	13,37	77,11
U6	15 (+1)	9 (-1)	300 (+1)	14,00	78,14
U7	5 (-1)	11 (+1)	300 (+1)	14,26	79,57
U8	15 (+1)	11 (+1)	300 (+1)	15,13	79,75
9(PC)	10 (0)	10 (0)	240 (0)	13,26	78,82
10(PC)	10 (0)	10 (0)	240 (0)	13,16	78,98
11(PC)	10 (0)	10 (0)	240 (0)	12,98	78,20

Analisando-se os dados da Tabela 4.13, se observa boa reprodutibilidade no ponto central, com valores de desvio padrão de 0,14 para o rendimento e 0,42 para o teor de proteína. Os valores de rendimentos de extração variando na faixa de 11,84 a 15,13% e valores de teor de proteína na faixa de 75,56 até 79,75%. Melhores resultados de rendimento também foram observados por Dordevic e Antov (2017), ao realizarem UAE em sistema aquoso de duas fases para a extração integrada e separação de antioxidantes de palha de trigo obtiveram aumento de 2 vezes do rendimento de extração de açúcares redutores com água como solvente de extração aumento de 2 e 1,3 vezes nas atividades antioxidantes em extratos obtidos com água e solução aquosa-etanol. Preece et al. (2017) observou um aumento nos rendimentos de extração de proteína de 11% e 12% de soja e okara para tratamentos de ultrassom (20 kHz, 1 min, 50 ° C), respectivamente. Kadam et al. (2017), ao extraírem proteínas de algas marrons irlandesas (*Ascophyllum nodosum*) obtiveram aumento mínimo no rendimento de extração de 27% utilizando pré-tratamento com ultrassom a 750 W e 10 min, quando comparado com a extração alcalina convencional.

A análise dos efeitos principais e de suas interações para um limite de confiança de 95 % ($p < 0,05$) estão representados na Tabela 4.14, em que o rendimento de extração é a variável resposta, variando-se tempo (1), pH (2) e potência (3).

Tabela 4.14 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 99,06\%$) para o rendimento na UAE

<i>Fator</i>	<i>Efeito</i>	<i>Erro Puro</i>	<i>Valor de p^*</i>	<i>-95% Limite de Confiança</i>	<i>+95% Limite de Confiança</i>
Média/Interações	13,2324	0,0428	0,0000	13,0480	13,4167
(1) Tempo (min)	0,6108	0,1005	0,0260	0,1785	1,0430
(2) pH	0,7998	0,1005	0,0154	0,3675	1,2320
(3) Potência (W)	1,8402	0,1005	0,0030	1,4080	2,2725
(1) e (2)	0,0728	0,1005	0,5442	-0,35950	0,5050
(1) e (3)	0,1412	0,1005	0,2949	-0,2910	0,5735
(2) e (3)	0,2152	0,1005	0,1654	-0,2170	0,6475

Valor de p: probabilidade de significância

Os efeitos padronizados estão ilustrados no gráfico de Pareto por meio da Figura 4.12.

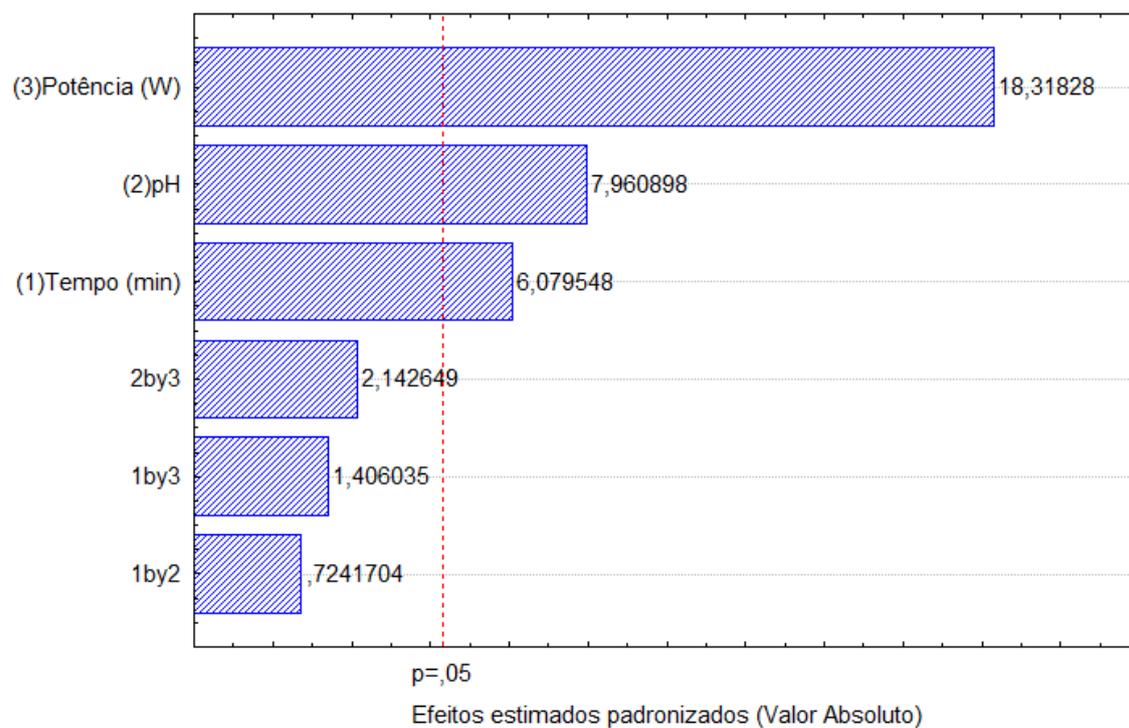


Figura 4.12 – Diagrama de Pareto do rendimento de extração da UAE

Através dos dados da Tabela 4.14, se observa que as três variáveis independentes possuem significância estatística, uma vez que apresentaram Valor de p com probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$). Na Figura 4.12 se confirma tal resultado, pois as variáveis tempo, pH e potência aparecem à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula, para a qual os efeitos das fontes de variação são nulos, sendo significativas a 95% de confiança. Observa-se ainda que todos os efeitos exercidos foram positivos, indicando que um aumento do rendimento é conseguido quando se muda as três variáveis avaliadas de um nível inferior para um superior.

Para avaliar a significância do modelo estatístico, foi realizada a análise de variância (ANOVA), os valores de F de Fisher calculados e tabelados para a regressão e os resíduos, bem como para a falta de ajuste e o erro puro foram obtidos. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.15. Para a construção do modelo, todos os fatores foram considerados.

Tabela 4.15 - Análise de variância para o rendimento na UAE

	<i>Soma</i> <i>Quadrática</i>	<i>Graus de</i> <i>Liberdade</i>	<i>Média</i> <i>Quadrática</i>	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$
Regressão	8,941	6	1,490	70,116	6,163
Resíduos	0,085	4	0,021		
Falta de Ajuste	0,045	2	0,022	1,106	19,00
Erro Puro	0,040	2	0,020		
Total	9,026				

O modelo empírico proposto para o rendimento de extração através do método assistido por ultrassom ($Y_{U,R}$), como uma função de parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$), em variáveis codificadas, com o valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9906 pode ser observado na Equação 4.3.

$$Y_{U,R} = 13,23236 + 0,30537X_1 + 0,39987X_2 + 0,92012X_3 + 0,03638X_1X_2 + 0,07063X_1X_3 + 0,10762X_2X_3 \quad (4.3)$$

Em que: X_1 = variável codificada correspondente ao tempo (min)

X_2 = variável codificada correspondente ao pH

X_3 = variável codificada correspondente à potência (W).

Através dos dados da Tabela 4.15, é possível observar que o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão é maior que o F_{tabelado} , sugerindo que o modelo é significativo a 95% de confiança. Para a falta de ajuste, se observa que o $F_{\text{calculado}}$ é menor que o F_{tabelado} , indicando que o modelo é preditivo a 95% de confiança.

A fim de confirmar o bom ajuste dos modelos, foram construídos gráficos de valores preditos pelo modelo empírico *versus* valores observados experimentalmente, bem como o gráfico da distribuição dos resíduos, que estão representados nas Figuras 4.13 e 4.14.

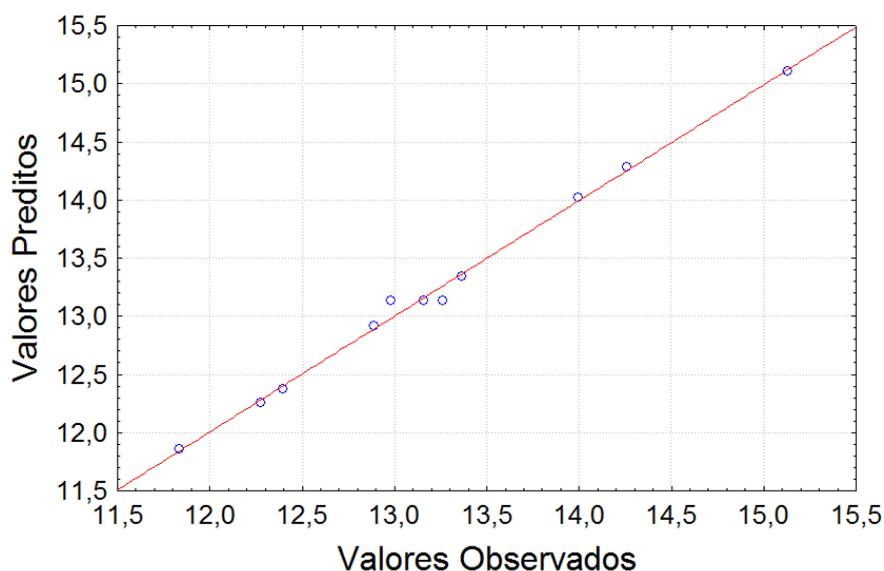


Figura 4.13 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta rendimento de extração por UAE.

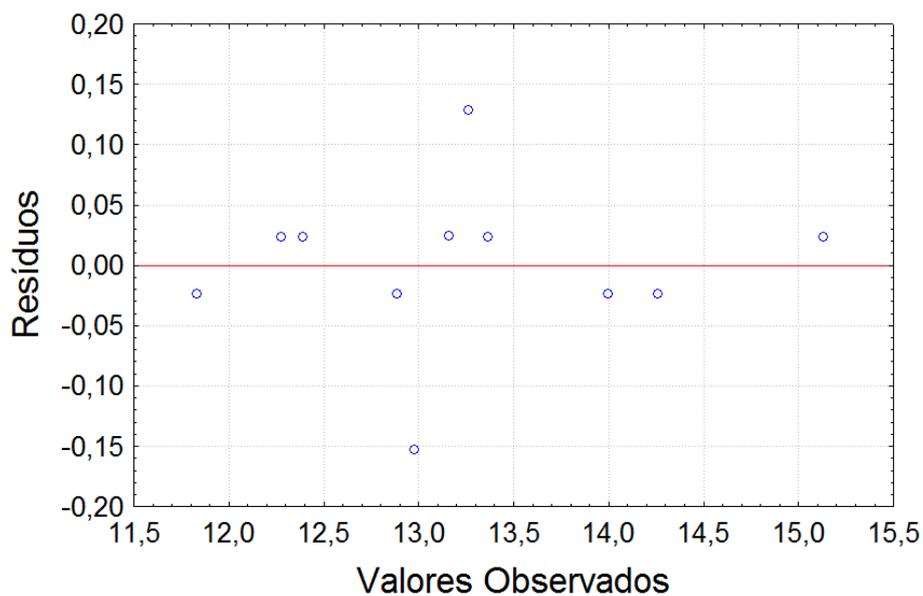


Figura 4.14 – Distribuição dos resíduos para o rendimento na UAE

Através da análise da Figura 4.13 se verifica uma distribuição aleatória dos valores experimentais e preditos pelo modelo empírico em torno da reta, com valores preditos próximos aos observados, confirmando a validade do modelo e um adequado ajuste, corroborando com os resultados da ANOVA. Na Figura 4.14, a qual representa a distribuição dos resíduos da eficiência do processo, se verifica uma distribuição aleatória dos dados em torno de zero, validando a análise estatística realizada.

Os gráficos de superfície de resposta estão representados nas Figuras 4.15 (a), (b) e (c), com o auxílio do software Statistica v. 7.0.

Na Figura 4.15 (a) é mostrada a relação entre pH e tempo de sonicação. Foi verificado que tanto um aumento do pH quanto do tempo de processo acarretou em um aumento do rendimento de extração. Sabe-se que o efeito do pH é de extrema importância em processos de extração, uma vez que a solubilidade dos compostos é diretamente dependente de suas variações. Assim, valores maiores de pH alteram a carga líquida das proteínas, causando repulsão eletrostática e o rompimento de algumas ligações de hidrogênio, desestabilizando-as (NELSON; COX, 2014), facilitando a extração da proteína. O aumento do tempo do processo possibilita que essa maior interação entre solvente e farelo ocorra por mais tempo, permitindo que maiores quantidades de proteína sejam extraídas. Resultados semelhantes foram observados por Hemwimol et al (2006), que verificaram que a porcentagem de extração de antraquinonas de raízes de *Morinda citrifolia* aumentou com o aumento da duração do tempo de processo de extração assistida por ultrassom. Ochoa-Rivas et al. (2017) obtiveram maiores rendimentos de extração de proteína de farinha de amendoim para tempos maiores de extração assistida por ultrassom.

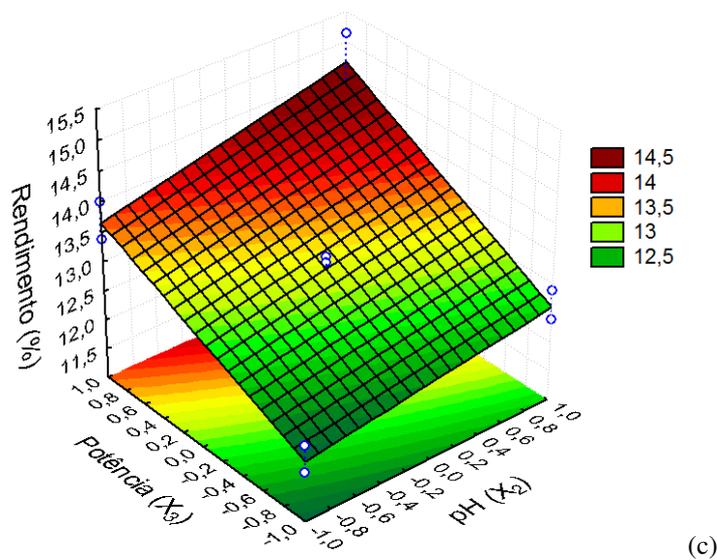
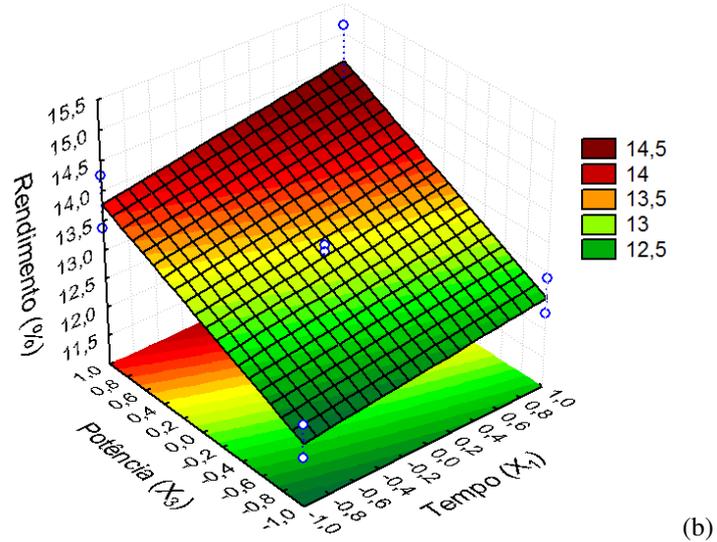
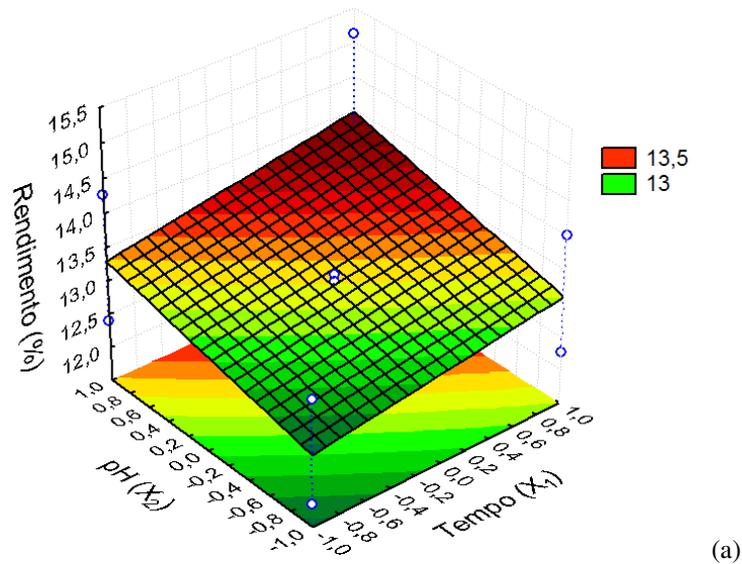


Figura 4.15 – Superfícies de resposta para o rendimento na UAE

Na Figura 4.15 (b) foi retratada a relação entre as variáveis potência de ultrassom e tempo. Foi possível verificar que o rendimento de extração aumentava à medida que se aumentava tanto a potência quanto o tempo de sonicação. Esse fato pode ser explicado pelo efeito cavitacional, uma vez que é gerado o crescimento aparente e colapso de bolhas dentro do líquido, que se expandem durante a pressão negativa e implodem violentamente, promovendo ondas com energia de cisalhamento muito elevadas e turbulência (SUSLICK, 1988), causando a ruptura do tecido vegetal bem como uma boa penetração do solvente na matriz do tecido, favorecendo a interação entre o solvente e os tecidos do farelo de arroz e, conseqüentemente, aumentando a transferência de massa (HEMWIMOL et al., 2006). Após o rompimento das paredes celulares, maiores tempos de sonicação permitem um maior contato entre o solvente e o farelo de arroz, permitindo uma maior e mais fácil extração da proteína. Resultados semelhantes foram observados por Karki et al. (2010), ao avaliarem o efeito de pré-tratamento ultrassônico de flocos de soja desengordurados para a liberação de proteína e açúcar, uma vez que a liberação de proteína aumentou com o aumento do tempo de sonicação. Albillos et al. (2011), ao avaliarem as paredes celulares de flocos de soja desengordurados após a aplicação de potência de ultrassom através de microscopia eletrônica de varredura verificaram uma desintegração progressivamente maior com o aumento da amplitude e tempo de sonicação, observando que houve ruptura quase completa das células de flocos de soja desengordurados com grande quantidade de matéria celular fragmentada, conseguindo maiores rendimentos de extração de proteína de amêndoas. Chittapalo e Noomhorm (2009) obtiveram maiores rendimentos de extração de proteína de farelo de arroz desengordurado com maiores potências de ultrassom (40, 60, 80 e 100 W) em um tempo de 5 minutos, uma vez que alcançaram rendimento de extração de $4,45 \pm 0,27\%$ com potência de ultrassom de 100 W. Phongthai et al. (2017) ao avaliarem diferentes potências (250, 350 e 500 W) e o tempo de extração (10, 20 e 30 min) de proteína do farelo de arroz obtiveram maiores rendimentos de extração para 350 W e 20 min, alcançando rendimento de extração máximo de $4,73 \pm 0,03\%$, já para os níveis superiores houve redução no rendimento de extração, provavelmente devido à desnaturação de proteínas causada pelo efeito de cavitação. Assim, pode-se dizer que as condições avaliadas no presente trabalho foram satisfatórias, uma vez que resultaram em maiores rendimentos de extração e não causaram efeitos negativos no mesmo com o aumento da potência de ultrassom.

Na Figura 4.15 (c) se confirma mais uma vez a influência positiva das variáveis potência e pH, uma vez que tanto o aumento do pH quanto da potência de ultrassom emitida gerou maiores rendimentos de extração.

A análise dos efeitos principais e de suas interações para um limite de confiança de 95 % ($p < 0,05$) estão representados na Tabela 4.16, em que o teor de proteína do material extraído é a variável resposta, variando-se tempo (1), pH (2) e potência (3).

