



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DA CONSERVAÇÃO MÍNIMA PARA AS FOLHAS DA  
MANDIOQUEIRA (*Manihot esculenta*) E DA OBTENÇÃO DE  
CONCENTRADOS PROTÉICOS POR TRÊS VIAS QUÍMICAS**

BELÉM – PARÁ

2022

JAQUELINE DE FÁTIMA CABRAL MORAES

**ESTUDO DA CONSERVAÇÃO MÍNIMA PARA AS FOLHAS DA  
MANDIOQUEIRA (*Manihot esculenta*) E DA OBTENÇÃO DE  
CONCENTRADOS PROTÉICOS POR TRÊS VIAS QUÍMICAS**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador:** Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

---

C117e Cabral Moraes, Jaqueline de Fátima.  
ESTUDO DA CONSERVAÇÃO MÍNIMA PARA AS  
FOLHAS DA MANDIOQUEIRA (*Manihot esculenta*) E DA  
OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS PROTÉICOS POR  
TRÊS VIAS QUÍMICA / Jaqueline de Fátima Cabral Moraes.  
— 2022.  
256 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2022.

1. Proteína. 2. Produto minimamente processado. 3.  
Concentrado protéico. 4. Extração. 5. Balanço de  
massa. I. Título.

CDD 664.022

---

JAQUELINE DE FÁTIMA CABRAL MORAES

**ESTUDO DA CONSERVAÇÃO MÍNIMA PARA AS FOLHAS DA  
MANDIOQUEIRA (*Manihot esculenta*) E DA OBTENÇÃO DE  
CONCENTRADOS PROTÉICOS POR TRÊS VIAS QUÍMICAS**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data da avaliação: 17/10/2022

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente



Rosinelson da Silva Pena  
Data: 26/07/2023 17:24:03-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena  
(FEA/ITEC/UFPA – Orientador)

Documento assinado digitalmente



Renan Campos Chisté  
Data: 27/07/2023 09:08:35-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Renan Campos Chisté  
(PPGCTA/ITEC/UFPA) – Membro

Documento assinado digitalmente



NELSON ROSA FERREIRA  
Data: 28/07/2023 09:20:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira  
(PPGCTA/ITEC/UFPA) – Membro

Documento assinado digitalmente



DAVI DO SOCORRO BARROS BRASIL  
Data: 27/07/2023 22:04:23-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil  
(PPGEQ/ITEC/UFPA) – Membro externo

Documento assinado digitalmente



Alberdan Silva Santos  
Data: 21/08/2023 15:06:30-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Alberdan Silva Santos  
(PPGQ/ICEN/UFPA) – Membro externo

Dedico ao meu pai João Furtado Moraes (*in memoriam*),  
Minha mãe Lúcia Cleide Cabral Moraes,  
Meus avós Plínio Cabral e Odete Rosely (*in memoriam*),  
E a todas às vítimas da pandemia da Covid-19.

## AGRADECIMENTOS

O período de desenvolvimento dessa pesquisa foi uma combinação entre amadurecimento, desafios e resiliência. Nesses últimos anos entendi que uma tese não é apenas um trabalho, mas um prolongamento da vida do autor com expectativas particulares e de pessoas que nos cercam e apoiam.

Abraham Lincoln afirmou que “*A melhor maneira de prever o futuro é cria-lo*”. Deste modo, agradeço a todos que contribuíram para a criação do meu futuro profissional e meu crescimento pessoal.

Agradeço primeiro a Deus por ter me mantido com saúde e forças para chegar até o final, inclusive em tempos adversos como a pandemia que estamos vivenciando.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena por aceitar conduzir o meu trabalho de pesquisa, pelas críticas competentes e oportunas para o desenvolvimento deste trabalho e meu crescimento profissional.

Agradeço a Prof. Dra. Nádia Cristina Fernandes Corrêa e ao Prof. Dr. Luiz Ferreira de França por serem meus primeiros mentores na vida acadêmica e inspiração profissional constante.

Sou grata ao Prof. Dr. Renan Campos Chisté, ao Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira e ao Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil que compuseram a minha Banca de avaliação, pelas valiosas contribuições desde a minha Tese de Doutorado II. Agradeço ao Prof. Dr. Alberdan Silva Santos por ter se disponibilizado a assumir a vaga de membro externo nessa banca em tão pouco tempo.

Ao seu ‘Bertinho’ pelo apoio nesse trabalho devido à doação da matéria prima utilizada e seu importante incentivo à pesquisa científica.

A meus amigos de LAFAMI e LAOS; laboratórios em que vivi toda minha experiência profissional, sem dúvida minha segunda casa nesses 14 anos de Universidade Federal do Pará. Agradeço aos meus amigos do LAOS: Ricardo

Briglia, Eric César, Tomaz Freitas, José Freitas (Junior), Karina Rodrigues, Adriane Lago e Renan Tupinambá. Aos amigos do LAFAMI: Brenda Brito, Tatyane Mylena, Fernanda Sousa, Estela Sousa, Mayara Thayna, Gisélia, Gisele Oliveira, Adriano Rondineli, Adriano Lucena, Elivaldo Junior, Darly Pompeu, Rosane Chaves, Juliana Carmo e Ana Paula Campos. Aos amigos queridos que me apoiaram sempre Rebeca Costa, Carina Lemos, Priscila Alamar, Verônica Bezerra, Gilson Chagas, Dayse Duarte, Priscila Maia, Caroline Santos, Leonardo Pessoa, Fernanda Waris, Adriano Marçal, Elem Caramês e Mayara Galvão. Aos queridos amigos Silvio, Paula, Almir e Cleydi. Todos vocês compartilharam momentos importantes comigo, de descobertas e companheirismo!

Agradeço ao Laboratório de Defesa agropecuária (LFDA), que cedeu sua estrutura para a realização dos capítulos de III a VI dessa pesquisa, aos amigos que me ajudaram em todo esse período: Rogério Vieira, Renan Maciel e Jefferson Figueiredo e em especial ao Antônio Pinheiro, por ter viabilizado esse auxílio.

Agradeço à Universidade Federal do Pará (UFPA) e o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), do Instituto de Tecnologia (ITEC), pela assistência ao desenvolvimento das atividades acadêmicas e formação profissional. Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa concedida.

E finalmente, agradeço à minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida, a minha mãe Lúcia Cleide, minhas irmãs e sobrinha (Kelly, Keyla, Kedma, Rosi e Náyra Luize) que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. Aos meus sogros Rosa e Raimundo, ao Rodrigo, Anne e Beatriz por participarem deste momento e fornecerem sempre palavras de conforto. As minhas gatinhas, Aloy e Kena, pelos momentos de alegria, carinho e amor incondicional que ofereceram diariamente. Ao meu melhor amigo, esposo e parceiro de profissão Rogério Vieira, que foi meu companheiro em todas as horas contribuindo para que esta tese fosse concluída, com sugestões pertinentes.

## RESUMO

A mandioca é uma matéria prima com grande papel no cenário agrícola nacional, a qual é geradora de emprego e renda em todas as regiões do país. O uso deste produto agrícola dar-se de forma integral, devido à grande versatilidade que possui. A raiz é utilizada para alimentação humana, animal e pelas indústrias produtoras de farinha, de féculas e de energia; a parte aérea (folhas e hastes) pode ser utilizada para a alimentação humana (farinha a partir da folha) e ração animal. Nesse contexto, o objetivo da tese foi avaliar potenciais produtos derivados das folhas da mandioqueira com intuito de versificar sua utilização bem como promover a valorização dessa fração na matéria prima.

O primeiro capítulo desta tese apresenta uma revisão da literatura, a qual retrata os assuntos que são levantados nos capítulos seguintes. Os capítulos de II a VI apresentam os dados experimentais obtidos nesta pesquisa. No segundo capítulo, o uso das folhas como produto minimamente processado para transporte foi avaliado, bem como seu armazenamento sob condições controladas de temperatura e atmosfera.

No terceiro capítulo, foi estudado a composição química, propriedades físico-químicas e o fracionamento das proteínas das folhas dessa matéria-prima (*Manihot esculenta*), tendo como base o procedimento de Osborne, onde diferentes solventes são aplicados para fracionar as proteínas através de mudanças na solubilidade que as proteínas desta folha apresentam. A partir disso, foi realizado nos capítulos IV, V e VI a extração dessas proteínas aplicando três vias químicas diferentes para a obtenção de concentrado, condições que permitiram o desenvolvimento do segundo e terceiro manuscrito.

Para a realização do processo de extração, aplicou-se o planejamento fatorial do tipo Box-Behnken, metodologia de superfície de resposta e a função desejabilidade para definir condições ótimas de extração das proteínas da mandioqueira em todas as vias (extração por solvente orgânico, extração em condições ácidas e extração em condições alcalinas).



Os concentrados proteicos liofilizados obtidos nas três vias foram caracterizados. Determinou-se o teor de compostos fenólicos totais, flavanóis totais, clorofila a, clorofila b e carotenóides totais; foram avaliados os parâmetros colorimétricos, e quantificado o de teor de proteína bruta, o rendimento de extração de proteína e o rendimento de concentrado proteico, e a propriedade tecnológica desse concentrado por meio da capacidade de absorção de água e da capacidade de absorção de óleo.

A avaliação dessas respostas permitiu definir a condição ótima de processo para cada via de extração pela função desejabilidade e conseqüentemente fez-se um acompanhamento do processo de extração o qual foi considerado um processo em regime permanente; possuindo quatro etapas: duas de entrada (folha *in natura* e solução extratora) e duas de saída (resíduo fibroso e concentrado proteico liofilizado); cujo controle foi possível pelo registro da massa (g), matéria seca (g/100 g), proteína bruta (g bs) e umidade (%). Os três concentrados proteicos liofilizados oriundos das condições de desejabilidade aplicadas foram avaliados higroscopicamente, por meio de isotermas de sorção de umidade a 25°C.

Os estudos realizados com a mandioca são promissores, pois a partir deles foi possível aprofundar formas de produção e transformação dessa matéria-prima; fatores que podem influenciar direta ou indiretamente e de forma positiva nas dimensões social, ambiental, cultural e econômica da região, e por conseqüência promover valorização de uma matéria prima regional, sejam pela tentativa de popularizar outras formas de uso ou pelo aprofundamento do conhecimento sobre esta.

**Palavras-chave:** produto minimamente processado; proteína; extração; concentrado protéico; balanço de massa.

## ABSTRACT

Cassava is a raw material with remarkable role in the national agricultural scenario, which generates employment and income in all regions of the country. The use of this agricultural product is integral, due to its great versatility. The root is used for food, animal feed and for the flour, starch and energy industries; the aerial part (leaves and stems) can be used for human food (flour from the leaf) and animal feed. In this context, the aim of this thesis was to evaluate the potential products derived from the leaves of mandioqueira root, in order to versify its use as well as to promote the valuation of this fraction in the raw material.

The first chapter of the thesis presents a literature review, which portrays the subjects that are raised in the following chapters. Chapters from II to VI present the experimental data obtained in this research. In the second chapter, it was evaluated the use of leaves as a minimally processed product for transport, as well as its storage under controlled conditions of temperature and atmosphere.

In the third chapter, it was studied the chemical composition, physicochemical properties and proteins fractionation of the leaves from the raw material (*Manihot esculenta*), based on the Osborne procedure, where different solvents were applied to fractionate the proteins through changes in solubility that these protein leaves present. From this, it was performed in chapters IV, V and VI, the extraction of proteins, applying three different chemical pathways to obtain concentrate. These conditions allowed the development of the second and third manuscripts.

For the extraction process, there were used: factorial design (Box-Behnken), response surface methodology, and the desirability function, which were applied to define the optimal conditions for the proteins of mandioqueira, in all routes (extraction by organic solvent, extraction under acid conditions and extraction under alkaline conditions).

The lyophilized protein concentrates obtained in the three pathways were characterized. The total phenolic contents, total flavanols, chlorophyll a,

chlorophyll b, and total carotenoids were determined; the colorimetric parameters were performed. Crude protein content, protein extraction yield and protein concentrate yield were quantified. Technological properties of this concentrate were determined through water absorption capacity and oil absorption capacity.

The evaluation of these responses allowed the definition of the optimum process condition for each route of extraction, by the desirability function. Consequently, a monitoring of the extraction process was made, which was considered a process in permanent regime, presenting four stages: two inlet (fresh leaf and extraction solution) and two outlet (fibrous residue and lyophilized protein concentrate); whose control was possible by recording the mass (g), dry matter (g/100 g), crude protein (g dry basis) and moisture (%). The three lyophilized protein concentrates derived from the conditions of desirability were evaluated hygroscopically, by means of moisture sorption isotherms at 25 °C.

The studies carried out with mandioqueira are promising, because from them, it was possible to deepen forms of production and transformation of this raw material; factors that can influence directly or indirectly and positively in the social dimensions, environmental, cultural and economic of the region, and consequently promote the valorization of a regional raw material, either by trying to popularize other forms of use or by deepening knowledge about it.

**Keyword:** minimally processed product; protein; extraction; protein concentrate; mass balance.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.1.** Fórmulas estruturais dos glicosídeos cianogênicos, linamarina e lotaustralina (GLEADOW; MØLLER, 2014)..... 35
- Figura 1.2.** Classificação dos aminoácidos essenciais de acordo com o grupo R das cadeias laterais. .... 43
- Figura 1.3.** Classes de compostos fenólicos presentes nos alimentos..... 48

### CAPÍTULO II

- Figura 2.1.** Fluxograma das etapas do processamento mínimo das folhas de mandioca..... 64
- Figura 2.2.** Gráfico de Pareto para contagem de bolores e leveduras (UFC/g).  
..... 69
- Figura 2.3.** Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a contagem de bolores e leveduras. .... 70
- Figura 2.4.** Gráfico da função desejabilidade para contagem de bolores e leveduras..... 71
- Figura 2.5.** Perda de massa (%) das folhas de mandioca minimamente processadas, armazenadas a 7°C; nas diferentes condições de embalagem. (■) Polietileno sem vácuo, (▲) Polietileno com vácuo e (●) Poliamida com vácuo.  
..... 73
- Figura 2.6.** Valores de pH (a), acidez total titulável (ATT) (b) e sólidos solúveis (SS) (c), para as folhas de mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento a 7°C. (■) Polietileno sem vácuo, (▲) Polietileno com vácuo e (●) Poliamida com vácuo..... 75

**Figura 2.7.** Parâmetros de cor instrumental e perfil da clorofila a (barras) e da clorofila b (marcadores), para as folhas de mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento a 7°C. (a) PE-SV, (b) PE-CV e (c) PA-CV. .... 78

**Figura 2.8.** Teor de compostos fenólicos nas folhas de mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento a 7°C. Valores com letras iguais, na mesma faixa, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. .... 80

### **CAPÍTULO III**

**Figura 3.1.** Estimativa do teor de proteínas nas folhas de mandioqueira *in natura* segundo à classificação empírica de Osborne. S1 – albuminas, S2 – globulinas, S3 – glutelina e S4 – prolaminas..... 99

**Figura 3.2.** Gráfico de calibração linearizado de Bradford..... 101

**Figura 3.3.** Teor de proteínas nas frações proteicas extraídas das folhas de mandioqueira *in natura*, em função do pH. Albumina (S1), globulina (S2), glutelina (S3) e prolamina (S4)..... 102

### **CAPÍTULO IV**

**Figura 4.1.** Etapas da extração e precipitação de proteínas da mandioqueira utilizando solução hidroalcoólica. .... 113

**Figura 4.2.** Balanço de massa de acordo a desejabilidade global..... 118

**Figura 4.3.** Teores de proteína bruta (% bs) para os pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioqueira com etanol, em cada corrida do planejamento..... 122

<b>Figura 4.4.</b> Teores de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b) e carotenoides totais (CT), expressos em $\mu\text{g/g}$ do liofilizado, e parâmetros de cor instrumental e imagens para os pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca com etanol, em cada corrida do planejamento. (a) corrida 1, (b) corrida 2, (c) corrida 3, (d) corrida 4, (e) corrida 5, (f) corrida 6, (g) corrida 7, (h) corrida 8, (i) corrida 9, (j) corrida 10, (k) corrida 11, (l) corrida 12, (m) corrida 13, (n) corrida 14 e (o) corrida 15.....	124
<b>Figura 4.5.</b> Gráfico de Pareto para a resposta rendimento do concentrado proteico - RCP (a) e capacidade de absorção de água – CAA (b).....	133
<b>Figura 4.6.</b> Curva de contorno e superfície de resposta para RCP (a) e CAA (b) a 135 min.....	135
<b>Figura 4.7.</b> Gráfico da função desejabilidade para carotenoides totais (CT), compostos fenólicos totais (CF), proteína bruta (PB), rendimento de extração de proteínas (REP) e rendimento de concentrado proteico (RCP).....	136
<b>Figura 4.8.</b> Balanço de massa para o processo de extração de proteínas da mandioca, utilizando o etanol como solvente.....	137
<b>Figura 4.9.</b> Isotermas de adsorção (■) e dessorção (□) de umidade a 25°C, para o concentrado proteico da mandioca. As linhas representam as isotermas previstas pelo modelo de Peleg, para adsorção (_____) e dessorção ( _ _ _ ).....	140

## **CAPÍTULO V**

<b>Figura 5.1.</b> Etapas do processo de extração de proteínas da mandioca, por via ácida.....	153
--	-----

<b>Figura 5.2.</b> Balanço de massa para a extração otimizada de proteína da folha da mandioca por via ácida. ....	157
<b>Figura 5.3.</b> Teores de proteína bruta (% bs) para os pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca por via ácida, em cada corrida do planejamento.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figura 5.4.</b> Teores de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b) e carotenoides totais (CT), expressos em µg/g do liofilizado, e parâmetros de cor instrumental e imagens para os pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca por via ácida, em cada corrida do planejamento. (a) corrida 1, (b) corrida 2, (c) corrida 3, (d) corrida 4, (e) corrida 5, (f) corrida 6, (g) corrida 7, (h) corrida 8, (i) corrida 9, (j) corrida 10, (k) corrida 11, (l) corrida 12, (m) corrida 13, (n) corrida 14 e (o) corrida 15.....	163
<b>Figura 5.5.</b> Gráfico de Pareto para a resposta clorofila a – Cl a (a), clorofila b – Cl b (b), carotenoides totais – CT (c) e variação de cor – ΔE (d). ....	173
<b>Figura 5.6.</b> Gráfico de Pareto para a resposta compostos fenólicos totais – CFT (a), flavanóis totais - FT (b) e proteína bruta - PB (c) .....	174
<b>Figura 5.7.</b> Curva de contorno e superfície de resposta para Cl a (a), Cl b (b), CT (c) e ΔE (d) a 135 min.....	178
<b>Figura 5.8.</b> Curva de contorno e superfície de resposta para CFT (a), FT (b) e PB (c) a 135 min.....	179
<b>Figura 5.9.</b> Gráfico da função desejabilidade para carotenoides totais (CT), compostos fenólicos totais (CF), proteína bruta (PB), rendimento de extração de proteínas (REP) e Rendimento de concentrado protéico (RCP). ....	181
<b>Figura 5.10.</b> Balanço de massa do processo de extração de proteínas utilizando tampão em pH's ácidos. ....	182

**Figura 5.11.** Isotermas de adsorção (■) e dessorção (□) de umidade a 25°C, para o concentrado proteico da mandioca, obtido por via ácida. As linhas representam as isotermas previstas pelo modelo de Peleg, para adsorção (\_\_\_\_\_) e dessorção ( \_ \_ \_ \_ )..... 185

## CAPÍTULO VI

**Figura 6.1.** Processo de extração de proteínas da mandioca utilizando tampão fosfato monobásico-fosfato dibásico e tampão carbonato de sódio-bicarbonato de sódio..... 199

**Figura 6.2.** Balanço de massa da extração otimizada. .... 203

**Figura 6.3.** Valores de proteína bruta (%) em base seca dos concentrados proteicos liofilizados para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino. .... 207

**Figura 6.4.** Imagens dos concentrados proteicos liofilizados para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino e seus respectivos parâmetros colorimétricos, valores quantitativos de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais para cada corrida. (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5, (f) 6, (g) 7, (h) 8, (i) 9, (j) 10, (k) 11, (l) 12, (m) 13, (n) 14 e (o) 15..... 208

**Figura 6.5.** Gráfico de Pareto para a resposta clorofila b – Cl b (a), variação de cor –  $\Delta E$  (b), proteína bruta – PB (c) e capacidade de absorção de água – CAA (d)..... 213

**Figura 6.6.** Gráfico da curva de contorno e gráfico da superfície de resposta em função do pH e da temperatura (T) para Cl b - (a),  $\Delta E$  - (b), PB - (c) a 135 min e CAA (d) a 240 min. .... 219



<b>Figura 6.7.</b> Gráfico da função desejabilidade para carotenoides totais (CT), compostos fenólicos totais (CFT), proteína bruta (PB), rendimento de extração de proteínas (REP) e Rendimento de concentrado protéico (RCP) para a extração de proteínas da mandioca.. .....	221
<b>Figura 6.8.</b> Balanço de massa do processo de extração de proteínas para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino... .....	222
<b>Figura 6.9.</b> Isotermas de adsorção (■) e dessorção (□) de umidade a 25°C, para concentrado proteico da mandioca, obtido por via alcalina. As linhas representam as isotermas previstas pelo modelo de GAB, para adsorção (_____) e dessorção (_ _ _ _).. .....	225

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1.1.** Composição e propriedades físico-químicas das diferentes partes da mandioca..... 37
- Tabela 1.2.** Perfil de aminoácidos em folhas de mandioca. .... 40

### CAPÍTULO II

- Tabela 2.1.** Matriz do planejamento fatorial Box-Behnken e os resultados para coliformes a 45°C e bolores e leveduras, para o processo de sanitização das folhas de mandioca. .... 62
- Tabela 2.2.** Matriz do planejamento fatorial Box-Behnken e os resultados para coliformes a 45°C e bolores e leveduras, para o processo de sanitização das folhas de mandioca  
..... 68
- Tabela 2.3.** Efeito estimado, erro puro, teste t e grau de significância estatística (p), para os fatores do modelo ajustado à contagem de bolores e leveduras. 698
- Tabela 2.4.** Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo ajustado à resposta contagem de bolores e leveduras. .... 69
- Tabela 2.5.** Contagem de bolores e leveduras, coliformes a 45°C e bactérias psicrotróficas, nas folhas de mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento a 7°C.. .... 81

### CAPÍTULO IV

- Tabela 4.1.** Níveis codificados e originais das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial do tipo Box-Behnken, utilizado na extração de proteínas da mandioqueira com etanol. .... 112

<b>Tabela 4.2.</b> Modelos utilizados na predição da isoterma de sorção.....	119
<b>Tabela 4.3.</b> Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g liofilizado) e flavanóis totais (mg eq. catequina/g liofilizado) nos pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca com etanol, em cada corrida do planejamento.....	121
<b>Tabela 4.4.</b> Rendimentos de concentrado proteico (RCP) e de extração de proteína (REP), para a extração de proteínas da mandioca com etanol, em cada corrida do planejamento. ....	126
<b>Tabela 4.5.</b> Capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO) para os pós liofilizado obtido da extração de proteínas da mandioca com etanol, em cada corrida do planejamento. ....	129
<b>Tabela 4.6.</b> Matriz do planejamento fatorial Box-Behnken e os resultados para as respostas do Planejamento para a extração de proteínas da mandioca, utilizando o etanol como solvente. ....	131
<b>Tabela 4.7.</b> Efeito estimado, erro puro e grau de significância estatística (p) para os fatores do modelo rendimento do concentrado proteico (RCP) e capacidade de absorção de água (CAA).....	132
<b>Tabela 4.8.</b> Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo ajustado às respostas RCP e CAA.....	134
<b>Tabela 4.9.</b> Análises do concentrado proteico liofilizados obtido na condição definida como ótima, para o processo de extração de proteínas da mandioca.....	138
<b>Tabela 4.10.</b> Dados de sorção de umidade a 25°C para o concentrado proteico liofilizado da mandioca.....	139

<b>Tabela 4.11.</b> Parâmetros dos ajustes dos modelos matemáticos aos dados de sorção de umidade do concentrado proteico da mandioca.....	141
--	-----

## **CAPÍTULO V**

<b>Tabela 5.1.</b> Níveis codificados e originais das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial do tipo Box-Behnken para extração de proteínas da mandioca, por via ácida. ....	152
---	-----

<b>Tabela 5.2.</b> Modelos utilizados na predição da isoterma de sorção.....	158
--	-----

<b>Tabela 5.3.</b> Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g liofilizado) e flavanóis totais (mg eq. catequina/g liofilizado) nos pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca por via ácida, em cada corrida do planejamento.....	159
---	-----

<b>Tabela 5.4.</b> Rendimentos de concentrado proteico (RCP) e de extração de proteína (REP), para a extração de proteínas da mandioca por via ácida, em cada corrida do planejamento. ....	166
---	-----

<b>Tabela 5.5.</b> Capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO) para os pós liofilizado obtido da extração de proteínas da mandioca por via ácida, em cada corrida do planejamento. ....	167
---	-----

<b>Tabela 5.6.</b> Matriz do planejamento fatorial Box-Behnken e os resultados para as respostas do Planejamento utilizando solução hidroalcoólica para extração de proteínas da mandioca.....	170
--	-----

<b>Tabela 5.7.</b> Efeito estimado, erro puro e grau de significância estatística (p) para os fatores do modelo clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), carotenoides totais (CT) e variação de cor ( $\Delta E$ ).....	171
--	-----

**Tabela 5.8.** Efeito estimado, erro puro e grau de significância estatística (p) para os fatores do modelo compostos fenólicos totais (CFT), flavanóis totais (FT) e proteína bruta (PB)..... 172

**Tabela 5.9.** Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo ajustado as respostas. .... 175

**Tabela 5.10.** Análises dos pós liofilizados do processo de extração de proteínas de acordo com as condições definidas pela desejabilidade .....**Erro!**

### **Indicador não definido.3**

**Tabela 5.11.** Dados de sorção de umidade para o concentrado proteico liofilizado extraído por solução hidroalcoólica a 25°C. .... 1834

**Tabela 5.12.** Parâmetros dos ajustes dos modelos matemáticos aos dados de sorção de umidade do liofilizado a 25°C, obtido na condição ótima do processo de extração de proteínas, utilizando tampão em pH ácido..... 1847

## **CAPÍTULO VI**

**Tabela 6.1.** Níveis codificados e originais das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial do tipo Box-Behnken, para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino..... 198

**Tabela 6.2.** Modelos utilizados na predição da isoterma de sorção..... 204

**Tabela 6.3.** Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g liofilizado) e flavanóis totais (mg eq. catequina/g liofilizado) para cada corrida do planejamento..... 205

**Tabela 6.4.** Valores do rendimento de extração de proteínas (REP) e rendimento de concentrados proteico (RCP) para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino..... 210

<b>Tabela 6.5.</b> Capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO) dos concentrados proteicos liofilizados para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino.....	212
<b>Tabela 6.6.</b> Matriz do planejamento fatorial Box-Behnken e os resultados para as respostas do Planejamento. ....	214
<b>Tabela 6.7.</b> Efeito estimado, erro puro e grau de significância estatística (p) para os fatores do modelo clorofila b (Cl b), variação de cor ( $\Delta E$ ), proteína bruta (PB) e capacidade de absorção de água (CAA).....	215
<b>Tabela 6.8.</b> Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo ajustado às respostas. ....	217
<b>Tabela 6.9.</b> Análises dos concentrados proteicos liofilizados otimizados para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino. ....	223
<b>Tabela 6.10.</b> Dados de sorção de umidade para o concentrado proteico liofilizado extraído de proteínas da mandioca, em meio alcalino a 25°C. ....	224
<b>Tabela 6.11.</b> Parâmetros dos ajustes dos modelos matemáticos aos dados de sorção de umidade para o concentrado proteico liofilizado extraído de proteínas da mandioca, em meio alcalino a 25°C.....	226

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>27</b>
OBJETIVOS .....	31
OBJETIVO GERAL.....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>32</b>
REVISÃO DE LITERATURA .....	32
1. PRODUTOS VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS E CONSERVAÇÃO .....	33
2. MANDIOCA .....	34
3. FOLHAS DE MANDIOCA .....	38
4. PROTEÍNAS E FUNDAMENTOS DA PRECIPITAÇÃO .....	41
5. CONCENTRADO PROTÉICO E PROCESSOS DE EXTRAÇÃO .....	46
6. COMPOSTOS FENÓLICOS .....	48
7. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE .....	49
REFERÊNCIAS .....	51
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>58</b>
ESTABILIDADE DAS FOLHAS DA MANDIOQUEIRA ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz) SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS DE TEMPERATURA E ATMOSFERA .....	58
RESUMO .....	59
1. INTRODUÇÃO .....	60
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1. MATÉRIA PRIMA .....	61
2.2. DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SANITIZAÇÃO DAS FOLHAS .....	61
2.3. PROCESSAMENTO MÍNIMO DAS FOLHAS .....	63
2.4. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	64
Análises microbiológicas .....	64
Análises físicas e químicas.....	65
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1. OTIMIZAÇÃO da sanitização .....	67

3.2. Armazenamento das folhas minimamente processadas.....	72
<i>Perda de massa e atividade de água</i> .....	72
<i>pH, Acidez total e Sólidos solúveis</i> .....	74
<i>Cor instrumental, clorofila a e clorofila b</i> .....	77
<i>Compostos fenólicos totais</i> .....	79
<i>Análises microbiológicas</i> .....	81
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>85</b>

### **CAPÍTULO III.....90**

<b>ESTUDO DO FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DAS FOLHAS DA MANDIOQUEIRA COM DIFERENTES SOLVENTES</b> .....	<b>90</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>91</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>92</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>93</b>
2.1. COLETA DAS FOLHAS DE MANDIOCA .....	93
2.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS .....	94
2.3. QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVANÓIS TOTAIS NAS FOLHAS .....	94
2.4. FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS .....	95
2.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS POR BRADFORD.....	96
2.6. PONTO ISOELÉTRICO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS .....	96
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>97</b>
3.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA mandioqueira .....	97
3.2. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVANÓIS TOTAIS NAS FOLHAS DE MANDIOCA .....	98
3.3. FRAÇÕES DE PROTEÍNAS NAS FOLHAS DA MANDIOQUEIRA .....	99
<b>Curva padrão de quantificação de proteínas pelo método de Bradford</b> .....	<b>100</b>
3.4. PONTOS ISOELÉTRICO E SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS FRACIONADAS.....	101
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>105</b>

### **CAPÍTULO IV.....108**

<b>EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS FOLHAS DE MANDIOQUEIRA POR SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA</b> .....	<b>108</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>109</b>



<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>110</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>111</b>
2.1.MATÉRIA PRIMA.....	111
2.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA .....	111
2.2.1. Determinação de compostos fenólicos totais e flavanóis totais .....	113
2.2.2. Determinação de proteína bruta .....	114
2.2.3. Determinação da clorofila a, clorofila b e carotenóides totais .....	114
2.2.4. Análise colorimétrica.....	115
2.2.5. Rendimento de extração de proteína .....	115
2.2.6. Rendimento de concentrado proteico .....	115
2.2.7. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo .....	116
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	116
2.4. BALANÇO DE MASSA EM CONDIÇÕES ESTABELCIDAS POR DESEJABILIDADE GLOBAL COM USO DE SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA .....	118
2.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE.....	119
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>120</b>
3.1. RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA COM ETANOL.....	120
3.1.1. Compostos fenólicos totais e flavanóis totais .....	120
3.1.2. Proteína bruta.....	122
3.1.3. Clorofila a, clorofila b, carotenóides totais e colorimetria .....	123
3.1.4. Rendimento de extração de proteína e rendimento de concentrado proteico .....	126
3.1.5. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo .....	127
3.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	130
3.3. BALANÇO DE MASSA DA EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE PROTEÍNAS COM ETANOL .....	136
3.4. CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO .....	137
3.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE DO CONCENTRADO PROTEICO .....	138
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>143</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>144</b>
 <b>CAPÍTULO V.....</b>	 <b>148</b>
<b>EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS FOLHAS DA MANDIOQUEIRA POR VIA ÁCIDA.....</b>	<b>148</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>149</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>150</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>151</b>

2.1. MATÉRIA PRIMA .....	151
2.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA .....	151
<b>2.2.1. Determinação de compostos fenólicos totais e flavanóis totais .....</b>	<b>153</b>
<b>2.2.2. Determinação de proteína bruta .....</b>	<b>154</b>
<b>2.2.3. Determinação da clorofila a, clorofila b e carotenóides totais .....</b>	<b>154</b>
<b>2.2.4. Análise colorimétrica.....</b>	<b>155</b>
<b>2.2.5. Rendimento de extração de proteína .....</b>	<b>155</b>
<b>2.2.6. Rendimento de concentrado proteico .....</b>	<b>155</b>
<b>2.2.7. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo .....</b>	<b>156</b>
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	156
2.4. BALANÇO DE MASSA PARA A EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE PROTEÍNAS POR VIA ÁCIDA ....	157
2.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE.....	157
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>159</b>
3.1. RESULTADOS PARA A EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA mandioqueira POR Via ácida .....	159
<b>3.1.1. Compostos fenólicos totais e flavanóis totais .....</b>	<b>159</b>
<b>3.1.2. Proteína bruta.....</b>	<b>160</b>
<b>3.1.3. Clorofila a, clorofila b, carotenóides totais e cor instrumental .....</b>	<b>161</b>
<b>3.1.4. Rendimento de extração de proteína e rendimento de concentrado proteico .....</b>	<b>165</b>
<b>3.1.5. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo .....</b>	<b>167</b>
3.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	169
3.3. BALANÇO DE MASSA EM CONDIÇÕES ESTABELCIDAS POR DESEJABILIDADE GLOBAL POR VIA ÁCIDA .....	181
3.4. CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO .....	182
3.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE.....	183
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>189</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>190</b>

## **CAPÍTULO VI..... 194**

<b>EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS FOLHAS DA MANDIOQUEIRA EM MEIO ALCALINO.....</b>	<b>194</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>195</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>196</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>197</b>
2.1. MATÉRIA PRIMA .....	197
2.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA .....	197

2.2.1. Determinação de compostos fenólicos totais e flavanóis totais .....	199
2.2.2. Determinação de proteína bruta .....	200
2.2.3. Determinação da clorofila a, clorofila b e carotenóides totais .....	200
2.2.4. Análise colorimétrica.....	201
2.2.5. Rendimento de extração de proteína .....	201
2.2.6. Rendimento de concentrado proteico .....	201
2.2.7. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo .....	202
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	202
2.4. BALANÇO DE MASSA DA EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE PROTEÍNAS EM FAIXA DE pH BÁSICO .....	203
2.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE.....	203
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>205</b>
3.1. RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA EM MEIO ALCALINO... 205	
3.1.1. Compostos fenólicos totais e flavanóis totais .....	205
3.1.2. Proteína bruta.....	206
3.1.3. Clorofila a, clorofila b, carotenóides totais e colorimetria .....	207
3.1.4. Rendimento de extração de proteína e rendimento de concentrado proteico .....	210
3.1.5. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo .....	211
3.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	212
3.3. BALANÇO DE MASSA DA EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE PROTEÍNAS EM MEIO ALCALINO ....	221
3.4. CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO .....	222
3.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE.....	223
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>228</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>229</b>
 <b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	 <b>234</b>
 <b>APÊNDICES.....</b>	 <b>237</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>256</b>
<i>Anexo1. Manuscrito “Minimally processed cassava leaves: effect of packaging on the microbiological and physical-chemical standards” .....</i>	<i>256</i>

## INTRODUÇÃO GERAL

---

A mandioca (*Manihot Esculenta* Crantz) é uma importante cultura no cenário agrícola brasileiro, por ser um alimento de subsistência alimentar e nutricional para grande parte da população. Somente a região Norte é responsável por aproximadamente 35,2% da produção de mandioca, sendo 21% somente no estado do Pará; ela é geralmente produzida por pequenos produtores, para economias locais, em que predomina o caráter de subsistência ou abastecimento regional (VALLE; LORENZI, 2014; GROXKO; PEREIRA, 2021).

