



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

MAYARA SILVA RODRIGUES

**DEGOMAGEM ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE FARELO DE ARROZ: EFEITO NO
TEOR DE FÓSFORO, RENDIMENTO DO PROCESSO E PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS**

CAMPINAS
2020

MAYARA SILVA RODRIGUES

**DEGOMAGEM ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE FARELO DE ARROZ: EFEITO NO
TEOR DE FÓSFORO, RENDIMENTO DO PROCESSO E PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Klicia Araujo Sampaio

Este trabalho corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Mayara Silva Rodrigues, orientada pela Prof^a. Dr^a. Klicia Araujo Sampaio.

**CAMPINAS
2020**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

R618d Rodrigues, Mayara Silva, 1993-
Degomagem enzimática de óleo de farelo de arroz: efeito no teor de fósforo, rendimento do processo e propriedades físico-químicas / Mayara Silva Rodrigues. – Campinas, SP: [s.n.], 2020.

Orientador: Klicia Araujo Sampaio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fosfolipases. 2. Óleo de farelo de arroz. 3. Fosfolipídios. I. Sampaio, Klicia Araujo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Enzymatic degumming of rice bran oil: effect on phosphorus content, process yield and physical and chemical properties

Palavras-chave em inglês:

Phospholipases

Rice bran oil

Phospholipids

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Guilherme José Máximo

Ana Paula Badan Ribeiro

Gisele Atsuko Medeiros Hirata

Data de defesa: 28-07-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7114-5341>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2911068603574398>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme José Máximo (Presidente)

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Badan Ribeiro (Titular)

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Gisele Atsuko Medeiros Hirata (Titular)

Faculdade de Engenharia Química– UNIFESP

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

“Um dia você aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.”
(William Shakespeare)

DEDICATÓRIA

A Deus.

Dedico esta dissertação as pessoas que amo:

À minha querida mãe, Evalda, sempre presente e torcendo por mim.

Ao meu querido pai, Robério, sempre atencioso nos momentos difíceis.

À minha querida avó, Tereza, por ser tão forte e sábia.

Ao meu querido irmão Ray, que mesmo tão jovem se tornou apoio.

Ao meu querido companheiro, Daniel, que sempre com muita paciência e amor esteve comigo em todos os momentos.

A todos os meus amigos e familiares que mesmo longe sempre estiveram presentes.

AGRADECIMENTOS

À UNICAMP e ao Departamento de Engenharia de Alimentos pela oportunidade a mim proporcionada.

À Profa. Dra. Klicia Araujo Sampaio, pela orientação, atenção, disponibilidade e por acreditar que este trabalho poderia se tornar realidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (133760/2018-9) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Aos membros da banca, pelo enriquecimento do conteúdo deste trabalho.

A Paula e Marcela, pelo apoio durante execução dos experimentos.

Aos meus amigos, em especial, Kátia Pires, Cíntia Castro, Sabrina Matias e Maria Evaneide por estarem sempre presentes nos momentos importantes, sejam eles alegres ou tristes.

Agradeço à família Nigro Lopes, por todo o apoio durante a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A demanda por óleos vegetais para consumo doméstico e industrial tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. O óleo de farelo de arroz é um óleo vegetal altamente nutritivo, pois é rico em tocois e γ -orizanol. A degomagem é a primeira etapa no refino de óleos vegetais e tem como principal objetivo a remoção dos fosfolipídios ou gomas. Dentre os processos de degomagem amplamente aplicados, a degomagem enzimática que faz o uso de enzimas denominadas fosfolipases é o único processo que garante redução dos teores de fósforo (<10 mg/kg) independente da qualidade inicial do óleo. A fosfolipase A₁ (PLA₁) hidrolisa a primeira ligação acil éster gerando lisofosfolipídios e ácidos graxos livres como subprodutos. A fosfolipase C (PLC) por sua vez, atua liberando moléculas de diacilgliceróis, aumentando também o rendimento em óleo neutro. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar parâmetros de processo tais como concentração de enzima e tempo de reação, aplicados ao óleo de farelo de arroz para as enzimas PLA₁ e PLC-1G, combinação (PLC-1G/PLA₁) e para o coquetel (PLC-3G). Inicialmente foi feita a caracterização do óleo bruto e a degomagem aquosa, onde foi observado que o teor de 3% de água era o mais apropriado. Após isso, foi realizado o condicionamento químico para obter as melhores condições de pH para enzima atuar e seguiu-se para as degomagens. Dessa forma, foi utilizada a enzima PLA₁, em que foi observada uma redução no teor de fósforo (P) para 10,4 mg/kg, sendo que a concentração de enzima considerada ideal foi de 50 mg/kg obtendo-se um aumento em AGL, em termos relativos, de 91,4%. Em seguida foi feita a degomagem com a enzima Purifine[®] PLC (PLC-1G), em que a concentração ótima escolhida foi de 300 mg/kg e foi verificado que ocorreu diminuição do teor de fósforo para 67,6 mg/kg e aumento de DAG até 91,1% para 120 min de reação. As combinações de PLC-1G/PLA₁ e o coquetel (PLC-3G) apresentaram aumento nos valores de DAG e AGL, além de baixos teores (5 mg/kg) de fósforo (P), para os diferentes tempos de reação (60 e 120 min). Foi verificado que o teor de γ -orizanol e de tocois não variou durante o processo de degomagem enzimática apresentando valores próximos ao observado no condicionamento químico. Assim, as enzimas utilizadas nos processos de degomagem enzimática foram eficazes e mantiveram os componentes minoritários presentes no óleo.

Palavras-chave: óleos vegetais, fosfolipases, degomagem enzimática, fosfolipídios, componentes minoritários.

ABSTRACT

The demand for vegetable oils for domestic and industrial use has significantly increased in recent years. Rice bran oil is a highly nutritious vegetable oil, as it is rich in tocopherols and γ -oryzanol. Degumming is the first step in the vegetable oil refining process and its main objective is the removal of phospholipids or gums. Among the widely applied degumming processes, enzymatic degumming using phospholipase enzymes is the only process that guarantees a reduction in the phosphorus levels (<10 mg/kg) regardless of the initial quality of the oil. Phospholipase A₁ (PLA₁) hydrolyzes the first acyl ester bond, generating lysophospholipids and free fatty acids as by-products. Phospholipase C (PLC), in its turn, acts by releasing diacylglycerol molecules, also increasing neutral oil yield. Thus, the objective of the present work was to evaluate process parameters such as chemical conditioning, enzyme concentration and rate of reaction, applied to rice bran oil for the enzymes PLA₁ and PLC-1G, combination (PLC-1G/PLA₁) and cocktail (PLC-3G). Initially, the characterization of crude oil and water degumming were performed, where it was observed that the 3% water content was the most appropriate. After this, chemical conditioning was performed in order to obtain the best pH and temperature conditions for the enzyme to act. Thus, the enzyme PLA₁ was used, in which a reduction in the content of phosphorus (P) to 10.4 mg/kg was observed, with the enzyme concentration considered ideal being 50 mg/kg, obtaining an increase in AGL, in relative terms, of 91.4%. Then, degumming was performed with the enzyme Purifine[®] PLC (PLC-1G), in which the optimum concentration was 300 mg/kg and it was found that the phosphorus content decreased to 67.6 mg/kg and increased DAG up to 91.1% for 120 min of reaction time. The combinations of PLC-1G/PLA₁ and the cocktail (PLC-3G) presented low levels of phosphorus (P), close to 5 mg/kg for 60 and 120 min of reaction, and increased DAG and FFA. It was verified that the content of γ -oryzanol and tocopherols did not vary during the enzymatic degumming process, presenting values close to that observed in chemical conditioning. Thus, the enzymes used for enzymatic degumming processes were effective and kept the minor components present in the oil.

Keywords: vegetable oils, phospholipases, enzymatic degumming, phospholipids, minor components.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da constituição do grão de arroz.

Figura 2 - Exemplo de hidrólise do triacilglicerol formando uma molécula de diacilglicerol e uma de ácido carboxílico.

Figura 3 - Etapas do processamento do arroz em casca até a separação em óleo e farelo.

Figura 4 - Estrutura química de base dos tocoferóis e tocotrienóis (a) e (b).

Figura 5 - Estrutura química dos principais fosfolipídios presentes em óleos vegetais.

Figura 6 - Estrutura química dos principais componentes do gama-orizanól.

Figura 7 - Etapas do refino químico e físico

Figura 8 - Mecanismo de ação das fosfolipases.

Figura 9 - Diagrama experimental do processo de degomagem aplicado ao óleo de farelo de arroz.

Figura 10 - Sistema utilizado para experimentos de degomagem. a) Ultraturrax; b) Agitador.

Figura 11 - Óleo bruto e óleo degomado de farelo de arroz.

Figura 12 - Teor de minerais após degomagem aquosa do óleo de farelo de arroz bruto.

Figura 13 - Teor de ácidos graxos livres no óleo de farelo de arroz após degomagem aquosa.

Figura 14 - Efeito da concentração da enzima Lecitase Ultra sobre a redução do teor de minerais (condições da reação: 120 min; 3% água; pH 5,1; 52 °C).

Figura 15 - Aumento relativo em ácidos graxos livres após degomagem enzimática com diferentes concentrações de PLA₁.

Figura 16 - Teor de minerais após degomagem com a enzima PLA₁ (Lecitase Ultra) em diferentes tempos de reação.

Figura 17 - Aumento relativo em ácidos graxos livres após diferentes tempos de reação com PLA₁.

Figura 18 - Teor de minerais após degomagem com diferentes concentrações da enzima PLC-1G.

Figura 19 - Teor de minerais após cinética com PLC-1G.

Figura 20 - Teor de minerais da combinação (PLC - 1G/PLA₁) e do coquetel de PLC - 3G para o tempo de 60 min de reação.

Figura 21 - Teor de minerais da combinação (PLC - 1G/PLA₁) e do coquetel de PLC - 3G por 120 min.

Figura 22 - Aumento relativo em ácidos graxos livres para diferentes tempos de reação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição em ácidos graxos do óleo de farelo de arroz.

Tabela 2 - Teor de tocois (mg/kg) em diferentes tipos de óleos vegetais brutos.

Tabela 3 - Velocidade relativa de hidratação dos fosfatídios a 80°C.

Tabela 4 - Principais fosfolipases comerciais utilizadas em degomagem enzimática de óleos vegetais.

Tabela 5 - Caracterização do óleo bruto de farelo de arroz.

Tabela 6 - Teor de minerais e composição em fosfolipídios do óleo de farelo de arroz bruto.

Tabela 7 - Teor de tocois (mg/kg) após degomagem aquosa do óleo de farelo de arroz.

Tabela 8 - Teor de tocois (mg/kg) após degomagem com PLA₁.

Tabela 9 - Teor de tocois (mg/kg) após degomagem a 50 mg/kg de PLA₁ ao longo do tempo.

Tabela 10 - Composição em acilglicerois do óleo de farelo de arroz degomado com diferentes concentrações de PLC – 1G.

Tabela 11 - Teor de tocois (mg/kg) após degomagem com diferentes concentrações de PLC-1G.

Tabela 12 - Composição em acilglicerois do óleo de farelo de arroz degomado em diferentes tempos de reação para enzima PLC-1G.

Tabela 13 - Teor de tocois (mg/kg) após degomagem com PLC-1G ao longo do tempo.

Tabela 14 - Composição em acilglicerois do óleo de farelo de arroz após degomagem com combinações das enzimas PLC - 1G e PLA₁ e coquetel da enzima PLC - 3G.

Tabela 15 - Concentração em (mg/kg) de tocoferois e tocotrienóis presentes nas combinações (PLA₁ e PLC-1G) e no coquetel (PLC-3G).

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo do índice de acidez.

Equação 2. Cálculo de AGL em ácido oleico.

Equação 3. Cálculo dos fosfolipídios hidrolisados por PLC.

Equação 4. Cálculo do aumento de DAG (DAYTON & GALHARDO, 2008).

Equação 5. Cálculo do aumento de DAG (DAYTON & GALHARDO, 2008) após degomagem com PLC – 3G.

Equação 6. Cálculo do teor de ácidos graxos livres.

LISTA DE ABREVIACÕES

TAG: Triacilglicerol

DAG: Diacilglicerol

MAG: Monoacilglicerol

AGL: Ácidos graxos livres

HPL: Fosfolipídios Hidratáveis

NHPL: Fosfolipídios Não Hidratáveis

P: Fósforo

PL: Fosfolipídio

Mg: Magnésio

NaOH: Hidróxido de sódio

Fe: Ferro

Ca: Cálcio

CC: Condicionamento Químico

WDG: Degomagem Aquosa

EDG: Degomagem enzimática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1. Arroz	20
3.1.1. Estrutura e composição do grão	20
3.2. Farelo de arroz	22
3.3. Obtenção de óleos por extração usando solvente	24
3.4. Óleo de farelo de arroz.....	25
3.4.1. Tocoferóis e tocotrienóis	27
3.4.2. Fosfolípidios	30
3.4.3. Gama-Orizanol	32
3.5. Refino.....	33
3.5.1. Degomagem.....	35
<i>Degomagem Aquosa</i>	35
<i>Degomagem Ácida</i>	35
3.6. Degomagem enzimática de óleos vegetais	36
3.6.1. Coquetel PLC-3G	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Matéria-prima	40
4.2. Análises físico-químicas	40
4.2.1. Análise de acidez livre	40
4.2.2. Composição em acilglicerois	41
4.2.3. Minerais.....	41
4.2.4. Análise de pH.....	41
4.2.5. Análise de ressonância magnética nuclear (RMN)	41
4.2.6. Umidade do óleo e das gomas.....	42
4.3. Análise dos componentes minoritários	42
4.3.1. Tocoferóis e Tocotrienóis.....	42
4.3.2. Análise de Gama-orizanol.....	42
4.4. Aplicação da degomagem no óleo de farelo de arroz	43
4.5. Degomagem aquosa.....	45

4.6. Condicionamento químico (CC).....	45
4.7. Degomagem enzimática.....	46
4.8. Cálculo do teor de diacilglicerol (DAG).....	46
4.9. Cálculo do teor de ácidos graxos livres (AGL)	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Caracterização da matéria-prima	48
5.2. Degomagem aquosa.....	51
5.3. Degomagem enzimática (PLA ₁)	54
5.4. Cinética de reação (PLA ₁)	58
5.5. Degomagem enzimática (PLC-1G)	61
5.6. Cinética de reação (PLC-1G).....	64
5.7. Degomagem com combinação de enzimas/coquetel	68
5.7.1. Uso de PLC-1G/ PLA ₁ por (60 min) e PLC-3G por 60 min	68
5.7.2. Uso de PLC-1G/PLA ₁ (120 min) e PLC-3G (120 min).....	70
6. CONCLUSÃO.....	76
7. SUGESTÕES TRABALHOS FUTUROS	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICES	88
APÊNDICE 1. Cromatograma referente à análise de tocois do óleo de farelo de arroz bruto por UPLC.....	88
APÊNDICE 2. Cromatograma referente à análise de tocois do óleo de farelo de arroz degomado com a enzima PLA ₁ por UPLC.....	89

1. INTRODUÇÃO

A produção nacional de arroz alcançou 10,4 milhões de toneladas para a safra de 2018/2019 e a produção da safra de 2019/2020 está estimada em 10,6 milhões de toneladas. Apesar de o arroz ser uma cultura comum em quase todo o país, a maior parte da produção ocorre em dois estados, sendo eles Rio Grande do Sul e Santa Catarina. O Rio Grande do Sul, onde predomina o arroz irrigado, concentra 70,5% da produção nacional. A produção gaúcha foi estimada em 7,3 milhões de toneladas. Santa Catarina, segundo produtor nacional, estimou uma produção de 1,1 milhão de toneladas (IBGE, 2020).

O óleo de farelo de arroz bruto é definido como óleo obtido a partir de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) por procedimentos tecnológicos adequados, como por exemplo, a extração (ANVISA, 1999; CODEX ALIMENTARIUS, 2015). Este óleo tem na sua composição frações saponificáveis e insaponificáveis. Os principais compostos presentes na fração saponificável são triglicerídeos e fosfolipídios, enquanto os tocoferóis, tocotrienóis, e o γ -orizanol, antioxidantes amplamente conhecidos, são encontrados na fração insaponificável (ENGELMANN et al., 2016).

Para que se atinja o grau comestível, o óleo bruto, resultado do processo de extração, deve ser submetido ao processo de refino, cujo objetivo é remover impurezas e compostos indesejáveis (BASIRON, 2005). A degomagem é a primeira etapa no refino de óleos vegetais e tem como principal objetivo a remoção dos fosfolipídios ou gomas. Os principais fosfolipídios presentes no óleo de arroz são: fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) e ácido fosfatídico (PA). Os fosfolipídios são classificados de acordo com o seu grau de hidratação em hidratáveis e não hidratáveis. Os fosfolipídios hidratáveis (HPL) se tornam insolúveis em óleo na presença de água e são facilmente separados por centrifugação. Os fosfolipídios não hidratáveis (NHPL), em sua grande maioria, estão complexados com os sais de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e ferro (Fe) e para serem removidos necessitam da adição de um agente quelante (ácido cítrico, EDTA) para sequestrar os íons metálicos, possibilitando sua precipitação e separação por centrifugação. A taxa de hidratação dos fosfolipídios em ordem decrescente é definida como: fosfatidilcolina > fosfatidilinositol > fosfatidiletanolamina > ácido fosfatídico (COWAN; KORSHOLM, 2009).

Diversos métodos de purificação têm sido estudados para a remoção dos fosfolípidios, dentre estes se destacam a degomagem aquosa e as diferentes variações da degomagem ácida tais como super degomagem, degomagem completa, e a degomagem total. Porém, em todas as técnicas citadas, o teor de fósforo final depende da qualidade do óleo vegetal bruto, decorrendo em uma grande variabilidade dos resultados (DIJKSTRA, 2010). A degomagem enzimática é o processo que converte os fosfolípidios NHPL em sua forma hidratável (HPL), através do uso de enzimas conhecidas como fosfolipases (LAW, 2009). A nível comercial, a fosfolipase A (PLA) e a fosfolipase C (PLC) são as mais comumente utilizadas para o processo de degomagem, pois além de reduzirem teor de fósforo também atuam aumentando o rendimento em óleo neutro através da liberação de ácidos graxos ou diacilgliceróis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da degomagem enzimática na redução do teor de fósforo e rendimento do óleo de farelo de arroz, bem como avaliar parâmetros físico-químicos e teor de componentes minoritários após o processo de degomagem.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a melhor condição de processo em relação à porcentagem de água adicionada ao óleo de farelo de arroz bruto, de forma a obter melhor rendimento e menor teor de fósforo;
- Determinar as melhores condições de processo em relação à concentração de enzima para as fosfolipases PLA₁ e PLC-1G adicionadas ao óleo de farelo de arroz bruto, de forma a obter melhor rendimento e menor teor de fósforo;
- Estudar a cinética de redução do teor de fósforo no óleo de farelo de arroz bruto para diferentes tempos de reação (15, 30, 60, 90, 120 min) para a condição ótima de cada enzima (PLA₁ e PLC-1G);
- Avaliar o efeito conjunto das enzimas PLC-1G/PLA₁ e do coquetel PLC-3G após a degomagem do óleo de farelo de arroz bruto;
- Analisar a influência da degomagem enzimática sobre os parâmetros físico-químicos e teor de componentes minoritários (tocoferóis, tocotrienóis e γ -orizanol) presentes no óleo de farelo de arroz.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial. Sua importância é destacada principalmente em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social. A produção mundial anual de arroz é de aproximadamente 606 milhões de toneladas. Nesse cenário, o Brasil participa com aproximadamente 13 milhões de toneladas (2,17% da produção mundial) (FAO, 2017).

O arroz é um produto com pequeno comércio internacional. Os dez maiores produtores são: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Brasil e Japão. O Brasil, com uma produção anual, base casca, de 13 milhões de toneladas de arroz nas últimas safras, participa com 79,3% da produção do MERCOSUL (na média de 2008/09 até 2014/15) (SOSBAI, 2010).

A produção de arroz ocorre em diversos estados, sob várias condições ambientais e manejo, o que é assegurada pela sua ampla adaptabilidade. O Rio Grande do Sul é o estado brasileiro que mais produz arroz com sistema de irrigação por inundação. Enquanto que o sistema de produção de arroz de terras altas é o mais difundido territorialmente com produção em Mato Grosso, Goiás, Piauí, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins (BRASIL, 2017).

O beneficiamento do arroz produz quatro tipos de produtos: o arroz integral, o branco polido, o integral parboilizado e o parboilizado polido. A aparência do grão de arroz influencia diretamente na compra e em sua aceitação pelos consumidores, pois se sabe que a cor branca e translúcida é a mais aceita, sendo o arroz branco o mais consumido dentre todos os tipos existentes (SANTESTEVEAN, 2011).

3.1.1. Estrutura e composição do grão

O grão de arroz é formado pela cariopse e por uma camada protetora, a casca. Esta última corresponde a cerca de 20% do peso do grão. A cariopse é formada por diferentes camadas, sendo as mais externas o pericarpo, tegumento e aleurona, que representam 5 - 8% da massa do arroz integral. A camada de aleurona apresenta duas estruturas de

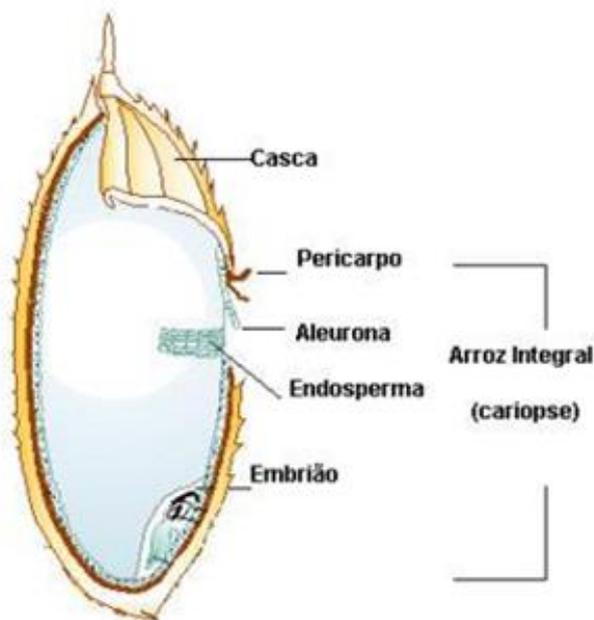
armazenamento, os grãos de aleurona (corpos proteicos) e os corpos lipídicos. O gérmen está localizado na base do grão, é rico em proteínas e lipídios, e representa 2 - 3% do arroz integral. O endosperma forma a maior parte do grão (89 - 94% do arroz integral) e é formado por células ricas em grânulos de amido e com alguns corpos protéicos (JULIANO; BECHTEL, 1985).