Tabela 4.16 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 83,57\%$) para o teor de proteína na UAE

<i>Fator</i>	<i>Efeito</i>	<i>Erro Puro</i>	<i>Valor de p^*</i>	<i>-95% Limite de Confiança</i>	<i>+95% Limite de Confiança</i>
Média/Interações	77,8787	0,1251	0,0000	77,3402	78,4171
(1) Tempo (min)	0,3348	0,2935	0,3722	-0,9280	1,5976
(2) pH	1,5164	0,2935	0,0355	0,2536	2,7792
(3) Potência (W)	2,1140	0,2935	0,0187	0,8512	3,3768
(1) e (2)	-0,6491	0,2935	0,1575	-1,9119	0,6137
(1) e (3)	0,2682	0,2935	0,4572	-0,9946	1,5310
(2) e (3)	0,5220	0,2935	0,2173	-0,7408	1,7848

Valor de p: probabilidade de significância

Os efeitos padronizados estão ilustrados no gráfico de Pareto por meio da Figura 4.16.

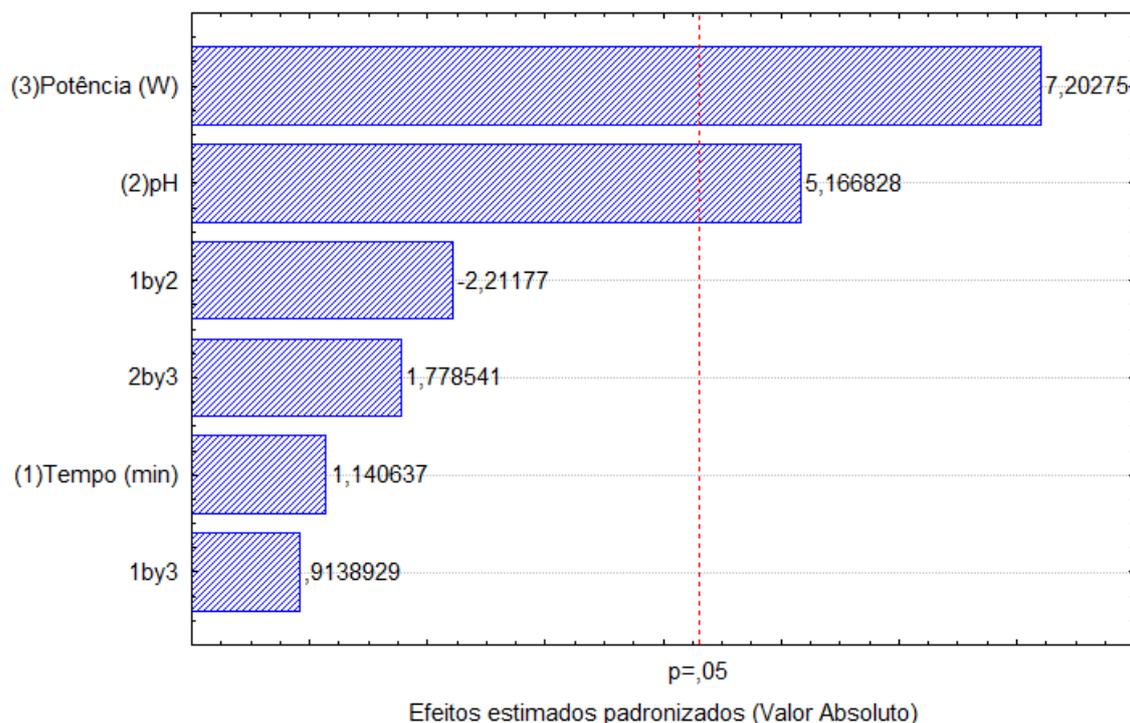


Figura 4.16 – Diagrama de Pareto do teor de proteína da UAE

Através dos dados da Tabela 4.16, se observa que as variáveis independentes potência e pH apresentam significância estatística, uma vez que apresentam probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$). No gráfico de Pareto da Figura 4.16 se confirma que as variáveis potência e pH foram significativas a 95%, uma vez que as mesmas estão à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula. Verifica-se ainda que os efeitos exercidos são positivos, pressupondo que um aumento do rendimento será alcançado ao se alterar tais variáveis de um nível inferior para um superior.

Para se avaliar a significância do modelo estatístico, foi realizada a análise de variância (ANOVA), verificados os valores de F de Fisher calculados e tabelados para a regressão e os resíduos, e também para a falta de ajuste e o erro puro. Os valores estão apresentados na Tabela 4.17.

Inicialmente, foi construído o modelo empírico com todos os fatores, porém, para se o mesmo fosse significativo, foi analisado o valor do R^2 ajustado à medida que se excluía os fatores menos significativo, conforme mostrado no gráfico de Pareto, sendo eles a interação (1 e 3), o tempo (t) e a interação (2 e 3).

Tabela 4.17 - Análise de variância para o teor de proteína na UAE

	<i>Soma</i> <i>Quadrática</i>	<i>Graus de</i> <i>Liberdade</i>	<i>Média</i> <i>Quadrática</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>F_{tabelado}</i>
Regressão	14,380	3	4,793	8,559	4,347
Resíduos	3,920	7	0,560		
Falta de Ajuste	3,576	5	0,715	4,151	19,296
Erro Puro	0,344	2	0,172		
Total	18,300				

O modelo empírico proposto para o teor de proteína através do método assistido por ultrassom ($Y_{U,T}$), como uma função de parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$), em variáveis codificadas, com o valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,7980 pode ser observado na Equação 4.4.

$$Y_{U,T} = 77,87867 + 0,16739X_1 + 0,75822X_2 + 1,05698X_3 - 0,32457X_1X_2 \quad (4.4)$$

Em que: X_1 = variável codificada correspondente ao tempo (min)

X_2 = variável codificada correspondente ao pH

X_3 = variável codificada correspondente à potência (W).

Verificando-se o valor de $F_{calculado}$ para a regressão na Tabela 4.17, se nota que o mesmo é maior que o $F_{tabelado}$, indicando que a 95% de confiança, o modelo é significativo. Em relação ao $F_{calculado}$ para a falta de ajuste, se verifica que o mesmo é menor que o $F_{tabelado}$, sugerindo que o modelo é preditivo a 95% de confiança.

Para a confirmação do bom ajuste desses modelos foram construídos gráficos de valores preditos pelo modelo empírico *versus* valores observados experimentalmente, e gráfico da distribuição dos resíduos, conforme mostrado nas Figuras 4.17 e 4.18.

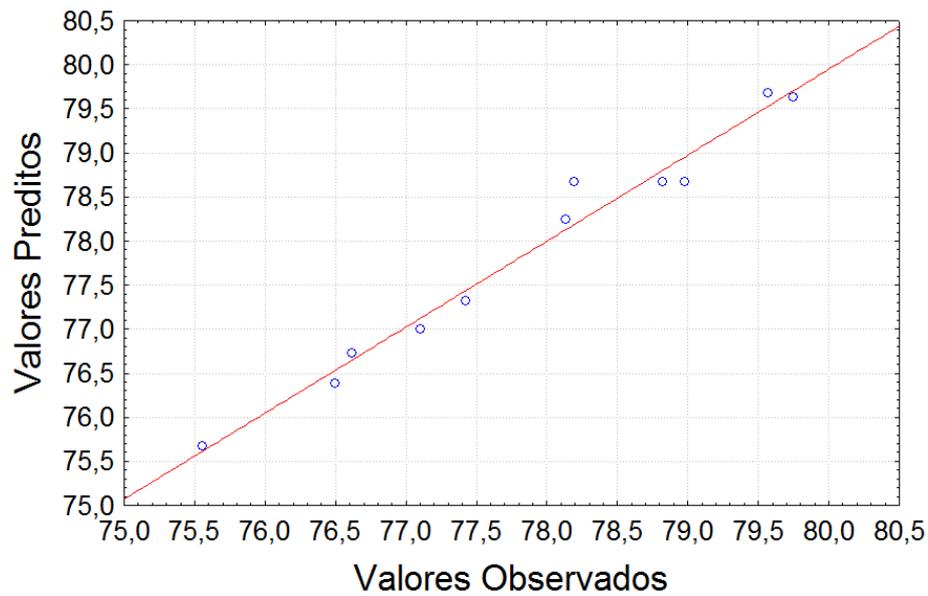


Figura 4.17 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta teor de proteína por UAE.

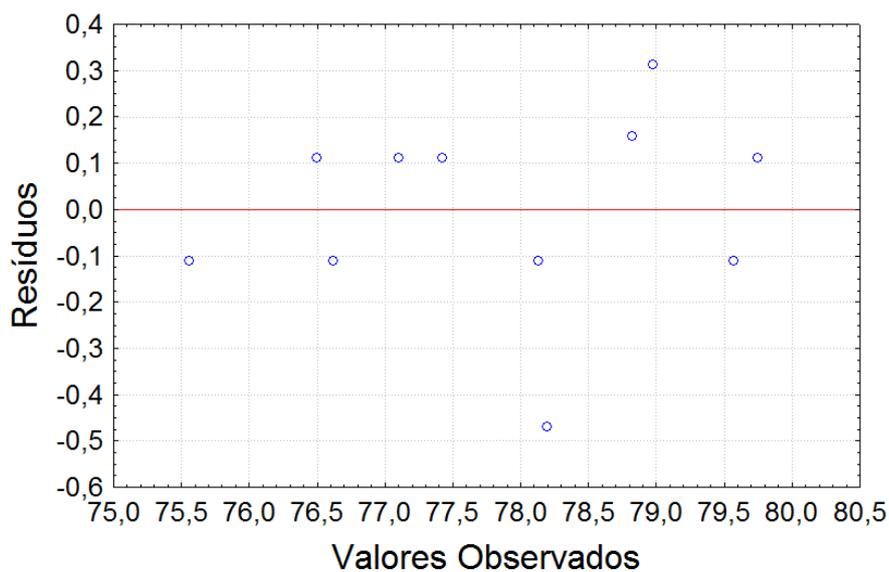
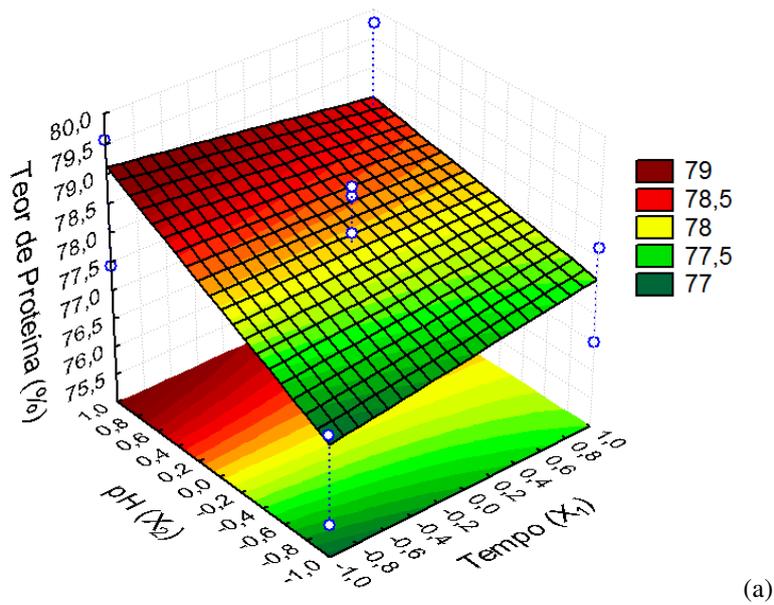


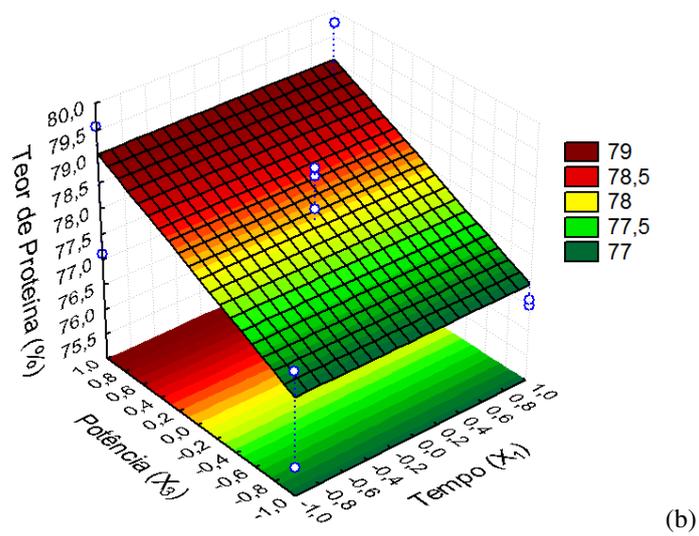
Figura 4.18 – Distribuição dos resíduos para o teor de proteína na UAE

Observando-se os valores experimentais e os preditos pelo modelo empírico na Figura 4.17, tem-se a confirmação dos resultados da ANOVA, uma vez que se verifica valores preditos próximos aos observados, e distribuição aleatória em torno da reta, confirmando a validade do modelo e um adequado ajuste. Para a distribuição dos resíduos da eficiência do processo na Figura 4.18, se verifica uma distribuição aleatória em torno de zero, validando a análise estatística realizada.

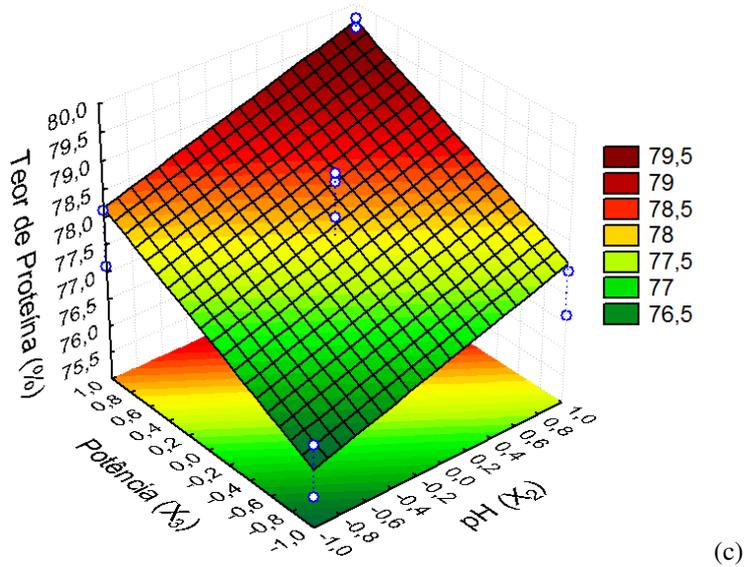
Os gráficos de superfície de resposta estão representados nas Figuras 4.19 (a), (b) e (c), com o auxílio do software Statística v. 7.0.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.19 – Superfícies de resposta para o teor de proteína na UAE

Através da Figura 4.19 (a) se verifica que o aumento do pH influenciou positivamente no aumento do teor de proteína, enquanto que a variação do tempo não apresentou influência. Tal fato pode ser atribuído à quebra de ligações entre a proteína e demais compostos do farelo de arroz, ocasionada pela alta alcalinidade do sistema, aumentando a pureza do extrato (SHIH et al., 1999). Oliveira et al. (2012), ao extraírem proteína de farelo de arroz por UAE em valores de pH de 8, 8,5 e 9 obtiveram teores de 31,07, 32,39 e 31,43%, respectivamente. Uma vez que tais valores foram muito próximos, foram sugeridos novos ensaios com valores mais elevados de pH, para então ser possível avaliar a influência do mesmo nos teores proteicos obtidos.

Na Figura 4.19 (b) se observa que o tempo não teve influência significativa sobre o teor de proteína extraído. Porém, a potência de ultrassom influenciou positivamente. Tal fato pode ser justificado pela maior solubilidade proteica gerada pela energia de ultrassom, a qual induz a cavitação e faz com que as proteínas sejam submetidas à ruptura física, ou ainda a transformação química, facilitando sua extração. Outra possível justificativa é que o material é aquecido por absorção específica de energia acústica, agitação dinâmica e tensões de cisalhamento e turbulência, favorecendo a liberação do extrato desejado (FLOROS; LIANG, 1994).

Na Figura 4.19 (c) se confirma a influência positiva dos parâmetros potência e pH, uma vez que foi atingido o maior teor de proteína nos ensaios assistidos por ultrassom. Resultados semelhantes foram obtidos por Amponsah e Nayak (2016), ao extraírem proteína de soja por UAE utilizando tampão de ureia, alcançando valores de concentração proteica de 12,78 e 14,25 mg/mL (66 e 73%) ao analisarem as temperaturas de 4 e 23 °C, respectivamente. Lopes et al. (2008), ao avaliarem sete diferentes extratos de proteína do arroz variando pH em 9, 10 e 12, obtiveram resultados semelhantes, com redução do teor de proteína a pH 12, possivelmente devido a outros compostos terem sido extraídos.

4.6 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Os valores de rendimento de extração e teor de proteína obtidos através da extração assistida por micro-ondas, avaliando-se as variáveis tempo de processo, pH e potência de ultrassom emitida estão apresentados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 – Matriz do planejamento de experimentos e valores de rendimento de extração e teor de proteína no material extraído para a MAE

<i>Ensaio</i>	<i>Valores das Variáveis</i>			<i>Variáveis Resposta</i>	
	<i>Tempo (X₁) (s)</i>	<i>pH (X₂)</i>	<i>Temperatura (X₃) (°C)</i>	<i>Rendimento de Extração (%)</i>	<i>Teor de Proteína (%)</i>
M1	60 (-1)	9 (-1)	30 (-1)	11,57	75,67
M2	120 (+1)	9 (-1)	30 (-1)	12,46	76,84
M3	60 (-1)	11 (+1)	30 (-1)	15,01	75,95
M4	120 (+1)	11 (+1)	30 (-1)	15,41	77,54
M5	60 (-1)	9 (-1)	55 (+1)	12,20	76,18
M6	120 (+1)	9 (-1)	55 (+1)	14,72	76,40
M7	60 (-1)	11 (+1)	55 (+1)	15,08	78,66
M8	120 (+1)	11 (+1)	55 (+1)	15,68	79,98
9(PC)	90 (0)	10 (0)	42,5 (0)	14,20	77,49
10(PC)	90 (0)	10 (0)	42,5 (0)	13,82	77,10
11(PC)	90 (0)	10 (0)	42,5 (0)	13,38	76,97

Através dos dados contidos na Tabela 4.18, se observa que o rendimento de extração variou na faixa de 11,57 até 15,68%, com desvio padrão nos pontos centrais de 0,18, enquanto que para o teor de proteína, o máximo valor obtido foi de 79,98% e o desvio padrão dos pontos centrais foi 0,27. Se observa ainda, boa reprodutibilidade dos pontos centrais. Choi et al. (2006) alcançaram rendimentos de extração de proteína solúvel de soja através de micro-ondas superiores aos obtidos em um sistema convencional, confirmando uma maior eficiência da técnica. Zekovic et al. (2017) obtiveram vantagens significativas para a recuperação de polifenóis de sálvia através de extração assistida por micro-ondas em comparação com métodos tradicionais, otimizando os parâmetros concentração de solvente, tempo de extração e razão entre sólido e líquido. Taamalli et al. (2012) realizaram a extração de compostos fenólicos de folhas de oliveira em um tempo de 6 min com maior eficiência quando comparado ao método convencional de extração por solvente, que necessitou de 24 h. Phongthai et al. (2016) ao extraírem proteína de farelo de arroz a 1000 W, com pH 10, por 90 s e razão sólido-líquido de 0,89 g de farelo/10 mL de água alcançaram teores de proteína de 71,27%.

A análise dos efeitos principais e de suas interações para um limite de confiança de 95 % ($p < 0,05$) estão representados na Tabela 4.19, em que o rendimento de extração é a variável resposta, variando-se tempo (1), pH (2) e temperatura (3).

Tabela 4.19 – Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 98,99\%$) para o rendimento na MAE

<i>Fator</i>	<i>Efeito</i>	<i>Erro Puro</i>	<i>Valor de p*</i>	<i>-95% Limite de Confiança</i>	<i>+95% Limite de Confiança</i>
Média/Interações	13,9641	0,0528	0,0000	13,7369	14,1914
(1) Tempo (s)	0,8893	0,1238	0,0188	0,3564	1,4222
(2) pH	2,7664	0,1238	0,0020	2,2335	3,2993
(3) Temperatura (°C)	0,5953	0,1238	0,0407	0,0624	1,1282
(1) e (2)	-0,3917	0,1238	0,0871	-0,9246	0,1412
(1) e (3)	0,2450	0,1238	0,1865	-0,2879	0,7779
(2) e (3)	-0,4257	0,1238	0,0752	-0,9586	0,1072

Valor de p: probabilidade de significância

Os efeitos padronizados estão ilustrados no gráfico de Pareto por meio da Figura 4.20.