A produção anual de mandioca no Brasil, em 2021, atingiu aproximadamente 18.098.115 t/ano (IBGE, 2021). Anteriormente, no ano de 2018, foram exportadas 2,7 toneladas de raiz de mandioca, correspondendo a um total de US\$ 2.388,00 (IBGE, 2018).

A produção da mandioca é totalmente aproveitada, devido à grande versatilidade. A raiz é utilizada para alimentação humana, animal e pelas indústrias produtoras de farinha, de féculas e de energia; a parte aérea (folhas e hastes) pode ser utilizada para a alimentação humana (farinha de folha de mandioca) e animal (ração) (TROMBINI; LEONEL, 2014; BOHNENBERGER *et al.* 2010). As hastes são de uso mais restrito, na alimentação animal, sob a forma de silagens e fenos (CONAB, 2014). Dentre os inúmeros segmentos que a mandioca possui para uso, as folhas da mandioqueira possuem grande importância nutricional, pois apresentam uma importante composição em aminoácidos essenciais, exceto metionina e cisteína, o que as torna uma alternativa potencial para uso como suplemento alimentar (YEOH; CHEW, 1976; GUERROUÉ *et al.*, 1996; MAPA, 2002; ORTEGA-FLORES *et al.*, 2003).

Embora as folhas da mandioqueira sejam potencialmente nutritivas, o consumo delas possui algumas restrições, devido à presença de substâncias tóxicas, como os glicosídeos cianogênicos (BRADBURY; DENTON, 2014) e devido ao elevado teor de fibras, que não podem ser digeridas por animais monogástricos (GUERROUÉ *et al.*, 1996). Desta forma, uma alternativa viável para o aproveitamento das folhas da mandioqueira é a obtenção de um concentrado protéico, isento dos compostos cianogênicos (MODESTI, 2007).

Segundo a RDC Nº 268, de 22 de setembro de 2005 define-se como produtos protéicos de origem vegetal os alimentos obtidos a partir de partes protéicas de espécie(s) vegetal(is), podendo ser apresentados em grânulo, pó, líquido, ou outras formas, com exceção daquelas não convencionais para alimentos. Podem ser adicionados de outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto. Para produtos como a proteína concentrada de soja, o produto deve conter na composição o mínimo de 68% de proteína, em base seca (BRASIL, 2005).

Os concentrados protéicos elaborados a partir de fontes vegetais, incluindo as folhas da mandioca, podem ser obtidos por precipitação das proteínas por via térmica ou ácida, básica, alcóolica e enzimática. Alguns trabalhos observaram que há uma composição de aminoácidos essenciais nas folhas da mandioca, como a isoleucina, a leucina, a valina e a treonina, que ratificam a importância nutricional desse coproduto da cadeia produtiva da mandioca (YEOH; CHEW, 1976; GUERROUÉ *et al.*, 1996; MAPA, 2002; ORTEGA-FLORES *et al.*, 2003).

Devido ao grande potencial tecnológico das folhas de mandioca e ao elevado volume de produção, o aproveitamento dessa matéria-prima se torna uma alternativa viável. O perfil de aminoácidos das folhas da mandioca justifica a utilização dela para a obtenção de um produto com alto valor agregado, como o concentrado protéico; como níveis reduzidos de substâncias antinutritivas e tóxicas encontradas nas folhas da mandioca.

Nesse contexto, este trabalho visou estudar formas de aumentar a valorização das folhas da mandioca, seja pelo estudo de armazenamento, ou pela obtenção e caracterização de concentrados proteicos por diferentes vias. Este trabalho está organizado em capítulos, conforme descrito a seguir:

### **Capítulo I. Revisão de literatura.**

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre a mandioca e suas folhas, a conservação de produtos vegetais, vegetais minimamente processados e etapas de processamento, proteínas e fundamentos da precipitação, concentrado protéico, compostos bioativos e isothermas de sorção de umidade.

## **Capítulo II. Folhas de mandioca minimamente processadas: Efeito da embalagem sobre o padrão microbiológico e físico-químico.**

Esse manuscrito foi publicado na revista Scientia Plena (<https://doi.org/10.14808/sci.plena.2021.051501>). O trabalho consta de um estudo sobre o uso das folhas de mandioca como produto minimamente processado para transporte e a avaliação do armazenamento sob refrigeração, com base em padrões microbiológicos e físico-químicos (Anexo 1).

## **Capítulo III. Estudo do fracionamento das proteínas para as folhas da mandioqueira em função da solubilidade com a aplicação de diferentes solventes.**

Neste capítulo, foi estudado a composição química, propriedades físico-químicas e o fracionamento das proteínas das folhas da mandioqueira (*Manihot esculenta*), utilizando o procedimento de Osborne.

## **Capítulo IV. Extração de proteínas da mandioqueira por solução hidroalcoólica.**

Nessa pesquisa foi utilizado o planejamento fatorial do tipo Box-Behnken, metodologia de superfície de resposta e a função desejabilidade para definir uma condição ótima para a extração das proteínas da mandioqueira, utilizando solução hidroalcoólica de etanol como solução extratora. O concentrado protéico liofilizado produzido foi caracterizado, realizou-se um balanço de massa do processo de extração citado e avaliou-se o comportamento higroscópico do produto obtido.

## **Capítulo V. Extração de proteínas da mandioqueira por via ácida.**

Nesse capítulo aplicou-se o planejamento fatorial do tipo Box-Behnken com o objetivo de avaliar o processo de extração de proteínas da mandioqueira por via ácida, e avaliar as características do concentrado proteico obtido, o balanço de massa do processo de extração e o comportamento higroscópico do produto obtido. A metodologia de superfície de resposta e a função desejabilidade foram utilizadas para definir uma condição ótima para o processo de extração.

## **Capítulo VI. Extração de proteínas da mandioca em meio alcalino.**

Nesta pesquisa foi utilizado o planejamento fatorial do tipo Box-Behnken, metodologia de superfície de resposta e a função desejabilidade para definição uma condição ótima para a extração das proteínas da mandioca utilizando solução extratora alcalina. O concentrado protéico liofilizado produzido foi caracterizado, um balanço de massa do processo de extração foi definido e, adicionalmente, o comportamento higroscópico do produto avaliado.

Ressalta-se que o conhecimento obtido por meio da proposta deste trabalho oferta formas de produção, transformação e comercialização de das folhas da mandioca, expondo configurações distintas para o enaltecimento de possíveis atividades integradoras entre o conhecimento e desenvolvimento científico a uma inclusão produtiva e social, mediante a valorização de uma matéria prima regional.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Promover a valorização das folhas da mandioca por meio da avaliação das características físicas e físico-químicas durante a estocagem, bem como utilizar essas folhas para elaborar concentrados proteicos e fornecer informações sobre as propriedades e condições de armazenamento para o produto.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o uso das folhas da mandioca como produto minimamente processado para transporte e a vida útil do produto, de maneira a fornecer uma nova alternativa de consumo e a valorização dessa matéria prima;
- Determinar a composição, as propriedades físico-químicas e o fracionamento das proteínas das folhas da mandioca (*Manihot esculenta*), utilizando o procedimento de Osborne pela primeira vez;
- Estabelecer condições para a obtenção de um concentrado protéico a partir das folhas da mandioca, por diferentes vias;
- Avaliar o comportamento higroscópico dos concentrados proteicos das folhas de mandioca por meio das isotermas de sorção de umidade.



## CAPÍTULO I

---

### REVISÃO DE LITERATURA

## 1. PRODUTOS VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS E CONSERVAÇÃO

O consumo diário de hortaliças fornece benefícios ao organismo e colabora para o desenvolvimento e a regulação orgânica do corpo, devido ao elevado teor de vitaminas e minerais (SANTOS *et al.*, 2012). Hortaliças folhosas possuem grande facilidade de perder água, o que pode ser favorecido pela temperatura e/ou umidade relativa utilizadas durante o armazenamento ou comercialização dos vegetais (ÁLVARES *et al.*, 2007). Uma avaliação dos diferentes métodos de processamento e preservação pode manifestar uma condição favorável no quesito qualidade nutricional dos vegetais (KAYS, 1999; EJOH *et al.*, 2007).

Os consumidores nas últimas décadas aumentaram a procura por uma dieta saudável e prática, sendo os vegetais minimamente processados uma alternativa de produto (RICO *et al.*, 2007). Alzamora *et al.* (2016) define como finalidade do processamento mínimo de alimentos, “manter e entregar produtos frescos convenientemente sem perder sua qualidade nutricional e garantir que o produto tenha um prazo de validade suficiente para permitir a distribuição aos consumidores pretendidos”.

Para a elaboração dos produtos minimamente processados são utilizados vários métodos combinados formando uma cadeia produtiva, dentre eles: lavagem, corte, trituração, embalagem e armazenamento (ARTÉS; ALLENDE, 2005). Na etapa de corte, a respiração do tecido vegetal é acelerada, causando lesões mecânicas e liberando substâncias presentes no interior das células que degradam o tecido vegetal e favorecem o desenvolvimento de microrganismos. Sendo assim, o controle dessa etapa é primordial para obtenção de um produto com características semelhantes ao original (SCHUH *et al.* 2020).

De acordo com Sethi *et al.* (2020), a lavagem com água remove os constituintes celulares que lixiviaram para o produto durante a etapa de corte, o que promove a redução da atividade microbiológica. A aplicação de sanitizante pode conferir maior redução dessa contaminação e, conseqüentemente, aumento da vida útil do produto. Esses sanitizantes são geralmente aplicados

na água de lavagem com intuito de formar um obstáculo ao desenvolvimento de microorganismos.

Sethi *et al.* (2020) ressaltam a importância da higienização e sanitização de frutas e vegetais minimamente processados, sendo um importante aliado no fornecimento global seguro desses produtos, ou seja, um produto livre de contaminantes microbiológicos e com atributos sensoriais desejados. Uma técnica amplamente conciliada ao processo de sanitização para a conservação e/ou preservação de produtos vegetais é o uso de baixas temperaturas, as quais podem promover a maximização da vida útil do produto, por retardar processos metabólicos responsáveis pelo avanço da senescência. Brosnan e Sun (2001) afirmam que algumas hortaliças e plantas medicinais possuem uma pequena vida útil, por este motivo necessitam ser refrigeradas com rapidez.

A etapa de sanitização é fundamental para a qualidade, segurança e vida útil dos produtos vegetais minimamente processados (Gil *et al.*, 2009). O uso de produtos de cloro é amplamente recomendado para atrasar ou eliminar o crescimento microbiológico, sendo o hipoclorito de sódio (NaClO) o desinfetante mais utilizado (LEE e BAEK, 2008). A temperatura de armazenamento é outro fator interferente pois promove o retardamento de características nutricionais, na minimização da contaminação microbiológica entre outros (RINALDI *et al.*, 2005).

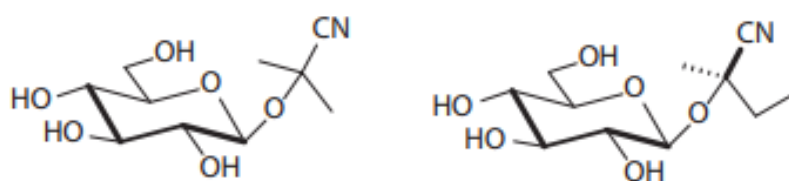
A deterioração de frutas e vegetais minimamente processados pode ser inibida pelo uso de técnicas como a aplicação de antioxidantes, cloro e o uso de embalagem com atmosfera modificada (MAP) são estudadas, com a finalidade de fornecer resultados mais claros sobre as alterações de produtos vegetais durante a pós-colheita, bem como sobre as mudanças que ocorrem nas propriedades nutricionais e nos compostos de promoção da saúde dos alimentos (GALANI *et al.*, 2017); principalmente pelo uso da refrigeração ou do congelamento.

## **2. MANDIOCA**

A mandioca possui fundamental importância para a agricultura brasileira, por ser um alimento relevante para a população, desde o consumo de seus produtos, até à tolerância aos ambientes estressantes de cultivo, quando comparadas com outras culturas alimentares, que não se desenvolvem em tais

condições. Sob condições ambientais consideradas ótimas, é favorável o uso dessa cultivar em áreas de plantação voltadas para a produção de energia, graças ao elevado rendimento. A produtividade da mandioca é atribuída a fácil assimilação do carbono, mesmo em condições extremas de umidade, temperatura e radiação solar (EL-SHARKAWY, 2003; VALLE; LORENZI, 2014).

A mandioca pertence ao grupo de plantas cianogênicas, por apresentar na composição os glicosídeos cianogênicos lotaustralina e linamarina (Figura 1.1), onde a linamarina corresponde 80% aproximadamente dos glicosídeos cianogênicos (CEREDA, MATTOS; 1996; CONAB, 2014).



**Figura 1.1.** Fórmulas estruturais dos glicosídeos cianogênicos, linamarina e lotaustralina (GLEADOW; MØLLER, 2014).

Uma das formas de classificar a mandioca leva em consideração a dosagem de compostos cianogênicos, que estão presentes em todas as partes da planta. Em função da quantidade desses compostos nas raízes, a mandioca pode ser classificada em dois grupos: mandioca brava, quando as raízes apresentam teor de ácido cianídrico superior a 100 mg/kg expresso em HCN e mandioca mansa, quando potencial cianogênico das raízes é inferior a este valor (MCKEY *et al.*, 2010). Apesar do potencial toxicológico, a cultura da mandioca apresenta grande versatilidade de uso, tanto na alimentação humana como na alimentação animal, seja da parte aérea da planta, das hastes e das raízes, como destacado no Quadro 1 (CONAB, 2014).

**Quadro 1.** Formas de utilização para a mandioca.

Parte aérea	Folhas	Alimentação animal (ração) e humana (suplemento)		
	Hastes	Alimentação animal (silagens, fenos e <i>in natura</i> )		
Raízes	Alimentação humana	Cozida, frita, bolos, biscoitos, pães, tortas, roscas, cremes, pudins		
	Alimentação animal	Crua, cozida, desidratada (farinhas, raspas e pellets)		
	Indústria	Fécula (amido)	Uso alimentício (amido nativo e amido modificado)	Glucose, maltose, gelatinas e féculas
			Uso industrial (amido nativo e amido modificado)	Adesivos, têxtil, papel e celulose, farmacêutica, explosivos, calçados, tintas, embutidos, calçados
		Amido fermentado	Uso alimentício	Confeitarias, padarias, indústria de biscoitos, pães
		Farinhas	Consumo humano	Farinhas de mesa
			Consumo animal	Rações balanceadas
		Raspas	Farinhas de raspas	Alimentação animal
				Alimentação humana
		Consumo animal	Rações balanceadas	
Álcool	Combustíveis, desinfetante, bebidas, perfumarias/farmacêutica			

Fonte: CONAB (2014)

Para avaliar a utilização de uma matéria-prima é primordial ter um conhecimento básico da composição centesimal, das diferentes partes da cultura. Neste contexto, na Tabela 1, é possível verificar a diferença na composição centesimal das diferentes partes da mandioca, com destaque para o alto teor protéico nas folhas.

**Tabela 1.1.** Composição e propriedades físico-químicas das diferentes partes da mandioca.

Propriedades	Raiz <i>in natura</i> *	Folha da mandioca**	Farinha das folhas da mandioca***
Umidade (g/100 g)	–	68 – 72	6,60
Proteínas (g/100 g bs)	4,92	19 – 29	23
Carboidratos totais (g/100 g bs)	82,38	–	22,27
Lipídeos (g/100 g bs)	0,88	1 – 10	7,22
Matéria seca (g/100 g)	10,07	–	–
Cinzas (g/100 g)	–	4 – 7	–
Acidez (mEq NaOH/100 g)	–	2 – 5	9,2

\*Chiwona-Karlun (2015); \*\*Modesto Junior, Chisté e Pena (2019); \*\*\*Trombini e Leonel (2014)

Do ponto de vista socioeconômico, a mandioca é cultivada em todas as regiões brasileiras, o que está relacionado com os hábitos alimentares das populações. A mandioca de mesa é comercializada e/ou consumida em todo o Brasil, tanto *in natura*, quanto minimamente processada ou na forma pré-cozida e congelada (AGUIAR, 2011; CONAB, 2016).

De acordo com o relatório mensal de fevereiro de 2022 da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), estima-se que a produção da raiz de mandioca para esse ano é de 18 milhões de toneladas para uma área total coletada de 1,24 milhão de hectares; o que mostra um aumento da área plantada de 1,17%, um aumento na área colhida de 1,10%, mas uma queda de produtividade de 15t/h para 14,45t/h quando comparado à 2021, ou seja, uma queda de produtividade de 3,71% e uma redução na produção total de 2,65% da raiz. Fato que foi justificado pelas alterações climáticas intensas na região Centro-Sul reduzindo a produtividade das lavouras de mandioca (CONAB, 2022).

Nas regiões Norte e Nordeste, a mandioca é vista como uma das principais fontes de alimento, sendo cultivada em pequenas extensões de terra, em sua maioria. No Estado do Pará, a mandioca é consumida principalmente na forma de farinha (farinhas seca, d'água e mista). Essa cultura possui grande demanda devido ao crescimento da cadeia produtiva, a qual se encontra ligada ao setor industrial, pela produção da fécula, embutidos e outros derivados da mandioca (SEBRAE, 2008).

### 3. FOLHAS DE MANDIOCA

Durante o beneficiamento da mandioca, inúmeros resíduos agroindustriais são gerados, caracterizados como cascas, polpa, águas residuais e folhas. Outra forma de se desperdiçar as folhas da mandioca é na fase de colheita das raízes (SILVA *et al.*, 2012).

As folhas da mandioca, na região Norte do Brasil, são consumidas em pratos típicos como a maniçoba, a qual é composta de folhas de mandioca trituradas e fervidas com água por vários dias (CÂMARA; MADRUGA, 2001). O consumo das folhas de mandioca, por sua vez, pode se dar de diferentes formas, de acordo com o costume de cada país. Dados apresentados pelos autores Latif e Müller (2015), referentes ao variado emprego das folhas da mandioca, em diferentes países, são apresentados no Quadro 2.

As folhas da mandioca apresentam um elevado teor de proteína e um importante perfil de aminoácidos essenciais, motivos pelos quais as folhas de mandioca podem ser consideradas uma fonte potencial de proteína (ORESEGUN *et al.*, 2016). Segundo Guerroué *et al.* (1996), as proteínas da folha da mandioca são ricas em ácido glutâmico, ácido aspártico e leucina.

As folhas da mandioca têm sido estudadas com frequência, na Europa, América e Ásia, com intuito de obter fontes de proteínas com alto valor agregado e economicamente viáveis, com base no processo de extração da proteína e na definição do uso industrial, em função das propriedades funcionais-tecnológicas (SILVA *et al.*, 2012). Dentre os produtos estudados estão os concentrados protéicos, que segundo Fasuyi (2005) podem apresentar um importante perfil de aminoácidos, em função do perfil de aminoácidos observado nas folhas da mandioca, o qual pode ser observado na Tabela 1.2.

Coldebella *et al.* (2013) estudaram diferentes métodos de extração das proteínas, para a elaboração de concentrado protéico a partir das folhas de mandioca, sendo a coagulação proteica realizada pela variação da temperatura, por precipitação isoelétrica, por solubilização das proteínas e por fermentação do suco da folha. Neste estudo, a solubilidade mínima de proteínas e as maiores precipitações de proteínas em folhas de mandioca ocorreram para valores de pH entre 4,0–5,0.

**Quadro 2.** Consumo de folhas de mandioca como alimento em diferentes países.

País	Forma de consumo	Nome do prato	Forma de consumo
Brasil	Como suplemento alimentar para combater a desnutrição	Multimistura, pratos típicos da região norte do país	Para a maniçoba as folhas da mandioca são moídas e cozidas por aproximadamente uma semana, onde são acrescidas carnes de porco e bovina, e outros ingredientes defumados e salgados.
Congo	Hortaliça preferida, consumo de 40-170 g/dia	Pondu, Sakasaka, Matamba, Sombe	É feito um produto com consistência pastosa, mais ou menos compacta, com legumes para cozimento de 30 a 40 minutos. Pode ser utilizado carne, peixe salgado ou cabra no cozimento das folhas.
Indonésia	Consumida como uma hortaliça	Daun Singkong, Daun ubi tumbuk	São cozidas em uma pasta de especiarias fritas, sendo frequentemente cozida com uma pequena berinjela amarga, ou apenas em gordura animal e sal.
Malásia	Um dos vegetais tradicionais	Masak lemak pucuk ubi	As folhas de mandioca são picadas e fritas em óleo e especiarias, forma uma pasta e é adicionada em leite de coco para a elaboração do ensopado
Sri Lanka	Consumo médio de 35 a 100 g/dia	Malluma	As folhas são trituradas em pilão com pimenta e especiarias. A pasta formada é frita em azeite de coco, juntamente com carne.
Tanzânia	Consumida como uma hortaliça	Kisanby, Kisamvu	Uma sopa de legumes com especiarias, que é combinada com folha de mandioca e peixe.
Zâmbia	Frequentemente	Kizaka, Ngwada	São folhas lavadas e maceradas em pilão, as quais passam por um longo processo de pré-cozimento com fervura. O preparo é frito em óleo de palma e cebola.

Fonte: Latif e Müller (2015)



**Tabela 1.2.** Perfil de aminoácidos em folhas de mandioca.

<b>Aminoácidos</b>	<b>g de aminoácido/100 g (BAYATA, 2019)</b>	<b>mg de aminoácido/ 100 g de folha (FAO, 2002)</b>
Alanina	340	421
Ácido aspártico	490	671
Arginina	300	381
Glicina	350	365
Ácido glutâmico	400	717
Histidina	130	157
Isoleucina	330	339
Lisina	370	437
Metionina	70	118
Cistina	40	77
Metionina+Cistina	110	195
Leucina	540	900
Serina	340	332
Treonina	270	327
Fenilalanina	180	386
Valina	20	401
Tirosina	180	274
Triptofano	50	102
Prolina	180	342

De acordo com CUI *et al.* (2017) a extração de proteína vegetais com soluções alcalinas é viável, porém as condições (concentração, temperatura, tempo e relação sólido-líquido) devem ser levadas em consideração para um maior rendimento da extração. Em seu estudo com folhas de chá atingiu-se uma taxa de extração de aproximadamente 56%, por meio do uso de NaOH 0,1 M, relação sólido-líquido de 40:1, tempo de extração de 5h e temperatura de 40°C.

Modesti *et al.* (2007) caracterizaram concentrados protéicos de folhas de mandioca, obtido por precipitação com calor (80°C) e por via ácida (HCl concentrado). O teor de proteínas nos concentrados aumentou em 57,72%, quando comparados com os teores encontrados na farinha das folhas de mandioca. Os rendimentos de extração das proteínas foram semelhantes para os dois métodos de precipitação utilizados. A mínima solubilidade de nitrogênio dos concentrados protéicos foi observada em pH entre 3 e 5.

Ortega-Flores *et al.* (2003) avaliaram a qualidade proteica de folhas desidratadas de mandioca, por meio de 8 ensaios biológicos com ratos, nos quais foram administradas rações com composições distintas para cada animal. Os autores constataram que quando as folhas da mandioca foram usadas, as formulações das rações apresentaram qualidade proteica baixa, o que foi atribuído aos elevados teores de fibra, que interferiram na digestibilidade das rações e no valor biológico das mesmas. Assim, a pesquisa mostrou que as folhas de mandioca não devem representar mais de 50% da formulação da mistura proteica, para que apresente efeito benéfico.

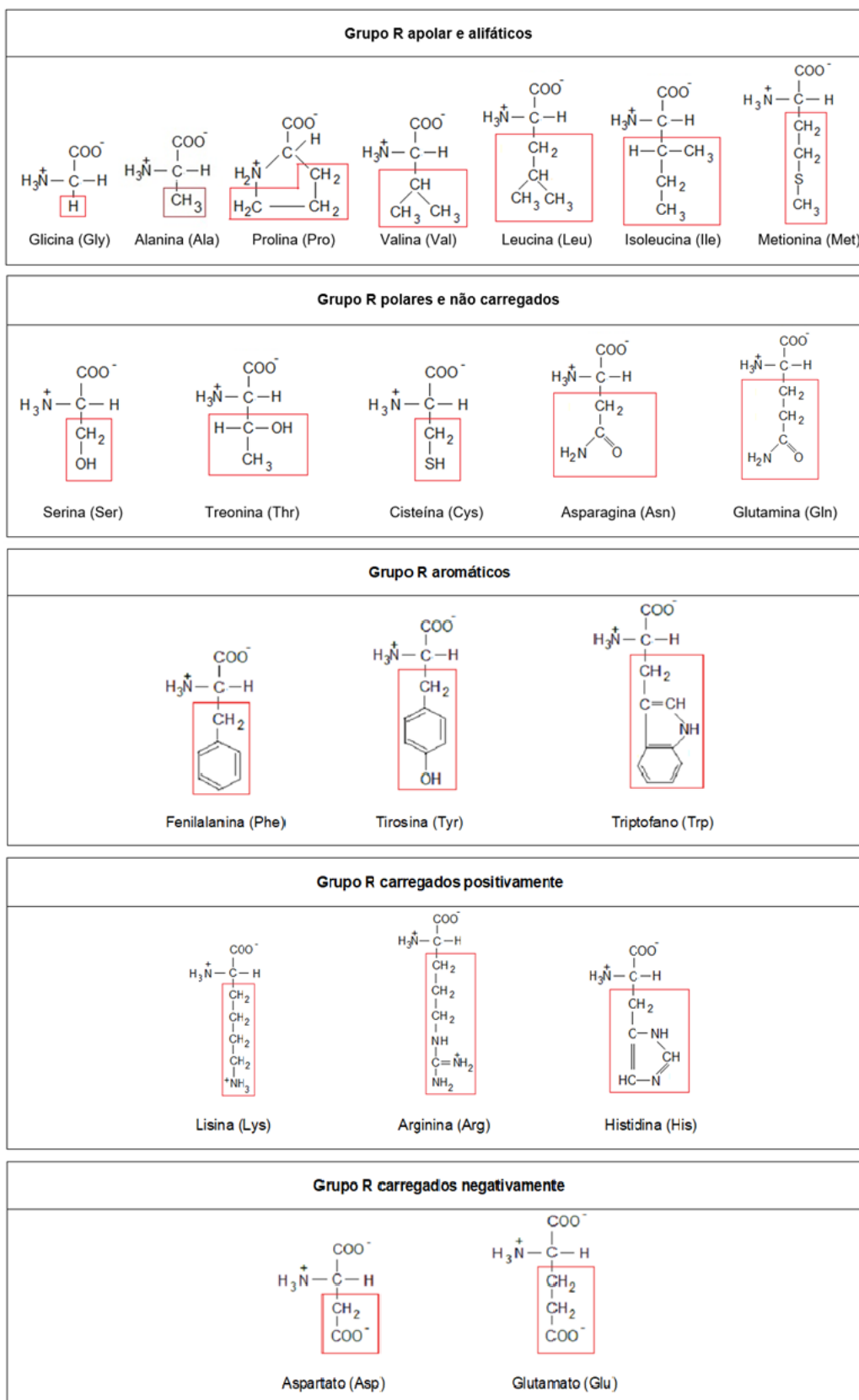
#### **4. PROTEÍNAS E FUNDAMENTOS DA PRECIPITAÇÃO**

As proteínas são constituídas por unidades monoméricas de aminoácidos, os quais apresentam na estrutura um grupo amino primário e um grupo carboxila, ligados a um mesmo átomo de carbono; exceto a prolina que possui um grupo amino secundário. As posições dos aminoácidos na cadeia dão origem às diferentes proteínas. Cada aminoácido é distinguido por uma cadeia lateral característica, que pode ser apolar (hidrofóbica), polar carregada (hidrofílica) ou polar não carregada (Figura 1.2) (VOET; VOET, 2006).