Através da descascagem, separa-se a casca da cariopse, obtendo-se o arroz integral. Esse pode ser polido para remoção do farelo (pericarpo, tegumento, camada de aleurona e gérmen), que representa 8,5 - 14,8% do arroz integral (JULIANO; BECHTEL, 1985), obtendo-se o arroz branco polido. Os grãos também podem ser submetidos à parboilização, processo hidrotérmico de gelatinização do amido através do qual se obtém o arroz parboilizado, o qual pode ser consumido na forma integral ou polido.

O arroz é constituído principalmente por amido, apresentando quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e cinzas. Entretanto, a composição do grão e de suas frações está sujeita a diferenças varietais, variações ambientais, de manejo, de processamento e de armazenamento (ZHOU et al., 2002), produzindo grãos com características nutricionais diferenciadas. Além disso, os nutrientes não estão uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão. As camadas externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibra, minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido. Dessa forma, o polimento resulta em redução no teor de nutrientes, exceto de amido, originando as diferenças na composição entre o arroz integral e o polido.

A Figura 1 apresenta um desenho esquemático de um grão de arroz e suas divisões. Um aspecto interessante na produção do arroz é que durante o processo de polimento retira-se o gérmen, causando uma diminuição no teor de gordura e também na possibilidade de oxidação, aumentando significativamente a vida de prateleira do mesmo.

Figura 1. Desenho esquemático da constituição do grão de arroz.



Fonte: GALERA, 2006

3.2. Farelo de arroz

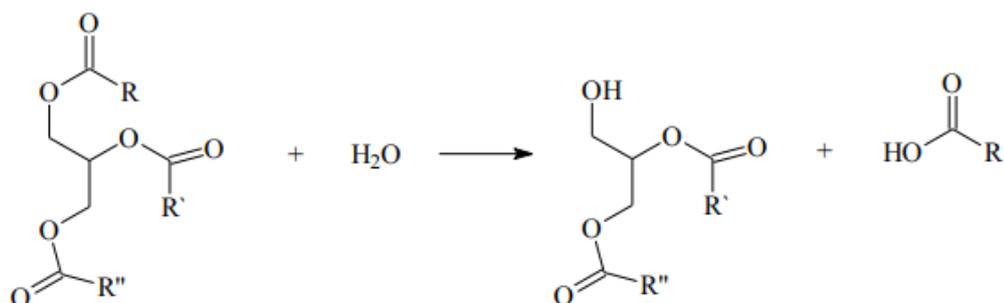
O farelo, um dos subprodutos resultantes do beneficiamento do arroz, representa de 8% a 11% do peso total do grão, sendo obtido a partir do seu polimento (PARRADO et al., 2006). O farelo de arroz apresenta aspecto farináceo, fibroso e suave ao tato. O pericarpo, o tegumento, a camada de aleurona e o gérmen (embrião) são eliminados durante a operação de polimento na forma de farelo de arroz, restando o endosperma (grão de arroz polido) (LAKKAKULA et al., 2004).

O farelo de arroz contém teores variáveis de amido proveniente do endosperma, além de resíduos da casca e de fragmentos de grão, devido ao processo de descasque e polimento do cereal. No farelo de boa qualidade, esses contaminantes são indesejáveis e devem ser evitados tanto quanto possível (CARVALHO; VIEIRA, 1999).

A maior limitação para a utilização do farelo de arroz tem sido a sua natureza altamente instável durante o armazenamento, devido ao seu elevado teor de lipídios. Após o polimento do arroz, as enzimas presentes no farelo (lipase, fosfolipase, glicolipase, lipoxigenase e oxidase) hidrolisam rapidamente os triacilglicerois, aumentando o teor de

ácidos graxos livres (Figura 2) e o desenvolvimento de odores e sabor de ranço (MUJAHID et al., 2005).

Figura 2. Exemplo de hidrólise do triacilglicerol formando uma molécula de diacilglicerol e uma de ácido carboxílico.



Fonte: MARTINS et al., 2013

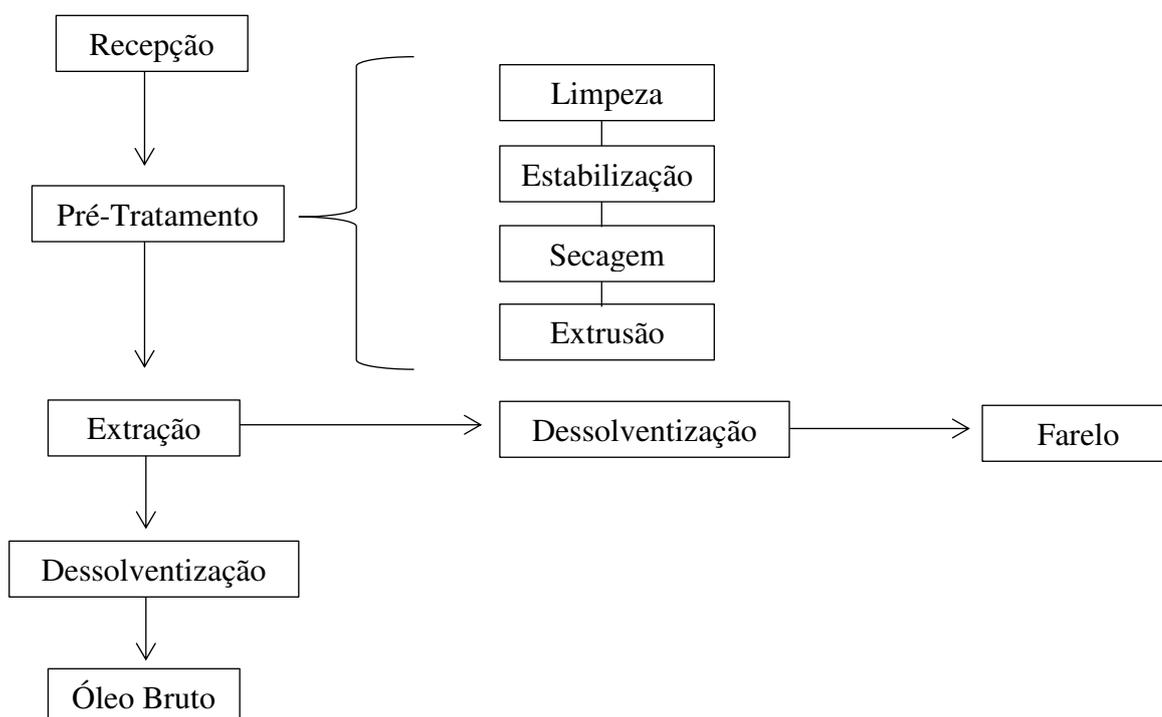
De acordo com a origem, expressivas variações podem ser encontradas para a composição química do farelo de arroz. A avaliação de produtos oriundos dos EUA, Espanha, Itália, Japão, México, Nepal e Sri Lanka revelou teores de proteínas entre 11,5 a 17,2%; teores de lipídios variando de 12,8 a 22,6%; fibra bruta de 6,2 a 14,4%; extrato não nitrogenado entre 33,5 e 53,5%, e percentual de cinzas na faixa de 8,0 e 15,4% (BERMUDES, 1994).

O elevado conteúdo de lipídios do farelo de arroz (entre 12,8 a 22,6%), aliado ao seu baixo valor comercial, justificam seu emprego majoritário como matéria-prima para indústria de extração de óleo comestível (SILVA; SANCHES; AMANTE, 2001). O óleo de arroz apresenta alta resistência à oxidação devido ao alto teor de tocoferóis e gama-orizanol, que apresentam ação antioxidante. A remoção do óleo não prejudica o uso do farelo para posterior aproveitamento, pois o conteúdo de proteína e demais substâncias é preservado durante o processo de extração, exceto as vitaminas lipossolúveis, que ficam mais concentradas no óleo (LEMOS; SOARES, 2000).

Antes da extração geralmente, o farelo de arroz passa por um pré-tratamento em que ele passa por extrusão, o que lhe confere maior estabilidade e aumenta o fluxo de solvente durante a etapa de extração do óleo (ORTHOEFER, 2005). Na Figura 3 podem ser visualizadas as etapas do processamento que vai até a extração do óleo e separação do farelo.

Inicialmente a matéria-prima possui alta umidade, o que pode causar diminuição no rendimento do óleo e no conteúdo proteico do farelo resultante. Dessa forma, a matéria-prima passa primeiramente pela etapa de recebimento, onde a umidade é reduzida a aproximadamente 13%, no intuito de diminuir os danos ao longo do processamento e armazenamento, aumentando sua estabilidade (ANDERSON, 2005).

Figura 3. Etapas do processamento do arroz em casca até a separação em óleo e farelo.



Fonte: Adaptado de ANDERSON (2005)

3.3. Obtenção de óleos por extração usando solvente

O óleo bruto utilizado no presente estudo foi extraído por solvente pela empresa Irgovel. Segundo Terigar et al. (2011) há dois processos geralmente utilizados para extração de óleos vegetais e a escolha por um deles depende das características da matéria-prima. A primeira é a extração por prensagem mecânica e a segunda, a extração por solventes. Quando a matéria-prima oleaginosa apresenta alto teor de óleo é mais vantajosa a prensagem mecânica, entretanto em alguns casos o teor de óleo por esse método não se mostra

satisfatório e a extração por solventes é a solução mais viável, como é o caso do farelo de arroz.

Normalmente, o óleo de farelo de arroz é extraído por solvente químico orgânico (hexano), o qual dissolve o óleo residual da torta deixando-o praticamente sem óleo (MANDARINO; ROESSING, 2001). Outros casos como a soja e o algodão, que apresentam baixo conteúdo de óleo, ou seja, têm menos de 20% do peso dos grãos de material graxo, os grãos após serem torrados e moídos sofrem diretamente a extração por solvente (RAMALHO; SUAREZ, 2013).

Atualmente o solvente mais utilizado é o hexano, por satisfazer uma série de exigências apropriadas para a operação, sendo elas: dissolver com facilidade o óleo, não agindo sobre outros componentes dos grãos; possuir composição homogênea e estreita faixa de temperatura de ebulição, em torno de 70 °C, que diminui a decomposição do óleo; ser imiscível em água, não formando azeótropos; e ter baixo calor latente de ebulição. Entretanto, este solvente apresenta algumas desvantagens, como a alta inflamabilidade e o alto custo (MANDARINO; ROESSING, 2001; RAMALHO; SUAREZ, 2013; PEREIRA, 2009).

O óleo é solubilizado no solvente através de dois mecanismos: a dissolução por simples contato entre as células vegetais desfeitas durante a prensagem ou moagem, ou por meio de difusão, em que o óleo atravessa lentamente as paredes semipermeáveis das células intactas para o meio líquido. A dissolução é um processo rápido e fácil. Já o processo de difusão é mais demorado e dependente da mistura óleo e solvente através da parede celular semipermeável (CARVALHO, 2011; RAMALHO; SUAREZ, 2013). Observa-se então, que durante a extração dos grãos laminados ou triturados, a velocidade do desengorduramento é, no começo muito rápido, diminuindo com o decorrer do processo (MANDARINO; ROESSING, 2001; CARVALHO 2011). O óleo resultante do processo de extração por solvente é chamado de óleo bruto. Para ser consumido, o óleo bruto, necessita passar pelas etapas posteriores de refino (RAMALHO; SUAREZ, 2013).

3.4. Óleo de farelo de arroz

O interesse mundial no óleo de farelo de arroz (RBO) tem aumentado consideravelmente, uma vez que é uma fonte natural rica em antioxidantes e contém uma

composição equilibrada de ácidos graxos, a maioria deles de valor nutricional, farmacêutico e cosmético (JESUS et al., 2010; CHEN et al., 2011). O óleo comestível obtido do farelo de arroz é apreciado especialmente no leste da Ásia. No Japão, aproximadamente 80 mil toneladas desse óleo são consumidas anualmente. Esse óleo recebeu atenção por apresentar grande quantidade de compostos nutracêuticos como o γ -orizanol, tocoferóis e tocotrienóis, sendo os dois últimos componentes da família da vitamina E (DANIELSKI et al., 2005). O γ -orizanol foi inicialmente encontrado no óleo de farelo de arroz em 1954. Como foi isolado do óleo obtido a partir do arroz (*Oryza sativa*) e continha um grupo hidroxila em sua estrutura, foi convenientemente chamado de orizanol. Estudos posteriores revelaram que o orizanol não é um composto simples e sim uma mistura de ésteres do ácido ferúlico (GRAF, 1992).

O óleo do farelo de arroz é constituído por cerca de 81 a 84% de triacilgliceróis, 2 a 3% de diacilgliceróis, 1 a 2% de monoacilgliceróis e 2 a 6% de ácidos graxos livres. Ainda, apresenta frações variáveis de glicolipídios (0,8%), fosfolipídios (1 - 2%), ceras (3 - 4%) (GHOSH, 2007). Os lipídios saponificáveis contidos no óleo de farelo de arroz perfazem um total de 90 - 96% do total, enquanto os insaponificáveis estão entre 3 e 8%, contendo predominantemente esteróis e álcoois triterpênicos e apresenta apenas traços de colesterol, sendo comparativamente encontrada maior quantidade de material insaponificável em óleo de farelo de arroz do que em outros óleos vegetais (LEMOS; SOARES, 2000).

De acordo com a Tabela 1, a composição dos ácidos graxos corresponde a cerca de 18% de ácidos graxos saturados, 45% de ácidos graxos monoinsaturados e 37% de ácidos graxos poliinsaturados. Os principais ácidos graxos saturados são os ácidos palmítico (12 - 18%) e esteárico (1,0 - 3%) e os principais insaturados são os ácidos oleico (38 - 50%), linoleico (22 - 42%) e linolênico (0 - 1%) (ROGERS et al., 1993).

O óleo de farelo de arroz apresenta benefícios ímpares à saúde, os quais podem ser atribuídos principalmente ao alto nível de matéria insaponificável. Do conteúdo de matéria insaponificável, 43% são esteróis e correlatos (orizanois, tocoferóis e tocotrienóis), 28% ácidos triterpênicos, 10% 4-metil esteróis e menos de 19% representam compostos polares (esqualeno, outros hidrocarbonetos e álcoois alifáticos) (RODRIGUES; ONOYAMA; MEIRELLES, 2006). As diferenças na composição se devem aos aspectos de cultivo, como solo e variabilidades climáticas. Investigações têm demonstrado que a ingestão do óleo de farelo de arroz causa uma redução no colesterol de baixa densidade (LDL) e também do

acúmulo de gorduras nas artérias o que a literatura atribui à matéria insaponificável (ROGERS et al., 1993).

Tabela 1. Composição em ácidos graxos do óleo de farelo de arroz

Ácido graxo	Nome	%
C14: 0	Ácido mirístico	0,1 - 1,0
C 16:0	Ácido palmítico	12,0 - 18,0
C 16:1	Ácido palmitoléico	0,2 - 0,6
C 18:0	Ácido esteárico	1,0 - 3,0
C 18:1	Ácido oleico	38,0 - 50,0
C 18:2	Ácido linoleico	22,0 - 42,0
C 18:3	Ácido linolênico	0,0 - 1,0
C 20:0	Ácido araquídico	0,0 - 1,0

Fonte: ROGERS et al., 1993

O óleo de farelo de arroz, em comparação com outros óleos evidencia algumas vantagens como sua alta resistência à oxidação durante cocção. Além disso, suas propriedades nutricionais o fazem disputar espaço com os óleos de gergelim e oliva. Como desvantagem tem-se o maior custo em relação a outros óleos devido a uma maior complexidade no processo de refino, fator responsável por sua menor produção em alguns países (RODRIGUES; ONOYAMA; MEIRELLES, 2006).

Segundo Prasad et al. (2011), o óleo de farelo de arroz apresenta efeitos benéficos ao organismo, principalmente para o tratamento de doenças crônicas, agindo como um agente antiolesterolêmico, apresentando benefícios para o sistema cardiovascular e atuando como agente antitumoral.

3.4.1. Tocoferóis e tocotrienóis

A vitamina E corresponde a oito diferentes compostos, nomeados α -, β -, γ -, δ -, (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis. O α -tocoferol encontra-se presente na maioria dos óleos vegetais, em sementes oleaginosas e alimentos de origem animal. Sendo assim, os óleos vegetais comestíveis, além de possuírem altas concentrações de tocoferóis e

alguns tocotrienóis, apresentam grande consumo em todo o mundo, sendo, portanto, os alimentos de maior contribuição para a ingestão de vitamina E (GUINAZ, 2009).

Segundo Berger et al. (2005) e Rajam et al. (2005), dentre os óleos vegetais, o óleo de farelo de arroz é um dos mais nutritivos e saudáveis. Considerado rico em componentes minoritários, torna-se atrativo por suas características nutracêuticas e também pela composição equilibrada em ácidos graxos. Na matéria insaponificável presente no óleo os constituintes nutricionalmente mais importantes são o gama-orizanol, tocoferóis e tocotrienóis (tocois), sendo os dois últimos os que compõem a vitamina E.

O conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis está relacionado com o processamento aplicado. Dessa forma, dependendo do processamento utilizado durante a extração e refino do óleo, o teor de tocoferóis pode ser diminuído em até 80%. Além disso, perdas podem acontecer depois na etapa de estocagem, por exposição ao oxigênio, luz, altas temperaturas, entre outros fatores (PESTANA, 2008).

O óleo de farelo de arroz bruto contém níveis relativamente elevados de tocois, dos quais 70% corresponde a tocotrienóis (Figura 4). Entre os óleos comestíveis essa condição é rara. No entanto, o conteúdo destes compostos é, muitas vezes, reduzido em função da falta de cuidados no armazenamento e processamento (RAJAM et al., 2005). A Tabela 2 mostra o teor de tocois para diferentes tipos de óleo.

Tabela 2. Teor de tocois (mg/kg) em diferentes tipos de óleos vegetais brutos.

Óleo	Tocoferol (mg/kg)				Tocotrienol (mg/kg)		
	β	α	γ	δ	α	γ	δ
Arroz	ND - 47	49 - 583	ND - 212	ND - 31	ND - 627	142 - 790	ND - 59
Soja	ND - 36	9 - 352	89 - 2307	154 - 932	ND - 69	ND - 103	ND
Milho	ND - 356	23 - 573	268 - 2468	23 - 75	ND - 239	ND - 450	ND - 20
Palma	ND - 234	4 - 193	ND - 526	ND - 123	4 - 336	14 - 710	ND - 377
Girassol	ND - 45	403 - 935	ND - 34	ND - 7	ND	ND	ND

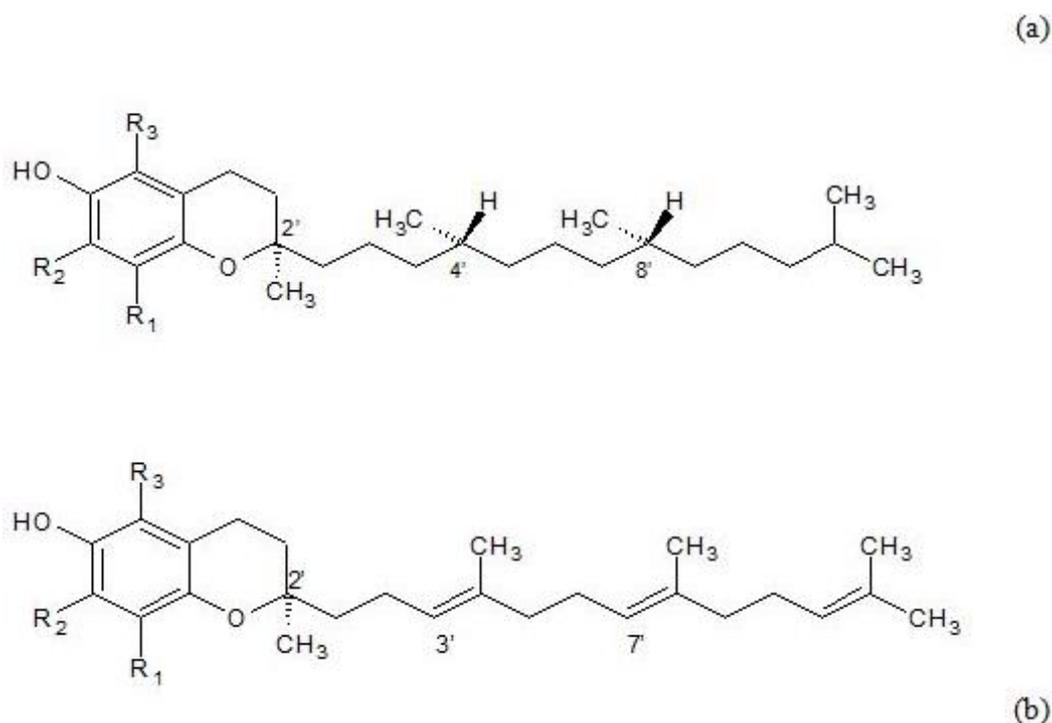
Fonte: CODEX STAN 210, (2015); ND: Não detectado.

Segundo Prasad et al. (2011), os tocoferóis e tocotrienóis, possuem ação antioxidante, isto é, combatem os radicais livres no organismo e sugerem também que as variações gama e delta dos tocotrienóis inibem o crescimento de células cancerígenas no

organismo. Alguns dados da literatura afirmam que os tocotrienóis são mais efetivos do que os tocoferóis e possuem maior estabilidade (KHOR; NG, 2000; CÍCERO et al., 2001).

O efeito hipocolesterolêmico do tocotrienol está relacionado a um mecanismo de inibição da produção de colesterol. Ele age inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGCoA), responsável pela síntese do colesterol (CÍCERO et al., 2001).

Figura 4. Estrutura química de base dos tocoferóis (a) e tocotrienóis (b)



ISÔMEROS	R ₁	R ₂	R ₃
(II) Alfa (α-)	CH ₃	CH ₃	CH ₃
(III) Beta (β-)	CH ₃	H	CH ₃
(IV) Gama (γ-)	H	CH ₃	CH ₃
(V) Delta (δ-)	H	H	CH ₃

Os tocoferóis são encontrados normalmente em nozes e óleos vegetais comuns como, germen de trigo e girassol, os tocotrienóis estão concentrados nos grãos de cereais (aveia, cevada) e alguns óleos vegetais como de palma e óleo de farelo de arroz (THERIAULT et al., 1999).

3.4.2. Fosfolipídios

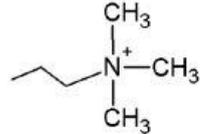
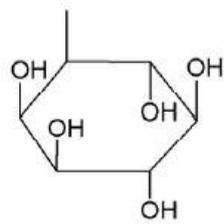
Os lipídios complexos conhecidos como fosfolipídios são também chamados glicerofosfolipídios ou glicerol-fosfatídios. São os principais componentes das membranas celulares, sendo que somente quantidades muito pequenas ocorrem em outros locais da célula. Os fosfolipídios são definidos pela presença de um poliálcool esterificado com ácido graxo e com ácido fosfórico (H_3PO_4). O ácido fosfórico, por sua vez, apresenta-se também esterificado a um álcool aminado (colina, etanolamina), ou um aminoácido (serina), ou mesmo a um poliálcool cíclico chamado inositol. Os fosfolipídios, em contraste com os triacilgliceróis, são substâncias com funções tanto polares quanto apolares, isto explica propriedades importantes, pois constituem uma ponte entre gorduras e fase aquosa, também tem grande facilidade para formar lipoproteínas (celular), constituindo membranas (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Para o refino de óleos, os fosfolipídios são divididos em duas categorias, os quais são denominados hidratáveis e não hidratáveis. A adição de água torna os fosfolipídios hidratáveis (HPL) dilatados, formando géis ou precipitados, facilitando assim sua separação do óleo através do processo de centrifugação. Os fosfolipídios não hidratáveis (NHPL) são transformados em formas hidratáveis através da utilização de ácidos ou outros agentes como EDTA, sendo, portanto, removidos juntamente com os fosfolipídios hidratáveis (O'BRIEN, 2000).