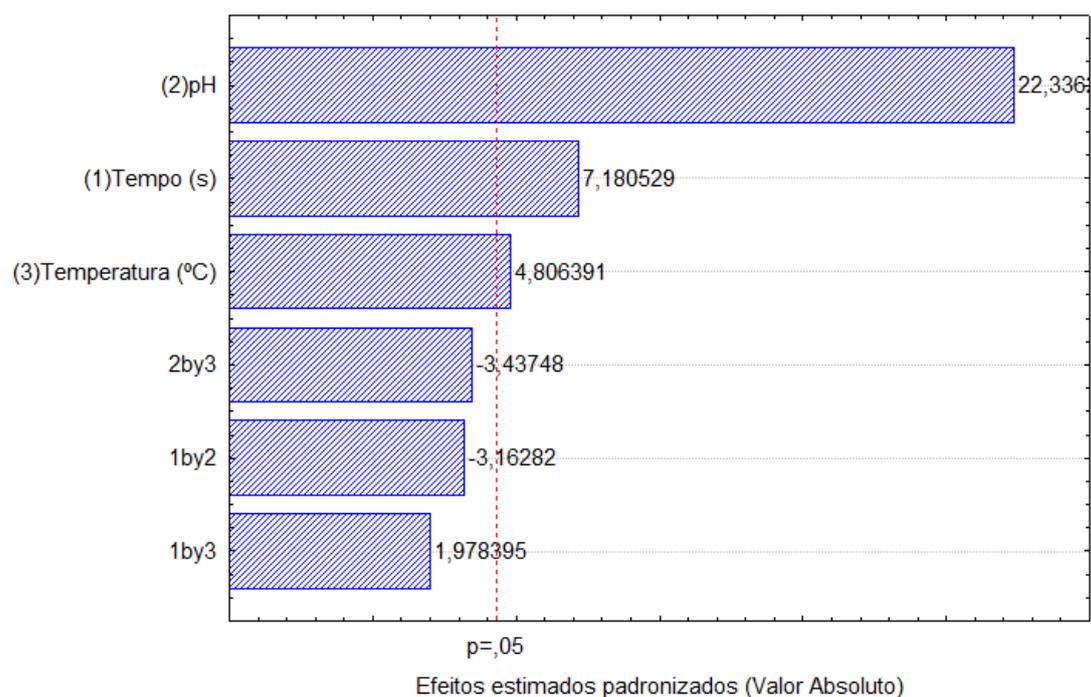


Figura 4.20 – Diagrama de Pareto do rendimento de extração da MAE

Observando-se a Tabela 4.19, se verifica que as três variáveis independentes possuem significância estatística, dispondo de Valor de p com probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$). Tal fato pode ser novamente observado na Figura 4.20, uma vez que as três variáveis independentes tempo, pH e temperatura se apresentam à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula, para a qual os efeitos das fontes de variação são nulos, sendo significativas a 95% de confiança. Verifica-se que os efeitos exercidos foram positivos, sugerindo que um aumento do rendimento é conseguido quando se muda as três variáveis avaliadas de um nível inferior para um superior.

A significância do modelo estatístico foi verificada através da análise de variância (ANOVA). Para tanto, os valores de F de Fisher calculados e tabelados para a regressão e os resíduos, e ainda para a falta de ajuste e o erro puro foram obtidos. Os resultados estão dispostos na Tabela 4.20. Todos os fatores foram considerados para a construção do modelo.

Tabela 4.20 - Análise de variância para o rendimento na MAE

	<i>Soma</i>	<i>Graus de</i>	<i>Média</i>		
	<i>Quadrática</i>	<i>Liberdade</i>	<i>Quadrática</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>F_{tabelado}</i>
Regressão	18,386	6	3,064	65,183	6,163
Resíduos	0,188	4	0,047		
Falta de Ajuste	0,127	2	0,127	2,065	19,00
Erro Puro	0,061	2	0,031		
Total	18,574				

A equação que representa o modelo empírico proposto para o rendimento de extração através do método assistido por micro-ondas ($Y_{M,R}$), como uma função de parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$), em variáveis codificadas, com o valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9899 está representada na Equação 4.5.

$$Y_{M,R} = 13,96413 + 0,44466X_1 + 1,38319X_2 + 0,29764X_3 - 0,19586X_1X_2 + 0,12251X_1X_3 - 0,21287X_2X_3 \quad (4.5)$$

Em que: X_1 = variável codificada correspondente ao tempo (s)

X_2 = variável codificada correspondente ao pH

X_3 = variável codificada correspondente à temperatura (°C).

Através dos dados da Tabela 4.20, se observa que a ANOVA demonstrou que o modelo foi significativo a 95% de confiança, como evidenciado pelos valores de regressão com $F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado} . Verificou-se também que o modelo é preditivo a 95% de confiança, pois o $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste é menor que o F_{tabelado} .

Gráficos de valores preditos pelo modelo empírico *versus* valores observados experimentalmente, bem como o gráfico da distribuição dos resíduos foram construídos como indicativos do bom ajuste dos modelos e estão representados nas Figuras 4.21 e 4.22.

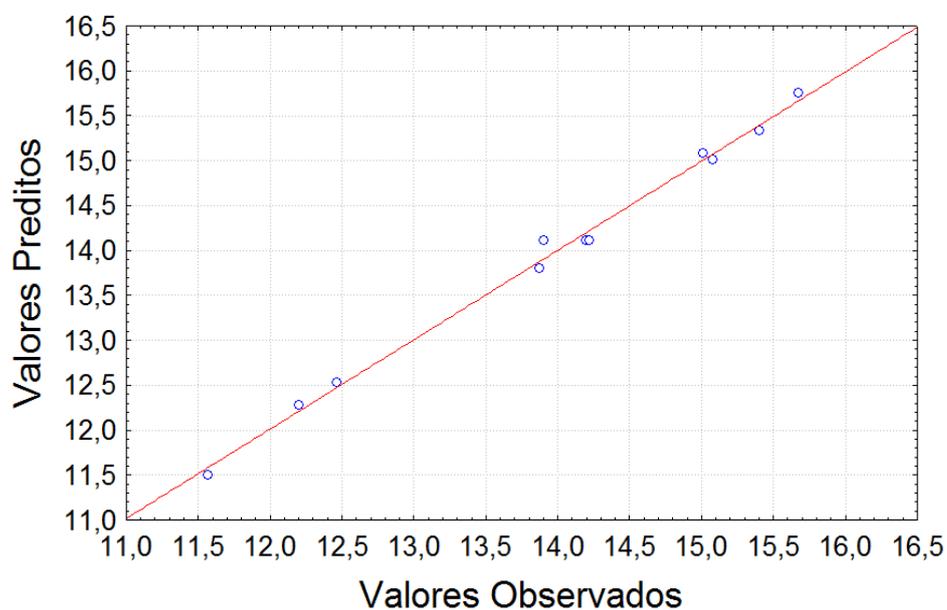


Figura 4.21 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta rendimento de extração por MAE.

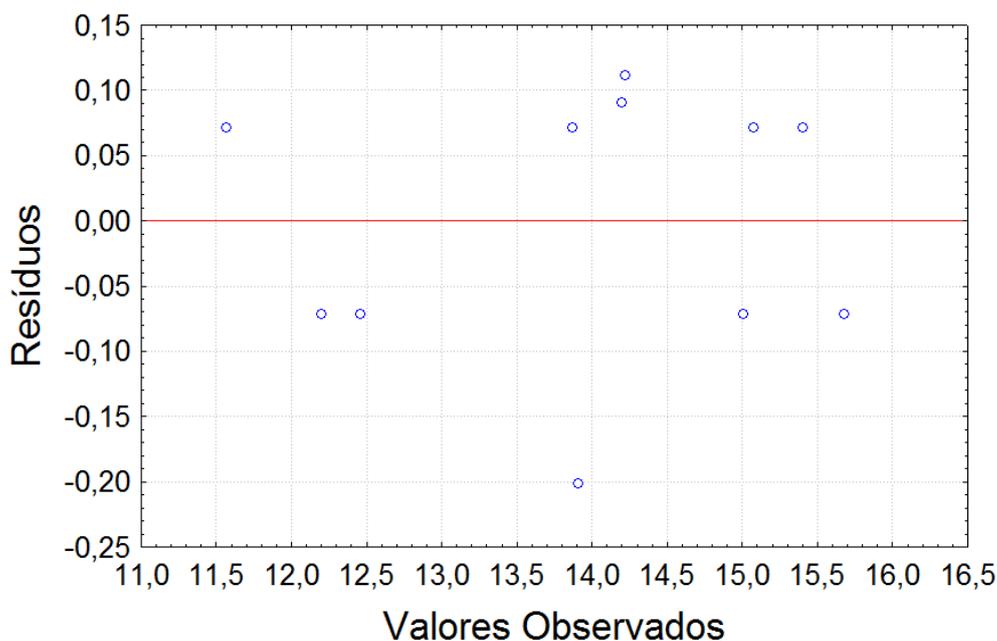
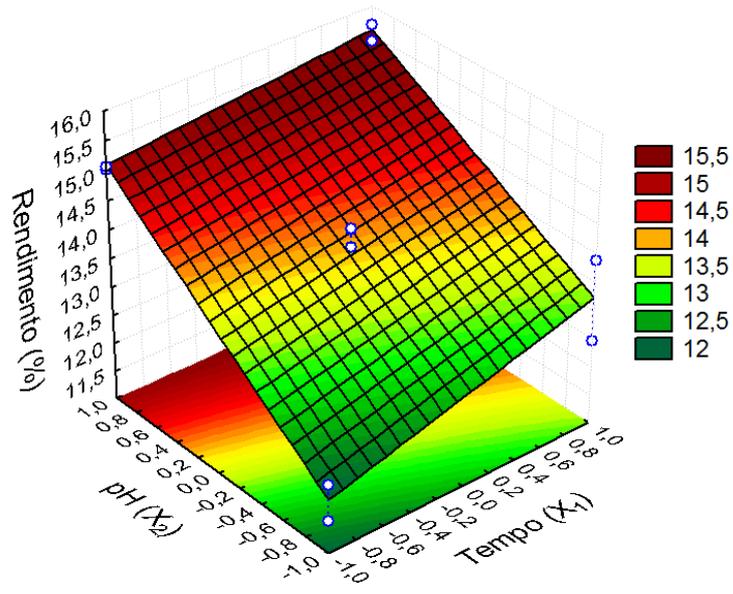


Figura 4.22 – Distribuição dos resíduos para o rendimento na MAE

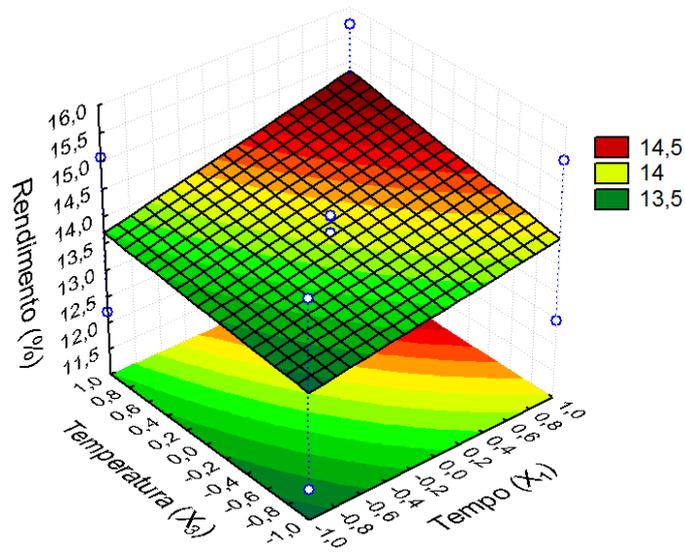
Na Figura 4.21 tem-se a confirmação dos resultados da ANOVA, uma vez que os valores preditos foram próximos aos observados, confirmando a validade do modelo e um adequado ajuste. A Figura 4.22 apresenta uma distribuição aleatória em torno de zero dos resíduos da eficiência do processo, o que valida a análise estatística realizada.

Os gráficos de superfície de resposta estão representados nas Figuras 4.23 (a), (b) e (c), com o auxílio do software Statistica v. 7.0.

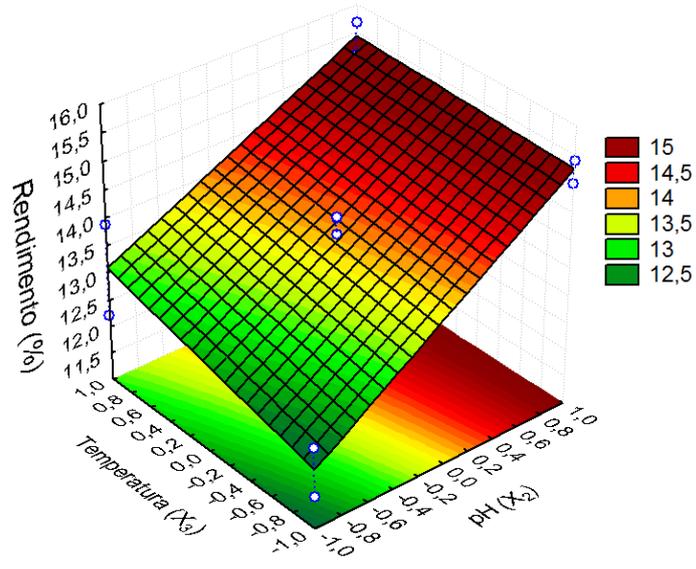
Figura 4.23 (a) se observa a influência positiva do pH e tempo de extração da proteína. Nota-se que o tempo utilizado na MAE é significativamente menor que o utilizado nas técnicas de extração anteriores, porém, igualmente eficiente. Uma provável explicação é que em métodos convencionais de aquecimento, utilizando a convecção e a condução, apenas a superfície do material é aquecida diretamente, sendo o aquecimento subsequente do material gerado por condução a partir da superfície. Para o aquecimento por micro-ondas, ocorre a geração direta de calor dentro do material por fricção entre moléculas polares como resultado da oscilação molecular em um campo elétrico que alterna rapidamente (BOURAOUI et al., 1993), facilitando o rompimento das paredes celulares e a liberação da proteína. Resultados semelhantes foram observados por Choi et al. (2006), que obtiveram maiores rendimentos de extração de proteína solúvel de soja por MAE através do aumento do tempo de processo.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.23 – Superfícies de resposta para o rendimento na MAE

Na Figura 4.23 (b) se verifica que tanto o aumento da temperatura quanto o aumento do tempo geraram maiores rendimentos de extração. Tal fato pode ser explicado pelo amolecimento dos tecidos do farelo ocasionado pelas maiores temperaturas, melhorando a taxa de difusão (MARAN; PRIYA, 2016), e reação de dissolução, facilitada pelas elevadas temperaturas, fornecendo energia para quebrar as ligações no sólido (LEFSIH et al., 2017). Assim, se observa um aumento do coeficiente de difusão efetivo da proteína solúvel, devido à ruptura das células do farelo de arroz, e o aumento da eficiência de extração (CHOI et al., 2006). Resultado semelhante foi observado por Phongthai et al. (2016), ao extraírem proteína de farelo de arroz orgânico cru da Tailândia, ao aumentarem o tempo de extração de 60 para 120 s, resultando em variação do rendimento de extração de $3,55 \pm 0,04\%$ para $4,08 \pm 0,00\%$, respectivamente. Porém, sabe-se que determinados fatores podem causar desnaturação proteica, assim, a escolha dos níveis das variáveis é de extrema importância. Amponsah e Nayak (2016), ao extraírem proteína de soja utilizando tampão fosfato-salino (PBS) reduziram seus valores significativamente de 10,40 mg/mL (53%) para 7,53 mg/mL (39%) à medida que a temperatura do MAE aumentou de 60 a 100 °C. Essa redução no rendimento de extração pode ser atribuída ao fato do tratamento térmico causar desnaturação e desdobramento das proteínas, levando à exposição superficial de grupos hidrofóbicos e sulfidrílicos localizados no interior da molécula. Tal fato pode resultar em agregação de proteínas irreversíveis e na formação de complexos covalentes levando a uma diminuição da solubilidade e extratabilidade da proteína (RENKEMA et al., 2000).

Na Figura 4.23 (c), se confirma a influência positiva do aumento de temperatura e tempo no processo de extração avaliado. Porém, deve-se tomar cuidado com tempos muito longos de emissão de micro-ondas. Bandyopadhyay et al. (2012), ao extrair proteínas de farinha de farelo de arroz desengordurado indiano através de MAE avaliaram os tempos de extração de 20, 30, 40, 60 e 90 segundos, sendo que seus melhores resultados foram alcançados com 40 segundos. Li et al. (2010), ao extraírem saponinas triterpênicas de resíduo desengordurado de *Xanthoceras sorbifolia* Bunge em intervalos de tempo de 3 a 11 minutos obtiveram melhores resultados com 7 minutos de processo, indicando que nem sempre longos tempos de extração são benéficos, uma vez que podem danificar o extrato desejado.

A análise dos efeitos principais e de suas interações para um limite de confiança de 95 % ($p < 0,05$) estão representados na Tabela 4.21, em que o teor de proteína do material extraído é a variável resposta, variando-se tempo (1), pH (2) e temperatura (3).

Tabela 4.21 - Análise estatística dos efeitos ($R^2 = 98,70\%$) para o teor de proteína na MAE

<i>Fator</i>	<i>Efeito</i>	<i>Erro Puro</i>	<i>Valor de p*</i>	<i>-95% Limite de Confiança</i>	<i>+95% Limite de Confiança</i>
Média/Interações	77,1603	0,0811	0,0000	76,8114	77,5091
(1) Tempo (s)	1,0733	0,1901	0,0300	0,2552	1,8914
(2) pH	1,7618	0,1901	0,0114	0,9436	2,5798
(3) Temperatura (°C)	1,3002	0,1901	0,0207	0,4821	2,1183
(1) e (2)	0,3838	0,1901	0,1810	-0,4343	1,2019
(1) e (3)	-0,3072	0,1901	0,2476	-1,1253	0,5109
(2) e (3)	1,2722	0,1901	0,0216	0,4541	2,0903

Valor de p: probabilidade de significância

Os efeitos padronizados estão ilustrados no gráfico de Pareto por meio da Figura 4.24.

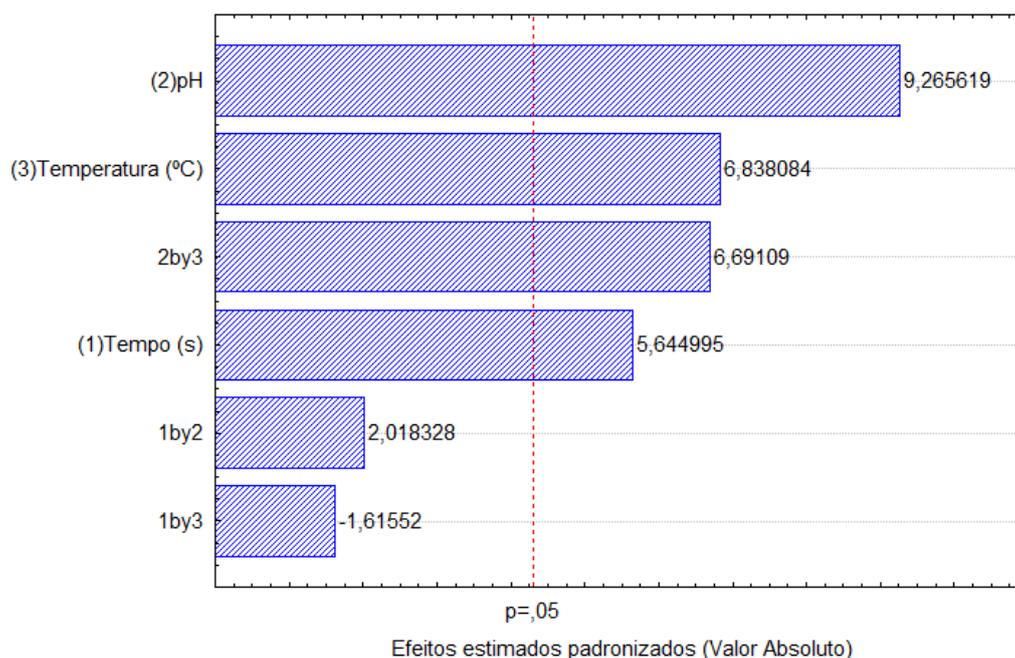


Figura 4.24 – Diagrama de Pareto do teor de proteína da MAE

Analisando os dados da Tabela 4.21, verifica-se que as três variáveis isoladas pH, temperatura e tempo, bem como a interação entre pH e temperatura (2 e 3) exibem probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$), apresentando significância estatística. Através do gráfico de Pareto da Figura 4.24, se confirma a significância a 95% de confiança das variáveis independentes e da interação (2 e 3), uma vez que as repostas aparecem à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula. Observa-se ainda que as mesmas exercem efeito positivo, indicando que ocorre um aumento do rendimento quando se altera as mesmas de um nível inferior para um superior.