As proteínas possuem grande importância para os organismos, por atuarem no crescimento e desenvolvimento, pois atuam como reguladores do metabolismo, no transporte de nutrientes, como catalisadores naturais, nas defesas imunológicas, como receptores de membranas e muitas outras funções (PAIVA; ALFENAS; BRESSAN, 2007).

As proteínas dispõem de propriedades funcionais também aplicadas à indústria de alimentos, as quais são de grande relevância tecnológica no processamento e na elaboração de produtos, devido a algumas particularidades que possuem. Estas propriedades estão associadas às características próprias da proteína: a estrutura molecular, o tamanho e os compostos com interação ao sistema protéico, e propriedades associadas ao ambiente em que ela se encontra (a força iônica e o pH). Dentre as propriedades funcionais de interesse para indústria, destacam-se: a interação água/óleo, a emulsificação, a capacidade de formação de espuma, a viscosidade, a geleificação, entre outras. Além

disso, as proteínas podem ser incorporadas em produtos alimentares, a fim de melhorar o sabor, a textura e outros atributos sensoriais de produtos processados (CÔRREA *et al.*, 2002; YU; AHMEDNA; GOKTEPE, 2007).



**Figura 1.2.** Classificação dos aminoácidos essenciais de acordo com o grupo R das cadeias laterais.

As propriedades funcionais das proteínas são atribuídas a fatores intrínsecos (estrutura molecular e composição) e fatores extrínsecos (temperatura, pH e substâncias químicas ambientais). À medida que esses aspectos são modificados, a estrutura das proteínas dos alimentos conseqüentemente é alterada, o que promove alteração nas propriedades funcionais (SFORZA; TEDESCHI; WIERENGA, 2016).

Fatores como a hidrofobicidade e a solubilidade podem influenciar diretamente nas propriedades dos alimentos. A hidrofobicidade pode ser descrita como a tendência das moléculas hidrofóbicas de reduzir ao máximo a superfície de contato com a água. Duas moléculas hidrofóbicas tentam se unir e evitar que a superfície mútua entre em contato com a água. Esta propriedade desempenha um papel importante nas interações proteína-proteína, a qual pode contribuir para o dobramento ou desdobramento de proteínas e agregação das mesmas (CALDARELLI; DE LOS RIOS, 2001; DAMODARAN; 2010).

As proteínas são classificadas de várias formas, quanto a sua estrutura, função e solubilidade, sendo este último fator o comumente empregado. Osborne (1924) é um dos estudiosos da classificação das proteínas vegetais, quanto a solubilidade em diferentes solventes, sendo este princípio ainda utilizado por diversos autores. Vondel, Lambrecht e Delcour (2020) propuseram a separação cromatográfica das proteínas da quinoa, baseada na teórica de Osborne, que classifica as proteínas quanto a solubilidade em água (albuminas), em soluções salinas (globulinas), em álcalis (glutelinas) e em álcool (prolaminas).

Ressalta-se que a solubilidade é definida como a percentagem de proteína em solução aquosa, que não é precipitada ou sedimentada por forças centrífugas moderadas. Essa propriedade pode ser definida como uma das condições de maior importância na avaliação das proteínas. A solubilidade atribui elementos como textura, cor, emulsificação, espuma e as propriedades sensoriais dos produtos alimentares. Na maioria das proteínas, a solubilidade ocorre em meios com pHs ácidos ou alcalinos, devido à grande quantidade de cargas de mesmo sinal, o que favorece a repulsão das moléculas e aumenta a solubilidade. No ponto isoelétrico (pI), por sua vez, a quantidade de cargas positivas e negativas se iguala e, e a repulsão das moléculas praticamente é

anulada; o que diminuindo a solubilidade das proteínas e aumenta a precipitação das mesmas (SGARBIERI, 1996, SFORZA; TEDESCHI; WIERENGA, 2016).

Quando avaliado o uso de solventes diferentes usados sucessivas vezes, resulta no fracionamento das proteínas em diferentes grupos de acordo com a afinidade da matéria prima e os solventes aplicados. A solubilidade já foi utilizada como um método de monitoramento da desnaturação das proteínas. A desnaturação promove o desdobramento da proteína, que se encontra em estado nativo e bem definido, a um modelo desordenado; mudança essa que pode ser reversível ou irreversível. Neste caso, fatores responsáveis pelas estruturas secundária e terciária das proteínas cessam. A desnaturação proteica pode ocorrer devido a ações externas, seja por um fator físico como a temperatura, alta pressão, cisalhamento; ou um fator químico como pH, polaridade de solventes ou aditivos que possuem a capacidade de modificar o ambiente iônico (DAMODARAN; 2010).

A temperatura quando alta ou baixa, pode promover a desnaturação proteica, de acordo com o tipo de proteína e/ou condições impostas; pois desestabiliza principalmente as interações não-covalentes. À medida que a temperatura é aumentada as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, que são exotérmicas por natureza, são enfraquecidas. As interações hidrofóbicas (que são de natureza endotérmica), por sua vez, quando as proteínas são expostas ao calor são fortalecidas; e quando a temperatura atinge níveis de 70 a 80°C, essas interações se tornam extremas (CALDARELLI; DE LOS RIOS, 2001; DAMODARAN, 2010).

O uso de aditivos, como os sais, pode promover a desnaturação de proteínas. Em meios com concentrações salinas maiores que 1 M, a água disponível terá maior contato com o sal presente no meio, causando a desidratação da proteína e, caso esta desidratação seja satisfatória, ocorrerá a redução da solubilidade e, conseqüentemente, a precipitação proteica, o que é conhecido como "*salting out*". Em meios com baixas concentrações salinas (< 0,2 M), por sua vez, o sal se une às proteínas com cargas opostas, o que promove a redução da energia livre eletrostática da proteína e conseqüentemente o aumento da solubilidade proteica, devido ao

favorecimento da interação água-proteína; o que é conhecido como “*salting in*” (DAMODARAN, 2010; USTUNOL, 2015).

Os solventes orgânicos são geralmente utilizados na extração, purificação e concentração de enzimas, pois em concentrações elevadas atuam como desnaturadores protéicos e em baixas concentrações promoverem a solubilidade de proteínas. Este tipo de desnaturação pode ser reversível, em função da polaridade da solução hidroalcolica e da concentração utilizada. Solventes orgânicos com polaridades inferiores a polaridade da água, como o etanol, reduz a constante dielétrica do meio em que a proteína se encontra, afetando a estabilidade do sistema (JAMADAGNI; GODAWAT; GARDE, 2011; USTUNOL, 2015).

## **5. CONCENTRADO PROTÉICO E PROCESSOS DE EXTRAÇÃO**

De acordo com a RDC N° 268, de 22 de setembro de 2005 um concentrado protéico deve apresentar um valor mínimo de 68% de proteínas, em base seca, e valores máximos de 8% de umidade, 5% de fibra bruta, 1% de lipídeos e 5% de cinzas.

As folhas da mandioca, possuem na composição, grande quantidade de proteína, porém a digestibilidade dessas proteínas pelos seres humanos é muito baixa, devido aos elevados valores de fibras e polifenóis, nas folhas. As proteínas das folhas da mandioca possuem uma importante composição em aminoácidos; com carência apenas dos aminoácidos metionina e triptofano, mas com alto valores de lisina (AWOYINKA; ABEGUNDE; ADEWUSI, 1995). Neste contexto, a obtenção de concentrados protéicos a partir das folhas da mandioca, pode ser uma alternativa para minimizar o impacto das fibras e polifenóis. Adicionalmente, um concentrado protéico pode ser utilizado como um produto funcional, quando adicionado a outros alimentos, devido ao alto teor de proteínas e ao perfil de aminoácidos (MODESTI *et al.*, 2007).

O processo de produção de concentrado protéico de folhas baseia-se na extração das proteínas, pela ruptura celular das folhas, o que promove a formação de um líquido e um resíduo fibroso. No líquido ficam os compostos solúveis existentes nas células vegetais, como as proteínas. Para promover a precipitação das proteínas pode-se utilizar diferentes métodos, como a

precipitação isoelétrica, a precipitação com álcool, a precipitação isoelétrica associada à precipitação com álcool, a precipitação com álcool e a extração com água, entre outros métodos (MODESTI *et al.*, 2007; YU; AHMEDNA; GOKTEPE, 2007).

Na obtenção de concentrados protéicos diversos métodos podem ser utilizados para a precipitação das proteínas, tais como: a precipitação isoelétrica (ação da variação do pH), precipitação por termocoagulação (ação da temperatura), precipitação com solventes orgânicos, como o etanol, o butanol, a acetona e o éter, e ainda a extração por ação de enzimas, como as proteases (SILVA *et al.*, 2012; COLDEBELLA *et al.*, 2013).

A precipitação isoelétrica se baseia na alteração do pH do meio, o qual é ajustado ao ponto isoelétrico (pI) da proteína. Essa precipitação ocorre devido à proteína possuir carga elétrica líquida nula, ou seja, há o equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos existentes nas moléculas de proteína. Com isso, ocorre a redução das interações dos grupos protéicos (agregação) e, conseqüentemente, a solubilidade da proteína atinge um valor mínimo (HARRISON *et al.*, 2003).

O uso de solventes orgânicos em alta concentração promove a precipitação das proteínas, devido à ação dos solventes nas interações hidrofóbicas das moléculas, o que desestabiliza as ligações de hidrogênio. Assim, as cadeias laterais apolares das proteínas são enfraquecidas, bem como as interações hidrofóbicas, o que é favorecido pela alta solubilidade das cadeias laterais não polares em solventes orgânicos (DAMODARAN, 2010).

A termocoagulação de proteínas de folhas ocorre geralmente na faixa de temperatura de 60-90°C. Em temperaturas superiores a 40°C, a maioria das proteínas passa a ser instável, devido ao aumento na energia cinética térmica que promove o desdobramento das proteínas, ou seja, inicia-se a desnaturação proteica, devido a exposição de grupos apolares, a agregação e a precipitação das proteínas e, conseqüentemente, a redução da solubilidade. Essa alteração da solubilidade das proteínas ocorre devido a interação proteína-proteína, a qual possui caráter hidrofóbico. Caso não ocorra a interação proteína-proteína, pode ocorrer a uma interação proteína-solvente, que possui caráter iônico, e resulta no aumento da solubilidade proteica, dificultando a precipitação das proteínas (SGARBIERI, 1996; DAMODARAN, 2010).



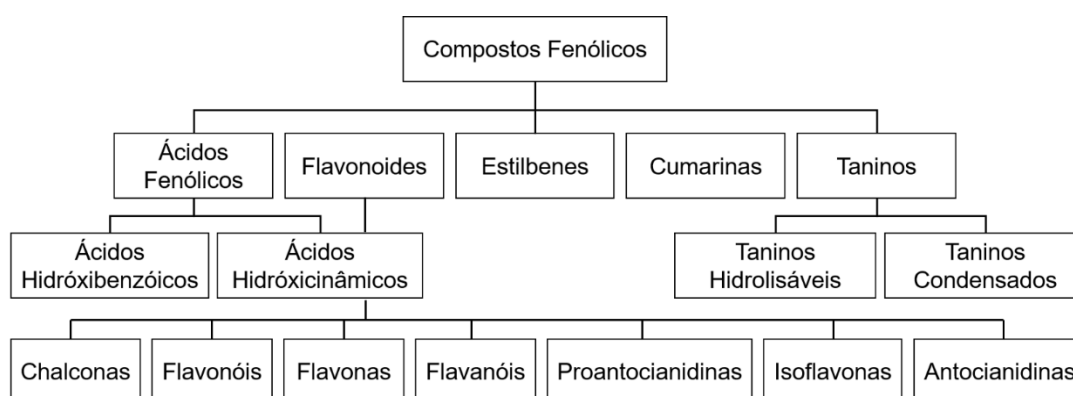
De acordo com Yang e Sagis (2021), a extração de proteínas vegetais tem sido foco de recentes estudos. Assim, os métodos de extração podem ser usados para fontes vegetais locais, como as folhas de mandioca, e em outras fontes vegetais, como girassol, a colza e microalgas.

## 6. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são produtos obtidos do metabolismo secundário das plantas, os quais apresentam como característica estrutural no mínimo um anel aromático, em que um ou mais grupos hidroxila estão ligados a estas regiões (BRAVO, 1998).

Estes compostos são sintetizados de acordo com condições ambientais e possuem classificação variada, como uma função do número dos anéis fenólicos que apresenta e das estruturas elementares que se ligam aos anéis e a outros, essas diferenças promovem algumas classificações como ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenes e lignanas (KOH; MITCHELL, 2006).

De acordo com Hassimoto e Mercadante (2018), existem mais de 10.000 compostos fenólicos encontrados no reino vegetal, os quais são subdivididos de acordo com as substituições na estrutura fundamental (Figura 1.3), dentre os majoritários presentes nos alimentos estão os ácidos fenólicos e flavonoides.



**Figura 1.3.** Classes de compostos fenólicos presentes nos alimentos

De acordo com Santos *et al.* (2016), as folhas de mandioca têm se destacado nos últimos anos, por apresentar grande potencial nutricional, a qual possui em sua composição proteínas, vitaminas e minerais, além da presença

de compostos fenólicos. No estudo feito com farinha de folhas de mandioca, os autores identificaram os seguintes compostos fenólicos, catequina, ácido gálico, epigalocatequina, ácido clorogênico e galocatequina, sendo a catequina o composto majoritário.

## 7. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE

A água possui grande importância na vida útil dos alimentos, pois atua diretamente na propriedade dos alimentos, o que permite favorecer reações de deterioração física e química por meio de sua capacidade de dissolver reagentes, mobilizá-los e também participar das reações; por isso o seu gerenciamento é fundamental na tecnologia de alimentos (LABUZA; ALTUNAKAR, 2020). A interação da água com analitos de um determinado produto alimentício esclarece a capacidade higroscópica que possui, o que a torna um indicador importante na produção, estabilidade e estocagem de alimentos que apresentem baixa umidade (LABUZA, 1975). Devido ao impacto de sua influência nos alimentos, conceitos foram definidos para elucidar os processos moleculares da água nesses sistemas (REID; FENNEMA, 2010).

A água em alimentos pode ser classificada como água ligada e água livre. A água livre presente no alimento mantém as mesmas características da água pura, apresentando um valor de atividade de água ( $a_w$ ) igual a 1, a qual está à disposição para o crescimento de micro-organismos, por exemplo. A água ligada é a fração de água que está intimamente ligada a outros elementos dos alimentos e possui um valor de  $a_w$  abaixo de 1 (HAYATI *et al.*, 2021).

O termo atividade de água ( $a_w$ ) é uma importante definição, além de ser imprescindível para relatar a disponibilidade e mobilidade de água em alimentos. (AKSIL *et al.* 2019). A  $a_w$  de um alimento é definida a partir da razão entre a pressão de vapor do próprio alimento em equilíbrio e a pressão de vapor de água pura em condições análogas (FDA, 1984; LABUZA, 1975). Tendo em vista a importância de se conhecer essa interação água-alimento, é necessário determinar a combinação entre o teor de umidade de equilíbrio e a  $a_w$ , conhecido como isoterma de sorção (adsorção ou dessorção) (AKSIL *et al.* 2019).

A configuração de uma isoterma é definida pela maneira que a água se liga ao sistema, como no caso de sistemas com moléculas de água com interações mais fracas, as quais geram uma maior  $a_w$ , o que sugerem a formação de produto mais instável (ANDRADE *et al.*, 2011; GUICHAU *et al.*, 2020).

A forma sigmóide é geralmente encontrada em curvas isotérmicas de produtos alimentícios. As isotermas de sorção podem ser divididas em três frações: a da água monocamada (tipo I) que corresponde a adsorção de uma camada monomolecular de água, da água multicamada (tipo II) que caracteriza a adsorção nas camadas adicionais acima da monocamada e da água em movimento livre (tipo III) que equivale a água existente nos poros, capaz de facilitar a dissolução das frações solúveis do sistema (LOMAURO; BAKSHI; LABUZA, 1985; HAYATI *et al.*, 2021).

A simulação do comportamento de sorção foi realizada inúmeras vezes, gerando mais de 200 modelos de diferentes autores, sendo alguns embasados subjetivamente e outros embasados experimentalmente. Ressalta-se que a sorção de água absorvida por um determinado produto está inerente à composição química, estado físico-químico e estrutura física; proporcionando isotermas de sorção originais para cada tipo de produto (ANDRADE *et al.*, 2011; AL-MUHTASEB *et al.*, 2002).

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, E. B.; VALLE, T. L.; LORENZI, J. O.; KANTHACK, R. A. D.; MIRANDA FILHO, H.; GRANJA, N. P. Efeito da densidade populacional e época de colheita na produção de raízes de mandioca de mesa. **Revista Bragantia**, v. 70, n. 3, p.561-569, 2011.
- AKSIL, T.; ABBAS, M.; TRARI, M.; BENAMARA, S. Water adsorption on lyophilized *Arbutus unedo* L. fruit powder: Determination of thermodynamic parameters. **Microchemical Journal**. v. 145, p. 35-41, 2019.
- AL-MUHTASEB, A. H.; McMINN W. A. M.; MAGEE, T. R. A. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. **Food and Bioprocess Processing**, v. 80, n. 2, p. 118-128, 2002.
- ÁLVARES, V. S.; FINGER, F. L.; SANTOS, R. C. A.; SILVA JR; CASALI, V. W. D. Effect of pre-cooling on the postharvest of parsley leaves. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 5, p. 31-34, 2007.
- ALZAMORA, S. M.; LÓPEZ-MALO, A.; TAPIA, M. S.; WELTI-CHANES, J. Minimally Processed Foods. **Encyclopedia of Food and Health**, Editor(s): Editor(s): Benjamin Caballero, Paul M. Finglas, Fidel Toldrá, p. 767-771, 2016.
- ANDRADE, R. D.; LEMUS, R.; PEREZ, C. E. Models of sorption isotherms for food: uses and limitations. **Vitae**, v. 18, n. 3, p. 325-334, 2011.
- ARTÉS, F.; ALLENDE, A. Chapter 26 - Minimal Fresh Processing of Vegetables, Fruits and Juices. 1st Edition. **Emerging Technologies for Food Processing**, Editor(s): Da-Wen Sun, p. 677-716, 2005.
- AWOYINKA, A. F.; ABEGUNDE, A. F.; ADEWUSI, S. R. A. Nutrient content of young cassava leaves and assessment of their acceptance as a green vegetable in Nigeria. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.47, p.21-28, 1995.
- BAYATA, A. Review on nutritional value of cassava for use as a staple food. **Science Journal of Analytical Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 83-91, 2019.
- BRADBURY, J.H.; DENTON, I. C. Mild method for removal of cyanogens from cassava leaves with retention of vitamins and protein. **Food Chemistry**, v.158 p. 417-420, 2014.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC n<sup>o</sup> 268, de 22 setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, de 23 de setembro de 2005.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BROSNAN, T.; SUN, D.W. Precooling techniques and applications for horticultural products- a review. **International Journal Refrigeration**, v.24, p.154-170, 2001.

CALDARELLI, G.; DE LOS RIOS, P. Cold and Warm Denaturation of Proteins. **Journal of Biological Physics**, v. 27, p. 229–241, 2001.

CÂMARA, F. S.; MADRUGA, M. S. Cyanic acid, phytic acid, total tannin and aflatoxin contents of a Brazilian multimistura preparation. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 33-36, 2001.

CEREDA, M. P.; MATTOS, M. C. Y. Linamarin - The toxic compound of cassava. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 2, n. 1, 1996.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.70, n.1, p. 41-46. 2011.

CHIWONA-KARLTUN, L.; NYIRENDA, D.; MWANSA, C. N. KONGOR, J. E.; BRIMER, L.; HAGGBLADE, S.; AFOAKWA, E. O. Farmer preference, utilization, and biochemical composition of improved cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties in Southeastern Africa. **Economic Botany**, v. 69, n. 1, p. 42-56. 2015.

COLDEBELLA, P. F.; GOMES S. D.; EVARINI, J. A.; CEREDA, M. P.; COELHO, S. R. M.; COLDEBELLA, A. Evaluation of protein extraction methods to obtain protein concentrate from cassava leaf. **Engenharia. Agrícola**, v. 33, n. 6, p. 1223-1233. 2013.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Conjuntura mensal – mandioca. Avaliação 01/03 a 31/03/2016. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_01\\_09\\_37\\_05\\_mandiocamarco2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_01_09_37_05_mandiocamarco2016.pdf). Acessado: 11 Nov 2016.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Histórico mensal – mandioca – Fevereiro 2022. Publicado 18/03/2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca>. Acessado: 01 Jun 2022.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Perspectivas para a agropecuária. ISSN: 2318-3241. v. 2, p. 1-155. Brasília, 2014. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_09\\_10\\_18\\_03\\_00\\_perspectivas\\_2014-15.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_10_18_03_00_perspectivas_2014-15.pdf) Acessado: 02 dez 2015.

CÔRREA, A. D.; SANTOS, C. D.; NATIVIDADE, M. A. E.; ABREU, C. M. P.; XISTO, A. L. R. P.; CARVALHO, V. D. Farinha de folhas de mandioca I – efeito da secagem das folhas sobre a atividade da linamarase. **Ciência Agrotecnologia**, v.26, n.2, p.368-374. 2002.

CUI, Q.; NI, X.; ZENG, L.; TU, Z.; LI, J.; SUN, K.; CHEN, X.; LI, X. Optimization of protein extraction and decoloration conditions for tea residues. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 4, p. 172-176, 2017.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas (Capítulo 5). In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição. Editora Artmed, Porto Alegre, p.179-262, 2010.

EL-SHARKAWY, M. A. Cassava biology and physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 53, p.621-641. 2003.

FAO. **Requisitos de proteínas e aminoácidos na alimentação humana**. FAO/ OMS/ Consulta de Especialistas da UNU sobre Requisitos de Proteínas e Aminoácidos na Nutrição Humana. Série de relatórios técnicos da OMS, n. 935. p.01-284, Genebra, 2002.

FASUYI, A. O. Nutrient Composition and Processing Effects on Cassava Leaf (*Manihot esculenta*, Crantz) Antinutrients. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.4, n. 1, p. 37-42, 2005.

FDA - Food and Drug Administration. **Inspection Technical Guides - Water Activity (aw) in Foods**. Dept. of Health, Education, and Welfare Public Health Service Food and Drug Administration. Number 39, 1984.

GALANI, J. H. Y., PATEL, J. S.; PATEL, N. J.; TALATI, J. G. Storage of Fruits and Vegetables in Refrigerator Increases their Phenolic Acids but Decreases the Total Phenolics, Anthocyanins and Vitamin C with Subsequent Loss of their Antioxidant Capacity. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 59-17, 2017.

GICHAU, A.W.; OKOTH, J.K.; MAKOKHA, A. Moisture sorption isotherm and shelf life prediction of complementary food based on amaranth–sorghum grains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, p. 962–970, 2020.

GIL, M.I.; SELMA, M.V.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; ALLENDE, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v.134, p. 37-45, 2009.

GLEADOW, R. M.; MØLLER, B. L. Cyanogenic Glycosides: Synthesis, Physiology, and Phenotypic Plasticity. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 155-185. 2014.

GROXKO, M.; PEREIRA, J. R. **Prognóstico agropecuário mandioca 2021/2022**. Departamento de Economia Rural – DERAL, Divisão de Conjuntura Agropecuária. ISSN 2764 – 2887, v. 13, n. 34, 2021. Disponível em: <[https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2022-01/Mandioca.pdf](https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2022-01/Mandioca.pdf)>. Acesso em: 26 de março de 2023.

GUERROUÉ, J. L.; DOUILLARD, R.; CEREDA, M. P.; CHIARELLO, M. D. As proteínas de folhas de mandioca: aspectos fisiológicos, nutricionais e importância tecnológica. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 14, n.2, p. 133-148, 1996.

HARRISON, R. G., TODD, P., RUDGE, S. R., PETRIDES, D. P., **Bioseparations Science and Engineering**, Oxford University Press, New York. 2003.

HASSIMOTO, N. M. A.; MERCADANTE, A. Z. Compostos fenólicos (Capítulo 8), in: LAJOLO, F. M.; MERCADANTE, A. Z. (Eds.); SANT'ANA A. S. **Química e bioquímica dos alimentos**. Primeira Edição. Editora Atheneu, Belo Horizonte, 2018.

HAYATI, R., SYNTHIA, D, MARLIAH, A. AND MUNAWAR, A. A. Water sorption isotherm of Aceh Rice (*Oryza sativa*): Study on chemical properties and characteristics. **International Journal of Agricultural Technology**, v. 17, n. 5, p.1753-1766, 2021.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção Agrícola - Lavoura Temporária – 2021. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/14/10334>. Acesso em: 23 mar 2023.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2018 Disponível em: [https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618?fbclid=IwAR12PyHDq\\_vkrOMVDMnahy8EW2\\_g9i1GOZAROhCXDZmORwsmFh7IbEE50js](https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618?fbclid=IwAR12PyHDq_vkrOMVDMnahy8EW2_g9i1GOZAROhCXDZmORwsmFh7IbEE50js). Acessado: 07 jan 2019.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - Dezembro 2019. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag\\_2019\\_dez.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2019_dez.pdf). Acessado: 08 jan 2021.

JAMADAGNI, S. N.; GODAWAT, R.; GARDE, S. Hydrophobicity of Proteins and Interfaces: Insights from Density Fluctuations. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 147-171, 2011.

KAYS, S. J. Preharvest conditions affecting appearance. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, p. 233-247, 1999.

KOH, E.; MITCHELL, A. E. Trends in the Analysis of Phytochemicals – Flavonoids and carotenoids. In: MESKIN, S.M.; BIDLACK, W.R.; RANDOLPH, R. K. **Phytochemicals – Aging and Health**. Buena Park: CRC Press. p. 39-76. 2006.

LABUZA, T. P. Interpretation of sorption data in relation to the state of constituent water. In: DUCKWORTH, R. B. **Water relations of foods**. London, Academic Press. Inc., p. 155-173, 1975.

LABUZA, T. P.; ALTUNAKAR, B. Water Activity Prediction and Moisture Sorption Isotherms (Capítulo 7) in: Barbosa-Cánovas, G. V.; Fontana Jr., A. J.; Schmidt, S. J.; Labuza, T. P. (Eds.); **Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications, Second Edition**. Segunda Edição. Editora Wiley-Blackwell, CRC Press, 2020.

LATIF, S.; MULLER, J. Potential of cassava leaves in human nutrition: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 2015.

LEE, S.Y.; BAEK, S.Y. Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. **Food Microbiol**, v. 25, p.582-587, 2008.

LOMAURO, C. J.; BAKSHI, A. S.; LABUZA, T. P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations: Part II - milk, coffee, tea, nut, oilseeds, spices and starchy foods, **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 18, n. 1, p. 118-124, 1985.

LUI, M. C. Y.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 206-212, 2003.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Comunicado Técnico 50: Utilização da fração proteica verde de folhas de mandioca na fortificação de alimentos. ISSN 0103-5231. 2002.

MCKEY, D.; CAVAGNARO, T. R.; CLIFF, J.; GLEADOW, R. Chemical ecology in coupled human and natural systems: people, manioc, multitrophic interactions and global change. **Chemoecology**, v. 20, p. 109-133. 2010

MODESTI, C. F.; CORRÊA, A. D.; OLIVEIRA, E. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D. Caracterização de concentrado protéico de folhas de mandioca obtido por precipitação com calor e ácido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 464-469, 2007.

MODESTO JUNIOR, E. N.; CHISTÉ, R. C.; PENA, R. S. Oven drying and hot water cooking processes decrease HCN contents of cassava leaves. **Food Research International**, v. 119, p. 517-523, 2019.

ORESEGUN, A.; FAGBENRO, O. A.; ILONA, P.; BERNARD, E. Nutritional and anti-nutritional composition of cassava leaf protein concentrate from six cassava varieties for use in aqua feed. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1147323>. 2016.

ORTEGA-FLORES, C. I.; COSTA, M. A. L.; CEREDA, M. P.; PENTEADO, M. V. C. Avaliação da qualidade protéica da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition**, v.25, p. 47-59, 2003.

OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins**, 2 Ed. Longmans, Green and Co., London, p. 154, 1924.

PAIVA, A. C.; ALFENAS, R. C. G.; BRESSAN, J. Efeitos da alta ingestão diária de proteínas no metabolismo. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 22, n. 1, p. 83-88. 2007.

REID, D. S.; FENNEMA, O. R. Água e gelo (Capítulo 2). In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição. Editora Artmed, Porto Alegre, p.179-262, 2010.

RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 7, p. 373-386, 2007.



RINALDI, M. M.; BENEDETTI, B. C.; CALORE, L. Efeito da embalagem e temperatura de armazenamento em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 480-486, 2005.

SANTOS, H. S.; MURATORI, M. C. S.; MARQUES, A. L. A.; ALVES, V. C.; CARDOSO FILHO, F. C.; COSTA, A. P. R.; PEREIRA, M. M. G.; ROSA, C. A. R. Avaliação da eficácia da água sanitária na sanitização de alfaces (*Lactuca sativa*). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 56-60, 2012.

SANTOS, M. A. I.; SIMÃO, A. A.; MARQUES, T. R.; SACKZ, A. A.; CORRÊA, A. D. Efeito de diferentes métodos de extração sobre a atividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos da folha de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, e2015067, 2016.

SCHUH, V.; SCHUH, J.; FRONZA, N. FORALOSSO, F. B.; VERRUCK, S.; VARGAS JUNIOR, A. SILVEIRA, S. M. Evaluation of the microbiological quality of minimally processed vegetables. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 290-295, 2020.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Estudo de mercado sobre a mandioca (farinha e fécula)**. Estudos de mercado – ESPM/SEBRAE. p. 14-27. 2008.

SETHI, S.; NAYAK, S. L.; JOSHI, A.; SHARMA, R. R. Sanitizers for fresh-cut fruits and vegetables (Chapter 5). In **Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Technologies and Mechanisms for Safety Control**. First Edition. SIDDIQUI, M. W. (ed.). Academic Press, 2020.

SFORZA, S.; TEDESCHI, T.; WIERENGA, P.A. Proteins: Chemistry, Characterization, and Quality. In: **Encyclopedia of Food and Health** / Caballero, B., Finglas, P., Toldrá, F., Academic Press – ISBN 9780123849472 - p. 548-553, 2016.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Editora-Livraria Varela, p., p.139-157, 1996.

SILVA, J. L., GOMES, S. D.; COELHO, S. R. M. EVARINI, J.; FERRI, P.; CEREDA, M. P.; LUCAS, S. D. M. Obtenção de concentrado proteico de folhas e parte aérea da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2279-2288, 2012.

TEO, C. R. P. A.; PRUDENCIO, S. H.; COELHO, S. R. M.; TEO, M. S. Obtenção e caracterização físico-química de concentrado proteico de folhas de mandioca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, p. 993-999, 2010.

TROMBINI, F. R. M.; LEONEL, M. Phisico-chemical composition and technological properties of cassava leaf flour. **Energia na Agricultura**, vol. 29, n.1, p.76-81. 2014

USTUNOL, Z. (2015). Physical, Chemical, and Processing-Induced Changes in Proteins (Chapter 4). In **Applied Food Protein Chemistry**. First Edition. USTUNOL, Z (ed.). John Wiley & Sons, Ltd., 2015.

VALLE, T. L.; LORENZI, J. O. Variedades melhoradas de mandioca como instrumento de inovação, segurança alimentar, competitividade e sustentabilidade: contribuições do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). **Cadernos de Ciência e Tecnologia**. v. 31, n. 1, p. 15-34. 2014.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. Tradução: Ana Beatriz Gorino da Veiga [et al]. ISBN 85-363-0680-7 – 3° ed. – Porto Alegre: Artmed, 2006.