A quantidade de fosfolipídios presente nos óleos vegetais é variável e está na faixa de 1 - 4%. Os mais comuns são fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) e ácido fosfatídico (PA). A fosfatidiletanolamina (PE) e ácido fosfatídico (PA) são não hidratáveis quando complexados com sais de cálcio e magnésio, e a fosfatidilcolina (PC) e o fosfatidilinositol (PI) não se apresentam complexados e são hidratáveis (OLIVEIRA, 2012). Os fosfolipídios predominantes no óleo de farelo de arroz são: fosfatidilcolina (41 - 42%), fosfatidiletanolamina (31 - 33%) e fosfatidilinositol (15 - 17%) (MANO et al., 1999).

A estrutura molecular dos fosfolipídios determina a sua capacidade de hidratação e separação do óleo. Na Figura 5 verifica-se a estrutura dos 3 principais fosfolipídios e do ácido fosfatídico. Segundo Diez (2000), além da hidratabilidade, também fatores cinéticos interferem na eficiência de remoção dos fosfolipídios.

Figura 5. Estrutura química dos principais fosfolipídios presentes em óleos vegetais.

Estrutura de X	Nome OH-X	Nome do Fosfolipídio
	Água	Ácido fosfatídico
	Etanolamina	Fosfatidil etanolamina
	Colina	Fosfatidil colina
	Mioinositol	Fosfatidil inusitol

Fonte: DIEZ,2000

Tabela 3. Velocidade relativa de hidratação dos fosfatídios a 80 °C.

Fosfolípido	PC	PI	PI-Ca	PE	PE-Ca	PA	PA-Ca
Velocidade relativa de hidratação	100	44	24	16	0,9	8,5	0,6

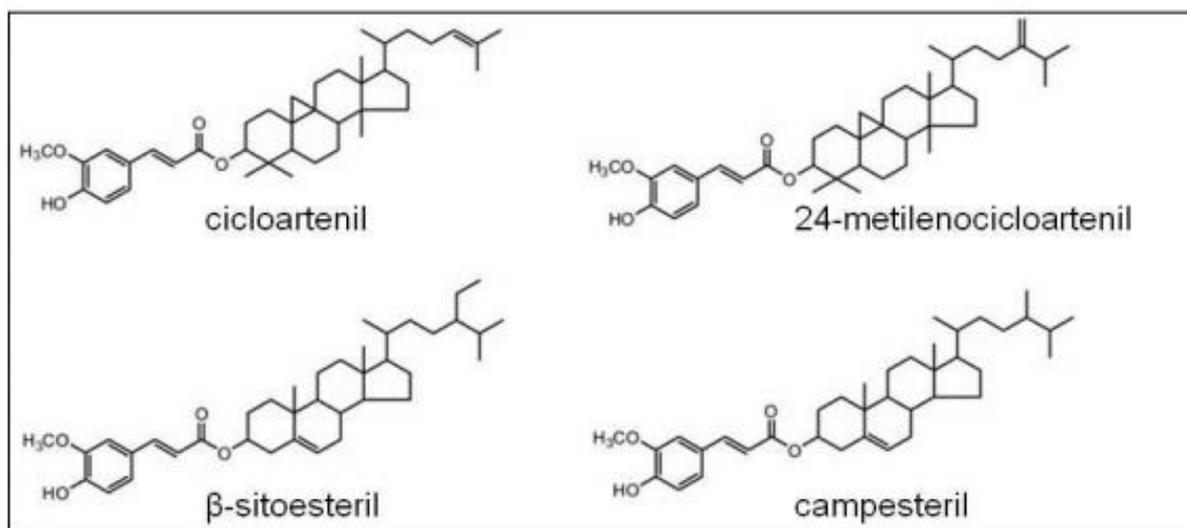
Fonte: DIEZ, 2000

O tempo de contato entre o óleo e a água tem alguma influência no estabelecimento do equilíbrio cinético. O tempo de contato não é, no entanto o único fator que afeta a cinética de hidratação dos fosfatídios; a interface óleo/água e a distância de difusão nessa interface (ou seja, a qualidade da dispersão da água no óleo) também apresentam influência.

3.4.3. Gama-Orizanol

O γ -orizanol representa cerca de 2% do óleo, dependendo da variedade do arroz e é constituído por uma mistura complexa de ésteres de ácido ferúlico com fitosteróis e álcoois triterpênicos (JULIANO et al., 2005). O ácido ferúlico, esterificado com esteróis em plantas, como nos orizanois, aumenta o potencial antioxidante, favorecendo o acesso molecular a componentes hidrofóbicos, que são mais susceptíveis à destruição celular oxidativa. O potencial antioxidante dos orizanois também é potencializado por agentes sinérgicos, como fosfolípidios, aminoácidos e α -tocoferóis, presentes em grande quantidade no farelo de arroz (SILVA; SANCHES; AMANTE, 2001). Mais de 23 ésteres dos ácidos ferúlico e caféico já foram identificados no γ -orizanol, sendo os principais componentes (mais de 80% da fração do γ -orizanol) o 24-metileno cicloartenil ferulato, cicloartenilferulato ou cicloartenol, β -sitoesterilferulato e campesterilferulato ou campesterol (FANG; YU; BADGER, 2003). Na Figura 6 encontram-se as estruturas químicas dos principais componentes do γ -orizanol.

Figura 6. Estrutura química dos principais componentes do gama-orizanol



Fonte: Adaptado de SANTESTEVAN (2011)

Wilson et al. (2007), demonstraram que no óleo de farelo de arroz, o orizanol e o ácido ferúlico possuem atividade de diminuição do colesterol por diferentes mecanismos de ação. O orizanol exerce grande efeito na diminuição dos níveis de LDL e aumento do HDL no

plasma e o ácido ferúlico possui grande capacidade antioxidante devido a sua habilidade de manter os níveis de vitamina E no soro sanguíneo.

A popularidade do farelo de arroz e seu óleo vêm aumentando e deverá encorajar ainda mais os consumidores conscientes com a saúde, por apresentar características interessantes, tanto tecnologicamente, quanto nutricionalmente (KAHLON, 2009). Neste sentido, torna-se extremamente importante avaliar cuidadosamente como as variáveis utilizadas no processo de refino e mais especificamente da etapa de degomagem impactam no rendimento e composição química do óleo, de maneira que se preserve a composição do produto obtido.

3.5. Refino

O refino é o processo de remoção das impurezas presentes nos óleos, podendo ser naturais ou formadas em etapas anteriores do processamento. O refino de óleos vegetais pode seguir duas vias distintas: química ou física (Figura 7). A principal diferença entre os dois tipos de refino está na remoção dos ácidos graxos livres (AGL). Enquanto no refino químico os AGL são removidos pela adição de soda cáustica, no refino físico a remoção é feita através do processo de destilação durante a etapa de desodorização/desacidificação que ocorrem conjuntamente (KELLENS; DE GREYT, 2000). Ambos os processos consistem na degomagem (opcional para o refino químico), desacidificação, branqueamento e desodorização. Winterização e pré-branqueamento podem ser necessários para certos óleos ou aplicações.

O conteúdo de fosfolipídios e a acidez são os fatores que norteiam a escolha do tipo de refino a ser realizado em óleos comestíveis. O refino químico requer um óleo com baixa acidez e não exige baixo conteúdo de fosfolipídios. Já para a realização do refino físico o óleo ao sair da degomagem deve conter teores de fósforos menores que 10 mg/kg e pode ser aplicado a óleos de elevada acidez. No refino físico o conteúdo de compostos que contêm fósforo deverá ser diminuído (< 5 mg/kg após o branqueamento) para se obter um produto final de qualidade superior (AUTINO, 2012).

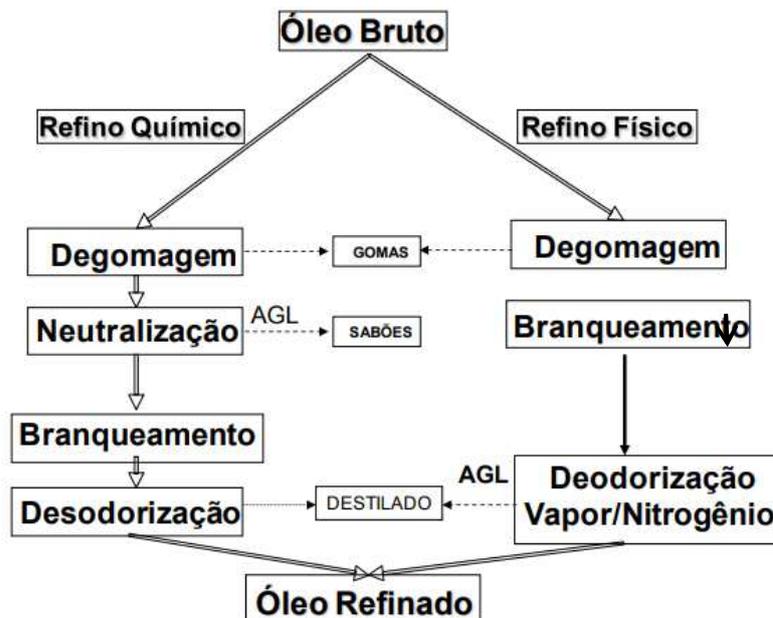
O refino químico é composto pelas etapas de neutralização, onde se utiliza o NaOH; clarificação, em que os pigmentos são adsorvidos geralmente por terras clarificantes e desodorização, onde os ácidos graxos remanescentes são eliminados, juntamente com os

aldeídos e cetonas presentes no óleo. O processo por via química apresenta algumas desvantagens, como alto consumo de energia, elevado consumo de água e produção de efluentes (RIBEIRO et al., 2005). Já o refino físico apresenta várias vantagens como, por exemplo, produtos de alto valor econômico como o gama-orizanol e os tocois que podem ser utilizados em indústrias de alimentos, farmacêuticas, entre outras.

Segundo Krishna et al. (2001), durante o refino físico o teor de γ -orizanol no óleo de farelo de arroz se manteve aproximadamente o mesmo do óleo bruto, indicando que o refino físico não provoca mudanças significativas na quantidade de γ -orizanol, diferentemente do que ocorre no refino químico, onde ocorrem variações consideráveis durante a etapa de neutralização, pois o γ -orizanol é separado com o sabão formado durante esta etapa.

O refino de um óleo bruto deve resultar em um produto com boa aparência, paladar neutro, resistente à oxidação e livre de substâncias tóxicas e indesejáveis. Por outro lado, este processo deve preservar os compostos desejáveis (triacilgliceróis e compostos minoritários) no óleo refinado e, proteger o óleo final de prováveis reações secundárias que produziriam compostos indesejáveis (KARLESKIND; WOLFF, 1996).

Figura 7. Etapas do refino químico e físico



Fonte: Adaptado de Kellens e De Greyt, 2000

3.5.1. Degomagem

O óleo vegetal bruto contém um grande número de compostos de natureza graxa não triglicéridica em diferentes teores de acordo com a natureza do óleo envolvido. A produção de óleos refinados de alta qualidade requer o máximo possível de remoção de materiais indesejáveis, com um dano mínimo aos triacilgliceróis e tocoferóis associado à perda mínima de óleo neutro (GUNSTONE, 1983).

A degomagem é a primeira etapa do refino e seu intuito é remover os fosfolipídios presentes no óleo vegetal, além de facilitar o armazenamento e transporte do óleo bruto. Os fosfolipídios podem causar escurecimento no óleo e serem precursores de sabores indesejáveis. Dessa forma, a remoção é essencial para a produção de um óleo de boa qualidade (CALHEIROS, 2007).

Degomagem Aquosa

A degomagem aquosa é o método mais simples para a remoção de fosfolipídios a partir de óleos vegetais. No entanto, apenas os HPL podem ser removidos durante esse tipo de degomagem, resultando em teores de fósforo no óleo degomado entre 80 - 150 mg/kg. Esses valores podem oscilar dependendo do tipo e da qualidade do óleo bruto e da presença de NHPL (GIBON; TIRTIAUX, 2000).

Nesse processo, os fosfolipídios (gomas) são hidratados, tornando-se insolúveis no óleo e são removidos por centrifugação. A temperatura é um fator de grande importância para degomagem aquosa. Uma baixa temperatura (60 °C) nessa etapa resulta em uma melhor degomagem, mas a custo de maiores perdas de óleo nas gomas; com temperatura mais alta (80 °C) as perdas serão reduzidas, entretanto, mais gomas permanecerão no óleo (ZAMBIAZI, 2003).

Degomagem Ácida

A degomagem ácida pode ser considerada uma alternativa ao processo de degomagem aquosa, pois utiliza um ácido combinado com água. O óleo é tratado por um ácido, geralmente ácido fosfórico ou ácido cítrico na presença de água. O teor de fósforo após a degomagem varia de 15 - 80 mg/kg dependendo dos diferentes tipos e da qualidade do óleo bruto. Para óleos contendo quantidades relativamente baixas de NHPL (por exemplo, óleo de

girassol), este processo pode conduzir a um teor de fósforo residual mais baixo (5 a 30 mg/kg) do que a degomagem aquosa. O processo é geralmente realizado em temperaturas em torno de 80 °C (CAMPBELL et al., 1983).

No processo de degomagem ácida, o ácido fosfórico forma um precipitado ou o ácido cítrico forma um complexo com cálcio e magnésio. Porém, devido ao elevado teor de fósforo residual, o óleo ainda requer um pós-tratamento para que siga para o refino físico no qual teores abaixo de 10 mg/kg são requeridos (CAMPBELL et al., 1983).

3.6. Degomagem enzimática de óleos vegetais

Recentemente, desenvolvimentos têm sido realizados com o uso da degomagem enzimática, que possui várias vantagens sobre os métodos químicos, como maiores rendimentos de óleo refinado, menor geração de efluentes e menor uso de produtos químicos (DIJKSTRA 2011; HAMMOND et al., 2005). A degomagem enzimática é um método de remoção de fosfolipídios em que fosfolipases são usadas para converter os fosfolipídios não hidratáveis (NHPL) em uma forma hidratável (HPL), promovendo posteriormente a hidrólise dos mesmos. Para serem considerados bem sucedidos, os métodos de degomagem devem reduzir o nível de fósforo no óleo para valores menores que 10 mg/kg. A atuação das fosfolipases libera óleo neutro na forma de ácidos graxos livres ou diacilgliceróis, os quais aumentam o rendimento do óleo (SAMPAIO et al., 2015). A Tabela 4 apresenta as principais fosfolipases utilizadas em degomagem enzimática de óleos vegetais.

Tabela 4. Principais fosfolipases comerciais utilizadas em degomagem enzimática de óleos vegetais

Fornecedor	Nome comercial	Tipo de enzima
Novozymes	Lecitase Ultra	PLA ₁
Novozymes	Lecitase [®] 10L	PLA ₂
Novozymes	Lecitase [®] Novo	PLA ₁
Novozymes	Quara Low P	PLA ₁
DSM	Purifine [®] PLC (1 ^o geração)	PLC
DSM	Purifine [®] PLC (3 ^o geração)	Coquetel (PLA ₂ , PLC-PI, PLC-1G)
DSM	Gumzyme [™]	PLA ₂
Danisco	Lysomax [®]	PLA ₂
Verenium	Purifine [™]	PLC
AB Enzymes	Rohalase [®] PL XTRA	PLA ₂

Fonte: Adaptado de Dayton & Galhardo (2020)

O processo de degomagem enzimática foi lançado industrialmente na década de 90 sob o codinome “Enzymax”, o qual consistia em três etapas principais, sendo estas: o ajuste do pH do meio através da adição de uma solução tampão; realização da reação enzimática; e a separação das gomas e do óleo degomado (AALRUST et al., 1992). No entanto, o processo “Enzymax” não encontrou grande aplicação industrial devido ao alto custo da enzima, sua relativa baixa estabilidade e seletividade, e também ao fato de ser utilizada uma lipase proveniente do pâncreas de porco.

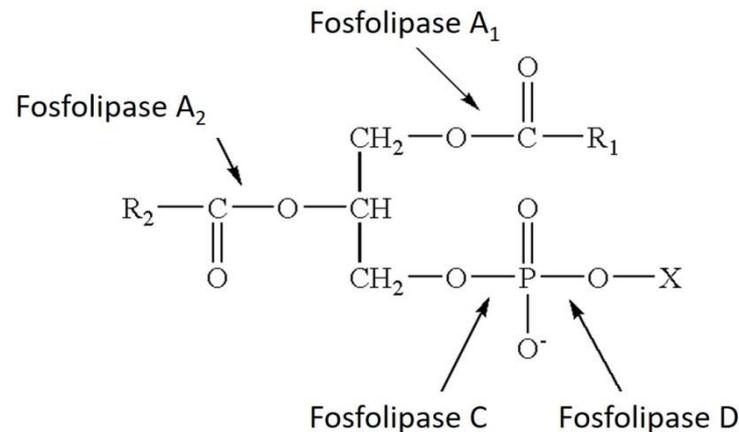
Atualmente, tem-se observado um grande interesse das indústrias processadoras de óleos vegetais no processo de degomagem enzimática. Uma das principais razões está relacionada à otimização das enzimas. Desta forma, enzimas mais estáveis, com custos mais acessíveis e de diferentes fornecedores se tornaram disponíveis no mercado. Além disso, o processo de degomagem enzimática não é apresentado apenas como um processo eficiente de degomagem, mas também como um processo que pode aumentar o rendimento do refino dos óleos vegetais através da redução das perdas de óleo neutro causadas por arraste mecânico, e também através da degradação das moléculas de fosfolipídios produzindo AGL e DAG (COWAN; KORSHOLM, 2009).

Nos últimos anos, diferentes tipos de fosfolipases comerciais de origem microbiana têm sido utilizados para a degomagem de óleos vegetais. Os principais tipos de fosfolipases são: A₁, A₂, C, e D e seus sítios ativos variam de acordo com sua especificidade (Figura 8) (CLAUSEN, 2001). As fosfolipases A₁ (PLA₁) e A₂ (PLA₂) liberam um ácido graxo da molécula de fosfolipídio, resultando em um lisofosfolipídio e um ácido graxo. Para tempos de reação suficientes, ambas as enzimas são relativamente não seletivas, podendo degradar praticamente todos os fosfolipídios.

Em estudos realizados utilizando a PLA₁ (Lecitase Ultra) os teores de fósforo do óleo de farelo de arroz e óleo de soja foram reduzidos para menos de 5 mg/kg e 6 mg/kg após 6 horas, respectivamente (JAHANI et al., 2008). No caso da PLA₂ (Lecitase 10 L), o conteúdo de fósforo do óleo de soja foi enzimaticamente degomado para 4,9 mg/kg após 5 h (JIANG et al., 2011). Roy et al., (2002) realizaram a degomagem enzimática usando Lecitase Ultra com o óleo de farelo de arroz e os resultados indicaram que a degomagem mediada pela fosfolipase A₁ não conseguiu reduzir o teor de fósforo no óleo de farelo de arroz para níveis adequados (< 10 mg/kg). No caso do óleo de colza, o nível de fósforo foi reduzido para <5

mg/kg utilizando uma fosfolipase A₁ de *Fusarium oxysporum* com o nome comercial de Lecitase® Novo (CLAUSEN, 2001).

Figura 8. Mecanismo de ação das fosfolipases. Onde X= H, colina, inositol, etanolamina, serina, etc.



A fosfolipase C originária da levedura *Pichia pastoris* (DSM Company), também conhecida como Purifine® 1G (PLC-1G) atua diretamente na ligação entre o glicerol e o fosfato, liberando um grupo fosfato ligado a um éster, o qual é solúvel em água e uma molécula de DAG, que fica retida na fase oleosa, contribuindo para o rendimento do processo. A PLC-1G é uma enzima seletiva, atuando na degradação dos dois principais fosfolípidos presentes no óleo (PC e PE) (SAMPAIO et al., 2019). Dessa forma, reduzindo problemas de emulsificação e o consequente arraste mecânico. Além disso, as PLCs não geram ácidos graxos livres como subproduto e, portanto, não aumentam a acidez do óleo degomado, o que pode impactar positivamente no processo de refino do óleo e do produto final (CLAUSEN 2001; DIJKSTRA 2011; YANG et al., 2008). No entanto, a desvantagem da fosfolipase C é que, em geral, não degrada o PA e PI, resultando em um óleo com teores de fósforos similares à degomagem aquosa (50 - 150 mg/kg).

Jiang et al. (2015) estudaram a degomagem enzimática de diferentes óleos brutos, sendo três variedades de óleo de soja, três de colza, um de óleo de farelo de arroz e um de camélia utilizando a fosfolipase A₁ (PLA₁) e a fosfolipase C (PLC) originária do *Bacillus cereus*. Os autores verificaram que a PLC utilizada poderia catalisar a separação do grupo

fosfato de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina sem pré-tratamento ácido, conseqüentemente, liberando diacilglicerol (DAG) solúvel em óleo, o que melhoraria o rendimento do produto após o processo de degomagem. Porém, os teores de fósforo em todos os óleos degomados estudados ficaram entre 12 – 126 mg/kg. Sampaio et al. (2019) avaliaram o processo de degomagem enzimática do óleo de milho bruto (951 mg/kg) utilizando a fosfolipase PLC-1G e obteve um teor de fósforo no óleo de degomado de 27 mg/kg. Como pode ser verificado, em ambos os casos os teores de fósforo ainda são superiores aqueles necessários para seguir o processo de refino físico. Uma forma para se resolver esse problema seria o uso de coquetéis onde as enzimas PLA e PLC são usadas combinadas no processo industrial.

3.6.1. Coquetel PLC-3G

A Purifine[®] 3G (PLC-3G) é um coquetel de fosfolipases formado pelas enzimas PLA₂, PLC-1G, e PLC-PI. A PLC-1G atua na degradação da PC e PE, a PLC-PI atua na degradação do PI (fosfatidilinositol), enquanto a PLA₂ atua na hidrólise do PA (ácido fosfatídico) e dos demais fosfolipídios remanescentes. A atuação em conjunto garante a redução do teor de fósforo a valores abaixo de 10 mg/kg, além do aumento do conteúdo de óleo neutro do óleo degomado.