A significância do modelo estatístico foi verificada através da análise de variância (ANOVA), sendo ainda obtidos os valores de F de Fisher calculados e tabelados para a regressão e os resíduos, bem como para a falta de ajuste e o erro puro. Tais resultados estão apresentados na Tabela 4.22. Para a construção do modelo, todos os fatores foram considerados.

Tabela 4.22 - Análise de variância para o teor de proteína na MAE

	<i>Soma</i>	<i>Graus de</i>	<i>Média</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>F_{tabelado}</i>
	<i>Quadrática</i>	<i>Liberdade</i>	<i>Quadrática</i>		
Regressão	15,613	6	2,602	50,544	6,163
Resíduos	0,020	4	0,051		
Falta de Ajuste	0,061	2	0,031	0,424	19,00
Erro Puro	0,145	2	0,072		
Total	15,819				

O modelo proposto para o teor de proteína através do método assistido por micro-ondas ($Y_{M,T}$), em variáveis codificadas, como uma função de parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$), com o valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9870 pode ser observado na Equação 4.6.

$$Y_{M,T} = 77,16026 + 0,53667X_1 + 0,88088X_2 + 0,65009X_3 + 0,19188X_1X_2 - 0,15359X_1X_3 + 0,63612X_2X_3 \quad (4.6)$$

Em que: X_1 = variável codificada correspondente ao tempo (s)

X_2 = variável codificada correspondente ao pH

X_3 = variável codificada correspondente à temperatura (°C).

Para a confirmação do bom ajuste desses modelos foram construídos gráficos de valores preditos pelo modelo empírico *versus* valores observados experimentalmente (Figura 4.25), e o gráfico da distribuição dos resíduos (Figura 4.26).

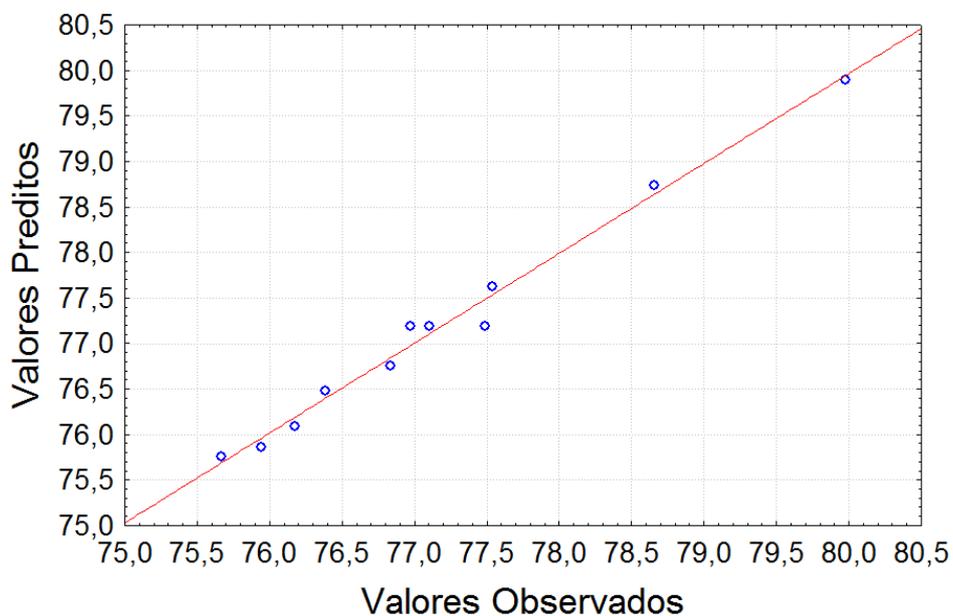


Figura 4.25 - Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo empírico para a resposta teor de proteína por MAE.

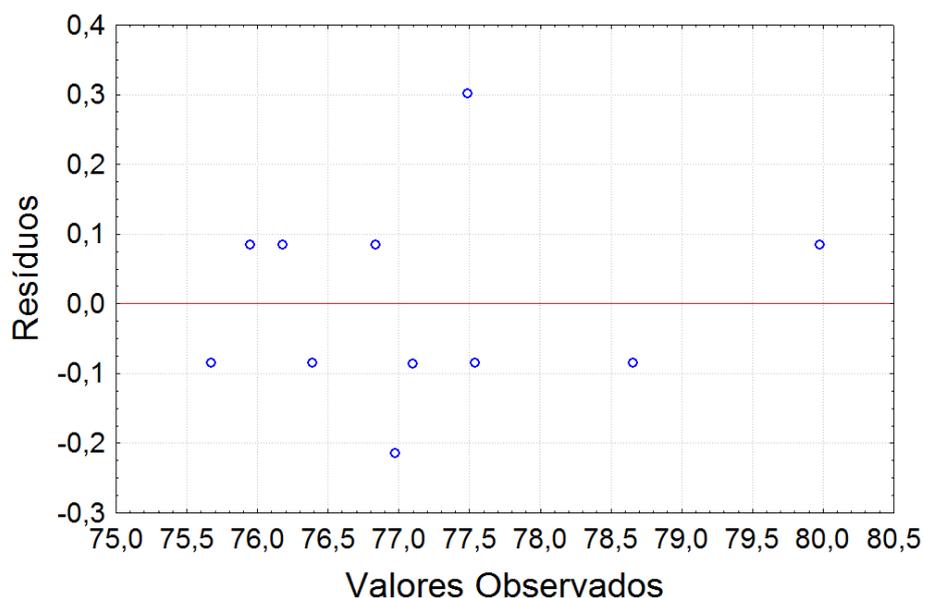


Figura 4.26– Distribuição dos resíduos para o teor de proteína na MAE

Na Figura 4.25 está representada a comparação entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo empírico, confirmando a validade do modelo e

um adequado ajuste, conforme indicado pela análise da ANOVA. Na Figura 4.26 está representada a distribuição dos resíduos da eficiência do processo, mostrando uma distribuição aleatória em torno de zero, validando a análise estatística realizada.

Os gráficos de superfície de resposta estão representados nas Figuras 4.27 (a), (b) e (c), com o auxílio do software Statistica v. 7.0.

Na Figura 4.27 (a), é possível observar que o aumento do pH e do tempo geram maiores teores de proteína no material extraído. Sabe-se que grande parte das proteínas contidas no farelo de arroz apresentam solubilidade limitada em água, pois estão combinadas com outros componentes do farelo, como o amido e a fibra. No entanto, muitas dessas ligações são sensíveis ao pH (SHIH et al., 1999) e podem ser clivadas em condições alcalinas de pH. Assim, a pH alcalinos se alcança uma maior pureza proteica dos extratos. Fato semelhante foi observado por Yeom et al. (2010), ao investigarem isolados de proteína de farelo de arroz preparados com autoclave e hidrólise enzimática, obtendo maiores teores proteicos para pH alcalinos.

Através da Figura 4.27 (b) se verifica que o aumento do tempo e da temperatura geram maiores teores de proteína. Isso pode ser atribuído ao fato de que as micro-ondas associadas a maiores tempos de processo geram a ruptura de ligações de hidrogênio, que são resultantes da rotação de moléculas de dipolo induzidas pelas micro-ondas, e também à migração de íons que aumentam a penetração do solvente na matriz, facilitando a liberação do extrato intracelular ao interromper a parede celular, melhorando a extração proteica (LI et al., 2010).

Na Figura 4.27 (c) se confirma a influência positiva do pH e temperatura. Porém, deve-se tomar cuidado com altas temperaturas geradas por micro-ondas, bem como longos tempos de exposição, uma vez que tais condições podem causar desnaturação gradual das proteínas, bem como desdobramento de proteínas levando a exposição superficial de grupos hidrofóbicos e sulfidrilos localizados no interior da molécula, o que pode resultar em agregação de proteínas irreversíveis e na formação de complexos covalentes levando a uma diminuição da solubilidade e extratabilidade da proteína (RENKEMA et al., 2000).

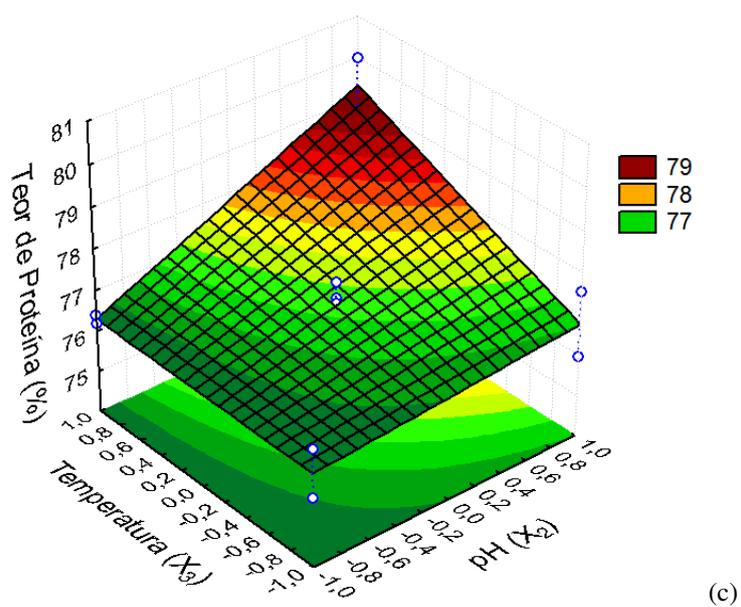
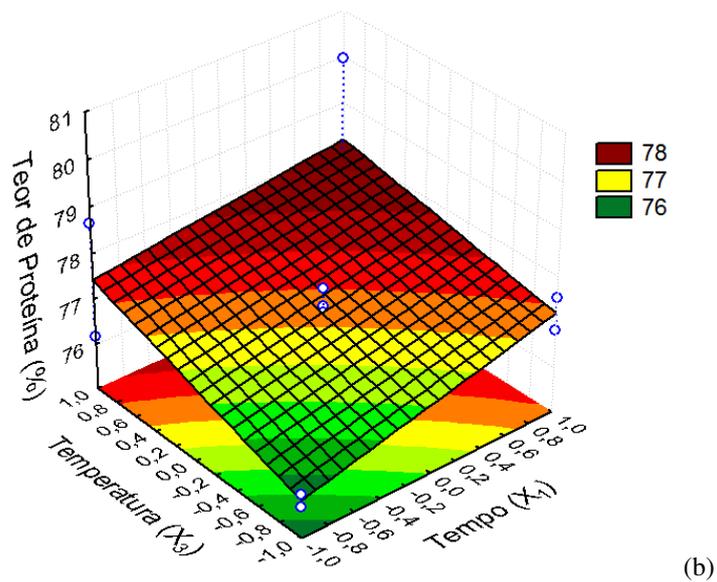
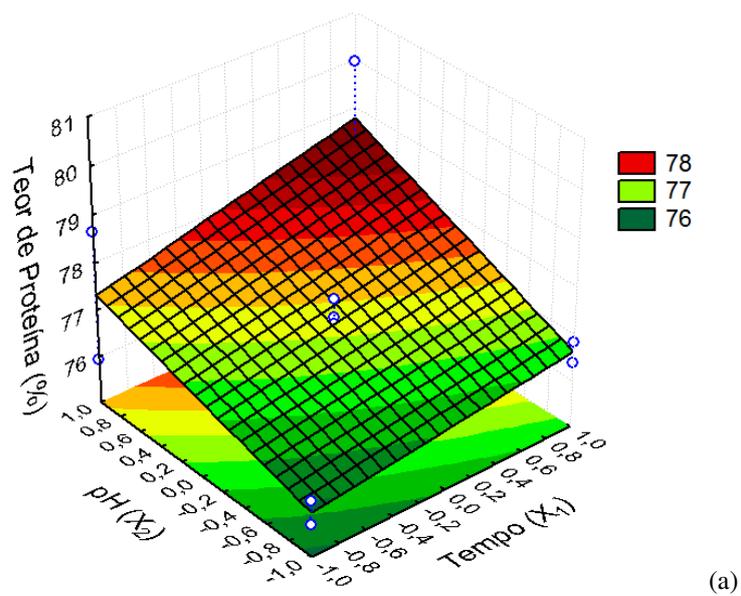


Figura 4.27 – Superfícies de resposta para o teor de proteína na MAE

4.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A fim de se verificar a eficiência dos métodos de extração, foi construída a Tabela 4.23, comparando os valores de rendimento de extração, teor de proteína do extrato obtido e tempo de processo para as melhores condições do método alcalino, UAE e MAE.

Tabela 4.23 – Rendimento de extração, teor de proteína e tempo de processo para a extração alcalina, UAE e MAE

<i>Método</i>	<i>Ensaio</i>	<i>Rendimento</i> (%)	<i>Teor de proteína</i> (%)	<i>Tempo</i> (min)
Alcalina	A18	12,85 ± 0,01	75,32 ± 0,58	60
UAE	U8	15,13 ± 0,14	79,75 ± 0,42	15
MAE	M8	15,68 ± 0,41	79,98 ± 0,27	2

Tomando-se a extração alcalina como base, verificou-se que através da UAE se obteve um rendimento de extração 17,8% maior e teor de proteína 5,88% maior em um tempo 4 vezes menor. Para a MAE, se observou rendimento de extração 22,04% maior e teor de proteína 6,19% maior em um tempo 30 vezes menor, mostrando que as técnicas ambientalmente amigáveis UAE e MAE proporcionam maior eficiência de processo, e são uma excelente opção para a obtenção de proteína de farelo de arroz.

Os valores contidos na Tabela 4.23 eram esperados, uma vez que a extração convencional, apesar de ser uma técnica simples e eficiente, é bastante laboriosa, com alto consumo de tempo e/ou energia, envolve grandes quantidades de solventes e, em última instância, pode causar uma degradação da molécula alvo (WANG et al., 1999; BAGHDIKIAN et al., 2016). Já as técnicas UAE e MAE apresentam como principais vantagens a grande redução no tempo de processo, seletividade aprimorada dos extratos desejados, maior rendimento dos extratos, alta reprodutibilidade em um curto período de tempo, além de apresentarem manipulação simplificada (KAUFMANN; CHRISTEN, 2002; MASON et al., 2011).

A técnica UAE requer menos tempo de processo devido às cavitações acústicas produzidas pelo ultrassom, que rompem as paredes celulares da matriz vegetal e facilitam a penetração do solvente, permitindo que o conteúdo intracelular seja liberado de forma eficiente. Além disso, ocorre o efeito mecânico da agitação do solvente causado pelas ondas ultrassônicas, aumentando a área de contato entre o

solvente e os compostos alvos, permitindo a maior penetração do solvente na matriz da amostra, facilitando a extração (CORBIN et al., 2015).

Para a MAE, a redução do tempo de processo se deve à forma como é gerado o aquecimento com as micro-ondas. Quando o calor das micro-ondas entra em contato com pequenos vestígios de umidade dentro da matriz celular, a evaporação ocorre e gera uma intensa pressão na parede celular, que acaba se rompendo e provoca a liberação dos constituintes ativos, no caso, a proteína do farelo de arroz (CHAN et al., 2011).

Fahmi et al. (2011), ao avaliarem o efeito da UAE sobre o teor de proteínas do extrato de soja observaram um aumento de cerca de 6,3% no extrato de soja extraído, fato possivelmente atribuído aos efeitos mecânicos da cavitação induzida, o que aumentou a permeabilidade nos tecidos das plantas. Amponsah e Nayak (2016) investigaram a MAE e a UAE para extrair e melhorar a recuperação de alérgenos de várias matrizes de soja (farinha de soja crua, isolado de proteína de soja e extrato de soja), utilizando a extração alcalina convencional como controle, obtendo maiores recuperações de proteínas nas amostras da MAE e da UAE do que as recuperações dos controles em todas as matrizes de soja avaliadas. Bagherian et al. (2011), ao extraírem pectina de toranja através de método convencional, por UAE e por MAE, obtiveram aumento de rendimento de 20,49% para a UAE em 28 minutos e 45,15% para a MAE após 5 minutos.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ APÓS AS EXTRAÇÕES

Com o intuito de visualizar melhor os efeitos do ultrassom e micro-ondas nas paredes celulares do FAD dos processos de extração, microscopias eletrônicas de varredura com ampliação de 500 vezes foram realizadas (resíduo sólido do farelo das melhores condições do método alcalino, UAE e MAE - Tabela 4.23) estão apresentadas nas Figuras 4.28 (a), (b) e (c).

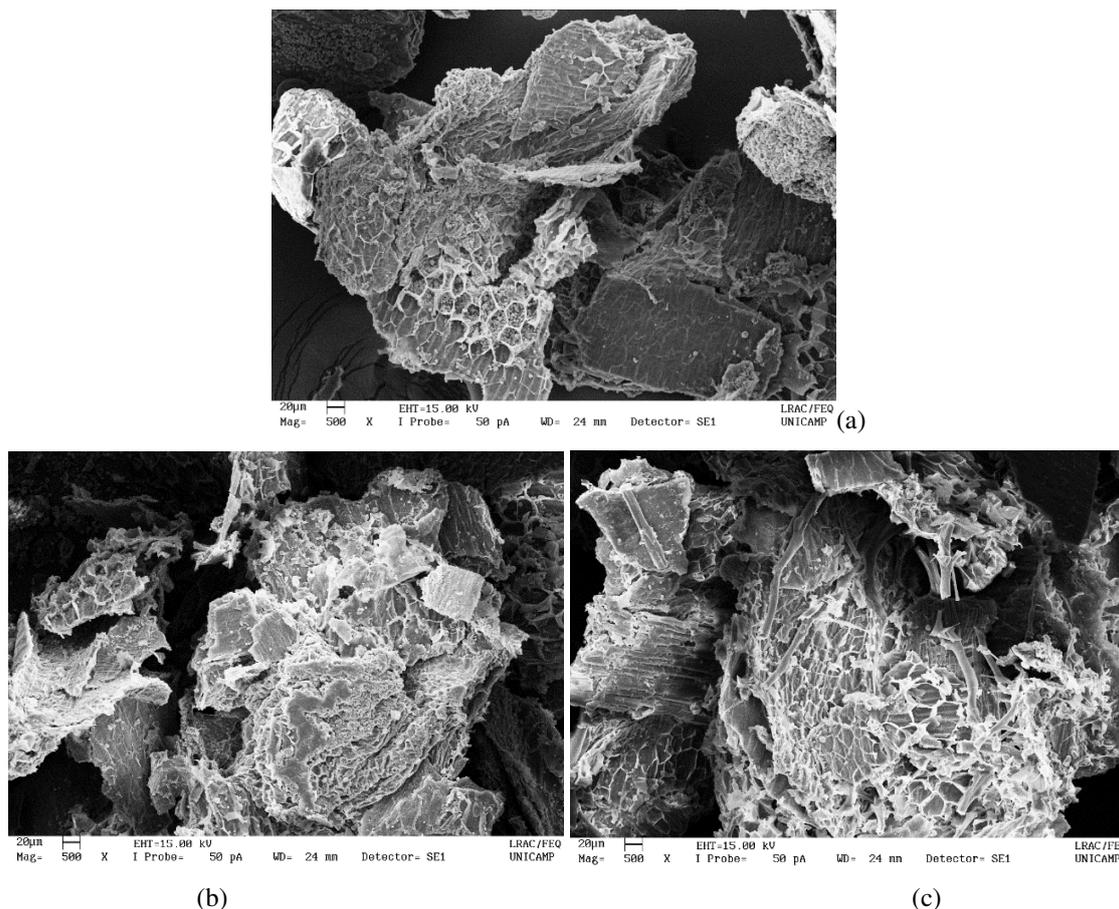


Figura 4.28 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o FAD após (a) extração alcalina (b) extração assistida por ultrassom e (c) extração assistida por micro-ondas

Através da análise das Figuras 4.28 (a), (b) e (c), observou-se alterações nos perfis das superfícies, uma vez que as amostras oriundas da UAE e MAE apresentaram maior dano do que a amostra do método convencional. A Figura 4.28 (a) apresentou estrutura superficial do FAD mais compacta e bem organizada, enquanto as Figuras 4.28 (b) e (c) apresentaram estruturas da superfície do FAD com fissuras e poros, fato atribuído às ondas ultrassônicas e micro-ondas. As bolhas de cavitação oriundas do ultrassom proporcionaram uma maior penetração nas paredes celulares, causando maior rompimento das mesmas em relação ao processo alcalino, liberando o material intracelulares de interesse (ROMDHANE; GOURDON, 2002). Assim como as micro-ondas, que são convertidas em energia cinética, gerando aquecimento seletivo do material, aumentando seu volume, causando a ruptura das paredes celulares do FAD, facilitando a extração do conteúdo desejado (MANDAL et al., 2007).