VONDEL, J.V.D.E.; LAMBRECHT, M.A.; DELCOUR, J.A. Osborne extractability and chromatographic separation of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) wholemeal. **LWT - Food Science and Technology**, v. 126, n. 109321, 2020.

YANG, J.; SAGIS, L. M. C. Interfacial behavior of plant proteins — novel sources and extraction methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 56, n. 101499, 2021.

YEOH, H. H.; CHEW, M. Y. Protein content and amino acid composition of cassava leaf. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1597-1599, 1976.

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. **Food Chemistry**, v. 103, p. 121-129. 2007.

## CAPÍTULO II

---

ESTABILIDADE DAS FOLHAS DA MANDIOQUEIRA (*Manihot  
esculenta* Crantz) SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS DE  
TEMPERATURA E ATMOSFERA

## RESUMO

O estudo apresenta uma alternativa para o processamento mínimo das folhas da mandioca trituradas; um produto amplamente utilizado na culinária da região Norte. Um planejamento Box-Behnken foi utilizado para definir a concentração da solução de hipoclorito de sódio (NaClO) e o tempo de imersão (t) capazes de garantir níveis aceitáveis para coliformes termotolerantes e bolores e leveduras, nas folhas. As folhas sanitizadas nesta condição foram trituradas; acondicionadas em embalagens de polietileno, em atmosfera padrão (PE-SV) e sob vácuo (PE-CV), e em embalagem de poliamida sob vácuo (PA-CV); e armazenadas a 7°C, por 30 dias. Foram acompanhadas as propriedades: perda de massa,  $a_w$ , pH, acidez, sólidos solúveis, cor instrumental, clorofila *a* e *b*, e compostos fenólicos; além da avaliação de *Salmonella* spp, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e bactérias psicrófilas. Foi definida como condição ótima para a sanitização, a imersão das folhas por 20 min, em uma solução 250 mg/L de NaClO, seguida de lavagem com água. O comportamento das propriedades físico-químicas e microbiológicas indicaram que as folhas da mandioca sanitizadas e trituradas estarão adequadas para o consumo por 24 h, se acondicionadas (PE-SV), por até 7 dias em PE-CV e por 14 dias em PA-CV, se armazenadas a 7°C.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Manihot esculenta*, sanitização, processamento mínimo.

## 1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Grantz) é uma cultura de raiz tropical, que possui uma composição abundante em amido. Esta espécie se destaca por apresentar uma produção mundial de 296,8 milhões de toneladas e uma área cultivada 26,6 milhões de hectares (WANG *et al.*, 2020). No Brasil, estima-se uma produção de 20,2 milhões de toneladas de mandioca, sendo a região Norte responsável por 36,1% dessa produção (IBGE, 2019).

No Brasil, as raízes da mandioca podem ser encontradas na forma minimamente processada ou pré-cozida e congelada (AGUIAR *et al.*, 2011), e o principal uso da raiz na região Norte é para a fabricação da farinha de mesa e do tucupi (CHISTÉ; COHEN, 2006). As folhas de mandioca, por sua vez, são utilizadas como ingrediente de pratos típicos da cultura amazônica (MODESTO JUNIOR *et al.*, 2019), como a maniçoba; um produto obtido com as folhas da mandioca trituradas e fervidas com água por vários dias, para a eliminação do cianeto (CÂMARA; MADRUGA, 2001). As folhas da mandioca são comumente comercializadas em feiras livres, do estado do Pará, na forma *in naturas* ou trituradas, com ou sem cozimento. Estas são comercializadas a granel ou em embalagens de polietileno; à temperatura ambiente. Em países como o Congo, a Indonésia, a Malásia e a Tanzânia, as folhas de mandioca são consumidas como hortaliça (LATIF; MÜLLER, 2015).

A composição de matérias primas de origem vegetal tem promovido um aumento na procura por esse tipo de produto, bem como incentivado estudos, em função das ações benéficas desses produtos à saúde (KHANAM *et al.*, 2012). O mercado consumidor, por sua vez, tem apresentado mudanças na forma de consumo destes produtos e, nesse contexto, os produtos minimamente processados têm ganhando destaque, devido as vantagens nutricionais e a praticidade de uso (SANTOS *et al.*, 2019).

O processo mínimo tem se tornado uma importante ferramenta para a indústria de alimentos; especialmente para vegetais. Porém, a utilização de pré-tratamentos, como o corte do vegetal, pode promover a liberação de material celular, no local da lesão e, assim, favorecer o crescimento de microrganismos e o aumento das taxas de senescência; reduzindo a vida útil do produto (ALI *et al.*, 2018).

O processamento mínimo é composto por etapas, como: lavagem, classificação, sanitização, corte, centrifugação, embalagem e refrigeração (FANTUZZI *et al.*, 2004). A sanitização de produtos minimamente processados é de fundamental importância para controlar o avanço de processos deteriorativos de origem microbiológica, pois esta etapa tem o intuito de eliminar microrganismos e reduzir a deterioração a níveis seguros (BRACKETT, 1987; VILARIN *et al.*, 2020).

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil microbiológico e físico-químico das folhas da mandioca minimamente processadas; visando apresentar uma alternativa mais segura de preservação para essas folhas, bem como agregar valor à cadeia produtiva da mandioca.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. MATÉRIA PRIMA**

As folhas de mandioca utilizadas na pesquisa foram coletadas no município de Salvaterra (Pará, Brasil) (Latitude: 00° 45' 12" Sul, Longitude: 48° 31' 00" Oeste, altitude de 5 m), em uma fazenda as margens da PA-154. As folhas foram colhidas em junho de 2019, com um ciclo do cultivar de oito meses. As folhas foram transportadas à temperatura ambiente ( $\approx 28^{\circ}\text{C}$ ), em embalagens de polietileno com capacidade para 10 kg e dimensões de 60 cm x 40 cm (comprimento x largura) e espessura do filme de 0,10 mm, até o Laboratório de Fontes Amiláceas da Universidade Federal do Pará (Belém, Pará, Brasil). As folhas foram separadas dos talos, com auxílio de uma tesoura de aço-inox, em um tempo inferior a 24 horas, após a coleta. Em seguida as folhas foram submetidas as diferentes condições de processamento mínimo. O acesso a espécie utilizada está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, sob o número A5D5AD2.

### **2.2. DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SANITIZAÇÃO DAS FOLHAS**

Nesta etapa da pesquisa foi utilizado um planejamento experimental, para definir a concentração de hipoclorito de sódio e o tempo de imersão das

folhas a serem utilizados no processamento mínimo das folhas. Para isto, foi utilizado um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken, a metodologia de superfícies de resposta (MSR) e a função desejabilidade. Foi avaliado o efeito das variáveis de entrada (variáveis independentes): concentração de hipoclorito de sódio (C) na solução sanitizante (100 – 300 mg/L) e tempo de imersão (t) das folhas na solução (10 – 30 min), sobre as respostas contagem de coliformes a 45°C e de bolores e leveduras (variáveis dependentes). A matriz do planejamento experimental é apresentada na Tabela 2.1 (primeira a terceira colunas).

**Tabela 2.1.** Matriz do planejamento fatorial Box-Behnken e os resultados para coliformes a 45°C e bolores e leveduras, para o processo de sanitização das folhas de mandioca.

Corrida	Variáveis originais (variáveis codificadas)		Respostas	
	C (X <sub>1</sub> )	t (X <sub>2</sub> )	Coliformes a 45°C (NMP/g)	Bolores e leveduras (UFC/ g)
1	100 (-1)	10 (-1)	< 3,0	1,18x10 <sup>1</sup>
2	100 (-1)	20 (0)	< 3,0	1,18x10 <sup>1</sup>
3	100 (-1)	30 (+1)	< 3,0	0,45x10 <sup>1</sup>
4	200 (0)	10 (-1)	< 3,0	0,09x10 <sup>1</sup>
5	200 (0)	20 (0)	< 3,0	1,82 x10 <sup>1</sup>
6	200 (0)	30 (+1)	< 3,0	0,36x10 <sup>1</sup>
7	300 (+1)	10 (-1)	< 3,0	0,45x10 <sup>1</sup>
8	300 (+1)	20 (0)	< 3,0	ND
9	300 (+1)	30 (+1)	< 3,0	0,54x10 <sup>1</sup>
10	200 (0)	20 (0)	< 3,0	0,27x10 <sup>1</sup>
11	200 (0)	20 (0)	< 3,0	0,27x10 <sup>1</sup>

C: concentração de hipoclorito de sódio (mg/L); t: tempo de imersão (min); X<sub>1</sub>: C; X<sub>2</sub>: t; NMP: número mais provável; UFC: unidade formadora de colônia; ND: não detectado.

Antes de realizar as corridas do planejamento experimental, as folhas da mandioca foram submetidas a uma etapa de seleção das folhas íntegras, seguida de lavagem com água corrente. Em seguida, foi realizada a sanitização, nas diferentes condições do planejamento. Após o tempo de contato, as folhas foram enxaguadas com água destilada, para retirar o cloro

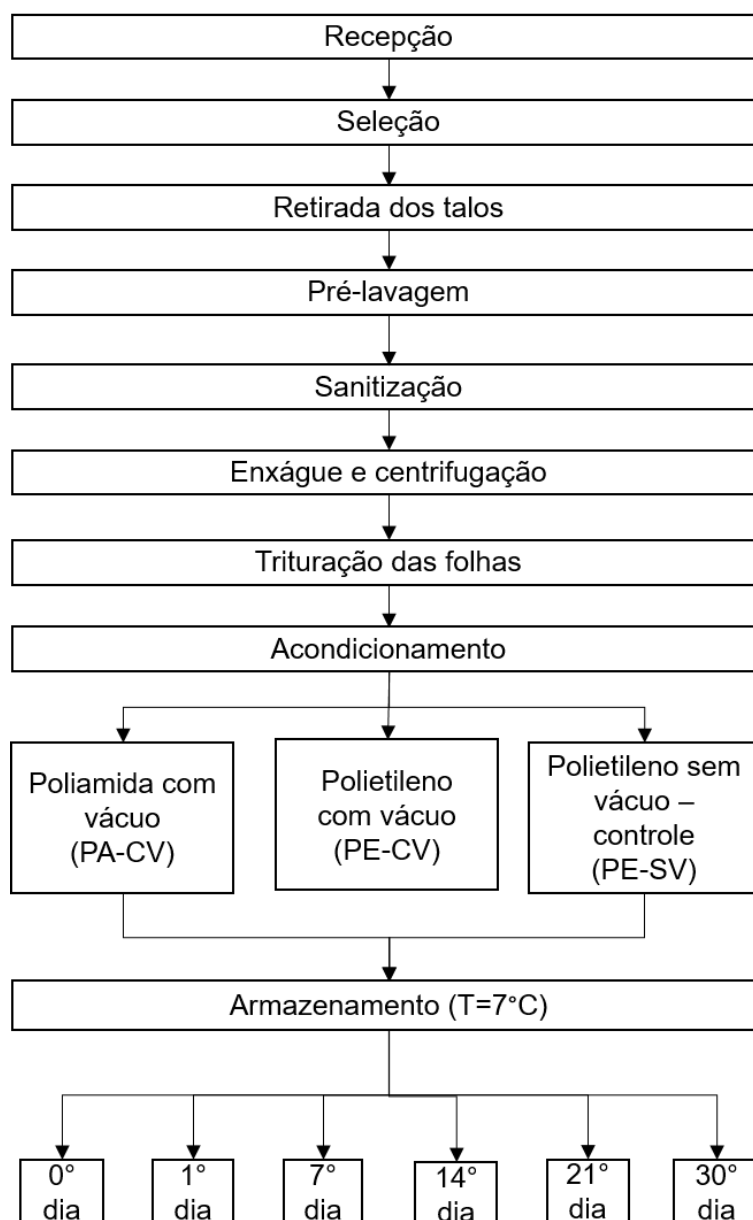
em excesso e, em seguida, foram secas superficialmente com auxílio de uma centrífuga manual para folhas e verduras, de polipropileno, com capacidade para 4,5 L (Alves Plastic, NCM:39241000, Gaspar Mirim, Brasil). Após estas etapas as folhas foram submetidas à análise microbiológica.

### 2.3. PROCESSAMENTO MÍNIMO DAS FOLHAS

Após a definição da condição da sanitização foram realizadas as corridas para a definição de uma condição de processamento mínimo para as folhas de mandioca. Para tal, foram realizadas as seguintes etapas: seleção das folhas íntegras; lavagem com água corrente; sanitização com hipoclorito de sódio, na condição ótima; enxágue com água destilada, para retirar o cloro em excesso; e secagem superficial por centrifugação. Em seguida, as folhas foram trituradas, em um triturador de bancada (Mondial, Power Mixer 500W, China). O estudo foi realizado com as folhas trituradas, por ser essa a principal forma de comercialização do produto.

Para avaliar a condição de acondicionamento, as folhas trituradas foram divididas em três grupos. No primeiro grupo as folhas foram acondicionadas em embalagem de polietileno com vácuo (PE-CV), no segundo grupo as folhas foram acondicionadas em embalagem de poliamida com vácuo (PA-CV) e no terceiro grupo, usado como controle, as folhas foram acondicionadas em embalagem de polietileno sem vácuo (PE-SV). Após embaladas, todas as amostras foram armazenadas sob refrigeração ( $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Para as amostras que foram embaladas sob vácuo foi utilizada uma seladora a vácuo (Selovac, Jumbo Mini, São Paulo, Brasil), em pressão de 10 mmHg por 3 s. O controle do armazenamento foi realizado nos tempos de 0, 1, 7, 14, 21 e 30 dias, quando amostras foram retiradas para a realização das análises microbiológicas, físicas e químicas. As etapas do processamento são apresentadas no fluxograma da Figura 2.1.





**Figura 2.1.** Fluxograma das etapas do processamento mínimo das folhas de mandioca.

## 2.4. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### ***Análises microbiológicas***

Nas determinações microbiológicas foi utilizado o método do número mais provável (NMP) APHA 9:2015 para contagem de coliformes a 45°C; o método de plaqueamento APHA 21:2015, para contagem de bolores e leveduras; e o método de plaqueamento APHA 13.61:2015, para contagem de

bactérias psicotróficas em alimentos; todos segundo os métodos oficiais da *American Public Health Association* – APHA (SILVA, 2017).

### **Análises físicas e químicas**

As amostras foram submetidas as análises de perda de massa, por gravimetria (Simões *et al.*, 2019); atividade de água ( $a_w$ ), em termohigrômetro digital (Aqualab 4TE, Decagon Devices Inc, USA); pH, em pHmetro de bancada (KASVI, k39-2014B, China); acidez total titulável (ATT), por titulação com hidróxido de sódio (AOAC, 1997); e sólidos solúveis totais (SST), em refratômetro digital de bancada (Quimis, Q76780, São Paulo, Brasil) (AOAC, 1997).

Foram também quantificados compostos químicos de interesse. *Clorofila a* e *clorofila b* foram determinadas por leitura dos extratos a 470 nm, 661,6 nm e 664,8 nm, em espectrofotômetro (BEL Photonics, BEL Engineering, Monza, Italy) (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001). *Compostos fenólicos totais* foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu (WATERHOUSE, 2002), sendo a quantificação feita com auxílio de uma curva analítica de ácido gálico, na faixa de concentração de 0,02 a 0,06  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/ $\mu\text{L}$  (absorvância entre 0,160 e 0,895). Os extratos foram obtidos de acordo com Boeing *et al.* (2014).

As amostras foram ainda submetidas a análise de cor instrumental, em um colorímetro digital (Chroma Meter CR-300, Konica Minolta, Japão), baseado no sistema CIELAB. Foi utilizada a seguinte calibração: fonte de luz D65/ geometria de visão de  $0^\circ$  (componente especular incluído), valores do branco  $X = 0,3174$  e do cinza  $Y = 0,3349$ . Foram determinados os parâmetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $c^*$  e  $h^\circ$ , por leitura direta no equipamento. A determinação da variação de cor ( $\Delta E$ ) foi calculada pela Equação 2.1 (PATHARE, OPARA E AL-SAID, 2013).

$$\Delta E = \left[ (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2 \right]^{1/2} \quad (2.1)$$

onde,  $\Delta L^*$  = variação da luminosidade, indicando a diferença em mais claro (+) e escuro (-),  $\Delta a^*$  = diferença em vermelho (+) e verde (-),  $\Delta b^*$  = diferença em amarelo (+) e azul (-) e  $\Delta E$  = diferença total de cor.

## 2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do planejamento experimental foram submetidos a análise de variância (ANOVA), para estimar os parâmetros estatísticos, a falta de ajuste do modelo e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Os testes de ajuste e de predição do modelo polinomial (Equação 2.2) foram realizados ao nível de significância de 5%.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 C + \beta_{11} C^2 + \beta_2 t + \beta_{22} t^2 + \beta_{12} Ct + \beta_{112} C^2 t + \beta_{122} Ct^2 \quad (2.2)$$

onde, Y é a variável dependente (coliformes a 45°C/g e bolores e leveduras); C e t representam as variáveis independentes concentração de hipoclorito e tempo de imersão;  $\beta_0$  representa o termo constante;  $\beta_1$  e  $\beta_2$  são os coeficientes lineares;  $\beta_{11}$  e  $\beta_{22}$  são os coeficientes quadráticos;  $\beta_{12}$  é o coeficiente de interação da concentração de hipoclorito linear e tempo de imersão linear,  $\beta_{112}$  é o coeficiente de interação da concentração de hipoclorito quadrático e tempo de imersão linear e  $\beta_{122}$  é o coeficiente de interação da concentração de hipoclorito linear e tempo de imersão quadrático.

Para a definição da condição ótima, para a sanitização das folhas, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta e a função desejabilidade. Os valores de desejabilidade variam de 0 a 1, onde 0 representa um valor completamente indesejado e 1 o valor mais desejável (DERRINGER; SUICH, 1980). Para obter o gráfico da função desejabilidade foram utilizadas taxas de variação da desejabilidade (s e t) iguais a 2 e um fator de grade de 4.

Para avaliar o comportamento das propriedades microbiológicas, físicas e químicas analisadas durante o armazenamento das folhas de mandioca minimamente processadas, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste complementar de Tukey, com 5% de significância, para a comparação das médias. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Statistica 7.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. OTIMIZAÇÃO DA SANITIZAÇÃO

Os resultados obtidos para coliformes a 45°C/g (NMP/g) e bolores e leveduras (UFC/g), para o planejamento Box-Behnken, são apresentados na Tabela 2.2 (quarta e quinta colunas).

**Tabela 2.2.** Matriz do planejamento fatorial Box-Behnken e os resultados para coliformes a 45°C e bolores e leveduras, para o processo de sanitização das folhas de mandioca.

Corrida	Variáveis originais (variáveis codificadas)		Respostas	
	C (X <sub>1</sub> )	t (X <sub>2</sub> )	Coliformes a 45°C (NMP/g)	Bolores e leveduras (UFC/ g)
1	100 (-1)	10 (-1)	< 3,0	1,18x10 <sup>1</sup>
2	100 (-1)	20 (0)	< 3,0	1,18x10 <sup>1</sup>
3	100 (-1)	30 (+1)	< 3,0	0,45x10 <sup>1</sup>
4	200 (0)	10 (-1)	< 3,0	0,09x10 <sup>1</sup>
5	200 (0)	20 (0)	< 3,0	1,82 x10 <sup>1</sup>
6	200 (0)	30 (+1)	< 3,0	0,36x10 <sup>1</sup>
7	300 (+1)	10 (-1)	< 3,0	0,45x10 <sup>1</sup>
8	300 (+1)	20 (0)	< 3,0	ND
9	300 (+1)	30 (+1)	< 3,0	0,54x10 <sup>1</sup>
10	200 (0)	20 (0)	< 3,0	0,27x10 <sup>1</sup>
11	200 (0)	20 (0)	< 3,0	0,27x10 <sup>1</sup>

C: concentração de hipoclorito de sódio (mg/L); t: tempo de imersão (min); X<sub>1</sub>: C; X<sub>2</sub>: t; NMP: número mais provável; UFC: unidade formadora de colônia; ND: não detectado.

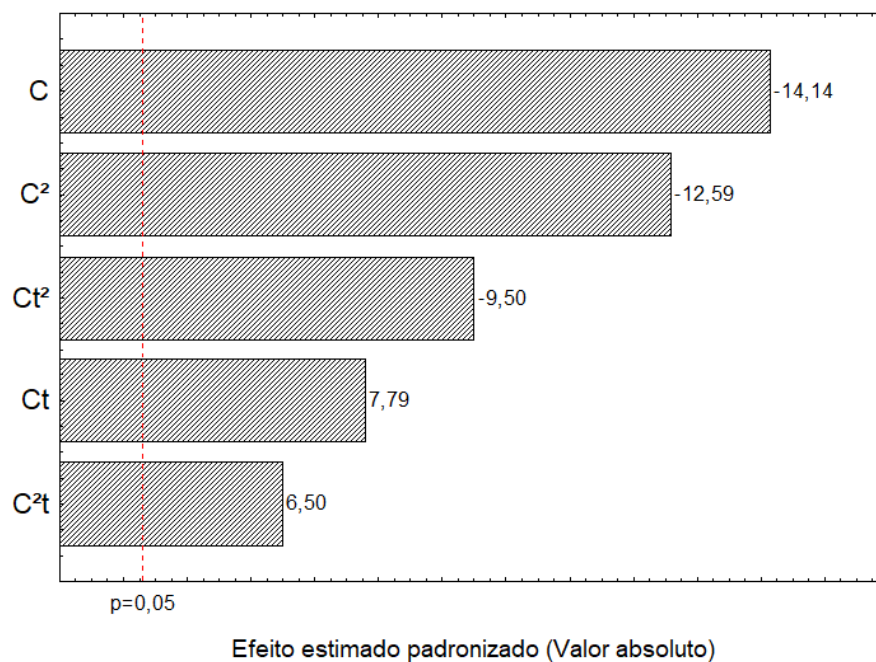
A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA estabelece o limite máximo para coliformes termotolerantes de  $5 \times 10^2$  NMP/g para produtos correlatos (BRASIL, 2001) e não preconiza um padrão para bolores e leveduras. Como todas as condições de sanitização garantiram contagens muito baixas para coliformes termotolerantes (< 3,0), a contagem de bolores e leveduras foi utilizada para a avaliação da eficiência do processo de sanitização das folhas. Os resultados da ANOVA aplicada a esta resposta são apresentados Tabela 2.3, considerado apenas os efeitos significativos ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.3.** Efeito estimado, erro puro, teste t e grau de significância estatística (p), para os fatores do modelo ajustado à contagem de bolores e leveduras.

Fator	Efeito estimado	Erro puro	t	P
Média	5,03	0,16	30,89	0,001
C	-6,06	0,43	-14,14	0,005
C <sup>2</sup>	-4,00	0,32	-12,59	0,006
Ct	4,09	0,53	7,79	0,016
Ct <sup>2</sup>	-4,32	0,45	-9,50	0,011
C <sup>2</sup> t	2,95	0,45	6,50	0,023

C: concentração de hipoclorito de sódio (mg/L); t: tempo de imersão (min); t: teste t; p: nível de probabilidade.

A concentração de hipoclorito (C) apresentou efeito negativo e desejável, pois o aumento de C promoveu a redução da contagem de bolores e leveduras (BL) nas folhas. O tempo de imersão (t), por sua vez, não apresentou efeito significativo quando avaliado individualmente; apenas quando presentes nas interações com C. A ordenação dos efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas, para o processo de sanitização das folhas de mandioca, pode ser melhor visualizado no gráfico de Pareto (Figura 2.2), onde pode ser comprovado que a concentração de hipoclorito de sódio (C e C<sup>2</sup>) foi a variável que apresentou o maior efeito isolado sobre a redução da contagem de bolores e leveduras.



**Figura 2.2.** Gráfico de Pareto para contagem de bolores e leveduras (UFC/g).

Na Tabela 2.4 são apresentados os resultados da ANOVA, para a regressão do modelo de segunda ordem, com os valores de F calculado e tabelado e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), para a resposta contagem de bolores e leveduras (BL); considerando apenas os efeitos significativos. Os resultados indicam que o ajuste do modelo à resposta foi significativo, a um nível de confiança de 95%. O valor do  $F_{\text{calculado}}$  superior ao valor do  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}} > 8$ ) ratifica que o modelo ajustado (Equação 2.3) é preditivo (BRUNS; SCARMÍNIO; BARROS NETO, 2001). O valor do  $R^2$ , por sua vez, indica que o modelo explica 98% da variação total dos dados observados para a variável contagem de bolores e leveduras. Adicionalmente, o valor de  $F_{\text{tabelado}}/F_{\text{calculado}}$  maior que cinco, para a falta de ajuste, asseguram a inexistência de falta de ajuste.

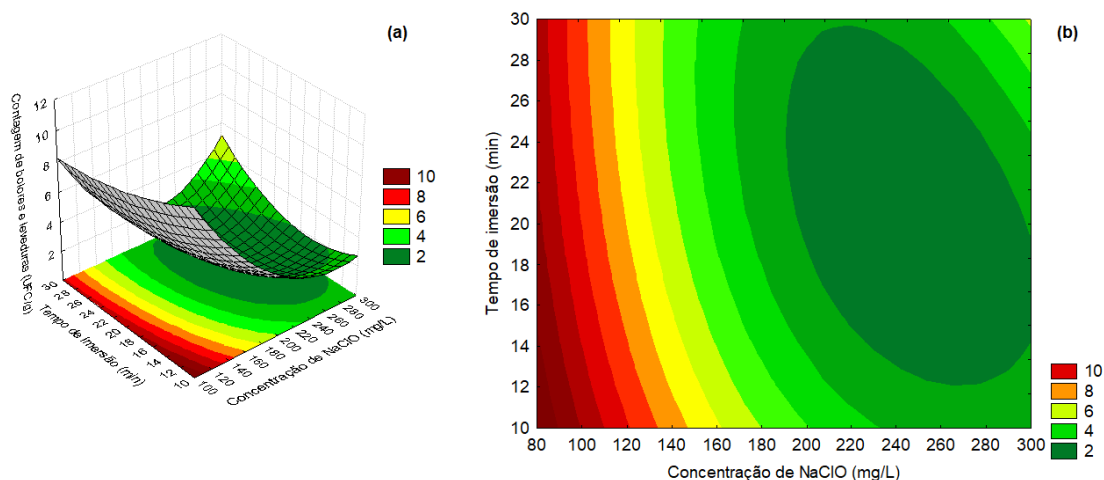
**Tabela 2.4.** Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo ajustado à resposta contagem de bolores e leveduras.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$	$R^2$
Regressão	151,97	5	30,39	44,67	5,05	0,98
Resíduos	3,40	5	0,68			
Falta de ajuste	2,85	3	0,95	3,45	19,16	
Erro Puro	0,55	2	0,28			
Total	155,37	10				

SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

$$BL = 23,42 - 0,112C + 1,92 \times 10^{-4}C^2 - 4,73 \times 10^{-3}Ct + 6,29 \times 10^{-5}Ct^2 + 8,73 \times 10^{-6}tC^2 \quad (2.3)$$

A superfície de resposta e as curvas de contorno geradas pela Equação 2.3, para a resposta contagem de BL, são apresentadas na Figura 2.3. A Figura 2.3a mostra que o aumento de C promoveu a redução em BL, cujos efeitos foram mais representativos para valores de C entre 200 e 300 mg/L e em t intermediária (20 min); condições nas quais a sanitização foi mais eficaz. A Figura 2.3b evidencia ainda que, para t superiores a 20 min foi possível obter os mesmos níveis de destruição para BL (2 UFC/g), utilizando menores C (entre 200 e 250 mg/L). Efeito semelhante foi observado para os tratamentos com maiores valores de C (entre 250 e 300 mg/L), os quais permitiram utilizar menores t (entre 14 e 20 min). Estes resultados são importantes, para efeitos práticos, pois possibilita a redução de custo para a sanitização das folhas da mandioca, devido à redução da demanda de hipoclorito de sódio ou ao emprego de menores tempos de processo.

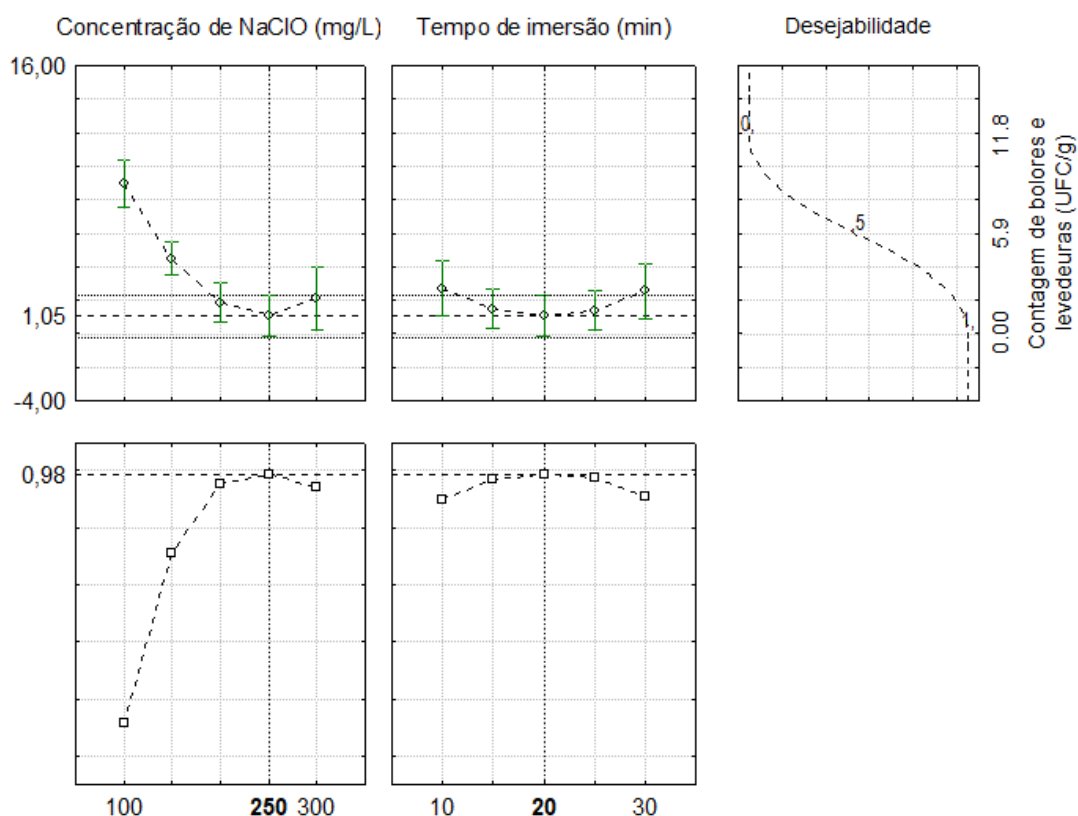


**Figura 2.3.** Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a contagem de bolores e leveduras.

A Figura 2.4 apresenta os gráficos com os perfis para a concentração de hipoclorito de sódio (C) e o tempo de imersão (t), bem como para a função de desejabilidade global, no domínio experimental do processo de sanitização das folhas da mandioca. Os valores atribuídos à função desejabilidade para a otimização do processo de sanitização foram: 0 para 11,82 UFC/g (indesejado),

0,5 para 5,91 UFC/g (moderadamente desejável) e 1 para 0,0 UFC/g (desejável); valores máximo, médio e mínimo, para a resposta contagem de BL.

A desejabilidade global varia de 0 a 1 e, quanto mais o valor se aproxima de 1, melhor é a otimização simultânea das variáveis estudadas (AKHNAZAROVA; KAFAROV, 1982). Assim o valor observado para a desejabilidade global, de 0,98, permite afirmar que os ótimos individuais para C e t, relativos a contagem de BL, estão próximos entre si, o que permite a seleção de uma condição experimental que atenda ambas variáveis. Assim, as condições ótimas definidas pela função desejabilidade, para o processo de sanitização das folhas da mandioca, são: uma concentração da solução aquosa de hipoclorito de 250 mg/L e um tempo de imersão das folhas na solução de 20 min. Nesta condição, a contagem de bolores e leveduras foi estimada em 1,05 UFC/g.