O coquetel PLC-3G apresenta alguns benefícios em relação a outras enzimas, como por exemplo, maior rendimento de óleo, portanto, maior lucro. A enzima PLC 3G separa os fosfolipídios do óleo, aumentando a produção de óleo pela captura de diglicerídios na fase oleosa. Com isso, a PLC-3G reduz drasticamente o volume da goma e reduz sua capacidade de formar uma emulsão. Menos formação de emulsão significa menor perda de rendimento de óleo devido ao óleo retido, enquanto um menor teor de goma significa uma separação mais limpa do óleo das fases pesadas, aumentando o rendimento (DSM, 2019).

De acordo com a empresa DSM (2019), para o processamento de óleos de sementes, como a soja, a enzima Purifine[®] 3G aumenta o rendimento do óleo em até 2,5%, em comparação com os métodos tradicionais, como a degomagem aquosa ou ácida. O valor desse aumento de rendimento é de até US \$ 5 milhões por ano de óleo recuperado em uma típica fábrica de processamento de óleo de 1.000 TM por dia. Porém, é importante salientar

que até o presente momento não existem estudos científicos com o coquetel Purifine 3G comprovando as afirmações do fabricante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio (EXTRA-E) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.1. Matéria-prima

O óleo bruto do farelo de arroz (*Oryza sativa*) foi cedido pela empresa Irgovel de Pelotas-RS. O óleo foi extraído por solvente e armazenado em bombonas de plástico, permanecendo à temperatura de aproximadamente 15 °C até a realização dos testes. As enzimas utilizadas durante os testes foram fosfolipase A₁ (PLA₁) cedida pela Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) e a Purifine® PLC (1° e 3° geração) desenvolvida pela DSM-Holanda.

4.2. Análises físico-químicas

4.2.1. Análise de acidez livre

A acidez livre foi determinada por titulação com hidróxido de sódio, através do método oficial Ca 5a-40 (AOCS, 2009). Aproximadamente 1 g de amostra foi pesada e dissolvida em 50 mL de álcool hidratado 99,5%. Em seguida a amostra foi titulada com hidróxido de sódio até a viragem do indicador (fenolftaleína). A fração mássica de acidez na amostra foi calculada levando-se em conta a massa da amostra, o volume de hidróxido de sódio utilizado e o peso molecular do ácido oleico (Equação 1 e 2), o qual é o ácido graxo majoritário.

$$\text{Índice de Acidez (mg de NaOH/g)} = \frac{\text{mL gastos de NaOH} \times N \times F \times \text{PM}(\text{NaOH})}{\text{massa da amostra}} \quad (1)$$

Onde, mL gastos de NaOH: volume de NaOH gastos na titulação; N: normalidade da solução de NaOH (0,01 N); F: fator de correção da solução de NaOH; PM: peso molecular do NaOH.

$$\text{AGL em ácido oleico (\%)} = \frac{\text{mL gastos de NaOH} \times \text{N} \times 28,2 \times \text{F}}{\text{massa da amostra}} \quad (2)$$

Onde, mL gastos de NaOH: volume de NaOH gastos na titulação; N: normalidade da solução de NaOH; F: fator da solução de NaOH; 28,2: fator de conversão (equivalente grama) do ácido oleico.

4.2.2. Composição em acilglicerois

Essa análise foi baseada na metodologia oficial Cd 11b-91 (AOCS, 2009). Foram pesadas, aproximadamente, 0,05g das amostras de óleo, adicionado o tetradecano e o agente derivatizante (BSTFA). Esses seguiram para estufa a 70 °C/20 min. Após esse tempo, foram transferidos 50 µL de amostra para vials e ressuspendido com 1 mL de hexano. Essas amostras seguiram para um cromatógrafo a gás (CG Agilent 7890A, Japão) com injeção OnColumn.

4.2.3. Minerais

Os minerais analisados no óleo de farelo de arroz bruto e degomado foram: o P (Fósforo), Fe (Ferro), Ca (Cálcio) e Mg (Magnésio). Estes foram quantificados usando o método Plasma Indutivamente Acoplado (ICP) de acordo com método oficial Ca 20-99 (AOCS, 2009).

4.2.4. Análise de pH

O pH das gomas foi medido diretamente com pHmetro de bancada (marca Lab 1000) e todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.2.5. Análise de ressonância magnética nuclear (RMN)

A composição dos fosfolipídios do óleo de farelo de arroz bruto foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) empregando um espectrômetro automático Bruker Avance III 600 MHz. O padrão interno utilizado para quantificação dos fosfolipídios foi o trifenil fostato (DIEHL, 2008).

4.2.6. Umidade do óleo e das gomas

Para determinação da umidade do óleo foi utilizada a titulação Karl Fischer de acordo com o método AOCS Ca 2e-84 (AOCS, 2009). A umidade das gomas foi medida através de balança de infravermelho (marca Bel Engineering).

4.3. Análise dos componentes minoritários

4.3.1. Tocoferóis e Tocotrienóis

A determinação do teor de tocoferóis e tocotrienóis no óleo bruto e nos óleos degomados foi realizada conforme metodologia de Ansolin (2017). O óleo foi diluído em isopropanol em uma concentração de aproximadamente $8000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As amostras foram filtradas em filtros PTFE hidrofóbico e depois seguiram para análise. Para análise de cromatografia líquida foi utilizado um espectrômetro de massas (LC-MS) e um sistema Cromatográfico Waters composto de um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC), modelo Acquity, acoplado com espectrômetro de massa. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna UPLC BEH C18 ($1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \times 100 \text{ mm}$) operando a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. O volume de injeção foi de $5 \mu\text{L}$. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.3.2. Análise de Gama-orizanol

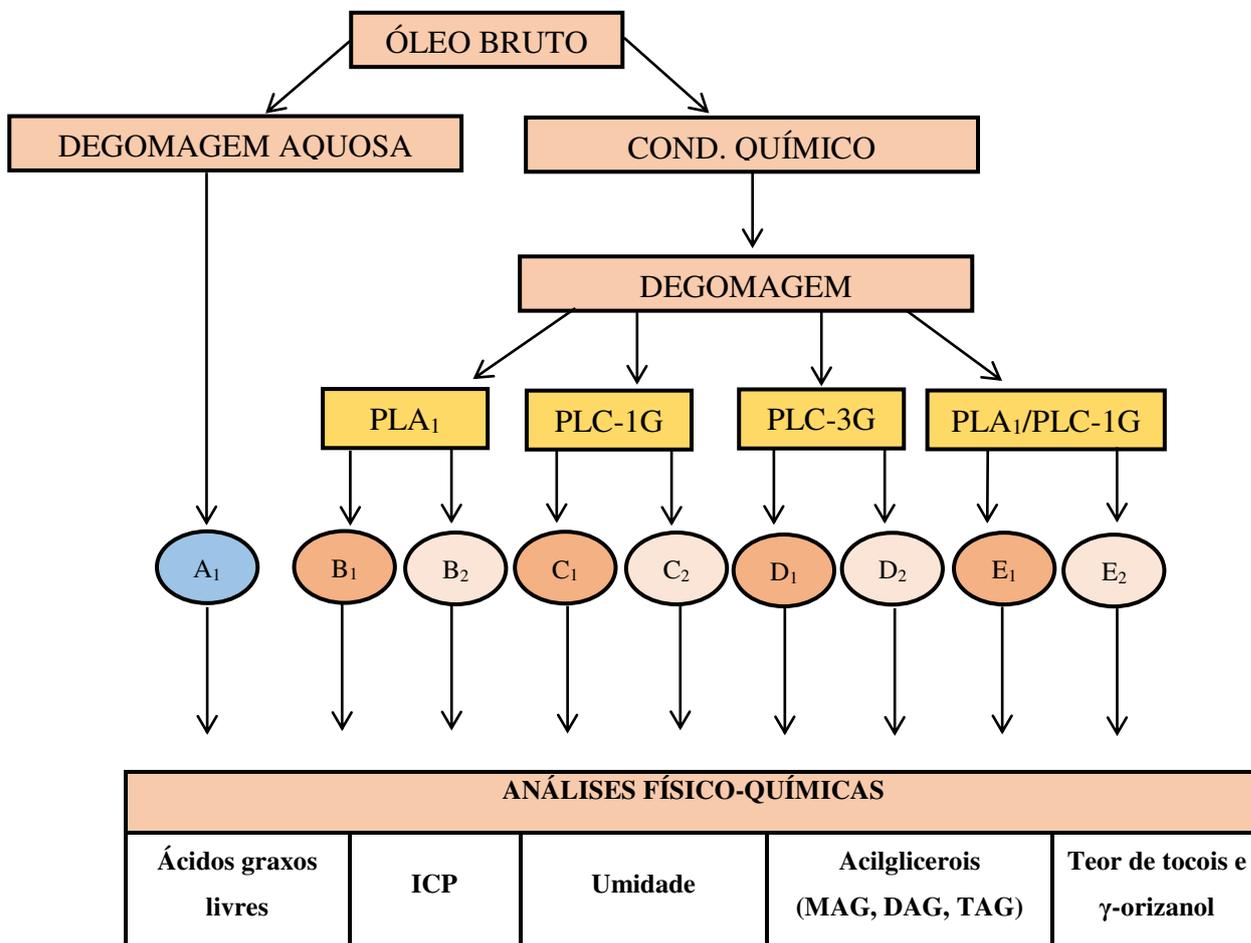
O teor de γ -orizanol no óleo bruto e nos óleos degomados foi determinado segundo metodologia do CODEX ALIMENTARIUS (2015) que utiliza espectroscopia, onde n-heptano é utilizado como solvente. Primeiramente realizou-se uma varredura da solução de γ -orizanol em heptano em toda a faixa do espectro UV-Visível para se determinar o comprimento de onda no qual ocorre a máxima absorção. Uma curva de calibração foi, então, construída com soluções de concentrações conhecidas ($0,030$ - $0,20 \text{ mg/ml}$) de γ -orizanol em heptano no comprimento de onda de máxima absorção.

A determinação de γ -orizanol no óleo bruto de farelo de arroz foi realizada pesando-se aproximadamente $0,02 \text{ g}$ da amostra em balão volumétrico de 25 mL e diluindo-se com heptano. Em seguida, a solução foi transferida para uma cubeta de quartzo para a leitura da absorbância no comprimento máximo de absorção que foi de 315 nm , contra o branco.

4.4. Aplicação da degomagem no óleo de farelo de arroz

O óleo de farelo de arroz foi submetido à degomagem aquosa, ao condicionamento químico e também à degomagem enzimática de acordo com metodologia proposta por Sampaio et al. (2015). Para realização da degomagem aquosa utilizou-se o teor de 3, 5, 7 e 10% de água, no intuito de definir o melhor resultado. Durante a degomagem enzimática, as enzimas foram adicionadas diretamente ao óleo após o condicionamento químico (com ajuste do pH). As enzimas foram estudadas separadas quanto às condições de processo (concentração de enzima e tempo de reação). Posteriormente, com a obtenção da melhor condição para cada enzima, foi estudada a combinação de ambas no mesmo processo (Figura 9). Para a enzima PLA₁ e PLC-1G foram testadas diferentes concentrações e tempos de reação, assim como para as combinações de enzimas (PLA₁/PLC-1G) e o coquetel PLC-3G.

Figura 9. Diagrama experimental do processo de degomagem aplicado ao óleo de farelo de arroz.



A₁: 3, 5, 7 e 10 % de H₂O;

B₁: PLA₁ (10, 30, 50, 70 mg/kg)/120 min;

B₂: PLA₁ (15, 30, 60, 90 e 120 min)/50 mg/kg;

C₁: PLC-1G (100, 200, 300, 400 mg/kg)/120 min;

C₂: PLC-1G (15, 30, 60, 90, 120 min)/300 mg/kg;

D₁: PLC-3G (60 min)/ 300 mg/kg;

D₂: PLC-3G (120 min)/ 300 mg/kg;

E₁: PLA₁/PLC-1G (60 min)/ 50 e 300 mg/kg, respectivamente;

E₂: PLA₁/PLC-1G (120 min)/ 50 e 300 mg/kg, respectivamente.

4.5. Degomagem aquosa

Para realização do processo de degomagem aquosa, o óleo bruto foi inicialmente aquecido a 80 °C e porcentagens de água de 3, 5, 7 e 10 % (m/m) referentes à massa de óleo foram adicionadas. A mistura permaneceu sob agitação por 15 min/350 rpm. Após este período, a mistura foi então centrifugada (10000 rpm/15 min) ocorrendo a separação do óleo degomado e das gomas ou fosfolipídios.

4.6. Condicionamento químico (CC)

O condicionamento químico teve por objetivo ajustar o pH ideal para que desta forma, a enzima viesse a atuar. Para o condicionamento químico, o ácido cítrico foi adicionado como uma solução aquosa a 30% (m/m) no óleo bruto de farelo de arroz. O óleo foi pré-aquecido de 80 °C, seguido de forte agitação (1 min/16000 rpm) em ultraturrax e a mistura foi agitada durante 15 min/350 rpm em agitador mecânico. Logo após foi adicionado NaOH como uma solução aquosa 14% (m/m) que também passou por forte agitação (1 min/16000 rpm) em ultraturrax o que garantiu uma boa dispersão entre o óleo e o NaOH. O pH ótimo atingido pela PLA₁ e pela PLC (1G e 3G) foi de 5,1 e 5,6, respectivamente.

Figura 10. Sistema utilizado para experimentos de degomagem. a) Ultraturrax; b) Agitador.



a) Ultraturrax

Fonte: Autoria Própria



b) Agitador Mecânico

Fonte: Autoria Própria

4.7. Degomagem enzimática

A degomagem enzimática utilizando as enzimas PLA₁ e PLC foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Sampaio et al. (2015). As condições de processo foram testadas em relação à concentração de enzima e tempo de reação. A etapa de ajuste do pH do meio foi realizada de acordo com o condicionamento químico descrito anteriormente. Após o ajuste do pH, a temperatura do óleo foi reduzida para 55 ou 60 °C, a depender do tipo de enzima, sendo então adicionada a concentração desejada de enzima (10 – 400 mg/kg). A mistura foi homogeneizada (1 min/16000 rpm) em ultraturrax e submetida à agitação suave (350 rpm) em agitador mecânico durante todo o tempo de reação (15, 30, 60, 90 e 120 min). As enzimas (PLA₁ e PLC) foram adicionadas separadas e posteriormente de forma combinada. Em seguida, a mistura foi aquecida até 85 °C, promovendo a desnaturação e inativação da enzima. Após a reação, a mistura foi centrifugada (10000 rpm/15min) para separação do óleo degomado e dos fosfolipídios. A Figura 11 mostra o óleo bruto de farelo de arroz e o óleo degomado.

Figura 11. Óleo bruto e óleo degomado de farelo de arroz.



Fonte: Autoria Própria

4.8. Cálculo do teor de diacilglicerol (DAG)

A composição dos fosfolipídios no óleo bruto de farelo de arroz foi medida por RMN e seu conteúdo foi utilizado para o cálculo teórico do teor de diacilglicerol que seria gerado após o processo de degomagem enzimática. Durante o processo de degomagem a enzima (PLC) hidrolisa a ligação entre o acilglicerol e o grupo fosfato liberando diacilglicerol (DAG), que é reconhecido como parte do óleo e, portanto, contribui para o rendimento em

óleo neutro. Dessa forma, sabendo que a enzima PLC-1G é específica para os fosfolipídios PC e PE, inicialmente faz-se a soma dos fosfolipídios (PL) que serão hidrolisados (Equação 3) pela PLC-1G.

$$PL = PC+PE \quad (3)$$

Tendo conhecimento do teor de fosfolipídio que podem ser hidrolisados e gerarem DAG, pode-se fazer os cálculos até chegar ao teor de DAG esperado no óleo degomado através da PLC-1G, como mostra a Equação 4. Segundo Dayton e Galhardo (2008), a quantidade de DAG que pode ser gerada pode ser calculada usando o conteúdo original de PC + PE do óleo multiplicado pela razão entre o peso molecular da dioleína e os pesos moleculares médios dos fosfolipídios (605/750) e utiliza-se uma eficiência de reação observada de aproximadamente 85% (explicada experimentalmente pela reação completa do PC, mas apenas reação parcial do PE, devido à taxa relativa de sua hidratação). Na prática, todo o DAG formado permanece no óleo degomado e está representado na Equação (4):

$$DAG (\%) = ((PC+PE) * 605/750 * 0,85) \quad (4)$$

Como o óleo bruto tem um teor 0,65 % (PC+PE), portanto seria esperado um aumento de DAG igual 0,45%, o que deveria ser somado ao teor de DAG previamente existente no óleo bruto.

Para a enzima PLC-3G deve-se levar em consideração o teor de PI, além do PC e PE, pois a enzima é capaz de hidrolisar os três fosfolipídios. Como o óleo bruto tem um teor 0,84 % (PC+PE+PI), portanto seria esperado um aumento de DAG igual 0,57%. Dessa forma, o cálculo levaria em consideração o aumento de DAG em porcentagem após degomagem.

$$DAG (\%) = ((PC+PE+PI) * 605/750 * 0,85) \quad (5)$$

4.9. Cálculo do teor de ácidos graxos livres (AGL)

O teor de AGL pode ser calculado a partir do teor de fosfolipídios presentes no óleo, porém para a geração de ácido graxo o processo de degomagem deve ser realizado com o uso da PLA₁. Assim, para saber a quantidade esperada de AGL é importante saber o teor de fosfolipídio presente no óleo. Neste caso, diferentemente da enzima PLC, não é necessário saber a composição em PL, já que a enzima não é seletiva. Assim, sabendo-se o teor de PL por meio da análise de RMN é possível calcular o aumento teórico ou esperado de AGL após degomagem com a enzima PLA₁.

$$\text{AGL (\%)} = ((\text{Total de PL}) * 0,036\% / (0,1 \text{ PL}\%)) \quad (6)$$

Dessa forma, ao saber o aumento teórico em AGL por meio do cálculo apresentado pela Equação 6, é possível calcular a acidez máxima total após degomagem, somando o aumento teórico com a acidez do óleo de farelo de arroz bruto inicial. Como o óleo bruto possui 0,91% de PL, espera-se que ocorra a formação de 0,33% de AGL no óleo degomado através da PLA₁, sendo que este valor deve ser somado ao teor de AGL já existente no óleo bruto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da matéria-prima

A Tabela 5 apresenta a composição em ácidos graxos, acilglicerois e tocois para o óleo de farelo de arroz bruto. De acordo com os resultados, os ácidos graxos em maior proporção são: oleico (39,6%), linoleico (36,4%) e palmítico (20,2 %). O total de ácidos graxos saturados encontrados foi de 22,2%, enquanto o total de ácidos graxos insaturados foi de 77,8 %. Resultados similares foram obtidos por Lüdtke (2016), onde os teores de ácidos graxos em maior proporção no farelo de arroz foram: oleico (32,8 - 35,6%), linoleico (30,8-33,5%) e palmítico (19,5-21,1%). Segundo Moretto e Fett (1998), a maior proporção de ácidos graxos insaturados é uma característica de óleos vegetais.

Segundo Pestana (2008) existe uma quantidade considerável dos ácidos linoleico e linolênico no óleo de farelo de arroz bruto. Os ácidos graxos linolênico e linoleico, por não serem sintetizados pelo organismo, constituem os ácidos graxos essenciais. Tais ácidos são elementos estruturais necessários à síntese de lipídios de tecidos, e têm um papel importante na regulação de vários processos metabólicos, de transporte e excreção. A carência de ácidos graxos essenciais na alimentação dos mamíferos (especialmente do homem) conduz a alterações no crescimento, na pele, imunológicas, neurológicas, e sérios transtornos comportamentais (INNIS, 2004).

Como esperado, a maior proporção dos acilglicerois presentes no óleo de arroz bruto é formado pelos triacilglicerois (TAG), representando aproximadamente 92,7% do total. É importante salientar que quanto maior o teor de TAG, melhor a qualidade do óleo. Os acilglicerois parciais (DAG e MAG) são provenientes da degradação dos TAGs e os resultados revelam que estes estão presentes nas seguintes proporções: 2,17 e 0,13 %,

respectivamente. Os ácidos graxos livres, os quais são os produtos da degradação final dos TAGs representam cerca de 5,0% do óleo.

Os tocoferóis e tocotrienóis (tocois), juntamente com o γ -orizanol são antioxidantes naturais e têm a função de prevenir a degradação do óleo, também estão relacionados à saúde do ser humano e por esse motivo são compostos desejáveis. Os tocois são considerados agentes importantes no tratamento das dislipidemias por alterarem o metabolismo lipídico, por exemplo, reduzem a acetilcoenzima A do fígado (precursora do colesterol) e interferem nas atividades de carboxilase e ácido málico (PRASAD et al., 2011).

Devido ao alto nível de componentes ativos, o óleo de farelo de arroz é considerado excelente para a saúde do ser humano, pois γ -orizanol e tocois têm a capacidade de diminuir o colesterol no sangue e diminuir absorção de colesterol. Tocotrienóis e γ -orizanol são conhecidos como poderosos antioxidantes e isso está associado com a prevenção de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Devido a esses efeitos benéficos, o óleo de farelo de arroz tem um alto valor nutricional e, portanto, é muito atraente comercialmente (VAN HOED et al., 2006).

A Tabela 5 apresenta a composição dos tocois presentes no óleo de farelo de arroz bruto e o Apêndice 1 mostra o cromatograma dos tocois no óleo bruto. Os teores de β/γ -tocotrienol e β/γ -tocoferol foram medidos conjuntamente, devido à disponibilidade do tipo de padrão. O β/γ -tocotrienol (461,4 mg/kg) apresentou a maior concentração no óleo de farelo de arroz bruto, seguido do β/γ -tocoferol (149,7 mg/kg) e do α -tocoferol (146,9 mg/kg). Iqbal et al. (2005) analisaram o óleo de farelo de arroz bruto e encontram para 2 variedades, valores totais de tocois de 756 mg/kg e 766 mg/kg. No presente estudo, o valor total de tocois encontrado para o óleo de arroz bruto foi de 796,3 mg/kg, o que indica que o presente estudo encontra-se de acordo com a literatura.

Segundo Ahsan et al. (2015) os tocotrienóis são encontrados em certos cereais (cevada, trigo, urucum) e óleos vegetais como óleo de palma, óleo de farelo de arroz, óleo de coco, onde o óleo de palma e o óleo de farelo de arroz contêm quantidades particularmente mais altas de tocotrienóis (940 mg/kg e 465 mg/kg, respectivamente). O óleo utilizado neste trabalho apresentou um valor total de 499 mg/kg para os tocotrienóis, sendo, portanto, predominantes. Variações podem ocorrer devido a fatores, como por exemplo, a variedade do arroz utilizado para a extração do farelo e do óleo.

Tabela 5. Caracterização do óleo bruto de farelo de arroz.

