

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Obtenção e caracterização de concentrados e
hidrolisados proteicos a partir do coproduto arroz
quebrado: da extração alcalina aos processos de
separação por membranas**

- Tese de Doutorado -

Daiana de Souza

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Obtenção e caracterização de concentrados e
hidrolisados proteicos a partir do coproduto arroz
quebrado: da extração alcalina aos processos de
separação por membranas**

Daiana de Souza

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Engenharia.

Área de Concentração: Fenômenos de
Transporte e Operações Unitárias

Orientadoras:

Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Tessaro

Prof^a. Dr^a. Lígia Damasceno Ferreira

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado “*Obtenção e caracterização de concentrados e hidrolisados proteicos a partir do coproduto arroz quebrado: da extração alcalina aos processos de separação por membranas*”, elaborado por Daiana de Souza, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia.

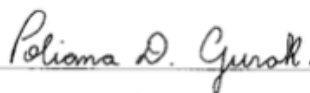
Comissão Examinadora:



Prof.^a. Dr.^a. Helen Treichel
Universidade Federal da Fronteira Sul



Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof.^a. Dr.^a. Poliana Deyse Gurak
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

“A lei da mente é implacável. O que você pensa, você cria; o que você sente, você atrai;
o que você acredita, torna-se realidade.”

Buda

Aos grandes amores da minha vida:
Everton, meu marido, pelo amor e compreensão incondicionais;
meus filhos queridos João Pedro e o bebê que está a caminho, pela confiança e
alegria de viver;
Wilmar e Luíza, meus pais, pela oportunidade de mais esta encarnação e pela
formação moral ensinada ao longo desta existência;
Tiago, meu irmão, pelo exemplo de vida.
Dedico.

Agradecimentos

“Não são as coisas bonitas que marcam nossas vidas, mas sim as pessoas que têm o dom de jamais serem esquecidas!”

Inicialmente eu gostaria de agradecer à Profa. Denise Ziegler, pela confiança dedicada ao permitir que uma ideia nascida no itt Nutrifor pudesse ser desenvolvida ao longo deste trabalho. Ainda, pela presença constante, conselhos e empenho em auxiliar sempre que necessário.

Às queridas Professoras Isabel Tessaro e Ligia Marczak, pela paciência em orientar uma aluna pouco presente fisicamente no DEQUI, mas que estava sempre ligada aos fortes conceitos aprendidos ao longo da formação do PPGEQ. Obrigada pela parceria, suporte em todos os momentos e grandes ideias para a solução de problemas enfrentados.

À equipe itt Nutrifor, seus professores e funcionários, pelo auxílio contínuo. Em especial à Profa. Laura Pinto e à Profa. Renata Ramos, pelas discussões científicas e ensinamentos que contribuíram muito para este trabalho. Aos Professores Juliano Garavaglia e Isabel Machado, e à colega Priscilla Ocanha, pela presença e apoio constantes, e às colegas Engenheiras de Alimentos Aline Centa e Ariani Schmidt, por estarem sempre dispostas a ajudar. Ao futuro Engenheiro de Materiais Arthur Sbardelotto, por sua longa e preciosa dedicação a esta pesquisa na execução de experimentos, na solução de problemas, no apoio em momentos difíceis e na vibração nos momentos de alegria.

A todos os queridos alunos de graduação que aceitaram participar desta pesquisa (Eng. Ivo Bassani, Eng. André Sabino, Eng. Viviane Arrozi), em especial aos hoje Engenheiros de Alimentos Carolina Gomes, Alisson Oliveira e Aline Centa, pela confiança depositada e dedicação constante.

À colega Profa. Liziane Lacerda, pelas contribuições a este trabalho. À equipe da Joaquim Oliveira Participações SA – JOSAPAR, pela parceria de longa data e apoio contínuo a esta pesquisa.

Aos membros da Banca de Qualificação deste trabalho, Prof. José Carlos Petrus, Profa. Simone Flores e Eng. Dr. Maurício Kipper, pelos conselhos que muito contribuíram para o direcionamento desta pesquisa.

Aos colegas do itt Fuse (UNISINOS) e LACER (UFRGS), pela parceria na realização de ensaios.

Aos colegas de doutorado do DEQUI, em especial, Profa. Giovana Mercali e Eng. Dr. Alan Ambrosi, pelo auxílio científico e parceria.

A todos os que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

E finalmente a Deus, pela bênção da vida, por ter me dado uma família maravilhosa que é o suporte fundamental de tudo, e por ter posto ao meu lado cada uma destas pessoas acima citadas que tornaram o meu caminho tão repleto de felicidade e realizações.

MUITO OBRIGADO!

Resumo

O Brasil é um grande produtor de *commodities* alimentícias, e hoje o desenvolvimento da indústria de ingredientes para a geração de insumos de maior valor agregado a partir destas matérias-primas é uma área pouco explorada pelas indústrias brasileiras. O arroz se destaca no agronegócio brasileiro, já que o país figura como o nono maior produtor mundial. O arroz quebrado é um coproduto do beneficiamento do arroz branco polido. Este estudo teve como objetivo propor e avaliar um processo de obtenção de concentrados e hidrolisados proteicos de arroz, contribuindo na oferta de estratégias para o desenvolvimento tecnológico do setor no Brasil. Adicionalmente, deseja-se auxiliar na valoração do coproduto arroz quebrado, alimento de baixo valor comercial, base para a geração de matérias-primas já encontradas internacionalmente, e que apresentam grande potencial de desenvolvimento no mercado brasileiro. Dentro deste contexto, buscou-se estudar a aplicação da tecnologia de membranas neste processo, por ser uma tecnologia limpa, de baixo consumo energético, já bem estabelecida e com aplicações crescentes na indústria de alimentos. O estudo iniciou com a avaliação da eficácia de um método rápido de extração alcalina de amido e proteína de arroz, no qual foi utilizada farinha de arroz derivada de arroz quebrado como matéria-prima, ao invés dos grãos quebrados, como no método tradicional. Nesse estudo, a partir do uso de uma razão substrato:solvente de 1:15, a etapa de extração foi realizada em estágio único a 30 °C em apenas 30 minutos – um curto tempo de extração se comparado ao método alcalino tradicional (24-48h). O rendimento da extração proteica com estas condições foi bastante elevado, atingiu 81,4 %. Observou-se ser possível realizar uma extração eficiente, com a minimização das reações indesejadas causadas pelo meio alcalino. Na segunda etapa foram avaliadas as propriedades funcionais do concentrado proteico obtido a partir do método rápido de extração alcalina. Além disso, suas propriedades foram comparadas com as de dois concentrados proteicos comerciais produzidos por extração enzimática. Foi observado que todos os concentrados proteicos avaliados apresentaram pobres propriedades funcionais, devido sobretudo a suas baixas solubilidades em condições de pH próximas à neutralidade e levemente ácidas, concluindo-se ser necessário estudos que visem a melhoria da solubilidade destas proteínas quando se busca uma aplicação mais abrangente das mesmas como ingredientes. Os resultados obtidos na primeira etapa deste estudo motivaram inicialmente o emprego da microfiltração na separação das correntes de amido e proteína do extrato alcalino, analisando a possibilidade de se obter um amido com elevada pureza e uma corrente de permeado contendo a proteína extraída. A análise global dos resultados obtidos nesse trabalho permite que seja destacado que a escolha da microfiltração para o processo de separação do amido e da proteína de arroz deve ser avaliada com cautela. Na quarta etapa deste estudo avaliou-se a aplicação da hidrólise enzimática parcial do concentrado proteico na solubilização da proteína de endosperma de arroz. A hidrólise parcial, realizada com Alcalase®, permitiu a solubilização de 40 % da proteína originalmente presente na suspensão de proteína extraída pelo método alcalino. Os peptídeos solúveis gerados apresentaram massa molar média de $1,18 \pm 0,33$ kDa, solubilidade proteica superior a 88,5 % na faixa de pH de 3 a 7 e boa capacidade de formação de espuma, apesar de formarem uma espuma de baixa estabilidade. Neste estudo o hidrolisado proteico foi concentrado e purificado por ultrafiltração, o que permitiu a redução de 68 % do conteúdo de sódio do produto. Concluiu-se que neste estudo foi possível propor um processo produtivo que permitiu a obtenção de ingredientes com adequadas propriedades nutricionais e funcionais a partir do coproduto arroz quebrado.

Palavras-chave: Arroz quebrado. Concentrados proteicos de arroz. Extração alcalina. Hidrolisados proteicos de arroz. Microfiltração. Ultrafiltração. Solubilidade proteica.

Abstract

The Brazil is a large producer of food commodities, and today the development of the industry of ingredients to add value to these raw materials is an area little explored by the Brazilian industries. Rice stands out in the Brazilian agribusiness, as the country is the ninth largest producer. The broken rice is a byproduct derived from the processing of polished rice. This study aimed to propose and evaluate a process of obtaining rice protein concentrates and hydrolysates contributing to offer strategies for the technological development of the sector in Brazil. Additionally, it aims to assist in the valuation of the byproduct broken rice, a low commercial value food which is the basis for the generation of raw materials already found internationally, and which have great potential in the Brazilian market. Within this context, it sought to study the application of membrane technology in this process, because it is a clean, low-energy, well-established technology, with growing applications in the food industry. The study began with the evaluation of the effectiveness of a fast alkaline extraction method for obtaining rice starch and protein, using rice flour derived from broken rice as raw material, instead of broken grains, as in the traditional method. In this study, with the use of a substrate:solvent ratio of 1:15, the extraction step was performed in a single stage at 30 °C in 30 minutes - a short extraction time compared to traditional alkaline method (24-48h). The yield of protein extraction with these conditions was very high, reached 81.4%. It was possible to perform an efficient extraction, with the minimization of undesired reactions caused by the alkaline medium. In the second stage of this study were evaluated the functional properties of the protein concentrate obtained by the fast alkaline extraction method. In addition, their properties were compared with two commercial concentrated protein produced by enzymatic extraction. It was observed that all the evaluated protein concentrates showed poor functional properties, mainly due to their low solubility at pH conditions close to neutrality and slightly acidic, concluding that it is necessary studies aimed to improve the solubility of these proteins in order to seek more applications of this ingredient. The results obtained in the first step of this study initially motivated the use of microfiltration to separate the starch and protein chains of the alkali extract, analyzing the possibility of obtaining a starch with high purity and a permeate stream containing the extracted protein. The global analysis of the results obtained in this work allows it to be noted that the choice of microfiltration for the separation process of starch and rice protein should be evaluated with caution. In the fourth stage of this study was evaluated the application of the partial enzymatic hydrolysis in solubilization of rice endosperm protein. The partial hydrolysis performed with Alcalase allowed solubilization of 40% of the protein originally present in the protein suspension extracted by the alkaline method. The generated soluble peptides had molecular weight average of 1.18 ± 0.33 kDa, protein solubility higher than 88.5 % in the pH range 3 to 7, and good foaming ability, while forming a low stable foam. In this study, the protein hydrolyzate was concentrated and purified by ultrafiltration, allowing 68 % reduction in the sodium content of the product. It is concluded that in this study was proposed a production process allowing obtaining ingredients with suitable nutritional and functional properties from the byproduct broken rice.

Keywords: Broken Rice. Rice protein concentrates. Alkaline extraction. Rice protein hydrolysates. Microfiltration. Ultrafiltration. Protein solubility.

Sumário

1 Introdução	1
2 Fundamentos Teóricos.....	7
2.1 Arroz.....	7
2.1.1 Estrutura e composição química do grão de arroz	8
2.1.2 Pós-colheita e beneficiamento do arroz	20
2.2 Processos de Separação por Membranas	23
2.2.1 Classificação dos PSM	24
2.2.2 Modos de operação.....	25
2.2.3 Princípios dos PSM.....	26
2.2.4 Fatores externos que afetam a performance da membrana.....	30
2.2.5 Fluxo limite e fluxo crítico	31
2.3 Referências.....	32
3 Revisão Bibliográfica: Ingredientes obtidos a partir do coproduto arroz quebrado..	37
3.1 Artigo 1	38
3.1.1 Introdução	40
3.1.2 Amido de arroz	42
3.1.3 Proteína de arroz.....	44
3.1.4 Tecnologias de Extração de Amido e Proteína de Arroz	48
3.1.5 Hidrolisados proteicos de arroz	58
3.1.6 Considerações finais	61
3.1.7 Referências	62
3.2 Questões de pesquisa.....	66
4 Revisão Bibliográfica: Microfiltração e Ultrafiltração nas Indústrias de amido, proteínas e hidrolisados proteicos vegetais.....	69
4.1 Artigo 2	70
4.1.1 Introdução.....	72
4.1.2 Microfiltração na separação e purificação de suspensões de amido	74
4.1.3 Ultrafiltração na concentração de proteínas vegetais.....	76
4.1.4 Ultrafiltração no fracionamento e purificação de hidrolisados proteicos	79
4.1.5 Considerações finais	85
4.1.6 Referências	86
4.2 Questões de pesquisa.....	90
5 Metodologia.....	91
5.1 Materiais	93
5.2 Caracterização da Matéria-prima.....	93
5.2.1 Caracterização centesimal.....	93
5.2.2 Distribuição do tamanho de partículas.....	94
5.2.3 Teor de amido danificado.....	94
5.2.4 Teores de aminoácidos	94
5.2.5 Perfil proteico - SDS-PAGE.....	95
5.2.6 Análise térmica.....	95
5.2.7 Análises Morfológicas	96
5.3 Estudo da extração alcalina e caracterização dos produtos	96
5.3.1 Extração alcalina	97

5.3.2	Caracterização dos produtos	99
5.4	Propriedades funcionais do concentrado proteico	100
5.4.1	Propriedades funcionais	100
5.5	Estudo da microfiltração e caracterização dos produtos	103
5.6	Estudo da produção e caracterização do hidrolisado proteico.....	110
5.6.1	Estudo cinético da hidrólise enzimática	110
5.6.2	Produção das amostras	112
5.6.3	Caracterização das amostras	118
5.7	Análise estatística	121
5.8	Referências.....	121
6	Caracterização do amido e da proteína extraídos por um método rápido de extração alcalina	125
6.1	Artigo 3.....	126
7	Propriedades funcionais de concentrados proteicos de arroz.....	129
7.1	Artigo 4.....	130
8	Microfiltração na separação de amido e proteína de arroz extraídos pelo método alcalino.....	133
8.1	Artigo 5.....	134
9	Produção de proteína hidrolisada de endosperma de arroz de alta solubilidade.....	137
9.1	Artigo 6.....	138
10	Considerações Finais.....	141

Lista de Figuras

- Figura 2.1:** Desenho esquemático de corte longitudinal de um grão de arroz, com a identificação dos diferentes componentes da sua estrutura. 8
- Figura 2.2:** Diagrama esquemático de vários corpos proteicos e grânulos compostos de amido na camada subaleurona do endosperma. 9
- Figura 2.3:** Micrografia de amido de arroz, demonstrando a estrutura morfológica típica deste amido, classificado como um amido composto. 11
- Figura 2.4:** Fluxograma representativo das quantidades aproximadas de produtos e coprodutos obtidos a partir do beneficiamento do arroz em casca. 22
- Figura 2.5:** Representação esquemática de (a) filtração convencional e (b) filtração tangencial com membranas de microfiltração. 27
- Figura 5.1:** Fluxograma de blocos com o desenho completo do presente estudo. 92
- Figura 5.2:** Fotografia do resíduo obtido na centrifugação, onde é possível observar a aparência do resíduo da camada superior (ULR) e do resíduo da camada inferior (LLR). O resíduo amiláceo integral (WSR) consiste na mistura destes dois produtos. 98
- Figura 5.3:** Fluxogramas apresentando as macro-etapas realizadas na condução deste trabalho, sendo CPT - amostra com pré-tratamento; SPT - amostra sem pré-tratamento; DF-H₂O - amostra derivada da diafiltração com água; DF-NaOH - amostra derivada diafiltração com solução de NaOH 0,18 % 104
- Figura 5.4:** Fotografias do sistema de filtração utilizado neste trabalho, sendo (a) o sistema utilizado na Etapa 1 e (b) o sistema utilizado na Etapa 2. 108
- Figura 5.5:** Fotografia do aparato experimental utilizado para a realização da hidrólise enzimática pelo método do pH estático, (a) pHmetro para o monitoramento contínuo do pH da suspensão durante a hidrólise e (b) bureta para a dosagem de KOH e manutenção do pH constante. 111
- Figura 5.6:** Fluxograma do processo completo utilizado para a extração, hidrólise enzimática e concentração das amostras produzidas neste trabalho. 113
- Figura 5.7:** Fotografias de algumas das etapas realizadas para a produção das amostras, sendo (a) extração alcalina, (b) amostra de concentrado proteico de arroz (RPC) após a centrifugação, (c) extrato ácido (AE), (d) re-suspensão do concentrado proteico, (e) homogeneização após re-suspensão, (f) neutralização do extrato a 1,5% de proteína, (g) hidrólise enzimática pelo método do pH estático, (h) aspecto dos extratos antes (à esquerda) e após (à direita) a hidrólise enzimática e (i) concentração da amostra HSRP-VC. 115
- Figura 5.8:** (a) Diagrama esquemático do sistema de filtração utilizado nos experimentos de microfiltração e ultrafiltração com o módulo plano; sendo: 1 - proveta utilizada como tanque de alimentação ao sistema, 2 - bomba diafragma, 3 - controlador de velocidade, 4 - manômetros hidráulicos, 5 - módulo plano em aço inox, 6 - válvula de controle de pressão, 7 - frasco para coleta do permeado, 8 - balança semi-analítica e 9 - banho ultra-termostático acoplado a uma serpentina para controle da temperatura. (b) Fotografias do módulo plano fechado, vista superior (à esquerda) e aberto (à direita). 116
- Figura 10.1:** Fluxograma do processo completo proposto e avaliado nesta tese. 147

Lista de Quadros

Quadro 2.1: Classificação para os processos de separação por membranas.	25
Quadro 4.1: Estudos de aplicação da ultrafiltração na concentração e purificação de proteínas vegetais de diferentes fontes, objetivos pretendidos, membranas avaliadas e principais resultados obtidos.	77
Quadro 5.1: Relação dos ensaios de caracterização realizados nos produtos obtidos no processo em estudo; indicação do método empregado e do número de replicatas.	101
Quadro 5.2: Relação dos ensaios de caracterização realizados nos concentrados proteicos avaliados neste estudo.....	102
Quadro 5.3: Resumo dos experimentos de diafiltração da Etapa 2.....	

Capítulo 1

Introdução

O arroz, por ser uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, é um cereal cultivado e consumido em todos os continentes, sendo um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. Aproximadamente 90 % de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia. A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo desse cereal. (*FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATION, FAO, 2015*). O Brasil se destaca como o nono maior produtor mundial de arroz, e o maior produtor de fora do continente asiático. O Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz no Brasil e na safra de 2014/15 concentrou 72 % da produção nacional. (*INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ, IRGA, 2015*).

A orizicultura brasileira, em especial a irrigada praticada no sul do País, tem apresentado expressivos avanços, principalmente em termos de produtividade, rentabilidade da produção e qualidade dos grãos, o que garante competitividade ao setor. No entanto, a pós-colheita é ainda um gargalo tecnológico e operacional, resultante, em parte, da pouca disponibilidade de informações. Na obtenção do produto beneficiado polido, o mais consumido no Brasil, o arroz é primeiramente submetido ao descascamento do grão. A remoção da casca produz o chamado arroz integral. Com a brunição e o polimento produz-se o arroz branco polido. Nesse processo, além de serem obtidos como coprodutos a casca e o farelo, também são produzidos os fragmentos de arroz, devido à fragilidade dos grãos. O fragmento é o produto constituído de 90 % de grãos quebrados e quirera. Estes coprodutos são constituídos principalmente por amido, e apresentam quantidades menores de proteínas (da ordem de 7 %), e baixos teores de lipídeos, fibras, minerais, vitaminas e compostos fenólicos.

O aproveitamento do arroz quebrado e da quirera de arroz é uma área ainda pouca explorada no Brasil. Atualmente estes coprodutos são muito utilizados na alimentação animal, para a produção de ração. Em outros países, o arroz quebrado é muito utilizado na produção industrial de farinhas de arroz de diferentes granulometrias e funcionalidades. Em todo o mundo há uma demanda constante por farinha de arroz para utilização em alimentos para bebês, cereais matinais, biscoitos, doces, macarrão, pães ázimos e outros. No Brasil, a produção de farinha de arroz para consumo humano também é realizada, mas a demanda por este produto é ainda menor do que a geração de grãos quebrados, sendo que o volume produzido deste coproduto ainda representa uma preocupação para o setor.

Internacionalmente, nos últimos anos, ingredientes derivados de arroz polido e do arroz integral têm sido a base para o desenvolvimento de muitos novos alimentos. Os ingredientes já comercialmente disponíveis de arroz apresentam propriedades similares aos produtos da indústria do milho. Amido de arroz, proteínas de arroz, xaropes de arroz, dextrina de arroz e hidrolisados de arroz apresentam aplicações crescentes. Todos estes ingredientes são singularmente diferentes dos seus homólogos derivados do milho. Os grânulos de pequeno tamanho, que fazem com que a textura de gel do amido de arroz seja única, têm tornado este ingrediente muito desejável como um substituto de gordura em alimentos, como agente de textura em cremes e sorvetes não lácteos, por exemplo. Adicionalmente, o baixo potencial alergênico da proteína de arroz tem alavancado sua crescente procura. Ainda, muitas pesquisas recentes têm demonstrado que a proteína de arroz, quando hidrolisada, pode ser fonte de peptídeos com diversas funções, tanto como aditivo natural para alimentos, quanto como ingrediente com atividade funcional no organismo humano.

Neste contexto insere-se o tema de pesquisa da presente tese: a obtenção de ingredientes naturais de maior valor agregado a partir de um coproduto da indústria orizícola brasileira, o arroz quebrado, visando contribuir para a geração de oportunidades tecnológicas ao setor e ao mercado brasileiro de ingredientes.

O amido de arroz é preferencialmente preparado a partir de arroz quebrado por razões econômicas. Ademais, como os dois mais abundantes componentes do grão de arroz polido são o amido e a proteína, a extração do amido sugere que a proteína de arroz deva ser considerada quando se investiga o potencial para agregação de valor ao grão quebrado. As proteínas de arroz são consideradas de grande valor, pois são incolores, ricas em aminoácidos essenciais, possuem sabor suave e são hipoalergênicas e hipocolesterolêmicas. Entretanto, para aplicações como ingredientes de alimentos, é desejável que possuam boas propriedades funcionais, tais como capacidades espumante, gelificante, emulsificante, entre outras. Atualmente pouco é conhecido acerca destas propriedades, e se sabe que podem variar em função do tipo de arroz de origem. O

que atualmente é reconhecido é que a proteína de arroz, por apresentar baixa solubilidade, apresenta propriedades funcionais pobres, o que limita sua aplicação como ingrediente de muitos alimentos, em especial de bebidas. Sabe-se que a técnica de extração empregada e a realização de modificações na sua estrutura podem acarretar importantes efeitos nas propriedades destas proteínas. Em especial, a hidrólise enzimática parcial tem se mostrado uma alternativa viável e muito eficiente na obtenção de proteínas com propriedades funcionais melhoradas.

Comercialmente, a produção de concentrados ou isolados proteicos vegetais consiste em uma solubilização aquosa das proteínas e carboidratos em pH ácido, neutro ou alcalino, e uma recuperação seletiva da proteína solubilizada, seguida de separação, e, ocasionalmente, lavagem e neutralização antes da secagem. O rendimento da extração proteica e as propriedades são influenciados pelo tipo de processo de extração e por diferentes fatores, tais como pH, concentração salina, força iônica do meio, carga líquida e repulsões eletrostáticas. O método enzimático também pode ser utilizado para a separação do amido e da proteína do endosperma de arroz. De acordo com os tipos de produtos desejados (amidos, oligossacarídeos, hidrolisados proteicos), diversas enzimas podem ser aplicadas, tais como amilases e proteases. A escolha do processo de extração irá influenciar diretamente nas características físicas, químicas e no potencial de aplicação tecnológica dos ingredientes obtidos.

Os processos de separação por membranas representam uma categoria de operações com aplicações cada vez maiores na Indústria de Alimentos. O sucesso da tecnologia de membranas no mercado de alimentos e bebidas está diretamente ligado a algumas de suas principais vantagens em relação às tecnologias de separação convencionais. Dentre elas destaca-se o tratamento suave, pelo uso de temperaturas baixas durante o processamento, a alta seletividade na separação de moléculas com diferentes características, o *design* compacto e modular, fornecendo facilidade de instalação e de aumento de escala e o baixo consumo energético em comparação com operações unitárias nas quais ocorre a mudança de fase para se realizar a separação das moléculas.

O Brasil é um grande produtor de *commodities* alimentícias e hoje o desenvolvimento da indústria de ingredientes para a geração de insumos de maior valor agregado a partir destas matérias-primas é uma área pouco explorada pelas indústrias brasileiras, apesar do país ser grande consumidor de ingredientes. Neste cenário, a presente pesquisa foi desenvolvida sob as hipóteses elencadas a seguir.

- 1) *O arroz quebrado brasileiro, ou a farinha de arroz atualmente produzida pela indústria brasileira a partir do arroz quebrado, pode ser base para o desenvolvimento de ingredientes de maior valor agregado.*

- 2) *O método alcalino pode ser empregado de forma eficiente e com minimização de seus efeitos deletérios sobre as proteínas, se forem adequadamente selecionadas as condições da operação de extração.*
- 3) *É possível melhorar a solubilidade da proteína de arroz a partir da realização de modificações enzimáticas em sua estrutura.*
- 4) *A tecnologia de membranas pode ser aplicada no processo de obtenção de ingredientes a partir do arroz quebrado, visando a melhoria da performance das etapas pós-extração, na obtenção de ingredientes com maior pureza e na minimização das perdas ao longo do processo.*

Desta forma, o objetivo principal deste estudo foi propor e avaliar um processo de obtenção de concentrados e hidrolisados proteicos de arroz, contribuindo na oferta de estratégias para o desenvolvimento tecnológico do setor no Brasil. Adicionalmente, deseja-se auxiliar na valoração do arroz quebrado: um coproduto de baixo valor comercial, base para a geração de matérias-primas já encontradas internacionalmente, e que apresentam grande potencial de desenvolvimento no mercado brasileiro. Vale salientar que este estudo teve como enfoque principal os ingredientes proteicos derivados do endosperma do arroz quebrado, pois a demanda por ingredientes proteicos de elevada qualidade é crescente na atualidade. Como já comentado, as proteínas do arroz apresentam vantagens nutricionais, relacionadas ao bom balanço nos teores de aminoácidos e principalmente devido à sua hipoalergenicidade. Entretanto, como o amido é o componente majoritário do endosperma do cereal, o estudo também considerou este componente, mas com menor ênfase. Dentro deste contexto, buscou-se estudar a aplicação da tecnologia de membranas neste processo, por ser uma tecnologia limpa, de baixo consumo energético, já bem estabelecida e com aplicações crescentes na indústria de alimentos. Frente ao exposto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) estudar a extração alcalina de proteínas da farinha produzida a partir de arroz quebrado;
- b) avaliar a influência das condições da operação de extração alcalina no rendimento e na cinética da extração das proteínas;
- c) realizar a caracterização química, térmica e morfológica os produtos obtidos com a extração alcalina;
- d) estudar as propriedades funcionais dos concentrados proteicos obtidos pelo método alcalino visando identificar potenciais aplicações do produto pela indústria de alimentos;
- e) comparar as propriedades funcionais dos concentrados proteicos produzidos com as de outros concentrados proteicos de arroz encontrados no mercado internacional;

- f) avaliar a aplicação da microfiltração na separação do amido e da corrente proteica obtida com a extração alcalina;
- g) estudar o efeito do uso de α -amilase comercial nas características de incrustações durante a microfiltração do extrato alcalino;
- h) avaliar a aplicação de diafiltrações para a purificação do amido durante a microfiltração do extrato alcalino;
- i) estudar a hidrólise enzimática parcial da proteína de arroz visando a melhoria de sua solubilidade;
- j) avaliar a aplicação da ultrafiltração e de diafiltrações na purificação do hidrolisado proteico obtido a partir do tratamento com proteases;
- k) caracterizar o hidrolisado proteico obtido em termos de sua composição nutricional e solubilidade.

O presente texto está estruturado da forma descrita a seguir. O Capítulo 2 apresenta a fundamentação teórica desta tese, abordando os principais aspectos relacionados à composição química do arroz; além dos fundamentos básicos dos processos de separação por membranas.

Os Capítulos 3 e 4 apresentam duas revisões bibliográficas realizadas acerca dos temas desta tese. No Capítulo 3 são abordadas as principais propriedades de alguns dos ingredientes que podem ser obtidos a partir do arroz quebrado, além das tecnologias atualmente estudadas neste setor. O Capítulo 4 traz estudos de aplicação dos processos de separação por membranas no processamento de amido, proteínas e hidrolisados proteicos vegetais. Ao final destes dois capítulos são apresentadas as questões de pesquisa que foram a base para os trabalhos desenvolvidos.

O Capítulo 5 descreve detalhadamente a metodologia adotada nesta pesquisa, demonstrando a linha de raciocínio empregada para a construção dos diferentes estudos que compõem a presente pesquisa.

O Capítulo 6 apresenta um estudo onde foi realizada a identificação das condições operacionais empregadas na extração alcalina a partir de farinha obtida de arroz quebrado. Além disso, o estudo apresenta a caracterização dos produtos obtidos no processo de extração alcalina desenvolvido.

O Capítulo 7 apresenta um estudo onde foram avaliadas as propriedades funcionais do concentrado proteico produzido via extração alcalina, em comparação com dois concentrados proteicos comerciais do mercado internacional.

O Capítulo 8 apresenta um estudo de aplicação da microfiltração na separação e purificação do amido de arroz obtido na extração alcalina, demonstrando a influência de um pré-tratamento enzimático na ocorrência de incrustações no processo, bem como da aplicação de diafiltrações com diferentes diluentes na purificação do amido e na recuperação da proteína na corrente de permeado.

O Capítulo 9 traz um estudo onde foi avaliada a hidrólise enzimática com proteases na solubilização da proteína de arroz extraída pelo método alcalino. O estudo abordou ainda a aplicação da ultrafiltração na concentração e purificação da proteína solúvel obtida, e ainda traz uma caracterização dos produtos obtidos no processo.

No Capítulo 10 são apresentadas as considerações finais desta tese onde os resultados obtidos ao longo de toda a pesquisa são confrontados e discutidos de forma articulada. O capítulo traz ainda conclusões gerais sobre o tema de pesquisa e sugestões de trabalhos para a continuação do estudo.

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos

Neste capítulo é apresentada a fundamentação teórica desta tese, onde são abordados os principais aspectos relacionados à composição química do arroz; além dos fundamentos básicos dos processos de separação por membranas. Na temática dos processos de separação por membranas, seção 2.2 deste capítulo, a seguinte bibliografia foi consultada para trazer o embasamento teórico necessário para a realização desta pesquisa: Baker (2004); Bell e Cousins (1994); Habert, Borges e Nóbrega (2006); Nóbrega, Habert e Borges (2001) e Scott (1996).

2.1 Arroz

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz destaca-se pela produção e área de cultivo, apresentando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto no social. Esse cereal é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e na Oceania, onde vivem 70 % da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. É o alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas. O arroz é um alimento com ótimo balanceamento nutricional, pois fornece 20 % da energia e 15 % da proteína *per capita* necessária ao homem. Desta forma, por ser uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, vem sendo

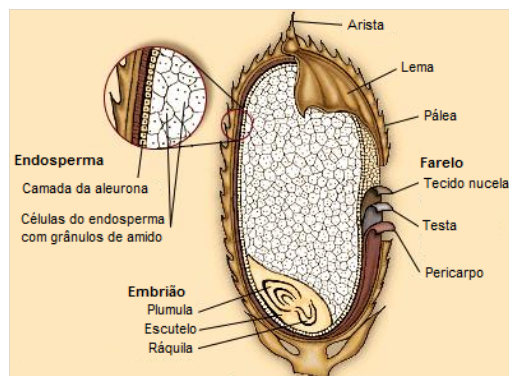
considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate da fome no mundo. (AZAMBUJA; VERNETTI JÚNIOR; MAGALHÃES JÚNIOR, 2004).

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO (2015), a produção mundial de arroz em casca de 2014 está avaliada em 741,3 milhões de toneladas (com base no arroz em casca), com projeção para 2015 de 749,8 milhões de toneladas. Aproximadamente 90 % de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia. Nesse continente estão 12 dos 15 maiores países produtores de arroz, e são realizados cerca de 5 % das importações e 62 % das exportações mundiais de arroz. (AZAMBUJA; VERNETTI JÚNIOR; MAGALHÃES JÚNIOR, 2004). A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo desse cereal. A América do Sul produziu 23,8 milhões de toneladas em 2014, sendo o Brasil responsável pela produção de 12,1 milhões de toneladas. (FAO, 2015). O Brasil se destaca como o nono maior produtor mundial de arroz, e o maior produtor de fora do continente asiático. O Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz brasileiro, tendo produzido, na safra 2014/2015, 8,7 milhões de toneladas, o que representa 72 % da produção nacional. (INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ, IRGA, 2015).

2.1.1 Estrutura e composição química do grão de arroz

A espécie *Oryza sativa* L. é uma monocotiledônea da família das Poaceae. Como tal, caracteriza-se por possuir caules ocos, flores reduzidas de cor verde e aquênios especializados, as cariopses ou grãos, como frutos. O grão de arroz (Figura 2.1) é formado basicamente de casca, farelo, endosperma e embrião, ou gérmen.

Figura 2.1: Desenho esquemático de corte longitudinal de um grão de arroz, com a identificação dos diferentes componentes da sua estrutura.

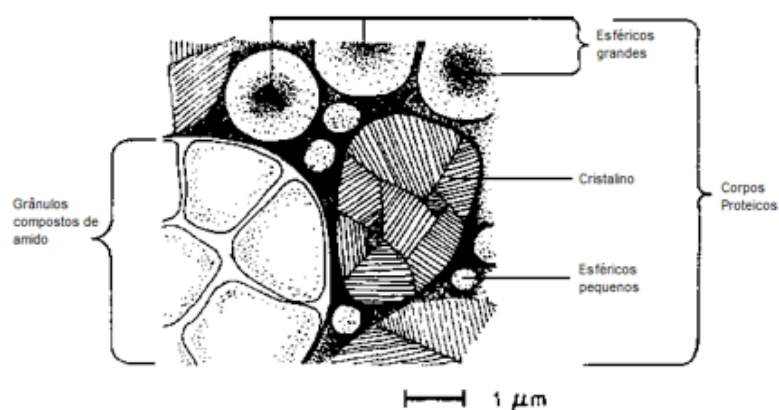


Fonte: Adaptado de Encyclopædia Britannica (1996).

O gérmen se localiza na face ventral do grão e contém as estruturas essenciais para produção de uma nova planta (lipídeos, enzimas – lipases e lipoxigenases, vitaminas e proteínas de reserva). O tegumento que envolve a semente encontra-se diretamente ligado ao pericarpo, membrana que envolve o fruto. No caso do arroz, toda essa estrutura encontra-se envolvida pela lema e pela pálea, que constituem a casca. As laterais da lema revestem as laterais da pálea, de tal forma que o conjunto se fecha firmemente. A casca é porosa, leve e rica em sílica (15 a 18 %). A principal função da casca é proteger o fruto contra o ataque de insetos ou fungos. A aleurona constitui a parte mais externa do endosperma, envolve também a parte externa do embrião, sendo formada por várias camadas de células parenquimatosas. (GUIMARÃES; FAGERIA; FILHO, 2002).

As células do endosperma são de paredes finas e preenchidas com amiloplastos contendo grânulos de amido (Figura 2.2). As duas camadas celulares mais externas do endosperma (a camada subaleurona) são ricas em proteínas e lipídeos e contêm amiloplastos com grânulos de amido menores do que os do interior do endosperma. Os grânulos de amido são poliédricos, com tamanho aproximado de 3 a 9 μm , com uma distribuição unimodal. A proteína ocorre principalmente sob a forma de corpos proteicos esféricos de 0,5 a 4 μm de tamanho ao longo do endosperma, mas os corpos proteicos cristalinos e pequenos corpos proteicos são esféricos e localizam-se na camada subaleurona. O corpo proteico esférico grande corresponde ao corpo tipo PB-I e o corpo de proteína cristalina, o tipo PB-II. (JULIANO, 1993; SHEWRY; HALFORD, 2002).

Figura 2.2: Diagrama esquemático de vários corpos proteicos e grânulos compostos de amido na camada subaleurona do endosperma.



Fonte: Adaptado de Juliano (1993).

O arroz é constituído principalmente por amido, apresentando quantidades menores de proteínas, lipídeos, fibras, minerais, vitaminas e compostos fenólicos. Entretanto, a composição do grão e de suas frações está sujeita a diferenças varietais, variações ambientais, de manejo, de

processamento e de armazenamento, produzindo grãos com características nutricionais diferenciadas. (JULIANO, 1993). Os nutrientes não estão uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão de arroz. As camadas externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídeos, fibras, minerais e vitaminas; enquanto que o centro é rico em amido. (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008).

2.1.2.1 Carboidratos

Os carboidratos são os principais constituintes do arroz. Além do amido, que corresponde a aproximadamente 90 % da matéria seca do arroz polido, também estão presentes açúcares livres e fibras. Enquanto que o endosperma é composto principalmente por amido, o farelo e o gérmen apresentam principalmente fibras, contendo pequenas quantidades de outros carboidratos. (JULIANO, 1993).

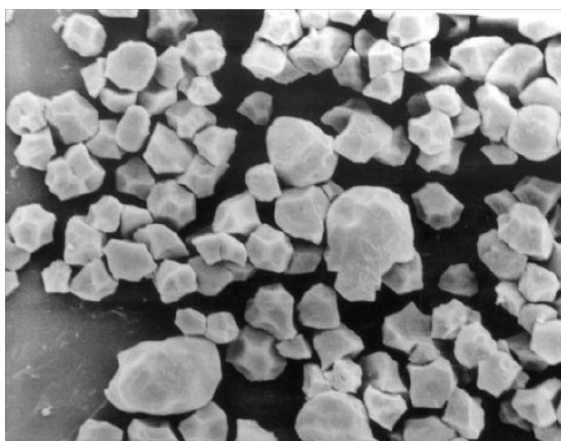
Os polissacarídeos não amiláceos de grãos de cereais são constituídos de microfibrilas de celulose, hemicelulose e substâncias pécicas. (LAI *et al.*, 2006). Esses polissacarídeos, por não serem digeridos pelas enzimas no trato gastrointestinal humano, fazem parte da fração fibra alimentar, que pode ser dividida em solúvel e insolúvel. O endosperma tem um menor teor de fibra do que o restante do arroz. Além disso, o endosperma tem um baixo teor de lignina, mas um maior teor de substâncias pécicas. (JULIANO, 1993).

O amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é essencialmente um polímero linear, enquanto que a amilopectina é um polímero altamente ramificado. A amilose apresenta cadeias lineares de cerca de 840 a 22.000 unidades de α -D-glicopiranosil unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. As moléculas de amilose podem conter pequenas ramificações (um ponto de ramificação a cada 170 a 500 unidades glicosil). A amilopectina geralmente compreende cerca de 70 a 80 % do grânulo de amido e é muito mais ramificada, com cerca de 4 a 5 % das ligações glicosídicas com pontos de ramificação. As moléculas de amilopectina são grandes discos planos contendo cadeias de α -D-glicopiranosil unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, com pontos de ramificação formados por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$. (PREISS, 2009). As proporções em que estas cadeias aparecem diferem entre genótipos, podendo-se classificar os grãos como ceroso (1 a 2 % de amilose), conteúdo de amilose muito baixo (2 a 12 %), baixo (12 a 20 %), intermediário (20 a 25 %) e alto (25 a 33 %). (JULIANO, 1993; MITCHELL, 2009).

O grânulo de amido é uma importante fonte de energia para períodos longos em plantas verdes. A estrutura do grânulo é muito adequada a este papel, sendo densamente empacotada e insolúvel em água, apesar de ser acessível a enzimas catabólicas da planta. Os grânulos de amido ocorrem na natureza nos mais diferentes tamanhos e formatos (esferas, elipsoides, polígonos,

plaquetas, tubetes irregulares). Suas formas e dimensões variam de 0,1 a 200 μm , dependendo da fonte botânica. Tais diferenças em sua morfologia são geralmente suficientes para fornecer informações inequívocas da fonte botânica do amido. (PÉREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009). A maior parte dos grânulos de amido é produzida individualmente em diferentes amiloplastos no vegetal; entretanto, alguns amidos, tais como o de arroz, aveia e ervilha contêm grânulos compostos (Figura 2.3). Nesses casos, mais de um grânulo é produzido simultaneamente no mesmo amiloplasto. (JANE, 2009).

Figura 2.3: Micrografia de amido de arroz, demonstrando a estrutura morfológica típica deste amido, classificado como um amido composto.



Fonte: Jane (2009).

Assim, os amidos compostos possuem grânulos que estão empacotados hermeticamente, tornando-se difícil sua separação. As formas dos grânulos de amidos compostos são principalmente poliédricas, possivelmente como resultado de limitações de espaço durante o desenvolvimento dos grânulos de amido. (JANE, 2009). Os grânulos compostos do amido de arroz possuem diâmetros que podem alcançar 150 μm e são formados por aglomerados de cerca de 20 a 60 grânulos. (ZHOU *et al.*, 2002).

2.1.2.2 Proteínas

As proteínas de reserva em grãos de cereais são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e depositadas em organelas localizadas dentro do retículo ou em vacúolos de reserva. A classificação de proteínas de reserva é baseada na extração sequencial de Osborne em função de diferentes solubilidades. Assim, as proteínas de cereais podem ser classificadas em quatro categorias: albuminas, solúveis em água; globulinas, solúveis em soluções salinas; prolaminas,

solúveis em soluções álcool/água; e glutelinas, solúveis em soluções ácidas e alcalinas diluídas. O fracionamento de Osborne foi um marco no desenvolvimento da química de cereais, mas cada uma dessas frações é uma complexa mistura de diferentes polipeptídeos com solubilidade similar. (GUERRIERI, 2004).

O conteúdo de proteínas no arroz é considerado baixo, entre 5 a 7 %, conforme Friedman (1996) e 6,3 a 7,1 %, conforme Juliano (1993). Segundo Lam-Sánchez *et al.* (1994) as glutelinas representam 68 a 72 % do total de proteínas do grão, as globulinas, 12 a 17 %, as albuminas, 10 a 12 %, e as prolaminas, 2 a 3 %. Considerando somente o endosperma do grão, verifica-se que o mesmo contém cerca de 7 a 18 % de albuminas, 5 a 12 % de prolaminas e 70 a 88 % de glutelinas. (ZHOU *et al.*, 2002). Outros autores afirmam que, em média, o endosperma do arroz apresenta 80 % de glutelinas. (JULIANO; BOULTER, 1976; JU; HETTIARACHCHY; RATH, 2001). No endosperma, essas proteínas estão fortemente aderidas aos grânulos de amido, localizam-se no interior de corpos proteicos tipo PB-I e PB-II (Figura 2.2). Os grandes e esféricos corpos proteicos tipo PB-I contêm basicamente prolaminas, enquanto que os corpos proteicos cristalinos do tipo PB-II contêm glutelinas. (JULIANO, 1993; LUMDUBWONG; SEIB, 2000).

As glutelinas do arroz consistem em subunidades ácidas de 30 a 39 kDa e subunidades básicas de 19 a 25 kDa. Os dois tipos de subunidades são formados por clivagem de um polipeptídeo precursor de 57 kDa. Estas subunidades permanecem associadas por pontes dissulfeto, resultando agregados polipeptídicos que podem ter massas molares na faixa de 64 a 500 kDa. (JULIANO, 1993; VAN DER BORGHT *et al.*, 2006). De fato, as proteínas do arroz são conhecidas por possuírem muitas ligações cruzadas entre si, devido à alta proporção de resíduos de cistina que são capazes de formar pontes dissulfeto entre diferentes polipeptídeos. Esse fator influencia na identificação de diferentes tipos de polipeptídeos presentes, uma vez que a sua visualização somente é possível mediante adequada separação dos mesmos, o que depende das condições empregadas na análise. Agboola, Ng e Mills (2005) discutem que o número de frações observado em seu estudo diferiu do relatado por outros autores, apesar dos valores observados para as albuminas, globulinas e glutelinas situarem-se dentro de faixas indicadas na literatura. Esse fator possivelmente também esteja relacionado às diferenças existentes entre as cultivares de arroz empregadas nos diversos estudos. Além disso, as frações obtidas pelos autores também diferiram em função da técnica de identificação empregada.