Resultados semelhantes nas estruturas superficiais do material foram observadas por Chittapalo e Noomhorm (2009), ao avaliarem FAD após extração por

método alcalino e UAE e Lamid et al. (2015), ao analisarem a estrutura da superfície do farelo de arroz após tratamento enzimático.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO PROTEICO DO FARELO DE ARROZ

A fim de avaliar e comparar a qualidade dos extratos proteicos obtidos em cada um dos métodos de extração, as amostras referentes aos níveis inferiores e superiores de cada um dos três planejamentos (A11, A18, U1, U8, M1 e M8) foram caracterizadas.

4.9.1 Composição Centesimal do Extrato Proteico do Farelo de Arroz

Após o extrato proteico do farelo de arroz ser obtido através dos três diferentes métodos, sua composição centesimal foi realizada, em gramas por 100 g de material, a fim de observar os principais constituintes das mesmas e possíveis variações ocasionadas pelas diferentes técnicas de extração. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4.24, 4.25 e 4.26.

Tabela 4.24 - Composição centesimal do extrato proteico obtido através da extração alcalina (g/100 g extrato)

<i>Composição</i>	<i>Proteína do arroz</i>	
	<i>A11</i>	<i>A18</i>
Umidade	3,83 ± 0,32 ^A	3,94 ± 0,87 ^A
Cinzas	4,32 ± 0,48 ^A	4,48 ± 0,94 ^A
Lipídios	1,12 ± 0,51 ^A	1,47 ± 0,32 ^A
Fibras totais	0,86 ± 0,66 ^A	0,89 ± 0,68 ^A
Proteína	66,31 ± 0,12 ^A	75,32 ± 0,15 ^B
Carboidrato ^{**}	23,56 ± 0,92 ^A	13,90 ± 0,35 ^B

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os parâmetros analisados nas linhas.

**Por diferença

Tabela 4.25 - Composição centesimal do extrato proteico obtido através da UAE (g/100 g extrato)

<i>Composição</i>	<i>Proteína do arroz</i>	
	<i>U1</i>	<i>U8</i>
Umidade	3,44 ± 0,12 ^A	3,19 ± 0,55 ^A
Cinzas	3,89 ± 0,41 ^A	4,01 ± 0,13 ^A
Lipídios	1,03 ± 0,62 ^A	1,22 ± 0,83 ^A
Fibras totais	0,99 ± 0,04 ^A	0,87 ± 0,16 ^A
Proteína	75,57 ± 0,21 ^A	79,72 ± 0,17 ^A
Carboidrato**	15,08 ± 0,33 ^A	10,99 ± 0,73 ^A

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os parâmetros analisados nas linhas.

**Por diferença

Tabela 4.26 - Composição centesimal do extrato proteico obtido através da MAE (g/100 g extrato)

<i>Composição</i>	<i>Proteína do arroz</i>	
	<i>M1</i>	<i>M8</i>
Umidade	3,99 ± 0,35 ^A	3,72 ± 0,43 ^A
Cinzas	3,12 ± 0,56 ^A	3,60 ± 0,32 ^A
Lipídios	1,17 ± 0,71 ^A	1,32 ± 0,51 ^A
Fibras totais	0,89 ± 0,21 ^A	0,81 ± 0,22 ^A
Proteína	75,68 ± 0,03 ^A	79,96 ± 0,19 ^A
Carboidrato**	15,15 ± 0,63 ^A	10,59 ± 0,55 ^A

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os parâmetros analisados nas linhas.

**Por diferença

Analisando-se os dados das Tabelas 4.24 a 4.26, verifica-se que os extratos obtidos são classificados como concentrados proteicos, uma vez que apresentam concentração de proteína inferior a 90% (SHIH; DAIGLE, 2000). Observa-se ainda grande semelhança entre as composições das amostras analisadas, indicando que a aplicação de ultrassom e micro-ondas na extração da proteína não afetou negativamente a composição dos extratos obtidos. Han et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes de composição de proteína de farelo de arroz obtida através de extração alcalina, com teor de proteína de 74,93%. Paraman et al. (2006), ao avaliar a composição centesimal

de isolados de proteína de arroz, obtiveram teores de proteína variando na faixa de 81 a 87,3%.

4.9.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético dos extratos proteicos do FAD obtido através das três técnicas de extração está representado na Figura 4.29.

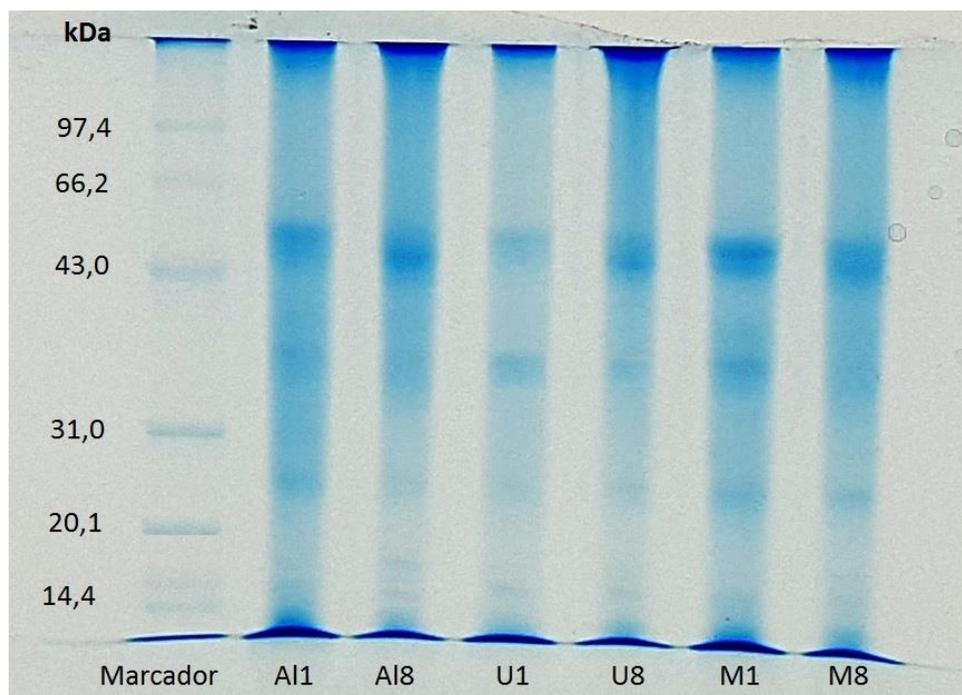


Figura 4.29 – Perfil eletroforético de peso molecular das proteínas de FA.

Nas seis amostras contidas na Figura 4.29, todos os principais polipeptídeos esperados foram observados. Foram identificadas pequenas bandas de polipeptídeos em 16 kDa e inferior a 14,4 kDa, referentes à prolamina (LOSSO et al., 2003; BORGHT et al., 2006). A banda que aparece a 26 kDa é referente à globulina (KUMAGAI et al., 2006). Nota-se uma banda intensa a 40 kDa, referente à glutelina, sobreposta com a albumina (ROMERO et al., 2012). A 57 kDa se observa uma forte banda, referente à proglutelina (KUMAGAI et al., 2006). Perfis semelhantes foram observados por Silva (2012), ao analisar isolado proteico de farelo de arroz obtido através de extração alcalina e enzimática; Romero et al. (2012), ao analisarem as propriedades de concentrado proteico de arroz; Xia et al. (2012), ao avaliarem proteína de arroz preparada por micro fluidização assistida por enzima e também obtida por extração alcalina. Também Phongthai et al. (2017), ao avaliarem proteína de farelo de arroz

obtida por extração alcalina e UAE e Phongthai et al. (2016), ao analisarem proteína de farelo de arroz obtida por extração alcalina e MAE, obtiveram resultados semelhantes.

Pode-se notar que os perfis eletroforéticos foram muito semelhantes para as seis amostras, indicando que tanto as ondas ultrassônicas quanto as micro-ondas não foram agressivas a ponto de danificarem bandas proteicas. Phongthai et al. (2017), ao extraírem proteína de farelo de arroz através do método alcalino e UAE verificaram a perda de uma banda a 71,5 kDa na UAE, provavelmente devido a uma ruptura da estrutura proteica pelo efeito de cavitação durante o ultrassom de alta intensidade.

4.9.3 Determinação de Aminoácidos

Na Tabela 4.27 está apresentada a composição de aminoácidos dos extratos proteicos do FAD obtida através da extração alcalina, UAE e MAE.

Analisando-se os valores das seis amostras apresentadas na Tabela 4.27, foi possível verificar padrões de aminoácidos muito semelhantes. Esse resultado é considerado satisfatório, uma vez que mostra que a aplicação de ultrassom e micro-ondas na extração da proteína não afetou negativamente a composição aminoacídica dos extratos obtidos.

O perfil de aminoácidos encontrado está de acordo com os obtidos por Tang et al. (2013), ao analisarem proteína do farelo de arroz seco por *spray dryer*, Han et al. (2015), ao avaliarem a qualidade nutricional da proteína do farelo de arroz, e Gnanasambandam e Hettiarachchy (1995), ao avaliarem concentrados de proteína de farelo de arroz não estabilizado e estabilizado, uma vez que os teores de aminoácidos e aminoácidos essenciais contidos na Tabela 4.27 (fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, treonina e valina) bem como suas quantidades são semelhantes aos apresentados na literatura.

Observa-se elevado teor de histidina, treonina, valina, leucina, isoleucina, lisina, fenilalanina e metionina em todas as amostras, os quais são aminoácidos essenciais para lactantes (CHO et al., 1984). Verificam-se bons teores de arginina e cistina, os quais são aminoácidos essenciais para bebês com baixo peso ao nascer, uma vez que os mesmos têm requisitos nutricionais severos devido ao rápido crescimento e à imaturidade da função gastrointestinal (BEHRMAN; VAUGHAN, 1983).

Tabela 4.27 – Composição de aminoácidos dos extratos proteicos de FAD (g/100 g_{extrato})

<i>Aminoácido</i>	<i>Amostra</i>					
	<i>A11</i>	<i>A18</i>	<i>U1</i>	<i>U8</i>	<i>M1</i>	<i>M8</i>
Aspartato	6,49	6,93	5,56	4,40	5,91	7,26
Glutamato	8,89	9,38	8,28	9,11	9,65	9,63
Hidroxiprolina	0,04	0,05	0,04	0,04	0,02	0,04
Serina	3,36	3,42	3,27	3,30	3,68	3,38
Glicina	4,06	4,12	3,96	3,98	4,40	4,17
Histidina	2,05	2,01	1,99	1,94	2,29	1,97
Taurina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Arginina	7,61	7,39	7,23	7,37	8,09	7,51
Treonina	2,90	3,04	2,75	2,82	3,08	3,08
Alanina	4,53	4,58	4,56	4,58	4,75	4,76
Prolina	2,94	3,01	2,79	2,91	3,18	3,07
Tirosina	2,63	2,64	2,53	2,71	2,80	2,77
Valina	4,55	4,50	4,36	4,35	4,86	4,60
Metionina	1,43	1,30	1,38	1,41	1,53	1,43
Cistina	1,30	1,26	1,18	1,20	1,45	1,26
Isoleucina	2,76	2,66	2,60	2,59	2,86	2,70
Leucina	4,57	4,65	4,51	4,61	4,82	4,83
Fenilalanina	3,32	3,24	3,20	3,22	3,63	3,35
Lisina	3,82	3,57	3,81	3,60	4,36	3,95
Total	67,25	67,74	64,01	64,14	71,34	69,76

*Triptofano não foi determinado.

A fim de identificar o primeiro aminoácido limitante dos extratos obtidos, avaliou-se o escore de aminoácidos essenciais das amostras. Os valores estão apresentados na Tabela 4.28.

Tabela 4.28 - Composição de aminoácidos totais (g/100 g_{proteína}) e escore de aminoácidos essenciais.

Aminoácido	Amostra (g/100 g _{proteína})						FAO/WHO (1991) ^a (g/100 g _{proteína})
	A11	A18	U1	U8	M1	M8	
Histidina	3,09	2,67	2,63	2,43	3,03	2,46	1,90
Treonina	4,37	4,04	3,64	3,54	4,07	3,85	3,40
Valina	6,86	5,97	5,77	5,46	6,42	5,75	3,50
Metionina ^b	4,12	3,40	3,39	3,27	3,94	3,36	2,52
Isoleucina	4,16	3,53	3,44	3,25	3,78	3,38	2,80
Leucina	6,89	6,17	5,97	5,78	6,37	6,04	6,60
Fenilalanina ^c	8,97	7,81	7,58	7,44	8,50	7,65	6,30
Lisina	5,76	4,74	5,04	4,52	5,76	4,94	5,80
<i>Escore de aminoácidos essenciais</i>							
Histidina	1,63	1,40	1,39	1,28	1,59	1,30	
Treonina	1,29	1,19	1,07	1,04	1,20	1,13	
Valina	1,96	1,71	1,65	1,56	1,83	1,64	
Metionina ^b	1,63	1,35	1,34	1,30	1,56	1,33	
Isoleucina	1,49	1,26	1,23	1,16	1,35	1,21	
Leucina	1,04	0,94	0,90	0,88	0,96	0,92	
Fenilalanina ^c	1,42	1,24	1,20	1,18	1,35	1,21	
Lisina	0,99	0,82	0,87	0,78	0,99	0,85	1º aminoácido limitante

*Triptofano não foi determinado;

^aReferência padrão FAO/WHO (1991) (aminoácido essencial para criança de 2 a 5 anos);

^bMetionina + cistina.

^cFenilalanina + tirosina.

Analisando-se os valores da Tabela 4.28, verifica-se que primeiro aminoácido limitante da proteína do farelo de arroz é a lisina, uma vez que apresenta o menor escore de aminoácido (< 1). Verifica-se também alto teor de lisina, o qual é o primeiro aminoácido limitante e um dos mais altos entre as proteínas do cereal, com valores na faixa de 4,74 a 5,76 g_{lisina}/100 g_{proteína}. O teor de lisina obtido foi superior ao encontrado por Parrado et al. (2006), de 3,46 g_{lisina}/100 g_{proteína} para o extrato enzimático

de farelo de arroz. Youssef (1974) ao avaliar concentrados proteicos de farelo de arroz do Cairo obteve teores de lisina de $4,23 \text{ g}_{\text{lisina}}/100 \text{ g}_{\text{proteína}}$ e $3,39 \text{ g}_{\text{lisina}}/100 \text{ g}_{\text{proteína}}$. Barbosa (2009) ao avaliar o perfil aminoacídico de arroz silvestre (*Oryza latifolia*), apresentando concentração de $4,05 \text{ g}_{\text{lisina}}/100 \text{ g}_{\text{proteína}}$ e Wang et al. (1999) obtiveram teor de $4,7 \text{ g}_{\text{lisina}}/100 \text{ g}_{\text{proteína}}$ ao analisar isolado de proteína de farelo de arroz.

A variação no teor de lisina pode estar associada à variedade do arroz utilizado, bem como à forma de obtenção da proteína do farelo de arroz. No entanto, os valores obtidos são considerados adequados, uma vez que a FAO (2017) considera que o teor de lisina e cisteína da proteína do farelo de arroz em casca com 14% de umidade está na faixa de 4,8 a 5,4% ($3,98$ a $5,05 \text{ g}/100 \text{ g}_{\text{proteína}}$) para uma contagem de aminoácidos de 83 a 93 $\text{g}/100 \text{ g}_{\text{proteína}}$ (JULIANO, 1985).

4.9.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias eletrônicas de varredura com nível de amplitude de 1000 vezes dos ensaios A11, A18, U1, U8, M1 e M8, estão representadas nas Figuras 4.30 (a), (b), (c), (d), (e) e (f), respectivamente.

Observando-se as Figuras 4.30, verifica-se diferentes tamanhos de partículas, bem como grande semelhança entre as amostras, indicando que tanto o ultrassom quanto as micro-ondas não causaram efeitos negativos na proteína obtida como, por exemplo, a desintegração das mesmas. Fato que foi observado por Karki et al. (2010), ao realizar MEV de flocos de soja desengordurado após tratamento com ultrassom.

Se observa que as amostras apresentaram diferentes conformações de partículas, com superfície áspera. Verifica-se que não há presença de grande quantidade de grânulos de amido, fato esperado, uma vez que as amostras extraídas apresentam em sua composição alto teor de proteína e baixo teor de carboidrato. Resultados semelhantes foram observados por Amagliani et al. (2016), ao analisarem diferentes produtos oriundos do farelo de arroz, no qual verificaram formatos irregulares das partículas e superfície desnivelada de um dos concentrados de proteína de arroz, forma modular arredondada irregular e superfície rugosa de um segundo concentrado de proteína de arroz. Souza et al. (2016) também observaram diferentes tamanhos e formatos de partículas de farinha de arroz e de concentrado proteico precipitado no ponto isoelétrico.

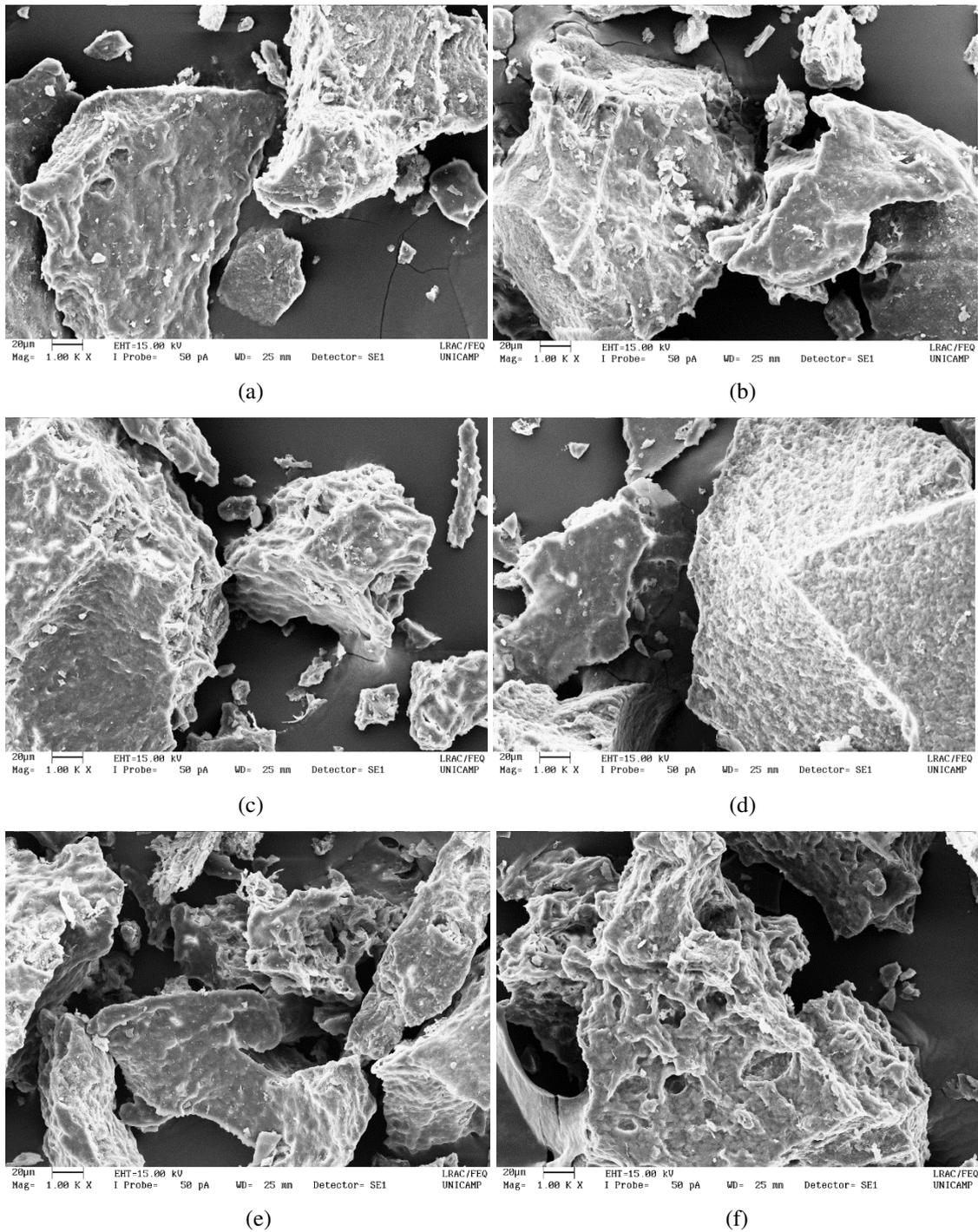


Figura 4.30 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos extratos proteicos de FAD dos ensaios (a) A11 (b) A18 (c) U1 (d) U8 (e) M1 e (f) M8

4.9.5 Digestibilidade Proteica *in vitro*

Os valores de digestibilidade proteica *in vitro* das amostras A11, A18, U1, U8, M1 e M8 estão apresentados na Tabela 4.29.