**Figura 2.4.** Gráfico da função desejabilidade para contagem de bolores e leveduras.



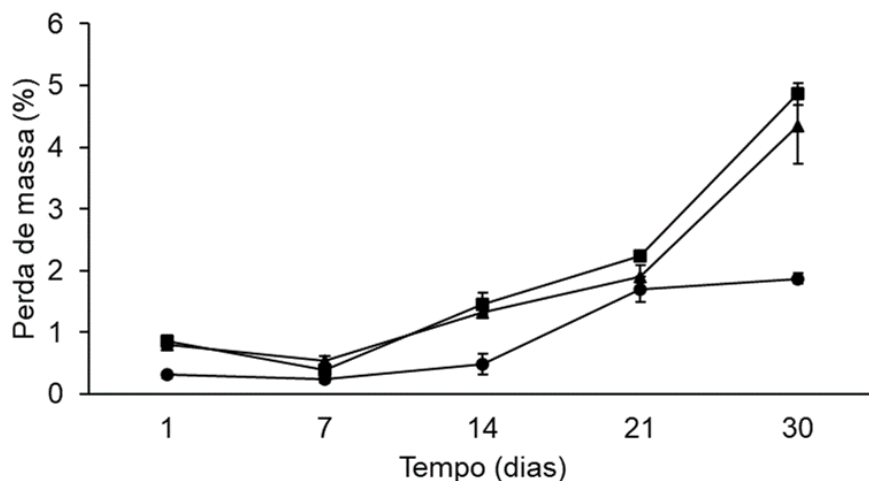
Berberi *et al.* (2001) avaliaram a eficiência do cloro, em três diferentes concentrações (70, 100 e 130 mg/L) e por um tempo de imersão de 15 min, sobre a sanitização da alface. Os produtos minimamente processados apresentaram uma contagem de bolores e leveduras de  $5 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^3$  e  $3 \times 10^3$  UFC/g, respectivamente; após 9 dias de armazenamento a 2°C. Estes níveis de contaminação foram superiores aos observado para as folhas da mandioca, no domínio experimental (Tabela 2.1).

### 3.2. ARMAZENAMENTO DAS FOLHAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

Após acondicionadas nas embalagens, as folhas de mandioca foram armazenadas em Incubadora BOD Refrigerada (Quimis, Q315M16, Brasil) a 7°C, durante 30 dias, quando foram realizadas as análises de perda de massa,  $a_w$ , pH, acidez total, SST, cor instrumental, clorofila *a* e *b*, compostos fenólicos totais, *Salmonella* spp/25g, coliformes a 45°C/g, contagem de bactérias psicotróficas e contagem de bolores e leveduras; cujos resultados serão apresentados e discutidos a seguir.

#### ***Perda de massa e atividade de água***

Os resultados da perda de massa das folhas de mandioca, nas diferentes embalagens, são apresentados na Figura 2.5. A perda de massa das folhas de mandioca aumentou com o tempo de armazenamento, mas esse aumento foi estatisticamente maior ( $p \leq 0,05$ ) para as folhas acondicionadas em embalagem de polietileno (PE), independente da aplicação de vácuo (PE-SV) ou da não aplicação de vácuo (PE-CV). O aumento observado foi mais representativo, a partir dos 21 dias de armazenamento, quando a perda de massa das amostras PE-SV e PE-CV continuou aumentando, enquanto os valores observados para as folhas acondicionadas em embalagem de poliamida (PA) com vácuo (PA-CV) permaneceram estatisticamente inalterados ( $p > 0,05$ ). Em 30 dias de armazenamento a perda de massa das folhas acondicionadas em embalagem de PE (PE-SV e PE-CV) atingiu um valor de aproximadamente 4,5%, enquanto para as folhas acondicionadas em embalagem de PE a perda de massa permaneceu inferior a 2%.



**Figura 2.5.** Perda de massa (%) das folhas de mandioca minimamente processadas, armazenadas a 7°C; nas diferentes condições de embalagem. (■) Polietileno sem vácuo, (▲) Polietileno com vácuo e (●) Poliamida com vácuo.

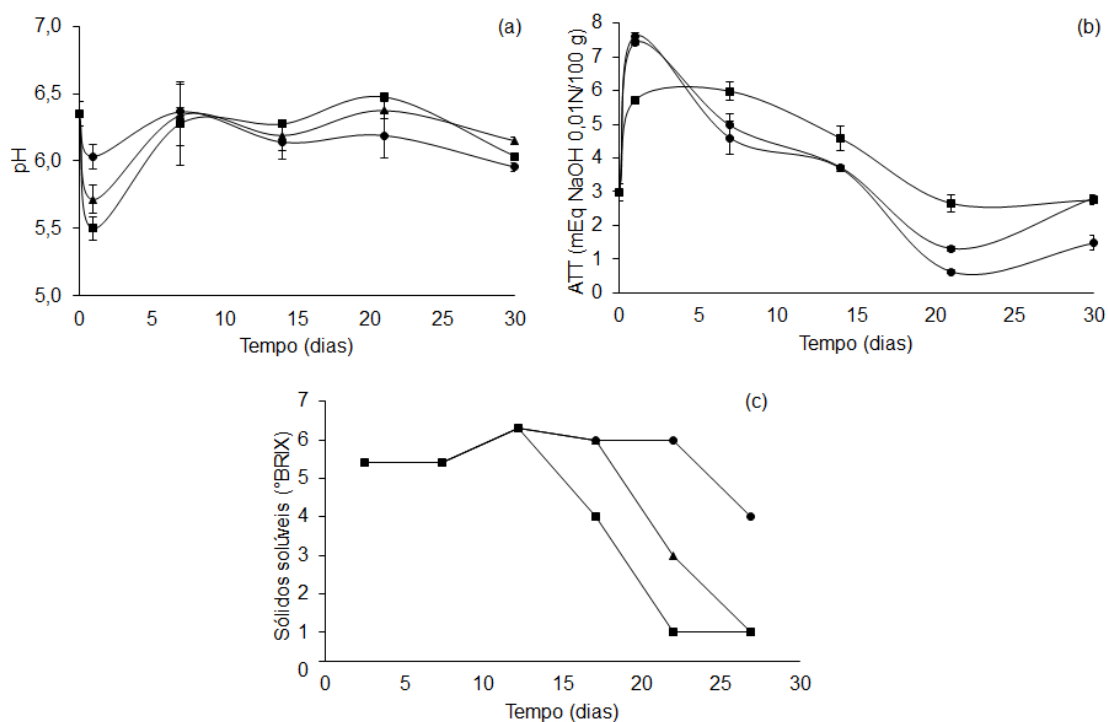
De acordo com Saltveit (2003), as lesões físicas causadas em vegetais frescos triturados, promovem uma resposta física e fisiológica imediata no tecido vegetal, promovendo o acúmulo de água na superfície e a exposição do tecido a propagação de contaminantes (alterações físicas) e posteriores mudanças, como a difusão de gases e a alteração na aparência da superfície (alterações fisiológicas). O acúmulo de água na superfície favorece a perda da água e, conseqüentemente a perda de massa do vegetal. Em síntese, os resultados indicam que se a variável de controle for a perda de massa, as folhas de mandioca trituradas podem ser acondicionadas em embalagem de PE sem vácuo, por até 21 dias, se armazenadas a 7°C. Porém, se for desejado um tempo de armazenamento a 7°C, de até 30 dias, é recomendado que as folhas sejam acondicionadas em embalagem de PA, sob vácuo, para um controle mais efetivo da variável.

As atividades de água ( $a_w$ ) dos produtos minimamente processados não apresentaram valores discrepantes (dados não apresentados) entre os tipos de embalagem empregadas (polietileno e poliamida), as condições de armazenamento (com e sem vácuo) e entre os dias de armazenamento. Valores de  $a_w$  próximo a 0,99 são condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos nas folhas da mandioca, caso a mesma não seja

higienizada, sanitizadas, acondicionada e armazenada em condições apropriadas.

### ***pH, Acidez total e Sólidos solúveis***

Na Figura 2.6 são apresentados os comportamentos do pH, da acidez total titulável (ATT) e dos sólidos solúveis (SS), nas folhas de mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento a 7°C. Foi observada uma redução do pH das folhas, no primeiro dia de armazenamento, a qual foi mais significativa para PE-SV, seguida de PE-CV e PA-CV. No sétimo dia, o pH das folhas aumentou para valores estatisticamente iguais aos iniciais, e permaneceu praticamente inalterado até o final do armazenamento. Rinaldi *et al.* (2005) avaliaram o armazenamento do repolho minimamente processado, a 5 e 10°C, e observaram o aumento do pH do vegetal, durante o armazenamento. O aumento observado no pH é atribuído à necessidade de neutralizar a acidificação do meio provocada pelo dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), produto da reação de respiração pós-colheita (KADER, 1986, MORENO *et al.*, 2016). Assim, a pequena variação do pH pode ser atribuída as baixas taxa de respiração das folhas de mandioca, na temperatura de armazenamento (7°C).



**Figura 2.6.** Valores de pH (a), acidez total titulável (ATT) (b) e sólidos solúveis (SS) (c), para as folhas de mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento a 7°C. (■) Polietileno sem vácuo, (▲) Polietileno com vácuo e (●) Poliamida com vácuo.

A ATT sofreu um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) no primeiro dia de armazenamento, para todas as condições de embalagem e, em seguida, ocorreu um decréscimo até o valor inicial, para PE-SV, e para valores inferiores aos iniciais, para PE-CV e PA-CV; no 21º dia de armazenamento. O aumento abrupto da ATT, nas primeiras 24 horas de armazenamento, pode ser atribuído ao consumo elevado de oxigênio ( $O_2$ ), devido ao processo de respiração do vegetal, que acumula  $CO_2$  e água. O  $CO_2$  formado pode dissolver na água para formar o ácido carbônico ( $H_2CO_3$ ), um ácido fraco, que tende a ionizar, para formar íons hidrogênio, bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) e carbonato ( $CO_3^{2-}$ ), promovendo a diminuição do pH (Figura 2.6a) e o aumentando da acidez (Figura 2.6b) (NEWTON, 2007).

A redução da ATT ocorrida a partir do primeiro dia de armazenamento para as folhas embaladas sob vácuo (PE-CV e PA-CV) e do sétimo dia para as folhas embalada em atmosfera padrão (PE-SV), pode ser atribuída ao consumo de ácidos orgânicos, como substrato por microrganismos, devido a limitação do processo de respiração das folhas e ao decréscimo das reservas energéticas;

uma vez que os tecidos vegetais não atuarem como sítios de armazenamento de carbono (ROURA *et al.*, 2000; RINALDI *et al.*, 2005). A menor concentração de O<sub>2</sub> e, conseqüentemente, a maior limitação ao processo de respiração, para as folhas embaladas a vácuo (PE-CV e PA-CV), fez com que nestas amostras a redução da ATT tenha ocorrido em um menor tempo e com maior intensidade. Quando são utilizadas embalagens de materiais com baixa permeabilidade ao O<sub>2</sub>, como a poliamina, o efeito mencionado é mais significativo (NGADI *et al.*, 2012), o que foi observado para as folhas embaladas em PA-CV (Figura 2.6b).

Até o sétimo dia de armazenamento ocorreu um aumento de 0,5 °Brix, no teor sólidos solúveis totais (SST), para as folhas de mandioca, em todas as condições de embalagem (Figura 2.6c). Este comportamento pode ser atribuído a traços de açúcares oriundos da degradação da parede celular ou a açúcares solúveis derivados da degradação de carboidratos de armazenamento do vegetal (MANESS; PERKINS-VEAZIE, 2003). A partir do sétimo dia ocorreu uma abrupta diminuição nos SST, das folhas embaladas em atmosfera padrão (PE-SV), de 6 °Brix para 1 °Brix; no 21º dia. Para as folhas embaladas a vácuo, os SST diminuíram a partir do 14º dia para PE-CV e apenas a partir do 21º dia para PA-CV; atingindo 1 °Brix e 4 °Brix, respectivamente, no 30º dia. Assim, a utilização de embalagem de poliamida sob vácuo para o acondicionamento das folhas da mandioca trituradas, foi a condição que se mostrou mais eficiente no controle dos SST, para o armazenamento a 7°C.

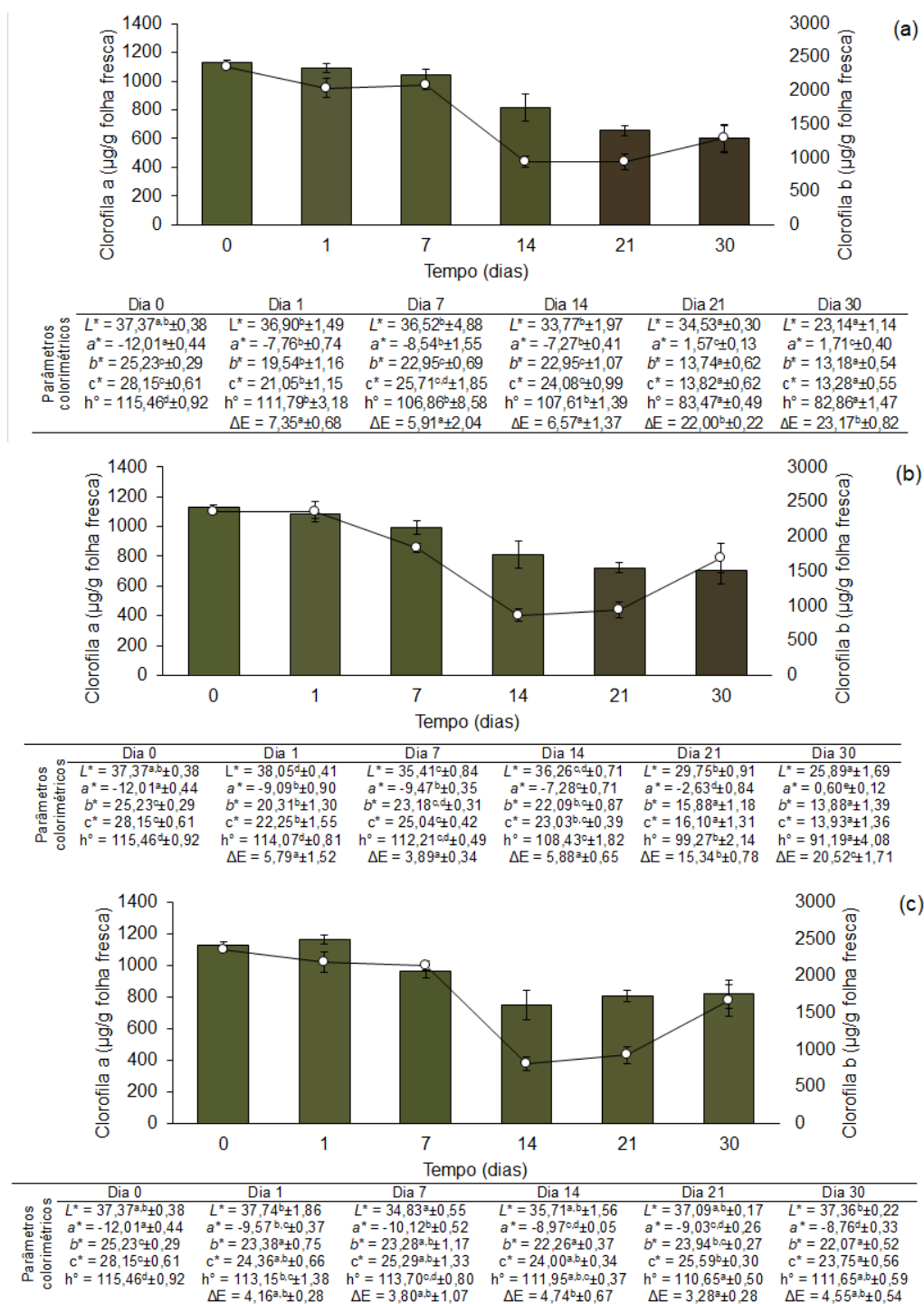
Com o passar do tempo de armazenamento, as taxas de respiração do vegetal são minimizadas, promovendo a mudança da rota aeróbica para a rota anaeróbica, para suprir a demanda energética. Nos vegetais ocorre majoritariamente a fermentação alcoólica, a qual é precedida da fermentação láctica, que promove o acúmulo de ácido láctico e induz a acidificação do citosol, um sinal para ativação da fermentação alcoólica, devido as condições de hipoxia criadas no ambiente, ou mesmo pela possível presença de bactérias lácticas (PORTE; MAIA, 2001; DAMODARAN *et al.*, 2010; NELSON; COX, 2011). Na rota anaeróbica ocorrerá a mudança do ciclo de Krebs para a via glicolítica, na qual o ácido pirúvico é descarboxilado para formar acetaldeído e, conseqüentemente, CO<sub>2</sub> e etanol (KADER, 1986). A produção de ácido láctico,

etanol, entre outros intermediários, promovem alterações no pH, ATT e SST, durante o armazenamento.

As alterações observadas durante o armazenamento podem também ser atribuídas ao aumento da concentração de CO<sub>2</sub> dentro das embalagens. Temperaturas entre 6°C e 10°C, na presença do CO<sub>2</sub>, podem induzir alterações microbiológicas, como o desenvolvimento de microrganismos mesófilos, quando comparados com condições atmosféricas padrão (VAROQUAUX; WILEY, 1997). Pode ainda ocorrer o desenvolvimento de microrganismos da flora ácido-láctica, promovendo a redução da ATT (Figura 2.6b) e dos SST (Figura 2.6c) (HINTLIAN; HOTCHKISS, 1986), ou o desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos, como as *Pseudomonas* spp, que são os maiores deterioradores de hortaliças (BRACKETT, 1997).

### **Cor instrumental, clorofila a e clorofila b**

Na Figura 7 são apresentados os comportamentos dos parâmetros de cor instrumental, bem como da clorofila *a* e de clorofila *b*, nas folhas da mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento a 7°C. Os valores dos parâmetros de cor indicam a presença das cores verde (-a\*) e amarelo (+b\*) escuro (L\* < 40), nas folhas da mandioca. A perda das colorações verde e amarela, e o escurecimento das folhas embaladas em PE-SV e PE-CV foram mais significativos a partir do 14º dia de armazenamento. Estes resultados indicaram que o uso do vácuo não foi favorável na retenção da cor, quando embalagens de polietileno foram usadas.



Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si na mesma linha, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

**Figura 2.7.** Parâmetros de cor instrumental e perfil da clorofila a (barras) e da clorofila b (linha), para as folhas de mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento a 7°C. (a) PE-SV, (b) PE-CV e (c) PA-CV.

Para as folhas embaladas em PA-CV, por sua vez, as cores verde e amarelo, bem como a luminosidade, foram mantidas durante os 30 dias de

armazenamento. Este comportamento é atribuído a maior eficiência da embalagem de poliamida na manutenção do vácuo (TYUFTIN; KERRY, 2020). Os resultados são ratificados pelo comportamento observado para o Chroma ( $c^*$ ), o ângulo Hue ( $h^\circ$ ) e a variação total de cor ( $\Delta E$ ).

O escurecimento das folhas pode ser atribuído às injúrias sofridas durante o longo período de armazenamento à frio. Tomás-Barberán *et al.* (1997) e Mai e Glomb (2013) observaram que o ácido clorogênico foi um dos compostos fenólicos responsáveis pelo escurecimento das folhas de alface, e Thakur *et al.* (1974) identificaram este ácido como um dos principais compostos fenólicos presentes nas folhas de mandioca.

Em relação ao comportamento da clorofila durante o armazenamento das folhas de mandioca minimamente processadas, foi observado um mesmo padrão de degradação para a clorofila *a* e para a clorofila *b*; cuja redução foi mais significativa a partir de sétimo dia de armazenamento. O início da degradação da clorofila pode ser atribuído à remoção do grupo fitol e a formação de clorofilídeo, por ação da clorofilase. A reação é favorecida pela liberação da enzima presente no cloroplasto, durante o processo de trituração da folha (STREIT *et al.*, 2005). O aumento da concentração das clorofilas *a* e *b*, observado a partir do 21º dia de armazenamento, pode ser atribuído ao aumento da perda da massa das folhas (Figura 5), o qual promoveu a concentração dos pigmentos.

### **Compostos fenólicos totais**

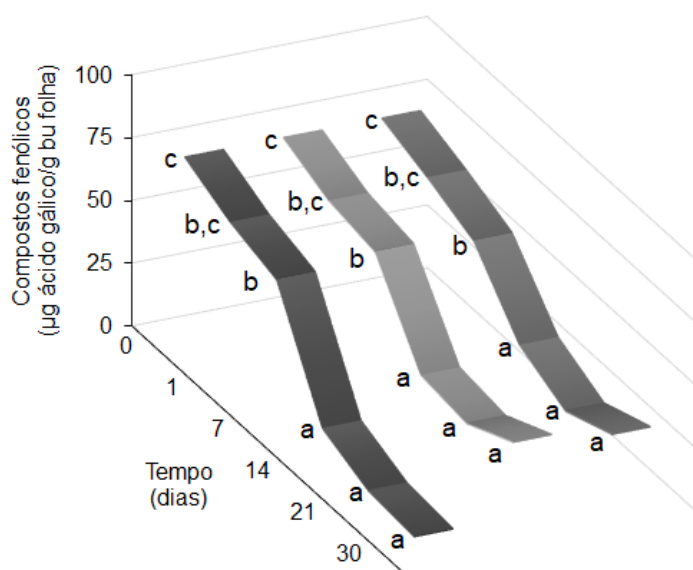
A Figura 8 apresenta o comportamento dos teores de compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g de folha fresca), nas folhas de mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento. A concentração inicial de compostos fenólicos nas folhas foi próxima aos valores observados por Suresh *et al.* (2011), em extratos obtidos com metanol (64mg/g), metanol acidificado (136 mg/g) e acetona (164 mg/g), dos caules de folhas de mandioca.

Foi observada a degradação dos compostos fenólicos das folhas, durante todo o armazenamento, a qual foi mais significativa a partir do sétimo dia de armazenamento, independente da embalagem e da atmosfera utilizadas. Após os 30 dias de armazenamento, os níveis máximos de degradação



observados foram de 93%, 49% e 62%, para as folhas embaladas em PE-SV, PE-CV e PA-CV. Os resultados mostram que as embalagens a vácuo foram bem mais eficientes na retenção dos compostos fenólicos das folhas, e que o acondicionamento em PE-CV foi mais eficiente que em PA-CV. Este comportamento pode ser atribuído ao fato de as folhas acondicionadas em embalagem de polietileno terem apresentado uma perda de massa duas vezes superior às folhas acondicionadas em embalagem de poliamida (Figura 5), o que promoveu a maior concentração dos compostos na primeira.

Vallejo *et al.* (2003) estudaram o armazenamento brócolis recém-colhidos por 7 dias à 1°C para simular o tempo máximo gasto no transporte e distribuição e do produto e por mais 3 dias à 15°C com o intuito de simular o tempo gasto no mercado de varejo. Posteriormente, Vallejo *et al.* (2003) verificaram que após 10 dias ocorreram perdas consideráveis de compostos fenólicos foram perdidos, em torno de 44-51, 59-62 e 73-74% em base úmida para derivados do ácido sinápico, flavonóides totais e derivados do ácido cafeoil-quínico.



**Figura 2.8.** Teor de compostos fenólicos nas folhas de mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento a 7°C. Valores com letras iguais, na mesma faixa, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

### **Análises microbiológicas**

Após o processo de sanitização, as folhas de mandioca foram submetidas às análises de *Salmonella* spp., bolores e leveduras, coliformes a 45°C e bactérias psicrotróficas. Como os resultados não revelaram a presença de *Salmonella*, em 25 g de folha fresca, esta análise não foi realizada durante o armazenamento das folhas. Os demais microrganismos, por sua vez, foram analisados durante os 30 dias de armazenamento, e os resultados são apresentados na Tabela 2.5.

De maneira geral, com a evolução do tempo de armazenamento, foi observado um aumento na contagem dos microrganismos avaliados, nas folhas de mandioca minimamente processadas; independente da condição de embalagem. Porém, um maior aumento foi observado para as folhas embaladas em polietileno, sendo as maiores contagens observadas para a embalagem sem vácuo (PE-SV). Um melhor controle microbiológico foi observado para as folhas embaladas em PA-CV.

**Tabela 2.5.** Contagem de bolores e leveduras, coliformes a 45°C e bactérias psicrotróficas, nas folhas de mandioca minimamente processadas, durante o armazenamento a 7°C.

Tempo (dias)	Bolores e leveduras (UFC/g)			Coliformes a 45°C (NMP/g)			Bactérias psicrotróficas (UFC/g)		
	PE-SV	PE-CV	PA-CV	PE-SV	PE-CV	PA-CV	PE-SV	PE-CV	PA-CV
0	6,82x10 <sup>2</sup>	6,82x10 <sup>2</sup>	6,82x10 <sup>2</sup>	<3,0	<3,0	<3,0	6,82x10 <sup>2</sup>	6,82x10 <sup>2</sup>	6,82x10 <sup>2</sup>
1	7,73x10 <sup>4</sup>	4,86x10 <sup>4</sup>	1,91x10 <sup>3</sup>	<3,0	<3,0	<3,0	7,73x10 <sup>4</sup>	4,86x10 <sup>4</sup>	1,91x10 <sup>3</sup>
7	1,58x10 <sup>6</sup>	8,18x10 <sup>5</sup>	2,52x10 <sup>4</sup>	3,6	3,6	3,6	1,58x10 <sup>6</sup>	8,18x10 <sup>5</sup>	2,52x10 <sup>4</sup>
14	1,20x10 <sup>7</sup>	7,32x10 <sup>6</sup>	2,73x10 <sup>5</sup>	<3,0	<3,0	<3,0	1,20x10 <sup>7</sup>	7,32x10 <sup>6</sup>	2,73x10 <sup>5</sup>
21	3,14x10 <sup>8</sup>	1,10x10 <sup>8</sup>	1,03x10 <sup>7</sup>	<3,0	<3,0	<3,0	3,14x10 <sup>8</sup>	1,10x10 <sup>8</sup>	1,03x10 <sup>7</sup>
30	4,00x10 <sup>8</sup>	1,82x10 <sup>8</sup>	9,55x10 <sup>7</sup>	9,2	<3,0	<3,0	4,00x10 <sup>8</sup>	1,82x10 <sup>8</sup>	9,55x10 <sup>7</sup>

PE-SV: Polietileno sem vácuo, PE-CV: polietileno com vácuo, PA-CV: poliamida com vácuo.

Schuh *et al.* (2020) avaliaram produtos à base de hortaliças minimamente processadas (broto, repolho, couve, alface, saladas tropicais e italianas), comercializados em três diferentes supermercados no município de Concórdia, em Santa Catarina, as quais apresentaram valores de coliformes termotolerantes inferiores a 3,0 NMP/g. Santos *et al.* (2019), por sua vez,

analisaram salada de hortaliças minimamente processadas, a qual apresentou uma contagem de coliformes a 45°C também menor que 3,0 NMP/g.

Durante os 30 dias de armazenamento, não foi observado um aumento da contagem de coliformes a 45°C nas folhas de mandioca minimamente processadas, exceto no 30º dia, para PE-SV. Porém os valores observados não excederam ao limite estabelecido pela legislação brasileira (10<sup>2</sup> NMP/g) (BRASIL, 2001). Estes resultados confirmam a eficiência da condição de sanitização utilizada, no processamento mínimo das folhas de mandioca; bem como da temperatura de armazenamento.

A contaminação inicial de bolores e leveduras nas folhas da mandioca minimamente processada foi de 6x10<sup>2</sup> UFC/g, valor inferior ao encontrado por Berbari *et al.* (2001), em folhas de alface minimamente processadas, cuja contagem foi de 2x10<sup>3</sup> UFC/g. Após 9 dias de armazenamento a 2°C, os autores observaram uma contagem de 3x10<sup>3</sup> UFC/g, para bolores e leveduras, folhas de alface minimamente processadas.

Em relação as bactérias psicrotróficas, a contagem atingiu valores da ordem de grandeza de 10<sup>8</sup> UFC/g folha fresca, aos 30 dias de armazenamento. As maiores contagens (>10<sup>6</sup> UFC/g) foram observadas a partir do sétimo dia para PE-SV, 14º dia para PE-CV e 21º dia para PA-CV. Porém, a legislação brasileira não define as bactérias psicrotróficas como possíveis contaminantes para vegetais minimamente processados. Hébraud e Potier (1999) ressaltam que a avaliação da presença de bactérias psicrotróficas em alimentos refrigerados é relevante, uma vez que a presença destes microrganismos é causa cotidiana de deterioração e intoxicação alimentar. Park *et al.* (2022) reportaram a contaminação de leite, sorvete, produtos lácteos, salada de arroz, temperos e vegetais como alface por bactérias psicrotróficas, por meio do *Bacillus cereus* psicrotolerante, o qual pode se tornar um perigo potencial de intoxicação alimentar devido às suas características toxigênicas.

De acordo com Francis *et al.* (1999), a temperatura é a variável de maior influência no crescimento de microrganismos, em vegetais minimamente processados. Estes autores observaram que as bactérias psicrotróficas *Aeromonas hydrophila* cresceram em produtos minimamente processados, armazenados sob refrigeração (2°C-5°C).

Santos *et al.* (2019) encontraram contagem de bactérias psicotróficas maior que  $3 \times 10^2$  UFC/g, em salada de hortaliças comerciais. Fantuzzi *et al.* (2004) observaram contagem de  $10^4$  UFC/g, para bactérias psicotróficas, em repolho minimamente processado, sanitizado com hipoclorito de sódio a 200 mg/L, por 10 min. Jacxsens *et al.* (2002) constataram a presença de bactérias psicotróficas em vegetais frescos cortados, acondicionados sob atmosfera modificada e armazenados sob refrigeração ( $7^\circ\text{C}$ ). Garg *et al.* (1990) e Fan e Song (2008) encontraram contagens entre  $10^3$  e  $10^5$  UFC/g, para bactérias psicotróficas, em produtos como alface, salada de repolho e couve-flor. Em um estudo com alface americana picada em tiras, Barriga *et al.* (1991) observaram um aumento de bactérias psicotróficas de  $10^4$  para  $10^7$  UFC/g, durante o armazenamento em atmosfera modificada, por 12 dias.

Estudos adicionais são necessários, visando estabelecer valores de referência, para bactérias psicotróficas e para bolores e leveduras, pois estes microrganismos podem ser indicadores do bom estado de conservação de um alimento. A avaliação das bactérias psicotróficas em vegetais minimamente processados é de grande importância, pois em temperaturas de refrigeração ideais para produtos vegetais ( $0^\circ\text{C}$  a  $7^\circ\text{C}$ ), pode ocorrer grande desenvolvimento desses microrganismos.

#### 4. CONCLUSÃO

Pela primeira vez foi estudado um processamento mínimo para as folhas da mandioqueira trituradas. A condição ótima definida para a sanitização das folhas da mandioqueira foi a imersão das folhas por 20 min, em uma solução aquosa com 250 mg/L de hipoclorito de sódio. Durante o armazenamento a 7°C, por sua vez, ocorreu o aumento da perda de massa das folhas, o qual foi mais expressivo para as folhas acondicionadas em embalagem de polietileno, em atmosfera padrão (PE-SV) e sob vácuo (PE-CV). A avaliação da cor instrumental indicou que o uso do vácuo não foi promissor na manutenção da cor das folhas, quando embalagens de PE foram utilizadas. Os compostos fenólicos sofreram degradação durante todo o armazenamento, a qual foi mais representativa a partir do sétimo dia, indiferentemente da embalagem e da atmosfera utilizadas. Em geral, houve um melhor controle microbiológico para as amostras acondicionadas em embalagem de poliamida sob vácuo (PA-CV). O estudo mostrou que as folhas da mandioqueira trituradas, se armazenadas a 7°C, estarão adequadas para o consumo por apenas 24 horas, se acondicionadas em embalagem de PE-SV; por até 7 dias quando embalagem de PE-CV forem utilizadas; e por até 14 dias se acondicionadas em embalagem de PA-CV. Embora esta embalagem tenha sido a mais eficiente, a embalagem de PE-CV se apresentaram como uma boa alternativa para a conservação das folhas da mandioqueira minimamente processadas; por representar um menor.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, E. B.; VALLE, T. L.; LORENZI, J. O.; KANTHACK, R. A. D.; MIRANDA FILHO, H.; GRANJA, N. P. Efeito da densidade populacional e época de colheita na produção de raízes de mandioca de mesa. **Revista Bragantia**. v. 70, n. 3, p. 561-569, 2011.