Van der Borgh *et al.* (2006) afirmam que a insolubilidade das proteínas do endosperma do arroz ocorre principalmente devido à sua hidrofobicidade e à presença de ponte de hidrogênio e dissulfeto entre os polipeptídeos. Desta forma, a maior parte das proteínas do endosperma pode ser dissolvida utilizando uma combinação de agentes de dissociação e agentes redutores. Além disso, a dissociação da glutelina em subunidades menores ocorre a altas

concentrações de álcali, devido à repulsão de cargas. Contudo, altas concentrações de NaOH podem causar modificações na proteína, causando principalmente a sua desagregação e redução do seu tamanho, resultando no aumento de sua solubilidade.

A qualidade da proteína depende de seu conteúdo em aminoácidos. Similar a outros cereais, o arroz apresenta a lisina como aminoácido limitante¹. Entretanto, entre os cereais, o arroz apresenta uma das maiores concentrações de lisina, resultando em balanço de aminoácidos mais completo. (JULIANO, 1993). Assim como são observadas variações no teor total de proteínas, também existem diferenças na composição em aminoácidos das proteínas entre o arroz integral e o polido.

a) Propriedades funcionais das proteínas

O termo “propriedade funcional” é definido como toda propriedade não nutricional que influi no comportamento de certos componentes de um alimento. A maior parte das propriedades funcionais influencia as características sensoriais, mas igualmente pode desempenhar papel importante nas propriedades físicas dos alimentos e de seus ingredientes durante o processamento, armazenamento, preparo e consumo. A somatória das propriedades funcionais de um alimento ou ingrediente alimentício é referida como “funcionalidade” e o “valor funcional” de um produto ou ingrediente alimentício aumenta a sua aceitação e utilização. (SGARBIERI, 1996; ORDÓÑEZ, 2005).

Segundo Sgarbieri (1996) e Ordóñez (2005), as propriedades físicas e químicas que repercutem na aplicabilidade tecnológica das proteínas são inúmeras; entre elas o tamanho, a composição e sequência de aminoácidos, a conformação espacial, a carga líquida, a capacidade de reação com outros componentes do alimento, etc. Além disso, a estrutura inicial de uma proteína pode se modificar por ação de agentes químicos, físicos e biológicos; bem como quando ela é incorporada na formulação do alimento devido a fatores extrínsecos, tais como o pH, a temperatura, as condições de processamento, as interações com outros componentes, etc.

Ordóñez (2005) classifica as propriedades funcionais das proteínas em dois grandes grupos:

¹ De acordo com FAO (2002), um aminoácido limitante é aquele que apresenta-se em uma concentração abaixo do padrão de aminoácidos de referência para proteínas, o que indica que o mesmo está em concentração limitada naquela proteína para garantir o crescimento e as funções vitais do organismo humano; devendo ser obtido, na alimentação, de outra fonte proteica.

1. *propriedades hidrodinâmicas*: são as relacionadas com as interações das proteínas com a água, tais como absorção e retenção de água, inchamento, adesão, solubilidade e viscosidade, além de outras, como geleificação, precipitação e formação de diferentes estruturas, como fibras e massas proteicas;
2. *propriedades ligadas a características de superfície*: entre elas capacidade de formação de espumas e emulsões e todos os fenômenos ligados à tensão superficial.

Os métodos para a medida de várias propriedades funcionais são ainda bastante empíricos, não existindo uma padronização dos procedimentos, o que dificulta muito a comparação de dados obtidos por diferentes trabalhos. (SGARBIERI, 1996).

A seguir são apresentados os fundamentos básicos das propriedades funcionais solubilidade, capacidade de absorção de água e óleo, geleificação e capacidade de formação e estabilização de espumas e emulsões.

Solubilidade: a solubilidade de uma proteína é definida como a porcentagem de proteína que se mantém em solução ou dispersão coloidal sob condições específicas e que não sedimenta com forças centrífugas moderadas. Para que uma proteína seja solúvel, ela deve interagir com o solvente, geralmente através de ligações de hidrogênio, interações do tipo dipolo-dipolo e iônicas); por isso esta propriedade pode ser também definida como o equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína solvente. (ORDÓÑEZ, 2005).

Uma boa solubilidade conduz a aplicação da proteína para a produção de bebidas, molhos, sopas desidratadas, purês, etc. A solubilidade em pH neutro ou no ponto isoelétrico costuma ser a primeira propriedade tecnológica que se mede de um ingrediente proteico, já que as proteínas insolúveis têm pouca aplicação na indústria alimentícia. Em pH's diferentes do ponto isoelétrico, as proteínas possuem cargas líquidas e repelem-se entre si, podendo interagir com as moléculas de água, sendo portanto, mais solúveis. Quando se representa a solubilidade de determinada proteína em função do pH, obtêm-se normalmente curvas em forma de U, onde a solubilidade mínima ocorre no ponto isoelétrico. Entretanto, diferentes comportamentos de solubilidade em função do pH podem ser observados para misturas de proteínas, tais como concentrados proteicos de soro de leite, caseinatos, ou em sistemas alimentícios. A precipitação das proteínas pode não necessariamente ocorrer no ponto isoelétrico devido à concentração da proteína e à constante de solubilidade dos demais produtos. (VOJDANI, 1996; ORDÓÑEZ, 2005).

Normalmente a solubilidade aumenta com a temperatura de 0 a 40-50 °C. Acima disto, a maioria das proteínas tende a desnaturar, o que implica na perda da solubilidade. (VOJDANI, 1996; ORDÓÑEZ, 2005).

Diferentes termos são usados na literatura para expressar a solubilidade de uma proteína.

Vonjdani (1996) apresenta uma revisão dos diferentes termos empregados, de acordo com o método utilizado para estimar a solubilidade.

A medida da solubilidade de proteínas a partir de amostras sólidas compreende a subdivisão das partículas sólidas, a exposição da amostra a um meio aquoso, a agitação e a aplicação de uma força de separação entre a fração solúvel e a insolúvel. A solubilidade da proteína pode ser determinada pela dosagem de nitrogênio na fração solúvel, calculando-se um índice de solubilidade de nitrogênio (ISN), pela Equação 2.1. (VOJDANI, 1996; SGARBIERI, 1996).

$$\text{ISN (\%)} = \frac{\text{NS}}{\text{NT}} * 100 \quad (2.1)$$

sendo NS o teor de nitrogênio solúvel e NT o teor total de nitrogênio na amostra.

A solubilidade de proteína (SP), Equação 2.2, é outra forma de expressar esta propriedade. Neste, uma dada proteína é solubilizada sob condições definidas, centrifugada e a quantidade de proteína solúvel no sobrenadante e o total de proteína na amostra são medidos. Com a expressão desta propriedade em termos de SP, a dosagem da proteína pode ser realizada por quaisquer técnicas, diferentemente do ISN, no qual a dosagem deve ser realizada pelo método de Kjeldahl. (VOJDANI, 1996).

$$\text{SP (\%)} = \frac{\text{PS}}{\text{PT}} * 100 \quad (2.2)$$

sendo PS a quantidade de proteína solúvel e PT a quantidade total de proteína da amostra.

Capacidade de absorção de água e óleo: a determinação da capacidade de ligação de água e óleo em alimentos à base de proteína é de extrema importância para a indústria de alimentos. A capacidade de ligar água e óleo determina não somente a aceitabilidade sensorial de um dado produto, mas também a sua margem de lucro. Os consumidores tendem a evitar produtos que mostram a exsudação de água no interior da embalagem. Além disso, formulações que resultam em pobres capacidades de ligar água e gordura se traduzem em perdas de líquidos durante o processamento. (BARBUT, 1996).

As propriedades de hidratação de proteínas estão diretamente relacionadas a fatores intrínsecos da própria molécula, isto é, com sua composição de aminoácidos e sua conformação. As proteínas interagem com a água mediante ligações de hidrogênio, ligações dipolo-dipolo ou cadeias laterais dos aminoácidos (interações com grupos ionizados). Assim, quando há proporção maior de aminoácidos com cadeias laterais hidrófobas, a proteína apresenta capacidade menor de hidratação do que quando é composta por aminoácidos com cadeias laterais hidrófilas, que podem estabelecer mais facilmente ligações de hidrogênio com a água.

Também influi na capacidade de hidratação a conformação das proteínas, bem como a organização tridimensional dessas cadeias ordenadas, estabilizadas mediante uniões hidrofóbicas, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes (estrutura terciária). (ORDÓÑEZ, 2005).

São descritos na literatura diferentes métodos para a avaliação da capacidade de absorção de água e óleo de proteínas. Cada um deles tem relação com as características intrínsecas de cada tipo de proteína testada. Cao *et al.* (2009) avaliaram a capacidade de absorção de água e óleo de proteínas de arroz integral, de arroz polido e de farelo de arroz utilizando o seguinte procedimento: amostras de cada proteína (0,5 g) foram misturadas com água destilada ou óleo vegetal refinado (5,0 mL) e as misturas foram centrifugadas a 1200 x g por 25 minutos. Após, foram drenadas por 30 minutos e o ganho de massa por unidade de massa de proteína foi registrado como a capacidade de absorção de água ou óleo.

Gelificação: a gelificação proteica consiste na formação de uma rede proteica ordenada a partir de proteínas previamente desnaturadas. É um fenômeno de agregação proteica no qual as forças atrativas e repulsivas estão tão equilibradas que é formada uma rede ou matriz terciária bem ordenada, capaz de reter grande quantidade de água. A gelificação desempenha papel fundamental em determinados alimentos, como sobremesas lácteas, produtos cárneos cozidos, produtos de panificação, etc., influenciando também em outras propriedades tecnológicas, como a absorção de água, a formação e estabilização de espumas e emulsões. Para que se forme o gel proteico, é necessário que haja desnaturação e agregação posterior de forma ordenada, predominando interações proteína-proteína. (MATSUMURA; MORI, 1996; ORDÓÑEZ, 2005).

A gelificação ocorrem em duas etapas: inicialmente ocorre a mudança conformacional ou a desnaturação parcial das moléculas proteicas, em seguida ocorre uma agregação gradual das proteínas desnaturadas. A segunda etapa é muito mais lenta que a primeira e, desta forma, controla o processo. (MATSUMURA; MORI, 1996). O fenômeno de formação de gel é complexo e normalmente se processa com o resfriamento da solução coloidal. Verifica-se um aumento da viscosidade até o ponto em que a rigidez se manifesta. Este ponto é chamado "ponto de gel". (SGARBIERI, 1996).

Segundo Matsumura e Mori (1996) proteínas com baixa solubilidade ou dispersibilidade em soluções aquosas também apresentam pobres propriedades gelificantes. As principais proteínas deste grupo são as proteínas dos cereais. Tratamentos enzimáticos, incluindo reações com proteases, podem ser úteis para modificar a solubilidade, bem como as demais propriedades das glutelinas e prolaminas de cereais.

O método empregado por Agboola, Ng e Mills (2005) para a identificação da concentração de proteína mínima para a gelificação de concentrados proteicos de arroz consistiu

em inicialmente preparar dispersões entre 1 e 10 % (m/m) em tubos teste. As dispersões foram completamente misturadas com o auxílio de um misturador tipo vortex por 5 minutos e, então, tratadas termicamente a 90 °C por 30 minutos. As suspensões foram então resfriadas em uma câmara fria a 5 °C por 1 hora, depois disso foram invertidas. A menor concentração na qual a amostra não fluía na inversão dos tubos era a concentração mínima de gelificação.

Capacidade de formação e estabilização de emulsões: uma das propriedades tecnológicas básicas, necessária para muitos sistemas alimentícios, é a habilidade de formar emulsões. As emulsões são sistemas dispersos de dois líquidos pouco solúveis ou insolúveis entre si. Normalmente a fase dispersante é a água, e a dispersa, óleo; nesse caso tem-se as emulsões óleo em água (O/W). Quando a água está dispersa no óleo, tem-se as emulsões água em óleo (W/O). Entretanto, em sistemas alimentícios, a estrutura das emulsões é muito mais complexa. (HILL, 1996; SGARBIERI, 1996; ORDÓÑEZ, 2005).

As emulsões são sistemas intrinsecamente instáveis. A estabilidade física de emulsões alimentícias W/O é governada primariamente pela posição e o tamanho das partículas sólidas. Em emulsões O/W a desestabilização resulta em floculação, coalescência, desnate ou inversão de fases, fenômenos que podem acontecer isoladamente ou em conjunto. (HILL, 1996). Para aumentar a sua estabilidade, utilizam-se agentes emulsionantes. Dentre os agentes emulsionantes possíveis para estabilizar emulsões alimentícias, tem-se as proteínas. Tais moléculas tensoativas se orientam de tal forma que seus extremos hidrófobos e hidrófilos se colocam nas superfícies da interface óleo/água, respectivamente. O acúmulo dessas moléculas na interface diminui a tensão interfacial, estabilizando o sistema. (SGARBIERI, 1996; ORDÓÑEZ, 2005).

Os termos estabilizante e emulsificante são frequentemente usados como sinônimos, mas suas funções são diferentes. Para a produção de uma emulsão, um emulsificante inicialmente deve facilitar a geração de uma nova interface pela diminuição da energia livre interna, e então deve garantir a formação de uma camada na interface óleo/água. É importante que o emulsificante seja adsorvido rapidamente na interface. As propriedades interfaciais dos surfactantes são, portanto, cruciais para a formação de emulsões estáveis. O papel do estabilizante é retardar a frequência de colisões das gotículas. As proteínas podem atuar tanto como emulsificantes quanto como estabilizantes, (HILL, 1996). As proteínas que apresentam melhores propriedades emulsificantes são as de maior solubilidade, estrutura dissociada e separada e boa hidrofobicidade. (ORDÓÑEZ, 2005).

Uma variedade de testes tem sido aplicados para indicar o valor de uma proteína em uma emulsão. A determinação do tamanho das gotas tem sido considerado o método mais apropriado para a avaliação da qualidade de uma emulsão e alguns métodos, incluindo o cálculo do índice de atividade da emulsão, o teste empírico de capacidade de emulsão, volume da fase

óleo e estabilidade da emulsão também podem ser empregados. (HILL, 1996).

Segundo Pearce e Kinsella (1978), a capacidade da proteína para estabilizar emulsões está relacionada com a área interfacial que pode ser revestida pela molécula proteica. De acordo com a teoria de Mie para dispersão de luz, existe relação entre a turbidez e a área interfacial de uma emulsão. No estudo, os autores avaliaram a turbidimetria como um método para medir as propriedades emulsificantes de proteínas. As emulsões foram feitas por homogeneização de quantidades conhecidas de proteínas e óleo de amendoim. Estas emulsões foram diluídas em série para produzir uma absorvância de 0,01 e 0,6 a 500 nm. Vários fatores, ou seja, o grau de homogeneização, o tipo de homogeneizador, a concentração de proteína, o volume de dispersão, a fração de volume de óleo, o pH e o tipo de óleo afetaram a formação de emulsão. Usando uma fórmula simples, baseada na turbidez, fração volumétrica da fase dispersa e da massa de proteína utilizada na emulsão, os autores determinaram o índice de atividade emulsificante, relacionado com a área interfacial da emulsão.

Zhao *et al.* (2012) utilizaram o procedimento de Pearce e Kinsella (1978) para determinar o índice de atividade emulsificante de concentrados proteicos de endosperma e farelo de arroz. Nele, alíquotas de 16 mL de soluções da proteína (preparada em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0) foram completamente homogeneizadas com 4 mL de óleo de soja usando um homogeneizador a 12.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente. Após, 50 µL da emulsão foram pipetados a 0,5 cm do fundo do tubo de preparação da emulsão e dispersos em 5 mL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1 % no instante de preparação da emulsão e 10 minutos depois da homogeneização. A absorvância da solução foi medida a 500 nm contra SDS 0,1 % como branco.

O índice de atividade emulsificante (IAE) e o índice de estabilidade da emulsão (IEE) foram calculados com o uso das Equações 2.3 e 2.4, respectivamente.

$$\text{IAE (m}^2\text{g}^{-1}\text{)} = \frac{2 * 2,303}{C * (1-\phi) * 10^4} * A_0 * \text{diluição} \quad (2.3)$$

$$\text{IEE (\%)} = \frac{A_{10} * 100}{A_0} \quad (2.4)$$

sendo A_0 e A_{10} as absorvâncias a 500 nm medidas imediatamente e depois de 10 minutos de formação da emulsão, respectivamente, com diluição de 100 vezes. C refere-se à concentração de proteína (g mL^{-1}) na solução antes da emulsificação, ϕ é a fração volumétrica de óleo da emulsão ($\phi = 0,20$).

Capacidade de formação e estabilização de espumas: as espumas alimentícias são dispersões de gás em uma fase contínua líquida ou semi-sólida, formada pelas chamadas lamínulas. Do mesmo modo que nas emulsões, é preciso proporcionar energia mecânica para

criar uma interface e, além disso, requer-se a presença de agentes de superfície que diminuam a tensão superficial para evitar a coalescência das bolhas de gás. As espumas alimentícias são bastante instáveis, porque apresentam grande superfície de interface. Uma proteína pode ter boa capacidade espumante se sua molécula for flexível e, portanto, estende-se rapidamente na interface, e se apresentar alto grau de hidrofobicidade, já que, desse modo, melhora sua orientação. Contudo, para que a espuma seja estável, é necessário que em torno de cada bolha de gás se forme uma película proteica espessa, contínua, elástica e impermeável ao ar. Tudo isso está relacionado com a concentração de proteínas, as interações intermoleculares e a capacidade de hidratação. (ORDÓÑEZ, 2005).

Segundo Wilde e Clark (1996) as espumas são estruturas de difícil estudo. Isto porque são sistemas dinâmicos de estabilidade transiente, e não respondem bem a técnicas invasivas. Medidas diretas de volume da espuma, distribuição do tamanho das bolhas e estabilidade proporcionam uma descrição física da espuma.

O parâmetro mais comum usado para definir uma espuma é o volume. Este parâmetro está intimamente relacionado com capacidade de formação de espuma de um sistema. Esta é frequentemente determinada simplesmente pela medição do volume da espuma obtido a partir de uma condição padrão de formação da mesma (tempo e tipo de batimento empregado). A capacidade de formação de espuma (FE) pode ser expressa como a razão entre o volume final da espuma e o volume inicial da suspensão, conforme a Equação 2.5. (WILDE; CLARK, 1996).

$$FE (\%) = \frac{V_e}{V_{is}} \quad (2.5)$$

sendo V_e o volume da espuma e V_{is} o volume inicial da suspensão.

Uma vez que a capacidade de formação de espuma foi determinada, a estabilidade da mesma precisa ser medida. Isto envolve medidas do volume da espuma ou de líquido drenado ao longo do tempo depois da formação da espuma. A habilidade da espuma reter o líquido e reduzir a drenagem é muito importante em muitas aplicações. Desta forma, a estabilidade da espuma (EE) pode ser expressa em termos do volume drenado em um determinado instante de tempo, após a formação da espuma (Equação 2.6). Com vistas a padronizar este instante de tempo buscando a avaliação comparativa de trabalhos, diversos autores têm adotado um tempo de meia vida, ou seja o período de tempo no qual o volume drenado atinge metade do volume da suspensão inicial. (WILDE; CLARK, 1996).

$$EE (\%) = \frac{V_{is} - V_{dt}}{V_{is} - V_d} \quad (2.6)$$

sendo V_{dt} o volume drenado após um período de repouso e V_d o volume drenado no instante de formação da espuma.

2.1.2.3 Lipídeos

De acordo com a sua capacidade de se associar com o amido (via interações do tipo *Van der Waals*), os lipídeos do arroz são frequentemente classificados como lipídeos amido e lipídeos não-amido. (LIU *et al.*, 2013). A maior proporção dos lipídeos do arroz localiza-se no gérmen (1/3 do conteúdo total) e no farelo (20 %, em base seca), especificamente como corpos lipídicos ou esferosomas na camada da aleurona; cerca de 1,5 a 1,7 % está presente no arroz polido, principalmente como lipídeos não-amido. (JULIANO, 1993).

Os lipídeos amido do endosperma estão associados à amilose. (LIU *et al.*, 2013). Os lipídeos amido são principalmente monoacilgliceróis (ácidos graxos e lisofosfatídeos) que formam complexos helicoidais de inclusão entre a amilose e a cadeia hidrocarbônica do lipídeo. (JULIANO, 1993; ZHOU *et al.*, 2002). Além disso, os corpos proteicos, particularmente os situados no endosperma do grão, são ricos em lipídeos. O principais ácidos graxos presentes são o linoleico (18:1) (29 a 42 %), o oleico (18:1) e o palmítico (16:0). O ácido linolênico (18:3) está presente em pequenas proporções (0,8 a 1,0 %). (JULIANO, 1993).

2.1.2.4 Minerais

Os minerais estão também concentrados nas camadas mais externas do grão integral, particularmente no farelo. De forma geral, aproximadamente 72 % está no farelo e 28 % no grão polido. Entretanto, alguns minerais apresentam distribuição mais uniforme, como sódio e cálcio, permanecendo no arroz branco polido 63 % do sódio e 74 % do cálcio do arroz integral. (JULIANO, 1993).

2.1.2.5 Vitaminas

O arroz contém principalmente vitaminas do complexo B e α -tocoferol (vitamina E), com concentrações insignificantes das vitaminas A, D e C. A concentração é maior nas camadas externas do grão, sendo que, para tiamina, riboflavina, niacina e α -tocoferol, aproximadamente 78, 47, 67 e 95 %, respectivamente, estão presentes no farelo. (JULIANO, 1993).

2.1.2 Pós-colheita e beneficiamento do arroz

As operações pós-colheita compreendem o transporte, recepção, pré-limpeza, secagem e armazenamento dos grãos de arroz. Após, os grãos seguem para o beneficiamento, quando na

produção de arroz integral ou branco polido, ou para o processo de parboilização, quando na obtenção de arroz parboilizado.

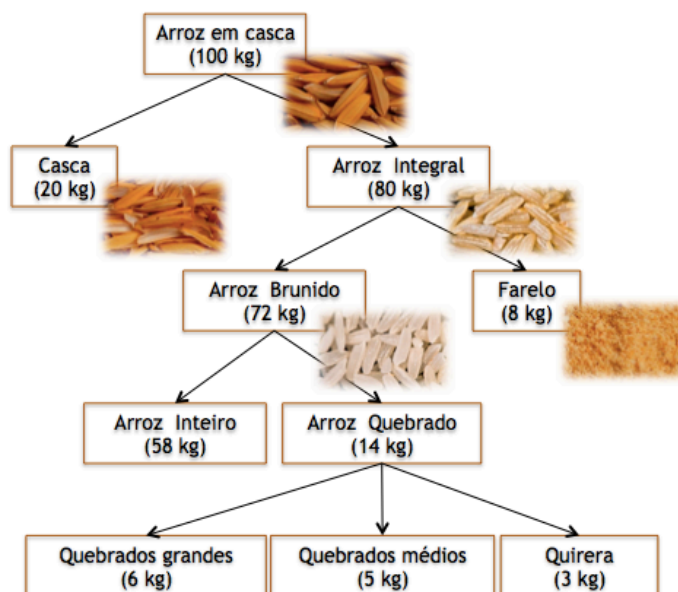
O transporte até unidade de secagem deve ocorrer no menor tempo possível. Ao chegar à unidade de conservação, é obrigatória a imediata operação de pré-limpeza. A secagem pode ser feita por vários métodos, desde o natural e os naturais melhorados, até a secagem forçada. Os principais danos causados aos grãos de arroz durante a secagem com ar aquecido são trincamento, formação de crosta periférica, alteração de coloração e desestruturação do amido, que provocam reduções no rendimento industrial e no valor comercial, além de diminuir a conservabilidade durante o armazenamento e dificultar as operações de preparo para consumo. (ELIAS; FRANCO, 2004).

Para obtenção do produto beneficiado polido, o arroz é primeiramente submetido ao descascamento do grão. A casca representa, aproximadamente, entre 20 e 22 % do peso total. (CASTRO *et al.*, 1999). A remoção da casca produz o chamado arroz integral. Assim que a casca é removida, a abrasão realizada sobre o farelo libera lipases que apresentam efeito hidrolítico sobre os lipídeos do grão. A subsequente rancidez resulta em *off-tastes* amargos e indesejáveis. Normalmente, assim que a casca é removida, o arroz é vendido para uso imediato como arroz integral ou segue para as próximas etapas do beneficiamento, que são a remoção do farelo e o polimento. (MITCHELL, 2009). Nas etapas de brunição e polimento são retirados o embrião (total ou parcialmente) e a maior parte da película que recobre o grão. A brunição, também conhecida como branqueamento, é complementada pelo polimento, que consiste no acabamento do produto e remoção dos resíduos de farelo. O coproduto resultante constitui o farelo, que representa cerca de 8 % do grão em casca ou 10 % do produto descascado. (CASTRO *et al.*, 1999). Este deve ser submetido à estabilização, um tratamento térmico que inativa as lipases. O farelo estabilizado tem sido usado como um ingrediente grau alimentício para alimentos processados. (MITCHELL, 2009).

Após o polimento, o arroz brunido e polido é dividido em uma série de frações de acordo com o seu tamanho. (MITCHELL, 2009). O total de grãos (inteiros e quebrados) recuperado após a eliminação da casca e do farelo é referido como “renda do benefício” e é expresso em porcentagem em relação ao produto bruto. Após o polimento, procede-se à separação entre as frações de grãos quebrados e inteiros, sendo considerado como inteiro o grão descascado e polido que, mesmo quebrado, apresente comprimento igual ou superior a três quartas partes do comprimento mínimo da classe a que pertence. A fração de grãos inteiros é referida como “rendimento do grão”. A Figura 2.4 apresenta um fluxograma com as quantidades aproximadas de produtos e coprodutos obtidos a partir do beneficiamento do arroz em casca. (CASTRO *et al.*, 1999).

O aproveitamento do arroz quebrado no Brasil é uma área ainda pouco explorada, quando comparada com outras partes do mundo. Considerando a produção brasileira de arroz de 2014, 12,1 milhões de toneladas (FAO, 2015), é possível estimar uma geração de mais de 1,5 milhões de toneladas de grãos quebrados ao ano (14 % do total de arroz com casca). Este coproduto é muito utilizado na alimentação animal, para a produção de ração. Fora do Brasil, o arroz quebrado é muito utilizado na produção industrial de farinhas de arroz de diferentes granulometrias e funcionalidades. Em todo o mundo há uma demanda constante por farinha de arroz para utilização em alimentos para bebês, cereais matinais, biscoitos, doces, macarrão, pães ázimos e outros. No Brasil, a produção de farinha de arroz para consumo humano também é realizada, mas a demanda por este produto é ainda menor do que a geração de grãos quebrados, sendo que o volume produzido deste coproduto ainda preocupa o setor.

Figura 2.4: Fluxograma representativo das quantidades aproximadas de produtos e coprodutos obtidos a partir do beneficiamento do arroz em casca.



Fonte: Castro *et al.* (1999); imagens adaptadas de Buggenhout *et al.* (2013).

Internacionalmente, nos últimos anos, ingredientes derivados de arroz polido e do arroz integral têm sido a base para o desenvolvimento de muitos novos alimentos. Os ingredientes já comercialmente disponíveis de arroz apresentam propriedades similares aos produtos da indústria do milho. Amido de arroz, proteínas de arroz, xaropes de arroz, dextrina de arroz e hidrolisados de arroz apresentam aplicações crescentes. (BAO; BERGMAN, 2004). O Capítulo 3 deste estudo apresenta um artigo de revisão que demonstra potencialidades do uso deste

coproduto na geração de ingredientes, abordando as principais propriedades e aplicações dos mesmos; além de discorrer sobre as tecnologia hoje disponíveis para realizar a sua produção.

2.2 Processos de Separação por Membranas

Os Processos de Separação por Membranas (PSM) compreendem uma vasta gama de processos fundamentalmente diferentes, desde a microfiltração até a eletrodialise. O fator comum que liga os diferentes tipos de operações de separação é o arranjo físico do processo. Em todos eles, a separação ocorre entre duas correntes separadas por uma fina interface ou barreira física. Esta interface constitui a membrana e permite o transporte seletivo de componentes das duas fases. (BELL; COUSINS, 1994).

Em essência, uma membrana nada mais é do que uma interface discreta e fina que modera a permeação de espécies químicas em contato com ela. Esta interface pode ser homogênea, isto é, completamente uniforme em composição e estrutura, ou pode ser quimicamente ou fisicamente heterogênea, por exemplo, contendo orifícios ou poros de dimensões finitas ou consistindo em uma estrutura em camadas. (BAKER, 2004). Segundo Habert, Borges e Nobrega (2006), em função das aplicações a que se destinam, as membranas apresentam diferentes morfologias. De um modo geral, as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: *densas* e *porosas*. Para se caracterizar as membranas são geralmente adotados parâmetros de natureza morfológica e parâmetros relativos às suas propriedades de transporte. No caso de membranas porosas, características como a distribuição de tamanho de poros, porosidade superficial e espessura são os parâmetros relevantes. Já para membranas densas, as características físico-químicas tais como o polímero utilizado e as substâncias a serem separadas, assim como a espessura do filme polimérico, são os parâmetros importantes. Entretanto, independente do tipo de membrana, as propriedades de transporte como permeabilidade a gases e líquidos, bem como a sua capacidade seletiva são utilizadas como parâmetros característicos dos processos.

A grande maioria das membranas usadas comercialmente são constituídas por materiais poliméricos. No entanto, nos últimos anos, o interesse em membranas formadas a partir de materiais menos convencionais aumentou. Membranas cerâmicas, uma classe especial de membranas microporosas, estão sendo usadas em aplicações de ultrafiltração e microfiltração, para os quais são necessários resistência a solventes e elevada estabilidade térmica. Além disso,

membranas metálicas densas, particularmente membranas de paládio, estão sendo consideradas para a separação de hidrogênio a partir de misturas de gases, por exemplo. (BAKER, 2004).

2.2.1 Classificação dos PSM

Uma classificação possível para os PSM é em termos do tamanho dos poros da membrana, da força motriz que governa o processo de transferência através da membrana e do mecanismo de transporte. Alternativamente, os processos com membranas podem ser classificados em termos do tamanho da molécula que está sendo separada. Tendo em mente que estas classificações se sobrepõem, não há uma definição rígida. (BELL; COUSINS, 1994). Segundo Habert, Borges e Nobrega (2006), os PSM que utilizam diferença de pressão através da membrana como força motriz têm sido utilizados para concentrar, fracionar e purificar soluções diluídas. De acordo com a natureza e do tipo de solutos e da presença ou não de partículas em suspensão, membranas com diferentes tamanhos e distribuição de poros ou mesmo densas são empregadas, caracterizando os processos conhecidos como Microfiltração (MF), Ultrafiltração (UF) e Osmose Inversa (OI). O Quadro 2.1 apresenta uma classificação normalmente aceita para os PSM.

Os processos de micro e de ultrafiltração serão detalhados a seguir, pois esses são os processos de interesse para o desenvolvimento deste trabalho.

2.2.1.1 Microfiltração

A microfiltração (MF) é o processo de separação com membranas mais próximo da filtração clássica. É indicado para a retenção de materiais em suspensão e emulsões. Como as membranas de MF são relativamente abertas, as pressões empregadas como força motriz para o transporte são baixas, dificilmente ultrapassando 3 bar. Na MF o solvente e todo o material solúvel permeia através da membrana, sendo retido apenas o material em suspensão.

Quadro 2.1: Classificação para os processos de separação por membranas.

Processo	Tamanho de poro Massa Molar de Corte	Força motriz	Mecanismo
Microfiltração	0,02 – 10 μm	Pressão 0,5 – 2 bar	Exclusão por tamanho
Ultrafiltração	0,001 – 0,02 μm $10^3 - 10^6$ Da	Pressão 1 – 7 bar	Exclusão por tamanho
Nanofiltração	0,001 – 0,005 μm	Pressão 5 – 40 bar	Exclusão por tamanho/ Solução-difusão
Osmose inversa	Não porosa < 10^3 Da	Pressão 10 – 100 bar	Solução-difusão
Osmose direta	Não porosa	Diferença de pressão osmótica	Solução-difusão
Permeação de gases	Não porosa	Pressão 0 – 100 bar	Solução-difusão
Diálise	10 – 30 Å	Diferença de concentração	Exclusão por tamanho e diferença de difusividade
Eletrodiálise	Não porosa < 2×10^2 Da	Potencial elétrico	Migração iônica
Pervaporação	Não porosa	Pressão parcial de vapor	Solução-difusão

Fonte: Adaptado de Bell e Cousins (1994) e Nóbrega, Habert e Borges (2001).

2.2.1.2 Ultrafiltração

A ultrafiltração (UF) é um processo de separação por membranas utilizado quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo macromoléculas. As membranas de UF apresentam poros mais fechados do que as membranas de MF. Soluções contendo solutos numa ampla faixa de massa molar ($10^3 - 10^6$ Dalton) podem ser tratadas por este processo. Como os poros das membranas de UF são menores, uma maior força motriz é necessária para obter fluxos permeados elevados o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente. Por este motivo as diferenças de pressão através da membrana variam na faixa de 1 a 7 bar.

2.2.2 Modos de operação

De acordo com a aplicação pretendida, existem diferentes maneiras de se operar um sistema de membranas. Os principais modos são o reciclo total, batelada e a diafiltração.

No modo de operação reciclo total, as correntes de concentrado e permeado retornam continuamente para o tanque de alimentação. Esse modo de operação é utilizado na determinação das melhores condições de operação do sistema, para avaliar a retenção da membrana e estudar as interações membrana-solução.

O modo batelada consiste em remover continuamente a corrente de permeado do sistema, enquanto que a corrente de concentrado retorna ao tanque de alimentação.

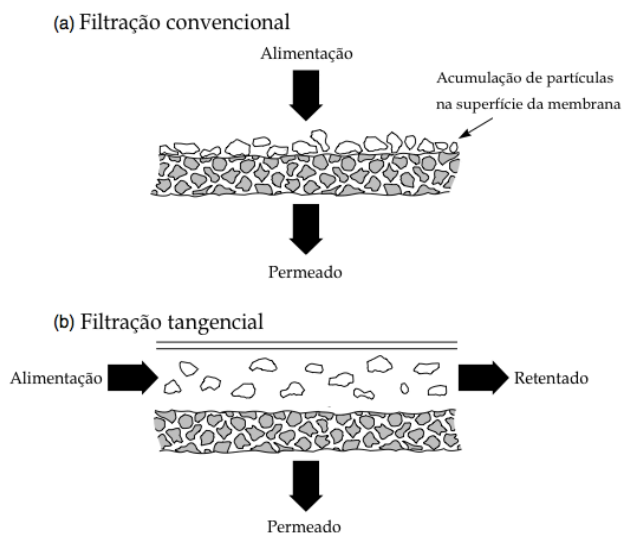
A diafiltração é um modo de operação diferente para os PSM, consiste basicamente em operar, por exemplo, os processos de MF ou UF, com uma alimentação contínua de solvente em vazão igual à vazão de permeado. Trata-se de uma operação de “lavagem” da solução problema. A diafiltração é utilizada quando se deseja purificar um determinado soluto de uma solução, onde os contaminantes são compostos de dimensões menores do que as do soluto de interesse, ou aumentar a recuperação de um microsoluto na corrente de permeado. Para o caso da purificação, os contaminantes vão sendo eliminados no permeado, enquanto a membrana retém o soluto de interesse. Uma vez alcançada a pureza desejada, interrompe-se a adição de solvente e, se necessário, pode-se efetuar a concentração do soluto purificado em modo batelada. A diafiltração pode também ser operada em regime semicontínuo, com o solvente sendo adicionado por etapas, nesse caso é possível minimizar a geração de permeado.

2.2.3 Princípios dos PSM

Nos sistemas de PSM, basicamente duas configurações de escoamento são utilizadas: a filtração convencional ou *dead-end* e a filtração tangencial ou *cross-flow* (Figura 2.5).

Na primeira, a solução de alimentação escoia perpendicularmente à superfície da membrana, promovendo a formação de uma camada na superfície da membrana semelhante a uma torta, devido ao acúmulo das partículas retidas. Na filtração tangencial, a alimentação escoia ao longo da superfície da membrana, reduzindo o acúmulo das partículas retidas. (BAKER, 2004).

Figura 2.5: Representação esquemática de (a) filtração convencional e (b) filtração tangencial com membranas de microfiltração.



Fonte: Adaptado de Baker (2004).

2.2.3.1 Mecanismos de permeação

O fluxo permeado representa a vazão (volumétrica, mássica ou molar) de permeado por unidade de área da membrana e é determinado pela força motriz aplicada e pela resistência apresentada pela membrana (ou por sua permeabilidade), que muitas vezes, são proporcionais.

A propriedade mais importante de uma membrana é a sua capacidade de controlar a taxa de permeação de diferentes espécies. O movimento de qualquer espécie através da membrana é causado pela ação de uma ou mais forças motrizes sobre os componentes da alimentação. A maioria dos processos utiliza como força motriz, o gradiente de potencial químico – que pode ser expresso em função do gradiente de pressão, de concentração ou de temperatura – ou o gradiente de potencial elétrico. De acordo com o tipo de membrana utilizada, dois modelos são utilizados para descrever o mecanismo de permeação, o *fluxo convectivo* e o fluxo devido à *solução-difusão*.

Em membranas porosas, especialmente nas membranas de microfiltração e em menor grau nas membranas de ultrafiltração, a membrana atua principalmente como uma peneira. Por possuírem poros relativamente grandes, os processos não são seletivos. As espécies químicas pequenas o suficiente para entrar nos poros são transportadas por *fluxo convectivo*. A performance da separação por membranas nestas circunstâncias é grandemente determinada pela aplicação, ou seja, as características da corrente que está sendo processada afeta largamente a performance da membrana. (BELL; COUSINS, 1994). O fluxo convectivo para os processos de micro e de

ultrafiltração é governado pelo gradiente de pressão, e a equação básica que representa este mecanismo de transporte é a Lei de Darcy, que pode ser escrita conforme a Equação 2.7.

$$J_i = K' c_i \frac{dp}{dx} \quad (2.7)$$

sendo J_i o fluxo de transferência do componente i , ($\text{g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e dp/dx o gradiente de pressão existente no meio poroso (dyn cm^{-3}), c_i a concentração do componente i no meio (g cm^{-3}) e K' um coeficiente que reflete a natureza do meio ($\text{cm}^3 \text{ s g}^{-1}$).

Esta equação pode ser escrita da forma como apresentado na Equação 2.8, com a definição da permeabilidade (L_p) da membrana. A permeabilidade é uma propriedade que quantifica o desempenho de permeação da membrana.

$$J = L_p \frac{\Delta P}{\Delta x} \quad (2.8)$$

sendo J o fluxo de permeado ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), L_p a permeabilidade ($\text{L m m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$), ΔP a pressão transmembrana (diferença entre a média aritmética entre as pressões de entrada e saída do módulo e a pressão da corrente de permeado) (bar) e Δx a espessura da membrana (m). Quando o fluido de trabalho é a água, L_p é chamada permeabilidade hidráulica, medida útil para caracterizar a membrana, além de indicar seu grau de integridade. Como durante o processo a membrana está compactada, sua espessura não é conhecida. Desta forma, a constante de proporcionalidade entre a pressão transmembrana e o fluxo de permeado é a permeância ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$), que consiste na razão entre a permeabilidade hidráulica e a espessura da membrana.

Em membranas com um menor tamanho de poro, a probabilidade de moléculas colidirem com a parede da membrana porosa é aumentada. Se a interação com a parede é diferente para as diferentes espécies químicas presentes na solução que está sendo tratada, a membrana apresentará uma seletividade intrínseca. Com a diminuição dos poros e à tendência de uma estrutura não porosa, a membrana passa a ter um papel maior na separação, e o mecanismo muda de fluxo convectivo através dos poros para fluxo difusivo ou *solução-difusão* dentro do polímero. (BELL; COUSINS, 1994). A difusão, a base do modelo de solução-difusão, é o processo pelo qual o soluto é transportado a partir de uma parte de um sistema para outro por um gradiente de concentração. Assim, segundo a Lei de Difusão de Fick (Equação 2.9):

$$J_i = - D_i \frac{dc_i}{dx} \quad (2.9)$$

sendo dc_i/dx o gradiente de concentração do componente i na direção x . O termo D_i é chamado difusividade mássica ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e é uma medida da mobilidade das moléculas individuais.

Assim, o fluxo permeado depende das propriedades da membrana, do produto a ser separado e das condições de operação tais como a pressão transmembrana, velocidade de escoamento tangencial e fator de concentração. Também é fortemente influenciado pela temperatura da solução de alimentação. Isso se dá, pois o fluxo é função da viscosidade dinâmica da solução que, por sua vez, é função da temperatura. Assim, quanto maior a temperatura, menor a viscosidade e maior o fluxo de permeado.

Outros parâmetros importantes que afetam o fluxo através da membrana são o pH e a força iônica; o efeito de cada um deles, entretanto, varia muito em função da solução de alimentação e da membrana utilizada. Estes parâmetros influenciam, principalmente, na solubilidade dos componentes da alimentação, alterando as interações entre essa solução e a membrana.

2.2.3.2 Retenção

O coeficiente de retenção (também chamado de coeficiente de rejeição) fornece a medida da habilidade de separação da membrana para diferentes operações conduzidas pela pressão: microfiltração, ultrafiltração e osmose inversa. É a fração de um componente presente na solução de alimentação que é retida pela membrana. O coeficiente de retenção observado (R_o) pode ser definido como descrito na Equação 2.10.

$$R_o = \frac{C_b - C_p}{C_b} \quad (2.10)$$

sendo C_b a concentração de soluto na solução de alimentação e C_p a concentração de soluto no permeado.

As membranas de UF normalmente são especificadas através da retenção nominal (*cut off*). A retenção nominal de uma membrana é definida como sendo o valor da massa molar para a qual a membrana apresenta um coeficiente de rejeição de 95 %. Assim, uma membrana com retenção nominal de 15 kDa é aquela capaz de rejeitar 95 % das moléculas presentes em uma solução de um soluto com massa molar de 15.000 Dalton.

2.2.3.3 Fator de concentração

O fator de concentração (FC) é uma variável limitante do processo porque está diretamente ligado ao fluxo permeado, isto é, a medida que a solução é concentrada o fluxo permeado diminui. O FC é definido conforme a Equação 2.11.

$$FC = \frac{V_0}{V_R} = \frac{V_0}{(V_0 - V_F)} \quad (2.11)$$

sendo FC fator de concentração de uma dada espécie; V_0 é o volume inicial da solução (L); V_R é o volume do retido (L); V_F é o volume da solução permeada (L).

2.2.4 Fatores externos que afetam a performance da membrana

Existem dois fatores principais que alteram a seletividade e afetam adversamente o fluxo das membranas: a *polarização por concentração* e as *incrustações*.

Quando se processa uma solução com solutos de baixa massa molar ou macromoléculas utilizando-se PSM, devido à seletividade do processo, sempre haverá aumento da concentração das espécies retidas próximo à superfície da membrana, independente da operação ser do tipo filtração convencional ou tangencial. O fato de a concentração do soluto próximo à superfície da membrana ser maior do que na solução provoca um movimento difusivo deste soluto no sentido de retornar ao seio da solução. Quando o sistema é operado em escoamento tangencial, é possível obter um equilíbrio entre a quantidade de soluto que é transportado em direção à membrana, arrastado pelo fluxo de solvente que permeia a membrana, e a quantidade de soluto que se difunde da região próxima à superfície da membrana em direção ao seio da solução. O resultado deste equilíbrio é um perfil de concentração de soluto, próximo à membrana, independente do tempo, o que possibilita o sistema ser operado em condições de regime estabelecido de transferência de massa, ou seja, fluxo permeado constante. Este fenômeno conhecido como *polarização por concentração*, é inerente a qualquer processo de transporte seletivo.