Parâmetro	RBO¹
TAG (%)	92,73 ± 0,03
DAG (%)	2,17 ± 0,04
MAG (%)	0,13 ± 0,00
AGL (%)	4,97 ± 0,02
Composição em ácidos graxos (%)	
Mirístico (C14:0)	0,28 ± 0,02
Palmítico (C16:0)	20,20 ± 0,01
Estearico (C18:0)	1,75 ± 0,1
Oleico (C18:1)	39,56 ± 0,05
Linoleico (C18:2)	36,37 ± 0,8
Linolênico (C18:3)	1,84 ± 0,02
Composição em Tocóis (mg/kg)	
α – tocoferol	146,96 ± 0,12
β/ γ – tocoferol	149,70 ± 0,28
α – tocotrienol	38,22 ± 0,54
β/γ – tocotrienol	461,45 ± 2,89
Total	796,33 ± 0,01
γ – orizanol (%)	1,80 ± 0,03

¹RBO: Óleo de farelo de arroz bruto

O teor de γ -orizanol foi analisado e o óleo bruto de farelo de arroz apresentou um teor de 1,8%. Observa-se que o valor de γ -orizanol do presente estudo encontra-se dentro da faixa citada na literatura por Van Hoed et al. (2006) que encontrou para o óleo bruto de farelo de arroz o teor de 1,8% de γ -orizanol.

Em comparação com a maioria dos óleos vegetais, o óleo bruto de farelo de arroz possui uma composição maior de componentes minoritários e compostos bioativos, como γ -orizanol, tocotrienóis e fitoesteróis, demonstrando assim, ser um óleo de alto valor nutricional e de grande importância para a saúde do consumidor. O γ -orizanol é constituído por um grupo de ésteres de ácidos ferúlicos e de álcoois triterpênicos e fitoesteróis. Os quatro componentes principais do γ -orizanol no óleo bruto de farelo de arroz são o ferulato de 24-metilenocicloartenol, o ferulato de cicloartenol, o ferulato de campesterol e o ferulato de β -sitosterol (VAN HOED et al., 2006).

A Tabela 6 apresenta o teor de minerais e a composição de fosfolipídios presentes no óleo de farelo de arroz bruto. Em geral, devido ao processo de extração utilizado, o óleo de farelo de arroz bruto apresenta elevados teores de minerais. Os minerais de maior relevância

para o processo de refino de óleo são: P (426,0 mg/kg) e Fe (9,6 mg/kg), pois estes estão relacionados com o escurecimento do óleo e perdas durante o refino. Além disso, o cálcio (5,0 mg/kg) e o magnésio (60 mg/kg) estão relacionados aos fosfolipídios não hidratáveis e conseqüentemente ao escurecimento do óleo.

De acordo com a composição em fosfolipídios, os compostos em maior proporção no óleo de farelo de arroz bruto são o PC (0,39%), PE (0,25%) e o PI (0,20%). O PC e PI são considerados hidratáveis, enquanto o PE pode ser parcialmente hidratável, caso esteja ligado a um metal do tipo Ca, Mg ou Fe, e o PA (0,07%) é considerado completamente não hidratável.

Tabela 6. Teor de minerais e composição em fosfolipídios do óleo de farelo de arroz bruto.

Minerais (mg/kg)	
P	426,0 ± 6,0
Fe	9,60 ± 0,06
Ca	5,05 ± 0,08
Mg	60,0 ± 0,20
Composição em Fosfolipídios (%)	
PC	0,39 ± 0,04
PE	0,25 ± 0,02
PI	0,20 ± 0,01
PA	0,07 ± 0,03
Total	0,91 ± 0,03

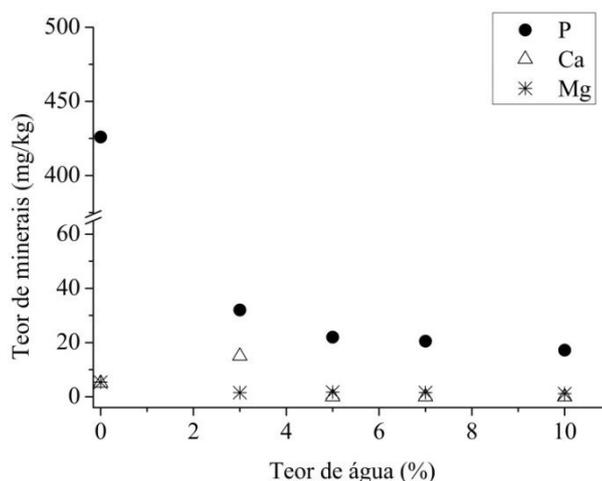
5.2. Degomagem aquosa

A degomagem aquosa tem como objetivo a remoção dos fosfolipídios hidratáveis (HPL). O processo de degomagem aquosa do óleo bruto de farelo de arroz foi realizado utilizando-se proporções de água variando entre 3 - 10% m/m, em relação à massa de óleo. A Figura 12 apresenta os valores dos minerais encontrados para as diferentes proporções de água.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 12, ocorreu uma redução no teor de todos os minerais presentes no óleo de arroz após a degomagem aquosa. O teor de fósforo no óleo bruto foi reduzido de 426 mg/kg para 32,0; 22,0; 20,5 e 17,2 mg/kg ao se adicionar 3, 5, 7 e 10% de água, respectivamente. Como pode-se verificar, houve somente uma pequena redução do teor de fósforo (32,0 – 17,2 mg/kg) quando aumentou-se o teor de água de 3 – 10%, não apresentando grandes vantagens para o processo, além de aumentar os

custos do mesmo e a consequente geração de efluentes. Desta forma, 3% m/m de água já seria um valor adequado para realização do processo de degomagem aquosa.

Figura 12. Teor de minerais após degomagem aquosa do óleo de farelo de arroz bruto.

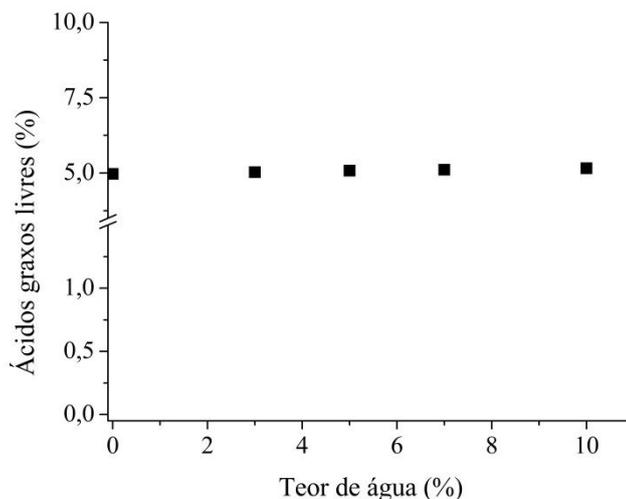


Durante todo o processamento a temperatura foi monitorada, permanecendo em torno de 80 °C, o que pode ter facilitado a degomagem. Segundo Dijkstra (2017) a degomagem aquosa ainda é um processo comum para remover fosfolipídios do óleo bruto. Nesse processo, a água quente é adicionada ao óleo bruto de 80 - 85 °C e a mistura é agitada em um processo geralmente chamado de "hidratação". Assim, os fosfolipídios "hidratáveis" aglomeram-se na interface óleo e água, capturando com eles alguns fosfolipídios não hidratáveis.

Apesar de a degomagem aquosa atuar na redução do teor de fósforo e dos demais minerais (Fe, Ca e Mg) presentes no óleo de farelo de arroz, os resultados obtidos ainda não atendem ao limite estabelecido para o processo de refino físico (< 10 mg/kg). Desta forma, o óleo precisa ser submetido a outro processo de purificação para seguir para as demais etapas.

Os ácidos graxos livres (AGL) são formados a partir da degradação dos triacilglicerois através de reações de hidrólise. A Figura 13 apresenta o teor dos AGL dos óleos submetidos à degomagem aquosa. Como pode ser observado, o teor dos AGL apresentou um ligeiro aumento (4,9 - 5,2%), o que pode ser resultado da hidrólise do óleo, devido às condições do processo, como presença de água e aquecimento.

Figura 13. Teor de ácidos graxos livres no óleo de farelo de arroz após degomagem aquosa.



Componentes Minoritários

O óleo de farelo de arroz também foi analisado em relação a compostos minoritários com elevado poder antioxidante, como tocoferóis e tocotrienóis. Estes são encontrados em proporções variáveis em plantas, sendo que sua principal fonte são os óleos vegetais. Após degomagem aquosa, os teores de tocois foram analisados para verificar se houve alteração após o processo e os resultados encontram-se na Tabela 7.

A Tabela 7 traz o teor de tocois após degomagem aquosa e como pode ser observado o β/γ -tocotrienol apresentou o maior teor dentre os tocois para o óleo após degomagem aquosa, variando de um teor de 461,4 mg/kg para o óleo bruto, até 438,5 mg/kg para 10% de água adicionada. Da mesma forma, os valores para α -tocoferol e β/γ -tocoferol variaram com os diferentes teores de água, apresentando maior perda para 10% de água adicionada. Não foi detectada a presença do δ -tocoferol no óleo utilizado. Em resultados apresentados por Lüdtke (2016), os autores verificaram uma perda de 53% no teor α -tocoferol após o processo de degomagem.

De uma forma geral neste trabalho, o aumento do teor de água na degomagem aquosa apresentou pouco efeito na redução dos tocois totais, apresentando perda de aproximadamente 8% entre 0 - 3% de água adicionada, 9% entre 0 - 5% de água adicionada e entre 0 - 7 e 0 - 10%, apresentou perda de 11,4% e 12,8%, respectivamente.

Tabela 7. Teor de tocois (mg/kg) após degomagem aquosa do óleo de farelo de arroz.

Teor de água (%)	β/γ -tocotrienol	α -tocotrienol	β/γ -tocoferol	α -tocoferol	Total
0*	461,4 \pm 2,9	38,2 \pm 0,5	149,7 \pm 0,3	146,9 \pm 0,1	796,3 \pm 18,1
3	460,1 \pm 2,8	19,2 \pm 2,8	120,2 \pm 1,8	133,2 \pm 1,1	732,8 \pm 1,8
5	455,2 \pm 2,0	18,0 \pm 1,2	119,2 \pm 2,3	130,2 \pm 2,1	722,7 \pm 5,3
7	442,9 \pm 1,2	17,0 \pm 1,3	118,2 \pm 2,1	127,6 \pm 1,7	705,3 \pm 7,5
10	438,5 \pm 2,9	15,0 \pm 1,2	116,1 \pm 2,1	124,0 \pm 2,30	693,6 \pm 15,3

*Corresponde ao teor de tocois no óleo bruto

O γ -orizanol consiste em um importante componente minoritário do óleo de farelo de arroz e também foi analisado após degomagem aquosa. Os resultados mostraram que no óleo bruto, o teor de γ -orizanol que era de 1,8%, sofreu uma pequena redução para 1,7% com a adição de 3% de água adicionada. Após adição de 10% de água o óleo degomado apresentou um teor de γ -orizanol de 1,69%. Como pode ser verificado, o teor de γ -orizanol permaneceu constante após a degomagem aquosa, indicando que o processo não tem efeito sobre o teor do mesmo.

5.3. Degomagem enzimática (PLA₁)

A degomagem é uma etapa crucial no refino de óleos e deve ser realizada antes das etapas de neutralização, branqueamento e desacidificação do produto, consistindo na primeira etapa do refino. A degomagem enzimática é o processo mais eficaz para a remoção dos fosfolipídios ou gomas, sendo o processo realizado através da utilização das fosfolipases. A fosfolipase A₁ (PLA₁) mais utilizada industrialmente é conhecida como Lecitase Ultra (Novozymes). Devido a sua atuação na posição *sn*₁ do fosfolipídio, essa enzima produz ácidos graxos livres e lisofosfolipídios. Os ácidos graxos provenientes da hidrólise dos fosfolipídios participam do aumento do rendimento de óleo, enquanto os lisofosfolipídios são removidos por centrifugação, constituindo as gomas.

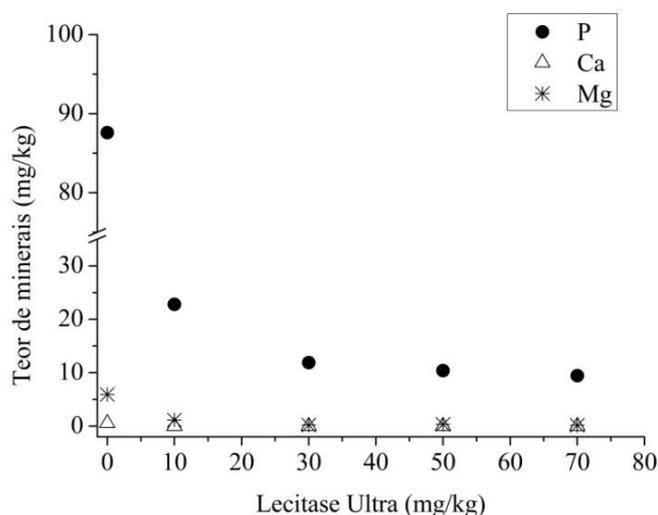
Inicialmente foi realizado o ajuste do pH do meio para o valor ótimo de atuação da enzima (5,1) através do procedimento denominado condicionamento químico (CC), o qual faz o uso de um ácido (ácido cítrico) e uma base (NaOH). Após a realização do condicionamento químico, a enzima PLA₁ foi adicionada ao óleo em diferentes concentrações, sendo estas: 10, 30, 50, e 70 mg/kg. A Figura 14 apresenta a variação do teor de fósforo em função da concentração de enzima utilizada na reação. Como pode ser observado, o teor de fósforo diminui à medida que a concentração de enzima aumenta. Para as

concentrações de enzima de 10 e 30 mg/kg, o teor de fósforo foi reduzido de 87,6 mg/kg (condicionamento químico) para 22,8 e 11,9 mg/kg, respectivamente. Para concentrações de enzima de 50 e 70 mg/kg, o fósforo residual no óleo degomado foi reduzido para 10,4 e 9,5 mg/kg, respectivamente.

De acordo com Yang et al. (2008), para que o óleo degomado seja submetido ao processo de refino físico é necessário que o teor de fósforo seja < 10 mg/kg, pois a etapa de branqueamento ainda atuaria na redução deste valor atingindo teores < 5 mg/kg, evitando assim possíveis problemas de escurecimento do óleo refinado. Portanto, levando-se em conta que a concentração de 50 mg/kg de enzima resultou em um teor de fósforo de 10,4 mg/kg, conclui-se que esta seria a concentração ótima da enzima Lecitase Ultra para degomagem do óleo de farelo de arroz.

A influência da concentração da enzima Lecitase Ultra aplicada ao óleo de soja bruto foi avaliada por Sampaio et al. (2015). Os autores verificaram uma redução gradativa do teor de fósforo à medida que a concentração de enzima aumentava de 30 para 100 mg/kg, atingindo valores de 9 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente. Em outro estudo realizado por Roy et al. (2002), utilizando a enzima Lecitase Novo (40 mg/kg), os autores verificaram uma redução do teor de fósforo do óleo bruto de farelo de arroz de 403 m/kg para 18 mg/kg. Após degomagem, o óleo foi então submetido ao processo de branqueamento atingindo teores de fósforo < 5 mg/kg.

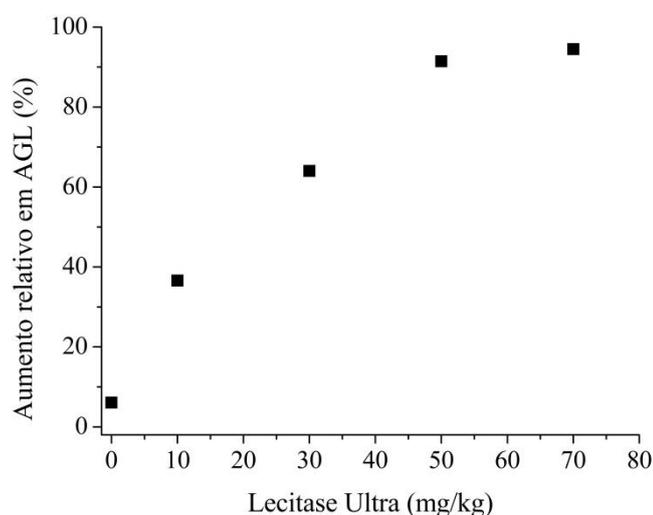
Figura 14. Efeito da concentração da enzima Lecitase Ultra sobre a redução do teor de minerais (condições da reação: 120 min; 3% água; pH 5,1; 52 °C).



A enzima Lecitase Ultra (PLA₁) utilizada neste trabalho atua seletivamente na posição *sn*₁ do fosfolípido liberando um ácido graxo. Segundo De Greyt (2012) a degradação de 0,1% de fosfolípido geraria um aumento de 0,036% em AGL. Como o óleo de farelo de arroz bruto possui 0,91% de fosfolípidios ocorreria a geração de 0,33% de acidez. No entanto, a instabilidade da posição *sn*₂ do fosfolípido pode favorecer a migração do grupo acil da posição *sn*₂ para a posição *sn*₁. Neste caso, a enzima atuaria novamente liberando mais um ácido graxo livre no óleo degomado, aumentando, portanto, a acidez do óleo.

A Figura 15 ilustra a variação do teor de ácidos graxos livres para as diferentes concentrações estudadas da enzima Lecitase Ultra. Como pode ser verificado, o teor de acidez aumenta à medida que a quantidade de enzima é aumentada, tendo como base o teor de acidez presente no condicionamento químico do óleo de farelo de arroz bruto (4,99%). Para as concentrações de 10, 30, 50 e 70 mg/kg, os valores de AGL, em termos relativos aumentam respectivamente: 36,6%, 64%, 91,4% e 94,5%. Como pode ser verificado, a partir da concentração de 50 mg/kg o teor de acidez do óleo degomado parece se estabilizar, indicando um possível completo consumo do substrato. De acordo com os resultados, não houve geração extra de ácidos graxos, provavelmente devido ao tempo de reação (120 min) que não favorece a ação da enzima sobre a posição *sn*₂ do fosfolípido.

Figura 15. Aumento relativo em ácidos graxos livres após degomagem enzimática com diferentes concentrações de PLA₁.



Componentes Minoritários

Após a degomagem do óleo de farelo de arroz com a fosfolipase PLA₁, analisou-se o conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis, os quais foram expressos em mg/kg de óleo (Tabela 8). O Apêndice 2 mostra o cromatograma para o óleo degomado. Como pode ser observado, de 0 - 30 mg/kg de PLA₁ observou-se uma perda de somente 2% no teor dos tocois. Entre 0 - 50 mg/kg a perda foi de 10,5% e entre 0 - 70 foi de aproximadamente 7%. Dessa forma, pode-se verificar que a degomagem com a enzima PLA₁ não causa grandes alterações nos teores de tocois. Isso ocorre provavelmente devido a degomagem enzimática ser um processo que usa temperaturas mais brandas, além da adição de somente pequenas quantidades de ácidos e bases.

Em outras etapas do refino físico, como a desacidificação, onde o óleo é submetido a elevadas temperaturas e baixas pressões, pode ocorrer uma maior variação do conteúdo de tocois. Van Hoed et al. (2010) realizou a desacidificação física aplicada ao óleo de farelo de arroz e constatou que após esta etapa o óleo apresentou alteração na composição relativa dos tocois, onde as principais perdas foram observadas para o γ -tocotrienol e γ -tocoferol, conhecidos como os principais antioxidantes que protegem o óleo contra oxidação durante o armazenamento.

Tabela 8. Teor de tocois (mg/kg) após degomagem com PLA₁.

PLA ₁ (mg/kg)	β/γ -tocotrienol	α -tocotrienol	β/γ -tocoferol	α -tocoferol	Total
0*	458,3 ± 1,3	29,2 ± 0,0	136,1 ± 0,1	140,2 ± 0,0	763,8 ± 21,2
10	456,5 ± 1,2	19,9 ± 0,2	143,9 ± 0,7	132,4 ± 1,4	752,7 ± 13,2
30	451,9 ± 5,5	23,5 ± 0,3	146,5 ± 1,5	136,8 ± 1,6	758,7 ± 17,5
50	408,4 ± 0,3	16,0 ± 0,0	137,5 ± 0,4	121,6 ± 0,9	683,6 ± 37,6
70	407,4 ± 5,5	18,4 ± 1,2	146,7 ± 2,9	138,0 ± 1,8	710,6 ± 16,0

*Corresponde ao experimento do condicionamento químico

Um dos grandes desafios dos processos de refino de óleos de alto valor agregado, como o óleo de farelo de arroz é a manutenção dos componentes que os tornam diferenciados, como é o caso do componente γ -orizanol. Após o processo de degomagem o conteúdo desse composto minoritário foi analisado e não apresentou alterações consideráveis com o aumento da concentração de PLA₁. O óleo bruto que inicialmente apresentou um teor de 1,8% de γ -orizanol apresentou um valor de 1,6% quando utilizando a maior concentração de enzima (70 mg/kg/120 min).

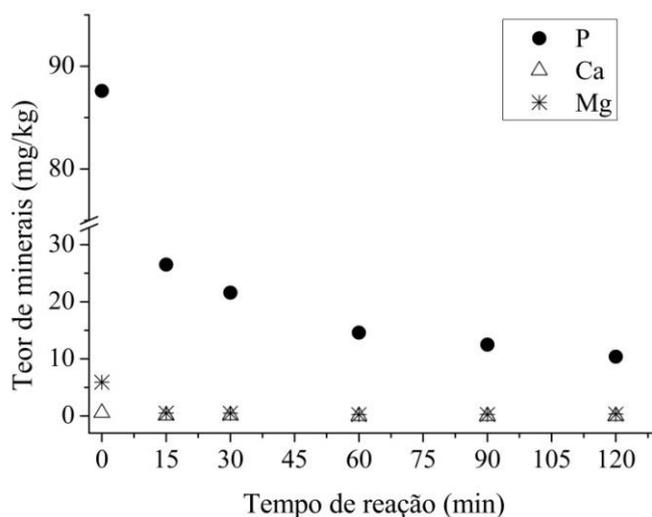
De acordo com a literatura, maiores concentrações de base podem ter um efeito de redução do teor de γ -orizanol. Van Hoed et al. (2010) verificaram que durante o processo de neutralização com 0,1% de NaOH, seguida de uma etapa de lavagem, foi atingida uma retenção de γ -orizanol de 90%. Ao aumentar o teor de NaOH para 0,2%, a retenção de γ -orizanol foi reduzida para 52%.

5.4. Cinética de reação (PLA₁)

A cinética da reação é importante para se estudar a hidrólise enzimática no tempo, ou seja, através dela é possível verificar o menor tempo no qual o menor teor de fósforo é obtido e assim, verificar as condições ótimas de tempo em que a enzima atua. Através do estudo da cinética de reação da enzima, também é possível maximizar a ação da mesma, o que resulta em menores custos. Em geral, o estudo da cinética é feito na concentração ótima da enzima, que para o caso da PLA₁ foi de 50 mg/kg e com diferentes tempos de reação (15, 30, 60, 90 e 120 min).