AKHNAZAROVA, S.; KAFAROV, V. Experiment optimization in chemistry and chemical engineering. Moscow: **Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition**; p. 312, 1982.

ALI, A.; YEOH, W. K.; FORNEY, C.; SIDDIQUI, M. W. Advances in postharvest technologies to extend the storage life of minimally processed fruits and vegetables. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 15, p. 2632-2649, 2018.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Gaithersburg, Md: AOAC International; 1997.

BARRIGA, M. I.; TRACHY, G.; WILLEMOT, C.; SIMARD, R. E. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 1586-1588, 1991.

BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 197-201, 2001.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, E. O.; SILVA, B. C.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. C.; VISENTAINER, J. V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 48, p. 1-9, 2014.

BRACKETT, R. E. Microbiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, v. 10, n. 3, p. 195-206, 1987.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa**. Resolução RDC12/01, de 2 de janeiro de 2001. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 janeiro de 2001.

BRUNS, R. E.; SCARMÍNIO, I. S.; BARROS NETO, B. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp; 2001. 401 p.

CÂMARA, F. S.; MADRUGA, M. S. Cyanic acid, phytic acid, total tannin and aflatoxin contents of a Brazilian multimistura preparation. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 33-36, ., 2001.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. **Estudo do processo de fabricação da farinha de mandioca** - Documentos 267. Belém: Embrapa Amazônia Oriental; p. 75, 2006.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas (Capítulo 5). In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Editora Artmed: Porto Alegre, p.179-262, 2010.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

FAN, L.; SONG, J. Microbial quality assessment methods for fresh-cut fruits and vegetables. **Stewart Postharvest Review – An International Journal for Reviews in Postharvest Biology and Technology**, v. 3, n. 10, p. 1-9, 2008.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M. C. D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 207-211, 2004.

FRANCIS, G. A.; THOMAS, C.; O'BEIRNE, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, p. 1-22, 1999.

GARG, N.; CHUREY, J. J.; SPLITTSTOESSER, D. F. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 80, p. 701-703, 1990.

HÉBRAUD, M.; POTIER, P. Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 211-219, 1999.

HINTLIAN, C. B.; HOTCHKISS, J. H. The safety of modified atmosphere packaging: a review. **Food Technology**, v. 40, n. 12, p. 70-76, 1986.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro.** Jan. 2019. Disponível em:

<[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag\\_2019\\_jan.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2019_jan.pdf)>  
>Acesso em 01 julho. 2020.

JACXSENS, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Temperature dependence of shelf-life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, n. 1, p. 59-73, 2002.

KADER, A. A. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 40, n. 5, p. 99-104, 1986.

KHANAM UKS, O. B. A. S.; YANASE, E.; MURAKAMI, Y. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 979-987, 2012.

LATIF, S.; MULLER, J. Potential of cassava leaves in human nutrition: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, n. 2, p. 147-158, 2015.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4.3.1-F4.3.8, 2001.

MAI, F.; GLOMB, M. A. Isolation of phenolic compounds from iceberg lettuce and impact on enzymatic browning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2868-2874, 2013.

MANESS, N.; PERKINS-VEAZIE, P. **Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. Soluble and storage carbohydrates; p. 361-382, 2003.

MODESTO JUNIOR, E. M.; CHISTÉ, R. C.; PENA, R. S. Oven drying and hot water cooking processes decrease HCN contents of cassava leaves. **Food Research International**, v. 119, p. 517-523, 2019.

MORENO, L. B.; SCHERWINSKI, R.; SILVA, J. M. T.; SCALON, S. P. Q.; CARNEVALLI, T. O. Conservação de repolho minimamente processado sob efeito de diferentes embalagens, tempo de estocagem e temperatura. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 2, p. 68-74, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed; p. 1273, 2011.

NEWTON, D. E. **Food chemistry**. New York: Facts On File. An Imprint of Infobase Publishing. Chapter 2, Food additives; p. 17-48, ISBN: 9780203910092, 2007.

NGADI, M. O.; LATHEEF, M. B.; KASSAMA, L. **Green Technologies in Food Production and Processing**. New York/Dordrecht/Heidelberg/London: Springer. Part IV, Emerging technologies for microbial control in food processing; p. 363-412, 2012.

PARK, K. M.; KIM, H. J.; PARK, K. J.; KOO, M. Toxigenic Potential of Mesophilic and Psychrotolerant *Bacillus cereus* Isolates from Chilled Tofu. **Foods**, v.11, n. 12, p.1674—1687, 2022.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 36-60, 2013.

PORTE, A.; MAIA, L. H. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 105-118, 2001.

RINALDI, M. M.; BENEDETTI, B. C.; CALORE, L. Efeito da embalagem e temperatura de armazenamento em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 480-486, 2005.



ROURA, S. I.; DAVIDOVICH, L. A.; DEL VALLE, C. E. Quality loss in minimally processed swiss chard related to amount of damaged area. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technology**, v. 33, n. 1, p. 53-59, 2000.

SALTVEIT, M. E. Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; **Fresh-cut vegetables**; p. 691-712, ISBN: 9780824706876, 2003.

SANTOS, R. B.; SILVA, J. M.; SILVA, C. S.; NASCIMENTO, M. S.; SANTOS, T. M. C.; COSTA, J. H. Q. Qualidade microbiológica de alimentos *in natura* minimamente processados. **Global Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 43-52, 2019.

SCHUH, V.; SCHUH, J.; FRONZA, N.; FORALOSSO, F. B.; VERRUCK, S.; VARGAS JUNIOR, A.; SILVEIRA, S. M. Evaluation of the microbiological quality of minimally processed vegetables. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. :290-295, 2020.

SILVA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Blucher; p. 535, 2017.

SIMÕES, N. A.; COELHO, D. G.; FONSECA, K. S.; BARROS JÚNIOR, A. P.; FERREIRA-SILVA, S. L.; FREIRE, C. S.; SILVA, E. F. Effect of multilayer nylon packages on the oxidative damage of minimally processed yam. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 1-15, 2019.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, 748-755, 2005.

SURESH, R.; SARAVANAKUMAR, M.; SUGANYADEVI, P. Anthocyanins from indian cassava (*Manihot esculenta* crantz) and its antioxidant properties. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 7, p. 1819-1828, 2011.

THAKUR, M. L.; SOMAROO, B. H.; GRANT, W. F. The phenolic constituents from leaves of *Manihot esculenta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 52, p. 2381-2386, 1974.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I.; CASTANER, M.; ARTÉS, F.; SALTVEIT, M. E. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 583-589, 1997.

TYUFTIN, A. A.; KERRY, J. P. Review of surface treatment methods for polyamide films for potential application as smart packaging materials: surface structure, antimicrobial and spectral properties. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, p. 100475-100485, 2020.

VALLEJO, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. Healthpromoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 3029-3034, 2003.

VAROQUAUX, P.; WILEY, R. C. Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas. Zaragoza: Acribia S.A. **Cambios biológicos y bioquímicos en frutas y hortalizas refrigeradas mínimamente procesadas**; p. 221-62, ISBN: 978-8420008318, 1997.

VILARIN, S. P.; TEIXEIRA, T. M. R.; LIMA, C. M. G.; PAGNOSSA, J. P.; FIGUEIREDO, R. M.; MEDEIROS, U. B. C.; SANTANA, R. F. Effect of sanitization on minimally processed cabbage (*Brassica oleracea* L.). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 6, p. 1-9, 2020.

WANG, S.; HE, H.; YU, J.; CHEN, S.; LI, X.; BO, F.; GUO, Q.; XU, Z.; JIN, M. Cellulase-added cassava ethanol process boosts ethanol titer and reduces glycerol production. **Industrial Crops & Products**, v. 148, p. 112304-112313, 2020.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 6, n. 1, p. 11.1.1 - 11.1.8, 2002.

WILEY, C. R. Alteración microbiológicas y microorganismos patógenos de frutas y hortalizas refrigeradas mínimamente procesadas. Zaragoza: Acribia, S.A. **Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas**; p. 263-304, ISBN: 978-8420008318, 1997.

### CAPÍTULO III

---

## ESTUDO DO FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DAS FOLHAS DA MANDIOQUEIRA COM DIFERENTES SOLVENTES

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as características gerais das folhas de mandioca (*Manihot esculenta*), como um possível insumo para a obtenção de concentrado proteico, bem como quantificar as frações proteicas obtidas das folhas, com ênfase na prolamina, que apresenta propriedade anfifílica. A composição química das folhas foi determinada e no extrato obtido com os solventes acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v) foram determinadas as concentrações de compostos fenólicos totais (CFT) e flavanóis totais (FT). As proteínas das folhas foram fracionadas por um estudo preliminar de extração sequencial de Osborne, e o ponto isoelétrico (PI) das frações foi determinado, com base na solubilidade das proteínas, em diferentes pH. Em 100 gramas das folhas frescas de mandioca foram observados 71,60 g de umidade, 2,04 g de cinzas, 4,05 g de lipídeos, 15,45 g de carboidratos e 6,86 g de proteínas. As folhas liofilizadas apresentaram 356,4 mg equivalente ácido gálico/g, para CFT, e 5,4 mg equivalente catequina/g, para FT. Nas frações de proteínas extraídas das folhas foram observados 0,13 g de albuminas, 0,08 g de globulina, 0,89 g de glutelinas e 4,38 g de prolaminas; em 100 g da folha *in natura*. Os PI's das frações proteicas foram observados em valores de pH 4,0 para as albuminas, pH 7,0 para as globulinas, pH 3,0 para as glutelinas e pH 2 para as prolaminas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Manihot esculenta*, extração sequencial, Osborne.

## 1. INTRODUÇÃO

Projeções recentes das Nações Unidas (ONU) mostram um crescimento alarmante da população mundial, a qual poderá atingir 9,73 bilhões de pessoas em 2050. Havendo a necessidade crescente de aumentar essa produção agrícola mundial, na África Subsaariana e no Sul da Ásia necessitaria mais que dobrar até 2050 e o resto do mundo precisaria aumentar um terço do volume de produção atual (FAO, 2017).

De acordo com Segatto *et al.* (2022), em 2025 haverá uma demanda de 7 milhões de toneladas de insumos proteicos para consumo, a qual não será suprida pela pecuária devido a redução da ingestão de carne em 50 % nos próximos anos para alcançar metas de sustentabilidade, assim fontes de proteína vegetais são necessárias para auxiliar nessa adversidade.

O interesse por proteínas extraídas de folhas para a alimentação humana tem ganhado força com o passar dos anos, por se tratar de uma matéria prima abundante, devido a diversidade de espécies vegetais disponíveis na natureza (ORTEGA-FLORES *et al.*, 2003). As folhas da mandioca, por exemplo, possuem propriedades nutricionais importantes, como teores de proteínas entre 19,7 e 29,5% em base seca (bs) e de carboidratos entre 66,1 e 72,1% bs (MODESTO JUNIOR; CHISTÉ; PENA, 2019). O alto teor proteico observado na folha da mandioca chama a atenção para o desenvolvimento de estudos, que visem avaliar a sua aplicabilidade.

Esa matéria prima destaca-se por apresentar na composição compostos bioativos. Pesquisa realizada por Koubala *et al.* (2015) determinou o teor de compostos fenólicos totais nas folhas de cinco genótipos de mandioca, sendo observados valores entre 6,02 a 15,06 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de folha em base úmida (bu). Santos *et al.* (2016) avaliaram o perfil de compostos fenólicos na farinha das folhas de mandioca e encontraram o ácido gálico, a galocatequina, a catequina, o ácido clorogênico e a epigalocatequina; com destaque para a catequina (208 mg/100 g).

Neste contexto, uma avaliação deste macronutriente pode fornecer informações importantes, como: a quantidade de proteínas solúveis e a classificação das proteínas, por fracionamento. Há estudos preliminares que

permitem classificar as proteínas vegetais de acordo com a solubilidade (SHEWRY; HALFORD, 2002).

Diante o exposto, um melhor conhecimento científico sobre as folhas da mandioca (*Manihot esculenta*), como potencial para aplicações alimentícias, se faz necessário. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a composição química, propriedades físico-químicas, e avaliar pela primeira vez o fracionamento das proteínas solúveis das folhas da mandioca, com ênfase na prolamina, utilizando o procedimento de Osborne.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. COLETA DAS FOLHAS DE MADIOCA**

As folhas de mandioca utilizadas no estudo possuíam 8 meses de idade, estas foram coletadas no mês de junho de 2020, no município de Salvaterra (Pará, Brasil) (Latitude: 00° 45' 12" S, Longitude: 48° 31' 00" W, altitude de 5 m). As folhas foram transportadas à temperatura ambiente ( $\approx 28^{\circ}\text{C}$ ), em embalagens de polietileno de alta densidade, com dimensões de 30 cm x 16 cm (comprimento x largura) e espessura do filme de 0,10 mm, até o Laboratório de Fontes Amiláceas da Universidade Federal do Pará (Belém, Pará, Brasil). Em menos de 24 horas após a coleta, as folhas foram separadas dos talos, com auxílio de uma tesoura de poda. O acesso a espécie utilizada está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, sob o número A5D5AD2.

As folhas foram selecionadas, para utilização apenas das folhas íntegras, as quais foram inicialmente lavadas com água corrente, em seguida, foram higienizadas com detergente neutro por 10 min, seguido de enxague com água corrente, para a eliminação do detergente neutro residual. As folhas foram tratadas em uma solução aquosa a 250 mg/L de hipoclorito de sódio, por imersão durante 20 min, seguida de enxágue com água corrente, para a

retirada do hipoclorito em excesso. Após a eliminação do excesso de água da superfície, as folhas foram armazenadas em embalagem de poliamida à vácuo por 3 meses a  $-30^{\circ}\text{C}$  até o início do estudo.

## 2.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS

As folhas de mandioca foram caracterizadas, para a determinação das seguintes propriedades: umidade, segundo o método 920.151 da AOAC (1997); teor de cinzas, segundo método 930.05 da AOAC (1997); proteínas totais, pela metodologia de micro-Kjeldahl, baseado no método 920.87 da AOAC (1997), empregando o fator de conversão de nitrogênio em proteína de 5,75 (proteína vegetal); teor de lipídeos, pelo método 922.06 da AOAC (1997) e carboidratos totais, por diferença, segundo a Resolução RDC nº 360 (BRASIL, 2003).

## 2.3. QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVANÓIS TOTAIS NAS FOLHAS

As folhas de mandioca foram inicialmente liofilizadas, para a obtenção do extrato a ser utilizado na quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT) e dos flavanóis totais (FT). Para o processo de liofilização, as folhas foram trituradas e congeladas a  $-30^{\circ}\text{C}$ , dispersas em bandejas do liofilizador (modelo Advantage Plus EL 85). A bomba de vácuo (modelo 200 5SD Vac Pump) operou a uma pressão de 200 mTorr e o condensador a  $-50^{\circ}\text{C}$ . O material foi mantido no liofilizador por 72 horas. Para a obtenção do extrato foi utilizado como solvente extrator acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v), de acordo com o método descrito por Boeing *et al.* (2014).

Os CFT foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu (WATERHOUSE, 2002), sendo a quantificação feita com auxílio de uma curva analítica de ácido gálico, na faixa de concentração de 1,0 a 60,0 mg de ácido gálico/L (absorbância entre 0,0258 e 0,8474). O método se baseia na reatividade comum dos polifenóis quando submetidos a uma interação entre os ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico durante 30 min, a qual acontece por um mecanismo de reação engajado, devido a transferência de elétrons (mecanismo redox). Para tal, 250  $\mu\text{L}$  do extrato ou água destilada (para o

branco) foram misturados com 250  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu 10% e 1250  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 7,5%. A solução foi então submetida a leitura em espectrofotômetro UV-Visível (Modelo Cary 50, marca Varian, Austrália), a 765 nm.

Os flavanóis totais (FT) foram quantificados pelo método do *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA), que tem como princípio a condensação da molécula de flavanol com o DMACA, conforme o descrito por McMurrough, Baert (1994) e Delcour, Varebeke e Janssens (1985). Para tal, foram misturados 200  $\mu\text{L}$  do extrato com 1000  $\mu\text{L}$  de DMACA 1%, diluído em HCl: metanol resfriado, na proporção de 1:3 (v/v). A mistura reativa foi mantida no escuro por 10 min, antes de ser submetida à leitura em espectrofotômetro a 640 nm.

#### 2.4. FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS

O método de extração em sequência de Osborne (1924) foi usado para separar as frações de proteínas das folhas de mandioca, de acordo com a solubilidade, sendo: fração 1 – solúvel em água (albuminas), fração 2 – solúvel em soluções salinas (globulinas), fração 3 – solúvel em álcalis (glutelinas) e fração 4 – solúvel em álcool (prolaminas) (Makeri *et al.* (2017)).

As extrações foram realizadas de acordo com Makeri *et al.* (2017), com modificações. Para a primeira etapa de extração 40,18 g de folhas de mandioca *in natura* foram trituradas, com auxílio de 240 mL de água ultra pura, em um ultra turrax (modelo T25 digital, IKA, Alemanha) a 13.000 rpm/min. O material obtido foi transferido para um reator de vidro encamisado, que foi mantido sob agitação intermitente, a 25°C por 2 h. Após este tempo, o conjunto foi mantido em repouso por 30 min e, em seguida, o material foi centrifugado (Modelo SL-5GR, marca Spmlaba, São Paulo) a 3500 x *g* por 10 min. O sobrenadante (S1) foi armazenado a -25°C e o precipitado (P1) seguiu para a próxima etapa de extração.

Nas próximas etapas de extração foram utilizados, o mesmo volume de solvente e as mesmas condições para os procedimentos de extração, repouso e centrifugação, utilizados na primeira extração, sendo alterado apenas o solvente extrator. Na segunda etapa de extração, o precipitado P1 proveniente da primeira etapa foi submetido à extração com solução de NaCl (0,42M),



originando o sobrenadante S2 e o precipitado P2. Na terceira etapa, a extração do precipitado P2 foi realizada com solução de NaOH 0,1M (pH 9,0), dando origem ao sobrenadante S3 e ao precipitado P3. Na última etapa, o precipitado P3 foi submetido à extração com etanol a 70%, para a obter o sobrenadante S4 e o precipitado P4. As quantidades de proteína contidas nos sobrenadantes S1, S2, S3 e S4 foram determinadas pelo método de Bradford adaptado (ERNST; ZOR, 2010).

## 2.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS POR BRADFORD

Para a quantificação das proteínas pelo método de Bradford, inicialmente foi obtida uma curva analítica de sete pontos, com concentrações de 0 a 25 µg de albumina do soro bovino/mL. De acordo com Ernst e Zor (2010), a razão das leituras de absorvância nos comprimentos de onda de 590 nm e 450 nm segue um comportamento linear com a concentração de proteína, sendo possível a quantificação de valores muito pequenos, de até 50 ng de albumina sérica bovina. Assim, fez-se a obtenção da curva analítica de acordo com a sequência descrita: 200 µL da solução padrão foram misturados a 1000 µL do reagente de Bradford e deixados para reagir por 5 min, para o desenvolvimento da cor. A leitura da absorvância foi realizada nos comprimentos de onda de 590 nm e 450 nm. Como branco foi utilizada a água ultra pura.

## 2.6. PONTO ISOELÉTRICO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS

Os extratos obtidos no item 2.4 foram avaliados em diferentes pH's com intuito de definir o ponto isoelétrico de cada sobrenadante e avaliar a interação proteína solúvel e solvente, para isso utilizou-se o seguinte procedimento: a 0,5 mL de cada sobrenadante (S1, S2, S3 e S4) foram adicionados 4,5 mL de água ultra pura, em tubos de ensaio. O pH da solução foi ajustado para diferentes valores, entre 2 e 11, com o auxílio de soluções de NaOH 0,1N e HCl 0,1N. Os tubos contendo a solução foram agitados ocasionalmente por 2 horas e, em seguida, fez-se a quantificação da proteína solúvel, com auxílio da curva analítica.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MANDIOQUEIRA

As folhas de mandioca utilizadas foram caracterizadas, visando apresentar dados sobre a composição em macronutrientes da matéria prima, bem como conhecer o teor de proteínas totais. As folhas frescas da mandioca apresentaram, em média,  $71,60 \pm 2,11$  g/100 g de umidade,  $2,04 \pm 0,01$  g/100 g de cinzas,  $4,05 \pm 0,10$  g/100 g de lipídeos,  $15,45 \pm 0,43$  g/100 g de carboidratos totais, e  $6,86 \pm 0,39$  g/100 g de proteínas. Os resultados indicam que as proteínas são o segundo maior macronutriente nas folhas da mandioca, e representam 24,2 g/100 g da base seca (bs).

De acordo com Wobeto et al. (2004), as folhas da mandioca *in natura* apresentam de 69 a 72% de umidade dependendo do tipo de cultivar; valores estes semelhantes ao observado nas folhas utilizadas neste estudo. Santos et al. (2020) avaliaram a composição centesimal das folhas frescas de mandioca, provenientes da Bahia, e encontraram 1,39 a 2,47% de cinzas, 0,69 a 3,65% de lipídios, 47,2 a 68,1% de carboidratos e 8,23 a 11,6% de proteína. As folhas de mandioca estudadas apresentaram teores de cinzas e de lipídios da mesma ordem de grandeza, porém os resultados obtidos para proteínas e, principalmente para carboidratos, foram inferiores aos encontrados pelos autores, o que pode ser atribuído à umidade das folhas utilizadas no estudo, que foi duas vezes maior do que a umidade das folhas de mandioca analisadas.

Chaiareekitwat et al. (2022) avaliaram o teor proteico de folhas de mandioca, em função da cultivar, da idade da planta e da posição da folha, e observaram teores de proteína bruta entre 18,50 a 34,82% bs. Quando expresso em relação a matéria seca, o teor de proteína nas folhas de mandioca estudada (24,2 g/100 g bs) se apresentou dentro da faixa reportada pelos autores. Outros fatores que podem justificar os resultados divergentes observados para algumas propriedades são: variedade da planta, o tipo de solo, a umidade do ar, a radiação, a precipitação pluviométrica. O município de Salvaterra (PA), local onde foi feita a coleta das folhas estudadas, apresentar ecossistemas de floresta de terra firme e de várzea, e faixas de transição de savana com uma elevação de 5 m.

### 3.2. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVANÓIS TOTAIS NAS FOLHAS DE MANDIOCA

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) observado nas folhas de mandioqueira estudada foi de 356,43 mg  $\pm$  24,4 equivalente ácido gálico/g da folha liofilizada. Este valor foi inferior aos encontrados por Linn e Myint (2018), na mandioqueira, quando o etanol foi utilizado como solvente de extração (784,22 mg de equivalentes de ácido gálico/g em b.s.) e quando a extração foi realizada por via aquosa (446,22 mg de equivalentes de ácido gálico/g em b.s.).

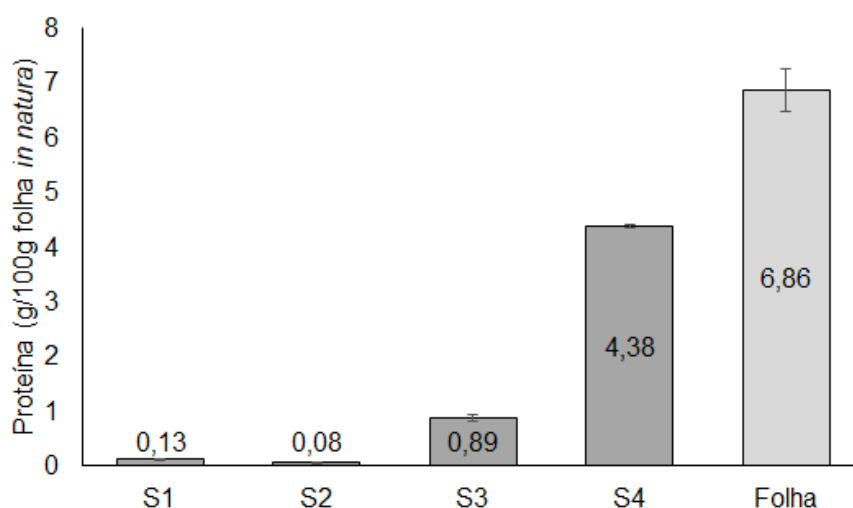
Além da origem, da idade e de condições edafoclimáticas, a divergência entre os resultados observados para CFT nas folhas de mandioqueira pode ser atribuída ao pré-tratamento aplicado. As folhas utilizadas por Linn e Myint (2018) foram apenas lavagem com água corrente, enquanto as folhas do presente estudo foram lavadas com água corrente, higienizadas com detergente neutro por 10 min, sanitizadas com hipoclorito de sódio a 250 mg/L por 20 min, e novamente enxaguadas com água. Assim, o hipoclorito de sódio pode ter provocado a degradação de compostos fenólicos das folhas de mandioqueira, por ser um potente agente oxidante. Segundo Minatel *et al.* (2017), a relação cloro e teor de compostos fenólicos não possui consenso definido, contudo os autores afirmam que o uso de hipoclorito de sódio à temperatura ambiente pode promover a redução do teor de compostos fenólicos para ocorrer a formação de produtos de oxidação; fato citado em estudo com cebola roxa, que apresentou perdas de flavonóis (23%) e antocianinas (13%) após higienização com hipoclorito de sódio a 50°C em fatias de cebola roxa (PÉREZ-GREGORIO *et al.*, 2011).

Quanto aos flavanóis totais (FT), a quantidade observada nas folhas de mandioqueira estudada foi de 5,37 mg  $\pm$  0,40 catequina/ g da folha liofilizada. Marie-Magdeleine *et al.* (2010) realizaram uma triagem fitoquímica das folhas de mandioca apenas para a identificação dos compostos presentes, onde constataram a presença de fenóis, taninos condensados, flavonóides, flavanos, cumarinas e triterpenos, e esteróis. Santos *et al.* (2016) analisaram e quantificaram os flavanóis totais em extratos obtidos da farinha da folha de mandioca, utilizando solventes semelhantes ao empregado no presente estudo,

e observaram, em média, 155,96 mg de catequina em bs /100 g farinha de folhas de mandioca, 19,30 mg epigalocatequina em bs /100 g farinha de folhas de mandioca e 9,10 mg de galocatequina em bs /100 g farinha de folhas de mandioca. A somatória destas frações corresponde a um valor FT de 184,36 mg/100 g em bs, o qual é 2,91 vezes menor que o valor encontrado nas folhas estudadas ( $537 \text{ mg} \pm 0,40$  catequina/ 100 g da folha liofilizada).

### 3.3. FRAÇÕES DE PROTEÍNAS NAS FOLHAS DA MANDIOQUEIRA

Os resultados obtidos para o fracionamento das proteínas das folhas de mandioqueira são apresentados na Figura 3.1. Este fracionamento preliminar permitiu separar por classe as proteínas de acordo com Osborne (1924).



**Figura 3.1.** Estimativa do teor de proteínas nas folhas de mandioqueira *in natura* segundo à classificação empírica de Osborne. S1 – albuminas, S2 – globulinas, S3 – glutelina e S4 – prolaminas.

O resultado estimado de proteínas solúveis foi menor para a fração S1 (0,13 g albumina/100 g de folha *in natura*). De acordo com Osborne (1924), empiricamente, a fração S1, extraída com água ultra pura, é constituída pelas proteínas do grupo das albuminas. Por serem proteínas globulares compactas, este grupo de proteínas apresenta baixo peso molecular (10 a 18 kDa) e uma estrutura composta por duas cadeias polipeptídicas, formadas por ligações de pontes de dissulfeto (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO; IRNASA-CSIC, 2009).

A fração S2 (0,08 g globulina/ 100 g de folha *in natura*), extraída com a solução salina de NaCl, é constituída pelo grupo das globulinas (OSBORNE,

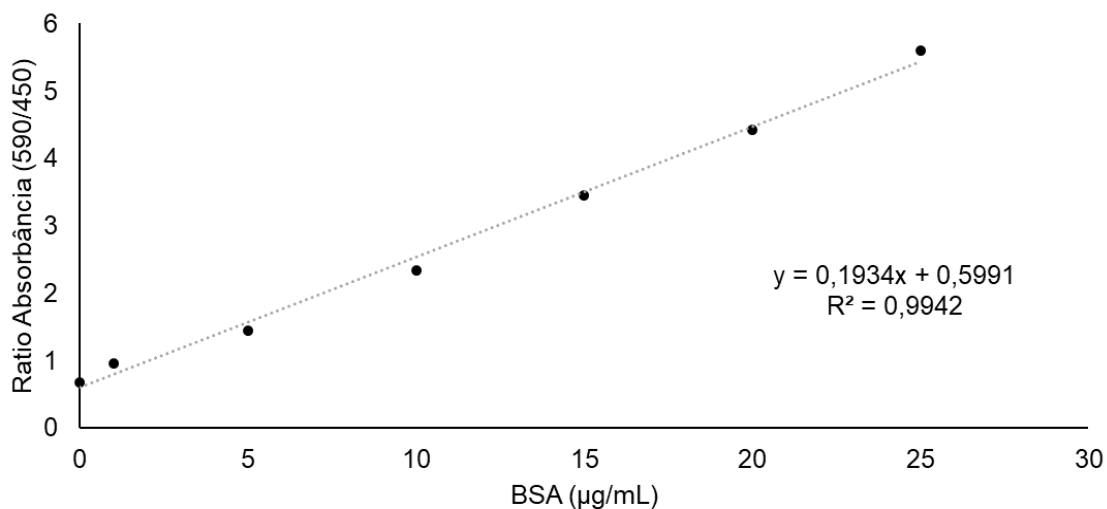
1924), as quais são proteínas globulares insolúveis em água, que apresentam um peso molecular superior as albuminas. De acordo com Rodríguez *et al.* (2011), ocasionalmente proteínas de folhas de plantas não apresentam boa solubilidade em água, e podem ser computadas no grupo das globulinas. Isso se deve a uma possível ligação de albuminas à parede celular, o que dificulta o fracionamento.

A fração proteica extraída com a solução de NaOH (S3), representada pelo grupo das glutelinas, apresentou um valor de 0,89 g/100 g de folhas *in natura*. Finalmente, a fração S4, extraída com etanol, e que representa o grupo das prolaminas, foi a fração mais representativa das proteínas presente nas folhas de mandioca (4,38 g/100 g de folhas *in natura*). De acordo com Rasheed *et al.* (2020), as glutelinas e as prolaminas podem apresentar similaridades, porém elas diferem quanto a massa molar e aos tipos de ligação química. Em estado nativo as prolaminas formam pontes de dissulfeto intramoleculares, enquanto as glutelinas tendem a formar ligações pontes de dissulfeto intermoleculares, fazendo com que estas frações apresentem diferentes o processo de extração.

De acordo com Song *et al.* (2020) e Hinderink *et al.* (2021), as moléculas de prolamina possuem a capacidade de se auto-organizar devido as propriedades anfífilas que apresentam; assim, elas podem ser estudadas como um possível sistema de entrega de diferentes compostos bioativos. Este fato salienta a importância dessa fração no estudo, uma vez que elas representaram aproximadamente 64% das proteínas das folhas da mandioca.