Tabela 4.29 – Digestibilidade proteica *in vitro*

<i>Amostra</i>	<i>Digestibilidade proteica</i> (%)
A11	62,34 ± 1,70 ^A
A18	62,10 ± 1,09 ^A
U1	62,22 ± 1,35 ^A
U8	64,07 ± 1,30 ^A
M1	62,67 ± 1,71 ^A
M8	64,08 ± 1,14 ^A

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os parâmetros analisados nas colunas.

Observando-se os valores de digestibilidade proteica das amostras contidas na Tabela 4.29, verifica-se que as mesmas não apresentam diferença estatística, sendo todos superiores a 60%. Resultados similares foram observados por Phongthai et al. (2016), ao avaliarem as propriedades de hidrolisados de proteína de farelo de arroz, obtendo valor de digestibilidade do concentrado de proteína de farelo de arroz preparado pelo método alcalino de $62,51 \pm 2,76\%$ e $60,92 \pm 1,62\%$ preparado pelo método MAE. Xia et al. (2012), ao avaliarem a digestibilidade de proteína de arroz obtida através de extração alcalina alcançaram valores de 60,94%.

Comparando-se a digestibilidade da proteína do farelo de arroz com outros alimentos, se observa que a mesma apresenta valor superior ao do sorgo, que possui digestibilidade de 54,56% (RESTLE et al., 2002), e valor superior ao concentrado de proteína de soja, que apresentou digestibilidade de $51,1 \pm 1,28\%$ (PHONGTHAI et al., 2016). Uma possível justificativa para essa diferença nos valores de digestibilidade é devido à variação na composição de aminoácidos dos materiais. Wang et al. (1999), ao avaliarem a proteína do arroz contataram que a mesma possui quantidades maiores de aminoácidos que a proteína de soja, podendo ser melhor digerida e absorvida que a proteína de soja no sistema *in vivo*.

4.9.6 Solubilidade Proteica

Nas Figuras 4.31, 4.32 e 4.33 estão representados os perfis de solubilidade dos extratos proteicos do FAD em função da variação do pH, obtidos através da

extração alcalina, UAE e MAE. A análise foi realizada a fim de avaliar as interações atrativas e repulsivas entre as moléculas do solvente e do soluto.

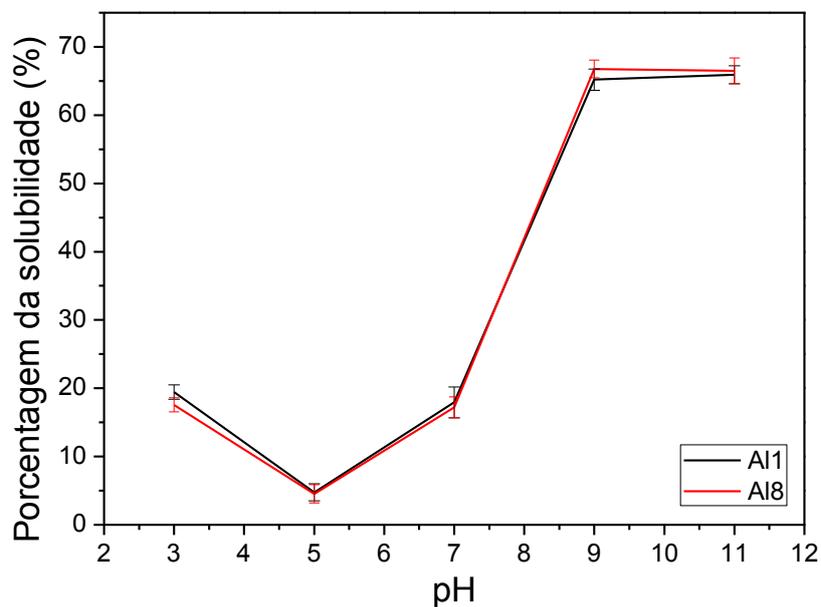


Figura 4.31 – Solubilidade do extrato proteico do FAD obtida através do método alcalino para os ensaios A11 e A18

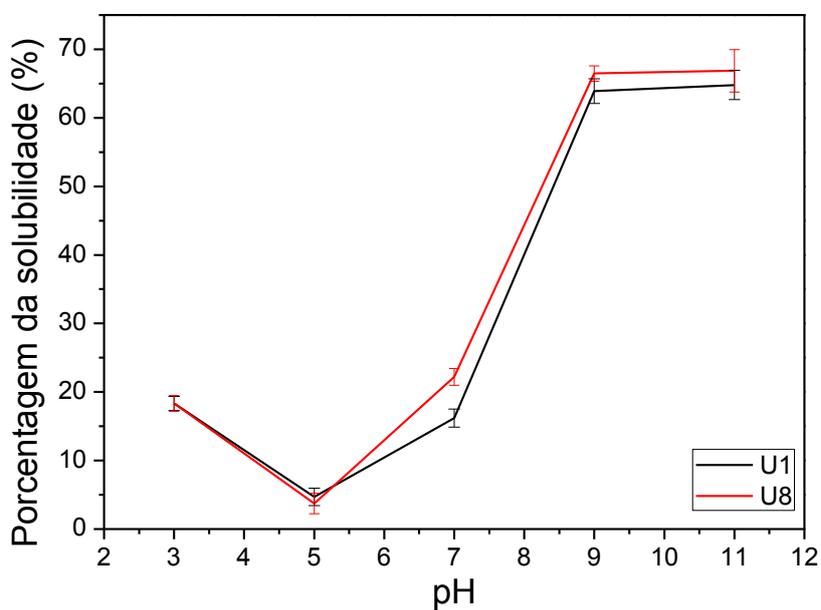


Figura 4.32 – Solubilidade do extrato proteico do FAD obtida através do método assistido por ultrassom para os ensaios U1 e U8

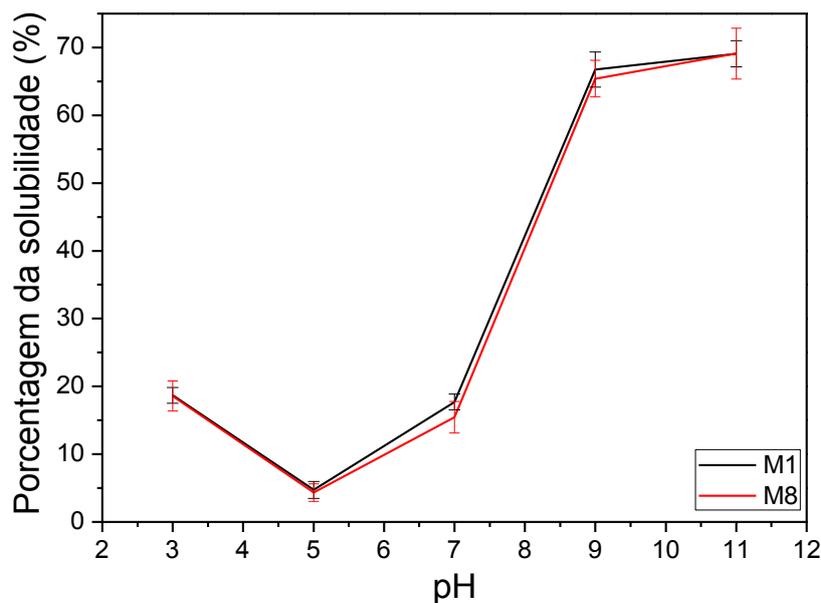


Figura 4.33 – Solubilidade do extrato proteico do FAD obtida através do método assistido por micro-ondas para os ensaios M1 e M8

Analisando-se os gráficos das Figuras 4.31, 4.32 e 4.33, verificam-se perfis semelhantes, com porcentagem da solubilidade próximo a 20% para o pH 3 para todas as situações. A solubilidade mínima se dá para o pH 5, fato esperado uma vez que para a maioria das proteínas a menor solubilidade se dá no ponto isoelétrico (4,7), local onde o número de cargas elétricas das proteínas se equivalem (número de radicais ácidos desprotonados $-\text{COO}^-$ igual ao número de radicais básicos protonados $-\text{NH}_3^+$) e não mais se repelem entre si, resultando em carga líquida igual a zero, sendo a interação hidrofóbica máxima com a água e a repulsão eletrostática e hidratação iônica mínimas, e então formando agregados e precipitação das moléculas (DAMODARAN, 1996; SGARBIERI, 1996; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Para os valores de pH superiores ou inferiores ao ponto isoelétrico, as proteínas apresentam carga e então a repulsão eletrostática e hidratação iônica promovem a solubilização (DAMODARAN, 1996). Analisando-se as figuras, verifica-se que a solubilidade aumenta à medida que o pH aumenta, chegando a 65,93% para a amostra A11, 66,49% para a amostra A18, 64,79% para a amostra U1, 66,87% para a amostra U8, 69,06% para a amostra M1 e 69,10% para a amostra M8.

A baixa solubilidade proteica em pH ácidos pode ser justificada pela presença de fitatos que formam complexos insolúveis com proteínas (FABIAN; JU, 2015). As interações hidrofóbicas favorecem as interações proteína-proteína, resultando em decréscimo na solubilidade. Ocorre ainda a perda de ação de forças de repulsão

eletrostáticas, que oferecem condições benéficas para a formação de agregados de proteínas com grande diâmetro e alta densidade. Para pH alcalinos, a solubilidade aumenta uma vez que as forças eletrostáticas de repulsão entre as proteínas carregadas negativamente ajudam a mantê-las separadas e aumentam as interações iônicas entre a proteína e o solvente (MAO; HUA, 2012).

Resultados semelhantes foram observados por Silva (2012), ao avaliar a solubilidade de isolado proteico do FAD, obtendo valor máximo entre 60 e 70%; Wang et al. (2015), ao avaliarem a solubilidade de concentrado de proteína de farelo de arroz, obtendo valor máximo de solubilidade de 80%. Bera e Mukherjee (1989) obtiveram valor máximo de solubilidade para concentrado de proteína de farelo de arroz de 75%. Gnanasambandam e Hettiarachchy (1995) obtiveram valores máximos de solubilidade para concentrado de proteína de farelo de arroz não estabilizado e concentrado de proteína de farelo de arroz estabilizado entre 60 e 70%. A diferença nos valores de solubilidade nos relatos acima pode ser atribuída a características intrínsecas dos farelos utilizados, como, por exemplo, a variedade e forma de cultivo do arroz.

4.10 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FARELO DA SAFRA 2016/2017

Sabe-se que diversos fatores podem influenciar na composição centesimal do farelo de arroz, sendo algum deles cultivar, local de plantio, tratamento do grão antes do beneficiamento, sistema de beneficiamento empregado, grau de polimento ao qual o grão foi submetido e ano de produção (PESTANA et al., 2008). Assim, os valores expressos na literatura para composição do farelo de arroz mostram grande variação, refletindo a influência desses fatores na composição do mesmo.

Dessa forma, um novo farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) *in natura* oriundo da safra 2016/2017 foi caracterizado para então ser utilizado para a extração da proteína e posterior comparação. O farelo foi obtido da empresa Mococa, sendo obtido através de aspiração nos interiores dos equipamentos durante o beneficiamento do grão, não passando por nenhum outro processo mecânico e/ou químico.

Os valores de composição centesimal estão representados na Tabela 4.30.

Tabela 4.30 - Composição centesimal do FA e FAD da safra 2016/2017

Composição	Safrá 2013/2014		Safrá 2016/2017	
	FA (%)	FAD (%)	FA (%)	FAD (%)
Umidade	10,17±0,02	11,77±0,03	11,13±0,04	12,47±0,02
Cinzas	10,73±0,05	12,04±0,22	9,44±0,08	10,13±0,12
Lipídios	18,20±0,21	2,84±0,11	17,31±0,11	1,99±0,18
Fibras totais	22,06±0,40	27,08±0,30	23,46±0,14	26,97±0,24
Proteína	13,82±0,62	15,67±0,38	12,10±0,33	15,40±0,26
Carboidrato*	25,02±0,64	30,60±0,55	26,56±0,65	33,04±0,42

*Por diferença

Analisando-se os dados da Tabela 4.30, observa-se que a composição do FA e FAD *in natura* da safra 2016/2017 apresenta composição centesimal semelhante ao estudado no presente trabalho, da safra 2013/2014. Assim, foi possível verificar que o fator safra de produção não teve grande influência na variação de composição dos farelos de arroz, sendo ambos *Oryza sativa* L. e produzidos no Brasil.

Resultados semelhantes em relação à safra foram encontrados por Storck et al. (2005), ao analisarem farelo de arroz oriundo do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA/Cachoeirinha/RS), durante as estações de crescimento de 2001/2002 e 2002/2003, obtendo valores de proteína de $8,37 \pm 0,85$ e $8,94 \pm 1,55$, respectivamente. Ao analisar a composição centesimal de farelos oriundos dos EUA, Espanha, Itália, Japão, México, Nepal e Sri Lanka, Bermudes (1994) obteve teores de proteínas variando na faixa de 11,5 a 17,2%, lipídeos variando de 12,8 a 22,6%, fibra bruta variando de 6,2 a 14,4%, extrato não nitrogenado entre 33,5 e 53,5%, e teores de cinzas na faixa de 8,0 e 15,4%. Assim, é possível perceber que o fator local de plantio apresenta influência maior na composição do farelo de arroz do que o fator safra.

4.11 EXTRAÇÃO COM O FARELO DE ARROZ DA SAFRA 2016/2017

Assim como influenciar na composição centesimal do farelo de arroz, fatores como local e período de cultivo do arroz podem influenciar também a extração das proteínas (PRAKASH; RAMANATHAM, 1994; KHAN et al., 2011). Assim, a fim de comparar a influência de diferentes safras de farelo de arroz no rendimento e teor de proteína, foram realizados ensaios em triplicata nas melhores condições para a extração alcalina, assistida por ultrassom e assistida por micro-ondas.

Os valores nas melhores condições de estudo bem como para o novo farelo estão apresentados na Tabela 4.31.

Tabela 4.31 – Rendimento de extração e teor de proteína para os FAD das safras 2013/2014 e 2016/2017.

<i>Extração</i>	<i>Farelo safra 2013/2014</i>		<i>Farelo safra 2016/2017</i>	
	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Teor de proteína (%)</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Teor de proteína (%)</i>
Alcalina	12,85 ± 0,01	75,32 ± 0,58	13,49 ± 0,11	76,22 ± 0,28
Ultrassom	15,13 ± 0,14	79,75 ± 0,42	15,47 ± 0,06	79,53 ± 0,37
Micro-ondas	15,68 ± 0,41	79,98 ± 0,27	16,08 ± 0,05	79,85 ± 0,43

Através dos dados da Tabela 4.31, verifica-se que o farelo de arroz oriundo da safra 2016/2017 apresentou rendimento de extração levemente superior e teores de proteína similares aos da safra 2013/2014. Prakash e Ramanatham (1994), ao avaliarem a influência de tratamentos como a estabilização e parboilização do farelo de arroz, observaram variações significativas no rendimento de extração e teor proteico do que o ano de produção do farelo.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados da presente pesquisa, foi possível verificar que a obtenção da proteína do farelo de arroz através das técnicas ambientalmente amigáveis extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas se mostrou viável do ponto de vista operacional, uma vez que proporcionou maiores rendimentos de extração e teores de proteína em períodos de tempo menores, em comparação com a convencional extração alcalina.

Concluiu-se que o processo de estabilização do farelo de arroz foi eficiente, uma vez que reduziu significativamente o teor de lipídio do mesmo. Verificou-se que o parâmetro razão entre amostra e solvente influenciou o rendimento de extração e teor de proteína para as três técnicas de extração avaliadas.

Os planejamentos experimentais propostos permitiram verificar as melhores condições de operação, dentro das condições limites do processo avaliadas. Concluiu-se que o rendimento e o teor de proteína para a extração alcalina foram influenciados positivamente pelas variáveis operacionais pH e temperatura, sendo ainda o rendimento influenciado pelo tempo de processo, uma vez que a mudança de um nível inferior para um nível superior fez com que o valor do mesmo aumentasse. Para a UAE, as variáveis operacionais potência, pH e tempo de processo influenciaram positivamente as variáveis respostas, bem como potência e pH influenciaram positivamente o teor de proteína obtido. Para a extração assistida por micro-ondas, as variáveis pH, temperatura e tempo de processo também influenciaram positivamente o rendimento de extração e o teor de proteína.

Nas melhores condições operacionais, foi possível verificar que a extração assistida por ultrassom resultou em maior rendimento (17,8%) e teor de proteína (5,88%) em relação à extração alcalina, em um tempo 4 vezes menor. Para a extração assistida por micro-ondas, se obteve maior rendimento (22,04%) e teor de proteína (6,19%), em comparação com a extração alcalina, em um tempo 30 vezes menor, indicando que as técnicas ambientalmente amigáveis são uma escolha mais vantajosa, devido a inúmeras vantagens proporcionadas, dentre elas a maior eficiência de processo, sendo a sua aplicação fortemente aconselhada em sistemas de extração semelhantes.

Em relação à qualidade do extrato proteico obtido, concluiu-se que as duas novas técnicas de extração são indicadas, uma vez que a aplicação de ondas ultrassônicas e micro-ondas não causaram danos à qualidade do extrato obtido, visto

que a composição centesimal do mesmo, perfil eletroforético, composição de aminoácidos, superfície da partícula, digestibilidade e solubilidade proteica se apresentaram semelhantes aos valores observados com a extração alcalina.

Por fim, concluiu-se que o farelo de arroz é uma excelente fonte de obtenção de uma proteína hipoalergênica, de boa qualidade, uma vez que o mesmo é um subproduto agroindustrial gerado em larga escala e de relativo baixo custo. Além disso, concluiu-se que a proteína do farelo de arroz apresenta elevado potencial para a aplicação em produtos alimentícios, melhorando a qualidade nutricional dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-HAMID, A.; LUAN, Y.S. Functional properties of dietary fiber prepared from defatted rice bran. *Food Chemistry*, v. 68, n. 1, p. 15-19, 2000.
- AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. *Journal of Cereal Science*, v. 41, p. 283-290, 2005.
- AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A. pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *Journal of Nutrition*, v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964.
- ALBILLOS, S. M.; AL-TAHER, F.; MAKS, N. Increasing extractability of protein for allergen detection after food processing. *Food Chemistry*, v. 127, p. 1831–1834, 2011.
- AMAGLIANI, L.; O'REGAN, J.; KELLY, A. L.; O'MAHONY, J. A. Physical and flow properties of rice protein powders. *Journal of Food Engineering*, v. 190, p. 1-9, 2016.
- AMBLER, R. P. Standards and accuracy in amino acid analysis. *Amino Acid Analysis*. Chichester: Ellis Horwood, p. 380, 1981.
- AMPONSAH, A.; NAYAK, B. Effects of Microwave and Ultrasound Assisted Extraction on the Recovery of Soy Proteins for Soy Allergen Detection. *Journal of Food Science*, v. 81, n. 11, p. 2876-2885, 2016.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L. *Nutrição animal*. Nobel, São Paulo, 4ª edição, v. 1, p. 395, 1983.
- AOAC - Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL. 16ª Edição, 3ª revisão, Publicado por AOAC International, Gaithersburg, v. 1, cap. 12, p.1-10, 1997a.
- AOAC - Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL. 16ª Edição, 3ª revisão, Publicado por AOAC International, Gaithersburg, v. 2, cap. 32, p.1-9, 1997b.
- BAGHDIKIAN, B.; FILLY, A.; FABIANO-TIXIER, A.; PETITCOLAS, E.; MABROUKI, F.; CHEMAT, F.; OLLIVIER, É. Extraction by solvent using microwave and ultrasound-assisted techniques followed by HPLC analysis of Harpagoside from *Harpagophytum procumbens* and comparison with conventional solvent extraction methods. *Comptes Rendus Chimie*, v. 19, p. 692-698, 2016.
- BAGHERIAN, H.; ASHTIANI, F. Z.; FOULADITAJAR, A.; MOHTASHAMY, M. Comparisons between conventional, microwave and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing*, v. 50, p. 1237– 1243, 2011.