Nos processos em escoamento tangencial, a polarização de concentração se estabelece em questão de minutos. Ela também provoca uma resistência adicional à transferência de massa do solvente através da membrana, com consequente queda no fluxo permeado, em relação ao fluxo de solvente puro obtido na mesma pressão. A polarização por concentração é fortemente afetada pelas condições de escoamento da corrente da alimentação, quantificadas pelo número de Reynolds (Re). Na medida em que se aumenta a velocidade tangencial da alimentação a espessura da região polarizada irá diminuir. Como consequência, o nível de polarização diminui e o fluxo permeado aumenta.

Como comentado anteriormente, o fenômeno de polarização por concentração se estabiliza nos instantes iniciais do processamento. Entretanto, é comum observar uma queda *contínua* do fluxo permeado com o tempo, indicando que outros fenômenos devem estar

presentes durante o processamento. Esta variação continuada do fluxo permeado com o tempo é atribuída a possíveis alterações na membrana provocadas pelas espécies presentes na solução processada. O conjunto dessas alterações é conhecido como incrustações (*fouling*) da membrana e, em alguns casos, pode levar a fluxos permeados tão baixos que chega a inviabilizar uma dada aplicação.

Os principais fenômenos que contribuem para a formação de incrustações são:

- a) *adsorção das moléculas de soluto na superfície da membrana* ou/e no interior de seus poros devido à interações físico-químicas com a membrana;
- b) *entupimento de poros por moléculas ou partículas em suspensão*; que consiste na ação mecânica de bloqueio de poros, que pode ocorrer tanto na superfície como no seu interior da membrana, dependendo de sua morfologia;
- c) *depósito de material em suspensão sobre a superfície da membrana* com formação de uma torta de filtração. No caso de soluções de macromoléculas, na região próxima à superfície da membrana, pode-se atingir uma concentração suficientemente elevada, de modo a possibilitar a geleificação da solução nesta região. Solutos de baixa massa molar, como sais, por exemplo, podem atingir o limite de solubilidade e precipitarem na superfície da membrana.

A queda do fluxo permeado com o tempo, observada nos PSM, é um problema inevitável. Entretanto, existem algumas técnicas de operação que resultam em recuperação, ao menos parcial, do fluxo permeado. A mais comum é a retrolavagem (*backflushing*) que é a inversão, por um intervalo curto de tempo, do sentido do fluxo permeado. Outra alternativa para se melhorar o fluxo permeado é a limpeza periódica da membrana, com soluções ácidas e alcalinas, ou utilizando surfactantes ou enzimas.

2.2.5 Fluxo limite e fluxo crítico

O fenômeno de incrustações tem sido amplamente estudado, uma vez que sua minimização torna os processos de separação por membranas mais atrativos, pois garante um maior fluxo de permeado, bem como proporciona maior vida útil às membranas. Uma forma de mitigar as incrustações é através da determinação do fluxo crítico. Este pode ser genericamente definido como o “primeiro” fluxo de permeado no qual o fenômeno de incrustações torna-se visível, sendo então bem diferenciado do fluxo limite, o qual é possivelmente o conceito mais antigo da filtração tangencial. (BACCHIN; AIMAR; FIELD, 2006). O fluxo limite representa o

máximo fluxo de permeado em estado estacionário que pode ser alcançado com o aumento da pressão transmembrana com uma dada solução ou suspensão, frente às condições hidrodinâmicas às quais o processo está submetido. O termo fluxo crítico tem sido usado principalmente de duas maneiras, *tanto* como o fluxo no qual a curva fluxo de permeado *vs* pressão transmembrana começa a se desviar da linearidade *ou* como o primeiro fluxo de permeado para o qual as incrustações irreversíveis são observadas. (BACCHIN; AIMAR; FIELD, 2006). De fato, partindo-se do princípio que a pressão transmembrana é a força motriz que governa o fenômeno de transferência de massa nos processos de microfiltração e ultrafiltração, entende-se que o aumento da pressão deve ocasionar um aumento de fluxo de permeado, fenômeno que é observado para pressões mais baixas. No entanto, o aumento do fluxo de permeado provoca uma maior concentração das espécies retidas próximo à superfície da membrana, o que tende a provocar uma queda no fluxo de permeado. Assim, a partir de certo valor de pressão, um aumento adicional desta corresponde a um aumento equivalente na resistência ao transporte do solvente, devido à polarização por concentração. A consequência é que o fluxo de permeado permanece inalterado com o aumento da pressão que leve o fluxo permeado ao seu valor limite. Ou seja, depois deste ponto, o aumento da pressão transmembrana não provoca uma elevação linear do fluxo de permeado, de acordo com o modelo de permeabilidade da membrana (Equação 2.8), mas tende a se aproximar a um valor assintótico devido à resistência da camada gel formada. (SCOTT, 1996). O valor pressão relativa ao fluxo limite deve ser determinado experimentalmente para cada tipo de sistema, uma vez que depende do nível de polarização do mesmo, que é função direta da concentração de soluto da alimentação, da hidrodinâmica do escoamento e da capacidade seletiva da membrana para o soluto em questão. A operação do sistema deve sempre ocorrer abaixo desta pressão, de forma a minimizar o fenômeno de incrustações, melhorando a eficiência do processo.

2.3 Referências

- 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. doi:10.1016/j.jcs.2004.10.007
- AZAMBUJA, I. H. V.; VENETTI JR., F. J.; MAGALHÃES JR., A. M. Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz. In: MAGALHÃES JR., A. M.; GOMES, A. S.; SANTOS, A. B. *Sistema de Cultivo de Arroz Irrigado no Brasil*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 270 p.
- BACCHIN, P.; AIMAR, P.; FIELD, R. W. Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications. *Journal of Membrane Science*, v. 281, p. 42–69, 2006.

- BAKER, R. W. *Membrane Technology and Applications*. 2ª. ed. England: John Wiley & Sons Ltda, 2004.
- BAO, J.; BERGMAN, C. J. The functionality of rice starch. In: ELIASSON, A.C. *Starch in food: Structure, function and applications*. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- BARBUT, S. Determining water and fat holding. In: HALL, G. M. *Methods of Testing Protein Functionality*, London: Chapman & Hall, 1996. 265 p.
- BELL, G.; COUSINS, R. B. Membrane separation processes. In: WEATHERLEY, L. R. *Engineering Processes for Bioseparations*, Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd., 1994. 296 p.
- BUGGENHOUT, J.; BRIJS, K.; CELUS, I.; DELCOUR, J. A. The breakage susceptibility of raw and parboiled rice: A review. *Journal of Food Engineering*, v. 117, p. 304–315, 2013. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.03.009
- CAI, J.; YANG, Y.; MAN, J.; HUANG, J.; WANG, Z.; ZHANG, C.; ... WEI, C. Structural and functional properties of alkali-treated high-amylose rice starch. *Food Chemistry*, v. 145, p. 245–53, 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.059
- CAO, X., WEN, H., LI, C., GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. *Journal of Cereal Science*, v. 50(2), p. 184–189, 2009. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.04.009>
- CASTRO, E. M.; VIEIRA, N. R. A.; RABELO, R. R.; SILVA, S. A. *Qualidade de grãos em arroz*. Santo Antônio de Goiás, 1999. 30 p.
- ELIAS, M. C.; FRANCO, D. F. Pós-Colheita e Industrialização de Arroz. In: MAGALHÃES JR., A. M.; GOMES, A. S.; SANTOS, A. B. *Sistema de Cultivo de Arroz Irrigado no Brasil*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 270 p.
- Encyclopædia Britannica Online*, 1996. Disponível em: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/121735/The-outer-layers-and-internal-structures-of-a-rice-grain>. Acesso em: 23 dez. 2013.
- FAO (Food and Agriculture Organization of United Nation). Rice Market Monitor - April 2015. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, v. XVIII, 2015. 42 p.
- FAO. (2002). *PROTEIN AND AMINO ACID REQUIREMENTS IN HUMAN NUTRITION*. Geneva.
- FRIEDMAN, M. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 6–29, 1996.
- GUERRIERI, N. Cereal proteins. In: YADA, R. Y. *Proteins in food processing*. Boca Raton: CRC Press, 2004. pp. 176-196.
- GUIMARÃES, C. M.; FAGERIA, N. K.; FILHO, M. P. B. Como a planta de arroz se desenvolve. *Informações Agrônomicas*, 2002. 12 p.
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. *Processos de Separação por Membranas*. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda., 2006.

- HILL, S. E. Emulsions. In: HALL, G. M. *Methods of Testing Protein Functionality*, London: Chapman & Hall, 1996. 265 p.
- IRGA (Instituto Riograndense do Arroz). *Produtividades municipais Safra 2014/15*. Governo do Estado do Rio Grande do Sul, Secretaria da Agricultura e Pecuária, 2015. Disponível em: http://www.irga.rs.gov.br/upload/20150710145210produtividade_municipios_safra_14_15.pdf. Acesso em: 07 de abril de 2016.
- JANE, J. Structural Features of Starch Granules II. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. *Starch: Chemistry and Technology*. 3ª. ed. Elsevier, 2009.
- JU, Z. Y.; HETTIARACHCHY, N. S.; RATH, N. Extraction, Denaturation and Hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. *Journal of Food Science*, v. 66, p. 229-232, 2001.
- JULIANO, B. O. Rice in Human Nutrition. Rome: International Rice Institute, 1993. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0567e/t0567e00.htm>. Acesso em: 26 dez. 2013.
- JULIANO, B. O.; BOULTER, D. Extraction and Composition of Rice Endosperm Glutelin. *Phytochemistry*, v. 15, p. 1601-1606, 1976.
- LAI, V. M. F.; LU, S.; HE, W. H.; CHEN, H. H. Non-starch polysaccharide compositions of rice grains with respect to rice variety and degree of milling. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1205-1210, 2006. doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.024
- LAM-SÁNCHEZ, A.; SANTOS, J. E.; TAKAMUA, K.; TREPTOW, R. M. O.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. Estudos nutricionais com Arroz (*Oryza sativa*, L.). *Alimentos e Nutrição*, v. 5, p. 37-48, 1994.
- LIU, L.; WATERS, D. L. E.; ROSE, T. J.; BAO, J.; KING, G. J. Phospholipids in rice: significance in grain quality and health benefits: a review. *Food Chemistry*, v. 139, p. 1133-45, 2013. doi:10.1016/j.foodchem.2012.12.046
- LUMDUBWONG, N.; SEIB, P. A. Rice Starch Isolation by Alkaline Protease Digestion of Wet-milled Rice Flour. *Journal of Cereal Science*, v. 31, p. 63-74, 2000. doi:10.1006/jcrs.1999.0279
- MATSUMURA, Y.; MORI, T. Gelation. In: HALL, G. M. *Methods of Testing Protein Functionality*, London: Chapman & Hall, 1996. 265 p.
- MITCHELL, C. R. Rice Starches: Production and Properties. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. *Starch: Chemistry and Technology*. 3ª. ed. Elsevier, 2009.
- NÓBREGA, R.; HABERT, A. C.; BORGES, C. P. *Introdução aos processos de separação com membranas*. Programa de Engenharia Química - COPPE/UFRJ. Rio de Janeiro, 2001.
- ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnología de Alimentos*, v. 1, Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.
- PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 26, p. 716-723, 1978. doi:10.1021/jf60217a041
- PÉREZ, S.; BALDWIN, P. M.; GALLANT, D. J. Structural Features of Starch Granules I. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. *Starch: Chemistry and Technology*. 3ª. ed. Elsevier, 2009.

-
- PREISS, J. Biochemistry and Molecular Biology of Starch Biosynthesis. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. *Starch: Chemistry and Technology*. 3ª. ed. Elsevier, 2009.
- SCOTT, K. *Handbook of Industrial Membranes*. 1ª. ed. Elsevier, 1996.
- SGARBIERI, V. C. *Proteínas em Alimentos Proteicos*. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.
- SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 947-58, 2002.
- VAN DER BORGHT, A.; 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.
- VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G. M. *Methods of Testing Protein Functionality*, London: Chapman & Hall, 1996. 265 p.
- WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. DE. Arroz: composição e características nutricionais. *Ciência Rural*, v. 38, p. 1184-1192, 2008.
- WILDE, P. J.; CLARK, D. C. Foam formation and stability. In: HALL, G. M. *Methods of Testing Protein Functionality*, London: Chapman & Hall, 1996. 265 p.
- ZHAO, Q.; SELOMULYA, C.; XIONG, H.; CHEN, X. D.; RUAN, X.; WANG, S.; ... ZHOU, Q. Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice. *Journal of Cereal Science*, v. 56, p. 568-575, 2012. doi:10.1016/j.jcs.2012.08.012
- ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 37, p. 849-868, 2002.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica: Ingredientes obtidos a partir do coproduto arroz quebrado

O arroz quebrado, coproduto do processo de beneficiamento do arroz polido, apresenta baixo valor comercial. Com base no total de arroz colhido no Brasil em 2014 (12,1 milhões de toneladas) e no fato de que cerca de 14 % da massa do grão em casca é convertido em arroz quebrado durante o beneficiamento, estima-se que em 2014 tenham sido produzidas mais de 1,5 milhões de toneladas deste coproduto no Brasil. Seu aproveitamento ainda é um desafio e preocupa o setor orizícola brasileiro. Internacionalmente este coproduto é matéria-prima básica para a geração de muitos ingredientes que cada vez mais vem ganhando mercado e importância na indústria de alimentos. O baixo potencial alergênico do arroz atrai a atenção dos consumidores, e estimula a indústria a utilizar ingredientes derivados do arroz como matérias-primas ou aditivos na fabricação de alimentos industrializados.

Este capítulo apresenta um trabalho de revisão de literatura que aborda propriedades e tecnologias de obtenção de amido, proteína e hidrolisados proteicos de arroz. Ao término do capítulo, são apresentadas questões de pesquisa elaboradas sobre o tema e que se busca responder nesta tese.

3.1 Artigo 1

INGREDIENTES OBTIDOS A PARTIR DO COPRODUTO ARROZ QUEBRADO: PROPRIEDADES E TECNOLOGIAS DE OBTENÇÃO

Daiana de Souza^{*a,b}, Denize Righetto Ziegler^b, Ligia Damasceno Ferreira Marczak^a, Isabel Cristina Tessaro^a

^a Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Engenheiro Luiz Englert s/n, Porto Alegre/RS 90040-040, Brasil

^b Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor), Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93022-000, Brasil

* Autor para correspondência (Daiana de Souza)

Endereço atual: Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor), Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93022-000, Brasil

Fone/Fax: +55 51 35908842

E-mail: daianasouz@unisinos.br (D. de Souza).

Resumo:

O arroz quebrado é um coproduto de baixo valor comercial derivado do beneficiamento do arroz polido. O aproveitamento deste coproduto no Brasil é uma área ainda pouco explorada, quando comparada com outras partes do mundo. Atualmente no Brasil este coproduto é matéria-prima para a produção de farinha de arroz para consumo humano, mas sua demanda é ainda menor do que a geração de grãos quebrados, sendo que o volume produzido deste coproduto ainda preocupa o setor arroseiro. Este trabalho apresenta uma revisão de literatura acerca das principais tecnologias empregadas no processamento de amido, proteína e hidrolisados proteicos de arroz, buscando discorrer sobre as potencialidades e limitações das mesmas na obtenção destes importantes ingredientes. Inicia apresentando uma breve contextualização acerca das propriedades do amido e da proteína de arroz, destacando suas aplicações nas Indústrias de Alimentos e Bebidas. Em seguida traz os principais resultados obtidos em diferentes estudos que avaliaram a influência dos parâmetros do processo de obtenção destes ingredientes, pretendendo entender a influência da aplicação de diferentes tecnologias nas características e propriedades dos produtos obtidos. Por fim, analisa a importância da hidrólise proteica tanto na melhoria das propriedades funcionais de proteínas, quanto na obtenção de peptídeos bioativos à base de arroz.

Palavras-chave: Arroz quebrado; Amido de Arroz; Proteína de Arroz; Hidrolisado proteico de arroz; Extração alcalina; Extração enzimática; Hidrólise enzimática de proteínas.

3.1.1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado hipoalergênico porque não possui gliadinas ou peptídeos que estão normalmente associados com as respostas alérgicas, tais como as que podem ser causadas pelo trigo, cevada ou centeio. Tradicionalmente, o arroz é percebido como um alimento equilibrado, como de fato o é; sua melhor digestibilidade, em comparação com outros grãos de cereais, levou à sua utilização preferencial em alimentos infantis e geriátricos, seguindo as recomendações médicas de que o arroz seja o primeiro grão de cereal a ser oferecido às crianças, e ao fato de ser o grão preferido para recuperar pacientes. São raras as evidências científicas que sustentem por que o arroz tem essa vantagem digestiva, apenas centenas de anos de experiência anedótica. (MITCHELL, 2009).

O arroz quebrado é um coproduto de baixo valor comercial derivado do beneficiamento do arroz polido. O aproveitamento deste coproduto no Brasil é uma área ainda pouco explorada, quando comparada com outras partes do mundo. Considerando a produção brasileira de arroz de 2014, 12,1 milhões de toneladas (FAO, 2015), é possível estimar uma geração de cerca de 1,7 milhões de toneladas de grãos quebrados ao ano (14 % do total de arroz com casca). Este coproduto é muito utilizado na alimentação animal, para a produção de ração. Além disso, atualmente no Brasil este coproduto é matéria-prima para a produção de farinha de arroz para consumo humano, mas sua demanda é ainda menor do que a geração de grãos quebrados, sendo que o volume produzido deste coproduto ainda preocupa o setor.

Internacionalmente, o arroz quebrado, tanto com alto quanto com baixo teor de amilose, é utilizado na produção industrial de farinhas de arroz de diferentes granulometrias e funcionalidades. Em todo o mundo há uma demanda constante por farinha de arroz para utilização em alimentos para bebês, cereais matinais, biscoitos, doces, macarrão, pães ázimos e *snacks*. A farinha de arroz é comumente usada para preparar biscoitos e massas de pizza pré-formados e não assados, como um extensor para queijos em pó e açúcares, como revestimento para batatas fritas e em misturas para panquecas e *waffles*. O uso de farinha de arroz em *batters* (recobrimentos de empanados) confere crocância ao recobrimento e reduz a absorção de óleo durante a fritura, retardando a transferência de umidade e aumentando o tempo de vida de prateleira do produto. Pães fermentados sem glúten podem ser produzidos com farinha de arroz aditivada com metilcelulose. A farinha de arroz também tem sido usada como uma fonte de carboidratos para soluções isotônicas para rehidratação. Uma combinação de farinha de arroz extrusada e xarope de arroz é um bom substituto de gordura. A farinha de arroz ceroso (0 a 2% de amilose) é frequentemente usada como um agente de textura em molhos brancos, molhos de

carne e pudins. Além disto, a farinha de arroz pode prevenir a sinérese durante os ciclos de congelamento e descongelamento desses produtos. Esses poucos exemplos demonstram a diversidade dos produtos nos quais a aplicação da farinha de arroz traz benefícios tecnológicos. (BAO; BERGMAN, 2004).

Nos últimos anos, ingredientes derivados de arroz polido e do arroz integral têm sido a base para o desenvolvimento de muitos novos alimentos. Os ingredientes já comercialmente disponíveis de arroz apresentam propriedades similares aos produtos da indústria do milho. Amido de arroz, proteínas de arroz, xaropes de arroz, dextrina de arroz e hidrolisados de arroz apresentam aplicações diversas; todos estes ingredientes são singularmente diferentes dos seus homólogos derivados do milho. Produtos baseados inteiramente em ingredientes à base de amido de arroz, como vinagres, soluções de reidratação oral, bebidas não-lácteas, sobremesas congeladas e pudins, são *commodities* estáveis no mercado, muitas vezes assumindo a liderança nas vendas sobre os seus homólogos de milho ou de soja em alimentos naturais e segmentos de marketing convencionais. (MITCHELL, 2009).

O amido de arroz é preferencialmente preparado a partir de arroz quebrado por razões econômicas. (MITCHELL, 2009). Como os dois mais abundantes componentes do grão de arroz polido são o amido e a proteína, a extração do amido sugere que a proteína de arroz deva ser considerada quando se investiga o potencial para agregação de valor ao arroz quebrado. (AGBOOLA, NG; MILLS, 2005). O interesse nessas proteínas é crescente, pois não são somente úteis como suplementos alimentares, mas também são adequadas para uma ampla gama de aplicações na indústria de alimentos; elas podem ser usadas em produtos de panificação, coberturas cremosas, molhos, etc., devido a suas altas capacidades de retenção de água e óleo, o que auxilia na redução da perda de umidade e mantém uma agradável textura nestes produtos. (CAO *et al.*, 2009). Adicionalmente, a proteína de arroz pode ser modificada visando a geração, tanto de hidrolisados proteicos com distintas propriedades funcionais, que permitem a extensão de sua aplicação como ingredientes em alimentos, quanto de peptídeos bioativos com diferentes funcionalidades como aditivos alimentares (por terem ação antioxidante, por exemplo) ou com benefícios à saúde humana (com ação hipotensora, por exemplo).

Este trabalho apresenta uma revisão de literatura acerca das principais tecnologias empregadas no processamento de amido, proteína e hidrolisados proteicos de arroz, onde busca discorrer sobre as potencialidades e limitações das mesmas na obtenção destes importantes ingredientes. Inicia com a apresentação de uma breve contextualização acerca das propriedades do amido e da proteína de arroz, destacando suas aplicações nas Indústrias de Alimentos e Bebidas. Em seguida traz os principais resultados obtidos em diferentes estudos que avaliaram a influência dos parâmetros do processo de obtenção destes ingredientes, com o objetivo de

entender a influência da aplicação de diferentes tecnologias nas características e propriedades dos produtos obtidos. Por fim, analisa a importância da hidrólise proteica tanto na melhoria das propriedades funcionais de proteínas, quanto na obtenção de peptídeos bioativos à base de arroz.

3.1.2 Amido de arroz

O amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é essencialmente um polímero linear, enquanto que a amilopectina é um polímero altamente ramificado. A amilose apresenta cadeias lineares de cerca de 840 a 22.000 unidades de α -D-glicopiranosil unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. As moléculas de amilose podem conter pequenas ramificações (um ponto de ramificação a cada 170 a 500 unidades glicosil). A amilopectina geralmente compreende cerca de 70 a 80 % do grânulo de amido e é muito mais ramificada, com cerca de 4 a 5 % das ligações glicosídicas com pontos de ramificação. As moléculas de amilopectina são grandes discos planos contendo cadeias de α -D-glicopiranosil unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, com pontos de ramificação formados por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$. (PREISS, 2009). As proporções em que estas cadeias ocorrem diferem entre os genótipos de arroz e pode-se classificar os grãos como ceroso (1 a 2 % de amilose), conteúdo de amilose muito baixo (2 a 12 %), baixo (12 a 20 %), intermediário (20 a 25 %) e alto (25 a 33 %). (JULIANO, 1993; MITCHELL, 2009).

O amido encontra-se naturalmente presente em grânulos nos vegetais, sendo que seu grânulo é uma importante fonte de energia para períodos longos em plantas verdes. A maior parte dos grânulos de amido é produzida individualmente em diferentes amiloplastos no vegetal; entretanto, alguns amidos, tais como o de arroz, contêm grânulos compostos. Nesses casos, mais de um grânulo é produzido simultaneamente no mesmo amiloplasto. (JANE, 2009). Assim, amidos compostos possuem grânulos que estão empacotados hermeticamente, tornando-se difícil sua separação. As formas dos grânulos de amidos compostos são principalmente poliédricas, possivelmente como resultado de limitações de espaço durante o desenvolvimento dos grânulos de amido. (JANE, 2009). Os grânulos compostos do amido de arroz possuem diâmetros que podem alcançar 150 μm e são formados por aglomerados de cerca de 20 a 60 grânulos. (ZHOU *et al.*, 2002). Desta forma, os grânulos de amido de arroz são poliédricos, com tamanho aproximado de 3 a 9 μm , com uma distribuição unimodal.

Quando comparado à farinha de arroz, o amido de arroz apresenta um menor número de relatos de aplicação em sistemas alimentícios. (BAO; BERGMAN, 2004). Entretanto,

tradicionalmente, as propriedades básicas associadas ao amido de arroz são consideradas vantajosas em relação a amidos de outras fontes. Estas características incluem hipoalergenicidade, digestibilidade, aceitação do consumidor, sabor brando, cor branca, maior estabilidade do gel a ciclos de congelamento-descongelamento, maior resistência aos ácidos e uma vasta gama de proporções de amilose:amilopectina que podem ser encontrados em diferentes cultivares de arroz. (MITCHELL, 2009).

O sabor agradável de amido de arroz, a sua branquidão e o pequeno tamanho dos seus grânulos permitem a obtenção de vantagens tecnológicas necessárias na fabricação de molhos e pudins, tendo excelentes perfis de sabor e sensação tátil na boca. (MITCHELL, 2009). De fato, segundo Bao e Bergman (2004), os grânulos de pequeno tamanho, que fazem com que a textura de seu gel seja única, tem tornado o amido de arroz muito desejável como um substituto de gordura em alimentos tais como bebidas à base de leite saborizadas, sorvetes, iogurtes e molhos para saladas; ele é a base de muitos sorvetes não-lácteos. Relatado como de suave textura, o amido de arroz tem aumentado sua participação em aplicações de cremes de confeitaria. O amido de arroz é descrito como tendo características desejáveis para uso em cereais matinais que precisam permanecer crocantes após o contato com o leite. Amido de arroz também é utilizado para gerar as maltodextrinas que são incorporados em alimentos como agentes de enchimento, veículo de aromas, textura ou redutor de dulçor. Para Lim *et al.* (1999), com as vantagens inerentes da distribuição uniforme e pequeno tamanho dos grânulos de amido, além de sua cor branca e odor neutro, sobremesas e produtos de panificação são algumas das aplicações para o amido de arroz.

Segundo Mitchell (2009), aplicações não alimentícias do amido de arroz são também baseadas no pequeno tamanho dos seus grânulos; estas incluem usos pela indústria têxtil e de cosméticos, bem como aplicações em tinta de impressão.

Em geral, existem vários fatores básicos que afetam as propriedades funcionais do amido. Esses fatores incluem a variedade de arroz, o teor de proteína residual, o método de extração e a realização de modificações.

As propriedades funcionais do amido de arroz dependem da relação amilose:amilopectina. As diferenças entre os amidos de arroz produzidos a partir de grãos longo, médio ou curto são insignificantes em relação ao teor de amilose. Amidos de arroz produzidos a partir de arroz comum tendem a produzir géis de maior viscosidade, com textura pastosa. A textura da géis de amido de arroz ceroso (baixo teor de amilose) tende a ser pegajosa. Amido de arroz comum contém 0,3 % a 0,4 % de lipídios, enquanto que o amido de arroz ceroso contém consideravelmente menos lipídeos (0,03 %). Estes lipídios estão complexados com o amido e não

podem ser facilmente removidos, sendo provavelmente os responsáveis pela turbidez do gel e pela dificuldade na clarificação do amido hidrolisado. (MITCHELL, 2009).

O teor de proteína residual pode afetar muito as características de empastamento e demais propriedades funcionais do amido de arroz. Entretanto, o método de extração empregado também influencia intensamente nas características de empastamento. O aumento do teor de proteína residual em amidos de arroz produzidos mecanicamente melhora significativamente as propriedades funcionais, tais como capacidade de dispersão, a textura lisa do gel, estabilidade durante o processamento a ultra-alta temperatura, a resistência à hidrólise ácida e a estabilidade a ciclos de congelamento-descongelamento. Algumas dessas vantagens funcionais podem ser atribuídas à formação de agregados esféricos de amido de arroz, na presença da proteína, durante a operação de secagem por atomização. (MITCHELL, 2009).

3.1.3 Proteína de arroz

De acordo com a FAO (1980), é considerado Concentrado de Proteínas Vegetais o produto que apresenta teor proteico entre 65 e 90 % (base seca); já o Isolado de Proteínas Vegetais é considerado o produto que apresenta teor proteico acima de 90 % (base seca).

As proteínas de arroz são consideradas de grande valor, pois são incolores, ricas em aminoácidos essenciais, possuem um sabor suave e são hipoalergênicas e hipocolesterolêmicas. Entretanto, para aplicações como ingredientes de alimentos, é desejável que elas possuam boas propriedades funcionais, tais como capacidades espumante, geleificante e emulsificante, entre outras. Atualmente pouco é conhecido acerca destas propriedades, e sabe-se que podem variar em função do tipo de arroz de origem. Além disso, a técnica de isolamento empregada também pode acarretar importantes efeitos nas propriedades destas proteínas. (AGBOOLA, NG; MILLS, 2005).

3.1.3.1 Aspectos nutricionais

As proteínas são componentes essenciais da dieta, necessárias à sobrevivência de animais e humanos. A função básica das proteínas na nutrição é fornecer a quantidade de aminoácidos necessária à manutenção da saúde. Dessa forma, a qualidade de uma proteína, também conhecida como valor nutritivo ou nutricional deste nutriente, depende do conteúdo de

aminoácidos e da utilização fisiológica de aminoácidos específicos após sua ingestão, absorção e oxidação. O metabolismo de aminoácidos é determinado pela proporção com que os mesmos são utilizados para a síntese proteica. Devido a isso, os aminoácidos podem ser divididos em três categorias, com base na sua absoluta ou relativa taxa de síntese proteica *in vivo*: (a) indispensáveis (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina); (b) condicionalmente indispensáveis (arginina, cisteína e tirosina); (c) dispensáveis (alanina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutâmico, glicina, prolina e serina). (FRIEDMAN, 1996).

Com um conteúdo proteico médio de 5 a 7 %, os níveis de proteína no arroz são menores do que o encontrado na maioria dos demais cereais. Entretanto, devido ao seu conteúdo de lisina ser mais que 50 % maior que o do trigo e ao fato de que o seu balanço de aminoácidos é mais equilibrado, é considerada uma proteína de melhor qualidade que a do trigo. (FRIEDMAN, 1996).

Segundo Lam-Sánchez *et al.* (1994) as glutelinas representam 68 a 72 % do total de proteínas do grão, as globulinas, 12 a 17 %, as albuminas, 10 a 12 %, e as prolaminas, 2 a 3 %. Ao se considerar somente o endosperma do grão, verifica-se que o mesmo contém cerca de 7 a 18 % de albuminas, 5 a 12 % de prolaminas e 70 a 88 % de glutelinas. (ZHOU *et al.*, 2002). Outros autores afirmam que, em média, o endosperma do arroz apresenta 80 % de glutelinas. (JULIANO; BOULTER, 1976; JU; HETTIARACHCHY; RATH, 2001).

Além de sua função básica, as proteínas contêm sequências de peptídeos com atividades antimicrobianas, redutoras da pressão arterial, antioxidantes, com propriedades de reduzir o colesterol. Pequenos peptídeos resultantes da hidrólise realizada pela enzima pancreática são absorvidos no intestino mais rapidamente que os aminoácidos livres, e alguns peptídeos resistem à digestão, mantendo suas atividades fisiológicas. As propriedades hipocolesterolêmicas de peptídeos se devem principalmente à sua habilidade em deslocar o colesterol das micelas de ácidos biliares durante o transporte dentro do lúmen intestinal, diminuindo sua absorção. Este mecanismo foi apoiado por estudos que demonstraram que a proteína do arroz aumenta a excreção fecal de esteróides neutros. (YANG *et al.*, 2011).

3.1.3.2 Propriedades Funcionais

O termo “propriedade funcional” é definido como toda propriedade não nutricional que influi no comportamento de certos componentes de um alimento. A maior parte das propriedades funcionais influencia as características sensoriais, mas igualmente pode desempenhar importante papel nas propriedades físicas dos alimentos e de seus ingredientes

durante o processamento, armazenamento, preparo e consumo. A somatória das propriedades funcionais de um alimento ou ingrediente alimentício é referida como “funcionalidade” e o “valor funcional” de um produto ou ingrediente alimentício aumenta a sua aceitação e utilização. (SGARBIERI, 1996; ORDÓÑEZ, 2005). As principais propriedades funcionais de proteínas são solubilidade, capacidade de absorção de água e óleo, geleificação e capacidade de formação e estabilização de espumas e emulsões. Os métodos para a medida de várias destas propriedades são ainda bastante empíricos, não existindo uma padronização dos procedimentos, o que dificulta muito a comparação de dados obtidos por diferentes trabalhos. (SGARBIERI, 1996).

Vários estudos têm buscado avaliar as propriedades funcionais de proteínas de arroz polido (endosperma), arroz integral, e do farelo de arroz, objetivando buscar a agregação de valor deste insumo, que atualmente internacionalmente é muito utilizado para a alimentação animal. Além disso, o entendimento de suas características permite o estudo de técnicas que melhorem suas propriedades, visando aumentar cada vez mais o leque de suas aplicações nas Indústrias de Alimentos e Bebidas.

Agboola, Ng e Mills (2005) avaliaram as propriedades de geleificação e capacidades de formação de emulsões e espumas de isolados proteicos de arroz integral extraídos pelo método alcalino e por pré-tratamento enzimático com amilases. Os isolados proteicos apresentaram boa capacidade de formação de géis a baixas concentrações (em torno de 5 %). Entretanto, apresentaram baixas propriedades emulsificantes e espumantes. Os resultados sugerem que as proteínas de arroz (principalmente glutelinas) não foram bons emulsificantes nem foram hábeis na formação de espumas devido à sua baixa solubilidade e alta massa molar. Geralmente, as proteínas insolúveis em sistemas aquosos possuem altas quantidades de pontes dissulfeto e são pobres emulsificantes. As pontes dissulfeto também diminuem a flexibilidade da molécula, dificultando a formação e estabilização de espumas e os tipos de extração estudados não afetaram as propriedades funcionais avaliadas. Os autores indicaram a direção de futuros estudos no sentido de melhorar a solubilidade e conseqüentemente as propriedades emulsificantes e espumantes das proteínas de arroz mediante hidrólise enzimática, visando a redução das pontes dissulfeto.

Cao *et al.* (2009) investigaram as propriedades funcionais de proteínas extraídas de arroz integral, arroz polido e farelo de arroz. As proteínas de arroz integral e polido apresentaram pobres solubilidades em condições ácidas devido ao elevado conteúdo de glutelinas e outras frações proteicas de alta massa molar. A proteína de farelo de arroz apresentou componentes de massa molar significativamente menores que das demais proteínas. A solubilidade do nitrogênio e as propriedades espumantes e emulsificantes das proteínas estudadas foram afetadas, não somente pelo pH (na faixa de 3 a 11), mas também pela concentração de NaCl (0,4 a 2,0 %) e

sacarose (4,0 a 20,0 %). Todas elas, particularmente as proteínas do farelo de arroz, apresentaram boas propriedades funcionais em meios com altas concentrações de sal ou de açúcar, demonstrando bom potencial para aplicações na indústria de alimentos. Segundo os autores, as proteínas do arroz não apenas servem como suplementos alimentares, mas também são adequadas para uma ampla variedade de aplicações industriais na área de alimentos; elas podem ser usadas para produtos de padaria, coberturas cremosas, e salsichas, etc., devido à sua alta capacidade de ligar água e óleo, o que ajuda a reduzir a perda de umidade e manter a textura do alimento. As proteínas estudadas, especialmente as proteínas do farelo de arroz, podem formar uma excelente base para os sistemas alimentícios ricos em açúcar, como massas de bolo, sobremesas congeladas e confeitos.

Pinciroli *et al.* (2009) compararam as propriedades funcionais de isolados proteicos de arroz integral e polido de duas cultivares, uma com alto conteúdo proteico (*Nutriar*) e outra típica da América Latina (*El Paso 144*). As quatro amostras apresentaram baixíssima solubilidade na faixa de pH moderado, mas demonstraram solubilidades significativamente superiores nos extremos de pH (tanto alto quanto baixo). Os isolados do cultivar *Nutriar* apresentaram solubilidade superior à dos isolados *El Paso 144*. O isolado de arroz integral do cultivar *Nutriar* foi mais solúvel em pH 9,0, mostrando capacidade de formação de espumas e emulsões mais alta. Os quatro isolados apresentaram boas capacidades de ligação de água e óleo.

Zhao *et al.* (2012) compararam as propriedades funcionais de proteínas de endosperma de arroz e proteínas do farelo de arroz. As proteínas de farelo de arroz apresentaram-se superiores na solubilidade, nas propriedades emulsificante e de formação de espumas e na capacidade de ligar água e óleo, mesmo estando desnaturadas. As propriedades emulsificantes foram dependentes da solubilidade e da hidrofobicidade superficial das moléculas, enquanto que a solubilidade também foi relacionada com o conteúdo de ligações dissulfeto.

Romero *et al.* (2012) estudaram a composição, estrutura e o comportamento interfacial e emulsificante de um concentrado proteico comercial de arroz. Os autores observaram que o produto, composto principalmente por glutelinas na forma de monômero ou polímero, mostrou uma pobre solubilidade em uma ampla faixa de pH (2 a 10) com uma solubilidade mínima no pH 4,5. Os resultados obtidos a partir dos resultados de distribuição de tamanho de gotículas nas emulsões demonstraram uma maior estabilidade da emulsão em pH 2,0.

Liu *et al.* (2011) investigaram a eficiência da glutaminase na catálise da desamidação da glutelina de arroz, tendo em vista o aumento de sua solubilidade. Para a glutelina não desamidada, a solubilidade foi baixa na faixa de pH de 5 a 7. Entretanto, com a desamidação realizada pela glutaminase, ocorreu expressivo aumento da solubilidade da proteína. Uma

diminuição da massa molar e um aumento da carga líquida das moléculas de proteína podem ter promovido um aumento na interação proteína - água. Ao mesmo tempo, a proteína resultante da desamidação apresentou um menor ponto isoelétrico. Segundo os autores, a desamidação por glutaminase é um método eficaz para modificar glutelina de arroz, tendo em vista o aumento de sua solubilidade em solução aquosa. Os resíduos de glutamina foram convertidos com sucesso em ácidos glutâmico, e ligações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e algumas ligações dissulfeto da glutelina de arroz foram quebrados. Assim, as distribuições de peso molar foram rearranjadas sem expressiva clivagem das ligações peptídicas por desamidação. A glutelina arroz presente, na forma desamidada, apresentou uma forma mais flexível ou estendida. Sob condições levemente ácidas e neutras, as glutelinas de arroz desamidadas mostraram excelente solubilidade. Desta forma, esta poderia ser uma ferramenta potencial para a melhoria da utilização de proteína de arroz na Indústria de Alimentos.

Wang *et al.* (2015) afirmam que a solubilização de isolados proteicos de arroz tem sido considerada como um processo crítico e desafiante que afeta a disponibilidade comercial deste insumo. Os autores estudaram o tratamento de moagem sob congelamento (*freeze-milling*) combinado com o pré-tratamento alcalino para aumentar a solubilidade proteica, observando ser possível aumentar a solubilidade da proteína em até 42 vezes. O estudo investigou os mecanismos de solubilização por moagem sob congelamento, e análises estruturais revelaram que a moagem fez com que as proteínas se desdobrassem irreversivelmente com os cristais de gelo formados no interior dos corpos proteicos. A excelente performance do método pode auxiliar na solubilização dos concentrados proteicos de arroz atualmente subutilizados, aumentando a sua disponibilidade comercial para o desenvolvimento de alimentos líquidos à base de proteína de arroz.

3.1.4 Tecnologias de Extração de Amido e Proteína de Arroz

Devido ao fato de que os dois principais componentes do endosperma do arroz são o amido e a proteína, a tecnologia de extração de proteínas do endosperma do arroz está diretamente ligada à produção de amido de arroz ou de hidrolisados de arroz. Dessa forma, essa seção abordará as tecnologias hoje já aplicadas ao nível industrial, bem como estudos de aplicabilidade de novas tecnologias para a obtenção destes ingredientes a partir do endosperma do arroz.

Comercialmente, a produção de concentrados ou isolados proteicos consiste em uma

solubilização aquosa das proteínas e carboidratos em pH ácido, neutro ou alcalino, e uma recuperação seletiva da proteína solubilizada, seguida de separação, e, ocasionalmente, lavagem e neutralização antes da secagem. O rendimento da extração proteica e as propriedades são influenciados pelo tipo de processo de extração e por diferentes fatores, tais como o pH, a concentração salina, a força iônica do meio, a carga líquida e as repulsões eletrostáticas. Vários protocolos de extração de proteínas de tecidos animais e vegetais a partir de sistema aquosos ácidos e alcalinos vêm sendo publicados. No caso de proteínas de plantas, a identificação do método ideal de extração é particularmente desafiadora, devido às características estruturais e metabólicas dos tecidos vegetais. Os principais protocolos de extração alcalina são baseados no também chamado Método de Osborne, mas cada método é otimizado de acordo com o objetivo do estudo e a fonte da proteína vegetal. (MARTÍNEZ-MAQUEDA *et al.*, 2013).

Como já mencionado, o amido de arroz é preferencialmente preparado a partir do arroz quebrado, por razões econômicas. Existem dois métodos comerciais para a separação da proteína e do amido de arroz: o tradicional e o mecânico. O método tradicional envolve a solubilização alcalina das proteínas de arroz, enquanto que o método mecânico libera o amido a partir do processo de moagem úmida. A produção mundial de amido de arroz em 2009 era de cerca de 25.000 toneladas métricas. Aproximadamente 75 % deste foi processado pela companhia Belga *Beneo Remy Industries*, a qual produz o amido de arroz pelo método alcalino há mais de 100 anos. Até 1990, o amido de arroz preparado pelo método alcalino foi o único disponível comercialmente. (MITCHELL, 2009).

O método mecânico de produção de amido é um processo de moagem úmida que permite que a remoção da proteína seja opcional, uma vez que a proteína não é solubilizada nesse processo, apenas é removida fisicamente depois que os grânulos de amido e as proteínas foram mecanicamente liberados do endosperma. Amidos contendo 0,25 a 7 % de proteína podem ser produzidos por este método. O método tradicional de produção de amido de arroz, por sua vez, envolve a solubilização da glutelina, a qual constitui aproximadamente 80 % do total de proteínas no arroz; ele produz amido com menos de 1 % de proteína. A proteína obtida pelo método mecânico apresenta boa qualidade nutricional. Entretanto, apresenta um *aftertaste* salgado, o que faz com que não seja facilmente aceitável como um ingrediente alimentício. (MITCHELL, 2009).

O método enzimático também pode ser utilizado para a separação do amido e da proteína do endosperma de arroz. De acordo com os tipos de produtos desejados (amidos, oligossacarídeos, hidrolisados proteicos), diversas enzimas podem ser aplicadas, tais como amilases e proteases. De acordo com Martínez-Maqueda *et al.* (2013), as enzimas podem auxiliar na extração de proteínas de diversas maneiras. Carbohidrases, por atacarem os componentes da parede celular, podem aumentar o rendimento da extração liberando mais proteína da matriz

vegetal. Nos últimos anos, diferentes proteases, isoladas ou em conjunto, têm sido usadas para hidrolisar proteínas a peptídeos, aumentando sua solubilidade e melhorando o seu potencial de extração. O método de extração enzimático tem sido reconhecido como mais ambientalmente amigável, seguro e uma alternativa barata para a extração de óleo e proteína simultaneamente de algumas fontes. Além disso, este processo evita danos sérios às proteínas causados pelos processos de refino, melhorando suas propriedades nutricionais e funcionais. No entanto, a extração enzimática oferece algumas desvantagens, tais com o longo tempo requerido e o alto custo das enzimas. O uso de enzimas imobilizadas pode reduzir o custo total do processo por permitir o seu reuso.