A Figura 16 apresenta o teor de minerais obtido após a degomagem com a enzima Lecitase Ultra (PLA₁) para os diferentes tempos de reação. Como pode ser observado, o teor de fósforo foi reduzido de 26 a 21 mg/kg para tempos de reação variando entre 15 - 30 min. Para tempos de reação entre 30 - 60 min o teor de fósforo foi reduzido para os valores de 21 e 15 mg/kg, respectivamente. Aumentando o tempo de reação para 60 - 90 min, o teor de fósforo foi reduzido para valores entre 15 - 13 mg/kg. Para o tempo de reação de 120 min, o óleo degomado atingiu 10,4 mg/kg, se enquadrando, portanto, no valor desejado para que o óleo possa seguir as demais etapas do refino físico (10 mg/kg). Sendo assim, o tempo de reação de 120 min foi escolhido como tempo mais apropriado para atuação da enzima PLA₁ (Lecitase Ultra).

Figura 16. Teor de minerais após degomagem com a enzima PLA₁ (Lecitase Ultra) em diferentes tempos de reação.

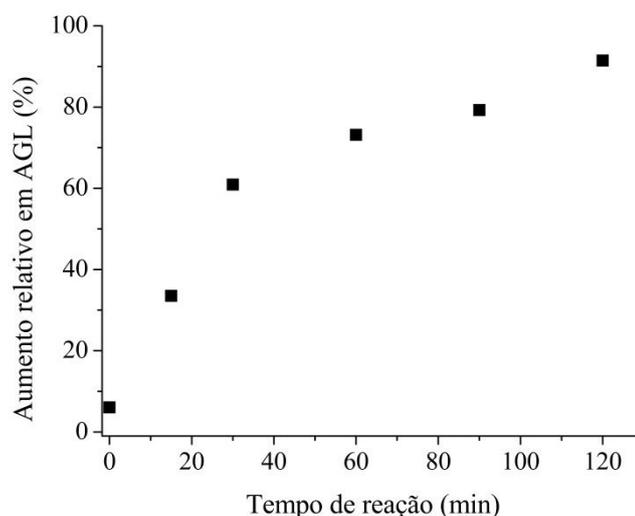


Jahani et al. (2008) realizaram a degomagem enzimática do óleo de farelo de arroz utilizando a enzima Lecitase Ultra (PLA₁) obtida de uma amostra experimental de *Thermomyces lanuginosus/Fusarium oxysporum*, com a concentração de 50 mg/kg. De acordo com os autores, foi obtida a redução do teor de fósforo para valores <10 mg/kg após um tempo de reação de 240 min.

Além do teor de fósforo obtido no óleo degomado para os diferentes tempos de reação, foi avaliado também o possível aumento do teor de ácidos graxos livres. Isso ocorreu, pois as fosfolipases, como a PLA₁, são um grupo de enzimas, que atuam na hidrólise do fosfolipídio liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos livres. Neste trabalho foi analisado o teor de ácidos graxos livres após degomagem, no intuito de verificar a eficácia da enzima com relação ao aumento do rendimento do óleo.

A Figura 17 apresenta o aumento relativo do teor de ácidos graxos livres para os diferentes tempos de reação (0 – 120 min), utilizando a concentração de 50 mg/kg de enzima. Entre 0 – 30 min houve um acréscimo de 0,20% de AGL, que equivale 60,9% do valor teórico esperado. Para tempos de reação entre 0 – 60min ocorreu um aumento de 0,24% de AGL que equivale a 73% do valor esperado. Para tempos de reação entre 0 – 90 min e 0 – 120 min, os resultados foram equivalentes a 79,3% e 91,5%, respectivamente. Como após 120 min de reação o aumento em termos relativos foi de aproximadamente 91,5% de AGL no óleo degomado, esse tempo foi escolhido como o melhor tempo de atuação da enzima.

Figura 17. Aumento relativo em ácidos graxos livres após diferentes tempos de reação com PLA₁.



Como mostram os dados (Figuras 18 e 19), o teor de fósforo diminui, à medida que o teor de AGL aumenta com o tempo de reação, demonstrando assim a capacidade da enzima PLA₁ de degomar o óleo de farelo de arroz.

Componentes Minoritários

Os componentes minoritários foram analisados e os teores de tocois presentes no óleo degomado com PLA₁ ao longo do tempo, encontram-se na Tabela 9. Durante os primeiros 0 – 15 min de reação, a perda de tocois foi de aproximadamente 9%, quando comparado ao teor previamente existente no óleo proveniente do condicionamento químico. Entre 0 – 30 min a perda foi de aproximadamente 6%, já as perdas entre 0 – 60 min, 0 – 90min e 0 – 120 min foram, respectivamente: 8%, 9% e 10,5%. De acordo com os resultados, a porcentagem de perda dos tocois permanece praticamente constante com o tempo de reação, ocorrendo leves perdas. Ao avaliar os tocois individualmente, nota-se que o β/γ -tocotrienol foi responsável pelos maiores teores, o que está relacionado com os próprios valores existentes no óleo bruto.

O óleo degomado pela enzima PLA₁ (Lecitase Ultra) também foi analisado em relação ao teor do componente minoritário γ -orizanol. Este não apresentou grandes alterações em seu resultado (1,6 – 1,7%), o que significa que a degomagem enzimática não alterou o conteúdo de γ -orizanol, sendo uma boa alternativa para o refino do óleo de farelo de arroz.

Tabela 9. Teor de tocois (mg/kg) após degomagem a 50 mg/kg de PLA₁ ao longo do tempo.

PLA ₁ (min)	β/γ -tocotrienol	α -tocotrienol	β/γ -tocoferol	α -tocoferol	Total
0*	458,3 ± 1,3	29,2 ± 0,0	136,1 ± 0,0	140,2 ± 0,0	763,8 ± 21,2
15	402,2 ± 4,4	18,3 ± 1,0	130,8 ± 3,9	142,4 ± 4,2	693,7 ± 3,9
30	408,7 ± 2,1	17,5 ± 0,6	148,1 ± 0,8	145,3 ± 1,3	719,6 ± 14,3
60	390,6 ± 3,8	16,5 ± 0,2	152,6 ± 1,2	143,4 ± 0,4	703,1 ± 2,6
90	375,5 ± 2,6	15,2 ± 0,3	154,5 ± 5,8	151,4 ± 4,6	696,7 ± 1,8
120	408,4 ± 0,3	16,0 ± 0,1	137,5 ± 0,4	121,6 ± 0,9	683,6 ± 11,1

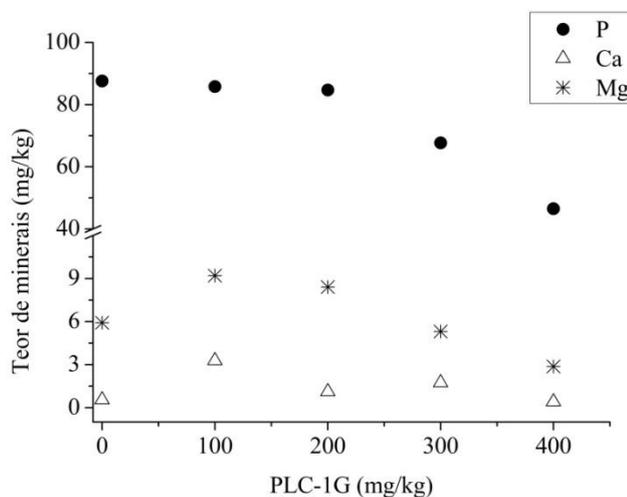
*Corresponde ao experimento do condicionamento químico

5.5. Degomagem enzimática (PLC-1G)

A enzima PLC-1G (Purifine[®] PLC-DSM) é uma fosfolipase que atua de forma seletiva nos fosfolipídios PC e PE. Esta atua na ligação anterior ao grupo fosfato, fazendo a clivagem do fosfolipídio em uma molécula de diacilglicerol e um grupo fosfato, sendo que o diacilglicerol permanece no óleo, aumentando assim o rendimento em óleo neutro após degomagem. Como as fosfolipases decompõem os fosfolipídios em fragmentos solúveis em água e solúveis em óleo, isto reduz sua capacidade de formar uma emulsão, o que, por sua vez, significa menor perda de rendimento em função de arraste do óleo. A Figura 18 apresenta o teor dos minerais presentes no óleo de farelo de arroz após degomagem com a enzima PLC-1G.

Como pode ser verificado, o teor de fósforo (P) decresce à medida que a concentração de enzima aumenta e o mesmo ocorre para os demais minerais como Ca e Mg. No tempo zero, correspondente ao condicionamento químico, o teor de P no óleo era de 87,6 mg/kg. Para 100 e 200 mg/kg o teor de P apresentado foi 85,8 e 84,7 mg/kg, respectivamente. Para as concentrações de 300 e 400 mg/kg, da enzima PLC-1G, o óleo degomado apresentou os menores teores de fósforo, sendo estes: 67,6 e 46,5 mg/kg, respectivamente. O elevado teor de fósforo remanescente no óleo degomado após atuação da enzima PLC-1G se deve provavelmente a não degradação de PI e PA, pois a enzima atua de forma seletiva em relação a PC e PE.

Figura 18. Teor de minerais após degomagem com diferentes concentrações da enzima PLC-1G.



Devido a diferença para o teor de fósforo entre as concentrações de 300 e 400 mg/kg da enzima PLC-1G, optou-se por seguir para as próximas degomagens com a concentração de 300 mg/kg, tendo em vista o custo investido no processo, o qual é proveniente principalmente da enzima. Na realidade, o teor de fósforo encontrado no presente estudo apresenta um comportamento que já era esperado, pois segundo Gupta (2017), dependendo do óleo degomado e do processo empregado, o teor de P após degomagem com a enzima PLC-1G pode chegar a valores maiores que 100 mg/kg.

A Tabela 10 traz a composição em acilglicerois do óleo de farelo de arroz após degomagem com diferentes concentrações da enzima PLC-1G. Como pode ser observado, o teor de DAG aumentou à medida que a concentração da enzima PLC-1G foi aumentada, mostrando assim, que a enzima apresenta ação efetiva em relação à formação de DAG após degomagem do óleo de farelo de arroz. É importante salientar também que como os acilglicerois são analisados conjuntamente, à medida que o teor de DAG aumenta os teores de TAG e MAG também sofrem alterações.

Atualmente existem poucos estudos na literatura sobre degomagem enzimática de óleos vegetais com a enzima PLC-1G. De uma forma geral, esses artigos mostram que ocorre aumento no teor de DAG e que esse aumento é função da hidrólise de PC e PE. Os autores (JIANG et al., 2015) e (YE et al., 2016) investigaram o uso da enzima PLC em diversos óleos

vegetais brutos, como soja, canola, camélia e farelo de arroz e observaram o aumento do conteúdo de DAG em todos os casos.

Tabela 10. Composição em acilgliceróis do óleo de farelo de arroz degomado com diferentes concentrações de PLC-1G.

PLC (mg/kg)	TAG (%)	DAG (%)	MAG (%)
0*	92,61 ± 0,22	2,22 ± 0,19	0,18 ± 0,02
100	92,45 ± 0,09	2,41 ± 0,06	0,15 ± 0,03
200	92,27 ± 0,03	2,56 ± 0,05	0,17 ± 0,01
300	92,14 ± 0,12	2,63 ± 0,09	0,24 ± 0,03
400	92,11 ± 0,15	2,65 ± 0,11	0,24 ± 0,03

*Corresponde ao experimento do condicionamento químico

O teor de DAG variou de 2,22% para a concentração de PLC-1G de 0 mg/kg (CC), até o teor de 2,63% para a concentração de 300 mg/kg de enzima. Dessa forma o aumento de DAG foi de 0,41%. Considerando que a enzima PLC-1G é específica para PC e PE e os valores para os dois são, respectivamente 0,3912% e 0,2542%, resultando em um teor total de 0,65% (PC + PE). Para um teor de fosfolipídio de 0,65% (PC+PE) seria esperado um aumento total de DAG esperado seria 0,45%. Isso significa que em termos relativos, aproximadamente 91,1% do total dos fosfolipídios PC e PE foram hidrolisados em DAG, para o tempo de reação de 120 min de processo e 300 mg/kg de enzima. Foi verificado que a adição de mais 100 mg/kg, ou seja, de 300 mg/kg para 400 mg/kg de enzima, resultou em um aumento relativo de apenas 4% no teor de DAG. Dessa forma, optou-se por utilizar 300 mg/kg como concentração máxima de PLC-1G nos demais experimentos. Resultados similares foram obtidos por Sampaio et al. (2019) quando avaliando a degomagem enzimática do óleo de milho bruto utilizando a enzima PLC-1G.

Segundo Jiang et al. (2015) o DAG gerado pela hidrólise de PC e PE poderia melhorar o rendimento de óleo após o processo de degomagem com PLC, o que foi observado no presente estudo já para a concentração de 300 mg/kg de enzima. Além disso, a enzima em concentrações mais elevadas (400 mg/kg) é mais suscetível à aglomeração, o que reduz a reação efetiva nas fases, ou seja, a partir de um dado momento a enzima atinge sua eficiência máxima fazendo com que não ocorra mais um aumento considerável de DAG.

Componentes Minoritários

Os componentes minoritários (tocois e γ -orizanol) representam um grande atrativo do óleo de farelo de arroz, por apresentarem benefícios à saúde e por isso também foram analisados nos óleos degomados com a utilização da enzima PLC-1G. O teor de tocois para o óleo degomado com PLC-1G em diferentes concentrações encontra-se na Tabela 11.

Tabela 11. Teor de tocois (mg/kg) após degomagem com diferentes concentrações de PLC-1G.

PLC-1G (mg/kg)	β/γ -tocotrienol	α -tocotrienol	β/γ -tocoferol	α -tocoferol	Total
0*	457,6 \pm 1,2	28,2 \pm 0,0	136,2 \pm 0,0	141,2 \pm 0,0	763,2 \pm 20,1
100	422,9 \pm 3,4	22,4 \pm 0,1	128,8 \pm 0,2	127,4 \pm 0,4	701,5 \pm 8,1
200	423,1 \pm 4,0	21,6 \pm 0,2	127,8 \pm 2,4	133,1 \pm 1,4	705,7 \pm 5,1
300	420,7 \pm 1,2	20,0 \pm 0,2	124,4 \pm 0,6	131,3 \pm 0,5	696,4 \pm 11,7
400	419,8 \pm 6,7	22,7 \pm 0,4	119,9 \pm 1,4	135,4 \pm 1,0	697,9 \pm 10,6

*Corresponde ao experimento do condicionamento químico

Como pode ser observado na Tabela 11, o teor de β/γ -tocotrienol apresentou valores mais elevados que os demais tocois (419,8 – 457,6 mg/kg), seguido por β/γ -tocoferol (119,9 – 136,2 mg/kg) e α -tocoferol (127,4 – 141,2 mg/kg) seguindo os teores encontrados no óleo bruto de farelo de arroz. Rajam et al. (2005) estudaram o efeito do refino físico sobre os componentes minoritários no óleo de farelo de arroz em escala laboratorial e em escala industrial e verificaram que os tocois apresentaram redução durante os testes em escala piloto e escala industrial em função das perdas ocorridas durante as etapas de processamento do óleo.

Para verificar o efeito das diferentes concentrações da enzima PLC-1G sobre o teor de γ -orizanol após processo de degomagem enzimática analisou-se os óleos degomados. De acordo com os resultados, ao aumentar a concentração de enzima, o teor de γ -orizanol permaneceu constante (1,7%), indicando que a enzima e/ou o processo não degradam o mesmo.

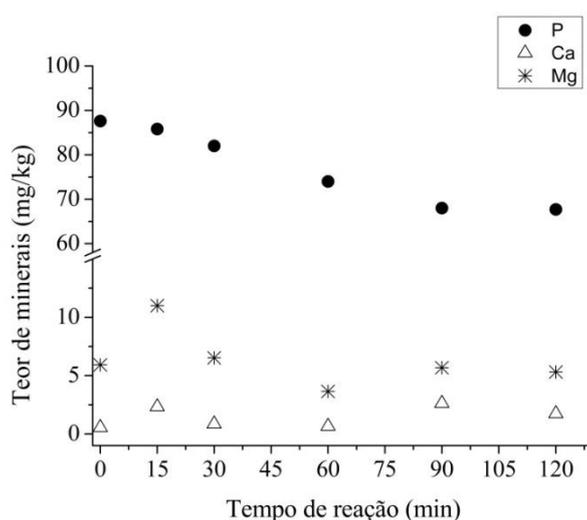
5.6. Cinética de reação (PLC-1G)

Após a definição da melhor concentração de enzima para realização dos experimentos com a enzima PLC-1G aplicada ao óleo de farelo de arroz bruto, procedeu-se a avaliação da cinética de reação. Dessa forma, foi realizada a degomagem enzimática com a

PLC-1G para a concentração de 300 mg/kg nos seguintes tempos de reação: 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min, como mostra a Figura 19.

Como esperado, após a degomagem utilizando a enzima PLC-1G foi observada uma queda no teor de fósforo com o aumento do tempo de reação. Para tempos de reação entre 90 – 120 min a redução no teor de fósforo não foi tão perceptível, variando entre 67 – 68 mg/kg, provavelmente devido a completa degradação dos fosfolipídios aos quais a PLC-1G atua de forma seletiva (PC e PE). Para os demais minerais, tais como Ca e Mg, os valores encontrados variaram entre 0,6 – 2,6 mg/kg e 3,6 – 11 mg/kg, respectivamente, e o Fe variou de 0,3 – 0,7 mg/kg, demonstrando que a maior parte desses minerais foram retirados com a goma.

Figura 19. Teor de minerais após cinética com PLC-1G.



Após os tempos de reação definidos para a avaliação da cinética de reação, os óleos degomados foram analisados em relação ao teor de acilglicerois (Tabela 12). Os acilglicerois são formados basicamente pelos TAG, DAG e MAG, porém de acordo com a especificidade da enzima, a degradação de PC e PE geraria maiores teores de DAG, o que consequentemente interfere na concentração dos demais acilglicerois. O teor de acilglicerois variou entre 92,14 – 92,61% e 0,18 – 0,24% para TAG e MAG, respectivamente.

Os DAG's por sua vez, aumentaram à medida que ocorreu o aumento do tempo de reação, alcançando maior porcentagem para o tempo de 120 min de reação. Considerando o teor inicial de DAG no experimento controle (CC), sendo 2,22%. Para 15 min apresentou o teor de 2,26%, pode-se verificar que o aumento absoluto do teor de DAG para o tempo de 15

min foi de 0,04%, o que corresponde ao valor relativo de 8,9%. Enquanto para o tempo de 30 min o teor foi de 2,35% e o aumento absoluto de DAG foi de 0,13% que corresponde a 28,9% em termos relativos. Para 60, 90 e 120 min os teores foram: 2,42%, 2,54% e 2,63% e o aumento absoluto de DAG foi de 0,20%, 0,32% e 0,41% o que corresponde em termos relativos a 44,4%, 71,1% e a 91,1%, respectivamente. Os cálculos dos valores relativos foram realizados tendo como base a soma do teor de PC+PE (0,65%), que resultaria no valor absoluto de DAG de 0,45%.

Jiang et al. (2015) estudaram a otimização da degomagem de óleo de camélia utilizando a enzima PLC (obtida por fermentação submersa de *Bacillus cereus* geneticamente modificada). De acordo com os resultados, o conteúdo de fósforo residual do óleo de camélia foi reduzido de 575,59 mg/kg para um teor menor que 20 mg/kg em 2 h, e nenhuma redução significativa foi observada após 2 h. O rendimento do óleo de camélia degomado foi aumentando lentamente com o aumento do tempo de reação. Isto pode ser explicado, já que a enzima PLC utilizada no estudo só poderia catalisar o grupo fosfato de PC e PE, o que significa que o óleo tratado com PLC requer etapas de tratamento além da degomagem, no processo de refino físico.

Sampaio et al. (2019) estudaram a degomagem enzimática de óleo de milho utilizando 200 mg/kg de enzima PLC-1G e constataram que após 120 min de reação o aumento relativo no teor de DAG foi de 92% e o teor de P, foi de 27 mg/kg. Os autores também verificaram que um aumento do tempo de reação para 240 min contribuía apenas com um leve aumento de DAG e diminuição do P residual. Dessa forma, os autores decidiram que o tempo de 120 min, seria o tempo ótimo de reação.

Tabela 12. Composição em acilglicerois do óleo de farelo de arroz degomado em diferentes tempos de reação para a enzima PLC-1G

Tempo (min)	TAG (%)	DAG (%)	MAG (%)
0*	92,61 ± 0,22	2,22 ± 0,19	0,18 ± 0,02
15	92,51 ± 0,09	2,26 ± 0,07	0,23 ± 0,00
30	92,40 ± 0,03	2,35 ± 0,00	0,26 ± 0,02
60	92,32 ± 0,02	2,42 ± 0,04	0,26 ± 0,02
90	92,21 ± 0,11	2,54 ± 0,12	0,24 ± 0,00
120	92,14 ± 0,16	2,63 ± 0,19	0,24 ± 0,01

Condições= 300 mg/kg; pH= 5,6; *Corresponde ao experimento do condicionamento químico.

Componentes Minoritários

Além da avaliação do teor de fósforo e DAG's nos óleos degomados, estes também foram analisados em relação aos teores de tocois e γ -orizanol. O teor de tocois foi analisado por UPLC e encontra-se na Tabela 13. A maior perda no teor de tocois ocorreu para 120 min de reação que apresentou aproximadamente 9% de perda, podendo estar relacionado ao maior tempo de processo. O total de tocois encontrados para o óleo de arroz degomado variou entre 696,4 – 763,2 mg/kg ao longo dos 120 min de reação. Valores similares foram encontrados por Rodrigues et al. (2014), que encontraram para o óleo de farelo de arroz degomado um teor total de 794 mg/kg de tocois.

Neste estudo, os principais tocois encontrados, tanto no óleo bruto, como após o condicionamento químico e degomagem enzimática foram o β/γ -tocotrienol (402,2 – 457,6 mg/kg), seguido pelo β/γ -tocoferol (124,4 – 148,1). Segundo Van Hoed (2010), na maioria dos óleos vegetais, o principal tocoferol é o γ -tocoferol. Porém, o óleo de farelo de arroz é rico em tocotrienóis, principalmente γ -tocotrienol. Assim, o presente estudo encontra-se de acordo com a literatura, onde o β/γ -tocotrienol apresentou os maiores valores.

O teor de γ -orizanol representa um importante composto presente no óleo de farelo de arroz e foi medido no presente estudo após degomagem com enzima PLC-1G para os diferentes tempos de reação. De acordo com as análises, o teor de γ -orizanol apresentou uma leve redução de 1,8% no óleo bruto para 1,7% no óleo degomado após o tempo de reação de 120 min permaneceu praticamente constante durante o estudo da cinética da reação.

Tabela 13. Teor de tocois (mg/kg) após degomagem com PLC-1G ao longo do tempo.