- BAIANO, A. Recovery of biomolecules from food wastes - A review. *Molecules*, v. 19, p. 14821-14842, 2014.
- BANDYOPADHYAY, K.; CHAKRABORTY, C.; BARMAN, A. K. Effect of Microwave and Enzymatic Treatment on the Recovery of Protein from Indian Defatted Rice Bran Meal. *Journal of Oleo Science*, v. 61, n. 10, p. 525-529, 2012.
- BARATA, T. S. Caracterização do consumo de arroz no Brasil. XLIII Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, Ribeirão Preto, SP, 2005.
- BARBOSA, M. M. Composição em aminoácidos e digestibilidade *in vivo* de proteína do arroz nativo, espécie *Oryza latifolia*, da região do Pantanal, no estado de Mato Grosso do Sul. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MT, 2009.
- BARNABAS, I. J.; DEAN, J. R.; FOWLIS, I. A.; OWEN, S. P. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soils using microwave energy. *Analyst*, v. 120, 1995.
- BATISTA, I. Recovery of Proteins from Fish Waste Products by Alkaline Extraction. *European Food Research and Technology*, v. 210, p. 84–89, 1999.
- BEHRMAN, R.; VAUGHAN, V. Nutrition and Nutritional Disorders. In: Nelson Textbook of Pediatrics, 12^a Edição, Nelson, W., Editora W. B. Saunders Co.: Philadelphia, p. 138-139, 1983.
- BENSON, J.; LOUIE, P. C.; BRADSHAW, R. A. Amino acid analysis of peptides. *The Peptides*, Academic Press, v. 4, 1981.
- BERA, M. B.; MUKHERJEE, R. K. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Science*, v. 54, p. 142–145, 1989.
- BERMUDES, R. F. Avaliação do farelo de arroz integral em rações para carneiros Holandês e Jersey desaleitados precocemente. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas - RS, 1994.
- BERNARD, J. K.; AMOS, H. E. Influence of pelleting whole cottonseed on ration digestibility and milk production and composition. *Journal of Dairy Science*, v. 68, p. 3255–3261, 1985.
- BERSET, J. D.; EJEM, M.; HOLZER, R.; LISCHER, P. Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 383, p. 263–275, 1999.

- BETSCHART, A. A.; FONG, R. Y.; SAUNDERS, R. M. Rice by-products: Comparative extraction and precipitation of nitrogen from U.S. and Spanish bran and germ. *Journal of Food Science*, v. 42, n. 4, p. 1088-1093, 1977.
- BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. *Transport Phenomena*, New York, John Wiley & Sons, Inc., 2ª Edição, 1976.
- BLACKADDER, D. A.; NEDDERMAN, R. M. *A handbook of unit operations*. Academic Press, London-New York, 1971.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. *Introdução à química de alimentos*, 2ª Edição, São Paulo: Varela, p. 222, 1992.
- BORA, P. S.; RIBEIRO, D. Influence of pH on the Extraction Yield and Functional Properties of Macadamia (*Macadamia integrifolia*) Protein Isolates. *Food Science and Technology International*, v. 10, n. 4, p. 263-267, 2004. DOI: 10.1177/1082013204045779
- BORDERÍAS, A. J.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. *Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, v. 28, n. 2, p. 159-169, 1988.
- BORGHT, A. V. D.; VANDEPUTTE, G. E.; DERYCKE, V.; BRIJS, K.; DAENEN, G.; DELCOUR, J. A. Extractability and chromatographic separation of rice endosperm proteins. *Journal of Cereal Science*, v. 44, p. 68-74, 2006.
- BOURAOUI, M.; RICHARD, P.; FICHTALI, J. A review of moisture content determination in foods using microwave oven drying. *Food Research International*, v. 26, p. 49-57, 1993.
- BRASIL, 2005. Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos, constante do anexo desta resolução. Disponível em http://www.icadonline.com.br/ajuda/arquivos_4154/Federal%20-%20RDC%20263%20de%202005.pdf Pesquisado em 12/09/14.
- CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 19, n. 4, 2000.
- CÂNDIDO, L. M. B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de Tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcional. Tese

(Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 1998.

CARVALHO, J. L. V.; VIEIRA, N. R. A. A cultura do arroz no Brasil: usos alternativos. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 605-621, 1999.

CAVALHEIRO, C. V. Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea* L. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2013.

CHAN, C. H., YUSOFF, R., NGOH, G.C., KUNG, F.W.L. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 6213–6225, 2011.

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

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. *Nucleus*, v. 6, n. 2, p. 33-46, 2009.

CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acribia, v. 1, P. 315, 1976.

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

CHEMAT, F.; LUCCHESI, M. Microwave-assisted extraction of essential oils. *Microwaves in organic synthesis*, A. Loupy, Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p. 959–983, 2006.

CHEN, L.; HOUSTON, D. F. Solubilization and Recovery of Protein from Defatted Rice Bran. AACC Meeting, Chicago, Illinois, v. 47, p. 72-79, 1970.

CHENG, W. M.; RAGHAVAN, G. S. V.; NGADI, M.; WANG, N. Microwave power control strategies on the drying process I. Development and evaluation of new microwave drying system. *Journal of Food Engineering*, v. 76, p. 188–194, 2006.

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

CHO, E. S., H. L. ANDERSON, R. L. WIXOM, K. C. HANSON, G. F. KRAUSE, Long-term effects of low histidine intake on men. *Journal of Nutrition*, v. 114, p. 369–384, 1984.

- CHOI, I.; CHOI, S. J.; CHUN, J. K.; MOON, T.W. Extraction yield of soluble protein and microstructure of soybean affected by microwave heating. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 30, p. 407–419, 2006.
- CHRASTIL, J. correlations between the physicochemical and functional properties of rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 1683-1686, 1992.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira – Grão. *Observatório Agrícola*. v.1, n. 3, 2016
- CONNOR, M. A.; SAUNDERS, R. M.; KOHLER, G. O. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. *Cereal Chemistry*, v. 53, n. 4, p. 488-496, 1976.
- CORBIN, C.; FIDEL, T.; LECLERC, E. A.; BARAKZOY, E.; SAGOT, N.; FALGUIÉRES, A.; RENOUEAU, S.; BLONDEAU, J. P.; FERROUD, C.; DOUSSOT, J.; LAINÉ, E.; HANO, C. 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.
- COSTA, S.; GARIEPY, Y.; ROCHA, S. C. S.; RAGHAVAN, V. Microwave extraction of mint essential oil – Temperature calibration for the oven. *Journal of Food Engineering*, v. 126, p. 1-6, 2014.
- CREMASCO, M. A. *Operações Unitárias em Sistemas Particulados e Fluidomecânicos*, 2ª Edição, Editora Blucher, 2012.
- DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). *Food Chemistry*. 3ª Edição. New York: Marcel Dekker, p. 321-428, 1996.
- DAMODARAN, S. Food proteins: an overview. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Ed.). *Food proteins and their applications*. New York: Maecel Decker, cap. 1, p. 1-24., 1997.
- DANIELSKI, L.; ZETZL, C.; HENSE, H.; BRUNNER, G. A process line for production of raffinated rice oil from rice bran. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 133-8, 2005.
- DENARDIN, C. C.; SILVA, L.P.; BEVILAQUA, P.R. Composição nutricional do farelo de arroz polido e parboilizado. III Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado e XXV Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Balneário Camboriú - SC. Anais. Itajaí - SC: Estação Experimental de Itajaí/ EPAGRI S. A., p.614-616. 2003.
- DORDEVIC, T.; ANTOV, M. Ultrasound assisted extraction in aqueous two-phase system for the integrated extraction and separation of antioxidants from wheat chaff. *Separation and Purification Technology*, v. 182, p. 52–58, 2017.

EMBRAPA, 2004. <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/> Pesquisado em 26/08/14 às 09:36.

EMBRAPA, 2005. <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/> Pesquisado em 12/09/14 às 14:50.

ENOCHIAN, R. V.; SAUNDERS, R. M.; SCHULTZ, W. G.; BEAGLE, E. C. Stabilization of rice bran with extruder cookers and recovery of edible oil: A preliminary analysis of operational and financial feasibility. Marketing Research Report nº 1120, USDA, 1981.

FABIAN, C.; JU, Y. A Review on Rice Bran Protein: Its Properties and Extraction Methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, p. 816–827, 2015. DOI: 10.1080/10408398.2010.482678

FAHMI, R.; KHODAIYAN, F.; POURAHMAD, R.; EMAM-DJOMEH, Z. Effect of Ultrasound Assisted Extraction upon the Protein Content and Rheological Properties of the Resultant Soymilk. *Advance Journal of Food Science and Technology*, v. 3, n. 4, p.245-249, 2011.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. <https://www.fao.org.br/> Pesquisado em 12/09/14 às 09:20.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E08.htm>. Pesquisado em 17/08/17 às 11:39

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, International Year of Rice 2004 Rice is life, 2004. Disponível em <http://www.fao.org/rice2004/en/f-sheet/factsheet3.pdf>. Pesquisado em 06/10/14 às 11:15.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Evaluation of protein quality. Joint FAO/WHO report. Rome: FAO Food Nutrition, 1991.

FARFÁN, J. A. Química de proteínas aplicada a ciência e tecnologia de alimentos. 1ª Edição, Editora da Unicamp, v. 1, n.1, p. 31-63, 1990.

FARIA, S. A. S. C. Caracterização dos farelos de arroz irrigado e de sequeiro submetidos a diferentes técnicas de estabilização. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2008.

FLOSOS, J.D.; LIANG, H. Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials: High-intensity ultrasound accelerates diffusion and can be used to improve food processes. *Food Technology*, v. 48, n. 12, p. 79-84, 1994.

- FONSECA, H. Arroz: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia - Série Extensão Agroindustrial, n.1, Piracicaba – SP, FEALQ, v. 1, 1984.
- FRANCONY, A.; PÉTRIER, C. Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 77, n. 3, 1996.
- GANZLER, K.; SALGÓ, A. Microwave extraction – a new method superseding traditional Soxhlet extraction. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung*, v. 184, p. 274-276, 1987.
- GANZLER, K.; SALGÓ, A.; VALKÓ, K. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 371, p. 299-306, 1986.
- GANZLER, K.; SZINAI, I.; SALGÓ, A. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrixes by a microwave technique. *Journal of Chromatography*, v. 520, p.257-262, 1990.
- GNANASAMBANDAM, R.; HEITARACHCHY, 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.
- GOFF, G. L.; NOBLET, J. Comparative total tract digestibility of dietary energy and nutrients in growing pigs and adult sows. *Journal of Animal Science*, v. 79, p. 2418-2427, 2001.
- HALL, G. M. *Methods of testing protein functionality*. London: Chapman & Hall, p. 265, 1996.
- HAMADA, J. S. Characterization of protein fractions of rice bran to devise effective methods of protein solubilization. *Cereal Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 662-668, 1997.
- HAN, S.; CHEE, K.; CHO, S. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry*, v. 172, p. 766–769, 2015.
- HAQUE, M. A., ALDRED, P., CHEN, J., BARROW, C. J., ADHIKARI, B. Comparative study of denaturation of whey protein isolate (WPI) in convective air drying and isothermal heat treatment processes. *Food Chemistry*, v. 141, p. 702 - 711, 2013.
- HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. *Manual de química fisiológica*. Ateneu, 5ª edição, São Paulo, p. 736, 1982.

- HEMWIMOL, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 13, p. 543–548, 2006.
- HEYWOOD, A. A.; MYERS, D. J.; BAILEY, T. B.; JOHNSON, L. A. Functional properties of low-fat soy flour produced by an extrusion-expelling system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 79, p. 1249–1253, 2002.
- HOU, J.; CAO, C.; MA, X.; IDREES, F.; XU, B.; HAO, X.; LIN, W. From Rice Bran to High Energy Density Supercapacitors: A New Route to Control Porous Structure of 3D Carbon. *Nature, SCIENTIFIC REPORTS*, p. 1-6, 2014. DOI: 10.1038/srep07260
- IONASHIRO, M. A.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. *Cerâmica*, v. 26, n. 121, p.17-24, 1980.
- IONASHIRO, M. GIOLITO, I. Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. Giz Editorial, São Paulo, 2004.
- JARPA-PARRA, M.; BAMDAD, F.; WANG, Y.; TIAN, Z.; TEMELLI, F.; HAN, J.; CHEN, L. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LW T - Food Science and Technology*, v. 57, p. 461-469, 2014.
- JASSIE, L.; REVESZ, R.; KIERSTEAD, T.; HASTY, E.; MATZ, S. Microwave-assisted solvent extraction. *Microwave-enhanced chemistry. Fundamentals, sample preparation, and applications*, Kingston HMS, Haswell SJ. American Chemical Society, Washington, DC; p. 569-609. 1997.
- JIAMYANGYUEN, S.; SRIJESDARUK, V.; HARPER, W. J. Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 27, n. 1, p. 55-64, 2005.
- JU, Z. Y.; HETTIARACHCHY, N. S.; RATH, N. Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *Journal of Food Science*, v. 66, n. 2, p. 229-232, 2001.
- JULIANO, B. O.; BECHTEL, D. B. The rice grain and its gross composition. In B. O. Juliano (Ed.), *Rice: Chemistry and technology*, 2^a Edição, p. 17 – 57, St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, 1985.
- JULIANO, B. O.; VILLAREAL, C. P. Grain quality evaluation of world rices. IRRI - International Rice Reserch Institute, Manila, Philippines, 1993.
- JULIANO, B.O. Rice in human nutrition. IRRI – International Rice Reserch Institute, FAO, Rome, cap. 1, n. 26, p. 1-162, 1993.

- JULIANO, B.O. Rice: Chemistry and Technology. AACC, Sant Paul, p. 182 – 184, 1985.
- KADAM, S. U.; ÁLVAREZ, C.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P. Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. Food Research International, v. 99, p. 1021 –1027, 2017.
- KARKI, B.; LAMSAL, B. P.; JUNG, S.; LEEUWEN, J. H.; POMETTO III, A. L.; GREWELL, D.; KHANAL, S. K. Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. Journal of Food Engineering, v. 96, p. 270–278, 2010.
- KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. Phytochemical Analysis, V. 13, 9. 105-113, 2002.
- KAWAMURA, Y.; MURAMOTO, M. Anti-tumorigenic and immunoactive protein and peptide factors in food stuff. 2. Antitumorigenic factors in rice bran. Food and Cancer Prevention Chemical and Biological Aspects, Waldron K.W., Johnson I.T., and Fenwick L.R., Eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 331–401, 1993.
- KENNEDY, G.; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. Food Chemistry, v. 80, p. 589–596, 2003.
- KENNEDY, G.; BURLINGAME, B.; NGUYEN, N. Nutrient impact assessment of rice in major rice-consuming countries. International Rice Commission Newsletter. v. 51, p. 33-42, 2002.
- KHAN, S. H.; BUTT, M. S.; SHARIF, M. K.; SAMEEN, A.; MUMTAZ, S.; SULTAN, M. T. Functional Properties of Protein Isolates Extracted from Stabilized Rice Bran by Microwave, Dry Heat, and Parboiling. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 2416-2420, 2011. DOI:org/10.1021/jf104177x
- KINSELLA, J.; PHILLIPS, L. Structure-function relationships in food proteins, film and foaming behavior. Journal of the American Oil Chemists Society, p. 52–77, 1989.
- KLEIN, E. J.; SANTOS, K. A.; TAVARES, F.; PINZAN, F.; SILVA, E. A.; VIEIRA, M. G. A. Avaliação do processo de obtenção de extratos de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* C.) utilizando extração assistida por ultrassom. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Campinas, SP, Brasil, 2015.
- KOH, T. S. Ultrasonic preparation of fat-free biological materials for elemental analysis. Analytical Chemistry, v. 55, p. 1814-1815, 1983.

- KORN, M.; ANDRADE, M. V. A. S. Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom. *Analytica*, n. 3, p. 34-39, 2003.
- KRAUSE, M. V.; MAHAN, L. K. Proteína. Alimentos, nutrição e dietoterapia. Roca, 6^a Edição, cap. 5, São Paulo, p.77-100, 1989.
- KUMAGAI, T.; KAWAMURA, H.; FUSE, T.; WATANABE, T.; SAITO, Y.; MASUMURA, T.; WATANABE, R.; KADOWAKI, M. Production of Rice Protein by Alkaline Extraction Improves Its Digestibility. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 52, p. 467–472, 2006.
- KUMORO, A. C.; AINI, N.; RETNOWATI, D. S.; BUDIYATI, C. S. Effect of temperature and particle size on the alkaline extraction of protein from chicken bone waste. *Reaktor*, v. 13, n. 2, p. 124-130, 2010.
- KUNRATH, M. C. Avaliação nutricional do farelo de arroz desengordurado em suínos nas fases de crescimento e terminação utilizando o método de substituição e a análise de regressão. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2010.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAKKAKULA, N. R.; LIMA, M. H, WALKER, T. Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. *Bioresource Technology*, v. 92, p. 157-164, 2004.
- LAMID, M.; AL-ARIF, M. A.; PUSPANINGSIH, N. N. T.; KURNIATI, A.; ASMARANI, O.; WARSITO, S. H. Lignocellulosic enzymes characterization and scanning electron microscope analysis on rice bran surface structure changes. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 1, p. 124-130, 2015.
- LAWAL, O. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, v. 86, p. 345–355, 2004.
- LEFSIH, K.; GIACOMAZZA, D.; DAHMOUNE, F.; MANGIONE, M. R.; BULONE, D.; BIAGIO, P. L. S.; PASSANTINO, R.; COSTA, M. A.; GUARRASI, V.; MADANI, K. Pectin from *Opuntia ficus indica*: Optimization of microwave-assisted extraction and preliminary characterization. *Food Chemistry*, v. 221, p. 91–99, 2017.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica, Sarvier, 2^a Edição, São Paulo, 1995.

- LETELLIER, M.; BUDZINSKI, H.; BELLOCQ, J.; CONNAN, J. Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks. *Organic Geochemistry*, v. 30, p. 1353- 1365, 1999.
- LI, J.; ZU, Y. G.; FU, Y. J.; YANG, Y. C.; LI, S. M.; LI, Z. N.; WINK, M. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11, 637-643, 2010.
- LIMA, G. J. M. M.; MARTINS, R. R.; ZANOTTO, D. L.; BRUM, P. A. R. Composição química e valores de energia de subprodutos do beneficiamento de arroz. CT / 244 / Embrapa Suínos e Aves, p. 2, 2000.
- LIU, Y.; ZHAO, G.; REN, J.; ZHAO, M.; YANG, B. Effect of denaturation during extraction on the conformational and functional properties of peanut protein isolate. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 12, p. 375–380, 2011.
- LOSSO, J. N.; BANSODE, R. R.; BAWADI, H. A. Perfusion chromatography purification of a 15 kDa rice prolamin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 7122-7126, 2003.
- LU, J. J.; CHANG, T. T. Rice in its temporal and spatial perspective. AVI Publishing Company, Westport, CT, USA, p. 1-74, 1980.
- LUH, B. S.; BARBER, S.; de BARBER, C. B. Rice: Utilization. 2ª Edição, New York, Van Nostrand Reinhold, v.2, p. 313 – 362, 1991.
- LUMEN, B.O.; CHOW, H. Nutritional quality of rice endosperm. Rice utilization. Van Nostrand Reinhold, 2ª Edição, New York, v. 2, cap. 15, p. 363-395, 1995.
- LUZ, L. P. Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 1998.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; OSSA, E. M.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, v. 77, n. 3, p. 948-952, 2009.
- MAGALHÃES, C.S. Avaliação comparativa de procedimentos de extração de proteínas em plantas medicinais e fitoterápicos e quantificação de metais associados a essas proteínas. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2008.

- MANDAL, V.; MOHAN, Y.; HEMALATHA, S. Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, v. 1, p. 7-18, 2007.
- MAO, X.; HUA, Y. Composition, Structure and Functional Properties of Protein Concentrates and Isolates Produced from Walnut (*Juglans regia* L.), *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 1561-1581, 2012. DOI: 10.3390/ijms13021561
- MARAGNO, V. P.; KUHN, R. C. Estabilidade do farelo de arroz sob diferentes tratamentos: micro-ondas, peletização e desengorduramento. *Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 15, n. 1, p. 47-53, 2013.
- MARAN, J. P.; PRIYA, B. Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. *Journal of Food Science and Technology*, v. 53, n. 1, p. 792-799, 2016. DOI: 10.1007/s13197-015-1988-8
- MASON, T. J.; CHEMAT, F.; VINATORU, M. The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry*, v. 15, p. 237-247, 2011.
- McKEVITH, B. Nutricional aspects of cereal. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, v. 29, p. 111–142, 2004.
- MEIRELES, M. A. A. Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications, 1ª Edição, cap. 4, Florida: CRC Press, 2009.
- MERRILL, A. L.; WATT, B. K. Energy Value of Foods: Basis and Derivation. *Agriculture Handbook*, Washington DC, ARS United States Department of Agriculture. p. 74, 1973.
- MESSIAS, R. F. Fracionamento enzimático do farelo integral de arroz parboilizado. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, 2005.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/> Pesquisado em 26/06/2014.
- MOHAMED, A.; BIRESAW, G.; XU, J.; HOJILLA-EVANGELISTA, M. P.; RAYAS-DUARTE, P. Oats protein isolate: Thermal, rheological, surface and functional properties. *Food Research International*, v. 42, p. 107–114, 2009.
- MOREIRA, M. M.; BARROSO, M. F.; BOEYKENS, A.; WITHOUCK, H.; MORAIS, S.; DELERUE-MATOS, C. Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops & Products*, v. 104, p. 210–220, 2017.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEINS, J. M.; BUREN, J. P. V.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, v. 50, p. 1715-1718, 1985.