3.1.4.1 Extração alcalina

No processo alcalino, o arroz polido quebrado é mantido em maceração por 24 horas em uma solução de hidróxido de sódio a 0,3 – 0,5 % a temperaturas que podem variar da ambiente até 50 °C. Esse processo de maceração do grão afeta a solubilização das proteínas, sendo que a moagem úmida do grão macerado na presença da solução de hidróxido de sódio libera o amido, produzindo uma pasta amilácea. O amido é mantido em suspensão e estocado por 10 a 24 horas para dissolver ainda mais as proteínas. O material da parede celular é então removido por filtração e a pasta de amido é lavada com água (para remover a proteína), neutralizada e seca. O processo de secagem comercial, o qual necessariamente envolve inicialmente ar a baixas temperaturas para prevenir a gelatinização do amido, pode permitir o desenvolvimento microbiano, razão pela qual a contagem microbiana é cuidadosamente monitorada nessa etapa do processo. Uma vantagem do processo alcalino é a facilidade com que a solução alcalina produz modificações no amido, já que as principais reações de modificação ocorrem em valores de pH elevados. A desvantagem é o resíduo alcalino gerado, e suas consequências ambientais. (MITCHELL, 2009).

Diversos autores utilizaram a extração sequencial ou unicamente a extração alcalina em estudos de caracterização e modificação das proteínas do endosperma de arroz. A seguir são apresentadas as condições operacionais empregadas em alguns destes estudos.

Lim *et al.* (1999), ao comparar a eficiência da remoção proteica por solução alcalina ou por soluções de surfactantes na obtenção de amido de arroz, examinaram o efeito de NaOH 0,1 %; NaOH 0,2 %; dodecil benzeno sulfonato a 1,2 % + sulfito de sódio a 0,12 %; e lauril sulfato de sódio a 1,2 % + sulfito de sódio a 0,12 %. Os grãos de arroz polido da subespécie japonesa foram encharcados com água por 3h a temperatura ambiente e então convertidos à farinha; essa foi dispersa na razão solvente:sólido de 3:1 nos diferentes sistemas extrativos em temperaturas que

variaram de 20 a 45 °C. Cada extração foi realizada em quatro estágios, de 1 ou 2 horas de duração, com separação do resíduo amiláceo por centrifugação a 1800 x g por 10 minutos. Ao término do último estágio de extração, o amido foi novamente suspenso em água e neutralizado para pH 7,0 com HCl 0,1 M. Esta suspensão foi centrifugada e o amido foi lavado duas vezes com água destilada e uma vez com etanol a 95 % e após seco a 40 °C. O sistema extrativo composto por dodecil benzeno sulfonato a 1,2 % + sulfito de sódio a 0,12 % foi o mais efetivo na obtenção de um amido com menor resíduo de proteína. Os autores recomendaram ainda o uso de temperaturas baixas, visando a manutenção das propriedades funcionais do amido.

Agboola, Ng e Mills (2005), ao avaliarem a influência do método de extração nas características e propriedades funcionais de proteínas de endosperma de arroz integral de uma cultivar australiana, estudaram diferentes métodos de extração. Os autores inicialmente realizaram a extração sequencial das proteínas de farinha de arroz integral desengordurada, a 25 °C, utilizando água, NaCl 5 %, NaOH 0,1 M e etanol 70 %. A extração com água ocorreu na razão solvente:sólido de 4:1 por 4 horas. Após centrifugação (3000 x g por 30 minutos) para remoção da fração de albuminas, o resíduo foi extraído com NaCl 5 % na razão solvente:sólido de 4:1. O resíduo foi submetido à extração alcalina com NaOH 0,1 M por 1 hora para a obtenção da fração de glutelina, e o resíduo foi submetido à extração com etanol para obtenção da fração de prolamina. Cada etapa de extração foi realizada duas vezes, e cada fração obtida foi purificada por precipitação no respectivo ponto isoelétrico e liofilizada. Os autores também realizaram a obtenção de um isolado rico em glutelina pela extração alcalina de farinha de arroz integral. Nesta, a farinha foi mantida sob agitação em uma solução de NaOH 0,1 M por 1 hora na razão solvente:sólido de 12:1 na temperatura ambiente, sendo então separada do resíduo amiláceo por centrifugação a 3000 x g por 30 minutos. O pH do sobrenadante rico em glutelina foi ajustado para 4,8 com HCl 1 M. O precipitado foi lavado por duas vezes com água destilada e liofilizado. Os autores estudaram, ainda, a influência da hidrólise enzimática do amido com α -amilases comerciais como um pré-tratamento para a posterior extração sequencial ou unicamente alcalina das proteínas; foi observado que o tratamento enzimático pré-extração afetou principalmente a fração de albuminas, aumentando o rendimento em termos de matéria seca, mas reduzindo o conteúdo de proteínas do isolado proteico obtido.

Paraman, Hettiarachchy e Schaefer (2008), ao otimizar a extração de proteínas do endosperma de um arroz tipo longo produzido na Suíça, desenharam um experimento de extração alcalina no qual o pH variou de 9 a 11, a temperatura, de 30 a 50 °C, a razão solvente:sólido, de 8:1 a 12:1 e a concentração salina de 0 a 1 M. Nos experimentos, a farinha de arroz era homogeneizada com água por 1 minuto. Após, o pH era ajustado com NaOH 1 M e a suspensão era mantida sob agitação por 3 horas. A proteína solubilizada era separada por

centrifugação a 5000 x g por 15 minutos. O procedimento foi repetido duas vezes em cada condição experimental. A proteína extraída era precipitada a pH 4,5, mantida a 4 °C por 1 hora e então separada por centrifugação a 5000 x g por 20 minutos, lavada com água deionizada, neutralizada pH 7,0, liofilizada e armazenada a 5 °C. Dentre as condições estudadas, os autores obtiveram os melhores resultados na extração por 3 horas com pH 11,0, temperatura de 40 °C, razão solvente:sólido de 8:1. Com estas condições, os autores obtiveram 43,1 % de rendimento na extração, sendo que os autores observaram que o aumento do pH melhora a extração, mais produz uma proteína com menor solubilidade a pHs próximos à neutralidade. De fato, segundo Agboola, Ng e Mills (2005) e Xia *et al.* (2012), o tratamento alcalino, por promover o rompimento de certas pontes de hidrogênio, pontes dissulfeto e ligações amida na glutelina, reduz o tamanho das moléculas, o que permite uma melhor extração.

Bizzotto *et al.* (2006) realizaram a extração alcalina das proteínas de arroz polido para a obtenção da matéria-prima para a obtenção de hidrolisados proteicos. Os autores mantiveram por 60 minutos o arroz moído em meio aquoso a pH 12 (obtido com a adição de NaOH 3 M) sob agitação a 25 °C, a uma razão solvente:sólido de 5:1. A mistura foi então centrifugada e o resíduo foi lavado uma vez com NaOH 0,1 M e duas vezes com água. O extrato proteico foi neutralizado com HCl 3 M e liofilizado.

Liu *et al.* (2011) realizaram a extração de glutelinas do arroz a partir da extração sequencial em farinha de arroz desengordurada (oriunda de arroz quebrado), sendo que a extração foi realizada a 25 °C. Primeiramente, a fração albumina-globulina foi extraída com NaCl 50 mg mL⁻¹, com uma razão solvente:sólido de 5:1, sendo que, em seguida, a fração de prolamina foi extraída com etanol 12 M, a uma razão solvente:sólido de 4:1. Para remover a maior parte das proteínas, cada passo do processo foi realizado duas vezes. Então, 91 % das glutelinas foram extraídas com NaOH 0,01 M + dodecil sulfato de sódio a 20 mg mL⁻¹ (um agente surfactante que contribui para a solubilização da proteína). A fração de glutelinas foi purificada por precipitação isoelétrica no pH 4,8 com HCl 1M e o precipitado foi lavado com água destilada. A solução foi dializada com água destilada a 4 °C por 24 horas, liofilizada e estocada a 4 °C. Essa proteína apresentou boa solubilidade em pH 3 (78,15 g 100 mL⁻¹), mas solubilidade muito baixa nos pHs 5 e 7, 3,71 e 8,62 g 100 mL⁻¹, respectivamente. Os autores utilizaram esta proteína como matéria-prima o estudo que buscou avaliar a eficiência da glutaminase na catálise da desamidação da glutelina de arroz, tendo em vista o aumento de sua solubilidade, como já descrito previamente neste trabalho.

Xia *et al.* (2012), ao comparar o método alcalino com o método de microfluidização assistido por enzimas para a extração de proteínas do endosperma de arroz, realizaram a extração alcalina do arroz quebrado como experimento controle. Este foi misturado com solução

de NaOH 0,1 % por 1 hora à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 8000 x g por 10 minutos e o pH do sobrenadante foi ajustado para 4,8 para precipitar a proteína e o sistema foi centrifugado a 8000 x g por 20 minutos. A proteína precipitada foi dispersa em água na proporção de 1:10, neutralizada a pH 7,0 e liofilizada. A proteína extraída pelo método alcalino apresentou quantidades maiores de prolamina e globulina, além de quantidades similares de glutelina quando comparada com a proteína extraída por microfluidização. Devido a isto, a amostra controle apresentou um maior conteúdo de ácido glutâmico, leucina e aminoácidos aromáticos. A proteína extraída por microfluidização apresentou maior digestibilidade que a extraída pelo método alcalino, devido à sua maior concentração de glutelina (uma proteína de mais fácil digestão). A presença de prolamina (uma proteína indigestível) na amostra extraída pelo método alcalino diminuiu sua digestibilidade global.

a) Influência das condições de extração na qualidade do amido e da proteína

Tendo em vista a obtenção de ingredientes de alta qualidade funcional e nutricional, cada vez mais é estudada a influência das condições operacionais da extração nas propriedades de amidos e proteínas extraídos de diferentes fontes vegetais, principalmente no que diz respeito aos efeitos do tratamento alcalino. Essa seção apresenta os resultados obtidos em alguns estudos na área.

Em relação à proteína, sua qualidade pode ser alterada pelo processamento alcalino devido à ocorrência de reações indesejáveis que envolvem a racemização de aminoácidos, a formação de compostos tóxicos, tais como a lisinoalanina, a redução da digestibilidade, a perda de aminoácidos essenciais e a diminuição do valor nutritivo. (MARTÍNEZ-MAQUEDA *et al.*, 2013).

Kumagai *et al.* (2006) avaliaram a digestibilidade *in vitro* de extratos de proteína de endosperma de arroz obtidos por dois métodos. A proteína de arroz preparada por extração alcalina seguida de neutralização foi comparada com a preparada pela degradação do amido pela α -amilase termoresistente. No estudo da digestão *in vitro* com pepsina e pancreatina, a proteína obtida pelo método alcalino apresentou maior digestibilidade. Segundo os autores, o aumento da digestibilidade parece ser resultado da alteração da estrutura dos corpos proteicos causada pelo meio alcalino. A proteína de arroz produzida por extração alcalina apresenta maior digestibilidade que a da farinha de arroz e a da proteína obtida por hidrólise do amido. Esta maior digestibilidade é favorável para aumentar o valor nutricional de alimentos com elevado teor de amido, especialmente para alimentação de indivíduos idosos. Para elucidar se a digestibilidade é responsável pela ação hipocolesterolêmica da proteína de arroz, Yang *et al.*

(2011) avaliaram o efeito de proteínas de arroz extraídas pelo método alcalino e pelo método de hidrólise do amido no metabolismo de colesterol de ratos. A digestibilidade *in vitro* e *in vivo* foi significativamente menor nas proteínas de arroz quando comparadas à caseína, sendo a proteína extraída enzimaticamente a que apresentou menor digestibilidade. A correlação entre a digestibilidade proteica e a absorção de colesterol foi significativa neste estudo, sugerindo que a ação hipocolesterolêmica da proteína de arroz tenha ligação com a proteína não digerida, que inibe a absorção de esteróis neutros.

No que diz respeito à influência das condições alcalinas sobre o amido, muitos estudos têm buscado elucidar os fenômenos envolvidos. Segundo Yamamoto, Isozumi e Sugitani (2005), sob fortes condições alcalinas, sabe-se que o amido gelatiniza inclusive à temperatura ambiente, de forma que este comportamento é hoje utilizado na produção de pasta adesiva à base de amido de milho gelatinizado (utilizada para colagem de papel). Esse fenômeno pode ser um interessante objeto de pesquisa, uma vez que permite a gelatinização sem o aquecimento; ele ocorre à temperatura ambiente, sendo também chamado de gelatinização a frio. Entretanto, muito pouco se sabe sobre este tipo de gelatinização. (YAMAMOTO; ISOZUMI; SUGITANI, 2005). Todavia, quando se busca isolar o amido íntegro, sem danos em sua estrutura granular e molecular, devem ser avaliadas criteriosamente as condições operacionais empregadas na extração alcalina.

No estudo da influência da concentração de NaOH na eficiência da remoção proteica e na degradação dos grânulos de amido durante a extração alcalina, Cardoso *et al.* (2007) testaram seis diferentes concentrações de álcali (0,06 %, 0,12 %, 0,15 %, 0,18 %, 0,24 % e 0,30 %) sobre uma farinha de arroz brasileiro (subespécie Indica) com granulometria entre 0,1 e 0,42 mm. As extrações iniciaram com a imersão do arroz moído no solvente a 20 °C com razão solvente:sólido de 10:1 por 24 horas. Após, o sobrenadante foi descartado e o resíduo foi diluído ao volume original com NaOH. A mistura foi agitada por 10 minutos e centrifugada a 1250 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante separado do resíduo. O procedimento foi repetido oito vezes. O resíduo amiláceo foi, por fim, suspenso em água destilada, centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos e lavado com água até a neutralidade. Os autores identificaram que NaOH com concentração menor que 0,15 % apresentou baixa eficiência na remoção proteica, sendo a concentração ótima na faixa de 0,15 a 0,18 %. Com concentrações de NaOH maiores que 0,24 %, ocorreu o inchaço alcalino dos grânulos resultando em uma significativa ruptura da morfologia granular, associada com a diminuição da cristalinidade e da entalpia de gelatinização.

Nadiha *et al.* (2010) estudaram os efeitos da maceração de amidos de sagu, milho e batata em NaOH 0,025 M por 0, 15 e 30 dias a 30 °C na sua estrutura granular e propriedades físico-químicas. As mudanças observadas na morfologia dos grânulos de amido indicaram que a solução alcalina afetou a estrutura granular dos amidos. Os conteúdos de amilose de todos os

amidos tratados diminuíram significativamente após o tratamento. A temperatura de início de gelatinização (T_0 , obtida via DSC) aumentou significativamente, mas as entalpias de gelatinização e de retrogradação diminuíram. Os resultados mostraram que as propriedades físico-químicas do amido de diferentes fontes botânicas foram afetadas em diferentes graus frente ao tratamento alcalino. Os diferentes graus de suscetibilidade do tratamento alcalino sobre o amido refletem a complexidade da estrutura granular e da arquitetura molecular de diferentes tipos de amido.

Wang e Copeland (2012) avaliaram o efeito do tratamento alcalino na estrutura e nas propriedades funcionais de grânulos de amido de ervilha. O conteúdo de amilose diminuiu em cerca de 20 a 25 % depois de 15 dias de tratamento alcalino (NaOH 0,1 M) e ocorreu uma pequena diminuição na cristalinidade relativa e no conteúdo de duplas hélices. Os autores observaram deformações na superfície dos grânulos tratados e evidenciaram a adesão entre alguns grânulos. Foram observadas pequenas alterações no perfil de transição endotérmica, e a entalpia de gelatinização não sofreu alteração. O tratamento alcalino aumentou muito a taxa de hidrólise enzimática do amido de ervilha *in vitro*.

Cai *et al.* (2014) isolaram dois tipos de amido de arroz com alta amilose, um nativo e outro transgênico. Os amidos foram tratados com solução de NaOH 0,1 % e 0,4 % por 7 e 14 dias a 35 °C e caracterizados em termos de suas propriedades estruturais e funcionais. O tratamento com NaOH 0,1 % não afetou significativamente as propriedades funcionais e estruturais dos amidos, exceto por diminuir sua resistência à hidrólise enzimática por amilases. O tratamento com NaOH 0,4 % afetou a morfologia do grânulo e diminuiu a densidade eletrônica entre as lamelas cristalinas e amorfas do amido. Comparados com o controle, os amidos tratados apresentaram menor conteúdo de amilose, maior temperatura inicial e de pico de gelatinização, e menor resistência às hidrólises ácida (por HCl) e enzimática.

Segundo Thys *et al.* (2008), embora seja reconhecido o fato de que a solução alcalina pode afetar a superfície dos grânulos de amido, o real mecanismo de modificação ainda permanece desconhecido. Os autores avaliaram o efeito do tratamento alcalino (NaOH 0,05 e 0,1 M) na ultraestrutura de amido de pinhão. Os resultados obtidos parecem indicar dois possíveis cenários para as alterações provocadas pelo tratamento alcalino. O primeiro é baseado na degradação externa do amido e tem relação com a dissociação das pontes de hidrogênio da amilopectina devido ao procedimento de lavagem com NaOH; dependendo do contato entre o hidróxido de sódio e os grânulos de amido, a dissociação das pontes de hidrogênio da amilopectina pode ocorrer, mudando a estrutura dos grânulos. O segundo, e mais provável, é baseado na lixiviação da amilose do grânulo causada pela gelatinização alcalina parcial promovida pelo meio alcalino.

De fato, segundo Yamamoto, Isozumi e Sugitani (2005), a gelatinização do amido sob condições alcalinas fortes ocorre devido à destruição de pontes de hidrogênio entre as moléculas de amido promovida pelos íons hidroxila que penetram nos grânulos. Além disso, na gelatinização do amido de arroz por condições alcalinas fortes, o NaOH, após penetrar no grânulo de amido, pode reagir com lipídeos originalmente oclusos nas moléculas de amilose para gerar sais de sódio de ácidos graxos de cadeia longa. As fortes propriedades surfactantes destes sais de sódio podem formar fortes e estáveis complexos com a amilose. Como um resultado, o estágio inicial de gelatinização seria incapaz de induzir cooperativamente tensões nos cristalitos de amilopectina.

3.1.4.2 Extração enzimática

Segundo Agboola, Ng e Mills (2005), trabalhos têm demonstrado que a remoção enzimática do amido da farinha de arroz (utilizando amilases) pode ser usada para a produção de isolados proteicos contendo mais de 76 % de proteína. Já para Li *et al.* (2009) os processos que preservam a estrutura nativa dos grânulos de amido de arroz e que minimizam a geração de efluentes líquidos do processo de separação de amido, são os preferidos para o isolamento do amido de arroz. A remoção das proteínas nos grânulos de amido utilizando protease parecem representar um método eficaz para a produção de amido de arroz e pode servir como uma alternativa a um processo alcalino industrial. A maioria dos cientistas acredita que os tratamentos de alimentos com protease sem produtos químicos adicionais resulta em grânulos de amido com retenção da maior parte de suas características nativas.

Lumdubwong e Seib (2000) avaliaram a eficácia da hidrólise enzimática com protease alcalina comparativamente à extração alcalina de proteína de farinha de arroz obtida por moagem úmida. Em um desenho fatorial 3 x 3, os autores avaliaram o rendimento na recuperação do amido e o grau de pureza do mesmo, com o pH variando entre 8,5 e 10, o teor de protease, entre 0,5 e 1,5 % e o tempo de digestão entre 5 e 30 horas. Utilizando 1,1 % de protease em pH 10 e com 18 horas de extração, obteve-se uma recuperação de 95 % do amido, o qual apresentou 0,5 % de proteína. Comparando este resultado com a extração alcalina realizada com NaOH 0,05 M, os autores observaram um rendimento 10 % maior com o método enzimático. Além disso, o amido extraído com a digestão enzimática apresentou maior brilho, conteve mais lipídeos e apresentou menor consistência de gel. Os custos estimados na época demonstraram que o método enzimático custou aproximadamente o dobro que o método tradicional, principalmente devido ao custo da enzima.

Segundo Wang e Wang (2004), apesar do uso de proteases neutras ser efetivo no isolamento de amido de arroz, o maior desafio a ser enfrentado é o longo período de digestão (18 horas). Com o objetivo de reduzir o tempo de reação, os autores estudaram a aplicação da tecnologia de ultrassom de alta intensidade associada à hidrólise, tendo sido avaliado o efeito do ultrassom antes, durante e após a hidrólise na eficiência da extração. Os autores observaram que a digestão unicamente com a protease neutra por 3 a 5 horas produz amido de arroz com baixo residual proteico e com um rendimento comparável ao método alcalino de extração. A digestão com a protease neutra por 2 horas seguida da sonicação a 75 - 50 % de amplitude por 15 ou 30 minutos foi o melhor tratamento, dentre os estudados. A estrutura do amido, tanto granular quanto molecular, não foi alterada nestas condições. Desta forma, os autores concluíram que este método permite a obtenção de amido de arroz sem a geração de efluentes líquidos com elevado conteúdo salino.

Vieira *et al.* (2008) estudaram a extração enzimática das proteínas de uma farinha comercial de arroz e, visando aumentar o rendimento de extração proteica, avaliaram os parâmetros tipo de enzima (protease alcalina e neutra), temperatura (40, 50 e 60 °C); pH (9,5, 10,5 e 11,0), tratamento físico da amostra (sem tratamento, *ultra-turrax* a 16.000 rpm e ultrassom a 120 W, ambos por 5, 10 e 15 minutos), relação Enzima:Substrato (E:S) de 5:100 e 10:100, e concentração inicial de matéria-prima (1:3, 1:5 e 1:10 p/v). Os resultados mostraram que a melhor condição de extração proteica, que levou ao maior rendimento, foi a que empregou a concentração inicial de matéria-prima a 1:10, sem tratamento físico, com pH 10,5, com a protease alcalina na relação E:S de 10:100, a 50 °C, tendo atingido um rendimento de 63,4 %.

Em relação ao efeito das proteases sobre o amido, segundo Li *et al.* (2009), os amidos de arroz produzidos a partir do tratamento do Protease N exibiram viscosidades de empastamento mais altas que as produzidas pelo amido extraído durante o tratamento com Alcalase. Os resultados obtidos pelos autores sugerem que as proteases conduzem à extração de amidos de arroz sem danos nas suas características naturais decorrentes do processo de separação. Entretanto, a presença de proteases remanescentes no amido pode provocar dano à sua estrutura com conseqüente alteração de suas propriedades. No estudo realizado, os autores consideraram a Protease N melhor para o isolamento do amido, em comparação com a Alcalase, pois promoveu um menor dano na sua estrutura molecular.

3.1.5 Hidrolisados proteicos de arroz

Os hidrolisados proteicos apresentam diversas vantagens funcionais e nutricionais em relação às proteínas integrais. Segundo Sgarbieri (1996), a demonstração de que oligopeptídeos de baixo peso molecular são absorvidos pelo organismo humano tão eficientemente, ou até mais eficientemente, que os aminoácidos livres, despertou o interesse pelo uso de hidrolisados proteicos parciais em nutrição hospitalar. Dietas contendo hidrolisados proteicos têm sido utilizadas quando há problemas de digestão ou de má absorção de proteínas. Além disso, de acordo com Bizzotto *et al.* (2006), esses preparados enzimáticos possuem menor imunogenicidade que a de proteínas e peptídeos de elevado peso molecular.

Os hidrolisados proteicos são muito utilizados, em diversos países, na alimentação de pessoas que apresentam dificuldades na absorção de proteínas, como idosos, crianças com diarreia e portadores de fibrose cística e indivíduos com necessidade aumentada de proteínas, como os atletas, por exemplo. (BIZZOTTO *et al.*, 2006). Segundo Sgarbieri (1996), quanto à eficiência metabólica na utilização dos hidrolisados parciais, comparados aos aminoácidos livres e proteína intacta, vários estudos têm demonstrado que, mantida constante a composição de aminoácidos, indivíduos normais absorvem igualmente aminoácidos livres, hidrolisados parciais e proteína intacta na dieta, enquanto que indivíduos com problemas digestivos e de absorção utilizam melhor os peptídeos (hidrolisados) quando comparados com as dietas de aminoácidos livres. Por outro lado, as proteínas intactas são muito mal absorvidas e utilizadas por esses indivíduos. O problema relativo às dietas contendo apenas aminoácidos livres é a elevada osmolaridade, que age no sentido de dificultar a absorção dos aminoácidos; já as proteínas intactas são mal digeridas pelos indivíduos com síndromes de mal absorção e/ou problemas de digestão.

Vioque *et al.* (2001) classificaram os hidrolisados em três grupos de acordo com o grau de hidrólise, o qual direciona a sua aplicação: hidrolisados com baixo grau de hidrólise (entre 1 e 10 %) (que possuem propriedades funcionais melhoradas em relação às proteínas de origem), hidrolisados com variados graus de hidrólise (geralmente usados como agentes saborizantes) e hidrolisados com elevado grau de hidrólise (superior a 10 %) (principalmente usados como suplementos nutricionais e dietas médicas especiais).

De fato, segundo Swaisgood (2004), as propriedades funcionais de proteínas, tais como potencial emulsificante, capacidade de formação e estabilização de espumas, geleificação,

viscosidade e capacidade de ligar água, por serem determinadas pela topologia superficial da molécula, podem ser modificadas com proteinases específicas sob condições apropriadas.

Segundo Hernández-Ledesma, Contreras e Recio (2011), a hidrólise enzimática de proteínas induz modificações nas propriedades emulsificantes e de espumas. Em relação às propriedades emulsificantes, os peptídeos formados atuam como surfactantes e contribuem para a formação de gotas na matriz óleo/água pela diminuição da tensão superficial (facilitando a quebra das gotas) e por prevenirem a coalescência. Além disso, a estabilidade da emulsão pode ser favorecida por proteínas e peptídeos capazes promover a repulsão eletrostática ou o impedimento estérico.

Recentemente, tem sido reconhecido que, além do seu papel nutricional básico, muitas proteínas contêm, dentro da sua estrutura primária, sequências de peptídeos diferentes que exercem efeitos benéficos sobre a saúde humana. Esses pode ser liberados por enzimas digestivas durante o trânsito gastrointestinal, por fermentação e/ou maturação durante o processamento do alimento ou proteólise por enzimas grau alimentício de diferentes fontes (animal, microrganismos e vegetal). (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011).

Segundo Sarmadi e Ismail (2010), os hidrolisados são uma mistura que é principalmente composta por peptídeos e aminoácidos produzidos pela hidrólise enzimática, ácida ou alcalina de proteínas, ou ainda por fermentação. Quando a proteólise é induzida por proteases endógenas, o termo “autolisado” é normalmente usado, ao invés de “hidrolisado”. Os peptídeos bioativos, por outro lado, são sequências específicas de aminoácidos purificados a partir dos hidrolisados.

Peptídeos bioativos são considerados fragmentos específicos das proteínas que são inativos dentro da sequência da proteína original. Depois que são liberados por hidrólise enzimática, eles exercem uma série de funções fisiológicas. Estes peptídeos possuem um tamanho de 2 a 20 aminoácidos e massas moleculares menores que 6 kDa. A composição e a sequência de aminoácidos afetam a atividade do biopeptídeo. (SARMADI; ISMAIL, 2010). Estas moléculas apresentam diferentes atividades, tais como antimicrobiana, antioxidante, anti-trombótica, anti-hipertensiva, imunomoduladora, opióide, entre outros; podendo sua ação ser sobre o alimento ou o ser humano, nos sistemas cardiovascular, digestório, endócrino, imunológico e nervoso. O potencial destes peptídeos bioativos para reduzir o risco de doenças crônicas e promover a saúde humana tem despertado crescente interesse científico e comercial ao longo da última década. (SARMADI; ISMAIL, 2010; HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011).

O método mais comum para a obtenção de peptídeos bioativos é através da hidrólise enzimática de proteínas. O uso de proteinases de grau alimentício derivadas de microrganismos comercialmente disponíveis é vantajoso, uma vez que estas enzimas apresentam baixo custo, são

seguras e apresentam alto rendimento da reação. (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011).

A natureza da enzima utilizada não irá somente influenciar no grau de hidrólise, como também no tipo de peptídeos produzidos. Neste sentido, as proteases podem ser divididas em dois grandes grupos segundo sua atividade catalítica. As endopeptidases rompem as ligações internas da molécula proteica, enquanto que as exopeptidases hidrolisam as ligações terminais da cadeia polipeptídica. As exopeptidases ainda podem ser classificadas como aminopeptidases (se rompem o extremo N-terminal da cadeia) e carboxipeptidases (se rompem o extremo carboxila). A especificidade da protease também é variável em função da sequência aminoacídica. Por exemplo, algumas hidrolisam onde exista um aminoácido específico, enquanto que outras são menos específicas e reconhecem vários aminoácidos. As enzimas de origem bacteriana são as mais utilizadas na indústria de hidrolisados proteicos devido à facilidade de manipulação destes microrganismos e aos altos rendimentos de enzima que produzem. (VIOQUE *et al.*, 2001).

Bizzotto *et al.* (2006), visando a obtenção de um hidrolisado proteico de arroz com baixo teor de fenilalanina, realizaram a extração alcalina das proteínas de arroz seguida pela hidrólise do concentrado proteico com a enzima corolase PP. Os hidrolisados proteicos, tratados com carvão ativo, apresentaram teores de fenilalanina inferiores a 0,1 g 100 g⁻¹, possibilitando o seu uso no preparo de formulações dietéticas para fenilcetonúricos.

Li *et al.* (2007) produziram um hidrolisado proteico com atividade *in vitro* inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA), que no organismo humano atua no mecanismo modulatório da pressão arterial. Os autores hidrolisaram a proteína de arroz com o uso da protease comercial Alcalase. No estudo foi identificado e isolado um potente tetrapeptídeo com atividade anti-hipertensiva *in vivo* em ratos. Os autores enfatizaram a necessidade de realizar extensivos estudos clínicos com humanos para avaliar a eficácia do hidrolisado a longo prazo, bem como sua segurança, para propósitos terapêuticos.

Zhang *et al.* (2010) estudaram a ação de diferentes proteases (Alcalase, Quimiotripsina, Neutrase, Papaína e Flavorase) na hidrólise enzimática de proteína do endosperma de arroz, visando a obtenção de peptídeos antioxidantes. Os autores verificaram que, com o uso da Neutrase, foi possível obter um hidrolisado enzimático com elevada atividade antioxidante. Os autores isolaram dois diferentes peptídeos que mostraram forte atividade antioxidante via métodos cromatográficos e identificaram a sequência dos mesmos utilizando MALDI-TOF/TOF MS/MS. Os autores salientaram que, apesar da necessidade da continuação das pesquisas, o hidrolisado proteico obtido já poderia ser considerado um adequado antioxidante natural para a prevenção de reações oxidativas durante o processamento de alimentos.

Zhou, Canning e Sun (2013) avaliaram a eficácia de hidrolisados proteicos de arroz na prevenção da oxidação lipídica e no aumento do *shelf-life* de produtos cárneos. As proteínas de arroz foram hidrolisadas com três tipos de proteases microbianas e separadas em doze frações mediante ultrafiltração sequencial. As frações que apresentaram maior potencial antioxidante *in vitro* (uma delas obtida a partir da hidrólise com Validase e a outra obtida a partir da hidrólise com Alcalase) foram incorporadas em carne bovina moída e o seu efeito na inibição da oxidação lipídica foi avaliado por 15 dias. O hidrolisado obtido com Validase inibiu a oxidação lipídica em 19 % e 15 % nos dias 8 e 15 de estocagem respectivamente, sugerindo que tal hidrolisado poderia ser utilizado para o aumento do *shelf-life* de produtos cárneos.

A hidrólise de isolados proteicos vegetais é realizada normalmente em um reator descontínuo com agitação e controle de temperatura e pH. Para interromper a hidrólise, a enzima pode ser inativada com calor, diminuição do pH ou com uma combinação de ambos. Por fim, a enzima também pode ser removida do meio mediante filtração. (VIOQUE *et al.*, 2001). Segundo Sgarbieri (1996) os métodos em uso para obtenção de hidrolisados consistem na utilização de sistemas descontínuos e sistemas contínuos com reatores de membranas semipermeáveis ou enzimas imobilizadas. Um número muito grande de trabalhos de hidrólise enzimática utilizando reatores com membranas de ultrafiltração foram realizados a partir do início da década de 1970. Alguns autores apontam a otimização da utilização da enzima como a principal vantagem no emprego deste sistema. O fato da membrana permitir a remoção contínua de produtos da reação, peptídeos de baixo peso molecular, parece ser uma das maiores vantagens, já que a sua presença é a principal causa da diminuição da reação, quando realizada em sistema descontínuo. Outro aspecto importante em relação aos reatores com ultrafiltração é a possibilidade de controle, dentro dos limites de porosidade da membrana, da distribuição de pesos moleculares. Este controle é de extrema importância, pois algumas propriedades funcionais e nutritivas estão estreitamente relacionadas aos pesos moleculares.

3.1.6 Considerações finais

A crescente demanda por proteínas vegetais de elevada qualidade nutricional, e com baixo potencial alergênico, tem impulsionado o estudo da composição e propriedades funcionais das proteínas de arroz, com a finalidade de embasar a busca por técnicas de modificação de concentrados e isolados proteicos visando em especial a melhoria de sua solubilidade, a qual se traduz na melhoria das demais propriedades. Apesar de atualmente pouco valorizado no Brasil, o arroz quebrado é um importante insumo para a produção de amido, proteína e hidrolisados

proteicos de arroz. Dentre estes, amido de arroz é o ingrediente que possui maior número de relatos de aplicação em sistemas alimentícios no mercado mundial.

A tecnologia tradicional de obtenção de amido e proteína de arroz, o método alcalino, é uma técnica bastante eficiente, de baixo custo e, se realizada com o devido controle, permite a obtenção de ingredientes com adequadas propriedades funcionais e nutricionais. O controle é necessário tendo em vista que o meio alcalino forte, principalmente quando associado a temperaturas mais elevadas, pode induzir a alterações tanto nos grânulos de amido, quanto da estrutura e composição nutricional das proteínas. Neste contexto, novas técnicas enzimáticas vêm sendo desenvolvidas para a extração do conteúdo proteico do endosperma de arroz, mantendo os grânulos de amido íntegros. Adicionalmente, também é possível fazer uso de amilases na separação do amido e da proteína de arroz, técnica já empregada industrialmente na atualidade. Entretanto, com esta tecnologia são gerados uma corrente de concentrado proteico e outra de hidrolisados à base de dextrinas e oligossacarídeos derivados da degradação do amido de arroz.

Os hidrolisados proteicos de arroz, por sua vez, são ingredientes com grande potencial de aplicação em sistemas alimentícios; com a hidrólise parcial das proteínas é possível melhorar a solubilidade e demais propriedades funcionais de concentrados e isolados proteicos. Além disso, a hidrólise permite a obtenção de peptídeos bioativos com potencial de uso tanto como aditivos alimentares, como antioxidantes naturais, quanto como ingredientes com atividade biológica no organismo humano.

Desta forma, entende-se que mais estudos são necessários nesta área tendo em vista o desenvolvimento tecnológico, tanto do setor orizícola brasileiro, na valoração deste coproduto com a geração de matérias-primas de grande interesse industrial para a produção de alimentos, quanto da indústria de ingredientes brasileira, permitindo que o país deixe de produzir unicamente *commodities* e passe a agregar valor a sua matéria-prima, processando também as chamadas *commodities* tecnológicas.

3.1.7 Referências

- 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. doi:10.1016/j.jcs.2004.10.007
- BIZZOTTO, C. S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E. A. R.; SILVA, V. D. M.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Hidrolisados proteicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da Corolase PP e uso do carvão ativo. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, p. 308–316, 2006.

- CAI, J.; YANG, Y.; MAN, J.; HUANG, J.; WANG, Z.; ZHANG, C.; ... WEI, C. Structural and functional properties of alkali-treated high-amylose rice starch. *Food Chemistry*, v. 145, p. 245-53, 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.059
- CAO, X.; WEN, H.; LI, C.; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. *Journal of Cereal Science*, v. 50, p. 184-189, 2009. doi:10.1016/j.jcs.2009.04.009
- CARDOSO, M. B.; PUTAUX, J.-L.; SAMIOS, D.; DA SILVEIRA, N. P. Influence of alkali concentration on the deproteinization and/or gelatinization of rice starch. *Carbohydrate Polymers*, v. 70, p. 160-165, 2007. doi:10.1016/j.carbpol.2007.03.014
- FAO (Food and Agriculture Organization of United Nation). Rice Market Monitor - April 2015. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, v. XVIII, 2015. 42 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization of United Nation). *Report of the First Session of the Codex Committee on Vegetable Proteins*. Codex Alimentarius. Rome, Italy, 1980. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org>>. Acesso em: 20 abr. 2014.
- FRIEDMAN, M. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 6-29, 1996.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DEL MAR CONTRERAS, M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 165, p. 23-35, 2011. doi:10.1016/j.cis.2010.11.001
- JANE, J. Structural Features of Starch Granules II. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. *Starch: Chemistry and Technology*. 3ª. ed. Elsevier, 2009.
- JU, Z. Y.; HETTIARACHCHY, N. S.; RATH, N. Extraction, Denaturation and Hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. *Journal of Food Science*, v. 66, p. 229-232, 2001.
- JULIANO, B. O. Rice in Human Nutrition. Rome: International Rice Institute, 1993. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0567e/t0567e00.htm>. Acesso em: 26 dez. 2013.
- JULIANO, B. O.; BOULTER, D. Extraction and Composition of Rice Endosperm Glutelin. *Phytochemistry*, v. 15, p. 1601-1606, 1976.
- KUMAGAI, T.; KAWAMURA, H.; FUSE, T.; WATANABE, T.; SAITO, Y.; MASUMURA, T.; ... KADOWAKI, M. Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 52, p. 467-72, 2006.
- LAI, V. M. F.; LU, S.; HE, W. H.; CHEN, H. H. Non-starch polysaccharide compositions of rice grains with respect to rice variety and degree of milling. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1205-1210, 2006. doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.024
- LAM-SÁNCHEZ, A.; SANTOS, J. E.; TAKAMUA, K.; TREPTOW, R. M. O.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. Estudos nutricionais com Arroz (*Oryza sativa*, L.). *Alimentos e Nutrição*, v. 5, p. 37-48, 1994.

- LI, G.-H.; QU, M.-R.; WAN, J.-Z.; YOU, J.-M. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v. 16, p. 275–80, 2007.
- LI, Y.; LU, F.; LUO, C.; CHEN, Z.; MAO, J.; SHOEMAKER, C.; ZHONG, F. Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar. *Food Chemistry*, v. 117, p. 69–74, 2009. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.078
- LIM, S.; LEE, J.-H.; SHIN, D.-H.; LIM, H. S. Comparison of Protein Extraction Solutions for Rice Starch Isolation and Effects of Residual Protein Content on Starch Pasting Properties. *Starch/Starke*, v. 51, p. 120–125, 1999.
- LIU, L.; WATERS, D. L. E.; ROSE, T. J.; BAO, J.; KING, G. J. Phospholipids in rice: significance in grain quality and health benefits: a review. *Food Chemistry*, v. 139, p. 1133–45, 2013. doi:10.1016/j.foodchem.2012.12.046
- LIU, Y.; LI, X.; ZHOU, X.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Effects of glutaminase deamidation on the structure and solubility of rice glutelin. *LWT - Food Science and Technology*, v. 44, p. 2205–2210, 2011. doi:10.1016/j.lwt.2011.05.011
- LUMDUBWONG, N.; SEIB, P. A. Rice Starch Isolation by Alkaline Protease Digestion of Wet-milled Rice Flour. *Journal of Cereal Science*, v. 31, p. 63–74, 2000. doi:10.1006/jcrs.1999.0279
- MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MIRALLES, B.; GÓMEZ-RUIZ, J. Á. Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion In: TOLDRÁ, F.; NOLLET, L. M. L., *Proteomics in Foods*. Boston: Springer, 2013. pp. 21–51. doi:10.1007/978-1-4614-5626-1
- MATSUMURA, Y.; MORI, T. Gelation. In: HALL, G. M. *Methods of Testing Protein Functionality*, London: Chapman & Hall, 1996. 265 p.
- MITCHELL, C. R. Rice Starches: Production and Properties. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. *Starch: Chemistry and Technology*. 3^a. ed. Elsevier, 2009.
- NADIHA, M. Z. N.; FAZILAH, A.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Comparative susceptibilities of sago, potato and corn starches to alkali treatment. *Food Chemistry*, v. 121, p. 1053–1059, 2010. doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.048
- ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnología de Alimentos*, v. 1, Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.
- PARAMAN, I.; HETTIARACHCHY, N. S.; SCHAEFER, C. Preparation of Rice Endosperm Protein Isolate by Alkali Extraction. *Cereal Chemistry*, v. 85, p. 76–81, 2008. doi:10.1094/CCHEM-85-1-0076
- PINCIROLI, M.; VIDAL, A. A.; AÑÓN, M. C.; MARTÍNEZ, E. N. Comparison between protein functional properties of two rice cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 1605–1610, 2009. doi:10.1016/j.lwt.2009.06.003
- PREISS, J. Biochemistry and Molecular Biology of Starch Biosynthesis. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. *Starch: Chemistry and Technology*. 3^a. ed. Elsevier, 2009.
- PÉREZ, S.; BALDWIN, P. M.; GALLANT, D. J. Structural Features of Starch Granules I. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. *Starch: Chemistry and Technology*. 3^a. ed. Elsevier, 2009.

- ROMERO, A.; BEAUMAL, V.; DAVID-BRIAND, E.; CORDOBES, F.; GUERRERO, A.; ANTON, M. Interfacial and emulsifying behaviour of rice protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, v. 29, p. 1–8, 2012. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.01.013
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, v. 31, p. 1949–56, 2010. doi:10.1016/j.peptides.2010.06.020
- SGARBIERI, V. C. *Proteínas em Alimentos Proteicos*. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.
- SILVA, O. F.; WANDER, A. E.; FERREIRA, C. M. Arroz: Mercado, comercialização e consumo. Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 201-?. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fok5vmke02wyiv80bhgp5prthhx4.html>. Acesso em: 23 dez. 2013.
- SWAISGOOD, H. E. The use of immobilized enzymes to improve functionality. In: YADA, R. Y. *Proteins in food processing*. Boca Raton: CRC Press, 2004. pp. 176-196.
- THYS, R. C. S.; WESTFAHL, H.; NOREÑA, C. P. Z.; MARCZAK, L. D. F.; SILVEIRA, N. P.; CARDOSO, M. B. Effect of the alkaline treatment on the ultrastructure of C-type starch granules. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 1894–901, 2008. doi:10.1021/bm800143w
- VIEIRA, C. R.; LOPES JR., C. D. O.; RAMOS, C. S.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M. P. C. Extração enzimática das proteínas da farinha de arroz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 599–606, 2008.
- VIOQUE, J.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; MILLÁN, F. Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. *Grasas y Aceites*, v. 52, p. 132-136, 2001.
- WANG, L.; WANG, Y.-J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science*, v. 39, p. 291–296, 2004. doi:10.1016/j.jcs.2003.11.002
- WANG, S.; COPELAND, L. Effect of alkali treatment on structure and function of pea starch granules. *Food Chemistry*, v. 135, p. 1635–42, 2012. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.003
- WANG, T.; ZHANG, H.; WANG, L.; CHEN, Z. Mechanistic insights into solubilization of rice protein isolates by freeze-milling combined with alkali pretreatment. *Food Chemistry*, v. 178, p. 82-88, 2015.
- XIA, N.; WANG, J.-M.; GONG, Q.; YANG, X.-Q.; YIN, S.-W.; QI, J.-R. Characterization and In Vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction. *Journal of Cereal Science*, v. 56, p. 482–489, 2012. doi:10.1016/j.jcs.2012.06.008
- YAMAMOTO, H.; ISOZUMI, N.; SUGITANI, T. A concavity property of the viscosity growth curve during alkali gelatinization of rice starch. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 379–386, 2005. doi:10.1016/j.carbpol.2005.08.056
- YANG, L.; CHEN, J.; XU, T.; QIU, W.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; ... LIU, H. Rice protein extracted by different methods affects cholesterol metabolism in rats due to its lower digestibility. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, p. 7594–7608, 2011. doi:10.3390/ijms12117594

- ZHANG, J.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X.; WANG, X.; YAO, H. Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. *Food Chemistry*, v. 119, p. 226-234, 2010. doi:10.1016/j.foodchem.2009.06.015
- ZHAO, Q.; SELOMULYA, C.; XIONG, H.; CHEN, X. D.; RUAN, X.; WANG, S.; ... ZHOU, Q. Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice. *Journal of Cereal Science*, v. 56, p. 568-575, 2012. doi:10.1016/j.jcs.2012.08.012
- ZHOU, K.; CANNING, C.; SUN, S. Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation. *LWT – Food Science and Technology*, v. 50, p. 331-335, 2013.
- ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 37, p. 849-868, 2002.