### ***Curva padrão de quantificação de proteínas pelo método de Bradford***

A partir da curva analítica criada para a quantificação das proteínas solúveis, obteve-se uma equação da reta para a correlação entre razão os comprimentos de onda ( $\text{Absorbância}_{590\text{nm}}/\text{Absorbância}_{450\text{nm}}$ ) e a concentração do padrão de albumina de soro bovino (BSA) (Figura 3.2), a qual foi utilizada para determinar o teor protéico.

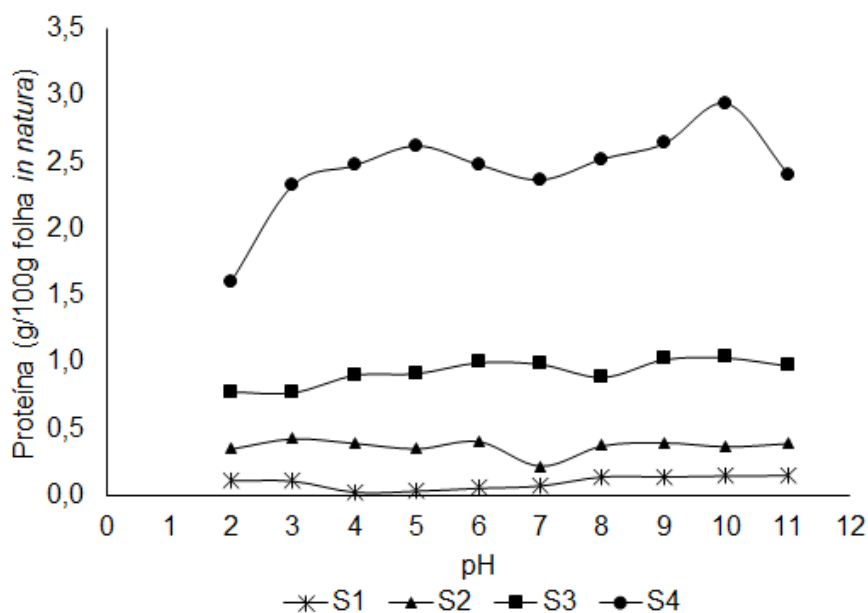


**Figura 3.2.** Gráfico de calibração linearizado de Bradford

#### 3.4. PONTOS ISOELÉTRICO E SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS FRACIONADAS

Com o objetivo de determinar o ponto isoelétrico (Figura 3.3) e a solubilidade das proteínas contida nas frações S1, S2, S3, e S4, extraídas com os diferentes solventes, foi quantificado o teor de proteínas na faixa de pH entre 2 e 11. O ponto isoelétrico de uma proteína corresponde ao valor de pH no qual a molécula se encontra eletricamente neutra, condição na qual ocorre uma menor solubilidade da proteína na solução e, conseqüentemente, um menor teor de proteína é detectado.

Na Figura 3.3 é possível observar que a proteína da fração S1 (grupo das albuminas) apresentou ponto isoelétrico em pH 4,0. Em estudo realizado por Coldebella *et al.* (2013) com folha de mandioca, os autores observaram uma menor solubilidade proteica no sobrenadante avaliado, entre os valores de pH de 4,0 a 5,0, e definiram esta faixa como a que compreende o ponto isoelétrico da proteína. Resultado semelhante foi obtido para as proteínas extraídas das folhas de *Moringa oleifera*, que apresentaram uma menor solubilidade entre valores de pH de 3,5 a 4,0 (SOO *et al.*, 2021).



**Figura 3.3.** Teor de proteínas nas frações proteicas extraídas das folhas de mandioca *in natura*, em função do pH. Albumina (S1), globulina (S2), glutelina (S3) e prolamina (S4).

Para as proteínas da fração S2 (grupo das globulinas) o menor teor de proteínas foi obtido em pH 7,0, indicando que este é o ponto isoelétrico da proteína. Contudo supõem-se que a relação solução salina-proteína utilizada pode ter influenciado na resposta. O pH 7,0 pode indicar uma neutralidade elétrica, portanto um ponto isoelétrico, ou seja, a proteína está apresentando um número equivalente de cargas positivas e negativas. Isso se deve pela concentração de proteína, onde é possível supor que é baixa, logo, toda a proteína presente nessa solução muito diluída apresentará ponto isoelétrico igual 7. Vale ressaltar que nessa etapa do fracionamento utilizou-se um sal neutro (NaCl) em concentração adequada, 2 a 10%, para promover a separação das globulinas por diluição. Não foram encontrados resultados semelhantes para folhas da mandioca na literatura, sendo esta a primeira vez a ser evidenciado a neutralidade elétrica durante o fracionamento de proteínas para esta matriz (SGARBIERI, 1996).

O comportamento observado das proteínas da fração S3 (grupo das glutelinas) (Figura 3.3) indicou que o ponto isoelétrico da proteína ocorre em pH 3,0. Makeri *et al.* (2017) avaliaram o fracionamento e realizaram a caracterização físico-química e estrutural das frações proteicas de sementes de

feijão alado e de soja, e obtiveram resultados semelhante para a solubilidade das frações de proteínas dos grupos das globulinas da soja e das globulinas e albuminas do feijão alado, em pH 3,0. De acordo com Sgarbieri (1996), para um grande número de proteínas o ponto isoelétrico se encontra na faixa de pH de 3,5 a 6,5.

Para as proteínas da fração S4 (grupo das prolaminas) foi observada a menor solubilidade (1,60 g/100 g das folhas *in natura*) em pH 2,0, indicando que este é o ponto isoelétrico da proteína. Mohanta *et al.* (2019) avaliaram a massa molecular e o ponto isoelétrico (PI) de proteínas vegetais e encontraram um PI em pH 2, para a fração proteica extraída da pimenta-aji (*Capsicum baccatum*).

Quando avaliada a interação proteína-solvente na Figura 3.3 é possível constatar a solubilidade das frações obtidas. A maior solubilidade da proteína é identificada pelo maior teor proteico encontrado na curva. Assim, a fração S1 apresentou maior teor proteico (0,15 g/100 g de folha *in natura*) entre pH 8 e 11, indicando que as proteínas desta fração apresentam afinidade alcalina. A fração S2 foi mais solúvel (0,43 g /100 g de folha *in natura*) em pH 3, o que sugere que as proteínas desta fração possuem afinidade por meio ácido. Para a fração S3, o pH 10 foi o que indicou maior teor proteico (1,04 g /100 g de folha *in natura*), pH no qual a fração S4 apresentou também o maior teor proteico (2,94 g /100 g de folha *in natura*). Estes resultados sugerem também uma maior afinidade das proteínas das frações S3 e S4 pelo meio alcalino.



#### 4. CONCLUSÃO

Um estudo inicial foi necessário para constatar que é viável a utilização das folhas da mandioca (*Manihot esculenta*) para a extração de proteínas. As folhas frescas de mandioca apresentaram 6,86 g de proteínas/100 g, além de apresentarem importantes concentrações de compostos fenólicos (356,43 mg  $\pm$  24,4 equivalente ácido gálico/g) e de flavanóis (5,37 mg  $\pm$  0,40 catequina/g), em relação à folha liofilizada. O método de Osborne se mostrou eficaz na separação das frações de proteínas das folhas de mandioca, em função da solubilidade em água (albuminas), em solução salina (globulinas), em álcali (glutelinas) e em álcool (prolaminas); sendo esta a fração de proteínas encontrada em maior quantidade (4,38 g/100 g de folha *in natura*); fração de interesse deste estudo. A avaliação do ponto isoelétrico (PI) das frações proteicas indicou que as albuminas apresentaram PI em pH = 4, as glutelinas em pH = 3 e as prolaminas em H = 2. No caso das globulinas houve uma indicação de que o PI ocorreu em pH 7. As frações de albumina, glutelina e prolamina apresentaram maior solubilidade em pH's básicos, enquanto a fração de globulina foi mais solúvel em meio ácido. Assim, o presente estudo explorou propriedades que podem indicar o potencial das folhas de mandioca para a obtenção de concentrado proteico, além de ter indicado condições para o isolamento das frações proteicas das folhas.

## REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Gaithersburg, Md: AOAC International; 1997.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, E. O.; SILVA, B. C.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. C.; VISENTAINER, J. V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 48, p. 1-9, 2014.

BRASIL, Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Diário Oficial da União Resolução RDC nº 360**. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados Brasília, DF. Dezembro de 2003.

CHAIAREEKITWAT, S.; LATIF, S.; MAHAYOTHEE, B.; KHUWIJITJARU, P.; NAGLE, M.; AMAWAN, S.; MÜLLER, J. Protein composition, chlorophyll, carotenoids, and cyanide content of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) as influenced by cultivar, plant age, and leaf position. **Food Chemistry**, v. 372, n. 131173, 2022.

COLDEBELLA, P. F.; GOMES, S. D.; EVARINI, J. A.; CEREDA, M. P.; COELHO, S. R. M.; COLDEBELLA, A. Evaluation of protein extraction methods to obtain protein concentrate from cassava leaf. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 6, p.1223-1233, 2013.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas (Capítulo 5). In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Editora Artmed: Porto Alegre, p.179-262, 2010.

DELCOUR, J.A. AND VAREBEKE, D.J. A new colourimetric assay for flavanoids in pilsner beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 91, p. 37-40, 1985.

ERNST O., ZOR T. Linearization of the Bradford Protein Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 38, 2010.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome. ISBN 978-92-5-109551-5, 2017, 2017.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S.; ARELLANO, J. B.; IRNASA-CSIC, SPAIN. (2009). Vegetable protein isolates (Chapter 15). In **Handbook of hydrocolloids**. Philips, G. O.; Willians, P. A. (ed.). Woodhead Publishing Limited, 2009.

HINDERINK, E. B. A.; RUITER, J.; LEEUW, J.; SCHROËN, K.; SAGIS, L. M. C.; BERTON-CARABIN, C. C. Early film formation in protein-stabilised emulsions: Insights from a microfluidic approach. **Food Hydrocolloids**, v. 118, n. 106785, p. 118-130, 2021.

KOUBALA, B. B.; LAYA, A.; MASSAÏ, H.; KOUNINKI, H.; NUKENINE, E. N. Physico-chemical characterization leaves from five genotypes of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) consumed in the far North region (Cameroon). **American Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 40-47, 2015.

LINN, K. Z.; MYINT, P. P. Estimation of nutritive value, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Manihot esculenta* Crantz. (Cassava) leaf. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 6, n. 6, p.73-79, 2018.

MAKERI, M. U.; MOHAMED, S. A.; KARIM, R.; RAMAKRISHNAN, Y.; MUHAMMAD, K. Fractionation, physicochemical, and structural characterization of winged bean seed protein fractions with reference to soybean. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. S2, p. S2220-S2236, 2017.

MARIE-MAGDELEINE, C.; UDINO, L.; PHILIBERT, L.; BOCAGE, B.; ARCHIMEDE, H. In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 85-92, 2010.

MCMURROUGH, I.; BAERT, T. Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 100, p. 409-416, 1994.

MINATEL, I. O.; BORGES, C. V.; FERREIRA, M. I.; GOMEZ, H. A. G.; CHEN, C. Y. O.; LIMA, G. P. P. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability (Chapter 1). **Phenolic Compounds - Biological Activity**. Editor (s): Marcos Soto-Hernandez; Mariana Palma-Tenango; Maria del Rosario Garcia-Mateos. 2017.

MODESTO JUNIOR, E. N.; CHISTÉ, R. C.; PENA, R. S. Oven drying and hot water cooking processes decrease HCN contents of cassava leaves. **Food Research International**, v. 119, p. 517-523, 2019.

MOHANTA, T. K.; KHAN, A.; HASHEM, A.; ALLAH, E. F. A.; AL-HARRASI, A. The molecular mass and isoelectric point of plant proteomes. **BMC Genomics**, v. 20, n. 631, 2019.

ORTEGA-FLORES, C. I.; COSTA, M. A. L.; CEREDA, M. P.; PENTEADO, M. V. C. Avaliação da qualidade protéica da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition**, v.25, p. 47-59, 2003.

OSBORNE, T. B. **The vegetable protein**; 2nd ed.; Longmans Green and Co.: New York, p.154, 1924.

PÉREZ SIMBA, B. P.; GARRIDO ESPINOSA, J. A.; ENDARA VARGAS, A. B.; LANDÁZURI FLORES, A. C.; RAMÍREZ CÁRDENAS, L. de L. Á. Optimization of the extraction and precipitation process of a leaf protein concentrate from *Moringa oleifera* Lam. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 75, n. 1, p. 9813-9821, 2022.

PÉREZ-GREGORIO, M. R.; REGUEIRO, J.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. **Food Control**, v. 22, p.1108-1113, 2011.

RASHEED, F.; MARKGREN, J.; HEDENQVIST, M.; JOHANSSON, E. Modeling to Understand Plant Protein Structure-Function Relationships – Implications for Seed Storage Proteins. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 873-889, 2020.

RODRÍGUEZ, P.; PÉREZ, E.; ROMEL, G.; DUFOUR, D. Characterization of the proteins fractions extracted from leaves of *Amaranthus dubius* (*Amaranthus* spp.). **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 7, p. 417-424, 2011.

SANTOS, B. R. S.; SILVA, E. F. R.; MINHO, L. A. C.; BRANDÃO, G. C.; SANTOS, A. M. P.; SANTOS, W. P. C.; SILVA, M. V. L.; SANTOS, W. N. L. Evaluation of the nutritional composition in effect of processing cassava leaves (*Manihot esculenta*) using multivariate analysis techniques. **Microchemical Journal**, v. 152, n. 104271, 2020.

SANTOS, M. A. I.; SIMÃO, A. A.; MARQUES, T. R.; SACKZ, A. A.; CORRÊA, A. D. Efeito de diferentes métodos de extração sobre a atividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos da folha de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, e2015067, 2016.

SEGATTO, M. L.; STAHL, A. M.; ZANOTTI, K.; ZUIN, V. G. Green and sustainable extraction of proteins from agro-industrial waste: An overview and a closer look to Latin America. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 37, 100661, 2022.

SGARBIERI, V.C. Propriedades físico químicas dos aminoácidos e proteínas (Capítulo 1). Em **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Editora-Livraria Varela, p.80, 1996.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 947-958, 2002.

SONG, J.; SUN, C.; GUL, K.; MATA, A.; FANG, Y. Prolamin-based complexes: Structure design and food-related applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 20, p. 1120-1149, 2021.

SOO, M. H.; SAMAD, N. A.; ABANG ZAIDEL, D. N.; MOHD JUSOH, Y. M.; MUHAMAD I. I.; HASHIM, Z. Extraction of plant-based protein from *Moringa oleifera* leaves using alkaline extraction and isoelectric precipitation method, **Chemical Engineering Transactions**, v. 89, p. 253-258, 2021.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 6, n. 1 p. 111–118, 2002.

WOBETO, C.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D. Cianeto na farinha e folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1115-1118, 2004.

**CAPÍTULO IV**

---

**EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS FOLHAS DE MANDIOQUEIRA  
POR SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA**

## RESUMO

O estudo avaliou o processo de extração de proteínas das folhas de mandioca, utilizando solução hidroalcoólica de etanol como solvente extrator. Um planejamento experimental foi utilizado para avaliar o efeito da concentrações de etanol (40, 50 e 60%), da temperatura (-5, 15 e 35°C) e do tempo (30, 135 e 240 min) do processo sobre o rendimento de extração de proteína (REP), o rendimento do concentrado proteico (RCP), e o teor de composto fenólicos totais (CFT), flavanóis totais (FT), clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), carotenóides totais (CT), cor instrumental, capacidade de absorção de água (CAA) e óleo (CAO) do concentrado proteico. O REP e o RCP apresentaram maiores valores em corridas distintas, corrida 3 (40% de etanol, 35°C e 135 min de extração) e corrida 13 (50% de etanol, 15°C e 135 min de extração), respectivamente. O processo proposto para a extração de proteínas manteve teores consideráveis de compostos bioativos (CT, CFT e FT) no produto final. Os altos valores de CAA e CAO encontrados se assemelham a outros resultados encontrados para concentrados protéicos na literatura. Os liofilizados obtidos apresentaram cores mais escuras ( $L^* < 50$ ) e coloração verde ao amarelo, com uma variação de cor muito distinta quando comparada a mandioca *in natura*. A desejabilidade global definiu as condições ótimas de processo (etanol de 54%, 6°C e 30 min de extração) de acordo com as variáveis REP, RCP, CFT, CT e PB. Neste contexto, foi feito o balanço de massa e a avaliação do comportamento higroscópico dos produtos, onde as isoterma de adsorção de umidade apresentou comportamento do tipo III e a de dessorção se classificou como tipo II, a modelagem matemática dos dados indicam que o modelo de Peleg foi o mais capaz de predizer as isotermas de adsorção e dessorção de umidade do concentrado protéico.

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de proteínas ou produtos proteicos, como concentrados e isolados proteicos, é recomendado na alimentação diária para assegurar as funções vitais desempenhadas por esses macronutrientes (PAIVA; ALFENAS; BRESSAN, 2007). Assim, aliado a crescente demanda por alimentos promotores da saúde, tem-se impulsionado o desenvolvimento de ingredientes proteicos funcionais. Além disso, há um interesse cada vez maior em explorar novas fontes de proteínas derivadas de plantas, com base em princípios de saúde, ambientais e econômicos (HOUDE *et al.*, 2018). Neste sentido, as folhas verdes dos vegetais, em geral, têm mostrado características favoráveis para o uso como fonte de proteínas na dieta humana, que podem ser utilizadas no combate à desnutrição e na produção de rações mais nutritivas para os animais (SOARES *et al.*, 2016).

Ressalta-se que é indispensável o consumo de aminoácidos essenciais, a qual é comumente suprida por produtos de origem animal, contudo, com o crescimento populacional faz-se necessário à procura de novas fontes de proteínas à base de plantas. Assim, estudos têm sido realizados utilizando diferentes matérias primas de origem vegetal, com o intuito de produzir concentrado proteico, sendo um exemplo, a mandioqueira (AKYÜZ; ERSUS, 2021). Inúmeros fatores podem influenciar a elaboração de concentrados protéicos vegetais, o que se torna necessário avaliar o procedimento aplicado na obtenção deste produto.

Dentre os métodos, destaca-se a utilização de solventes orgânicos, como o etanol, utilizados para solubilizar as proteínas e separá-las dos demais compostos presentes (PÉREZ *et al.*, 2022), como no estudo realizado para a extração de proteínas do resíduo de chá feito pela combinação de álcool-álcali como solução extratora (CHEN *et al.*, 2012). Diante o exposto, este capítulo tem o objetivo de avaliar a aplicabilidade de solução hidroalcoólica na extração de proteínas da mandioqueira e avaliar as características do produto obtido.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. MATÉRIA PRIMA

Folhas de mandioca com 8 meses de cultivo foram utilizadas no desenvolvimento dessa pesquisa. A coleta foi realizada no mês de junho de 2020, no município de Salvaterra (Pará, Brasil) (Latitude: 00° 45' 12" S, Longitude: 48° 31' 00" W, altitude de 5 m). O acesso a espécie utilizada está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, sob o número A5D5AD2.

### 2.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA

Para cada ensaio de extração, as folhas de mandioca *in natura* ( $\approx 20$  g) foram misturadas com solução extratora numa proporção de 1:10 (folha:solução) e trituradas em um ultra turrax modelo T25 digital (IKA, Alemanha) a 13.000 rpm por 1min. O líquido verde obtido foi transferido para um reator cilíndrico de vidro encamisado com tampa esmerilhada e capacidade para 250 mL (dimensões: externa de 80 mm x 115 mm e interna de 50 mm x 100 mm), acoplado a um termômetro, para registro constante da temperatura, onde foram realizadas as corridas de extração, em condições pré-definidas.

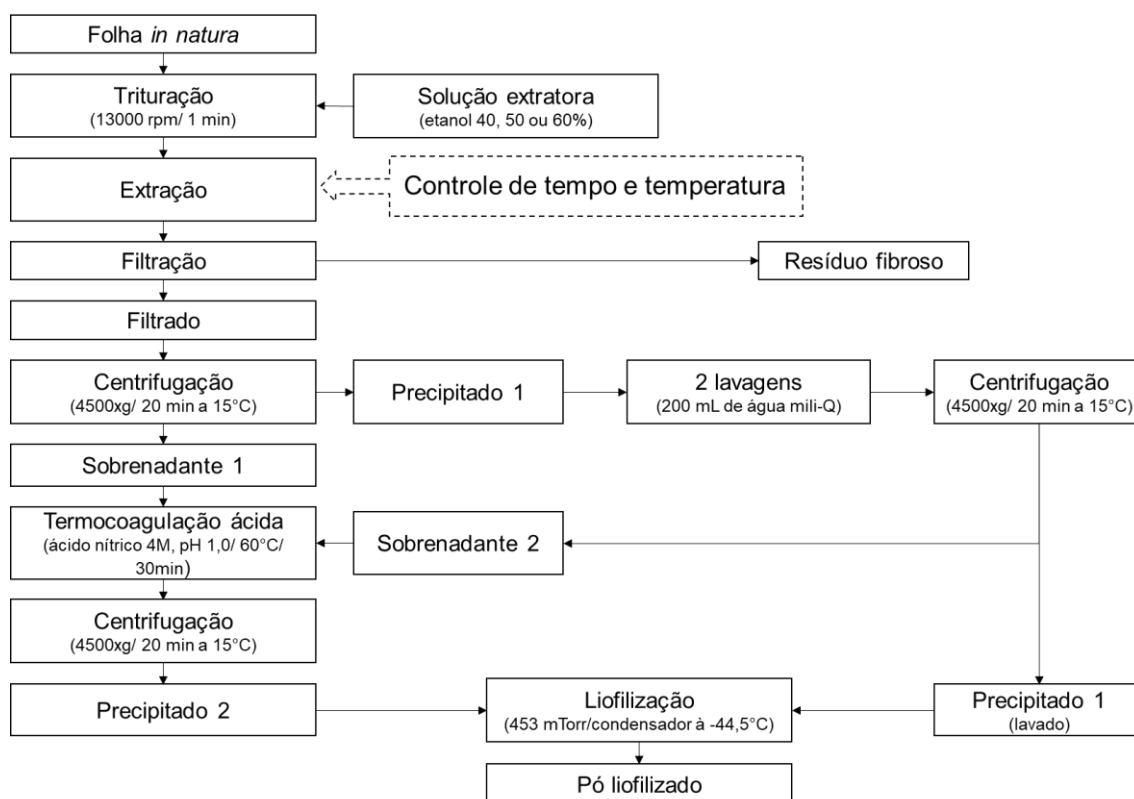
Um planejamento Box-Behnken foi utilizado para avaliar a extração das proteínas pelo uso de solução hidroalcoólica em diferentes concentrações. O planejamento foi constituído de três níveis (+1, 0 e -1), com três réplicas no ponto central, totalizando 15 corridas (Tabela 4.1). O etanol foi utilizado como solução hidroalcoólica (álcool etílico PA com 99,5% de pureza) nas concentrações de 40, 50 e 60%. As curvas de contorno foram determinadas em função dos fatores significativos, definidos a partir da avaliação dos efeitos e do diagrama de Pareto.



**Tabela 4.1.** Níveis codificados e originais das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial do tipo Box-Behnken, utilizado na extração de proteínas da mandioca com etanol.

Corrida	Variável codificada			Variável original		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Concentração (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	-1	-1	0	40	-5	135
2	+1	-1	0	60	-5	135
3	-1	+1	0	40	35	135
4	+1	+1	0	60	35	135
5	-1	0	-1	40	15	30
6	+	0	-1	60	15	30
7	-1	0	+1	40	15	240
8	+1	0	+1	60	15	240
9	0	-1	-1	50	-5	30
10	0	+1	-1	50	35	30
11	0	-1	+1	50	-5	240
12	0	+1	+1	50	35	240
13	0	0	0	50	0	135
14	0	0	0	50	0	135
15	0	0	0	50	0	135

A Figura 4.1 descreve as principais etapas do processo de extração de proteínas da das folhas de mandioca utilizando o etanol como solução extratora. O produto da extração foi liofilizado e submetido as análises de compostos fenólicos totais (mg ácido gálico/g do liofilizado), flavanóis totais (mg catequina/g do liofilizado), proteína bruta (%), clorofila a e b (µg/g do liofilizado), carotenóides totais (µg/ g do liofilizado), análise colorimétrica ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $c^*$ ,  $h^\circ$  e  $\Delta E$ ), rendimento de extração de proteínas (%), rendimento de concentrado proteico (%), capacidade de absorção de água (g/g base seca – bs) e capacidade de absorção de óleo (g/g bs).



**Figura 4.1.** Etapas da extração e precipitação de proteínas da mandioca utilizando solução hidroalcoólica.

### 2.2.1. Determinação de compostos fenólicos totais e flavanóis totais

Os extratos dos produtos das corridas do planejamento experimental foram obtidos de acordo com Boeing *et al.* (2014), para a realização de todas as análises de composto bioativos.

Os compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu (WATERHOUSE, 2002), sendo a quantificação feita com auxílio de uma curva analítica de ácido gálico, na faixa de concentração de 1 a 60 mg de ácido gálico/L (absorbância entre 0,0258 e 0,8474). Este método tem como base a reatividade comum dos polifenóis, quando submetidos a uma interação entre os ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, por 30 min; o que acontece por um mecanismo de reação engajado, devido a uma transferência de elétrons (mecanismo redox). A marcha analítica ocorreu da seguinte maneira: 250 µL de amostra ou água destilada para o branco, 250 µL de Folin-Ciocalteu 10% e 1250 µL de carbonato de sódio 7,5% foram misturados, e a

solução foi submetida à leitura, em espectrofotômetro UV-Visível (Modelo Cary 50, marca Varian).

Os flavanóis totais (FT) foram determinados pelo método de p-dimetilaminocinamaldeído (DMACA), o qual tem como princípio a condensação da molécula de flavanol com o DMACA, conforme o descrito por McMurrugh, Baert (1994) e Delcour, Varebeke e Janssens (1985). A marcha analítica seguiu a mistura de 200  $\mu\text{L}$  de extrato e 1000  $\mu\text{L}$  de p-Dimetilaminocinamaldeído (DMACA) 1% diluído em HCl: metanol resfriado, na proporção de 1:3 (v/v), o qual reagiu por 10 min, na ausência de luz, e seguiu para posterior leitura em espectrofotômetro a 640 nm.

### **2.2.2. Determinação de proteína bruta**

Para a determinação da proteína bruta das amostras foi utilizado o método de micro-Kjeldahl, de acordo com o método n° 920.87 da AOAC (1997). O método tem como base a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio, mediante digestão com ácido sulfúrico, com posterior destilação para liberação de amônia gasosa, a qual reage com solução de ácido bórico para formação de borato de amônio, seguido de titulação com solução de ácido clorídrico padronizada. O fator de conversão nitrogênio-proteína empregado foi de 5,75 (AOAC, 1997).

### **2.2.3. Determinação da clorofila a, clorofila b e carotenóides totais**

A base para a quantificação espectroscópica da clorofila a ( $\mu\text{g/g}$  do liofilizado), clorofila b ( $\mu\text{g/g}$  do liofilizado) e carotenóides totais ( $\mu\text{g/g}$  do liofilizado) foram as metodologias propostas por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Os extratos foram submetidos à leitura em 664,1 nm, 648,6 nm e 470 nm. Para a análise foram pesados aproximadamente 0,02 g da amostra liofilizada, o qual foi macerado com solução de etanol com 5% (v/v) de água, seguido de filtração em papel qualitativo. A solução foi aferida em balão volumétrico de 10 mL, com a solução extratora.

#### 2.2.4. Análise colorimétrica

As amostras foram analisadas em um colorímetro digital (Chroma Meter CR-300, Konica Minolta, Japão), baseado no sistema CIELAB. Para a calibração do equipamento foi utilizado uma fonte de luz D65, geometria de visão de 0° (componente especular incluído), valores do branco  $X = 0,3174$  e do cinza  $Y = 0,3349$ . Foram determinados os parâmetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $c^*$  e  $h^\circ$ , por leitura direta no equipamento. Para a obtenção dos valores da variação total de cor ( $\Delta E$ ) foi utilizado pela Equação 4.1 (PATHARE, OPARA E AL-SAID, 2013).

$$\Delta E = \left[ (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2 \right]^{1/2} \quad (4.1)$$

onde,  $\Delta L^*$  = variação da luminosidade, indicando a diferença em mais claro (+) e escuro (-),  $\Delta a^*$  = diferença em vermelho (+) e verde (-),  $\Delta b^*$  = diferença em amarelo (+) e azul (-) e  $\Delta E$  = diferença total de cor.

#### 2.2.5. Rendimento de extração de proteína

Para a obtenção do rendimento de extração de proteína (REP, %) foi efetuado o cálculo da massa de proteína no concentrado, em relação à massa de proteína na mandioqueira utilizada na extração (SILVA *et al.*, 2012), conforme a Equação 4.2.

$$\text{REP (\%)} = \frac{\text{PBCP}}{\text{PBIE}} \times 100 \quad (4.2)$$

onde, PBCP é a massa de proteína bruta do concentrado proteico (g) e PBIE é a massa de proteína bruta presente na amostra inicial (g).

#### 2.2.6. Rendimento de concentrado proteico

O rendimento do concentrado proteico (RCP, %) foi quantificado por meio da relação entre a massa do concentrado proteico obtido em cada corrida e a massa inicial de folha de mandioqueira utilizada (SILVA *et al.*, 2012), pela Equação 4.3.

$$\text{RCP (\%)} = \frac{\text{MCP}}{\text{MIE}} \times 100 \quad (4.3)$$

onde, MCP é a massa do concentrado proteico (g) e MIE é a massa de matéria seca nas folhas utilizadas na extração (g).

### 2.2.7. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo

Para determinar a capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção óleo (CAO) das proteínas da mandioca foi utilizado o método descrito por Cao *et al.* (2009), mantendo-se a proporção de 1:10 (m/v), amostra:água (ou óleo). As amostras foram pesadas ( $\approx 0,05$  g) em eppendorf e misturadas com água destilada ou óleo vegetal refinado (0,5 mL), com o auxílio de um agitador de tubo vórtex (modelo K45-2820, marca KASVI basic, Brasil). As misturas foram centrifugadas (Modelo SL-5GR, marca Spmlaba, São Paulo) a  $1200 \times g$  por 25 min. As amostras foram mantidas inclinadas por 30 min com intuito de escoar o líquido remanescente (sobrenadante), não absorvido. O ganho de massa por unidade de massa de proteína, em base seca, foi registrado como a capacidade de absorção de água ou de óleo Equação 4.4.

$$CAA \text{ ou } CAO = \frac{m_2}{m_1} \quad (4.4)$$

Onde  $m_1$  é o peso da amostra seca e  $m_2$  é o peso da amostra úmida após a drenagem da água ou óleo.

## 2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis avaliadas no planejamento foram concentração de álcool etílico (%), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo (min). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para estimativa dos parâmetros estatísticos, da falta de ajuste do modelo e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Os testes de ajuste e predição do modelo foram realizados ao nível de significância de 5% pelo programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT INC., 1995). Os modelos quadráticos foram avaliados de acordo com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Para a definição da condição ótima do planejamento, para a extração de proteínas da mandioca, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta e a função desejabilidade. O método de otimização simultânea denominada “Função Desejabilidade”, o qual consiste na transformação de

uma função desejabilidade para cada variável de resposta, onde os valores de desejabilidade são especificados em uma faixa de 0 a 1, no qual 0 representa o valor indesejado e 1 o valor desejável (DERRINGER; SUICH, 1980). Neste planejamento, os valores de desejabilidade foram definidos como 0 para o valor mínimo, 0,8 como valor médio e 1 como o valor máximo, para todas as respostas.

Barros Neto, Scarminio e Bruns (2007) indicam que após a determinação da desejabilidade para cada resposta (desejabilidade individual) é necessário correlacionar todas à uma desejabilidade global, a qual geralmente é dada pela média geométrica de “m” das desejabilidades individuais. Esta rotina promove a redução das variáveis respostas em um único valor: a desejabilidade global, descrita na Equação 4.5.