PLC-1G (min)	β/γ -tocotrienol	α -tocotrienol	β/γ -tocoferol	α -tocoferol	Total
0	457,6 \pm 1,2	28,2 \pm 0,0	136,2 \pm 0,0	141,2 \pm 0,0	763,2 \pm 20,1
15	402,2 \pm 8,2	18,3 \pm 0,5	135,5 \pm 2,4	148,2 \pm 1,4	704,2 \pm 4,1
30	408,7 \pm 5,7	17,5 \pm 0,4	148,1 \pm 0,8	145,3 \pm 1,5	719,6 \pm 6,8
60	409,3 \pm 3,4	17,1 \pm 0,3	146,8 \pm 3,0	144,2 \pm 2,4	717,4 \pm 5,2
90	410,1 \pm 2,1	20,1 \pm 0,4	140,2 \pm 2,2	142,4 \pm 1,4	712,8 \pm 2,0
120	420,7 \pm 1,2	20,0 \pm 0,2	124,4 \pm 0,6	131,3 \pm 0,5	696,4 \pm 9,6

*Corresponde ao experimento do condicionamento químico

Krishna et al. (2001) estudaram a variação do teor de γ -orizanol após o refino químico e físico e constataram que o teor de γ -orizanol no óleo de farelo de arroz submetido

ao refino físico variou de 1,60 a 1,74%, enquanto o óleo refinado quimicamente apresentou uma quantidade consideravelmente menor (0,19%). Esse resultado demonstrou que o γ -orizanol foi afetado pelo refino químico, que tem como diferencial a etapa de neutralização na qual se utilizam altas concentrações de base (NaOH), sendo que o γ -orizanol foi perdido principalmente na forma de sabões. No presente estudo, no entanto, a quantidade de NaOH utilizada foi bem pequena e praticamente não causou alterações no teor de γ -orizanol.

5.7. Degomagem com combinação de enzimas/coquetel

A combinação das duas enzimas (PLA₁ e PLC-1G) foi realizada no intuito de avaliar a ação das mesmas utilizadas em conjunto e assim fazer uma comparação com o coquetel PLC-3G, o qual é composto pelas enzimas PLC-1G, PLA₂ e PLC-PI. O uso da combinação de enzimas ou do coquetel tem com objetivo não somente o aumento do rendimento em óleo neutro, como também a redução do teor de fósforo, o qual não se consegue com o uso individual da enzima PLC-1G. Primeiramente, a combinação de enzimas ou coquetel foi avaliado para o tempo de reação 60 min e após, para o tempo de 120 min. Para cada experimento foi feita uma comparação do efeito da combinação de enzimas e do coquetel sobre o óleo de farelo de arroz, quanto à composição em acilglicerois, componentes minoritários e teores de minerais (P, Ca, Mg e Fe).

5.7.1. Uso de PLC-1G/ PLA₁ por (60 min) e PLC-3G por 60 min

O coquetel PLC-3G é conjunto de fosfolipases que atuam em todos os fosfolipídios (PA, PI, PC e PE), pois consiste em uma mistura das enzimas PLC-1G, PLA₂ e PI-PLC (GUPTA, 2017). Portanto, ela age não somente aumentando o rendimento em óleo neutro (AGL e DAG), como também reduzindo o teor de minerais. É importante ressaltar que o fósforo tem papel importante no escurecimento do óleo.

Dayton e Galhardo (2008) descreveram o uso de uma combinação de enzimas PLC e PLA₁ para hidrólise completa de fosfolipídios em um processo de degomagem de óleo de soja. Os autores realizaram degomagem sequencial e simultânea com PLC e PLA₁ em 38 amostras. Uma sinergia entre os dois tipos diferentes de enzimas foi verificado, mesmo quando as condições de reação não eram ótimas para ambas, onde o teor de P variou de 1,8 – 109,6 mg/kg.

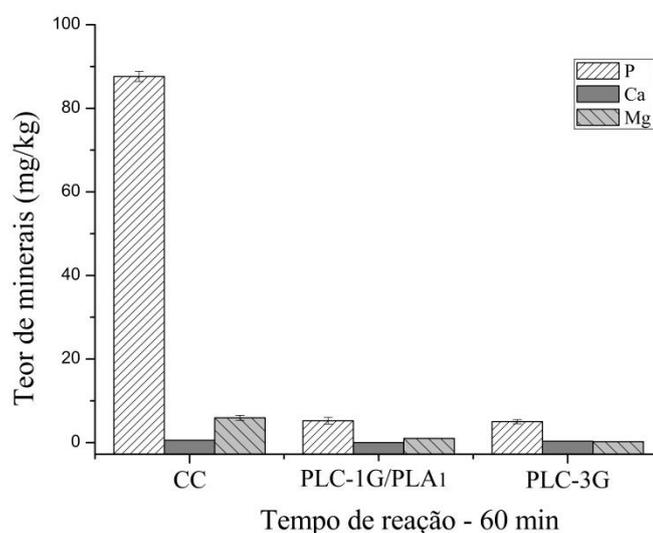
Em comparação com o processo de degomagem tradicional, a degomagem enzimática do óleo de farelo de arroz tem vantagens como, por exemplo, melhor utilização de subprodutos como gomas e ceras, diminuição de perdas de óleo devido à eliminação da neutralização química, menor perda de óleo na goma, γ -orizanol bem preservado, processo ecológico com menos água residual e efluentes, menor perda de óleo por lavagem com água (SENGAR et al., 2014). Assim, a degomagem com a combinação das duas enzimas (PLA₁ e PLC-1G) e o coquetel (PLC-3G) tem muito a acrescentar no processo de refino do óleo de farelo de arroz.

A Figura 20 apresenta os resultados do teor de minerais presentes no óleo após degomagem com a combinação de PLA₁ e PLC-1G e com o coquetel (PLC-3G) para o tempo de 60 min de reação. Para a combinação foram utilizadas as melhores condições da enzima PLA₁ e da enzima PLC-1G. Desta forma, as concentrações escolhidas para a combinação foram: 50 mg/kg para a enzima PLA₁ e 300 mg/kg para a enzima PLC-1G, pois foram as concentrações que apresentaram o menores teores de fósforo e maiores teores de óleo neutro (AGL ou DAG), o que minimiza os gastos do processo.

A combinação de PLA₁ e PLC-1G teve o tempo de 60 min atuando no óleo (o qual havia passado por condicionamento químico). Após o ajuste do pH foi realizada a adição de 50 mg/kg da enzima PLA₁. Assim, seguiu-se então para homogeneização (1 min/16000 rpm) e agitação leve (15 min em agitador mecânico). Em seguida foi adicionada a concentração de 300 mg/kg da enzima PLC-1G, em que foi feita a agitação até o tempo de 60 min. Da mesma forma, o coquetel (PLC-3G) também teve o mesmo tempo de atuação de 60 min com uma concentração de 300 mg/kg. Após o tempo de reação foi analisado o teor de minerais para a combinação de enzimas (PLA₁/PLC-1G) e para o coquetel.

De acordo com a Figura 20, pode-se verificar que tanto a combinação de enzimas, quanto o coquetel foram efetivos na redução do teor de fósforo do óleo de farelo de arroz para teores de aproximadamente 5 mg/kg. Sendo assim, é possível concluir que tanto a utilização da combinação de enzimas quanto do coquetel traria um efeito benéfico para o processo de degomagem enzimática do óleo de farelo de arroz.

Figura 20. Teor de minerais da combinação (PLC - 1G/PLA₁) e do coquetel de PLC - 3G para o tempo de 60 min de reação.



A PLC-3G apresentou baixos valores também para Ca e Mg, foram encontrados os teores de 0,31 e 0,2 mg/kg, respectivamente. Enquanto que a combinação apresentou teores de 0,1 mg/kg e 0,9 mg/kg para Ca e Mg, respectivamente. Dessa forma, do ponto de vista econômico e prático, pode-se dizer que a enzima PLC-3G foi mais efetiva que a combinação PLC-1G/PLA₁ para o mesmo tempo de reação (60 min), pois ao utilizar a combinação de enzimas foram gastos 350 mg/kg (50 mg/kg-PLA₁ + 300 mg/kg-PLC) e para o coquetel a quantidade utilizada foi de 300 mg/kg, o que resultou em valores similares de minerais, resultando desta forma, em possíveis menores custos de processo.

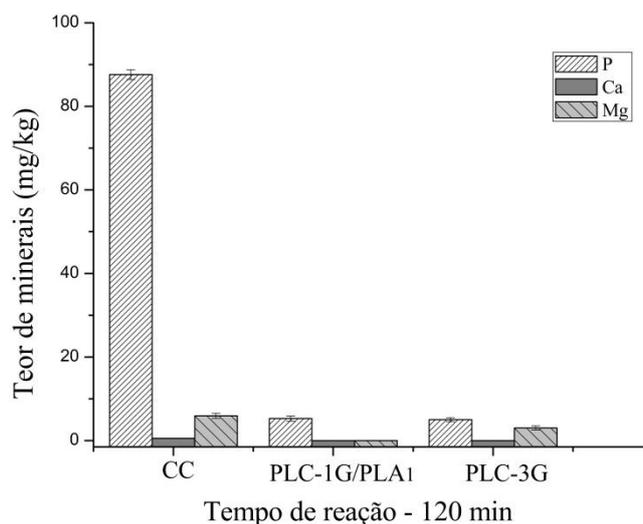
Jiang et al. (2015) realizaram degomagens enzimáticas em 8 variedades de diferentes óleos vegetais utilizando uma mistura das enzimas PLC + PLA₁ durante 3,5 horas (sendo 0,5 h para um pré-tratamento ácido e 3 h de degomagem enzimática) e encontrou teores de fósforo menores que 5 mg/kg para todos os óleos. Vale salientar que não há trabalhos na literatura sobre a enzima PLC-3G até o momento.

5.7.2. Uso de PLC-1G/PLA₁ (120 min) e PLC-3G (120 min)

O tempo é um parâmetro de suma importância no processo de degomagem enzimática, pois através dele é possível analisar o que está ocorrendo no meio e se a enzima está sendo efetiva, assim possibilitando chegar a condições ótimas de processo. Sabendo-se da

importância, tanto a combinação de enzimas (PLC-1G/PLA₁) quanto o coquetel (PLC-3G) foram avaliados também para o tempo de reação de 120 min, como mostra a Figura 21.

Figura 21. Teor de minerais da combinação (PLC-1G/PLA₁) e do coquetel de PLC-3G por 120 min.



De acordo com os resultados pode-se verificar que o teor de fósforo para a combinação com PLC-1G/PLA₁ apresentou resultado de 5,26 mg/kg de fósforo. Já a PLC-3G apresentou, resultado de 5,01 mg/kg para 120 min. Dessa forma, tanto a combinação quanto o coquetel conseguiram chegar a teores menores que 10 mg/kg de fósforo durante 60 e 120 min de reação. Isso ocorre provavelmente, porque após os 60 min de reação todo o fosfolípido já foi consumido pelas enzimas, resultando em valores que ficam sempre ao redor de 5 mg/kg.

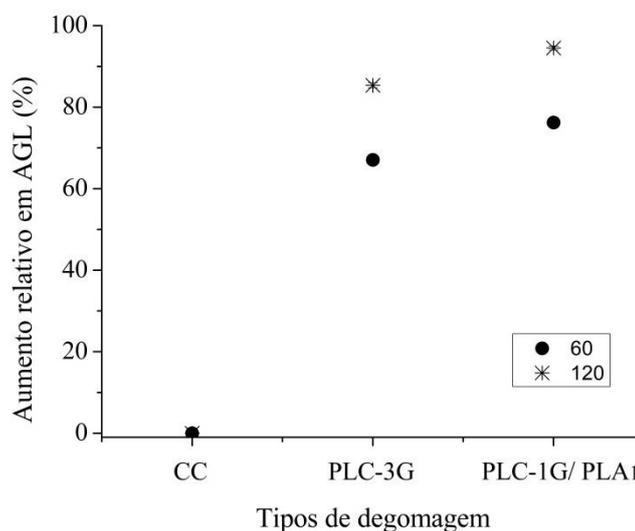
Avaliação do rendimento em DAG e AGL após o processo de degomagem

Como se sabe, as fosfolipases PLA's são responsáveis pela hidrólise dos fosfolípidios em AGL, enquanto as PLC's são responsáveis pela hidrólise dos fosfolípidios em DAG. Sendo assim, os óleos degomados foram analisados em relação ao teor de AGL e DAG para os tempos de reação de 60 e 120 min.

Inicialmente foi avaliado o teor de AGL para os tempos de 60 e 120 min tanto para a combinação de enzimas como para o coquetel, e o aumento em termos relativos encontra-se na Figura 22. De acordo com os resultados, o aumento do tempo de reação de 60 min para 120 min resultou no aumento do teor de AGL presente no óleo degomado tanto para

a combinação de enzimas quanto para o coquetel. Porém, se compararmos para um mesmo tempo de reação, é possível verificar que o uso da combinação resultou em maiores teores de AGL.

Figura 22. Aumento relativo em ácidos graxos livres para diferentes tempos de reação.



Como a partir do uso da combinação de enzimas ou do coquetel pode-se obter a formação de AGL ou DAG, o rendimento do óleo degomado foi avaliado também a partir da análise do teor de DAG (Tabela 14). De acordo com os resultados, o aumento do tempo de reação de 60 min para 120 min promoveu um aumento no teor de DAG no óleo degomado para a combinação PLC-1G/PLA₁. Considerando o teor inicial de DAG no experimento controle (CC) pode-se verificar que o aumento absoluto do teor de DAG para o tempo de 60 min foi de 0,30%, o que corresponde ao valor relativo de 66,7%. Enquanto para o tempo de 120 min o aumento absoluto de DAG foi de 0,42% que corresponde a 93,33% em termos relativos. Os cálculos dos valores relativos foram realizados tendo como base a soma do teor de PC + PE (0,65%), que resultaria no valor absoluto de DAG de 0,45%.

De acordo com os resultados, o aumento do tempo de reação de 60 min para 120 min promoveu um aumento no teor de AGL no óleo degomado para a combinação PLC-1G/PLA₁. Considerando o teor inicial de AGL no experimento controle (CC), pode-se verificar que o aumento absoluto do teor de AGL para o tempo de 60 min foi de 0,25%, o que corresponde ao valor relativo de 76,2%. Enquanto para o tempo de 120 min o aumento absoluto de AGL foi de 0,3% que corresponde a 91,5% em termos relativos.

Tabela 14. Composição em acilglicerois do óleo de farelo de arroz após degomagem com combinações das enzimas PLC - 1G e PLA₁ e coquetel da enzima PLC - 3G.

Enzimas e coquetel	Tempo (min)	TAG (%)	DAG (%)	MAG (%)	AGL (%)
CC	0	92,63 ± 0,22	2,22 ± 0,19	0,16 ± 0,02	4,99 ± 0,14
PLC-1G/ PLA ₁	60	91,99 ± 0,01	2,52 ± 0,02	0,25 ± 0,00	5,24 ± 0,02
PLC-1G/ PLA ₁	120	91,84 ± 0,09	2,64 ± 0,06	0,23 ± 0,02	5,29 ± 0,06
PLC-3G	60	91,81 ± 0,12	2,62 ± 0,05	0,36 ± 0,07	5,21 ± 0,00
PLC-3G	120	91,65 ± 0,23	2,76 ± 0,15	0,32 ± 0,04	5,27 ± 0,04

Chemical conditioning (CC). Different letters in the same column indicate significant differences

Resultados similares foram observados para o coquetel (PLC-3G), onde o teor de DAG, após 60 min, apresentou um aumento absoluto de 0,40%, o que corresponde a um aumento relativo de 70,18%. Para o tempo de 120 min de reação, o óleo degomado apresentou um aumento absoluto de DAG da ordem de 0,54%, o que corresponde em termos relativos a 94,70%. É importante salientar que no caso do coquetel (PLC-3G), deve existir nos cálculos a inclusão do PI, pois este possui uma enzima específica para degradação deste fosfolípido, resultando em maiores valores de DAG no óleo degomado.

Para os resultados de AGL foi observado que para o coquetel (PLC-3G), o teor de AGL apresentou um aumento absoluto de 0,22% após 60 min, o que corresponde a um aumento relativo de 67,07%. Para o tempo de 120 min de reação, o óleo degomado apresentou um aumento absoluto de AGL da ordem de 0,28%, o que corresponde em termos relativos a 85,4%.

Componentes Minoritários

Os componentes minoritários presentes no óleo de farelo de arroz que correspondem aos constituintes da vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) e ao γ -orizanól constituem uma grande vantagem ao óleo que por suas características vem sendo pesquisado e utilizado em várias áreas. A deficiência de vitamina E na dieta humana está relacionada com anomalias neurológicas e distúrbios de má absorção de gordura (CHUNHIENG et al., 2008).

Assim, devido a sua importância, os teores de tocois das combinações e do coquetel também foram analisados e encontram-se na Tabela 15.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 15, pode-se verificar que o β/γ -tocotrienol apresentou os maiores valores, permanecendo de acordo com os resultados obtidos para as outras degomagens realizadas anteriormente sem combinação. Para a combinação de PLC-1G/PLA₁ nos dois tempos (60 e 120 min), o teor de β/γ -tocotrienol variou de 436,7 – 404,2 mg/kg. Enquanto para o coquetel (PLC-3G) nos dois tempos (60 e 120 min) o teor de β/γ -tocotrienol variou de 452,1 – 433,5 mg/kg. As pequenas perdas observadas estão relacionadas com o processo.

Tabela 15. Concentração em (mg/kg) de tocoferóis e tocotrienóis presentes nas combinações (PLA₁ e PLC-1G) e no coquetel (PLC-3G).

Tratamento	Tempo (min)	β/γ -tocotrienol	α -tocotrienol	β/γ -tocoferol	α -tocoferol	Total
CC*	0	458,3 ± 1,3	29,2 ± 0,5	136,1 ± 0,3	140,2 ± 0,3	763,8 ± 21,2
PLC/PLA ₁	60	436,8 ± 0,4	29,4 ± 0,7	151,8 ± 0,2	137,0 ± 0,2	755,1 ± 9,9
PLC/PLA ₁	120	404,2 ± 1,2	27,4 ± 0,8	152,9 ± 0,2	135,8 ± 0,3	720,3 ± 14,7
PLC-3G	60	452,1 ± 1,6	22,8 ± 1,3	129,9 ± 0,4	138,2 ± 0,4	743,1 ± 1,4
PLC-3G	120	433,5 ± 1,4	23,3 ± 3,2	132,5 ± 0,6	133,9 ± 0,5	723,1 ± 12,7

*Corresponde ao condicionamento químico

Os valores de α -tocotrienol, β/γ -tocoferol apresentaram uma leve perda para a combinação de PLC-1G/PLA₁ por 60 e 120 min. O mesmo comportamento foi observado para o coquetel PLC-3G para os tempos de 60 e 120 min. Sendo que as porcentagens de perda no teor total de tocois foram maiores para o tempo de 120 min para a combinação (PLC-1G/PLA₁) e PLC-3G, apresentando respectivamente, 6% e 5% de perda.

O conteúdo de γ -orizanol para os tratamentos de PLC-1G/PLA₁ (60 min e 120 min) apresentou um teor de aproximadamente 1,7%, para ambos os experimentos, o mesmo resultado obtido após condicionamento químico, indicando que a degomagem não alterou o conteúdo de γ -orizanol. Para as degomagens com o coquetel (PLC-3G) nos dois tempos, 60 e 120 min, o teor de γ -orizanol também não apresentou alterações e permaneceu em aproximadamente 1,7%.

O presente estudo está de acordo com Krishna et al. (2001) os quais verificaram que o conteúdo de γ -orizanol no óleo não foi afetado após a degomagem. Os autores

observaram que no óleo bruto o teor era de 1,86% e após o processo de degomado passava para 1,84%. Ainda de acordo com os autores, o refino do óleo por via física conseguiu manter o teor de γ -orizanol no óleo refinado em aproximadamente 100% do encontrado no óleo bruto, mostrando que o refino físico é capaz de manter o γ -orizanol mesmo após o processo de degomagem.

6. CONCLUSÃO

A primeira etapa do trabalho consistiu na caracterização do óleo bruto de farelo de arroz que incluiu: teor de acidez, composição em acilglicerois, composição de fosfolipídios, teor de minerais, composição em ácidos graxos, e componentes minoritários. Após isso foi realizada a degomagem aquosa para os teores de 3, 5, 7 e 10% de água adicionada durante 15 min. De acordo com os resultados, durante as degomagens não houve uma grande variação no teor de fósforo (32 - 17,2 mg/kg), assim foi escolhido o teor de água de 3% como ideal, devido aos menores custos envolvidos.

Antes de cada processo de degomagem enzimática foi realizado o condicionamento químico (CC), onde o objetivo era alcançar o pH ideal para a enzima atuar. As condições ótimas de concentração para cada enzima foram encontradas e a partir dessas condições foram realizadas as degomagens variando o tempo de reação (15 a 120 min). Dessa forma, o efeito de cada enzima (PLA₁, PLC-1G e PLC-3G) separadamente foi avaliado, assim como o efeito conjunto no óleo de farelo de arroz bruto.

Primeiramente, foi realizada a degomagem enzimática com a enzima PLA₁ com as concentrações de 10, 30, 50 e 70 mg/kg durante 120 min, onde o objetivo era escolher a melhor concentração para seguir para o estudo da cinética. Dessa forma, a concentração escolhida foi a de 50 mg/kg, pois apresentou teor de fósforo (P) de 10,4 mg/kg durante os 120 min de reação.

A cinética com a enzima PLA₁ foi realizada para os tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 min, onde foram analisados os teores de minerais, AGL e componentes minoritários. O teor de fósforo (P) já para os tempos de reação entre 60 - 90 min, foi reduzido para valores entre 13 e 15 mg/kg. Para o tempo de reação de 120 min, o óleo degomado atingiu 10,4 mg/kg, se enquadrando, portanto, no valor desejado para que o óleo tivesse condições de seguir as demais etapas do refino físico (10 mg/kg). Sendo assim, o tempo de reação de 120 min foi escolhido como tempo mais apropriado para atuação da enzima PLA₁ (Lecitase Ultra). O teor de AGL em termos relativos após os 120 min de reação foi de 91,5 %, indicando que a enzima foi capaz de hidrolisar os fosfolipídios e esse tempo foi escolhido como o melhor tempo de atuação da enzima.

Para a enzima PLC-1G foram realizadas degomagens com 100, 200, 300 e 400 mg/kg, no intuito de escolher a melhor concentração e seguir para a cinética. Foi verificado

que dentre as concentrações, a de 300 mg/kg apresentou um teor de fósforo (P) de 67,6 mg/kg. Devido a diferença para o teor de fósforo entre as concentrações de 300 e 400 mg/kg da enzima PLC-1G, optou-se por seguir para as próximas degomagens com a concentração de 300 mg/kg.

Ao escolher a concentração de 300 mg/kg foi estudada a ação da PLC-1G ao longo de 120 min. Foi verificado que o teor de DAG apresentou, em termos relativos, o teor de 91,1% após os 120 min de reação. Foi verificado que com o aumento do tempo de reação os teores de minerais apresentaram redução ao longo do tempo de reação, onde o teor de fósforo chegou a 67,6 mg/kg após 120 min.