MOULTON, K. J.; WANG L. C. A pilot study of continuous ultrasonic extraction of soyabean protein. *Journal of Food Science*, v. 127, n. 47, p. 1127-1129, 1982.

NAGATANI, T.; SAITO, S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. *Scanning Microscopy*, v. 11, p. 901-909, 1987.

NAKAI, S.; CHAN, L. Structure modification and functionality of whey proteins: quantitative structure-activity relationship approach. *Journal of Dairy Science*, v. 68, n. 10, p. 2763-2772, 1985.

NASCIMENTO, C. A. M. Propriedades nutritivas e medicinais do arroz. Comissão de Agricultura, Pecuária, Abastecimento e Desenvolvimento Rural Audiência Pública, Brasília, Brasil, 2007.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*, 6^a Edição, Porto Alegre: Artmed, 2014.

NORMAND, F. L.; MARSHALL, W. E. Differential Scanning Calorimetry of Whole Grain Milled Rice and Milled Rice Flour. *Cereal Chemistry Journal*, v. 66, n. 4, p. 317-320, 1989.

OCHOA-RIVAS, A.; NAVA-VALDEZ, Y.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; CHUCK-HERNÁNDEZ, C. Microwave and Ultrasound to Enhance Protein Extraction from Peanut Flour under Alkaline Conditions: Effects in Yield and Functional Properties of Protein Isolates. *Food Bioprocess Technology*, v. 10, p. 543–555, 2017. DOI: 10.1007/s11947-016-1838-3.

OLIVEIRA, L.; OHARA, M. A.; CANAN, C. Extração de proteínas do farelo de arroz utilizando diferentes condições de ultrassom. XVII SICITE - Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR, Medianeira – PR, 2012.

OLIVEIRA, M. S.; FEDDERN, V.; KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8335–8338, 2011.

- ORDÓÑEZ, J. A.; RODRIGUES, M. I. C.; ALVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MIGUILLON, G. D. G. F; PERALES, L. H; CORTECERO, M. D S. *Tecnologia de alimentos - Componentes dos Alimentos e Processos*. v. 1. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- ORTHOEFER, F. T. Rice bran oil: Healthy liquid source. *Food Technology*, v. 50, n. 12, p. 62-64, 1996.
- OSBORNE, T. B. *The vegetable proteins*, 2ª Edição, London: Longsman-Green, p. 125, 1924.
- PARAMAN, I.; HETTIARACHCHY, N. S.; SCHAEFER, C.; BECK, M. I. Physicochemical Properties of Rice Endosperm Proteins Extracted by Chemical and Enzymatic Methods. *Cereal Chemistry Journal*, v. 83, n. 6, p. 663–667, 2006. DOI: 10.1094 / CC-83-0663
- PARE, P.; BELANGER, J. *Microwaves-assisted process (MAP): principles and applications*, *Instrumental Methods in Food Analysis*. Elsevier Sciences BV, Amsterdam, p. 395–420, 1997.
- PARK, S.; BEAN, S. R. Investigation and Optimization of the Factors Influencing Sorghum Protein Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 7050-7054, 2003.
- PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F.; TERÁN, L. C.; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract, with potential use as functional food. *Food Chemistry*, v. 98, p. 742-747, 2006.
- PARTHASARATHI, S.; EZHILARASI, P. N.; JENA, B. S.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. A comparative study on conventional and microwave-assisted extraction for microencapsulation of *Garcinia* fruit extract. *Food and Bioproducts Processing*, v. 91, p. 103-110, 2013.
- PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIANI, R. C. Farelo de arroz: características, benefícios à saúde e aplicações. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)*, Curitiba v. 26, n. 1, p. 29-40, 2008.
- PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. E. Protein Stability. In: PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. E. *Structure, Function and Properties of Food Proteins*. New York: Academic Press, cap. 2, p. 25-61, 1994.
- PHONGTHAI, S.; LIM, S.; RAWDKUEN, S. Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of Cereal Science*, v. 70, p. 146-154, 2016.

- PHONGTHAI, S.; LIM, S.; RAWDKUEN, S. Ultrasonic-assisted extraction of rice bran protein using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry*, v. 41, p. 1-11, 2017.
- PIMENTEL, M. A.; PEIXOTO, R. R. Desaleitamento precoce de terneiros. II – Valor do farelo de arroz em rações. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v. 12, n. 4, p. 654-666, 1983.
- PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. A.; MENEZES, M. E. S. A química dos alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais. Edufal - Editora da Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, 2005.
- PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 179-187, 2006.
- PRAKASH, J.; RAMANATHAM, G. Effect of stabilization of rice bran on the extractability and recovery of proteins. *Nahrung/Food*, v. 38, p. 87 - 95, 1994.
- PREECE, K. E.; HOOSHYAR, N.; ZUIDAM, N. J. Whole soybean protein extraction processes: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 43, p. 163–172, 2017.
- RAMEZANZADEH, F. M.; RAO, R. M.; WINDHAUSER, M.; PRINYAWIWATKUL, W.; TULLEY, R.; MARSHALL, W. E. Prevention of hydrolytic rancidity in bran during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 3050-3052, 1999.
- RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L. Amino acid availability in poultry - in vitro and in vivo measurements. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 50, p. 889-908, 1999.
- RENKEMA, J. M. S.; LAKEMOND, C. M. M.; JONGH, H. H. J.; GRUPPEN, H.; VLIET, T. V. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. *Journal of Biotechnology*, v. 79, n. 3, p. 223-30, 2000.
- RESTLE, J.; ROSO, C.; AITA, V.; NÖRNBERG, J. L.; BRONDANI, I. L.; CERDÓTES, L.; CARRILHO, C. O. Produção Animal em Pastagem com Gramíneas de Estação Quente. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 3, p. 1491-1500, 2002.
- RHEE, K. C.; CATER, C. M.; MATTIL, K. F. Effect of processing pH on the Properties of Peanut Protein Isolates and Oil. *American Association of Cereal Chemists, Inc., Pilot Knob Road*, v. 50, p. 395-404, 1973.

- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de Alimentos. 2ª Edição, São Paulo: Edgard Blucher, 2007.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. Edgard Blücher - Instituto Mauá de Tecnologia, São Paulo, p. 184, 2004.
- ROCHA, C. A. Efeito do tratamento por microondas do arroz recém colhido no rendimento de grãos inteiros, na qualidade de cozimentos e na estabilização do farelo. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2002.
- RODRIGUES, C. E. C.; FILHO P. A. P.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibrium for the system rice bran oil + fatty acids + ethanol + water + γ -oryzanol + tocols. *Fluid Phase Equilibria*, v. 216, p.2 71–283, 2004.
- RODRIGUES, C. E. C.; ONOYAMA M. M.; MEIRELLES, A. J. A. Optimization of the rice bran oil deacidification process by liquid-liquid extraction. *Journal of Food Engineering*, v. 73, n. 4, p. 370-378, 2006.
- RODWELL, V. W. Amino acids. *Harper's biochemistry*. Stamford: Appleton & Lange, 24ª Edição, p. 868, 1996.
- ROMDHANE, M.; GOURDON, C. Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, v. 87, p. 11–19, 2002.
- ROMERO, A.; BEAUMAL, V.; DAVID-BRIAND, E.; CORDOBAS, F.; GUERRERO, A.; ANTON, M. Interfacial and emulsifying behaviour of rice protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, v. 29, p. 1-8, 2012.
- ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*. v. 1012, p. 119–128, 2003.
- RUSSIN, T. A.; ARCAND, Y.; BOYE, J. I. Particle size effect on soy protein isolate extraction. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 31, p. 308-319, 2007.
- SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. *Journal of Nutrition*, v. 127, p. 758-764, 1997.
- SAUNDERS, R. M. Rice bran: composition and potential food sources. *Food Reviews International* 1, v. 3, p. 465–495. 1985.
- SAUNDERS, R. M. The properties of rice bran as a foodstuff. *Cereal Foods World*, v. 35, n. 7, p. 632 – 636, 1990.

- SEREEWATTHANAWUT, I.; PRAPINTIP, S.; WATCHIRARUJI, K.; GOTO, M.; SASAKI, M.; SHOTIPRUK, A. Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 555-561, 2008.
- SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos proteicos; propriedades, degradações, modificações. Varela, São Paulo, p. 517, 1996.
- SGARBIERI, V.C. Alimentação e Nutrição - Fator de Saúde e Desenvolvimento. Almed, São Paulo, p. 250-261, 1987.
- SHIH, F. F.; CHAMPAGNE, E. T.; DAIGLE, K.; ZARINS, Z. Use of enzymes in the processing of protein products from rice bran and rice flour. *Nahrung*, v. 43, n. 1, p. 14 – 18, 1999.
- SHIH, F. F.; DAIGLE, K. W. Preparation and Characterization of Rice Protein Isolates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 77, n. 8, p. 885-889, 2000.
- SICHERI, R.; COITINHO, D. C.; MONTEIRO, J. B.; COUTINHO, W. F. Recomendações de Alimentação e Nutrição Saudável para a População Brasileira. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 44, n. 3, p. 227-232, 2000.
- SIENKO, M. J.; PLANE, R. A. Química. Companhia Editora Nacional, 7ª Edição, São Paulo, p. 605, 1976.
- SILVA, J. B.; BORA, P. S.; NETO, V. Q. Caracterização de propriedades funcionais do isolado protéico de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora*) modificado por acetilação. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, p. 1-30, 1997.
- SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. *Journal of Food Engineering*, v. 75, p. 487- 494, 2006.
- SILVA, P. M. Isolado Protéico de Farelo de Arroz: Obtenção, Propriedades Funcionais e Aplicação. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, 2012.
- SIRIKUL, A.; MOONGNGARM, A.; KHAENGKHAN, P. Comparison of proximate composition, bioactive compounds and antioxidant activity of rice bran and defatted rice bran from organic rice and conventional rice. *Journal of Agricultural & Food Industrial Organization*, v. 2, n. 4, p. 731-743, 2009.
- SOTELO, A.; HERNANDEZ, M.; MONTALVO, I.; SOUZA, V. Amino acid content and protein biological evaluation of 12 Mexican varieties of rice. *Cereal Chemistry*, v. 71, n. 6, p. 605-609, 1994.

- SOUZA, D.; SBARDELOTTO, A. F.; ZIEGLER, D. R.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C. Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method. *Food Chemistry*, v. 191, p. 36–44, 2016.
- STEWART, F. C.; LYNDON, R. F.; BABER, J. T. Acrylamide gel electrophoresis of soluble plant proteins: a study on pea seedlings in relation to development. *American Journal of Botany*, v. 52, n. 2, p. 155-164, 1965.
- STONE, A. K.; KARALASH, A.; TYLER, R. T.; WARKENTIN, T. D.; NICKERSON, M. T. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, v. 76, p. 31-38, 2015.
- STORCK, C. R.; SILVA, L. P.; FAGUNDES, C. A. A. Categorizing rice cultivars based on differences in chemical composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 18, p. 333–341, 2005.
- SUSLICK, K. S. Ultrasound: its chemical, physical, and biological effects. In: SUSLICK, K.S. (Ed.). *Ultrasound*. New York: VCH, p.123-164, 1988.
- SWAIN, M. J.; JAMES, S. J.; SWAIN, M. V. L. Effect of continuous (intermittent) use on the power output of domestic microwave ovens. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 41, p. 652–656, 2006.
- TAAMALLI, A.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; IBANEZ, E.; ZARROUK, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, A. Optimization of Microwave-Assisted Extraction for the Characterization of Olive Leaf Phenolic Compounds by Using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS². *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 791 – 798, 2012.
- TAIRA, H. Grain quality: physicochemical properties and quality of rice grains. *Science of the rice plant – Physiology*. Food and Agriculture Police Research Center, Tokyo, v. 2, cap. 6.1, p. 1063-1089, 1995.
- TANG, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.; ESWARANANDAM, S. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes. *Journal of Food Science*, v.68, p.152–157, 2003.
- TECSON, E. M.; ESMAMA, B. V.; LONTOK, L. P.; JULIANO, B. O. Studies on the Extraction and Composition of Rice Endosperm Glutelin and Prolamin, *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, v. 48, p. 168-181, 1971.

THEERAKULKAIT, C.; CHAISERI, S.; MONGKOLKANCHANASIRI, S. Extraction and Some Functional Properties of Protein Extract from Rice Bran. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, v. 40, p. 209-214, 2006.

THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SIVAKUMAR, V.; MARAN, J. P. Process optimization and analysis of microwave assisted extraction of pectin from dragon fruit peel. *Carbohydrate Polymers*, v. 112, p. 622–626, 2014.

THUÉRY, J. Microwaves and matter. *Microwaves: Industrial, Scientific and Medical Applications*, Grant EH, Parte 1, Londres, p. 83-125, 1992.

TOLDRÁ, F.; NOLLET, L. M. L. Proteomics in Foods - Principles and Applications. *Food Microbiology and Food Safety*, v. 2, 2013.

TSUKUI, A. Extração assistida por micro-ondas de óleo de café verde (*Coffea arabica* L.) e quantificação de diterpenos por cromatografia líquida de alta eficiência. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2013.

USMAN, M.; ISHFAQ, M. T.; MALIK, S. R.; ISHFAQ, B.; IQBAL, M. Effects of Temperature, pH and Steeping Time on the Extraction of Starch from Pakistani Rice. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, v. 5, n. 6, p. 887-892, 2014.

VIEIRA, C. R.; JUNIOR, C. O. L.; RAMOS, C. S.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M. P. C. Extração enzimática das proteínas da farinha de arroz. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 28, n. 3, p. 599-606, 2008.

VIEIRA, N. R. A.; RABELO, R. R. Qualidade tecnológica. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. *A cultura do arroz no Brasil*. 2ª edição, Santo Antônio da Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 869-900, 2006.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. v. 8, p. 303–313, 2001.

VOJDANI, F. Solubility. *Methods of testing protein functionality*. Blackie Academic & Professional, Londres, cap. 2, p. 11-60, 1996.

WANG, C. Y.; LUH, B. S. *Rice: Production*. 2ª Edição, cap. 9, p. 311 – 345, 1991.

WANG, C.; XU, F.; LI, D.; ZHANG, M. Physico-chemical and Structural Properties of Four Rice Bran Protein Fractions Based on the Multiple Solvent Extraction Method. *Czech Journal of Food Sciences*, n. 2, v. 33, p. 283-291, 2015.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of natural products from plants. *Trends in Food Science and Technology*, v. 17, p. 300-312, 2006.

- WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 411-416, 1999.
- WANG, S. H.; FERNANDES, S. M.; CABRAL, L. C. Solubilidade de nitrogênio, dispersibilidade de proteína e propriedades emulsificantes dos extratos hidrossolúveis desidratados de arroz e soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, p.12-17, 2000.
- WEBER, K.; OSBORN, M. Proteins and sodium dodecyl sulfate:molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. *The proteins*. Academic Press, New York, v. 1, p. 179-233, 1975.
- WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry of Clinical Laboratory Automation*, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.
- WU, J.; LIN, L.; CHAU, F. T. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells, *Ultrasonics Sonochemistry*. v. 8, 347–352, 2001.
- XIA, N.; WANG, J.; GONG, Q.; YANG, X.; YIN, S.; QI, J. Characterization and *In Vitro* digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted micro fluidization: Comparison to alkaline extraction. *Journal of Cereal Science*, v. 56, p. 482-489, 2012.
- XIAO, W.; HAN, L.; SHI, B. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix astragali*. *Separation and Purification Technology*, v. 62, p. 614–618, 2008.
- YEOM, H.; LEE, E.; HA, M.; HA, S.; BAE, D. Production and Physicochemical Properties of Rice Bran Protein Isolates Prepared with Autoclaving and Enzymatic Hydrolysis. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, v. 53, n. 1, p. 62-70, 2010.
- YOUSSEF, A. M.; EL-FOULY, M. M.; EL-BAZ, F. K. Isolation and Chemical Composition of Protein Concentrates from Soya-Bean, Rice-Bran and Protelan. *Qualitas Plantarum*, v. 24, p. 71-84, 1974.
- ZEKOVIC, Z.; PINTAC, D.; MAJKIV, T.; VIDOVIC, S.; MIMICA-DUKIC, N.; TESLIC, N.; VERSARI, A.; PAVLIC, B. Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery - Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, v. 99, p. 49–59, 2017.
- ZHOU, L.; YANG, Y.; REN, H.; ZHAO, Y.; WANG, Z.; WU, F.; XIAO, Z. Structural Changes in Rice Bran Protein upon Different Extrusion Temperatures: A Raman

Spectroscopy Study. *Journal of Chemistry*, v. 2016, p. 1-8, 2016. DOI: 10.1155/2016/6898715.

ZHU, J. H.; ZOU, X. R.; CHEN, X. T. Study on the microwave extraction of protein from broken Rice. *Modern Food Science Technology*, 2013.

ANEXO

Anexo 1 – Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade.

GL V2	V1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	243.9	244.7	245.4	245.9	248.0	251.1	252.2	253.3	253.8
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.446	19.471	19.479	19.487	19.492
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.660	8.594	8.572	8.549	8.538
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.803	5.717	5.688	5.658	5.643
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.558	4.464	4.431	4.398	4.382
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.874	3.774	3.740	3.705	3.687
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.445	3.340	3.304	3.267	3.249
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.150	3.043	3.005	2.967	2.947
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.936	2.826	2.787	2.748	2.727
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.774	2.661	2.621	2.580	2.559
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.646	2.531	2.490	2.448	2.426
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.544	2.426	2.384	2.341	2.319
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.459	2.339	2.297	2.252	2.230
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463	2.388	2.266	2.223	2.178	2.155
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.328	2.204	2.160	2.114	2.090
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.276	2.151	2.106	2.059	2.035
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308	2.230	2.104	2.058	2.011	1.986
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.191	2.063	2.017	1.968	1.943
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.155	2.026	1.980	1.930	1.905
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.124	1.994	1.946	1.896	1.870
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321	2.283	2.250	2.222	2.197	2.176	2.096	1.965	1.916	1.866	1.839
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.259	2.226	2.198	2.173	2.151	2.071	1.938	1.889	1.838	1.811
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275	2.236	2.204	2.175	2.150	2.128	2.048	1.914	1.865	1.813	1.785
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255	2.216	2.183	2.155	2.130	2.108	2.027	1.892	1.842	1.790	1.762
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.198	2.165	2.136	2.111	2.089	2.007	1.872	1.822	1.768	1.740
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220	2.181	2.148	2.119	2.094	2.072	1.990	1.853	1.803	1.749	1.720
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204	2.166	2.132	2.103	2.078	2.056	1.974	1.836	1.785	1.731	1.702
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190	2.151	2.118	2.089	2.064	2.041	1.959	1.820	1.769	1.714	1.685
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177	2.138	2.104	2.075	2.050	2.027	1.945	1.806	1.754	1.698	1.669
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.126	2.092	2.063	2.037	2.015	1.932	1.792	1.740	1.683	1.654
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	2.038	2.003	1.974	1.948	1.924	1.839	1.693	1.637	1.577	1.544
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026	1.986	1.952	1.921	1.895	1.871	1.784	1.634	1.576	1.511	1.476
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993	1.952	1.917	1.887	1.860	1.836	1.748	1.594	1.534	1.467	1.430
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951	1.910	1.875	1.845	1.817	1.793	1.703	1.545	1.482	1.411	1.370
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.886	1.850	1.819	1.792	1.768	1.676	1.515	1.450	1.376	1.333
120	3.920	3.072	2.680	2.447	2.290	2.175	2.087	2.016	1.959	1.910	1.869	1.834	1.803	1.775	1.750	1.659	1.495	1.429	1.352	1.307
240	3.881	3.033	2.642	2.409	2.252	2.136	2.048	1.977	1.919	1.870	1.829	1.793	1.761	1.733	1.708	1.614	1.445	1.375	1.290	1.237