3.2 Questões de pesquisa

Com base no estudo apresentado nesta revisão da literatura, foram elaboradas questões de pesquisa a partir de lacunas identificadas e que serão respondidas nesta tese.

- 1) A literatura apresenta muitos estudos que realizaram a extração das proteínas de arroz pelo meio alcalino com diferentes condições operacionais. Quais seriam as condições com as quais se pode extrair o máximo de proteína com o menor tempo de contato possível entre o meio alcalino e o substrato da extração?
- 2) O meio alcalino, apesar de ser muito eficiente na solubilização de proteínas, é tido como capaz de provocar uma série de alterações indesejadas nas proteínas, tais como a desnaturação proteica, a perda de aminoácidos essenciais e a formação de compostos tóxicos, como a lisinoalanina. Em que medida estas alterações podem ser minimizadas, com base na seleção das condições operacionais empregadas na extração?
- 3) O meio alcalino também provoca a gelatinização a frio do amido. É possível minimizar a ocorrência deste fenômeno com o uso de NaOH em baixa concentração?
- 4) A literatura indica que a proteína de arroz apresenta pobres propriedades funcionais, tendo em vista sua baixa solubilidade. Além disso, aponta para o fato de que as propriedades funcionais podem variar em função do método de extração empregado na obtenção da proteína. É possível que proteínas extraídas pelo método alcalino e pelo método enzimático apresentem propriedades funcionais distintas?

- 5) A hidrólise enzimática das proteínas a um baixo grau de hidrólise permite a melhoria de suas propriedades funcionais. É possível melhorar a solubilidade da proteína de endosperma de arroz com a hidrólise enzimática parcial? Que rendimentos podem ser obtidos neste processo?

Capítulo 4

Revisão Bibliográfica: Microfiltração e Ultrafiltração nas Indústrias de amido, proteínas e hidrolisados proteicos vegetais

Os processos de separação por membranas estão atualmente bem estabelecidos na indústria de alimentos. No processamento de proteínas vegetais, mais especificamente da soja, os primeiros estudos acerca da aplicação dos processos de separação por membranas, em especial da aplicação da ultrafiltração, datam da década de 1970. Desde então, várias pesquisas vêm sendo realizadas na concentração de proteínas vegetais de diversas fontes. A indústria de amido também já utiliza os processos de separação por membranas. E mais recentemente muito tem sido estudado sobre a aplicação da ultrafiltração na concentração e no fracionamento de peptídeos de diferentes fontes, com o intuito de purificá-los do hidrolisado proteico original, gerando insumos que podem ter aplicação tanto na indústria de alimentos quanto na indústria farmacêutica.

Os desafios são grandes neste campo de estudo, uma vez que o processo pode parecer simples, mas os mecanismos envolvidos na separação de moléculas por ultrafiltração, em especial, são bastante complexos. Este capítulo apresenta um trabalho de revisão de literatura que aborda basicamente estudos de aplicação das tecnologias de microfiltração e ultrafiltração nas indústrias de amido, proteínas e hidrolisados proteicos vegetais. Ao término do capítulo, são apresentadas questões de pesquisa elaboradas sobre o tema e que se busca responder nesta tese.

4.1 Artigo 2

MICROFILTRAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO NAS INDÚSTRIAS DE AMIDO, PROTEÍNAS E HIDROLISADOS PROTEICOS VEGETAIS

Daiana de Souza^{*,a,b}, Denise Righetto Ziegler^b, Ligia Damasceno Ferreira Marczak^a, Isabel Cristina Tessaro^a

^a Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Engenheiro Luiz Englert s/n, Porto Alegre/RS 90040-040, Brasil

^b Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor), Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93022-000, Brasil

* Autor para correspondência (Daiana de Souza)

Endereço atual: Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor), Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93022-000, Brasil

Fone/Fax: +55 51 35908842

E-mail: daianasouz@unisinos.br (D. de Souza).

Resumo:

A tecnologia de membranas é útil no fracionamento de moléculas e oferece uma boa alternativa para a separação por garantir um processo ambientalmente amigável a custos acessíveis. É uma importante tecnologia aplicada ao fracionamento de moléculas de valor agregado, com o objetivo de melhorar suas propriedades pelo aumento de sua pureza. Este trabalho apresenta uma revisão da literatura acerca de estudos sobre a aplicação da microfiltração para a separação e purificação de suspensões de amido, da ultrafiltração para concentração e purificação de proteínas vegetais e para o fracionamento e concentração de hidrolisados de proteínas vegetais. Nesta revisão é possível observar os tipos de aplicações estudadas, os benefícios alcançados, bem como os principais desafios enfrentados pelos pesquisadores. A indústria de processamento de amido vem empregando a tecnologia de membranas para muitas aplicações, incluindo o pré-tratamento de água, a recuperação de solutos e o tratamento de efluentes. No processamento de isolados e concentrados proteicos, geralmente a ultrafiltração é aplicada na substituição das operações de precipitação isoeletrica e lavagem. Na indústria de hidrolisados proteicos e peptídeos, as membranas, de acordo com as suas características, podem ser para a separação de peptídeos de proteínas não hidrolisadas ou de enzimas proteolíticas, no fracionamento de peptídeos de acordo com suas massas molares, na concentração de soluções de peptídeos (de uma mistura inicial ou de frações selecionadas) e na possível purificação de soluções (dessalinização, desodorização parcial, etc.) em modo diafiltração. Este procedimento parece simples em teoria uma vez que as membranas são hábeis em separar compostos pelo mecanismo de exclusão molecular, baseado em suas massas molares. Entretanto, isto não acontece na prática, uma vez que a manufatura assimétrica dos poros da membrana nem sempre reflete a estreita faixa da massa molar de corte especificada. Além disso, as interações eletrostáticas soluto-soluto e soluto-membrana influenciam de forma bastante significativas no desempenho do processo. Mesmo assim, com a adequada seleção dos parâmetros operacionais do processo, a tecnologia de membranas permite muitas oportunidades para o setor, e por este motivo vem crescendo cada vez mais a sua utilização em escala industrial.

Palavras-chave: Microfiltração, Ultrafiltração, Amido, Proteínas vegetais, Hidrolisados proteicos, Peptídeos.

4.1.1 Introdução

A tecnologia de membranas já forneceu uma série de soluções para alguns dos principais problemas da sociedade industrializada moderna. Os processos de separação por membranas possuem o potencial tanto para substituir as técnicas convencionais de energia intensiva, ao realizar o transporte seletivo e eficiente dos componentes específicos, quanto para melhorar o desempenho de processos reacionais. Esses processos são essenciais para uma vasta gama de aplicações, incluindo produção de água potável, geração de energia, reparação de tecidos, produção de produtos farmacêuticos, produção de alimentos, dentre outras. (DRIOLI; STANKIEWICZ; MACEDONIO, 2011).

Esta tecnologia é útil no fracionamento de moléculas e oferece uma boa alternativa para a separação, por garantir um processo ambientalmente amigável a custos acessíveis. Os processos vêm ganhando cada vez mais importância no fracionamento de moléculas de alto valor agregado, quando o objetivo é melhorar suas propriedades pelo aumento de sua pureza. (SAIDI *et al.*, 2014).

O componente chave de cada processo de separação por membranas é a membrana, uma interface claramente materializada por uma fina barreira nano-estruturada/funcionalizada. Ela controla a troca entre duas fases não apenas por forças externas e sob o efeito das propriedades do fluido, mas também devido às características intrínsecas do material da membrana. A tecnologia de membranas já ganhou uma grande importância nas últimas duas décadas e agora está competindo com outras tecnologias de separação em termos de eficiência energética, alta capacidade de separação, separação seletiva e investimentos de capital. (DRIOLI; STANKIEWICZ; MACEDONIO, 2011).

Segundo Lipnizki (2010) ao longo das duas últimas décadas, o mercado mundial de tecnologia de membranas na indústria de alimentos aumentou para um volume de cerca € 800-850 milhões, e é agora o segundo maior mercado industrial para as membranas após o tratamento de água e de águas residuais, incluindo a dessalinização.

As principais tecnologias de membranas aplicadas na indústria de alimentos são os processos microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI). Em relação à participação no mercado, os sistemas de UF representam a maior fatia do mercado, com 35 %, seguido pelos sistemas de MF, com 33 %, e os sistemas de NF/OI, com 30 %. Outros processos de separação, como eletrodialise (ED) e pervaporação (PV) têm apenas uma pequena quota de mercado. As principais aplicações deste mercado são na indústria de laticínios (leite,

soro de leite, salmoura de queijos, etc.), seguido por outras indústrias de bebidas (cerveja, sucos de frutas e vinho, etc.). O sucesso da tecnologia de membranas no mercado de alimentos e bebidas está diretamente ligado a algumas das principais vantagens dos processos de membranas em relação às tecnologias de separação convencionais (LIPNIZKI, 2010; MONDOR, 2014):

- a) tratamento suave, devido às mudanças de temperatura moderada durante o processamento;
- b) alta seletividade baseada em mecanismos de separação única, por exemplo, peneiramento, solução-difusão ou mecanismo de troca iônica;
- c) *design* compacto e modular, fornecendo facilidade de instalação e de aumento de escala;
- d) baixo consumo de energia em comparação com condensadores e evaporadores.

A desvantagem fundamental da filtração por membranas é a redução no fluxo de permeado, o que acarreta uma perda de produtividade do processo ao longo do tempo. O efeito das incrustações pode ser minimizado por intervalos de limpeza regulares. Na indústria de alimentos é comum se ter, pelo menos, um ciclo de limpeza a cada 24 h de operação, devido à natureza das soluções. Outras ações para reduzir as incrustações estão diretamente relacionadas ao projeto e operação da planta. Durante o projeto da planta, a seleção de uma membrana de baixa tendência à incrustações, por exemplo, membranas hidrofílicas para reduzir incrustações por bactérias, e módulos de membrana com alturas de canais apropriados, por exemplo módulos com *design* de canal aberto, para evitar o bloqueio por partículas, pode reduzir o risco de entupimento e contaminação de forma significativa. (LIPNIZKI, 2010).

A operação da planta abaixo do *fluxo crítico* - o fluxo abaixo do qual um declínio de fluxo ao longo do tempo não ocorre, e acima do qual as incrustações são observadas - pode estender o tempo entre os intervalos de limpeza de forma significativa, mas é comumente relacionada à operação a baixa pressão, que se traduz em baixas capacidades. Em alternativa, a operação do processo em regime de fluxo turbulento pode reduzir o efeito das incrustações, mas a geração de turbulência está associada a um aumento na perda de carga e, por conseguinte, a custos de energia mais elevados. Outras limitações para a aplicação de processos de membrana podem ser relacionadas com as características de alimentação, por exemplo, aumento da viscosidade ou da pressão osmótica com a concentração. (LIPNIZKI, 2010).

Entretanto, em geral, processos de separação por membrana com fluxo tangencial estabeleceram-se na indústria de alimentos e uma série de estudos na literatura tem sido realizados em diversas aplicações desta importante indústria. Tais estudos são fundamentais para ampliar as potencialidades para o setor. Este trabalho apresenta uma revisão da literatura acerca de estudos sobre a aplicação da microfiltração para a separação e purificação de

suspensões de amido; e da ultrafiltração para concentração e purificação de proteínas vegetais e para o fracionamento e concentração de hidrolisados de proteínas vegetais. Nele é possível observar os tipos de aplicações estudadas, os benefícios alcançados com a aplicação desta tecnologia, bem como os principais desafios enfrentados.

4.1.2 Microfiltração na separação e purificação de suspensões de amido

A indústria de processamento de amido emprega a tecnologia de membranas para muitas aplicações, incluindo o pré-tratamento de água, a recuperação de sólidos e o tratamento de efluentes. As membranas podem ser usadas para filtrar diferentes tipos de fluidos nos processos de isolamento de amido de batata, trigo e milho, com variáveis graus de sucesso quando comparados com as tecnologias convencionais como centrifugação, filtração a vácuo e evaporação. Novos coprodutos podem ser desenvolvidos usando a tecnologia de membranas. Além disso, os custos do tratamento de efluentes podem ser reduzidos pela maior recuperação de sólidos que é obtida com a aplicação desta tecnologia. Estes resultados são duplamente vantajosos, uma vez que, além da redução do custo de tratamento do efluente, também se observa a redução de perdas no processo. (RAUSCH, 2002).

Shukla *et al.* (2000) utilizaram uma membrana de titânio em um suporte poroso de aço inoxidável para a filtração de suspensões de amido de milho, visando a possibilidade de substituir os hidrociclones ou centrífugas utilizadas atualmente na concentração e purificação do amido. Os autores observaram que o amido pode ser processado até concentrações superiores a 50 %, dependendo do nível de proteína residual desejado no produto. Baixas pressões e altas velocidades tangenciais são recomendadas para minimizar as incrustações. A temperatura de operação deve ser ajustada para prevenir a gelatinização do amido durante a microfiltração. No estudo, os autores realizaram a microfiltração com uma membrana de 0,1 μm a 49°C, mas salientam que a temperatura pode variar de acordo com a fonte do amido microfiltrado. Com o sistema tubular utilizado, o fluxo de permeado foi independente da pressão para pressões acima de 1,5 bar. Os autores observaram a completa rejeição do amido, mas 60–70 % para a proteína. Os autores sugerem o uso de uma membrana com poros maiores para facilitar a remoção da proteína. O protocolo de limpeza da membrana, utilizando hidróxido de sódio, cloro e glucoamilase, forneceu os melhores resultados para a recuperação do fluxo da membrana.

Cancino, Rossier e Orellana (2006) testaram a aplicação da microfiltração associada com a osmose inversa na diminuição da carga orgânica do efluente da indústria de amido de milho. Utilizando uma membrana de 0,2 μm na microfiltração, foi possível realizar a recuperação do

amido do efluente. Com a aplicação da osmose inversa no permeado da microfiltração, os autores observaram ser possível reduzir a demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅) do efluente para valores abaixo dos limites legais (DBO₅ final de 31 mg O₂ L⁻¹).

Aspelund e Glatz (2010) avaliaram a adequação da microfiltração para a clarificação de extratos proteicos de milho obtidos a partir do endosperma e do gérmen do cereal, na recuperação de proteínas recombinantes. Os grânulos de amido mais densos foram removidos por sedimentação durante 30 segundos, e os não sedimentados foram removidos da suspensão com membranas de 0,2 µm de cerâmica e de PVDF (poli (fluoreto de vinilideno)). Os autores observaram a clarificação das suspensões e a baixa rejeição de proteínas de baixa massa molar. Entretanto, observaram alta rejeição para proteínas de mais alta massa molar (>80 kDa) na filtração com membranas cerâmicas, as quais puderam ser recuperadas utilizando membranas de PVDF. Os autores ainda observaram um altas incrustações nas membranas cerâmicas causado pela presença de amido solubilizado (gelatinizado) na suspensão.

Lecorre, Bras e Dufresne (2011) buscando melhorar a performance do processo de produção e recuperação de nanocristais de amido de milho (estruturas cristalinas resultantes da ruptura dos grânulos de amido a partir da hidrólise de partes amorfas), estudaram a aplicação da microfiltração associada à hidrólise. A microfiltração foi realizada com membranas cerâmicas de 0,1, 0,2, 0,5 e 0,8 µm, e os parâmetros do processo foram estudados. Os resultados mostraram que a microfiltração pode ser uma solução promissora para conseguir a separação de nanocristais de partículas não totalmente hidrolisadas. Não foram observadas diferenças significativas no tamanho final de partículas para todas as membranas testadas.

Middlewood e Carson (2012a) avaliaram a microfiltração como uma alternativa para as operações tradicionais para a separação do amido e amaranto de um extrato produzido pelo processo de Al-Hakkak. Um sistema de filtração tangencial Millipore PROFLUX, equipado com uma membrana de celulose regenerada de 1000 kDa, foi utilizado no experimento. A membrana selecionada reteve todos os grânulos de amido, mas também reteve mais proteína do que o desejado. A pressão transmembrana adequada foi de cerca de 100-150 kPa, acima da qual o fluxo de permeado aumentava de forma não linear com a pressão. A realização de diafiltrações reduziu o teor de proteína e gordura do retido, mas não o suficiente para atingir os níveis comercialmente aceitáveis.

Middlewood e Carson (2012b), após observarem as incrustações na membrana de celulose regenerada de 1000 kDa, identificaram dificuldades significativas no processo de limpeza da membrana. Neste artigo os autores descreveram o ciclo de limpeza desenvolvido para limpar adequadamente a membrana após a operação. As principais etapas de limpeza foram: uma lavagem com água fria para remover o material fracamente ligado, uma lavagem com

solução de protease para remover a proteína, uma lavagem com solução de hidróxido de sódio para "pré-tratar" todos os grânulos de amido restantes, uma lavagem com solução de amilase para degradar os grânulos de amido, e uma lavagem definitiva com solução de hidróxido de sódio para remover os resíduos da etapa anterior.

Wojciech *et al.* (2013) aplicaram a microfiltração tangencial para a separação de grânulos nativos de amido de milho de um caldo de fermentação, analisando a formação de incrustações na membrana. Os autores avaliaram a influência da pressão transmembrana e da velocidade tangencial da corrente de concentrado no declínio do fluxo de permeado, trabalhando com uma membrana cerâmica com poros de 0,45 μm . Foi observado que a minimização da formação de incrustações ocorreu com a utilização de alta velocidade tangencial (4,55 m s^{-1}) e baixa pressão transmembrana (0,35 bar).

4.1.3 Ultrafiltração na concentração de proteínas vegetais

Segundo Mondor (2014), a ultrafiltração tem sido sugerida como um dos meios para a superação dos problemas encontrados com o processo de precipitação isoelétrica de proteínas. Porter e Michaels (1971) citados por Mondor (2014), foram os primeiros a sugerir o uso da ultrafiltração no processamento de extratos proteicos de soja. Em 1975, Okubo *et al.* estudaram a ultrafiltração utilizando o modo de diafiltração na obtenção de concentrados e isolados proteicos de soja com reduzido teor de fitatos. Desde então, um crescente número de pesquisadores vem investigando diferentes aspectos do uso desta tecnologia inicialmente na concentração e purificação de proteínas de soja, e mais recentemente no processamento de proteínas vegetais de diferentes fontes. O Quadro 4.1 apresenta um resumo das aplicações da ultrafiltração empregadas por diversos estudos com diferentes tipos de proteínas vegetais.

Quadro 4.1: Estudos de aplicação da ultrafiltração na concentração e purificação de proteínas vegetais de diferentes fontes, objetivos pretendidos, membranas avaliadas e principais resultados obtidos.

Matriz	Objetivos da aplicação da ultrafiltração	Membranas avaliadas	Principais resultados obtidos	Referência
Proteína de batata	Concentrar proteínas, reduzir sabor e odor residual do concentrado.	5, 10, 30 e 100 kDa (celulose regenerada) 20, 30, 50 e 100 kDa (PES-H*)	Obtenção de um concentrado com melhor qualidade sensorial.	Zwijnenberg <i>et al.</i> (2002)
Proteína de tremoço	Melhorar rendimento e melhorar propriedades funcionais em relação à proteína obtida por PI**.	10 kDa	Maior rendimento na concentração e obtenção de proteína com melhor solubilidade em meio ácido.	Chew; Casey; Johnson (2003)
Proteína de endosperma de arroz	Concentrar proteínas e melhorar propriedades funcionais em relação ao método tradicional PI.	5 kDa	Obtenção de um concentrado com maior solubilidade e propriedades emulsionantes melhoradas.	Paraman; Hettiarachchy; Schaefer (2008)
Proteína de grão de bico	Melhorar a recuperação de proteínas, reduzir o teor de fatores antinutricionais (ácido fítico, fenólicos e inibidores de tripsina) no concentrado.	50 kDa	Os concentrados apresentaram menor conteúdo de inibidores de tripsina, maior conteúdo de fósforo e fenólicos, quando comparados com os produzidos por precipitação isoelétrica.	Mondor <i>et al.</i> (2009)
Proteínas de ervilha amarela, grão de bico e lentilhas verde e vermelha	Melhorar rendimento e melhorar propriedades funcionais em relação à proteína obtida por PI.	50 kDa	Obtenção de um concentrado com algumas propriedades funcionais levemente melhores.	Boye <i>et al.</i> (2010)
Proteína de amaranto	Comparar o rendimento da extração, a concentração proteica e as características físico-químicas de concentrados proteicos obtidos por PI.	Não informado	O concentrado proteico obtido por ultrafiltração apresentou melhor perfil de aminoácidos (com menores perdas), em relação ao processo convencional.	Castel <i>et al.</i> (2012)
Proteína de folha de alfafa	Avaliar a performance da membrana em concentrar o suco de folha de alfafa, entendendo a eficiência do processo, a performance da separação, o comportamento do fluxo e as incrustações em diferentes configurações de módulos.	20 kDa	A filtração dinâmica usando módulo de disco rotatório apresentou a melhor produtividade e melhor potencial para aplicação industrial.	Zang <i>et al.</i> (2015)
Proteína de semente de cânhamo	Concentrar proteínas e comparar a digestibilidade e as propriedades funcionais com as de um concentrado comercial.	10 kDa	Obtenção de um concentrado proteico com maior solubilidade e com melhores propriedades espumantes.	Malomo; Aluko (2015)
Proteínas de canola	Remover fatores antinutricionais, desenvolver um método escalável para extrair e isolar as proteínas majoritárias da canola.	10 kDa	Foi desenvolvido um método simples e escalável para o isolamento de proteína de canola.	Akbari; Wu (2015)

* PES-H – poli(etersulfona) hidrofílica

** PI - precipitação isoelétrica

No processamento de isolados e concentrados proteicos de soja, geralmente a ultrafiltração é aplicada na substituição das operações de precipitação isoeletrica e lavagem. Membranas de ultrafiltração de diferentes massas molares de corte (MMC) têm sido estudadas para a concentração e purificação de extratos de soja, mas a massa molar de corte de 50 kDa tem demonstrado os melhores balanços entre alto fluxo de permeado e a alta rejeição proteica. Uma das vantagens da ultrafiltração sobre a precipitação isoeletrica é o fato de que a ultrafiltração permite a recuperação de praticamente toda a proteína solubilizada, aumentando a recuperação proteica e minimizando a geração de efluentes. Outra vantagem é o fato de que os componentes indesejáveis do extrato de soja, tais como oligossacarídeos e ácido fítico podem ser seletivamente separados das proteínas. Adicionalmente, as isoflavonas podem ser recuperadas em elevadas concentrações no isolado, tornado os isolados e concentrados proteicos de soja produzidos por ultrafiltração com melhores propriedades funcionais do que os produzidos pelo processo tradicional. A principal desvantagem é a ocorrência de incrustações. (MONDOR, 2014).

Na literatura é possível encontrar muitos estudos acerca da aplicação da ultrafiltração na obtenção de concentrados proteicos de soja. Rao *et al.* (2002) caracterizaram um concentrado proteico de soja produzido por ultrafiltração em termos de suas propriedades funcionais, qualidade proteica e atributos sensoriais, comparando a performance do produto com a farinha de soja e um concentrado comercial obtido por precipitação isoeletrica. A concentração das proteínas extraídas com o uso de uma membrana com MMC 30 kDa permitiu a obtenção de um concentrado ligeiramente mais solúvel que o produto comercial e com menor sabor e aroma típicos da soja. Diversos outros trabalhos avaliaram diferentes aspectos do processo, principalmente comparando a eficiência do mesmo com o processo convencional de precipitação isoeletrica. (ALI *et al.*, 2011; ALI *et al.*, 2010; ALIBHAI *et al.*, 2006; KIM; KIM, 2015; KRISHNA KUMAR; YEA; CHERYAN, 2004; KUMAR; YEA; CHERYAN, 2003; LAI *et al.*, 2013; MONDOR *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2014).

Como pode ser observado, a ultrafiltração é uma metodologia bem estabelecida com múltiplas vantagens, restrições e desafios. Quando são usadas membranas com poros maiores, o mecanismo dominante da ultrafiltração é a exclusão por tamanho, e a correspondente separação de macro e micromoléculas é bastante clara. Pela aplicação de membranas com poros menores, o corte molecular se torna mais estrito e a separação é conduzida em termos da solubilidade dos componentes e da hidrofobicidade da membrana. Este fato introduz severas restrições ao processo devido à polarização por concentração de proteínas e polissacarídeos (por exemplo, pectina), conduzindo o à formação de camada gel, agregação proteica e incrustações. Entretanto, tais aspectos trazem oportunidades para aplicações específicas. Por exemplo, no caso do uso de membranas com MMC da ordem de 1-2 kDa, as interações eletrostáticas entre a superfície da

membrana e os solutos podem aumentar a seletividade de membrana, se o meio for adequadamente selecionado. (GALANAKIS, 2015).

4.1.4 Ultrafiltração no fracionamento e purificação de hidrolisados proteicos

Os hidrolisados proteicos apresentam diversas vantagens funcionais e nutricionais em relação às proteínas integrais. Segundo Sgarbieri (1996), a demonstração de que oligopeptídeos de baixa massa molar são absorvidos pelo organismo humano tão eficientemente ou até mais eficientemente que os aminoácidos livres, despertou o interesse pelo uso de hidrolisados proteicos parciais em nutrição hospitalar. Adicionalmente, as propriedades funcionais de proteínas, tais como potencial emulsificante, capacidade de formação e estabilização de espumas, geleificação, viscosidade e capacidade de ligar água, por serem determinadas pela topologia superficial da molécula, podem ser modificadas com proteinases específicas sob condições apropriadas. (SWAISGOOD, 2004). Ainda, além do seu papel nutricional básico, recentemente tem sido reconhecido que muitas proteínas contêm, dentro da sua estrutura primária, sequências de peptídeos diferentes que podem apresentar diferentes ações, tanto como aditivos alimentares quanto exercendo efeitos benéficos para a saúde humana. (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011).

Desta forma, muitas pesquisas tem sido realizadas em relação à produção de hidrolisados proteicos com diferentes objetivos:

- a) na melhoria das propriedades funcionais da proteína de origem, aumentando o leque de aplicações da proteína como um ingrediente para a indústria de alimentos;
- b) na produção de hidrolisados proteicos mais biodisponíveis para organismo humano, usados como suplementos alimentares;
- c) e na produção de peptídeos ativos, que podem possuir tanto atividades como aditivos alimentares (antioxidantes, por exemplo), quando podem possuir bioatividades dentro do organismo humano, podendo ser adicionados em alimentos ou comercializados como suplementos alimentares.

Na indústria de hidrolisados proteicos e peptídeos, as membranas, de acordo com as suas massas molares de corte, podem ser usadas com diferentes objetivos (VANDANJON *et al.*, 2007): para a separação de peptídeos de proteínas não hidrolisadas ou de enzimas proteolíticas, com membranas de ultrafiltração com elevadas massas molares de corte (aproximadamente 20 kDa); no fracionamento de peptídeos, de acordo com suas massas molares, com membranas de ultrafiltração de massas molares de corte intermediárias (aproximadamente 4 a 8 kDa); na

concentração de soluções de peptídeos (de uma mistura inicial ou de frações selecionadas), com membranas de nanofiltração com baixa massa molar de corte (aproximadamente 200 a 300 Da); e na possível purificação de soluções (dessalinização, desodorização parcial, etc.) por nanofiltração em modo diafiltração.

Wu, Hettiarachchy e Qi (1998) investigaram as propriedades funcionais de peptídeos de soja preparados por hidrólise com papaína e purificados por ultrafiltração. Segundo os autores, o controle do tamanho dos peptídeos é importante para a obtenção de propriedades funcionais desejáveis de modo a que estes peptídeos possam ser melhor utilizados. A modificação enzimática proteolítica de isolados proteicos de soja, seguida por ultrafiltração, é uma forma eficaz para fracionar estas proteínas em peptídeos com massa molar controlada. O hidrolisado foi fracionado por ultrafiltração com uma célula de agitação (em modo de filtração *dead end*) e membranas de discos (100 kDa, 50 kDa, e 20kDa). Os peptídeos apresentaram maior solubilidade e propriedades emulsionantes melhoradas em relação ao isolado proteico original.

Berot *et al.* (2001) utilizaram a ultrafiltração para o fracionamento de dois tipos de polipeptídeos produzidos a partir de hidrólise enzimática de glúten de trigo. Os polipeptídeos hidrofílicos e fracamente carregados foram bem transmitidos através de uma membrana inorgânica em pH ácido, enquanto que um polipeptídeo hidrofóbico e dois carregados positivamente foram altamente retidos. Através da combinação de cromatografias de troca iônica e fase reversa, os autores demonstraram que o fracionamento dos polipeptídeos se baseou na repulsão eletrostática pela membrana carregada positivamente. Depois da realização de diafiltração contínua, foi possível recuperar o retido contendo 75 a 88 % do polipeptídeo hidrofóbico e o permeado contendo 84 a 90 % dos polipeptídeos hidrofílicos, dependendo do tamanho da membrana utilizada (150 e 50 kDa, respectivamente).

Posteriormente, Popineau *et al.* (2002) avaliaram as propriedades funcionais de hidrolisados de glúten preparados por hidrólise enzimática limitada com a protease 2500S. Os hidrolisados foram fracionados por ultrafiltração, utilizando duas membranas inorgânicas com massas molares de corte de 50 e 150 kDa. Os retidos foram enriquecidos em peptídeos hidrofóbicos e os permeados foram enriquecidos em peptídeos hidrofílicos. As propriedades de formação de espuma e emulsionantes dos hidrolisados, retidos e permeados foram analisadas em dois pHs (4 e 6,5) e duas concentrações de sal (0,2 e 2 % de NaCl). Os hidrolisados exibiram melhor capacidade de formação de espuma, mas as espumas não foram estáveis. Os permeados não apresentaram propriedades emulsificantes. Os retidos produziram espumas com boa estabilidade e foram mais eficientes que o hidrolisado não fracionado para estabilizar emulsões. As propriedades funcionais de retidos foram fracamente influenciadas pelo pH e a força iônica. As diferentes massas molares de corte avaliadas não influenciaram nas propriedades funcionais dos hidrolisados ultrafiltrados.

Moure, Domínguez e Parajó (2006) recuperaram por ultrafiltração a proteína solubilizada durante a produção industrial de concentrados de soja, utilizando uma membrana de 10 kDa. Após, a proteína recuperada foi fracionada sequencialmente com membranas de 30 kDa e 50 kDa, nesta ordem. As frações retida e permeada para a membrana de 50 kDa foram submetidas à hidrólise enzimática com Flavourzyme® para a remoção dos inibidores e proteínas alergênicas presentes na fração de permeado e para melhorar as propriedades funcionais da fração de retido. As quatro frações obtidas (<10 kDa, <30 kDa, <50 kDa hidrolisado e retido em 50 kDa hidrolisado) foram ensaiadas quanto à suas atividades antioxidantes. A fração com massa molar <10 kDa apresentou a maior atividade antioxidante utilizando todos os métodos de avaliação do potencial antioxidante considerados no trabalho. Além disso, a proteólise aumentou o potencial antioxidante da amostra que permeou a membrana de 50 kDa.

Wang *et al.* (2006) hidrolisaram parcialmente proteínas do trigo (glúten) utilizando a preparação enzimática comercial Protamex® e fracionaram o hidrolisado com membranas de ultrafiltração de diferentes massas molares de corte com o objetivo de avaliar a melhoria das propriedades funcionais solubilidade, potencial emulsificante e formador de espuma e a reologia do gel. O fracionamento foi realizado em membranas de ultrafiltração com massas molares de corte de 100, 50 e 20 kDa, mediante ultrafiltração sequencial. A proteólise levou a um significativo aumento da solubilidade das frações nos pHs entre 2-10 e a uma mudança do ponto isoelétrico, de 6-7 para 5. As solubilidades das frações de retido (de todas as membranas) e do permeado da membrana de 20 kDa foram significativamente melhoradas em comparação com o controle não tratado e o hidrolisado. A fração retida na membrana de 50 kDa foi superior a das outras três frações para o índice de atividade de emulsão entre pH 2 e 10. A espuma mais estável foi obtida com a fração retida pela membrana de 100 kDa. A estabilidade da espuma diminuiu à medida que a massa molar de frações de hidrolisado diminuiu. Além disso, foi verificado que, depois da proteólise, a hidrofobicidade superficial do glúten hidrolisado aumentou significativamente em comparação com o controle, exceto para a fração de permeado. Além disso, a proteólise resultou numa diminuição no módulo de armazenamento de géis, indicando uma diminuição de sua elasticidade.

Das, Bhattacharjee e Ghosh (2009) avaliaram a viabilidade de concentrar um hidrolisado proteico de gergelim por ultrafiltração, estudando a influência dos parâmetros operacionais pressão transmembrana, concentração da alimentação e pH da solução no fluxo de permeado e na rejeição de proteínas. Os autores utilizaram uma membrana de poli(etersulfona) de massa molar de corte de 5 kDa. Os resultados mostraram a ocorrência de incrustações durante o processo, embora na maioria dos casos o fluxo da água pôde ser recuperado com o emprego da metodologia de limpeza sugerida. A rejeição das proteínas ficou na faixa de 50-70 %, dependendo das condições operacionais empregadas. Fluxo mínimo e a concentração máxima de permeado

(ou seja, rejeição mínima) foram obtidos no ponto isoelétrico do hidrolisado proteico de gergelim. O estudo mostrou claramente que a ultrafiltração pode ser usada como uma ferramenta eficaz para a concentração de hidrolisado proteico de gergelim após escolha adequada das condições de operação.

Tsou *et al.* (2012) avaliaram o efeito da hidrólise limitada de isolado proteico de soja com Flavourzyme® 1000 MG na geração de um hidrolisado proteico com ação antiadipogênica. No estudo, os autores realizaram a ultrafiltração sequencial (com membranas com massas molares de corte de 30 kDa, 10 kDa e 1 kDa) com o intuito de avaliar se o fracionamento intensificava as atividades observadas. A ação antiadipogênica foi avaliada com culturas de células, medindo-se a supressão da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH) e o acúmulo de lipídios em pré-adipócitos 3T3-L1. Os autores observaram que a hidrólise limitada do isolado proteico de soja com Flavourzyme® durante 2 horas revelou muito maior supressão da glicerol-3-fosfato desidrogenase que o isolado proteico de soja intacto em pré-adipócitos 3T3-L1. Além disso, o fracionamento usando a ultrafiltração foi útil, uma vez que o permeado da membrana com massa molar de corte de 1 kDa apresentou efeitos potencializados na ação antiadipogênica.

Roblet *et al.* (2012) determinaram as bioatividades resultantes da hidrólise de isolado proteico de soja a partir de um tratamento enzimático duplo com pepsina e pancreatina e investigaram se o fracionamento dos hidrolisados proteicos por ultrafiltração com membranas de 10 kDa em módulos de fibras ocas e espiral aumentava a atividade biológica dos peptídeos recuperados. O foco do estudo foi no rastreio da bioatividade das frações de peptídeos utilizando vários bioensaios *in vitro*, tais como a proliferação de células cancerosas, destruição de murino norovírus-1 (MNV-1), propriedades antioxidantes e imunomoduladoras, e, finalmente, metabolismo da glicose em uma linhagem de células musculares. Efeitos biológicos significativos dos peptídeos, tanto para a capacidade antioxidante (teste ORAC) quanto para o metabolismo (ensaio de captação de glicose muscular) foram encontrados. Estes resultados mostraram que a ultrafiltração dos hidrolisados produzidos é um processo adequado para a recuperação de grandes quantidades de peptídeos bioativos.

Zhou, Sun e Canning (2012) avaliaram o potencial de proteases microbianas comerciais na geração de hidrolisados proteicos/peptídeos de milho com potencial antioxidante, como uma estratégia para melhorar a qualidade de alimentos e prolongar a vida de prateleira de produtos cárneos através da inibição da oxidação de lipídeos. Os hidrolisados proteicos foram produzidos por hidrólise enzimática de isolado proteico de milho utilizando as enzimas Validase® FP, uma protease alcalina e uma protease neutra. Os hidrolisados foram purificados por ultrafiltração em escoamento *dead-end* de forma sequencial, utilizando membranas de celulose de 10 kDa, 3 kDa e 1 kDa (onde o permeado da primeira membrana foi usado como solução de alimentação da segunda membrana, e assim sucessivamente). Todos os concentrados e permeados foram

liofilizados. As frações foram avaliadas em relação a suas propriedades antioxidantes *in vitro*. Em seguida, para testar um potencial inibitório sobre o processo de oxidação lipídico associado com o desenvolvimento de rancidez, as frações de peptídeos identificadas com potentes atividades antioxidantes foram selecionados para posterior avaliação antioxidante contra a oxidação lipídica em carne bovina moída cozida, pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As três frações com maior potencial antioxidante foram: permeado da membrana de 3 kDa do hidrolisado produzido pela protease neutra; permeado da membrana de 10 kDa e da membrana de 3 kDa do hidrolisado produzido pela protease alcalina. O potencial antioxidante das mesmas foi avaliado em carne cozida durante 15 dias de armazenamento, onde foi observado que a fração produzida pela protease neutra foi a que apresentou melhor desempenho. A recuperação desta fração a partir do isolado proteico de milho foi de 6,3 %, sugerindo que este ingrediente poderia ser produzido e usado em carnes como um aditivo antioxidante.

He *et al.* (2013) utilizaram várias proteases para digerir isolado proteico de sementes de colza, e o hidrolisado foi fracionado com ultrafiltração (<1 kDa, 1-3 kDa, 3-5 kDa e 5-10 kDa). As atividades *in vitro* e *in vivo* (em modelo animal - ratos) dos hidrolisados proteicos foram dependentes do tipo de protease usada para a digestão proteica e também do tamanho das frações de peptídeos. A massa molar das frações de peptídeos foi inversamente proporcional às propriedades antioxidantes e inibidoras da enzima conversora de angiotensina (relacionada à diminuição da pressão arterial). Os autores defendem que é possível que o pequeno tamanho dos peptídeos os tornem mais hábeis a penetrar na estrutura proteica da enzima, mudando sua conformação e diminuindo sua atividade. Os peptídeos produzidos neste estudo podem ser usados como ingredientes na formulação de alimentos funcionais e produtos nutracêuticos com capacidade de reduzir a pressão arterial.

Ranamukhaarachchi, Meissner e Moresoli (2013) avaliaram a habilidade de uma membrana de nanofiltração de massa molar de corte de 2,5 kDa em aumentar a capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos de soja obtidos por hidrólise enzimática e pré-tratados por ultrafiltração, para remover os grandes fragmentos dissolvidos no meio. Segundo os autores, estudos prévios indicaram que membranas de nanofiltração mais fechadas (300-500 Da) não foram eficientes no fracionamento de hidrolisados proteicos de soja em função do pH. Como é esperado que tais hidrolisados possuam diferentes peptídeos com distintas cargas e tamanhos, um pH específico teria um efeito significativo no fracionamento com membranas de nanofiltração com massas molares de corte maiores. Assim, o estudo investigou o papel do pH durante a nanofiltração no conteúdo de peptídeos e na capacidade antioxidante do permeado. Os peptídeos foram produzidos por hidrólise com pepsina e pancreatina. A fração de permeado produzida por nanofiltração com a membrana de 2,5 kDa em pH 8 apresentou a maior atividade antioxidante, permitindo um incremento de treze vezes na propriedade em relação ao isolado proteico original.

Alashi *et al.* (2014) investigaram a atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de canola e frações de peptídeos preparadas utilizando cinco proteases e membranas de ultrafiltração (1, 3, 5, e 10 kDa). Os peptídeos apresentaram um alto potencial antioxidante. As frações dos hidrolisados obtidos com pepsina e pancreatina menores que 1 kDa apresentaram o melhor potencial.

Merz *et al.* (2015) investigaram a aplicação da hidrólise enzimática e das operações de centrifugação e ultrafiltração para obtenção de hidrolisados proteicos de glúten com alergenicidade reduzida. Foi possível produzir hidrolisados de glúten sem potencial alergênico utilizando o preparado comercial Flavourzyme®. A centrifugação foi suficiente para a obtenção de hidrolisados sem alergenicidade quando a concentração de glúten no substrato era de 25 g L⁻¹. Já com a concentração em 100 g L⁻¹, a ultrafiltração com uma membrana de massa molar de corte de 1 kDa foi necessária para garantir a hipoalergenicidade do hidrolisado.

Um dos maiores desafios da concentração e fracionamento de peptídeos encontra-se na correta seleção do pH e da força iônica do meio para garantir a separação desejada. Isto porque com o uso de membranas com pequenos tamanhos de poros (1-2 kDa), as interações eletrostáticas tornam-se bastante significativas no desempenho do processo. Vários estudos buscam entender estes fenômenos, como no trabalho de Fernández e Riera (2013), que estudaram a influência da força iônica no fracionamento de peptídeos com membranas de poli(etersulfona) com massas molares de corte de 1kDa e 5 kDa. Os autores utilizaram como matéria-prima para o estudo a β -lactoglobulina bovina hidrolisada com tripsina até o percentual de hidrólise de 6,6 %. Foi observado que, nas condições de pH em que as interações eletrostáticas entre a membrana e os peptídeos não foram significativas, a adição de sal aumentou a transmissão de todos os peptídeos pela membrana, como resultado de uma redução do seu tamanho efetivo. No entanto, quando o efeito de carga foi o principal mecanismo responsável pelo processo de fracionamento, a combinação entre a redução tanto do raio do peptídeo quanto da densidade de carga da membrana afetou a transmissão de espécies catiônicas e aniônicas de forma distinta. Embora a transmissão de peptídeos carregados negativamente aumentou consideravelmente, a transmissão de solutos positivos foi fracamente afetada ou até mesmo diminuiu. Apesar dos bons fatores de separação entre peptídeos carregados observados sob condições de baixa força iônica, a seletividade do processo diminuiu quando se trabalhou com um teor elevado de sal. Além disso, o fator de separação entre peptídeos bioativos e não-bioativos diminuiu ligeiramente sob condições de força iônica elevada. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os peptídeos de proteínas do leite podem ser fracionados em diferentes pHs, alterando a força iônica da solução.

4.1.5 Considerações finais

A ultrafiltração e outras tecnologias de membranas estão dentre as principais técnicas físico-químicas e não destrutivas aplicadas para as etapas de separação de macro e micromoléculas, extração e isolamento/purificação de moléculas bioativas derivadas de recursos biológicos naturais de baixo valor agregado. Particularmente, muitas pesquisas buscam concentrar macromoléculas e liberar pequenas espécies no permeado. Este procedimento parece simples em teoria uma vez que as membranas são hábeis em separar compostos pelo mecanismo de exclusão molecular, baseado em suas massas molares. Entretanto, isto não acontece na prática, uma vez que a estrutura assimétrica dos poros da membrana nem sempre reflete a estreita faixa da massa molar de corte especificada. O efeito deste parâmetro é atenuado quando são consideradas a solubilidade dos solutos e a hidrofobicidade da superfície da membrana. Desta forma, a massa molar de corte não é uma barreira absoluta para a separação de macro e micromoléculas. (GALANAKIS, 2015).

Este trabalho apresentou estudos que vêm sendo realizados com o intuito de avaliar o desempenho da microfiltração e da ultrafiltração no processamento de amido, proteínas vegetais e hidrolisados proteicos vegetais. No processamento de amido foi possível observar que uma das vantagens mais interessantes do uso da microfiltração é na recuperação de amido do efluente industrial, diminuindo a carga orgânica do mesmo e as perdas do processo. Já no processamento de proteínas, a ultrafiltração é muito estudada já há várias décadas como substituta da precipitação isoelétrica, na concentração das proteínas. De fato esta operação permite um maior rendimento na recuperação proteica. Muitos autores ainda buscam a melhoria das propriedades funcionais das proteínas pela concentração com a ultrafiltração, mas os resultados mostram que são muito tênues os benefícios neste sentido.