Para as combinações de PLC-1G e PLA₁ foram analisados os teores de minerais, AGL, DAG e os componentes minoritários, assim como para o coquetel (PLC-3G). Tanto as combinações quanto o coquetel apresentaram teores de aproximadamente 5 mg/kg de fósforo (P), o que indica que tanto a combinação quanto o coquetel foram eficientes para o tempo de 60 e 120 min de reação. Os AGL apresentaram valores relativos de 76,2% e 91,5% para a combinação (PLC-1G e PLA₁) durante 60 min e 120 min, respectivamente. Para o coquetel (PLC-3G), os valores em termos relativos foram: 67,1% e 85,4% nos tempos de reação de 60 e 120 min, respectivamente. Dessa forma, pode-se notar que a combinação apresentou maior teor de AGL após a degomagem.

Os teores de DAG em termos relativos, para a combinação após 60 e 120 min foram 66,7% e 93,3%, respectivamente. Para o coquetel, os teores foram 70,2% e 94,7% para 60 e 120 min, respectivamente, ou seja, após os 120 min de reação o teor de DAG foi similar para os dois tratamentos. Entretanto a quantidade de enzima utilizada no coquetel (300 mg/kg) é menor que para a combinação (350 mg/kg), fazendo com que o tratamento com o coquetel seja considerado ideal.

As degomagens mantiveram os teores de componentes minoritários elevados, onde o β/γ -tocotrienol foi o que apresentou os maiores teores para o óleo bruto e para todas as degomagens. O γ -orizanol variou de 1,6 – 1,7 % para todas as degomagens, o que significa que os processos de degomagem não causaram alterações nos componentes minoritários.

Os processos abordados nesse trabalho poderão ser utilizados pelas indústrias como forma de redução do teor de P, aumento de AGL e DAG e manutenção dos componentes minoritários (tocois e γ -orizanol). Sendo assim, pode-se concluir que as

degomagens enzimáticas com PLA₁, PLC-1G, combinação (PLA₁/PLC-1G) e o coquetel (PLC-3G) são eficientes na degomagem de óleo de farelo de arroz.

7. SUGESTÕES TRABALHOS FUTUROS

Como demonstrado por meio dos experimentos, as enzimas apresentaram ótimos resultados, mas futuros estudos são necessários para que se tenha uma melhor noção da capacidade da enzima PLC-3G. Como foi visto essa enzima é relativamente nova e não há uma quantidade significativa de estudos para parâmetros de análise da mesma em outros tipos de óleos vegetais. Assim, é necessário que outras matérias-primas sejam avaliadas.

- Realização de testes com o objetivo de definir as condições ótimas da enzima PLC-3G em outros tipos de óleos;
- Utilizar outros métodos de análise de γ -orizanol, como HPLC ou UPLC;
- Otimização das etapas de refino do óleo de farelo de arroz

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALRUST, E., BEYER, W., OTTOFRICKENSTEIN, H. **Enzymatic method for reducing the amount of phosphorous containing components in vegetable and animal oils**. 1992, European Patent 0,513,709.

AHSAN, H.; AHAD, A.; SIDDIQUI, W. A. A review of characterization of tocotrienols from plant oils and foods. **Journal Of Chemical Biology**, v. 8, n. 2, p.45-59, 20 jan. 2015.

ANDERSON, D. A primer on oils processing technology. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2005, 6 ed., v.5, Cap. 1, p. 1-56. 2005.

ANSOLIN, M.; SOUZA, P. T; MEIRELLES, A. J. A.; BATISTA, E. A. C. Tocopherols and Tocotrienols: an Adapted Methodology by UHPLC/MS Without Sample Pretreatment Steps. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 7, p.2165-2174. 2017.

ANVISA—National Health Surveillance Agency. RDC n 482, September 23, 1999. Technical Rules for Identity Fixation and Quality of Vegetable Fats and Oils.

A.O.C.S. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 2009, AOCS Press: Champaign, USA.

ARROZ IRRIGADO: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil/ 28^a Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado, 11 a 13 de agosto de 2010. Bento Gonçalves, RS.- Porto Alegre: **SOSBAI**, 2010.

AUTINO, H. C. Degomagem. In: Barrera-Arellano, D.; Block, J.M. **Temas selectos en aceites y grasas**. 1.ed. São Paulo: Editora Blucher, v.1, p. 97- 307, 2012.

BASIRON, Y. Palm Oil, in Bailey's industrial oil &fat products. **John Wiley and Songs**. 6. ed. v.3, p. 333-419, 2005.

BERGER, A.; REIN, D.; SCHAFER, A.; MONNARD, I.; GREAMUD, G. LAMBELET, P.; BERTOLI, C. Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied γ -orizanol in mildly hypercholesterolemic men. **European Journal of Nutrition**, v. 44, p. 163-173, 2005.

BERMUDES, R. F. **Avaliação do farelo de arroz integral em rações para terneiros holandês e jersey desaleitados precocemente**. 242 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.1994.

BRUSCATTO, M. H. **Estabilidade de biofenóis no óleo de arroz submetido ao aquecimento em diferentes temperaturas**. 2008. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciencia e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2008.

CALHEIROS, M. N. **Extração de orizanol da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz**. 2007. 105p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

CAMPBELL, S. J.; NAKAYAMA, N.; UNGER, E.H. (United Oilseed Products Ltd.). **Chemical degumming of crude vegetable oils**. Canadian Patent 1 157 883. 1983.

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

CARVALHO, C. O. Comparação entre métodos de extração do óleo de *Mauritia flexuosa* L.f. (ARECACEAE – buriti) para uso sustentável na reserva de desenvolvimento Tupé: rendimento e atividade antimicrobiana. 2011. 110p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação – Universidade do Estado do Amazonas, 2011.

CHEN, C.; YANG, Y.; SHEN, C.; LAI, S.; CHANG, C. M.; SHIEH, C. Recovery of vitamins B from supercritical carbon dioxide-defatted rice bran powder using ultrasound water extraction. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p.124-128. 2011.

CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; DIDIER, M. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols and sterols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n.7, p. 1374–1380. 2008.

CICERO, A. F. G.; GADDI A. Rice bran oil and γ -oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. **Phytotherapy Research**, v.15, p.277-289, 2001.

CLAUSEN, K. Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. **European Journal of Lipid Science Technology**, v.103, p. 333 - 340, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS. Codex standard for named vegetable oils: Codex-Stan 210. p.8–15, 2015.

COWAN, D.; KORSHOLM, N. **Development in enzymatic degumming**. Presentation at the 7th Euro Fed Lipid Congress, p. 18–121, 2009.

DANIELSKI, L.; ZETZL, C.; HENSE, H.; BRUNNER, G. A. Process line for the production of reffined rice oil from rice bran. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 133-141, 2005.

DAYTON, C. L.; GALHARDO, F. **Enzymatic degumming utilizing a mixture of PLA and PLC phospholipase**. US Patent. 2008/018233A1. 2008.

DAYTON, C. L.; GALHARDO, F. **Enzymatic Degumming**. AOCs Lipid Library®. Disponível em: <<https://lipidlibrary.aocs.org/edible-oil-processing/enzymatic-degumming>>. Acessado em 10 de Agosto de 2020.

DE GREYT, W. Current and future technologies for the sustainable and cost-efficient production of high quality food oils. **European Journal Of Lipid Science And Technology**,

v. 114, n. 10, p. 1126-1139. 2012.

DIEHL, B. W. K. NMR spectroscopy of natural substances. In: NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis, Ed.1., Keys: Holzgrabe, U; Wawer, I; Diehl, B; Eds, **Elsevier B. V.** —Jordan Hill: Oxford, England, p.194–196. 2008.

DIEZ, Roberto. Superdesgomado de aceites crudos. Libro de Oro de A&G - 10º Aniversario – v. 2 : Recopilación de Artículos Técnicos, Asociación Argentina de Grasas y Aceites, n. 10, p. 111-120, 2000. DIJKSTRA, A. J. Optimization of Enzymatic Degumming process for Rapeseed oil. **Eur J Lipid Sci Technol**, v.112, p. 1178–1189, 2010.

DIJKSTRA, A. J. Enzymatic degumming. **Lipid Technology**, v. 23, n. 2, p. 36–38. 2011.

DIJKSTRA, A. J. About water degumming and the hydration of non-hydratable phosphatides. **European Journal Of Lipid Science And Technology**, v. 119, n. 9, p.1600496-1600507, 2017.

DIJKSTRA, A. J. “Desgomado, refinación, lavado y secado de aceites y grasas”, Libro de Oro de A&G - 10º Aniversario - Tomo II, Presentado en la Conferencia Mundial sobre Procesamiento de Aceites y Grasas de la AOCS - Budapeste – Hungría, 1992.

DSM - Purifine® 3G: converting lost oils into profit. Disponível em: <https://www.dsm.com>. Acesso em 10 janeiro de 2019.

ENGELMANN, J. I.; RAMOS, L. P.; CREXI, V. T.; MORAIS, M. M. Degumming and Neutralization of Rice Bran Oil. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 2, p. 1–10, 2016.

FANG, N.; YU, S.; BADGER, T. M. Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS/MS. **Journal Agric. Food Chemistry**, v.51, p. 3260-3267, 2003.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical databases. Disponível em: <<http://www.fao.org>> . Acesso em 16 de setembro de 2017.

GALERA, J. S. Substituição parcial da farinha de trigo por farinha de arroz (*Oryza sativa* L.) na produção de sonho – estudo modelo. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GIBON, V.; TIRTIAUX, A. Removal of gums and waxes – a review, v. 11, p. 524–535. 2000

GHOSH, M. Review on Recent Trends in Rice Bran Oil Processing. **Journal of the American Oil Society**, v. 84, p. 315-324, 2007.

GRAF, E. Antioxidant Potential of ferulic acid. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 13, p. 345-448, 1992.

GUINAZ, M.; MILAGRES, R. C. R. M.; PINHEIRO, H. M. S.; CHAVES, J. B. P. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Química Nova**, v. 32, p. 2098-2103, 2009.

GUNSTONE, F. D. **Lipids in Food Chemistry: Biochemistry and Technology**. S.1:Pergamon International Library, 1983.

GUPTA, M. K. **Chapter 4 - degumming practical Guide to vegetable oil processing** (2nd ed.). AOCS Press 41–78. 2017.

HAMMOND, E. G. ; JOHNSON, L. A. ; SU, C. ; WANG, T. ; White, P. J. **Soybean oil**. In: **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 6. Ed., John Wiley & Sons. 2005.

INNIS, S. M. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. **Adv Exp Med Biol**, v. 554, p. 27 - 43. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>. Acessado em 10 de Junho de 2020.

IQBAL, S.; BHANGER, M.I.; ANWAR, F. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 265-272, 2005.

JAHANI, M.; ALIZEDEH, M.; PIROZIFARD, M., QUDSEVALI, A., Optimization of enzymatic degumming process for rice bran oil using response surface methodology. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, p. 1892–1898, 2008.

JESUS, S. P.; GRIMALDI, R.; HENSE, H. Recovery of γ -oryzanol from rice bran oil by product using supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 149-155, 2010.

JIANG, F.; WANG, J.; JU, L.; KALEEM, I.; DAI, D.; LI, C. Optimization of degumming process for soybean oil by phospholipase B. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, n. 8, p.1081-1087. 2011.

JIANG, X.; CHANG, M.; JIN, Q.; WANG, X. Application of phospholipase A₁ and phospholipase C in the degumming process of different kinds of crude oils. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 3, p. 432–437. 2015.

JIANG, X.; CHANG, M.; JIN, Q.; WANG, X. Optimization of the degumming process for camellia oil by the use of phospholipase C in pilot-scale system. **Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 6, p. 3634–3644. 2015.

JULIANO, B.O.; BECHTEL, D.B. The rice grain and its gross composition. In: JULIANO, B.O. (Ed.).**Rice: chemistry and technology**. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, cap.2, p.17-57. 1985.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v.299, p. 146-154, 2005.

KAHLON, T. S. Rice Bran: Production, Composition, Functionality and Food Applications, Physiological Benefits. In: Editors Cho, S.S. e Samuel, P. Fiber **Ingredients: Food Applications and Health Benefits**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 305-321, 2009.

KARLESKIND, A.; WOLFF, J. P. **Oils and Fats Manual: A Comprehensive Treatise**. Lavoisier Technique et documentation, v. 1, p. 196-206. 1996.

KELLENS, M.; DE GREYT, W. Deodorization. In: O'Brien, R. D.; FARR, W.E.; WAN, P.J. (eds.), **Introduction to fats and oil technology**. Ed. 2. AOCS press, Champaign, Illinois, p. 618, 2000.

KHOR, H. T.; NG, T.T. Effects of administration of α -tocopherol and tocotrienols on serum lipids and liver HMGCoA reductase activity. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.51, p. 3-11, 2000.

KRISHNA, A. G. G.; KHATOON, S.; SHIELA, P. M.; SARMANDAL, C. V.; INDIRA, T.N.; MISHRA, A. Effect of refining of crude rice bran oil on the retention of oryzanol in the refined oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 2, p. 127-131, 2001.

LAKKAKULA, N. R.; LIMA, M.H; WALKER, T. Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. **Bioresource Technology**, v.92, p.157–161, 2004.

LAW, B. A. Enzymes in Dairy Product Manufacture. In: Whitehurst, R.J.; Oort, M. V. (Eds.), **Enzymes in Food Technology**. John Wiley & Sons, New Jersey, p. 91-108, 2009.

LEMOS, M. R. B.; SOARES, L. A. de S. Farelo de arroz: um subproduto em estudo. **Óleos & Grãos**, v. 7, n. 51, p.40-48, 2000.

LÜDTKE, F. L. **Estudo da degomagem e clarificação de óleo bruto do farelo de arroz (*Oryza sativa*) visando refino físico**. 2016. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. **Tecnologia para a produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.

MANO, Y.; KAWAMINAMI, K.; KOJIMA, M.; OHNISHI, M.; ITO, S. Comparative composition of brown rice lipids (lipid fractions) of indica and japonica rices. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.63, n.4, p.619-626, 1999.

MORETTO, E.; FETT, R. A. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. Livraria varela, São Paulo, 1998.

MUJAHID, A.; HAQ, I.; ASIF, M.; GILANI, A. H. Effect of various processing techniques and different levels of antioxidant on stability of rice bran during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p. 847-852, 2005.

O'BRIEN, R. D. Fats and Oils: An Overview. Chapter 1: **Introduction to fat and oils Technology**. Ed 2. AOCS press, Champaign, Illinois, p. 618, 2000.

OLIVEIRA, S. A. T. **Estudo das unidades de degomagem e neutralização**. 2012, 85p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2012.

ORTHOEFER, F. T. Rice Bran Oil. In: SHARIDI, F. (Ed.) **Bailey's industrial oil and fat products**. New Jersey: John Wiley & Sons. 6 ed., v.2., Cap. 10, p. 465-489. 2005.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F. COLLANTES, T. L. BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v.98, n.4, p.742-748, 2006.

PEREIRA, C. S. S. **Avaliação de diferentes tecnologias na extração do óleo do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. 88p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

PESTANA, V. R.; ZAMBIAZI, R.; MENDONÇA, C. R. B.; BRUSCATTO, M. H.; RAMIS-RAMOS, G. Quality changes and tocopherols and γ -oryzanol concentrations in RBO during the refining process. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 85, p. 113 – 119, 2008.

PRASAD, M. N. N.; SANJAV, K. R.; KHATOKAR, M. S.; VISMAYA, M. N.; SWAMY, S. N. Health Benefits of Rice Bran-A Review. **Journal Nutrition & Food Sciences**, v. 1, 2011.

RAJAM, L.; SOBAN, K. D. R.; SUNDARESAN, A.; ARUMUGHAN, C. A novel Process for Physically Refining Rice Bran Oil Through Simultaneous Degumming and Dewaxing. **Journal of the American Oil Chemists'Society**, v.82, p.223-220, 2005.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P.A. Z. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n.1, p. 2-15, 2013.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. ISBN: 85-212-0326-8.

RIBEIRO, A. P. B.; SOARES, M. S.; MOURA, J. M. L. N.; CÁCERES, M. C.; GONÇALVES, L. A. G. Aplicações da tecnologia de membranas no processamento de óleos vegetais. **Boletim Centro de Pesquisa em Processamento de Alimentos**, v. 23, n.1, p 1-22, 2005.

RODRIGUES, C. E. C.; ONOYAMA M. M.; MEIRELLES, A. J. A. Optimization os the rice bran oil deacidification process by liquid-liquid extraction. **Journal of Food Engineering**, v.73, n.4, p. 370-378, 2006.

RODRIGUES, C. E. C.; GONÇALVES, C. B.; MARCON, E. C.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. A. Deacidification of rice bran oil by liquid-liquid extraction using a renewable solvent. **Separation And Purification Technology**, v. 132, p.84-92. 2014.

ROGERS, E. J.; RICE, S. S. M.; NICOLOSI, R. J.; CARPENTER, D. R.; McCLELLAND, C.A.; RMANCZYK, L. J. Identification and quantification of oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 70, n.3, p. 301-307, 1993.

ROY, S. K.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. Enzymatic degumming of rice bran oil **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.79, p. 845–846, 2002.

SAMPAIO, K. A.; ZAYAKINA, N.; WOSNIAK, B.; TSUKAMOTO, J.; DE GREYT, W.; STEVENS, C. Enzymatic Degumming: degumming efficiency versus yield increase. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 1, p. 81-86, 2015.

SAMPAIO, K. A.; ZAYAKINA, N.; UITTERHAEGEN, E.; DE GREYT, W.; VERHÉ, R.; MEIRELLES, A. J. A.; STEVENS, C.V. Enzymatic degumming of corn oil using phospholipase C from a selected strain of *Pichia pastoris*. **LWT**. 2019.

SANTESTEVAN, V. A. **Desenvolvimento de metodologia para a análise de óleo de arroz**. 2011. 102 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SENGAR, G.; KAUSHAL, P.; SHARMA, H.; KAUR, M. Degumming of rice bran oil. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 183 – 198. 2014.

SILVA, M. A., SANCHES, C., AMANTE, E. R. Farelo de arroz composição e propriedades. **Óleos e grãos**, v.10, n.61, p. 34-42, 2001.

TERIGAR, B. G.; BALASUBRAMANIAN, S.; SABLIOV, C. M.; LIMA, M.; BOLDOR D. Soybean and rice bran oil extraction in a continuous microwave system: From laboratory-to pilot scale. **Journal of Food Engineering**, v.104, p. 208-217, 2011.

THERIAULT, A.; CHAO, J.; WANG, Q.; GAPOR, A.; ADELI, K. Tocotrienol: A review of its therapeutic potential. **Clinical Biochemistry**, v.32, n.5, p.309-319, 1999.

VAN HOED, V.; DEPAEMELAERE, G.; AYALA, J. V.; SANTIWATTANA, P.; VERHÉ, R.; DE GREYT, W. Influence of chemical refining on the major and minor components of rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 83, n. 4, p. 315–321, 2006.

VAN HOED, V. **Quality assessment of the high value vegetable oils by characterization of minor components**. 326 p. PhD Thesis – Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University – Ghent, 2010.

WILSON, T. A.; NICOLOSIA, R. J.; WOOLFREYA, B.; KRITCHEVSKYB, D. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, p.105 - 112, 2007.

YANG, B.; ZHOU, R.; YANG, J.; WANG, Y.; WANG, W. Insight into the enzymatic degumming process of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 5, p. 421 – 425, 2008.

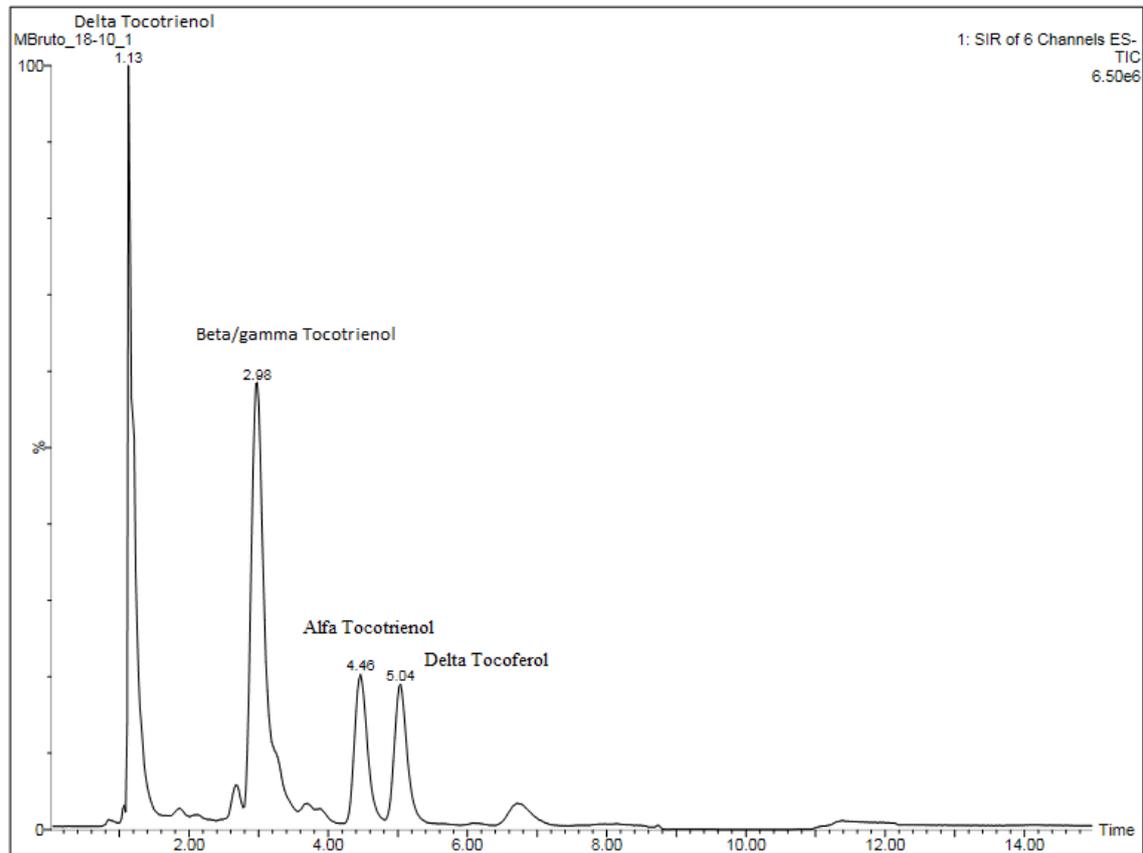
YE, Z.; QIAO, X.; LUO, Z.; HU, C.; LIU, L.; HE, D. Optimization and comparison of water degumming and phospholipase C degumming for rapeseed oil. **CyTA - Journal of Food**, v. 14, n. 4, p. 604 – 612. 2016.

ZAMBIAZI, R. **Tecnologia de óleos e gorduras**. UFPel. Pelotas-RS, 123p. 2003.

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.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Cromatograma referente à análise de tocois do óleo de farelo de arroz bruto por UPLC.



APÊNDICE 2. Cromatograma referente à análise de tocois do óleo de farelo de arroz degomado com a enzima PLA₁ por UPLC.