Todavia, é na área de hidrolisados proteicos e peptídeos que o maior número de pesquisas vem se concentrando atualmente. Isto porque, as aplicações potenciais dos hidrolisados proteicos e peptídeos são muitas, tanto na indústria de alimentos quanto na indústria farmacêutica. A ultrafiltração oferece muitas oportunidades neste setor, pois ela permite o fracionamento e a concentração de peptídeos específicos mediante a seleção adequada da membrana, do meio e das condições de operação do sistema. Os mecanismos envolvidos neste processo são complexos e demandam a realização de cada vez mais estudos na área para a elucidação dos fenômenos e a melhoria da eficiência dos processos.

4.1.6 Referências

- AKBARI, A., WU, J. An integrated method of isolating napin and cruciferin from defatted canola meal. *LWT - Food Science and Technology*, v. 64(1), p. 308–315, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.046>
- ALASHI, A. M., BLANCHARD, C. L., MAILER, R. J., AGBOOLA, S. O., MAWSON, A. J., HE, R., ... ALUKO, R. E. Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry*, v. 146, p. 500–506, 2014. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.081>
- ALI, F., IPPERSIEL, D., LAMARCHE, F., MONDOR, M. Characterization of low-phytate soy protein isolates produced by membrane technologies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 11(1), p. 162–168, 2010. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.004>
- ALI, F., MONDOR, M., IPPERSIEL, D., LAMARCHE, F. Production of low-phytate soy protein isolate by membrane technologies: Impact of salt addition to the extract on the purification process. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 12(2), p. 171–177, 2011. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.01.013>
- ALIBHAI, Z., MONDOR, M., MORESOLI, C., IPPERSIEL, D., LAMARCHE, F. Production of soy protein concentrates/isolates: traditional and membrane technologies. *Desalination*, v. 191(1-3), p. 351–358, 2006. <http://doi.org/10.1016/j.desal.2005.05.026>
- ASPELUND, M. T., GLATZ, C. E. Purification of recombinant plant-made proteins from corn extracts by ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, v. 353(1-2), p. 103–110, 2010. <http://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.02.036>
- BEROT, S., POPINEAU, Y., COMPOINT, J. P., BLASSEL, C., CHAUFER, B. Ultrafiltration to fractionate wheat polypeptides. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, v. 753(1), p. 29–35, 2001. [http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00418-7](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00418-7)
- BOYE, J. I., AKSAY, S., ROUFIK, S., RIBÉREAU, S., MONDOR, M., FARNWORTH, E., RAJAMOHAMED, S. H. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, v. 43(2), o. 537–546, 2010. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>
- CANCINO, B., ROSSIER, F., ORELLANA, C. Corn starch waste water treatment with membrane technologies: pilot test. *Desalination*, v. 200(1-3), p. 750–751, 2006. <http://doi.org/10.1016/j.desal.2006.03.495>
- CASTEL, V., ANDRICH, O., NETTO, F. M., SANTIAGO, L. G., CARRARA, C. R. Comparison between isoelectric precipitation and ultrafiltration processes to obtain Amaranth mantegazzianus protein concentrates at pilot plant scale. *Journal of Food Engineering*, v. 112(4), p. 288–295, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.05.010>
- CHEW, P. G., CASEY, A. J., JOHNSON, S. K. Protein quality and physico-functionality of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* cv. Gungurru) protein concentrates prepared by isoelectric precipitation or ultrafiltration. *Food Chemistry*, v. 83, p. 575–583, 2003. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00156-0](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00156-0)
- DAS, R., BHATTACHERJEE, C., GHOSH, S. Effects of operating parameters and nature of

- fouling behavior in ultrafiltration of sesame protein hydrolysate. *Desalination*, v. 237(1-3), p. 268–276, 2009. <http://doi.org/10.1016/j.desal.2008.01.020>
- DRIOLI, E., STANKIEWICZ, A. I., MACEDONIO, F. Membrane engineering in process intensification – An overview. *Journal of Membrane Science*, v. 380(1-2), p. 1–8, 2011. <http://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.06.043>
- FERNÁNDEZ, A., RIERA, F. A. Influence of ionic strength on peptide membrane fractionation. *Separation and Purification Technology*, v. 119, p. 129–135, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.09.012>
- GALANAKIS, C. M. Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration. *Trends in Food Science & Technology*, v. 42(1), p. 44–63, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.005>
- HE, R., ALASHI, A., MALOMO, S. A., GIRGIH, A. T., CHAO, D., JU, X., ALUKO, R. E. Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. *Food Chemistry*, v. 141(1), p. 153–159, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.087>
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., DEL MAR CONTRERAS, M., RECIO, I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 165(1), p. 23–35, 2011. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2010.11.001>
- KIM, H. J., KIM, B. K. Comparison of soy protein concentrates produced using membrane ultrafiltration and acid precipitation. *Food Science and Biotechnology*, v. 24(1), p. 67–73, 2015. <http://doi.org/10.1007/s10068-015-0011-5>
- KRISHNA KUMAR, N. S., YEA, M. K., CHERYAN, M. Ultrafiltration of soy protein concentrate: Performance and modelling of spiral and tubular polymeric modules. *Journal of Membrane Science*, v. 244, p. 235–242, 2004. <http://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.06.056>
- KUMAR, N. S. K., YEA, M. K., CHERYAN, M. Soy Protein Concentrates by Ultrafiltration. *Journal of Food Science*, v. 68(7), p. 2278–2283, 2003. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05759.x>
- LAI, Y. P., MONDOR, M., MORESOLI, C., DROLET, H., GROS-LOUIS, M., IPPERSIEL, D., ... ARCAND, Y. Production of soy protein isolates with low phytic acid content by membrane technologies: Impact of the extraction and ultrafiltration/diafiltration conditions. *Journal of Food Engineering*, v. 114(2), p. 221–227, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.012>
- LECORRE, D., BRAS, J., DUFRESNE, A. Ceramic membrane filtration for isolating starch nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, p. 1565–1572, 2011. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.064>
- LIPNIZKI, F. Cross-Flow Membrane Applications in the Food Industry. In K.-V. PEINEMANN, S. P. NUNES, L. GIORNO (Eds.), *Membrane Technology, Volume 3: Membranes for Food Applications* (Vol. 3, pp. 1–24). Wiley-VCH, 2010.
- MALOMO, S. A., ALUKO, R. E. Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 31, p. 151–159, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.08.004>

- MERZ, M., KETTNER, L., LANGOLF, E., APPEL, D., BLANK, I., STRESSLER, T., FISCHER, L. Production of wheat gluten hydrolysates with reduced antigenicity employing enzymatic hydrolysis combined with downstream unit operations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (October), n/a-n/a, 2015. <http://doi.org/10.1002/jsfa.7515>
- MIDDLEWOOD, P. G.; CARSON, J. K. Extraction of amaranth starch from an aqueous medium using microfiltration: Membrane characterization. *Journal of Membrane Science*, v. 405-406, p. 284-290, 2012a.
- MIDDLEWOOD, P. G., CARSON, J. K. Extraction of amaranth starch from an aqueous medium using microfiltration: Membrane fouling and cleaning. *Journal of Membrane Science*, v. 411-412, p. 22-29, 2012b. <http://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.04.008>
- MONDOR, M. Production of value-added soy protein products by membrane-based operations. In DRIOLI, A. C. (Ed.). *Integrated Membrane Operations: In the Food Production*. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH, 2014.
- MONDOR, M., AKSAY, S., DROLET, H., ROUFIK, S., FARNWORTH, E., BOYE, J. I. Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 10(3), p. 342-347, 2009. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.01.007>
- MONDOR, M., ALI, F., IPPERSIEL, D., LAMARCHE, F. Impact of ultrafiltration/ diafiltration sequence on the production of soy protein isolate by membrane technologies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 11(3), p. 491-497, 2010. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.02.002>
- MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry*, v. 41(2), p. 447-456, 2006. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.014>
- OKUBO, K.; WALDROP, A. B.; IACOBUCCI, G. A.; MYERS, D. V. Preparation of low-phytate soybean protein isolate and concentrate by ultrafiltration. *American Association of Cereal Chemists*, v. 52, p. 263-271, 1975.
- PARAMAN, I., HETTIARACHCHY, N. S., SCHAEFER, C. Preparation of Rice Endosperm Protein Isolate by Alkali Extraction. *Cereal Chemistry*, v. 85(1), p. 76-81, 2008. <http://doi.org/10.1094/CCHEM-85-1-0076>
- POPINEAU, Y., HUCHET, B., LARRÉ, C., BÉROT, S. Foaming and Emulsifying Properties of Fractions of Gluten Peptides Obtained by Limited Enzymatic Hydrolysis and Ultrafiltration. *Journal of Cereal Science*, v. 35(3), p. 327-335, 2002. <http://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0437>
- RANAMUKHAARACHCHI, S., MEISSNER, L., MORESOLI, C. Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, v. 429, p. 81-87, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.040>
- RAO, A., SHALLO, H. E., ERICSON, A. P., THOMAS, R. L. Characterization of soy protein concentrate produced by membrane ultrafiltration. *Journal of Food Science*, v. 67(4), p. 1412-1418, 2002. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10299.x>
- RAUSCH, K. D. Front end to backpipe: Membrane technology in the starch processing industry. *Starch/Stärke*, v. 54, p. 273-284, 2002.

- ROBLET, C., AMIOT, J., LAVIGNE, C., MARETTE, A., LESSARD, M., JEAN, J., ... BAZINET, L. Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes. *Food Research International*, v. 46(1), p. 237-249, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.014>
- SAIDI, S., DERATANI, A., BELLEVILLE, M.-P., AMAR, R. BEN. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International*, v. 65, p. 453-461, 2014. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.026>
- SHUKLA, R., TANDON, R., NGUYEN, M., CHERYAN, M. Microfiltration of starch suspensions using a tubular stainless steel membrane. *Membrane Technology*, v. 120, p. 5-8, 2000.
- TSOU, M. J., LIN, S. BIN, CHAO, C. H., CHIANG, W. D. Enhancing the lipolysis-stimulating activity of soy protein using limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration. *Food Chemistry*, v. 134(3), p. 1564-1570, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.093>
- VANDANJON, L., JOHANNSSON, R., DEROUINIOT, M., BOURSEAU, P., JAOUEN, P. Concentration and purification of blue whiting peptide hydrolysates by membrane processes. *Journal of Food Engineering*, v. 83(4), p. 581-589, 2007. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.03.040>
- WANG, J., ZHAO, M., YANG, X., JIANG, Y. Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Journal of Cereal Science*, v. 44(1), p. 93-100, 2006. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.04.002>
- WOJCIECH, B.; CELINSKA, E.; DEMBCZYNSKI, R.; SZYMANOWSKA, D.; NOWACKA, M.; JESIONOWSKI, T.; GRAJEK, W. A Cross-flow microfiltration of fermentation broth containing native corn starch. *Journal of Membrane Science*, v. 427, p. 118-128, 2013.
- WU, W. U., HETTIARACHCHY, N. S., QI, M. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, p. 845-850, 1998. <http://doi.org/10.1007/s11746-998-0235-0>
- YANG, J., GUO, J., YANG, X.-Q., WU, N.-N., ZHANG, J.-B., HOU, J.-J., ... XIAO, W.-K. A novel soy protein isolate prepared from soy protein concentrate using jet-cooking combined with enzyme-assisted ultra-filtration. *Journal of Food Engineering*, v. 143, p. 25-32, 2014. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.031>
- ZANG, W.; GRIMI, N.; JAFFRIN, M. Y.; DING, L. Leaf protein concentration of alfalfa juice by membrane technology. *Journal of Membrane Science*, v. 489, p. 183-193, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2015.03.092>
- ZHOU, K., SUN, S., CANNING, C. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Food Chemistry*, v. 135(3), p. 1192-1197, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.063>
- ZWIJNENBERG, H. J., KEMPERMAN, A. J. B., BOERRIGTER, M. E., LOTZ, M., DIJKSTERHUIS, J. F., POULSEN, P. E., KOOPS, G. H. Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination*, v. 144, p. 331-334, 2002. [http://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00338-7](http://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00338-7)

4.2 Questões de pesquisa

Com base no estudo apresentado nesta revisão da literatura, foram elaboradas outras questões de pesquisa a partir de lacunas identificadas e que serão respondidas nesta tese.

- 6) A aplicação da microfiltração foi testada em alguns estudos que buscaram a recuperação do amido na corrente de concentrado e as proteínas na corrente de permeado. Os autores sugeriram o uso de membranas com poros maiores para diminuir a retenção de proteína. À luz de nosso conhecimento, não foi relatada na literatura até o momento a aplicação da microfiltração na recuperação do amido de arroz extraído pelo método alcalino. A microfiltração pode ser utilizada na recuperação deste amido na corrente de concentrado e na recuperação das proteínas no permeado, se for utilizada uma membrana com poros maiores do que os relatados?
- 7) Foi sugerido que a presença de amido gelatinizado na suspensão pode acarretar a formação de incrustações durante a microfiltração. Um pré-tratamento enzimático seria eficaz na sua redução?
- 8) É possível realizar a purificação do amido de arroz com diafiltrações durante a microfiltração?
- 9) A ultrafiltração pode ser empregada na concentração e purificação de hidrolisado proteico solúvel de arroz? Qual o rendimento da operação? Que grau de purificação pode ser alcançado?

Capítulo 5

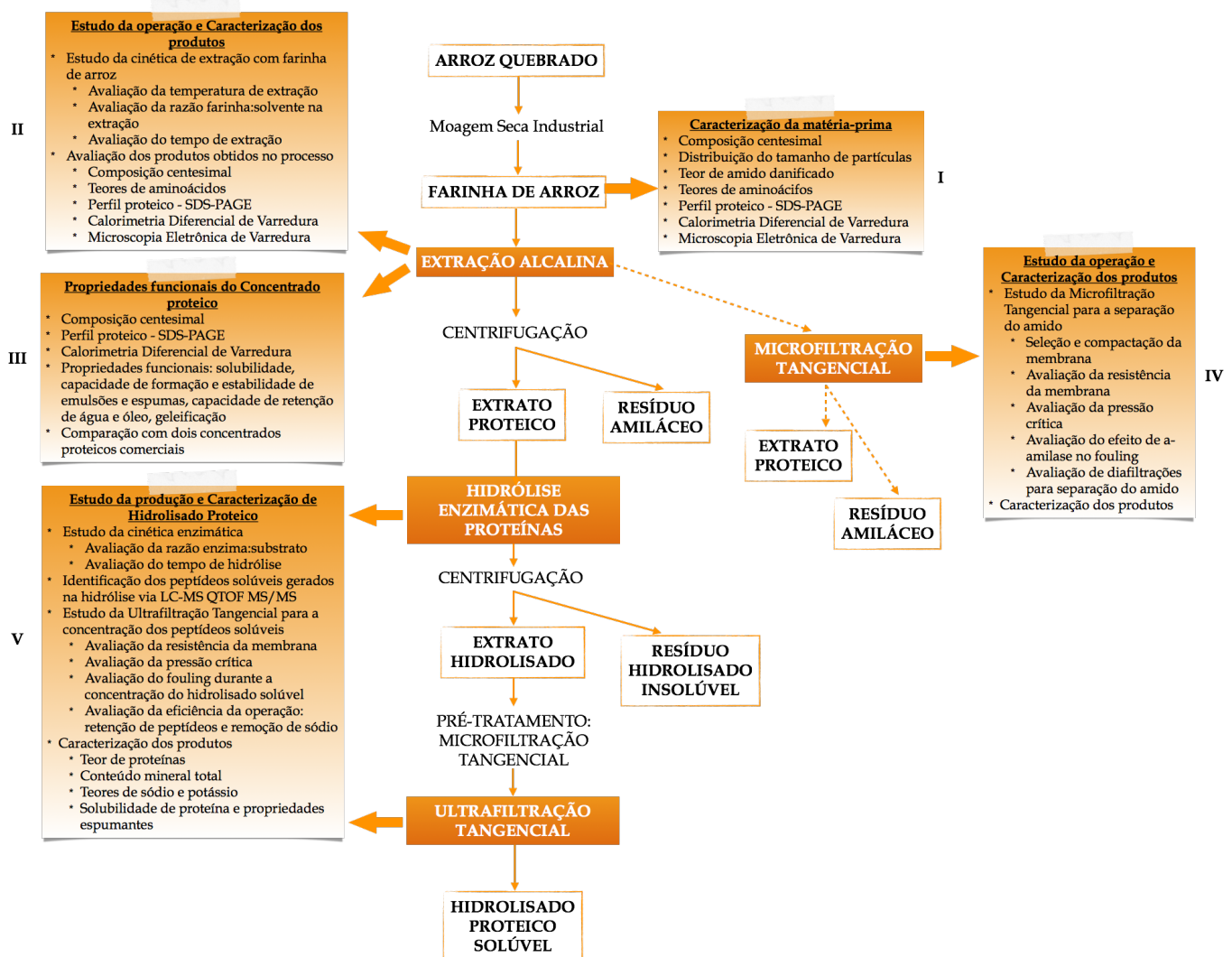
Metodologia

Este capítulo apresenta a metodologia empregada na presente tese. Os estudos realizados em escala de bancada, foram conduzido nos laboratórios do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, Rio Grande do Sul; e do Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor) da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), em São Leopoldo, Rio Grande do Sul. Além disso, alguns experimentos foram realizados nos Laboratórios de Química e Análise de Alimentos da UNISINOS, no Instituto Tecnológico em Ensaios e Segurança Funcional (itt Fuse) da UNISINOS, no Laboratório de Materiais Cerâmicos (LACER) da UFRGS e no CBO Análises Laboratoriais, em Campinas, São Paulo.

O fluxograma de blocos apresentado na Figura 5.1 apresenta o desenho completo desta pesquisa. A matéria-prima utilizada foi farinha de arroz proveniente de arroz quebrado derivado do processamento industrial de arroz polido. Na primeira etapa foi realizada a caracterização desta matéria-prima (Bloco I). Em seguida, foi realizado o estudo da operação de extração alcalina do amido e das proteínas de endosperma de arroz (Bloco II). Este estudo compreendeu a avaliação da cinética de extração em diferentes temperaturas e com diferentes razões solvente:sólido, visando identificar a razão de solvente:sólido indicada e o tempo mínimo de contato necessário para a extração das proteínas. Além disso, os produtos obtidos no processo desenvolvido foram caracterizados. O terceiro estudo (Bloco III) compreendeu a caracterização das propriedades funcionais do concentrado de proteínas de endosperma de arroz obtido via extração alcalina, em comparação com dois concentrados proteicos de arroz obtidos no mercado internacional, tendo em vista a aplicação deste produto como um ingrediente para a indústria de alimentos. A quarta fase deste estudo (Bloco IV) buscou avaliar a aplicabilidade da microfiltração

tangencial na separação do amido e das proteínas do extrato alcalino. Na quinta fase da pesquisa (Bloco V) foi proposto um método de produção de um hidrolisado proteico de endosperma de arroz de elevada solubilidade, a partir do extrato proteico obtido na extração alcalina. Nesse trabalho inicialmente estudou-se a cinética de hidrólise enzimática da proteína de endosperma de arroz. Em seguida foi estudada a aplicação da ultrafiltração tangencial na concentração e purificação do produto solúvel da hidrólise. Por fim, o hidrolisado proteico foi caracterizado.

Figura 5.1: Fluxograma de blocos com o desenho completo do presente estudo.



A seguir são detalhados os métodos empregados na realização de todas as atividades desenvolvidas ao longo deste estudo, com a função de trazer a descrição dos mesmos com um maior detalhamento, inclusive com fotografias de alguns dos experimentos realizados.

5.1 Materiais

A matéria-prima utilizada em todo o estudo foi farinha de arroz obtida pelo processo industrial de moagem a seco do arroz quebrado. A farinha (50 kg) foi gentilmente cedida por uma grande indústria arroseira do Rio Grande do Sul. Na obtenção da farinha, o arroz quebrado foi moído e não passou por nenhum tratamento térmico (que industrialmente é realizado para a inativação de enzimas e aumento do seu *shelf life*). Após sua produção, o produto foi imediatamente enviado ao laboratório, onde foi fracionado em porções de 5 kg e armazenado em freezer a -18 °C, sendo retiradas as quantidades necessárias para a realização dos experimentos.

O grau dos reagentes utilizados na realização das análises é indicado ao longo deste capítulo, na descrição dos métodos empregados.

5.2 Caracterização da Matéria-prima

A farinha de arroz foi caracterizada em termos de sua composição centesimal, distribuição de tamanho de partículas, teor de amido danificado, teor de aminoácidos, eletroforese SDS-PAGE, calorimetria diferencial de varredura e microscopia eletrônica de varredura, conforme descrito nesta seção.

5.2.1 Caracterização centesimal

Para a caracterização centesimal, a umidade foi determinada pelo método direto de secagem em estufa a 105°C (AOAC 935.29), o resíduo mineral total foi determinado por incineração em forno mufla a 550 °C (AOAC 923.03), o teor de lipídeos foi determinado por extração em Soxhlet (AOAC 920.85) e o teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl modificado (AOAC 2001.11) (N_x5,95). O teor total de carboidratos foi calculado por diferença, a partir do conhecimento dos teores dos demais constituintes (umidade, proteína, cinzas e lipídeos). Os teores de sódio e potássio foram determinados por fotometria de emissão de chama (Digimed, DM-61, São Paulo, Brasil) (AOAC 969.23) (Instituto Adolfo Lutz, 2008; AOAC, 1997; AOAC, 2002). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

5.2.2 Distribuição do tamanho de partículas

A distribuição do tamanho de partículas da farinha de arroz foi avaliada pela técnica de difração laser, que analisa as distribuições de tamanho das partículas por medição da variação angular na intensidade da luz difundida à medida que um feixe de laser interage com as partículas dispersas da amostra (CILAS 1180 Liquid, CILAS, Orleans, França).

5.2.3 Teor de amido danificado

O teor de amido danificado foi determinado pelo método descrito por Boyacı, Williams e Köksel (2004), em triplicata. Este método é baseado no fato de que a diferença entre o teor de sólidos solúveis de extratos preparados a partir da mesma farinha com e sem alfa-amilase é decorrente da ação da enzima em amido oriundo de grânulos danificados. O estágio de extração do método é similar ao do método oficial AACC 76-30A. Entretanto, depois da extração, um refratômetro (Abbe 0767B, Quimis, São Paulo, Brasil) foi usado para a medição do teor de sólidos solúveis das soluções, ao invés da determinação de açúcares redutores, realizada no método AACC. A alfa-amilase de *Aspergillus oryzae* utilizada neste estudo foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

5.2.4 Teores de aminoácidos

O método para determinação de aminoácidos foi o de derivatização com fenil-isotiocianato (PITC) dos produtos liberados por hidrólise ácida, seguidos por análise da mistura por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As proteínas da amostra foram hidrolisadas por 24 horas a 110 °C com HCl 6 M bidestilado e 0,3 % de fenol. Uma alíquota do padrão interno ácido α -aminobutírico foi adicionado à amostra hidrolisada. Os aminoácidos liberados pela hidrólise ácida foram submetidos à reação com PITC, de acordo com Hagen, Frost e Augustin (1989), separados por HPLC em fase reversa usando a coluna LUNA C18 (100Å, 5 μ m 250 x 4.6 mm, Código 00G-4252-EQ) (loop de injeção de 30 μ L, pH 6,40, com um gradiente de fluxo binário linear de 1 mL min⁻¹, à temperatura de 58 °C, com o eluente A sendo tampão acetato de sódio a 0,14 M, acetonitrila e trietilamina e o eluente B uma solução 6:4 de acetonitrila e água milli-Q) e quantificados com detector UV a 254 nm. A quantificação foi realizada por calibração

multinível usando o ácido α -aminobutírico como padrão interno, conforme descrito por White, Hart e Fry (1986). Os reagentes utilizados eram de grau HPLC. Para a quantificação do triptofano foi usado o método espectrofotométrico. No ensaio, a amostra, diluída em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,5) foi adicionada de 0,1 % de solução de pronase, o sistema foi incubado a 45 °C por 24 horas e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. A 1 mL do sobrenadante foram adicionados 9 mL de 4-dimetilamino-benzaldeído a 0,33 %, o sistema foi agitado e mantido à temperatura ambiente no escuro por 6 horas. Então, foram adicionados 0,1 mL de NaNO₂ a 0,045 %, e após 30 minutos (no escuro) a absorvância do complexo corado foi lida a 590 nm. A quantificação foi realizada usando L-triptofano como um padrão externo. Os ensaios foram realizados em duplicata para a amostra de farinha de arroz. Os reagentes utilizados eram de grau analítico.

5.2.5 Perfil proteico – SDS-PAGE

O perfil proteico da amostra foi analisado via SDS-PAGE usando um gel de acrilamida a 15 %. A preparação da amostra seguiu o procedimento descrito por Kumagai *et al.* (2006), o qual utilizou uma solução de SDS-ureia para a extração das proteínas. Esta solução era composta por ureia 8 M, dodecil-sulfato de sódio a 2 %, β -mercaptoetanol a 5 % e sacarose a 10 % em um tampão Tris-HCl 50 mM (pH 6,8). A amostra (1 mg de proteína) foi misturada com 1 mL de solução SDS-ureia e aquecida a 100 °C por 10 minutos. Após centrifugação a 3000 x g por 10 minutos, 5 μ L de azul de bromofenol foram adicionados a 15 μ L do sobrenadante. 10 μ L da mistura foram inseridos em cada poço. O ensaio foi realizado usando o sistema de eletroforese vertical MiniVE (GE Healthcare Bio-Science, Richmond, EUA) com gel de acrilamida de suporte a 3 % e gel de separação a 15 % em Tris-HCl a 25 mM, pH 8,3, glicina a 0,18 M e SDS a 0,1 % (Laemmli, 1970). A separação foi realizada usando uma fonte de eletroforese (EPS 601) ajustada a 100 V/gel para o gel de suporte e 120 V/gel para o gel de separação. O gel foi corado com solução de azul brilhante de coomassie R 250. As massas molares foram estimadas por comparação com o padrão SeeBlue® Pre-Stained (Novex, Life Technologies). Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

5.2.6 Análise térmica

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma técnica que permite o estudo das

transições térmicas de primeira e segunda ordem em proteínas, carboidratos e lipídeos, e fornece informações sobre os efeitos físicos e químicos energéticos, incluindo desnaturação, cristalização, gelatinização, transição vítrea, ou outras reações. (JU *et al.*, 2001). As medições de calorimetria diferencial de varredura foram realizadas em um calorímetro DSC 6000 (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, EUA), em duplicata. O instrumento foi calibrado com índio. Suspensões de 10 % de cada amostra foram preparadas em água destilada. Então, 7-10 mg de cada suspensão foram colocadas em panelinhas de alumínio de 20 μ L. As panelinhas foram mantidas à temperatura ambiente por algumas horas antes de serem aquecidas no calorímetro. As panelinhas seladas foram aquecidas de 30 a 100 °C a uma taxa de 10 °C min⁻¹, com uma panelinha vazia como referência.

5.2.7 Análises Morfológicas

A análise morfológica das amostras é fundamental para avaliar principalmente as características das frações de amido obtidas experimentalmente. A morfologia dos grãos de amido é bastante típica e útil na identificação de sua fonte botânica. As micrografias da amostra foram registradas usando o microscópio eletrônico de varredura EVO LS 15 (ZEISS, Birkerød, Dinamarca). A amostra seca (mantida em dessecador por no mínimo 72 horas) foi depositada em um *stub* de cobre usando uma fita adesiva dupla-face e recoberta com ouro em um vaporizador a vácuo. As observações foram realizadas no modo de elétrons secundários a 15,0 kV.

5.3 Estudo da extração alcalina e caracterização dos produtos

O processo alcalino foi escolhido como método de extração neste estudo por ser esta a técnica tradicional de obtenção de amido e proteína de arroz, largamente aplicado internacionalmente para a fabricação destes produtos; é uma tecnologia de baixo custo e alta eficiência que permite a obtenção de amido de arroz de alta pureza e concentrado proteico de arroz. Além disso, esta tecnologia é atualmente empregada no Brasil para a produção de isolados e concentrados proteicos de soja.

O método tradicional de extração alcalina do amido e de proteínas de arroz requer cerca de 24 a 48 horas de operação, uma vez que se utiliza o arroz quebrado como matéria-prima. Este longo tempo de contato entre a matéria-prima e o meio alcalino acarreta uma série de reações

indesejadas, tais como gelatinização a frio do amido, perda de aminoácidos essenciais e formação de compostos tóxicos, tais como lisinoalanina. Desta forma, com este estudo buscou-se estudar a extração alcalina utilizando farinha de arroz como matéria-prima, o que permite a minimização do tempo de contato entre a matéria-prima e o meio alcalino. No trabalho foi avaliada a cinética de extração e as características dos produtos obtidos com este processo.

5.3.1 Extração alcalina

Inicialmente realizou-se um trabalho de avaliação das condições operacionais mais influentes nesta operação unitária, tendo em vista a obtenção de máximo rendimento na extração a partir de farinha de arroz. Durante os experimentos, buscou-se trabalhar com condições operacionais que minimizassem a degradação das propriedades funcionais e nutricionais dos produtos. Assim, foi estudada a cinética e a razão solvente:sólido mínima necessária para a extração alcalina, utilizando NaOH 0,18 % como solvente e a farinha de arroz como matéria-prima, em apenas um estágio de extração. Foram avaliados os comportamentos da extração alcalina a 20 °C com razão solvente:sólido 4:1, 8:1, 12:1, 16:1 e 20:1 e a 30 °C com razão solvente:sólido de 10:1, 15:1, 20:1 e 25:1. Em cada experimento, o solvente foi aquecido à temperatura da extração em um béquer, a farinha de arroz foi adicionada e o meio foi mantido sob agitação em um banho termostático acoplado a uma mesa de agitação magnética (Multistirrer, Velp Scientifica, Usmate, Itália). A cinética de extração das proteínas foi estudada através da tomada de amostras da suspensão nos instantes de tempo de 15, 30, 45 e 60 minutos de extração. Após cada amostragem, a suspensão era filtrada sob pressão reduzida para a separação do resíduo amiláceo, e o teor de proteína no extrato proteico era determinado utilizando o método de Lowry, usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Após a identificação das condições operacionais que permitiam uma rápida extração e com o máximo de rendimento, um processo completo de extração e separação das amostras foi conduzido com o objetivo de ser realizada a caracterização química, morfológica e térmica dos produtos, com o propósito de elucidar os efeitos da técnica de extração empregada nas características dos produtos obtidos.

No experimento, 1500 mL de NaOH 0,18 % foram aquecidos a 30 °C em um banho térmico acoplado a uma mesa de agitação magnética. Então, 100 g de farinha de arroz foram adicionados ao solvente e o sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos a 30 °C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3380 x g por 5 minutos. O extrato proteico foi separado. O resíduo

amiláceo foi lavado uma vez com 250 mL de NaOH 0,18 % e centrifugado a 3380 x g por 5 minutos. O extrato de lavagem foi adicionado ao extrato proteico obtido previamente.

No final da centrifugação foi observada a existência de duas camadas no resíduo amiláceo, uma camada superior com textura cremosa, similar a um gel, e uma camada inferior com uma aparência de amido úmido, conforme pode ser observado na Figura 5.2. Amostras das duas camadas foram coletadas separadamente e submetidas à secagem para posterior caracterização, sendo doravante denominadas de resíduo da camada superior (ULR - *upper layer residue*) e resíduo da camada inferior (LLR - *lower layer residue*). O resíduo amiláceo integral, formado pela união destas duas camadas, foi neutralizado a pH 7,0 com 30 mL de HCl 0,1 M e submetido à secagem, sendo doravante denominado de resíduo amiláceo integral (WSR - *whole starchy residue*). As proteínas do extrato proteico foram precipitadas no ponto isoelétrico (pH 4,8, JU; HETTIARACHCHY; RATH, 2001) com 48 mL de HCl 0,1 M. Depois de centrifugado a 3380 x g por 5 minutos, o concentrado proteico foi neutralizado a pH 7,0 (com 8 mL de NaOH 0,1 M) e seco, sendo doravante denominado de concentrado proteico precipitado no ponto isoelétrico (IPPC - *isoelectric precipitate protein concentrate*). A secagem das amostras ocorreu a 28 ± 2 °C em uma estufa de circulação de ar (320-SE, Fanem, São Paulo, Brazil), por 36 horas. No final da operação de secagem, foram obtidos $84,5 \pm 0,4$ g de WSR e $4,98 \pm 0,08$ g de IPPC.

Figura 5.2: Fotografia do resíduo obtido na centrifugação, onde é possível observar a aparência do resíduo da camada superior (ULR) e do resíduo da camada inferior (LLR). O resíduo amiláceo integral (WSR) consiste na mistura destes dois produtos.



Para melhor entender a composição química da amostra ULR, foi conduzido um segundo experimento de extração nas mesmas condições descritas. Entretanto, depois da centrifugação para remover o extrato proteico, toda a fração ULR foi coletada, neutralizada a pH 7,0 e submetida à caracterização descrita a seguir. Foram determinados o teor de umidade, por secagem direta em estufa a 105 °C, o teor de proteína, pelo método de micro Kjeldahl (N_x5,95) e o conteúdo de amido desta amostra, pelo método descrito por Xiao, Storms e Tsang (2006). Neste ensaio, 50 µL da amostra foram misturados com 100 µL de solução de iodo-iodeto (I₂ 5 mM e KI 50 mM). Após o desenvolvimento de cor, 150 µL da mistura foram transferidos para uma microplaca com 96 poços e a absorvância foi medida a 580 nm utilizando um leitor de microplacas (Spectramax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). A quantificação foi realizada utilizando amido (grau analítico) com padrão externo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

5.3.2 Caracterização dos produtos

Os principais produtos obtidos no processo foram o concentrado proteico precipitado no ponto isoelétrico (IPPC), o resíduo amiláceo integral (WSR). Além deles, também foram estudadas algumas características das do resíduos da camada superior e inferior (ULR e LLR). Os ensaios de caracterização realizados nestas amostras são apresentados no Quadro 5.1.

Quadro 5.1: Relação dos ensaios de caracterização realizados nos produtos obtidos no processo em estudo; indicação do método empregado e do número de replicatas.

Amostra	Ensaio realizado	Método	Número de replicatas
IPPC	Composição centesimal	Seção 5.2.1*	Triplicata
	Teores de aminoácidos	Seção 5.2.4	Triplicata
	Perfil proteico - SDS-PAGE	Seção 5.2.5	Uma via
	Calorimetria diferencial de varredura	Seção 5.2.6	Duplicata
	Microscopia eletrônica de varredura	Seção 5.2.7	-
WSR	Composição centesimal	Seção 5.2.1	Triplicata
	Calorimetria diferencial de varredura	Seção 5.2.6	Duplicata
	Microscopia eletrônica de varredura	Seção 5.2.7	-
ULR	Teores de umidade, proteínas e amido.	Seção 5.3.1	Triplicata
	Calorimetria diferencial de varredura	Seção 5.2.6	Duplicata
	Microscopia eletrônica de varredura	Seção 5.2.7	-
LLR	Calorimetria diferencial de varredura	Seção 5.2.6	Duplicata
	Microscopia eletrônica de varredura	Seção 5.2.7	-

* Seção deste trabalho onde é realizada a descrição do método empregado.

5.4 Propriedades funcionais do concentrado proteico

Na terceira fase deste estudo foram determinadas as propriedades funcionais do concentrado proteico obtido no método de extração alcalina, buscando identificar as aplicações potenciais do mesmo como um ingrediente na indústria de alimentos (Figura 5.1, Bloco III). Nesse trabalho realizou-se uma comparação das propriedades funcionais solubilidade, capacidade de absorção de óleo e água, capacidade de formar gel, potencial emulsificante, estabilidade da emulsão, potencial de formação de espuma e estabilidade da espuma do produto gerado a partir do método de extração alcalina com as propriedades de dois concentrados proteicos de arroz comerciais. Os mesmos foram importados dos Estados Unidos, uma vez que este tipo de produto não era comercializado, na época, no Brasil. Segundo informações dos fabricantes, estes produtos foram obtidos a partir de arroz integral, utilizando a extração enzimática com amilases, que degradaram o amido de arroz, gerando produtos ricos em oligossacarídeos, e concentrados proteicos de arroz.

O concentrado proteico foi obtido a partir do método descrito previamente (Seção 5.3.1). Esta amostra, assim como as duas amostras comerciais, foram caracterizadas mediante a realização dos ensaios apresentados no Quadro 5.2.

Quadro 5.2: Relação dos ensaios de caracterização realizados nos concentrados proteicos avaliados neste estudo.

Ensaio realizado	Método	Número de replicatas
Teores de umidade e proteína total	Seção 5.2.1*	Triplicata
Perfil proteico - SDS-PAGE	Seção 5.2.5	Uma via
Calorimetria diferencial de varredura	Seção 5.2.6**	Duplicata

* Seção deste trabalho onde é realizada a descrição do método empregado.

** As amostras deste trabalho foram aquecidas de 35 a 110 °C, a uma taxa de 10 °C min⁻¹.

5.4.1 Propriedades funcionais

As propriedades funcionais dos concentrados proteicos foram avaliadas em triplicata na faixa de pH de 1 a 11. As amostras foram dispersas em diferentes soluções tampão, preparadas de acordo com Morita e Assumpção (1990), com reagentes de grau analítico. Para o pH 1, tampão

Clark e Lubs (ácido clorídrico 0,2 M e cloreto de potássio 0,2 M); na faixa de pH de 2 a 8, tampão McIlcaine (fosfato de sódio 0,1 M e ácido cítrico 0,1 M); para pH 9, tampão bicarbonato de sódio 0,1 M e carbonato de sódio 0,1 M; para pH 11, tampão Kolthoff (carbonato de sódio 0,1 M e ácido clorídrico 0,1 M).

Solubilidade: determinada de acordo com Bera e Mukherjee (1989) com algumas modificações. Foram preparados 5 mL de suspensões contendo 1 % (m/v) de cada amostra nos pHs 1 a 11. As suspensões foram homogeneizadas com auxílio de um agitador tipo vortex (MA 162, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 4000 rpm por 5 minutos e então centrifugadas (Combi 514 R, Hanil, Gwangju, Coréia do Sul) a 4000 x g por 30 minutos. Alíquotas dos sobrenadantes foram coletadas e o teor de proteína solúvel foi dosado pelo método de Lowry. O conteúdo total de proteína nas amostras foi determinado pelo método de Kjeldahl modificado (Nx5,95) (AOAC 2001.11). A solubilidade de proteína (SP, %) foi calculada de acordo com a Equação 5.1.

$$SP (\%) = \frac{PS}{PT} * 100 \quad (5.1)$$

onde PS é a quantidade de proteína solúvel e PT é a quantidade de total de proteína da amostra.

Capacidade de retenção de água e óleo: determinada de acordo com Sathe e Salunke (1981) com algumas modificações. Amostras de 0,125 g de cada concentrado proteico foram misturadas com 5 g de água destilada ou óleo de soja (Leve, IMCOPA, Paraná, Brasil). As suspensões foram agitadas ocasionalmente com um bastão de vidro por 30 minutos e então centrifugadas (Combi 514 R, Hanil, Gwangju, Coréia do Sul) a 3000 x g por 30 minutos. Os *pellets* foram drenados por 30 minutos e então a massa do líquido drenado foi medida. As capacidades de retenção de água e de óleo (CRA e CRO, g g⁻¹) foram calculadas de acordo com a Equação 5.2.

$$CRA \text{ ou } CRO (g g^{-1}) = \frac{\text{massa inicial da amostra} + (\text{massa de água ou óleo adicionada} - \text{massa drenada})}{\text{massa inicial da amostra}} \quad (5.2)$$

Geleificação: determinada de acordo com Agboola, Ng e Mills (2005) como a concentração mínima de proteína necessária para a formação de gel, com algumas modificações. As amostras foram suspensas nas soluções tampão (pH 3, 5, 7 e 9) nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 %. As suspensões foram agitadas em agitador tipo vortex (MA 162, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 4000 rpm por 5 minutos. Então, as amostras foram aquecidas em banho térmico a 90 °C por 30 minutos e resfriadas por 24 horas a 5 °C. Após, os tubos foram invertidos. A menor concentração proteica na qual o gel foi formado era considerada como a concentração mínima de geleificação.

Atividade emulsificante: o índice de atividade emulsificante (EA - *emulsion activity*) e o índice de estabilidade da emulsão (ES, % - *emulsion stability*) foram determinados pelo método turbidimétrico descrito por Pearce e Kinsella (1978) com algumas modificações. Suspensões a 0,1 % das amostras foram preparados em 18 mL das soluções tampão (pH 3, 5, 7, 9 e 11). Óleo de soja (6 mL) (Leve, IMCOPA, Paraná, Brasil) foi adicionado às suspensões. Então os sistemas foram homogeneizados com auxílio de um agitador tipo vortex (MA 162, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 4000 rpm por 1 minuto para a produção das emulsões. 50 µL de cada emulsão foram pipetados do fundo dos frascos a 0 e 10 minutos após a produção das emulsões e foram misturados com 5 mL de solução de dodecil sulfato de sódio (grau analítico) a 0,1 %. A absorvância das emulsões foi medida a 500 nm (Femto 482, Brasil). A absorvância medida imediatamente após a formação das emulsões foi expressa como o índice de atividade emulsificante, como descrito por Paraman *et al.* (2008). O índice de estabilidade da emulsão foi calculado com auxílio da Equação 5.3.

$$ES(\%) = \frac{\text{Absorvância inicial} * \text{intervalo de tempo (10 minutos)}}{\text{Alteração da absorvância ao longo do intervalo de tempo}} \quad (5.3)$$

Capacidade de formação de espuma e estabilidade da espuma: determinadas de acordo com Zhang, Zhang, Wang e Guo (2012) com algumas modificações. Suspensões a 1 % (m/v) das amostras foram preparados em 5 mL das soluções tampão (pH 3, 5, 7, 9 e 11). As suspensões foram agitadas em agitador tipo vortex (MA 162, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 4000 rpm por 1 minuto. Então, o volume após a agitação foi lido, e a Capacidade de formação de espuma (FC, % - *foaming capacity*) foi calculada com o uso da Equação 5.4.

$$FC(\%) = \frac{\text{volume após agitação} - \text{volume antes da agitação}}{\text{volume antes da agitação}} \quad (5.4)$$

A estabilidade da espuma (FE, % - *foam stability*) foi avaliada após 30 minutos de formação da espuma, e calculada com o uso da Equação 5.5.

$$FE(\%) = \frac{\text{volume após repouso} - \text{volume antes da agitação}}{\text{volume depois da agitação} - \text{volume antes da agitação}} \quad (5.5)$$

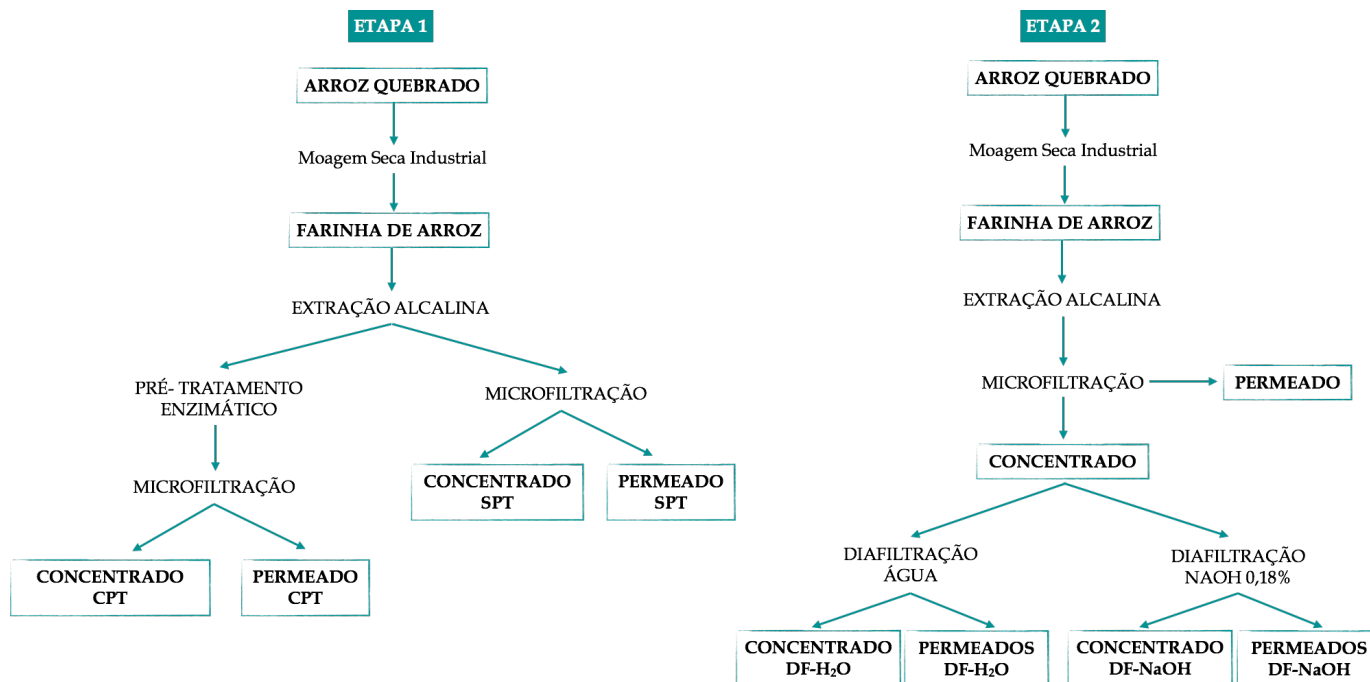
5.5 Estudo da microfiltração e caracterização dos produtos

Na quarta fase deste estudo (Figura 5.1, Bloco IV) o extrato obtido a partir do método rápido de extração alcalina de amido e proteína de arroz foi fracionado através da microfiltração combinando os modos de operação batelada e diafiltração para realizar a lavagem do concentrado, obtendo-se um amido de maior pureza e uma corrente de permeado contendo a proteína. Este trabalho buscou identificar o comportamento do fluxo de permeado durante o processo; analisar a influência de um pré-tratamento enzimático no desempenho da operação; e avaliar o efeito do tipo de diluente na remoção de proteína e sódio do amido durante a etapa de diafiltração descontínua, analisando a possibilidade de se obter um amido com elevada pureza e uma corrente de permeado contendo a proteína extraída.

O procedimento completo adotado neste trabalho é apresentado na Figura 5.3. A extração foi realizada pelo método rápido de extração alcalina, utilizando como solvente NaOH 0,18 %, como descrito por Souza *et al.* (2016). Como pode ser observado na Figura 5.3, o estudo foi realizado em duas etapas. Na Etapa 1, após a operação de extração alcalina, foi avaliada a influência de um pré-tratamento com o uso da alfa-amilase comercial (BAN 480 L) para a hidrólise do amido gelatinizado durante a extração. Isto porque, foi observado visualmente (em um estudo prévio), que esta fração de amido gelatinizado apresenta uma elevada viscosidade. Desta forma, entende-se que a presença deste gel na suspensão possa contribuir para a formação de incrustações diminuindo a eficiência a operação. As suspensões (pré-tratada e não pré-tratada) foram submetidas à microfiltração tangencial, onde foi avaliada a tendência a formar incrustações das mesmas.

A partir dos resultados obtidos na Etapa 1, foi realizada a Etapa 2, na qual foi estudada a influência da aplicação de diafiltrações com água e com NaOH 0,18 % na purificação do amido. As correntes de concentrado e permeado obtidas em cada etapa foram analisadas em função de vários parâmetros físico-químicos. A descrição detalhada do procedimento experimental adotado ao longo do estudo é apresentada a seguir.

Figura 5.3: Fluxogramas apresentando as macro-etapas realizadas na condução deste trabalho, sendo CPT - amostra com pré-tratamento; SPT - amostra sem pré-tratamento; DF-H₂O - amostra derivada da diafiltração com água; DF-NaOH - amostra derivada diafiltração com solução de NaOH 0,18 %.



5.5.1 Etapa 1

a) Extração alcalina

A operação de extração alcalina foi iniciada com 2 L de NaOH 0,18 % (grau analítico) sendo aquecidos a 30 °C em um banho térmico acoplado a uma mesa de agitação magnética (Multistirrer, Velp Scientifica, Usmate, Itália). Então, 133 g de farinha de arroz foram adicionados ao solvente e o sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos a 30 °C.

b) Pré-tratamento enzimático

A hidrólise enzimática do amido gelatinizado durante a extração foi realizada a partir da utilização do preparado comercial de alfa-amilase, a BAN 480 L. A BAN (*Bacterial Amylase Novo*) 480 L é uma alfa-amilase produzida pela Novozymes (Dinamarca) por fermentação de uma cepa selecionada de *Bacillus amyloliquefaciens*. É uma endoamilase que hidrolisa as ligações (1,4)-alfa-D-glicosídeo da amilose e amilopectina, resultando numa rápida redução do amido gelatinizado. Os produtos da ruptura são dextrinas de diferentes tamanhos de cadeia e oligossacarídeos. A BAN

480 L tem temperatura ótima de operação de 70 °C, atividade declarada de 480 KNU g⁻¹, é estável em pH entre 5 e 7. O preparado comercial foi gentilmente cedido pela LNF Latino Americana (Bento Gonçalves, Brasil).

Ao término da extração alcalina, o pH da suspensão foi ajustado a 6,0 com HCl 0,1 M (grau analítico), para acelerar a ação da enzima. Em seguida, foram adicionados 0,85 g de enzima para cada 100 g de farinha de arroz no extrato. Esta quantidade de enzima foi definida levando-se em consideração a indicação do fabricante, a atividade declarada da enzima e o fato da hidrólise ter sido conduzida a 30 °C, temperatura distante da ótima de ação da enzima. Esta temperatura foi escolhida para prevenir a gelatinização do amido nativo ainda presente na amostra (a fração de amido não gelatinizada durante a extração alcalina). O acompanhamento da hidrólise foi realizado através do teste com solução de iodo de acordo com Apar e Ozbek (2005). Neste método utilizou-se o reagente de iodo, preparado pela adição de 1 mL de solução estoque (0,5 % de I₂ em KI 5 %) e 5 mL de HCl 5 M a 500 mL de água destilada. Uma alíquota 200 µL de hidrolisado foi retirada a cada 10 minutos de hidrólise e nela foram adicionados 5 mL de solução de iodo. A degradação de amido pré-gelatinizado pela alfa-amilase adicionada foi medida em espectrofotômetro a 620 nm contra um branco com 200 µL de água destilada em 5 mL de solução de iodo.

Ao término da hidrólise enzimática, o pH da suspensão foi novamente ajustado para 12,0 com NaOH 0,1 M visando manter em solução toda a proteína extraída (uma vez que em pH 6,0 grande parte da proteína extraída apresenta baixa solubilidade), como observado por Agboola *et al.* (2005) e Zhao *et al.* (2012).

c) Microfiltração tangencial

A membrana utilizada para a realização dos testes é uma membrana cerâmica tubular monocanal de alumina, com tamanho de poro nominal de 1,4 µm e área de filtração de 5,46 x 10⁻³ m² (Membralox, Pall Corporation, Port Washington, EUA). Essa membrana foi selecionada devido ao seu tamanho de poro, que permite a retenção dos grânulos de amido, que apresentam tamanhos que podem variar de 3 a 8 µm. (JANE *et al.*, 1994). Os componentes do amido gelatinizado são majoritariamente amilose e amilopectina. As moléculas de amilose apresentam massa molar na faixa de 1,5 x 10⁵ a 1x10⁶ Da, enquanto que as moléculas de amilopectina, massas da ordem de 5x10⁶ a 1x10⁸ Da. (SILVA; CABELLO, 2006). Já as proteínas majoritárias do arroz, extraídas pelo método alcalino, apresentam massas molares inferiores a 50 kDa. (SOUZA *et al.*, 2016). Optou-se por utilizar uma membrana cerâmica, pois ela apresenta maior durabilidade, além de elevadas resistências mecânica, aos solventes orgânicos e extremos de pH, ao ataque biológico e à esterilização com vapor.

Os experimentos de microfiltração foram realizados em um sistema de filtração (Figura 5.4 a) composto por um tanque de alimentação com capacidade para 5 L, uma bomba diafragma (Shurflo, modelo nº 8030-813-239, Costa Mesa, EUA), um módulo de membrana em aço inoxidável do tipo tubular (Membralox, Pall Corporation, Port Washington, EUA), contendo a membrana, manômetros hidráulicos e válvulas para operação e controle do processo.

Compactação da membrana: quando uma membrana é submetida a um gradiente de pressão, utilizando um solvente puro que não interage com o seu material, o fluxo do permeado deve ser constante com o tempo, indicando a estabilidade mecânica da membrana, pureza do solvente e baixa interação com o material da membrana. Ocorrendo o decréscimo do fluxo de solvente puro com o tempo, diz-se que a membrana está sofrendo um adensamento, causado pela deformação de sua microestrutura, fenômeno conhecido como compactação. Desta forma, para não considerar esta redução de fluxo de permeado como incrustação ou polarização por concentração, previamente aos experimentos com as suspensões de amido, a membrana foi compactada com água deionizada, através de imposição de uma pressão maior do que a de operação, para garantir que a mesma não sofreria compactação durante os testes. A compactação foi conduzida com água deionizada como fluido de trabalho, na pressão de 2 bar, pois segundo Shukla *et al.* (2000), em suspensões de amido se trabalha com pressões inferiores a 1,5 bar a fim de minimizar as incrustações nas membranas. O modo de operação foi o de reciclo total e foram realizadas medidas de fluxo de permeado até que o mesmo se tornasse constante.

Permeância, pressão crítica e pressão de trabalho: a permeância é caracterizada pela constante de proporcionalidade entre o fluxo volumétrico de permeado e a pressão aplicada. Esta foi determinada com água deionizada antes da realização dos testes, no modo de operação de reciclo total, com medições do volume de permeado, da pressão zero até 2 bar, com intervalos de 0,5 bar.

No processo de separação por membranas de fluidos diferentes de água destilada ou deionizada, o aumento da pressão não gera um proporcional aumento do fluxo de permeado devido aos fenômenos de polarização por concentração e incrustações. Então, no modo de operação de reciclo total, para a realização de cada um dos testes, foi determinada qual a pressão em que o aumento da mesma deixava de ser proporcional ao aumento do fluxo de permeado. Esta é denominada pressão crítica. A pressão de trabalho selecionada foi ligeiramente inferior à pressão crítica.

Ensaio de Microfiltração tangencial: para os ensaios de microfiltração tangencial, 2 L de cada uma das duas suspensões foram submetidos à microfiltração tangencial no modo batelada. A corrente de alimentação que foi submetida apenas à extração de amido pelo método alcalino e a que foi submetida à extração alcalina com posterior hidrólise do amido gelatinizado com α -

amilase doravante serão denominadas de suspensões SPT (sem pré-tratamento) e CPT (com pré-tratamento) respectivamente.

Segundo Shukla *et al.* (2000), em altas velocidades tangenciais, superiores a 5 m s^{-1} , as incrustações são minimizadas, então o procedimento experimental adotado nesta etapa consistiu em fixar a velocidade tangencial máxima possível de ser aplicada no equipamento (2 m s^{-1}). Cada experimento foi realizado na pressão transmembrana de 0,25 bar, durante 3 horas, a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. As microfiltrações foram realizadas até um fator de concentração de 1,4. Todas as microfiltrações foram realizadas em duplicata, com limpeza química e compactação da membrana entre cada uma delas, totalizando quatro experimentos.

Análises das correntes de processo: ao término do processo, os concentrados e permeados finais foram secos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa com circulação de ar (Ethiktechnology, modelo 400-5ND) e submetidos à análise do teor de proteína (Método de Kjeldahl modificado, Nx5,95) e de umidade em estufa (FABBE, modelo 119) a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ até massa constante. Além disso, os produtos foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura utilizando o microscópio EVO LS 15 (ZEISS, Birkerød, Dinamarca). As amostras desidratadas foram depositadas em *stubs* de cobre usando uma fita adesiva dupla face e recobertas com ouro. As observações foram realizadas em modo VPSE G3 a 15.0 kV.

5.5.2 Etapa 2

a) Extração alcalina

Para cada uma das bateladas ensaiadas, a extração alcalina foi realizada com 1,2 L de NaOH 0,18 %, que foram aquecidos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ em um banho térmico acoplado a uma mesa de agitação magnética. Então, 80 g de farinha de arroz foram adicionados ao solvente e o sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

b) Microfiltração tangencial

Após análise dos dados da Etapa 1, foram realizadas adaptações das tubulações do sistema de filtração com o objetivo de diminuir o volume morto e as perdas de carga do sistema, de forma a ser possível concentrar mais a suspensão e aumentar a velocidade tangencial do concentrado. A Figura 5.4 apresenta fotografias dos sistemas de filtração utilizados nas Etapa 1 e 2 deste trabalho. As alterações permitiram a redução do volume morto de 900 para 450 mL. Além disso, a velocidade do concentrado no sistema, que na primeira configuração limitava-se a

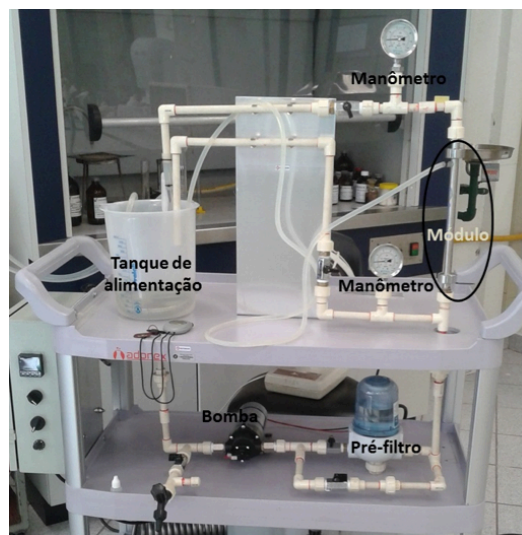
2 m s⁻¹, passou a atingir 2,8 m s⁻¹, garantindo uma maior turbulência do fluido ao circular pela membrana, diminuindo a tendência a formar incrustações.

Compactação da membrana: a membrana previamente limpa foi novamente compactada com água deionizada como fluido de trabalho à pressão de 2 bar até atingir fluxo de permeado constante.

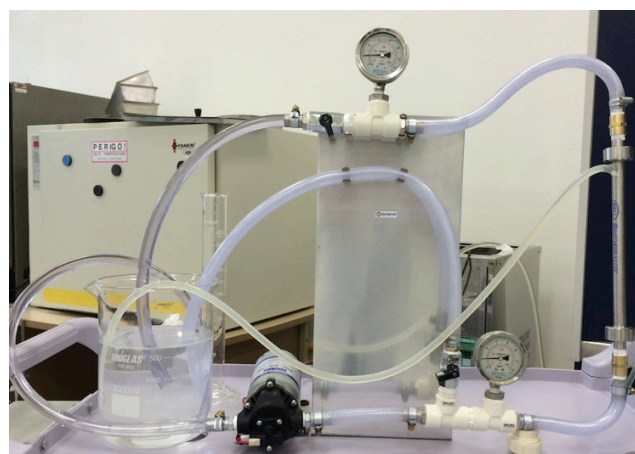
Permeância, pressão crítica e pressão de trabalho: a permeância foi novamente avaliada com água deionizada, em modo de reciclo total com velocidade de concentrado de 2,8 m s⁻¹. O fluxo de permeado foi coletado nas pressões zero, 0,5, 0,75, 1, 1,5 e 2 bar, tanto para a água (na determinação da permeância), quanto para a suspensão de trabalho (na determinação das pressões crítica e de trabalho).

Figura 5.4: Fotografias do sistema de filtração utilizado neste trabalho, sendo (a) o sistema utilizado na Etapa 1 e (b) o sistema utilizado na Etapa 2.

(a)



(b)



Ensaio de microfiltração tangencial e diafiltrações: os experimentos foram conduzidos sob pressão transmembrana de 0,5 bar, temperatura de 25 ± 1 °C, em modo batelada. O volume inicial do extrato foi de 1,2 L, sendo pré-concentrado até o fator de concentração 2 e, então, seguido de 12 volumes de diafiltração de 50 mL, totalizando 600 mL. A diafiltração, operada no modo descontínuo, foi realizada com dois diluentes diferentes: água deionizada e solução de NaOH 0,18%. Após a adição do último volume de diafiltração, a suspensão foi concentrada até o fator de concentração 2 e neutralizada com HCl 0,1 M. O concentrado final foi congelado e mantido desta forma até a etapa de secagem do amido. O Quadro 5.3 apresenta um resumo dos experimentos realizados. Os experimentos foram realizados em duplicata, com limpeza química e compactação da membrana entre cada uma delas, totalizando quatro experimentos.

Quadro 5.3: Resumo dos experimentos de diafiltração da Etapa 2.

	Experimento DF-NaOH	Experimento DF-H ₂ O
Diluyente	NaOH 0,18%	Água deionizada
Número de diafiltrações	12	12
Volume de diafiltração (mL)	50	50
Fator de concentração	2	2
Tempo médio de operação	5h e 5 min	4h e 53 min

Análises das correntes de processo: os permeados foram avaliados em termos de seus teores de proteína, pelo método de Lowry, pH, utilizando um pHmetro digital previamente aferido (AZ pH 86505, Taichung City, Taiwan) e condutividade elétrica, utilizando um condutivímetro digital previamente aferido (Digimed DM-32, São Paulo, Brazil). Os concentrados contendo o amido foram descongelados à temperatura ambiente. O amido depositou-se no fundo do béquer e o sobrenadante foi descartado. Os amidos foram secos em estufa (Ethiktechnology, modelo 400-5ND) com circulação de ar a 37 °C. Após, foram submetidos à análise do teor de proteína (Método de Kjeldahl modificado, Nx5,95), de umidade em estufa (FABBE, modelo 119) a 105 °C até massa constante e de sódio pelo método de espectrometria de emissão de chama (Digimed DM-61, São Paulo, Brasil), em triplicata, conforme Instituto Adolfo Lutz (2008).

5.6 Estudo da produção e caracterização do hidrolisado proteico

Na quinta fase do estudo (Figura 5.1, Bloco V) foi proposto um método de produção de um hidrolisado proteico de endosperma de arroz de elevada solubilidade a partir do extrato proteico obtido na extração alcalina. Neste trabalho inicialmente estudou-se a cinética de hidrólise enzimática da proteína de endosperma de arroz. Em seguida foi estudada a aplicação da ultrafiltração tangencial na concentração e purificação do produto solúvel da hidrólise. Por fim, o hidrolisado proteico foi caracterizado.

5.6.1 Estudo cinético da hidrólise enzimática

Na condução deste trabalho foi utilizada a Alcalase® 2.4 L FG, que consiste em uma preparação enzimática líquida em grau alimentício produzida pela Novozymes (Dinamarca). A Alcalase® foi gentilmente cedida pela LNF Latinoamericana (Bento Gonçalves, Brasil). Esta preparação enzimática comercial é composta por glicerol (50 %), água (41 %) e a protease subtilisina (Número do *Chemical Abstract Service* - CAS: 9014-01-1) (9 %), com atividade enzimática declarada de 2,4 AU-A g⁻¹. A protease subtilisina é uma endopeptidase do tipo serina que apresenta ampla especificidade de substrato e pode hidrolisar a maioria das ligações peptídicas dentro de uma molécula de proteína. Suas condições ótimas de ação estão na faixa de pH 7 a 9 e de temperatura de 30 a 65 °C. (NOVOZYMES, 2014).

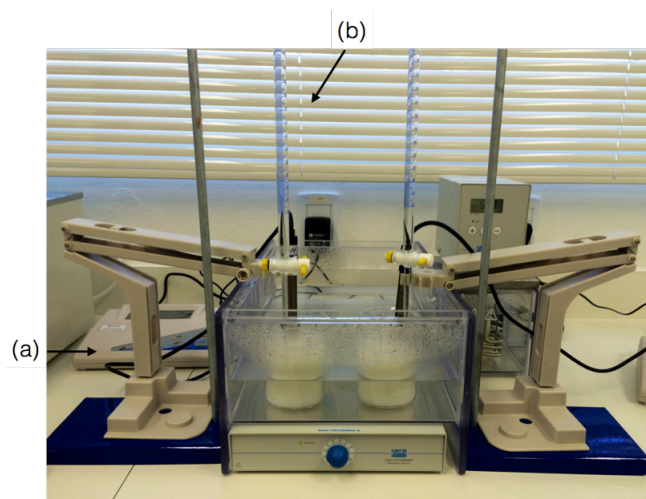
A razão enzima substrato e o tempo de hidrólise foram selecionados a partir de um estudo cinético, utilizando como matéria-prima uma suspensão de proteína de endosperma de arroz na concentração de $1,39 \pm 0,16$ %. Estes parâmetros foram selecionados com o objetivo de obter um grau de hidrólise de até 10 %, uma vez que, segundo Vioque *et al.* (2001), baixos graus de hidrólise (1 a 10 %) são aplicáveis para a melhoria das propriedades funcionais de proteínas.

A suspensão usada como matéria-prima para o estudo cinético foi preparada pelo método rápido alcalino (SOUZA *et al.*, 2016) com algumas modificações. No processo, 3600 g de solução de NaOH 0,18 % foram aclimatados a 30 °C em um béquer usando um banho termostático acoplado a uma mesa de agitação magnética. Então, 240 g de farinha de arroz foram adicionados ao solvente e o sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos a 30 ± 1 °C. Ao término, a suspensão foi centrifugada a 3220 x g por 10 minutos (5810 R (rotor A-4-81), Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O extrato proteico foi separado. O resíduo amiláceo foi lavado com 600 mL de solução de NaOH 0,18 % e centrifugado a 3220 x g por 10 minutos. O extrato de

lavagem foi adicionado ao extrato proteico obtido previamente. A proteína foi precipitada no ponto isoelétrico (pH 4,80) com HCl 1 M e o concentrado proteico precipitado no ponto isoelétrico (RPC - *rice protein concentrate*) foi separado do extrato ácido por centrifugação a $3220 \times g$ por 15 minutos. O RPC (que continha $15,6 \pm 1,9$ % de proteína, em base úmida) foi diluído com parte do extrato ácido até que a suspensão atingisse a concentração de proteína de 1,5 %. A suspensão foi homogeneizada com um liquidificador doméstico (RI2160, Philips Walita, Philips do Brasil, São Paulo, Brasil) e foi passada por uma peneira Tyler 32. Então o pH da suspensão foi ajustado a 7,0 com KOH 0,1 M e o teor de proteína da suspensão foi dosado pelo método de Kjeldahl modificado (AOAC 2001.11) ($N \times 5,95$). Como mencionado anteriormente, esta suspensão apresentou um teor de proteína de $1,39 \pm 0,16$ % (em base úmida).

O estudo da hidrólise foi conduzido em duplicata pelo método do pH estático. A Figura 5.5 apresenta uma fotografia do aparato experimental montado para a condução do experimento de hidrólise. As razões enzima:substrato testadas foram 0,05, 0,1 e 0,2 %. Em cada experimento, 100 mL da suspensão de proteína foram aclimatados a $55 \pm 1^\circ\text{C}$ em um béquer usando um banho termostático acoplado a uma mesa de agitação magnética. Alcalase® foi adicionada e o pH 7,0 foi mantido constante pela contínua adição de solução de KOH 0,1294 M. Aos 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos de hidrólise, 3 mL da suspensão eram amostrados e a enzima era inativada a 85°C por 15 minutos em um banho térmico (GLF, 1086, Burkwedel, Alemanha). As suspensões hidrolisadas foram centrifugadas a $4000 \times g$ por 30 minutos.

Figura 5.5: Fotografia do aparato experimental utilizado para a realização da hidrólise enzimática pelo método do pH estático, (a) pHmetro para o monitoramento contínuo do pH da suspensão durante a hidrólise e (b) bureta para a dosagem de KOH e manutenção do pH constante.



O grau de hidrólise (DH), definido como a razão percentual do número de ligações peptídicas clivadas (h) pelo número total de ligações peptídicas do substrato estudado (h_{tot}), foi

determinado para cada razão enzima:substrato estudada e a cada tempo de hidrólise, a partir do volume total de base consumida para manter o pH constante durante a hidrólise, de acordo com a Equação 5.6 descrita por Adler-Nissen (1986).

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} = \frac{B \times Mb}{Mp} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (5.6)$$

sendo B é o volume de base consumido para manter o pH constante; Mb é a concentração de base expressa em mol L⁻¹; Mp é a massa de proteína da amostra (definida como N (%) × 5,95, pelo método de Kjeldahl modificado) em gramas, e α é o grau médio de dissociação de grupos α-NH₂ no substrato proteico, e é expresso pela Equação 5.7.

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1+10^{\text{pH}-\text{pK}}} \quad (5.7)$$

onde pH e pK são os valores nos quais a proteólise foi conduzida. O valor de pK pode ser estimado pela Equação 5.8.

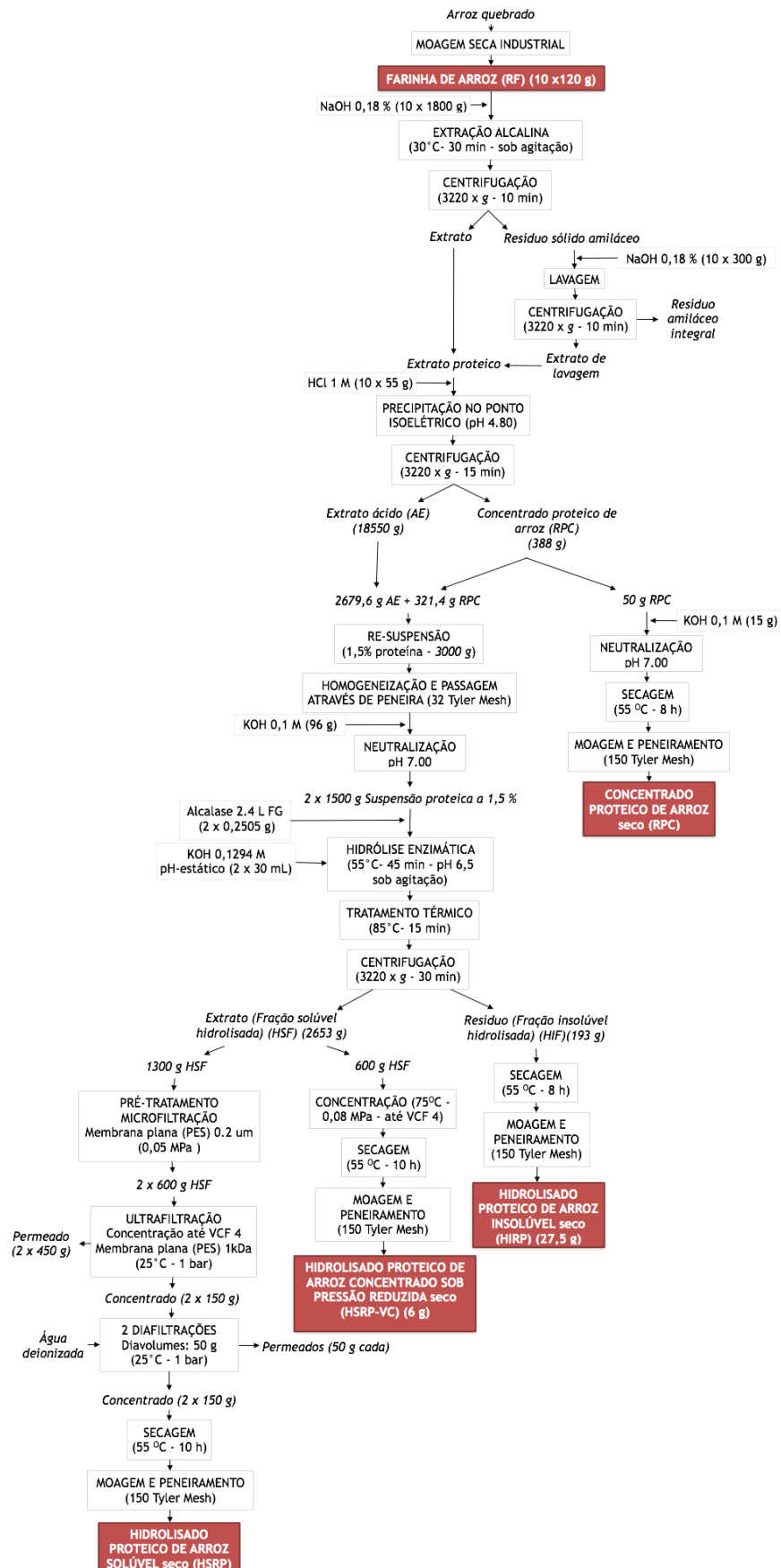
$$\text{pK} = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400 \quad (5.8)$$

onde T é a temperatura em Kelvin. O número total de ligações peptídicas (h_{tot}) do substrato proteico foi assumido como 9,20 meeqv g⁻¹ de proteína de arroz (ZHANG *et al.*, 2009).

5.6.2 Produção das amostras

A Figura 5.6 mostra o processo completo conduzido neste trabalho para a produção das amostras. O processo envolveu a extração das proteínas de endosperma de arroz seguida da hidrólise enzimática e da concentração da proteína solúvel por ultrafiltração tangencial, com o objetivo de obter um hidrolisado proteico solúvel de arroz mais purificado (HSRP - *hydrolyzed soluble rice protein*). Além disso, no final da etapa de hidrólise também foi obtida uma fração de hidrolisado proteico insolúvel de arroz (HIRP - *hydrolyzed insoluble rice protein*). Para fins comparativos foram produzidas duas amostras controle: o concentrado proteico de arroz (RPC - *rice protein concentrate*), que consiste em uma amostra de proteína de endosperma de arroz não hidrolisada, útil na avaliação da influência da hidrólise na solubilidade da proteína; e uma amostra de hidrolisado proteico solúvel de arroz concentrada por evaporação à pressão reduzida (HSRP-VC - *hydrolyzed soluble rice protein-vacuum concentrated*), útil para avaliar o efeito da ultrafiltração na concentração/purificação da amostra de hidrolisado proteico solúvel (HSRP).

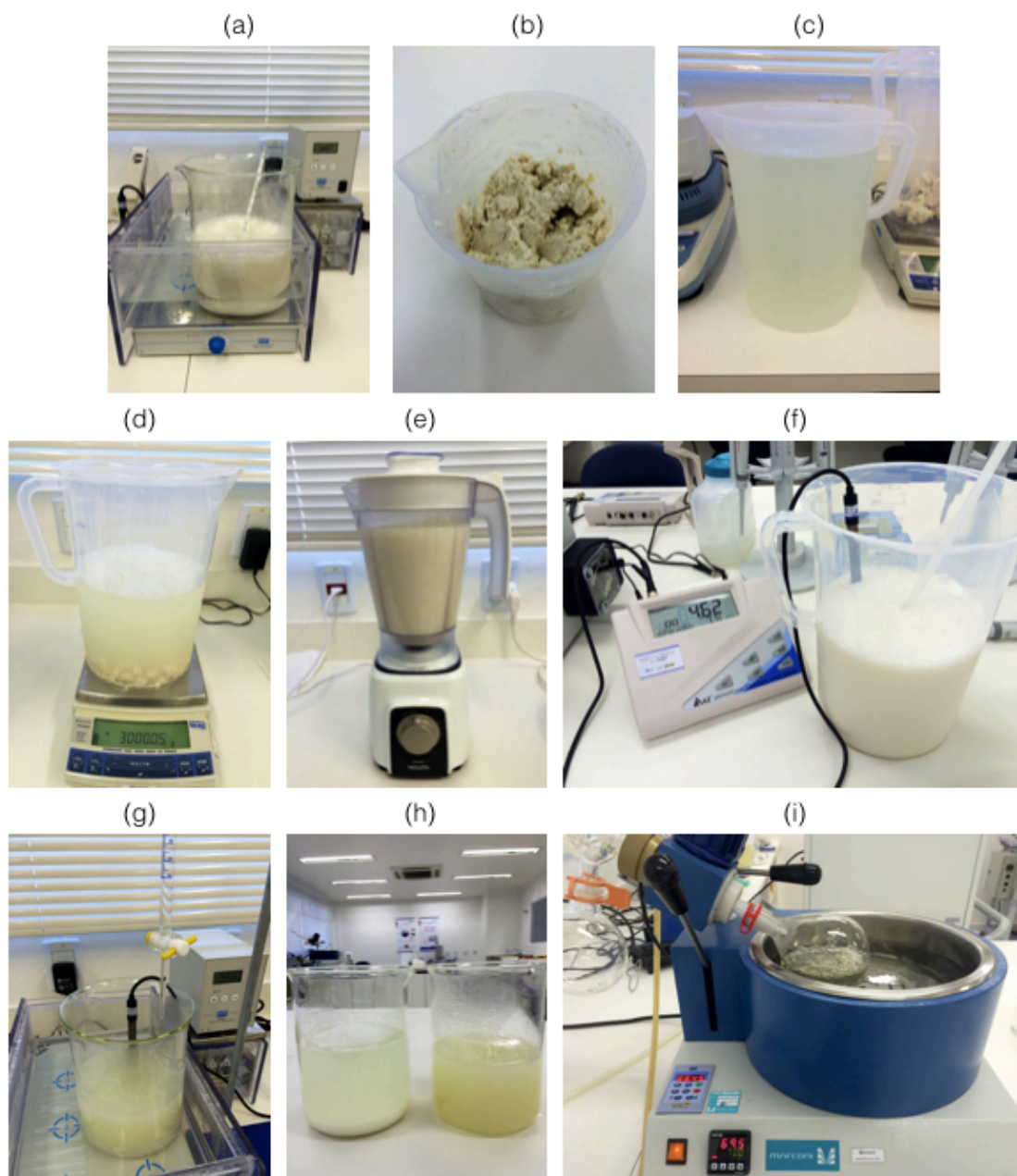
Figura 5.6: Fluxograma do processo completo utilizado para a extração, hidrólise enzimática e concentração das amostras produzidas neste trabalho.



Extração das proteínas: as proteínas do endosperma de arroz foram extraídas pelo método alcalino rápido (SOUZA *et al.*, 2016), com algumas modificações. No processo, dez bateladas de 1800 g de solução de NaOH 0,18% foram ambientadas a 30 °C em um béquer usando um banho termostático acoplado a uma mesa de agitação magnética. Então, em cada batelada, 120 g de farinha de arroz foram adicionados ao solvente e o sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos a 30 ± 1 °C. Ao término, a suspensão foi centrifugada a $3220 \times g$ por 10 minutos. O extrato proteico foi separado. O resíduo amiláceo foi lavado com 300 mL de solução de NaOH 0,18 % (em cada batelada) e centrifugado a $3220 \times g$ por 10 minutos. Os extratos de lavagem foram adicionados aos extratos proteicos obtidos previamente. Em cada batelada a proteína foi precipitada no ponto isoelétrico (pH 4,80) com 55 g de HCl 1 M e o concentrado proteico precipitado no ponto isoelétrico (RPC) foi separado do extrato ácido por centrifugação a $3220 \times g$ por 15 minutos, resultando em 388 g de RPC e 18550 g de extrato ácido (em 10 bateladas). Para a obtenção da amostra controle, 50 g do RPC foram neutralizados (pH 7,0) com 15 g de KOH 0,1 M e secos por 6 horas a 55 ± 5 °C em um forno com circulação de ar (800, Wictory, Caxias do Sul, Brasil) e então moídos em um moinho de martelos (M20, IKA, Staufen, Alemanha), peneirados em peneira Tyler 150 e armazenado a -10 °C. Outra quantidade (321,4 g) de RPC fresco (não desidratado) foi misturada com 2679,6 g do extrato ácido, com o objetivo de obter uma suspensão a 1,5 % de proteína que serviu de matéria-prima para a hidrólise enzimática. A suspensão foi homogeneizada com um liquidificador doméstico e foi passada por uma peneira Tyler 32. Então o pH da suspensão foi ajustado a 7,00 com 96 g de KOH 0,1 M e o teor de proteína da suspensão foi dosado pelo método de Kjeldahl modificado (AOAC 2001.11) ($N \times 5,95$). Esta suspensão apresentou um teor de proteína de $1,53 \pm 0,04$ % (em base úmida).

Hidrólise enzimática: A hidrólise enzimática foi conduzida com duas bateladas de 1500 g da suspensão previamente preparada. Depois de ambientada a 55 ± 1 °C, 0,2505 g (em cada batelada) de Alcalase® 2,4 L FG foram adicionados ao sistema e o pH 7,0 foi mantido constante pela contínua adição de solução de KOH 0,1294 M (30 mL para cada batelada). Depois de 45 minutos de hidrólise, a suspensão foi aquecida em um banho térmico a 85 °C por 15 minutos para a inativação da enzima, e resfriada em um banho refrigerado. As suspensões hidrolisadas foram centrifugadas a $3220 \times g$ por 30 minutos. Os resíduos insolúveis das duas bateladas foram combinados e secos por 8 h a 55 ± 5 °C em um forno com circulação de ar e então moídos em um moinho de martelos, peneirados em peneira Tyler 150 e armazenados a -10 °C, sendo doravante denominados de hidrolisado proteico insolúvel de arroz (HIRP). Os extratos solúveis das duas bateladas foram combinados, sendo doravante denominados como fração solúvel hidrolisada (HSF - *hydrolyzed soluble fraction*), e conduzidos para as operações de concentração/purificação, como descrito a seguir. A Figura 5.7 apresenta fotografias da condução das etapas de extração e hidrólise enzimática da proteína de endosperma de arroz.

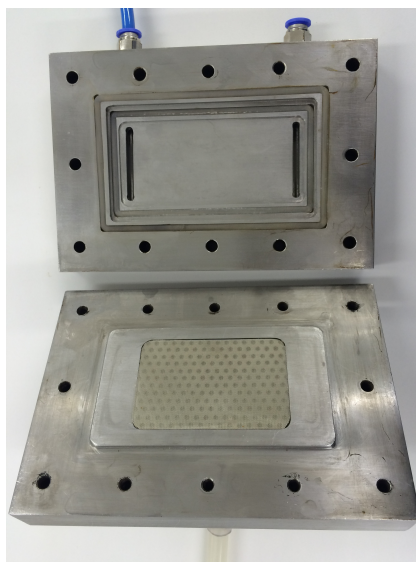
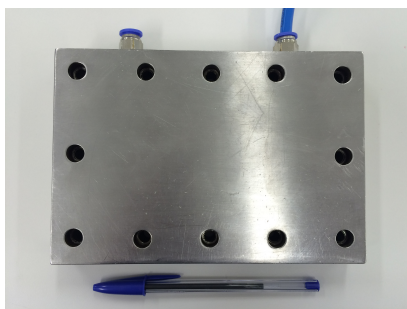
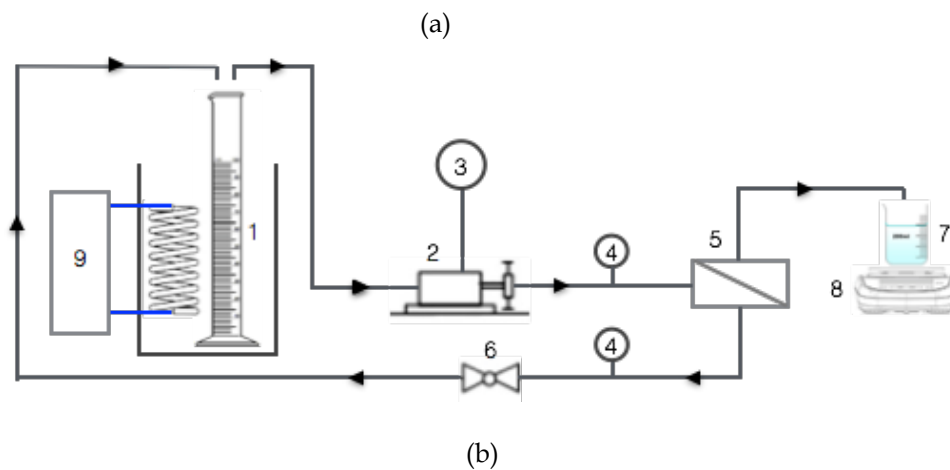
Figura 5.7: Fotografias de algumas das etapas realizadas para a produção das amostras, sendo (a) extração alcalina, (b) amostra de concentrado proteico de arroz (RPC) após a centrifugação, (c) extrato ácido (AE), (d) re-suspensão do concentrado proteico, (e) homogeneização após re-suspensão, (f) neutralização do extrato a 1,5% de proteína, (g) hidrólise enzimática pelo método do pH estático, (h) aspecto dos extratos antes (à esquerda) e após (à direita) a hidrólise enzimática e (i) concentração da amostra HSRP-VC.



Microfiltração e Ultrafiltração: para a obtenção de um hidrolisado proteico solúvel de arroz (HSRP) mais puro, a fração solúvel obtida na hidrólise enzimática (HSF) foi submetida à ultrafiltração tangencial (UF). Inicialmente a solução foi submetida à microfiltração tangencial

(MF) como um pré-tratamento à UF. Os processos de separação por membranas foram conduzidos em um sistema de bancada composto por um tanque de alimentação com capacidade de 0,25 L, uma bomba diafragma (3901-0206, Surflo, Costa Mesa, EUA) controlada por um controlador de velocidade (CFE 8701 F, Mortron, São Paulo, Brasil), um módulo plano em aço inoxidável com área de membrana de 0,0061 m², manômetros hidráulicos para o monitoramento da pressão transmembrana, válvula gaveta para o controle de pressão e um trocador de calor conectado a um sistema de circulação de água a 20 °C. A Figura 5.8 apresenta um diagrama esquemático do sistema e fotografias do módulo plano de filtração utilizando.

Figura 5.8: (a) Diagrama esquemático do sistema de filtração utilizado nos experimentos de microfiltração e ultrafiltração com o módulo plano; sendo: 1 - proveta utilizada como tanque de alimentação ao sistema, 2 - bomba diafragma, 3 - controlador de velocidade, 4 - manômetros hidráulicos, 5 - módulo plano em aço inox, 6 - válvula de controle de pressão, 7 - frasco para coleta do permeado, 8 - balança semi-analítica e 9 - banho ultra-termostático acoplado a uma serpentina para controle da temperatura. (b) Fotografias do módulo plano fechado, vista superior (à esquerda) e aberto (à direita).



A MF foi conduzida usando uma membrana de poli(flúoreto de vinilideno) (PVDF com tamanho de poro nominal de 0,2 μm (Synder V0.2, Synder Filtration, California, EUA). 1300 g de HSF foram microfiltrados em modo batelada a uma pressão transmembrana de 1 bar. Antes e após a microfiltração, a turbidez da solução foi medida com um turbidímetro digital (TU2016, AKSO, São Leopoldo, Brasil), com o objetivo de avaliar a redução da turbidez da solução.

A ultrafiltração foi conduzida com uma membrana de polietersulfona (PES) com massa molar de corte nominal de 1 kDa (Synder Filtration™ XT, Synder Filtration, California, EUA). Antes da filtração a membrana foi compactada com água deionizada na pressão de 1,5 bar por 1 hora. A velocidade tangencial foi mantida em 0,32 m s^{-1} , a máxima admissível para o sistema. Depois da compactação, foram realizadas medições do fluxo de permeado com o sistema operando com água deionizada como fluido de trabalho nas pressões de 0,5, 1, 1,5 e 2 bar, com o objetivo de avaliar a resistência hidráulica da membrana, R_m , a qual foi estimada com base na Lei de Darcy, Equação 5.9.

$$J = \frac{1}{\mu \times R_m} \times \Delta P \quad (5.9)$$

onde J é o fluxo de permeado ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$), μ é a viscosidade da água (bar s) e ΔP é a pressão transmembrana (bar).

Então, foram realizadas medições do fluxo de permeado com o sistema operando com HSF como fluido de trabalho nas pressões de 0,5, 1, 1,5 e 2 bar, com o objetivo de avaliar o fluxo crítico e garantir a seleção da pressão transmembrana de trabalho abaixo da pressão onde ocorre o fluxo crítico.

O experimento de ultrafiltração foi realizado (em duplicata) em modo batelada com 600 g da solução HSF pré-tratada, à temperatura constante (20 $^{\circ}\text{C}$), velocidade tangencial de 0,32 m s^{-1} , sob pressão transmembrana de 1,5 bar. O permeado foi continuamente coletado sobre uma balança semi-analítica (UX6200H, Shimadzu, Shimadzu do Brasil, São Paulo, Brasil) em porções de 50 g. Ao longo do experimento, o pH e a condutividade elétrica da corrente de retido foram monitoradas usando um pHmetro aferido (86505, AZ, Taichung City, Taiwan) e um condutivímetro aferido (DM-32, Digimed, São Paulo, Brasil). A concentração foi interrompida quando foi atingido o fator de concentração volumétrica (VCF - *volume concentration factor*) igual 4, o qual pode ser expresso pela Equação 5.10.

$$\text{VCF} = \frac{V_0}{V_R} = \frac{V_0}{V_0 - V_P} \quad (5.10)$$

sendo V_0 é o volume inicial da solução, V_R é o volume da corrente de retido e V_P é o volume de permeado.

Então, foram realizadas duas diafiltrações, cada um com 50 g de água deionizada. No final do experimento, as correntes de retido das duas replicatas foram secas por 8 h a 55 ± 5 °C em um forno com circulação de ar e então moídas em um moinho de martelos, peneiradas em um peneira Tyler 150 e armazenadas a -10 °C, sendo doravante denominadas de hidrolisado proteico solúvel de arroz (HSRP). Para avaliar o balanço de massa (para o componente proteína) das operações de concentração/diafiltração, foram dosados os conteúdos de proteína da solução HSF pré-tratada, da corrente de retido no final da operação e das frações de permeado. A dosagem foi realizada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) utilizando o kit Pierce™ (Thermo Scientific, Rockford, EUA) com albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) como referencia.

Durante os experimentos de ultrafiltração, a resistência devido às incrustações pode ser expressa pela Equação 5.11.

$$R_t = R_f + R_m \quad (5.11)$$

sendo R_f é a soma das resistências hidráulicas devido às partes irreversível (R_i) e reversível (R_R) devido às incrustações, R_t é a resistência hidráulica total e R_m é a resistência hidráulica da membrana limpa.

Para obter a amostra controle do processo de concentração por membranas, 600 g da solução HSF pré-tratada foram concentrados até VCF 4 a 75 °C e 0,08 MPa em um evaporador rotatório (Marconi, Piracicaba, Brasil) e secos por 8 h a 55 ± 5 °C em um forno com circulação de ar e, então, moídos em um moinho de martelos, após peneirados em uma peneira Tyler 150 e armazenados a -10 °C, sendo doravante denominados de hidrolisado proteico solúvel de arroz - concentrado a vácuo (HSRP-VC).

Limpeza das membranas: A limpeza química das membranas iniciou com seu enxágue com água deionizada, para remoção da solução residual do processo de concentração; limpeza em sistema fechado (*Clean in place*, CIP) com solução de NaOH (5 g L⁻¹) por 30 minutos à temperatura ambiente, para remoção dos componentes orgânicos; enxágue do sistema com água deionizada até a neutralidade; limpeza em sistema fechado (*Clean in place*, CIP) com solução de ácido cítrico (5 g L⁻¹) por 30 minutos à temperatura ambiente, para remoção dos componentes inorgânicos e enxágue final.

5.6.3 Caracterização das amostras

Identificação dos peptídeos: para identificar a natureza dos peptídeos presentes na

fração solúvel do hidrolisado e na amostra que foi submetida à concentração por ultrafiltração, as amostras HSF (*hydrolyzed soluble fraction*) e HSF após pré-tratamento de MF, foram submetidas à cromatografia rápida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de quadrupolo-tempo de voo (UHPLC-QTOF). A separação cromatográfica foi alcançada utilizando-se um sistema Nexera X2 Shimadzu (Sinc do Brasil, São Paulo, Brasil) equipado com duas bombas binárias LC-30AD, um degaseificador DGU-20A 3R, um amostrador SIL-30AC, um forno para colunas CTO-20A e um controlador CBM-20A. Empregou-se uma coluna Agilent Eclipse Plus C18 RRHD (2,1 x 50 mm, 1,8 μm), mantida a 40 °C. A fase móvel foi composta por ácido fórmico 0,1 % em água (solvente A) e ácido fórmico 0,1 % em acetonitrila (solvente B). A vazão utilizada foi de 0,6 mL min⁻¹, seguindo o seguinte gradiente: 2 % de B (0 min), 2 % de B (4 min), 50 % de B (80 min), 90 % de B (80,1 min), 90 % de B (88 min), 2 % de B (88,01 min), 2 % de B (96 min). O volume de injeção foi de 5 μL . O espectrômetro de massas utilizado foi um Bruker Impact HD QTOF (Sinc do Brasil, São Paulo, Brasil), equipado com uma fonte de íons Apollo II Electrospray, operando no modo positivo. Seguem as condições da fonte: *end plate offset voltage* de 500 V; voltagem do capilar igual a 4500 V; pressão do gás de nebulização de 5.5 bar; vazão do gás de secagem igual a 10 L min⁻¹; temperatura de secagem igual a 220 °C. O modo auto MS/MS foi usado. Os dados foram coletados na faixa de massas entre 150 - 2200 Da. A frequência de aquisição de espectro foi de 2 Hz.

A fim de alcançar a exatidão de massa desejada, foi empregada calibração interna com pós-correção de massas. Para isso, uma solução de calibração contendo uma mistura comercial de poli (fluoro alkoxi) fosfazinas, fornecida pelo fabricante foi constantemente infundida por meio de uma bomba e uma seringa. Uma válvula de 6 portas auxiliou na introdução desta solução no equipamento a cada início de corrida cromatográfica. O espectrômetro de massas operou com um poder de resolução de 50.000, numa massa de 1222 Da. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A aquisição dos dados foi realizada através dos *softwares* HyStar 3.2 e OTOF Control 3.4, enquanto, para o tratamento destes dados, utilizou-se o Compass QuantAnalysis 2.2 e o ProteinScape 3.1.0. Empregou-se o Mascot como banco de dados de espectrometria de massas de proteínas.

Teores de proteína, resíduo mineral, sódio e potássio: as amostras RPC, HIRP, HSRP-VC e HSRP foram caracterizadas em termos do teor de umidade por secagem direta em estufa a 105 °C (AOAC 935.29), teor de proteína pelo método de Kjeldahl modificado (N \times 5,95) (AOAC 2001.11), conteúdo mineral total por incineração em forno mufla a 550 °C (AOAC 923.03), teores de sódio e potássio por fotometria de emissão de chama (Digimed, DM-61, São Paulo, Brasil) (AOAC 969.23) (AOAC, 1997). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Solubilidade: as solubilidades de proteína das amostras RPC, HIRP, HSRP-VC e HSRP

foram avaliadas nos pHs 3, 4, 5, 6 e 7, pelo método descrito por Vojdani (1996). As amostras foram dispersas em água deionizada em concentrações de proteína conhecidas de aproximadamente 2,5 mg mL⁻¹ e os pHs foram ajustados com soluções de NaOH ou HCl 0,1 M. As dispersões foram então agitadas em shaker (KS 4000, IKA, Staufen, Alemanha) a 24 °C e 200 rpm por 30 minutos. O pH das amostras foi checado e reajustado e as amostras foram agitadas por mais 30 minutos. Após, o pH das amostras foi ajustado novamente. As amostras foram centrifugadas (5430 R (rotor F-35-6-30), Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 4000 x g por 30 minutos. O teor de proteína solúvel das suspensões foi medido pelo método BCA utilizando o kit Pierce™ (Thermo Scientific, Rockford, EUA) com albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) como referencia. O conteúdo total de proteína das suspensões foi dosado pelo método BCA, a partir da dissolução das proteínas nas amostras em solução de ureia 8 M e dodecil sulfato de sódio a 5 %, associada à homogeneização da amostra usando um triturador de tecidos com pistilo de vidro. A solubilidade de proteína (SP, %) foi calculada de acordo com a Equação 5.1. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Capacidade de formação de espuma e estabilidade da espuma: a capacidade de formação de espuma e a estabilidade das espumas foram determinadas de acordo com o método descrito por Wilde e Clark (1996), com algumas modificações. Foram preparados 50 mL de dispersões das amostras à concentração de 1 mg mL⁻¹ (como proteína) com água destilada (pH 5,0). As dispersões foram batidas por um minuto com uma batedeira doméstica (Pérola Maxx, Britânia, Curitiba, Brasil). A amostra batida foi imediatamente transferida para uma proveta e o volume da espuma foi medido. A capacidade de formação de espuma (FC, %) foi calculada de acordo com a Equação 5.12.

$$FC (\%) = \frac{V_f}{V_0} \times 100 \quad (5.12)$$

sendo V_f é o volume da espuma e V_0 é o volume inicial da dispersão antes do batimento.

A estabilidade da espuma (FS, %) foi medida pelo volume de líquido drenado separado da espuma depois de 30 minutos do batimento, e foi expresso pela Equação 5.13.

$$EE (\%) = \frac{V_0 - V_t}{V_0 - V_i} \times 100 \quad (5.13)$$

sendo V_t é o volume de líquido drenado depois de 30 minutos e V_i é o volume de líquido drenado imediatamente depois do batimento.

5.7 Análise estatística

Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão. As diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente usando a Análise de Variâncias (ANOVA) em um delineamento inteiramente casualizado e o Teste t de Student, para pares de médias, ou o Teste de Tukey, para comparação de três ou mais médias, utilizando o Software Assistat 7.7 Beta (Assistat, Campina Grande, Paraíba, Brasil).

5.8 Referências

- ADLER-NISSEN, J. Methods in food protein hydrolysis. In: *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London and New York: Elsevier Applied Science Publishers, pp. 110-131, 1986.
- 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.
- AOAC. *Official methods of analysis of AOAC international*. (16th ed) Maryland: Assoc. Off. Analyt. Chemists, 2 v. 1997.
- AOAC. *Official methods of analysis of AOAC international*. (17th ed, 1st rev.) Maryland: Association of Analytical Communities, 2002.
- APAR, D. K.; OZBEK, B. α -Amylase inactivation during rice starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1367-1379, 2005.
- BERA, M. B.; MUKHERJEE, R. K. Solubility, emulsifying and foaming properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Science*, v. 51, p. 142-145, 1989.
- BOYACI, I. H.; WILLIAMS, P. C.; KÖKSEL, H. A rapid method for the estimation of damaged starch in wheat flours. *Journal of Cereal Science*, v. 39, p. 139-145, 2004.
- CHERYAN, M.; ALVAREZ, J. R. Food and beverage industry applications. In: R. D. Noble, & Stern, S. A. (Eds.), *Membrane Separations Technology. Principles and Applications*. Elsevier Science B.V. 1995.
- HAGEN S. R.; FROST B.; AUGUSTIN J. Precolumn Phenylisothiocyanate Derivatization and Liquid-Chromatography of Amino-Acids In Food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 72, p. 912-916, 1989.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008.
- JANE, J.; KASEMSUWAN, T.; LEAS, S.; ZOBEL, H.; ROBYT, J. F. Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch/Stärke*, v. 46, p. 121-129, 1994.

- JU, Z. Y.; HETTIARACHCHY, N. S.; RATH, N. Extraction, Denaturation and Hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. *Journal of Food Science*, v. 66, p. 229–232, 2001.
- KUMAGAI, T.; KAWAMURA, H.; FUSE, T.; WATANABE, T.; SAITO, Y.; MASUMURA, T.; ... KADOWAKI, M. Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 52, p. 467–72, 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, v. 227, p. 680–685, 1970.
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. *Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação*. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher. 1990. 627 p.
- NOVOZYMES (2014). *Biocatalysis Product Sheet Protease 3*. Denmark. Disponível em: http://www.novozymes.com/en/solutions/biopharma/Brochures/Documents/2014-12715-01_Biocatalysis-Product-Sheet-Protease-3.pdf. Acesso em: 26.05.15
- PARAMAN, I.; HETTIARACHCHY, N.S.; SCHAEFER, C. Preparation of Rice Endosperm Protein Isolate by Alkali Extraction. *Cereal Chemistry*, v. 85, p. 76–81, 2008. doi:10.1094/CCHEM-85-1-0076
- PEARCE, K.N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 26, p. 716–723, 1978. doi:10.1021/jf60217a041
- SATHE, S. K., SALUNKHE, D. K. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: Emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. *Journal of Food Science*, v. 46, p. 71–81, 1981.
- SHUKLA, R.; TANDON, R.; NGUYEN, M.; CHERYAN, M. Microfiltration of starch suspensions using a tubular stainless steel membrane. *Membrane Technology*, v. 2000, p. 5–8, 2000.
- SILVA, F. I.; CABELLO, C. Caracterização das estruturas moleculares de amido de mandioca utilizando metodologia de pemeação em gel. *Energia na Agricultura*, v. 21, p. 50–68, 2006.
- SOUZA, D. DE, 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*, 191, p. 36–44, 2016. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.032
- VOJDANI, F. Solubility. In: G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality*. London: Chapman & Hall, pp. 11–60, 1996.
- 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*, v. 8, p. 170–177, 1986.
- WILDE, P. J.; CLARK, D. C. Foam formation and stability. In: G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality*. London: Chapman & Hall, pp. 110–152, 1996.
- XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*, v. 351, p. 146–148, 2006.
- ZHANG, H.-J., ZHANG, H., WANG, L., GUO, X.-N. Preparation and functional properties of rice

bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. *Food Research International* v. 47, p. 359–363, 2012. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.014

ZHAO, Q.; SELOMULYA, C.; XIONG, H.; CHEN, X. D.; RUAN, X.; WANG, S.; ... ZHOU, Q.
Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice. *Journal of Cereal Science*, v. 56, p. 568–575, 2012. doi:10.1016/j.jcs.2012.08.012

Capítulo 6

Caracterização do amido e da proteína extraídos por um método rápido de extração alcalina

Apesar de ser largamente utilizado na extração proteínas vegetais, sabe-se que o tratamento alcalino é capaz de ocasionar uma série de alterações nos produtos da extração. Desta forma, a primeira etapa deste estudo buscou responder às seguintes questões de pesquisa:

- 1) Quais seriam as condições com as quais se pode extrair o máximo de proteína de arroz com o menor tempo de contato possível entre o meio alcalino e o substrato da extração?
- 2) Em que medida as alterações das proteínas provocadas pelo meio alcalino (desnaturação proteica, a perda de aminoácidos essenciais e a formação de compostos tóxicos, como a lisinoalanina) podem ser minimizadas, com base na seleção das condições operacionais empregadas na extração?
- 3) O meio alcalino também provoca a gelatinização a frio do amido. É possível minimizar a ocorrência deste fenômeno com o uso de NaOH em baixa concentração?

No trabalho apresentado neste capítulo, objetivou-se avaliar a influência das condições operacionais adotadas na extração alcalina na composição química e nas propriedades térmicas e morfológicas dos produtos obtidos. O mesmo está na forma de artigo científico, na língua inglesa, com a formatação de citações e referências de acordo com as normas da revista na qual foi publicado.

6.1 Artigo 3

Food Chemistry 191 (2016) 36–44



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method



Daiana de Souza^{a,b,*}, Arthur Francisco Sbardelotto^b, Denize Righetto Ziegler^b,
Ligia Damasceno Ferreira Marczak^a, Isabel Cristina Tessaro^a

^aChemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Engenheiro Luiz Englert s/n, Porto Alegre/RS 90040-040, Brazil

^bInstitute of Technology in Food for Health (itt Nutrifor), University of Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93022-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2014
Received in revised form 5 March 2015
Accepted 10 March 2015
Available online 17 March 2015

Keywords:

Rice flour
Fast alkaline extraction
Rice starch
Rice protein

ABSTRACT

This study evaluated the characteristics of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method on rice flour (RF) derived from broken rice. The extraction was conducted using 0.18% NaOH at 30 °C for 30 min followed by centrifugation to separate the starch rich and the protein rich fractions. This fast extraction method allowed to obtain an isoelectric precipitation protein concentrate (IPPC) with 79% protein and a starchy product with low protein content. The amino acid content of IPPC was practically unchanged compared to the protein in RF. The proteins of the IPPC underwent denaturation during extraction and some of the starch suffered the cold gelatinization phenomenon, due to the alkaline treatment. With some modifications, the fast method can be interesting in a technological point of view as it enables process cost reduction and useful ingredients obtention to the food and chemical industries.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Institute of Technology in Food for Health (itt Nutrifor), University of the Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93.022-000, Brazil. Tel./fax: +55 51 35908842.

E-mail address: daianasouz@unisinos.br (D.de Souza).

O conteúdo deste artigo não será apresentado neste trabalho, pois os direitos autorais do mesmo já são de propriedade da Editora Elsevier, não podendo o mesmo ser publicado em duplicidade.

Capítulo 7

Propriedades funcionais de concentrados proteicos de arroz

Para direcionar a aplicação de isolados e concentrados proteicos vegetais como ingredientes na indústria de alimentos é fundamental conhecer previamente o comportamento de suas propriedades funcionais. Com a revisão de literatura realizada, foi possível observar que alguns estudos já avaliaram as propriedades funcionais de concentrados proteicos de arroz. A segunda etapa deste estudo buscou responder à seguinte questão de pesquisa: "A literatura indica que a proteína de arroz apresenta pobres propriedades funcionais, tendo em vista sua baixa solubilidade. Além disso, aponta para o fato de que as propriedades funcionais podem variar em função do método de extração empregado na obtenção da proteína. É possível que proteínas extraídas pelo método alcalino e pelo método enzimático apresentem propriedades funcionais distintas?"

No trabalho apresentado neste capítulo, objetivou-se avaliar as propriedades funcionais do concentrado proteico obtido a partir do método rápido de extração alcalina e comparar suas propriedades com as de dois concentrados proteicos comerciais produzidos por extração enzimática. O mesmo está na forma de artigo científico, na língua inglesa, com a formatação de citações e referências de acordo com as normas da revista à qual foi submetido.

7.1 Artigo 4

FUNCTIONAL PROPERTIES OF RICE ENDOSPERM PROTEIN CONCENTRATE OBTAINED BY THE FAST ALKALINE EXTRACTION METHOD

Daiana de Souza^{*,a,b}, Carolina Feistauer Gomes^b, Arthur Francisco Sbardelotto^b, Denize Righetto Ziegler^b, Ligia Damasceno Ferreira Marczak^a, Isabel Cristina Tessaro^a

^a Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Engenheiro Luiz Englert s/n, Porto Alegre/RS 90040-040, Brazil

^b Institute of Technology in Food for Health (ITT NUTRIFOR), University of Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93022-000, Brazil

* Corresponding author (Daiana de Souza)

Present address: Institute of Technology in Food for Health (itt Nutrifor), University of the Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93.022-000, Brazil.

Phone/Fax: +55 51 35908842

E-mail address: daianasouz@unisinos.br (D. de Souza).

O conteúdo deste artigo não será apresentado neste trabalho, pois o mesmo está em fase de avaliação em revista indexada da área e, para efeitos de direitos autorais, não pode ser publicado duas vezes em referências diferentes.

Capítulo 8

Microfiltração na separação de amido e proteína de arroz extraídos pelo método alcalino

A aplicação da microfiltração foi testada em alguns estudos que buscaram a recuperação do amido na corrente de concentrado e das proteínas na corrente de permeado. Naqueles trabalhos, os autores observaram a total rejeição do amido, porém alta retenção de proteína. Além disso, de acordo com nosso conhecimento, não foi relatada na literatura até o momento a aplicação da microfiltração na recuperação do amido de arroz extraído pelo método alcalino. Desta forma, a terceira etapa deste estudo buscou responder às seguintes questões de pesquisa:

- 1) A microfiltração pode ser utilizada na recuperação do amido de arroz na corrente de concentrado e na recuperação das proteínas no permeado, se for utilizada uma membrana com poros maiores do que o já relatado?
- 2) Foi sugerido que a presença de amido gelatinizado na suspensão pode acarretar a formação de *fouling* durante a microfiltração. Um pré-tratamento enzimático seria eficaz na sua redução?
- 3) É possível realizar a purificação do amido de arroz com diafiltrações durante a microfiltração?

No trabalho apresentado neste capítulo, objetivou-se avaliar a aplicação da microfiltração tangencial na separação do amido de arroz obtido pelo método rápido de extração alcalina. O mesmo está na forma de artigo científico.

8.1 Artigo 5

SEPARAÇÃO DE AMIDO E PROTEÍNA DE ARROZ OBTIDOS PELO MÉTODO RÁPIDO DE EXTRAÇÃO ALCALINA POR MICROFILTRAÇÃO TANGENCIAL

Daiana de Souza^{*,a,b}, Alisson de Oliveira^{a,b}, Aline Felten Centa^b, Arthur Francisco Sbardelotto^b, Denise Righetto Ziegler^b, Ligia Damasceno Ferreira Marczak^a, Isabel Cristina Tessaro^a

^a Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Engenheiro Luiz Englert s/n, Porto Alegre/RS 90040-040, Brasil

^b Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor), Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93022-000, Brasil

* Autor para correspondência (Daiana de Souza)

Endereço atual: Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor), Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93022-000, Brasil

Fone/Fax: +55 51 35908842

E-mail: daianasouz@unisinos.br (D. de Souza).

O conteúdo deste artigo não será apresentado neste trabalho, pois o mesmo será enviado para revista indexada da área e, para efeitos de direitos autorais, não pode ser publicado duas vezes em referências diferentes.

Capítulo 9

Produção de proteína hidrolisada de endosperma de arroz de alta solubilidade

A proteína de arroz é um insumo hoje pouco valorizado no mercado principalmente por possuir propriedades funcionais pobres. Em termos de funcionalidade, como um ingrediente alimentar, a solubilidade é uma das propriedades mais importantes de uma proteína. A hidrólise enzimática parcial (com baixo grau de hidrólise) vem sendo empregada para a melhoria das propriedades funcionais de proteínas de diferentes fontes. Neste contexto, na quarta etapa deste estudo foram propostas as questões de pesquisa apresentadas a seguir.

- 1) É possível melhorar a solubilidade da proteína de endosperma de arroz com a hidrólise enzimática parcial? Quais rendimentos podem ser obtidos neste processo?
- 2) A ultrafiltração pode ser empregada na concentração e purificação de hidrolisado proteico solúvel de arroz? Qual o rendimento da operação? Qual o grau de purificação que pode ser alcançado?

No trabalho apresentado neste capítulo, objetivou-se avaliar a influência da hidrólise enzimática e da ultrafiltração tangencial na obtenção de uma proteína hidrolisada de endosperma de arroz de alta solubilidade e reduzido teor de sódio. O mesmo está na forma de artigo científico, na língua inglesa, com a formatação de citações e referências de acordo com as normas da revista na qual foi submetido para publicação.

9.1 Artigo 6

OBTAINING AND PURIFICATION OF A HIGHLY SOLUBLE HYDROLYZED RICE ENDOSPERM PROTEIN

Daiana de Souza^{*,a,b}, Arthur Francisco Sbardelotto^b, Denize Righetto Ziegler^b, Laura Massochin Nunes Pinto^b, Renata Cristina de Souza Ramos^b, Ligia Damasceno Ferreira Marczak^a, Isabel Cristina Tessaro^a

^a *Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Engenheiro Luiz Englert s/n, Porto Alegre/RS 90040-040, Brazil*

^b *Institute of Technology in Food for Health (itt Nutrifor), University of Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93022-000, Brazil*

** Corresponding author (Daiana de Souza)*

Present address: Institute of Technology in Food for Health (itt Nutrifor), University of the Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo/RS 93.022-000, Brazil.

Phone/Fax: +55 51 35908842

E-mail address: daianasouz@unisinos.br (D. de Souza).

O conteúdo deste artigo não será apresentado neste trabalho, pois o mesmo está em fase de avaliação em revista indexada da área e, para efeitos de direitos autorais, não pode ser publicado duas vezes em referências diferentes.

Capítulo 10

Considerações Finais

O Brasil é atualmente o nono maior produtor mundial de arroz e o maior produtor de fora do continente asiático. Por ser um cereal de grande importância na cultura brasileira, o arroz é largamente consumido em todo o país, basicamente na forma beneficiada, e principalmente como arroz polido. Dessa demanda são produzidas anualmente grandes quantidades de arroz quebrado, coproduto do beneficiamento do grão. O aproveitamento do arroz quebrado no Brasil ainda é um desafio tecnológico. Este coproduto, atualmente pouco valorizado no país, pode ser matéria-prima para a geração de uma série de ingredientes para a indústria de alimentos.

Neste trabalho foi estudado um processo de fabricação de amido, proteína e hidrolisados proteicos de arroz a partir deste coproduto, com o intuito de contribuir na oferta de estratégias para o desenvolvimento tecnológico tanto do setor orizícola, quanto da indústria de *commodities* tecnológicas brasileira. Cabe salientar que este estudo teve como enfoque principal os ingredientes proteicos derivados do endosperma do arroz quebrado. Isto porque a demanda por ingredientes proteicos de elevada qualidade é crescente na atualidade. As proteínas do arroz apresentam vantagens nutricionais relacionadas ao bom balanço nos teores de aminoácidos e devido à sua hipoalergenicidade. Entretanto, como o amido é o componente majoritário do endosperma do cereal, o estudo também considerou este componente, mas com menor ênfase.

Neste contexto, as duas primeiras hipóteses avaliadas nesta tese foram as seguintes.

- 1) *O arroz quebrado brasileiro, ou a farinha de arroz atualmente produzida pela indústria brasileira a partir do arroz quebrado, pode ser base para o desenvolvimento de ingredientes de maior valor agregado.*

- 2) *O método alcalino pode ser empregado de forma eficiente e com minimização de seus efeitos deletérios sobre as proteínas, se forem adequadamente selecionadas as condições da operação de extração.*

Estas hipóteses puderam ser avaliadas com base nas questões de pesquisa levantadas ao longo do estudo, e que foram respondidas com os trabalhos realizados. As primeiras questões de pesquisa consideradas são apresentadas a seguir.

- 1) A literatura apresenta muitos estudos que realizaram a extração das proteínas de arroz pelo meio alcalino com diferentes condições operacionais. Quais seriam as condições com as quais se pode extrair o máximo de proteína com o menor tempo de contato possível entre o meio alcalino e o substrato da extração?
- 2) O meio alcalino, apesar de ser muito eficiente na solubilização de proteínas, é capaz de provocar uma série de alterações indesejadas nas proteínas, tais como a desnaturação proteica, a perda de aminoácidos essenciais e a formação de compostos tóxicos, como a lisinoalanina. Em que medida estas alterações podem ser minimizadas, com base na seleção das condições operacionais empregadas na extração?

Assim, a realização da primeira etapa deste estudo foi motivada pela carência na literatura científica de dados acerca da influência das condições da operação de extração de amido e proteína de arroz no rendimento do processo. Além disso, ao se compreender que o meio alcalino, principalmente associado a altas temperaturas, pode ser propício para a geração de reações indesejadas nas proteínas, como a formação de compostos tóxicos, como a lisinoalanina, acompanhada da perda de aminoácidos essenciais, buscou-se encontrar estratégias para minimizar o tempo de contato entre a matéria-prima e o solvente alcalino durante a extração. Esta etapa gerou um trabalho, apresentado no Capítulo 6 desta tese, que avaliou a eficácia de um método rápido de extração alcalina, no qual foi utilizada farinha de arroz derivada de arroz quebrado como matéria-prima, ao invés dos grãos quebrados, como no método tradicional.

Nesse estudo, a partir do uso de uma razão substrato:solvente de 1:15, a etapa de extração foi realizada em estágio único a 30 °C em apenas 30 minutos – um curto tempo de extração se comparado ao método alcalino tradicional, que exige de 24 a 48 h de tempo de contato entre os grãos quebrados e o solvente alcalino. O rendimento da extração proteica com estas condições foi bastante elevado, atingiu 81,4 %, tendo sido possível obter um concentrado proteico com 79 % de proteína em base seca e um amido com baixo teor residual de proteína (1,3% em base seca). Foi possível observar que, apesar das proteínas terem sofrido desnaturação durante a extração, não houve perda de aminoácidos essenciais. Adicionalmente, conforme Faist, Drusch, Kiesner, Elmadfa e Erbersdobler (2000), a formação de lisinoalanina é acompanhada da redução significativa do conteúdo de lisina da proteína, e o conteúdo do aminoácido não sofreu alteração

significativa durante a extração realizada nas condições estudadas. Assim, observou-se ser possível realizar uma extração eficiente, com a minimização das reações indesejadas causadas pelo meio alcalino. Isto foi possível devido ao curto tempo de contato entre o meio alcalino e a matéria-prima e ao uso de baixas temperaturas na extração.

Outra questão de pesquisa respondida neste trabalho foi a apresentada a seguir.

- 3) O meio alcalino também provoca a gelatinização a frio do amido. É possível minimizar a ocorrência deste fenômeno com o uso de NaOH em baixa concentração?

Mesmo utilizando solução de NaOH na concentração sugerida na literatura (CARDOSO *et al.*, 2007) como a que permite uma boa eficiência de extração e minimiza a gelatinização a frio do amido (NaOH 0,18 %), observou-se que parte do amido de arroz foi gelatinizado durante a extração. Isto ocorreu basicamente pelo uso da farinha de arroz como matéria-prima para a extração. A fração de amido gelatinizada foi resultante do fenômeno de gelatinização a frio promovido pelo contato do meio alcalino com grânulos de amido danificados pelo processo de moagem utilizado para a obtenção da farinha de arroz. Desta forma, entende-se ser necessário um controle do grau de danificação dos grânulos de amido da farinha usada como matéria-prima, tendo em vista a minimização desta fração.

A quarta questão de pesquisa proposta para avaliar as hipóteses supracitadas foi a seguinte:

- 4) A literatura indica que a proteína de arroz apresenta pobres propriedades funcionais, tendo em vista sua baixa solubilidade. Além disso, aponta para o fato de que as propriedades funcionais podem variar em função do método de extração empregado na obtenção da proteína. É possível que proteínas extraídas pelo método alcalino e pelo método enzimático apresentem propriedades funcionais distintas?

Esta questão foi elucidada no segundo trabalho produzido nesta tese, apresentado no Capítulo 7, onde foram avaliadas as propriedades funcionais do concentrado proteico obtido a partir do método rápido de extração alcalina. Além disso, suas propriedades foram comparadas com as de dois concentrados proteicos comerciais produzidos por extração enzimática (com o uso de amilases para a remoção da fração amilácea). Nesse trabalho foi observado que todos os concentrados proteicos avaliados apresentaram pobres propriedades funcionais, devido sobretudo a suas baixas solubilidades em condições de pH próximas à neutralidade e levemente ácidas. O tipo de extração empregado não teve influência representativa nas propriedades funcionais dos concentrados proteicos testados. Desta forma, concluiu-se ser necessário estudos que visem a melhoria da solubilidade destas proteínas quando se busca uma aplicação mais

abrangente das mesmas como ingredientes para a indústria de alimentos. Esses resultados motivaram a proposição da terceira hipótese desta tese.

- 3) *É possível melhorar a solubilidade da proteína de arroz a partir da realização de modificações enzimáticas em sua estrutura.*

Tal hipótese foi avaliada buscando-se responder à quinta questão de pesquisa.

- 5) A hidrólise enzimática das proteínas a um baixo grau de hidrólise permite a melhoria de suas propriedades funcionais. É possível melhorar a solubilidade da proteína de endosperma de arroz com a hidrólise enzimática parcial? Que rendimentos podem ser obtidos neste processo?

Esta questão foi respondida na quarta etapa deste estudo, apresentada no Capítulo 9 desta tese, onde avaliou-se a aplicação da hidrólise enzimática parcial do concentrado proteico na solubilização da proteína de endosperma de arroz. A melhoria da solubilidade foi escolhida por ser esta uma das principais propriedades funcionais das proteínas, e que influencia nas demais propriedades. Nesse trabalho a hidrólise foi realizada com Alcalase® de forma controlada, a fim de se obter um grau de hidrólise inferior a 10 %, por ser indicado na literatura que baixos graus de hidrólise permitem a melhoria das propriedades funcionais das proteínas. (VIOQUE *et al.*, 2001). A hidrólise realizada permitiu a solubilização de 40 % da proteína originalmente presente na suspensão de proteína extraída pelo método alcalino. Os peptídeos solúveis gerados apresentaram massa molar média de $1,18 \pm 0,33$ kDa, solubilidade proteica superior a 88,5 % na faixa de pH de 3 a 7 e boa capacidade de formação de espuma, apesar de formarem uma espuma de baixa estabilidade. É importante destacar que o perfil sensorial do hidrolisado não foi avaliado, e que mais estudos são necessários neste sentido, uma vez que a hidrólise enzimática de proteínas pode acarretar a geração de notas sápidas amargas no hidrolisado.

A quarta hipótese proposta para esta tese foi a seguinte.

- 4) *A tecnologia de membranas pode ser aplicada no processo de obtenção de ingredientes a partir do arroz quebrado, visando a melhoria da performance das etapas pós-extração, na obtenção de ingredientes com maior pureza e na minimização das perdas ao longo do processo.*

Os resultados obtidos na primeira etapa deste estudo motivaram inicialmente o emprego da microfiltração na separação das correntes de amido e proteína do extrato alcalino. Frente à revisão de literatura realizada, foram propostas as questões de pesquisa 6, 7 e 8.

- 6) A aplicação da microfiltração foi testada em alguns estudos que buscaram a recuperação do amido na corrente de concentrado e das proteínas na corrente de permeado. Os autores sugeriram o uso de membranas com poros maiores para diminuir a retenção de proteína. À luz de nosso conhecimento, não foi relatada na literatura até o momento a

aplicação da microfiltração na recuperação do amido de arroz extraído pelo método alcalino. A microfiltração pode ser utilizada na recuperação deste amido na corrente de concentrado e na recuperação das proteínas no permeado, se for utilizada uma membrana com poros maiores do que os relatados?

- 7) Foi sugerido que a presença de amido gelatinizado na suspensão pode acarretar a formação de incrustações durante a microfiltração. Um pré-tratamento enzimático seria eficaz na sua redução?
- 8) É possível realizar a purificação do amido de arroz com diafiltrações durante a microfiltração?

O terceiro trabalho realizado neste estudo, apresentado no Capítulo 8 desta tese, buscou responder estas questões. Foi avaliado o comportamento do fluxo de permeado durante o processo de separação do amido e da proteína por microfiltração; analisada a influência de um pré-tratamento enzimático no desempenho da operação; e avaliado o efeito do tipo de diluente na remoção de proteína e sódio do amido durante a etapa de diafiltração descontínua, analisando a possibilidade de se obter um amido com elevada pureza e uma corrente de permeado contendo a proteína extraída.

Frente aos resultados observados, foi possível verificar que a microfiltração se mostrou uma técnica capaz de possibilitar a purificação do amido de arroz, necessitando, porém, de mais estudos a fim de encontrar os parâmetros ideais para o melhor desempenho do processo. Observou-se que o pré-tratamento enzimático aplicado na suspensão oriunda da extração alcalina não foi satisfatório para minimizar as incrustações. Pelo contrário, o mesmo contribuiu para a desestabilização do sistema, aumentando a tendência de formação de incrustações ao longo da operação. A realização de diafiltrações com água deionizada permitiu a obtenção de uma corrente de concentrado isenta de proteína, entretanto, as proteínas, mesmo possuindo massas molares inferiores ao tamanho dos poros da membrana utilizada, não atravessaram a estrutura, não podendo ser recuperadas. A força iônica do meio apresentou um papel fundamental na separação com o tipo de membrana utilizada (cerâmica, com porosidade nominal de 1,4 μm). Isto porque a alteração causada neste parâmetro pelo uso de água deionizada como diluente durante as diafiltrações possivelmente tenha sido responsável pela adesão da proteína à membrana, o que impossibilitou sua recuperação na corrente de permeado.

Desta forma, a análise global dos resultados obtidos no trabalho da aplicação da microfiltração na recuperação do amido de arroz na corrente de concentrado e da proteína na corrente de permeado permite que seja destacado que a escolha da microfiltração para o processo de separação do amido e da proteína de arroz deve ser avaliada com cautela. Isto porque a centrifugação é uma técnica bastante eficaz, não apresentando, à luz dos conhecimentos

disponíveis atualmente na literatura e aos resultados deste trabalho, desvantagens tão marcantes quando comparada com a microfiltração. Possivelmente o estudo da aplicação da microfiltração na recuperação de pequenos grânulos de amido de arroz de difícil sedimentação e que acabam sendo perdidos na corrente de saída da centrífuga possa ser uma aplicação mais eficiente desta tecnologia nesse processo. Assim seria possível diminuir as perdas de amido do processo e melhorar a pureza da corrente de extrato proteico obtida nesta etapa. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a eficiência desta aplicação.

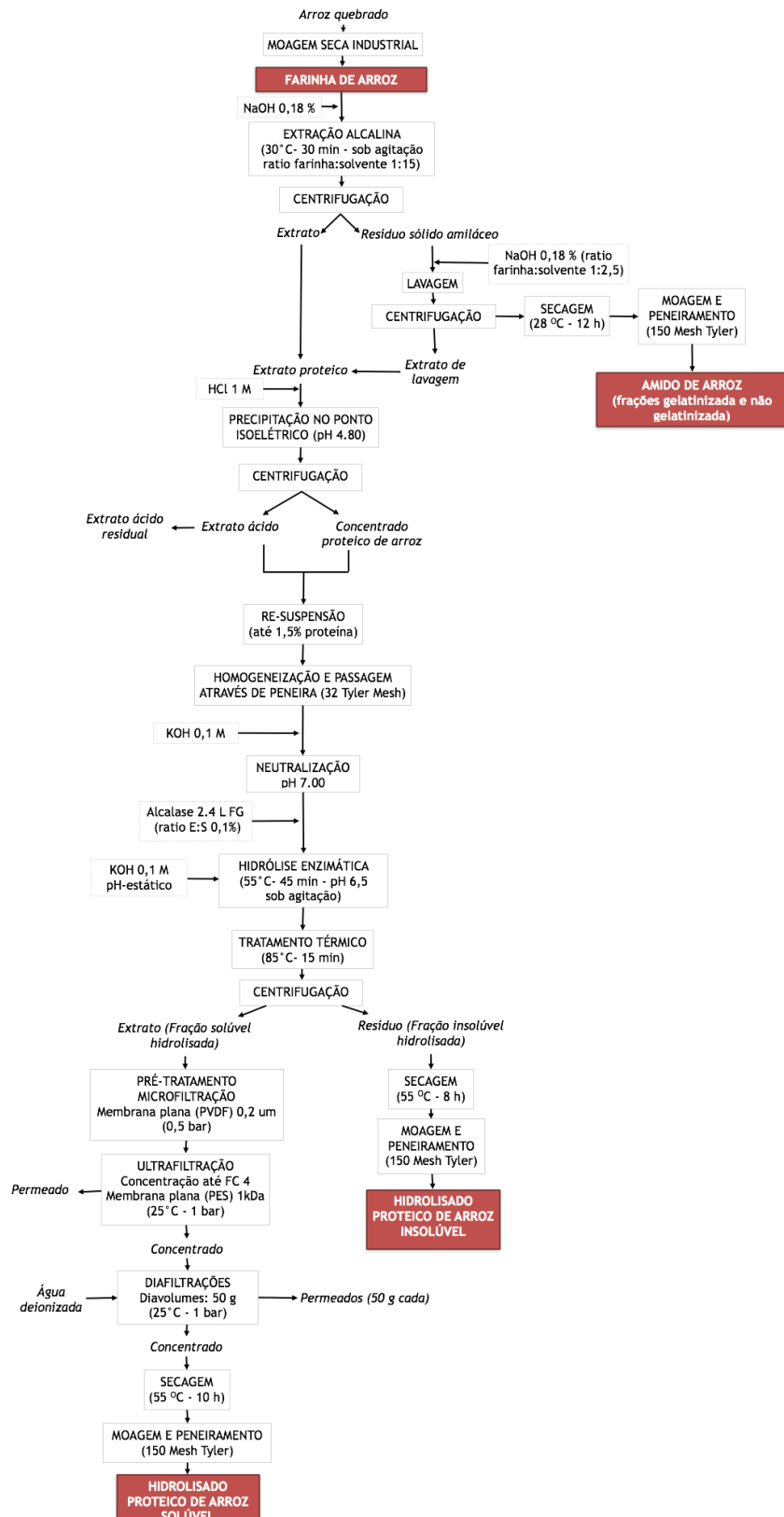
A partir dos resultados obtidos no terceiro trabalho desta pesquisa, optou-se por realizar a separação do amido por centrifugação, obtendo-se uma corrente de extrato proteico com as proteínas em solução. Nesta altura da pesquisa, após se verificar ser possível solubilizar parte da proteína do extrato alcalino por hidrólise enzimática, buscou-se estudar a aplicação da ultrafiltração na concentração da fração solúvel do hidrolisado proteico. Isto porque, outra desvantagem do uso do método alcalino, com a utilização de NaOH como solvente, reside na elevada concentração de sódio nos produtos da extração. Desta forma, foi proposta a nona questão de pesquisa desta tese.

- 9) A ultrafiltração pode ser empregada na concentração e purificação de hidrolisado proteico solúvel de arroz? Qual o rendimento da operação? Que grau de purificação pode ser alcançado?

Esta questão foi respondida no quarto trabalho realizado nesta pesquisa, apresentado no Capítulo 9 desta tese, onde foi estudada a concentração e purificação da corrente de hidrolisado solúvel com ultrafiltração (utilizando uma membrana polimérica de 1 kDa), em comparação com a concentração por evaporação à pressão reduzida. A aplicação da ultrafiltração permitiu a redução de 70 % do conteúdo mineral total e 68 % do conteúdo de sódio do hidrolisado solúvel, em comparação com o hidrolisado concentrado por evaporação à pressão reduzida. Além disso, observou-se que o hidrolisado concentrado por ultrafiltração apresentou uma solubilidade ligeiramente maior que o concentrado por evaporação, possivelmente devido às temperaturas empregadas na operação. Entretanto, quase 30 % dos peptídeos permearam a membrana durante a operação, possivelmente devido às suas massas molares serem inferiores ou próximas a 1 kDa, a massa molar de corte nominal da membrana. Desta forma, mais estudos são necessários para a avaliação do uso deste coproduto, uma vez que muito tem sido relatado atualmente na literatura acerca das propriedades de peptídeos de baixa massa molar. Há relatos de aplicação de peptídeos deste tipo tanto como aditivos naturais (antioxidantes, por exemplo), quanto como ingredientes bioativos por apresentarem atividades biológicas no organismo humano.

Frente ao exposto, com os trabalhos produzidos nesta pesquisa, entende-se que as quatro hipóteses levantadas nesta tese puderam ser confirmadas. Na Figura 10.1 é possível observar o fluxograma do processo completo proposto e avaliado nesta tese.

Figura 10.1: Fluxograma do processo completo proposto e avaliado nesta tese.



É importante destacar que nesta pesquisa se buscou ajustar um processo produtivo que permitisse a obtenção de ingredientes com adequadas propriedades nutricionais e funcionais. Entretanto, mais estudos são necessários para a obtenção de maiores informações que possibilitem a melhoria da eficiência do processo sugerido. Neste aspecto, a continuidade desta pesquisa pode compreender a realização dos seguintes trabalhos:

- a) avaliar a influência do grau de danificação do amido da farinha de arroz na minimização da geração da fração de amido gelatinizado na extração alcalina pelo método rápido;
- b) avaliar a performance da microfiltração da corrente de extrato proteico oriunda da centrifugação, com o intuito de realizar a recuperação de pequenos grânulos de amido presentes na corrente;
- c) estudar a aplicação da ultrafiltração em substituição à precipitação isoelétrica para concentrar as proteínas do extrato alcalino, e de diafiltrações para a purificação da proteína;
- d) avaliar diferentes graus de hidrólise para melhorar as demais propriedades funcionais do hidrolisado, tendo em vista a possibilidade de obter um produto não totalmente solúvel, mas que contenha fragmentos de proteína que podem ser mantidos estáveis em suspensão;
- e) avaliar as características sensoriais do hidrolisado, principalmente as notas sápidas amargas, estudando estratégias para a minimização da sua percepção sensorial;
- f) avaliar a aplicação do hidrolisado proteico em formulações de alimentos;
- g) avaliar os peptídeos da corrente de permeado, buscando identificar potenciais atividades como aditivo alimentar ou ingrediente bioativo;
- h) avaliar a aplicação de mais diafiltrações para aumentar o grau de remoção do sódio do hidrolisado proteico;
- i) estudar a aplicação da osmose reversa na recuperação da água das correntes finais de permeado, tendo em vista a minimização da geração de efluentes líquidos no processo.