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 d_3 \dots d_m} \quad (4.5)$$

onde, m é número de respostas. Para uma resposta qualquer  $d_m = 0$  define a mesma como completamente indesejável, logo a desejabilidade global é igual a zero.

Para a obtenção do gráfico da função desejabilidade foram utilizadas as taxas de variação da desejabilidade (s e t), onde os expoentes s e t estabelecem a importância da função para descobrir o valor desejado. De acordo com Derringer e Suich (1980), essas taxas são fundamentadas no seguinte princípio: seja  $L_i$  (valor inferior),  $LS$  (valor superior) e  $M$  (valor mediano), os quais são desejados para a resposta  $\hat{Y}$ , com  $L_i \leq M \leq LS$ .; sendo que para  $s = t = 1$ , a função desejabilidade aumenta linearmente com  $M$ ; para  $s < 1$  e  $t < 1$ , a função é convexa; e para  $s > 1$  e  $t > 1$ , a função é côncava. Para obter o gráfico da função desejabilidade foram utilizadas taxas de variação da desejabilidade (s e t) iguais a 2 e um fator de grade de 4 para as respostas proteína bruta (PB), rendimento de concentrado proteico (RCP) e rendimento de extração de proteína (REP). Para as respostas composto fenólicos totais (CFT) e carotenóides totais (CT), os valores de s e t foram iguais a 1.

O *software* Statistica 7.0 também foi utilizado para o ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de adsorção e dessorção de umidade do produto. Além da análise de regressão não-linear, utilizou-se a metodologia

de estimativa de Levenberg Marquardt, com um critério de convergência de  $10^{-6}$ .

Para avaliar a qualidade dos ajustes dos modelos foi utilizado o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), erro médio quadrático (RMSE) (Equação 4.6), o desvio médio relativo (P) (Equação 4.7) e da análise de resíduos.

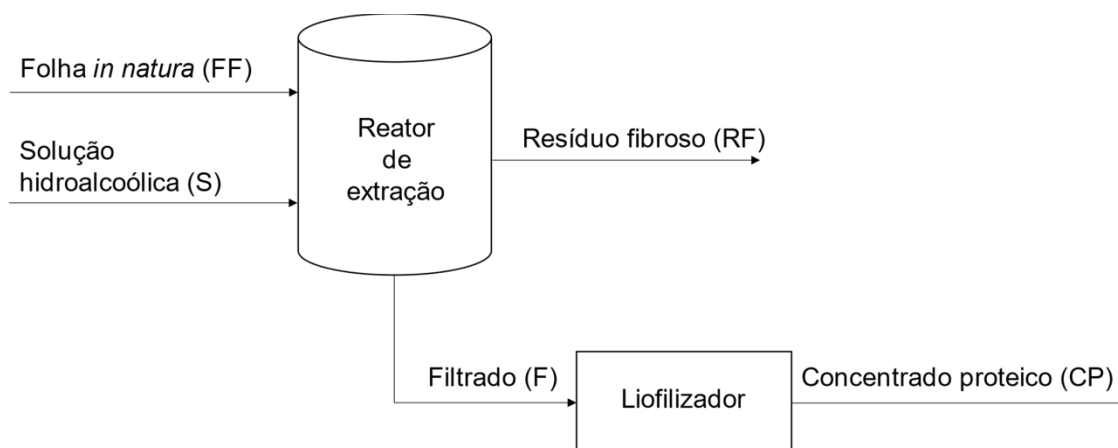
$$\text{RMSE} = \left[ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \right]^{1/2} \quad (4.6)$$

$$P = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|Y_i - \hat{Y}_i|}{Y_i} \quad (4.7)$$

onde:  $Y_i$  = valor observado;  $\hat{Y}_i$  = valor predito;  $n$  = número de dados observados.

#### 2.4. BALANÇO DE MASSA EM CONDIÇÕES ESTABELCIDAS POR DESEJABILIDADE GLOBAL COM USO DE SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA

O balanço de massa (Figura 4.2) foi considerado um processo em regime permanente, em que foi utilizada a condição ótima definida para o processo de extração de proteínas da mandioca, mediante função desejabilidade. Foi realizado o acompanhamento das quatro etapas do processo: duas de entrada (folha *in natura* e solução extratora) e duas de saída (resíduo fibroso e concentrado proteico liofilizado); cujo controle foi possível pelo registro da massa (g), matéria seca (g/100 g), proteína bruta (g bs) e umidade (%).



**Figura 4.2.** Balanço de massa de acordo a desejabilidade global.

Os produtos obtidos na condição de desejabilidade global do processo de extração foi liofilizado e submetido as análises de proteína bruta (PB), rendimento do concentrado proteico (RCP), rendimento da extração de proteína (REP), composto fenólicos totais (CFT) e carotenóides totais (CT). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 2.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE

O concentrado proteico liofilizado, obtido na condição ótima, foi avaliado higroscopicamente, por meio das isotermas de sorção de umidade. As isotermas foram obtidas em um analisador de sorção de vapor (VSA) (Aqualab VSA, Decagon, USA) a 25°C, conforme metodologia descrita por Silva e Pena (2018). Inicialmente, uma quantidade representativa de amostra, de 800 a 1000 mg, foi pesada em cápsula de aço inoxidável e o registro da massa foi efetuado na própria balança micro analítica do equipamento. O equipamento foi programado para obter dados de sorção (adsorção e dessorção) de umidade, em uma faixa de atividade de água ( $a_w$ ) de 0,1 a 0,9, pelo método DVS. Neste procedimento, equipamento promove o registro contínuo das massas e valores de  $a_w$  até o alcance de cada condição de equilíbrio, definida pelo registro de três medidas consecutivas, da variação massa/tempo ( $dm/dt$  %), com valor igual ou menor que 0,1. Ao final do processo, a amostra foi submetida à secagem, pelo método 920.151 da AOAC (1997), para a determinação da matéria seca. Os ajustes dos modelos matemáticos aos dados experimentais de adsorção e dessorção de umidade do produto são apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Modelos utilizados na predição da isoterma de sorção.

Modelo matemático	Equação
Blahovec (BLAHOVEC; YANNIOTIS, 2009)	$m = \frac{a_w}{a_1 + (b_1 \cdot a_w)} + \frac{a_w}{a_2 - (b_2 \cdot a_w)}$
Ferro-Fontan (FONTAN <i>et al.</i> , 1982)	$m = \left[ \frac{B}{\ln\left(\frac{A}{a_w}\right)} \right]^{\frac{1}{C}}$
GAB (MAROULIS; TSAMI; MARINOS-KOURIS, 1988)	$m = \frac{a \cdot c \cdot k \cdot a_w}{[(1 - k \cdot a_w) \cdot (1 + (c - 1) \cdot k \cdot a_w)]}$



---

Halsey (HALSEY, 1948)	$m = \left[ \frac{-a}{\ln a_w} \right]^{\frac{1}{b}}$
Henderson (HENDERSON, 1952)	$m = \frac{-\ln(1-a_w)}{1-a_w}$
Oswin (OSWIN, 1946)	$m = a \cdot \left[ \frac{a_w}{1-a_w} \right]^b$
Peleg (PELEG, 1993)	$m = k_1 \cdot a_w^{n_1} + k_2 \cdot a_w^{n_2}$
Smith (SMITH, 1947)	$m = b + a \cdot \ln(1-a_w)$

---

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA COM ETANOL

Neste item encontram-se todos os resultados obtidos nas corridas do planejamento experimental realizado.

##### 3.1.1. Compostos fenólicos totais e flavanóis totais

A Tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos para compostos fenólicos totais (CFT) e flavanóis totais (FT) dos pós liofilizados obtidos pelo planejamento experimental, para a extração com etanol.

**Tabela 4.3.** Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g liofilizado) e flavanóis totais (mg eq. catequina/g liofilizado) nos pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca com etanol, em cada corrida do planejamento.

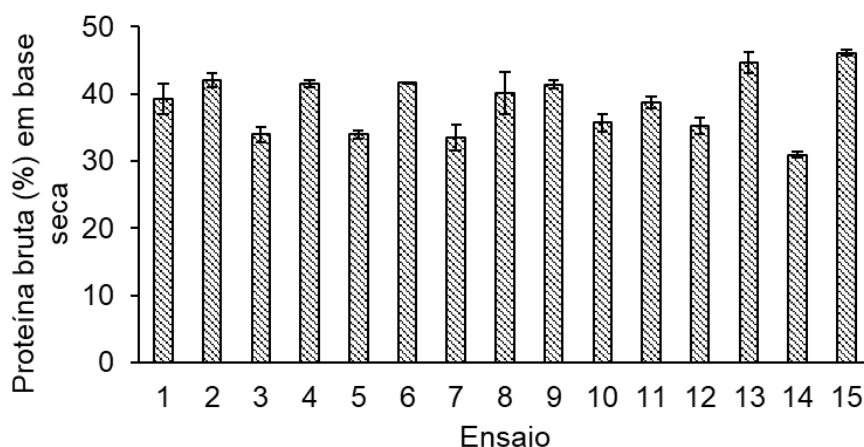
Corrida	Compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g do liofilizado)	Flavanóis totais (mg eq. catequina/g do liofilizado)
1	198,4±6,38	1,63±0,05
2	206,7±12,80	1,71±0,09
3	200,9±13,96	1,30±0,09
4	142,0±7,35	1,21±0,16
5	362,9±12,91	4,08±0,14
6	221,0±2,74	1,67±0,12
7	216,7±23,83	3,99±0,34
8	143,1±13,26	0,69±0,11
9	184,1±10,32	0,83±0,08
10	188,3±16,42	1,03±0,02
11	232,6±8,53	1,33±0,11
12	189,7±16,50	1,92±0,06
13	274,4±7,43	2,13±0,29
14	160,9±11,84	2,70±0,22
15	224,2±11,16	1,46±0,05

O conteúdo de fenólicos totais variou de 142 a 362,9 mg eq. ácido gálico/g do liofilizado e o conteúdo de flavanóis totais variou de 0,69 a 4,10 mg eq. catequina/g liofilizado. Os maiores teores de CFT e FT foram observados para a corrida 5, que utilizou uma concentração de etanol de 40%, temperatura de 15°C e um tempo de extração de 30 min. Não foi observada uma tendência definida para estas respostas, no domínio experimental. As extrações fenólicas de matérias primas vegetais podem ser influenciadas por inúmeros fatores como tipos e proporções de solventes, temperaturas de extração, tempos de extração e proporções sólido-líquido, etc. Em estudo de extração a frio sequencial e fracionada de compostos fitoquímicos realizado por Palavicini *et al.* (2022), foi observado rendimentos baixos quando utilizada baixa temperatura (4°C), por causa de altas tensão superficial e viscosidade mantidas pelo solvente, logo apresentando menor interação solvente e compostos solúveis. Conjectura-se que o mesmo ocorreu nas extrações da

mandioqueira pela faixa de temperatura utilizada no planejamento ser entre -5 a 35°C.

### 3.1.2. Proteína bruta

Na Figura 4.3 são apresentados valores, em porcentagem, de proteínas totais observados para os pós liofilizados, dos extratos obtidos em cada corrida do planejamento experimental. De acordo com os resultados, o maior percentual de proteína bruta ( $\approx 46\%$ ) foi observado no ponto central do planejamento, cujas condições de extração foram 50% de etanol, 15°C e 135 min de extração.



**Figura 4.3.** Teores de proteína bruta (% bs) para os pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioqueira com etanol, em cada corrida do planejamento.

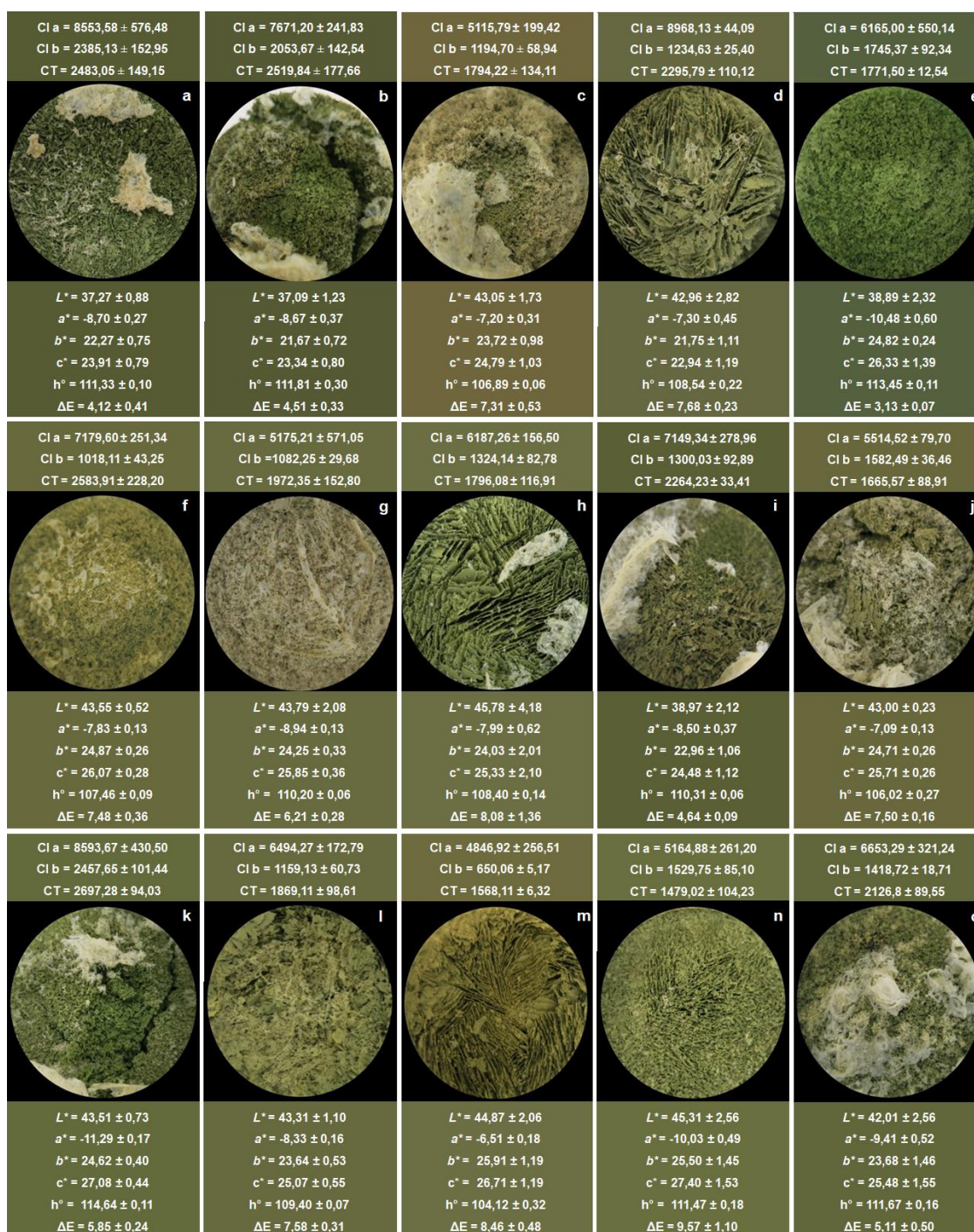
Teo *et al.* (2010) produziram concentrado protéico de folhas de mandioqueira desidratadas utilizando a coagulação por etanol. Os autores, homogeneizaram as folhas com água destilada (proporção 1:20, p:v) e realizaram filtração. O filtrado produzido teve adição de etanol (concentração final de 30%, v/v) para a precipitação das proteínas, as quais foram separadas por filtração. Ao final do processo os autores atingiram 60 % de proteína bruta; sendo superior ao encontrado no presente trabalho. É importante ressaltar que os autores utilizaram um fator de conversão nitrogênio-proteína de 6,25, enquanto no presente trabalho foi utilizado o fator de 5,75. (AOAC, 1997).

### 3.1.3. Clorofila a, clorofila b, carotenóides totais e colorimetria

Na Figura 4.4 são apresentados os resultados para os teores de clorofila a (Cl a,  $\mu\text{g/g}$  do liofilizado), clorofila b (Cl b,  $\mu\text{g/g}$  do liofilizado) e carotenóides (CT,  $\mu\text{g/g}$  do liofilizado) (Apêndice 4.I), bem como os parâmetros de cor instrumental (Apêndice 4.II) e as imagens dos pós liofilizados obtidos nas diferentes corridas do planejamento experimental.

O solvente utilizado no processo de extração tornou viável também a extração das clorofilas, juntamente com as proteínas, uma vez que as clorofilas a e b são muito solúveis em etanol (RAHAYUNINGSIH *et al.*, 2018). Os teores de clorofila variaram entre 4,8 a 9,0 mg/g (corridas 13 e 4, respectivamente) do liofilizado para a clorofila a e entre 0,6 e 2,5 mg/g do liofilizado (corridas 13 e 11, respectivamente) para a clorofila b. Observa-se que os maiores valores de clorofila b (Cl b) alcançados ocorreram em baixa temperatura ( $-5^{\circ}\text{C}$ ) com valores de 2 a 2,5 mg/g do liofilizado (corridas 1, 2 e 11), a clorofila a (Cl a) apresentou valores mais altos em concentrações de 60% de etanol, sendo as corridas 2, 4 e 6, o mesmo não se estende a corrida 8, supõem-se que o tempo elevado de extração (240 min) possa ter influenciado; ou em menor temperatura de extração ( $-5^{\circ}\text{C}$ ), no caso das corridas 1, 2, 9 e 11.

Segundo Damodaran, (2010), em meio com elevada concentração de álcoois, como o etanol, a clorofilase é ativada. A ação enzimática promove a retirada do grupo fitol da clorofila, a qual é facilitada por ser insolúvel em solventes polares. A saída do fitol possibilita a formação do clorofilídeo, o qual sofre esterificação produzindo o etil clorofilídeo, responsável pela alteração da coloração verde. As concentrações de etanol utilizadas e a dispersão da enzima devido ao rompimento da parede celular no processo de trituração das folhas de mandioca facilitaram a interação enzima-clorofila.



**Figura 4.4.** Teores de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b) e carotenoides totais (CT), expressos em  $\mu\text{g/g}$  do liofilizado, e parâmetros de cor instrumental e imagens para os pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca com etanol, em cada corrida do planejamento. (a) corrida 1, (b) corrida 2, (c) corrida 3, (d) corrida 4, (e) corrida 5, (f) corrida 6, (g) corrida 7, (h) corrida 8, (i) corrida 9, (j) corrida 10, (k) corrida 11, (l) corrida 12, (m) corrida 13, (n) corrida 14 e (o) corrida 15.

Em relação ao teor de carotenóides totais (CT), o menor valor foi observado para a corrida 14 (50% de etanol, 15°C e 135 min de extração) (1,5 mg/g do liofilizado) e o maior valor para a corrida 11 (50% de etanol, -5°C e 240 min) (2,7 mg/g do liofilizado). Os valores de CT observados nos pós liofilizados obtidos no domínio experimental são considerados elevados. Kulkarni e Nikolov (2018) reportaram a extração de uma fração de pigmento de alto valor, contendo clorofila e carotenóides, no processo de extração de proteína de microalgas, com etanol. O etanol pode afetar diretamente a permeabilidade da parede celular (RIVERA; CANE, 2012), sendo também um importante solvente para a extração de carotenóides, uma vez que estes compostos bioativos se encontram nas paredes celulares e nas células vegetais. De acordo com Santamaría-Fernández e Lübeck (2020), quase 80% das proteínas foliares se encontram nos cloroplastos, onde 50% delas fazem parte das membranas tilacóides, as quais englobam lipídios e pigmentos, como a clorofila e os carotenóides. Assim, os resultados obtidos na pesquisa indicam que a utilização do etanol na extração das proteínas da mandioca favorece, além da extração das proteínas, a extração da clorofila e de carotenóides.

Para os parâmetros de cor instrumental, os valores de  $L^*$  indicam cores mais escuras ( $L^* < 50$ ), a ordem de grandeza e os valores negativos de  $a^*$  ratificam a presença da coloração verde, os valores positivos de  $b^*$  indicam a presença da coloração amarela nas amostras. Os valores de  $c^*$  indicam uma saturação moderada das cores do liofilizado e os valores de  $h^\circ$  próximos a 110° indicam que os produtos apresentaram uma coloração amarela-esverdeada.

Os produtos das corridas 1 (Figura 4.4a), 2 (Figura 4.4b), 5 (Figura 4.4e), 9 (Figura 4.4i), 11 (Figura 4.4k) e 15 (Figura 4.4o), visivelmente, apresentaram a coloração verde mais próxima a tonalidade das folhas de mandioca, resultado coerente com a variação de cor que apresentam (menores valores). A variação total de cor ( $\Delta E$ ) mede a diferença entre os valores das coordenadas de cor  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  para as folhas da mandioca *in natura* e os valores das coordenadas de cor para os pós liofilizados. De acordo com Adekunle et al. (2010) as diferenças na cor compreensível podem ser calculadas e classificadas em três tipos; sendo: muito distintas ( $\Delta E > 3$ ), distintas ( $1,5 < \Delta E < 3$ ) e pequenas diferenças ( $1,5 < \Delta E$ ). Com base nesta classificação, as cores dos produtos obtidos em todas as corridas são classificadas como muito

distintas da cor das folhas da mandioca *in natura*; sendo que a menor variação foi observada para a corrida 5 (Figura 4.4e) (60% de etanol, 15°C e 30 min de extração).

### 3.1.4. Rendimento de extração de proteína e rendimento de concentrado proteico

No início dos processos de extração das proteínas a quantidade de proteína disponível nas folhas da mandioca *in natura* era de 6,86 g/100 g ( $\approx 28,2\%$  bs). Na Tabela 4.4 são apresentados os valores obtidos para o rendimento de concentrado proteico (RCP) e o rendimento de extração de proteína (REP).

**Tabela 4.4.** Rendimentos de concentrado proteico (RCP) e de extração de proteína (REP), para a extração de proteínas da mandioca com etanol, em cada corrida do planejamento.

Corrida	RCP (%)	REP (%)
1	5,46	8,85
2	13,84	24,10
3	15,76	22,14
4	12,08	20,75
5	7,68	10,78
6	12,92	22,25
7	14,18	19,67
8	10,18	16,91
9	9,24	15,84
10	15,69	23,17
11	11,89	19,06
12	14,35	20,91
13	14,45	26,71
14	14,84	19,01
15	12,87	24,55

A corrida 3 (40% de etanol, 35°C e 135 min de extração) foi a que apresentou maior valor de RCP (15,85%), enquanto o maior valor de REP (26,7%) foi observado para o produto da corrida 13 (50% de etanol, 15°C e 135 min de extração). De acordo com Cui *et al.* (2017), o uso de solventes orgânicos como etanol, acetona e butanol, pode promover a desnaturação das

proteínas de plantas, pois estes tipos de solventes apresentam uma certa hidrofobicidade, o que permite maior interação com proteínas com a cadeia lateral não-polar e proteínas ligadas a lipídeos. Assim, supõem-se que o elevado teor de lipídeos nas folhas de mandioca (4%), quando comparadas à outras hortaliças como no caso do espinafre (0,17%), pode ter favorecido a extração das proteínas (KALA; PRAKASH, 2007). Seguindo Zhang *et al.* (2017), o uso do etanol na solução extratora tende a diminuir a constante dielétrica do meio, o que promove a precipitação da proteína. O etanol permite ainda remover lipídeos, pigmentos presentes nos vegetais como a clorofila, carotenóides e compostos fenólicos.

Em um estudo de extração de proteínas do resíduo de chá, Chen *et al.* (2012) avaliaram a combinação de álcool-álcali como solução extratora. De acordo com o estudo, o aumento da concentração de etanol aumentou a produção de proteínas, até uma concentração de 60%, acima da qual o rendimento de extração diminuiu. Assim, os autores definiram como sendo 60% a concentração de etanol mais adequada para o processo estudado. Como, no presente estudo a concentração máxima de etanol utilizada foi justamente 60%, há um indicativo de que para obter maiores valores de RCP e REP seria necessária a combinação de outros solventes ou de outros métodos.

### **3.1.5. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo**

Os resultados obtidos para a capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO) são apresentados na Tabela 4.5. Rodsamran e Sothornvit (2018) estudaram as propriedades físico-químicas e funcionais das proteínas obtidas de um sobrenadante (leite de coco) e um precipitado (torta do óleo). Os autores identificaram os concentrados obtidos do sobrenadante por SPP e o concentrado obtido do precipitado por PPP. Para o SPP foram observados valores de CAA entre 0,78 a 2,92 g/g bs e para o PPP valores entre 2,30 a 3,43 g/g bs. Para a CAO os valores variaram entre 2,26 a 3,25 g/g bs para SPP e entre 2,60 a 3,40 g/g bs para PPP. Estes valores foram bem inferiores aos observados a CAA e a CAO dos concentrados proteicos da mandioca. Os altos valores de CAA e CAO se assemelham aos resultados encontrados para concentrados proteicos de grão-de-bico que variaram de 4,90



a 7,94 g/g bs e 10,90 a 14,60 g/g bs, respectivamente (AYDEMIR; YEMENICIOGLU, 2013).

**Tabela 4.5.** Capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO) para os pós liofilizado obtido da extração de proteínas da mandioca com etanol, em cada corrida do planejamento.

Corrida	CAA (g/g bs)	CAO (g/g bs)
1	8,70 ± 0,08	6,74 ± 0,13
2	6,86 ± 0,10	5,86 ± 0,33
3	8,30 ± 0,27	7,32 ± 0,16
4	7,75 ± 0,13	7,19 ± 0,74
5	7,47 ± 0,19	7,05 ± 0,32
6	7,77 ± 0,26	7,35 ± 0,12
7	8,64 ± 0,42	6,56 ± 0,28
8	7,23 ± 0,44	6,56 ± 0,24
9	7,53 ± 0,89	7,10 ± 0,26
10	7,78 ± 0,60	7,11 ± 0,08
11	7,45 ± 0,37	6,73 ± 0,17
12	6,52 ± 0,03	6,24 ± 0,47
13	6,55 ± 0,31	7,34 ± 0,23
14	6,71 ± 0,17	6,45 ± 0,04
15	6,92 ± 0,22	6,59 ± 0,32

De acordo com Damodaran (2010), quando solventes orgânicos, como o etanol, são utilizados na extração, estes provocam alteração na solubilidade da proteína, ocasionando o aumento de forças eletrostáticas intra e intermoleculares. Porém, quando há interação intramolecular repulsiva, desencadeia o desdobramento da proteína, o que pode viabilizar a redução da solubilidade da proteína em meio aquoso. Para o concentrado proteico da mandioca, os valores da CAA foram maiores do que os valores da CAO em todas as corridas, com exceção da corrida 13. Estes resultados sugerem que o uso do etanol na solução extratora promoveu nas proteínas uma maior exposição de locais hidrofílicos, com maior afinidade por moléculas de água.

As proteínas vegetais que possuem altos valores de capacidade de absorção de água e óleo (CAA e CAO) podem ser utilizadas como ampliadores em produtos cárneos ou produtos correspondentes a carne para o mercado vegano, como por exemplo, a adição de grão de bico e farinha de ervilha na elaboração de mortadela suína com baixo teor de gordura que promoveu um aumento do rendimento devido a uma menor perda de líquido (SANJEEWA *et al.*, 2010).

### 3.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Um planejamento experimental foi utilizado para definir a concentração de etanol na solução extratora, a temperatura e o tempo para o processo de extração de proteínas das folhas de mandioca. Para definir a condição ótima foi utilizado um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken, a metodologia de superfícies de resposta (MSR) e a função desejabilidade. Foram avaliados os efeitos das variáveis de entrada (variáveis independentes): concentração de etanol (E) na extração da proteína (40 – 60%), temperatura de extração (T) (-5° – 35°C) e tempo de extração (t) (30 – 240 min), sobre as respostas (variáveis dependentes): teor de clorofila a (Cl a), teor de clorofila b (Cl b), teor de carotenóides totais (CT), variação de cor ( $\Delta E$ ), quantidade de proteína bruta (PB), teor de flavanóis totais (FAT), teor de compostos fenólicos totais (CF), rendimento do concentrado proteico (RCP), rendimento de extração da proteína (REP), capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO). A matriz do planejamento experimental e os resultados para as respostas avaliadas são apresentados na Tabela 4.6.

A ANOVA mostrou que as variáveis concentração de etanol, temperatura e tempo de extração não apresentaram efeitos significativos ( $p > 0,05$ ), lineares, quadráticos e de interação sobre as respostas clorofila a, clorofila b, carotenóides totais, compostos fenólicos totais, flavanóis totais, proteína bruta, variação de cor, rendimento de extração de proteína e capacidade de absorção de óleo (dados não mostrados). Porém, não há uma comprovação efetiva que possa ratificar que a hipótese nula é falsa, o que só poderia ser viável com a ampliação do domínio experimental. Por outro lado, a ANOVA mostrou que as variáveis concentração de etanol, temperatura e tempo de extração exerceram efeitos significativos ( $p \leq 0,05$ ) sobre as respostas rendimento do concentrado proteico (RCP) e capacidade de absorção de água (CAA) (Tabela 4.7). A qualidade dos dados é ratificada pelos baixos valores dos resíduos, além da distribuição aleatória, o que pode ser constatado nos Apêndices 4.III (RCP) e 4.IV (CAA).

**Tabela 4.6.** Matriz do planejamento fatorial Box-Behnken e os resultados para as respostas do Planejamento para a extração de proteínas da mandioca, utilizando o etanol como solvente.

Corrida	Variáveis originais (variáveis codificadas)			Respostas (Variáveis dependentes)										
	E (X <sub>1</sub> )	T (X <sub>2</sub> )	t (X <sub>3</sub> )	Cl a	Cl b	CT	ΔE	PB	FAT	CF	RCP	REP	CAA	CAO
1	40	-5	135	8553,58	2385,13	2483,05	4,12	39,21	1,63	198,4	5,46	8,85	8,70	6,74
2	60	-5	135	7671,20	2053,67	2519,84	4,51	42,09	1,71	206,7	13,84	24,10	6,86	5,86
3	40	35	135	5115,79	1194,70	1794,22	7,31	33,95	1,30	200,9	15,76	22,14	8,30	7,32
4	60	35	135	8968,13	1234,63	2295,79	7,68	41,52	1,21	142,0	12,08	20,75	7,75	7,19
5	40	15	30	6165,00	1745,37	1771,50	3,13	33,95	4,08	362,9	7,68	10,78	7,47	7,05
6	60	15	30	7179,60	1018,11	2583,91	7,48	41,63	1,67	221,0	12,92	22,25	7,77	7,35
7	40	15	240	5175,21	1082,25	1972,35	6,21	33,52	3,99	216,7	14,18	19,67	8,64	6,56
8	60	15	240	6187,26	1324,14	1796,08	8,08	40,14	0,69	143,1	10,18	16,91	7,23	6,56
9	50	-5	30	7149,34	1300,03	2264,23	4,64	41,43	0,83	184,1	9,24	15,84	7,53	7,10
10	50	35	30	5514,52	1582,49	1665,57	7,50	35,70	1,03	188,3	15,69	23,17	7,78	7,11
11	50	-5	240	8593,67	2457,65	2697,28	5,85	38,76	1,33	232,6	11,89	19,06	7,45	6,73
12	50	35	240	6494,27	1159,13	1869,11	7,58	35,21	1,92	189,7	14,35	20,91	6,52	6,24
13	50	15	135	4846,92	650,06	1568,11	8,46	44,66	2,13	274,4	14,45	26,71	6,55	7,34
14	50	15	135	5164,88	1529,75	1479,02	9,57	30,97	2,70	160,9	14,84	19,01	6,71	6,45
15	50	15	135	6653,29	1418,72	2126,84	5,11	46,09	1,46	224,2	12,87	24,55	6,92	6,59

E: concentração de etanol na solução extratora (%); T: temperatura de extração (°C); t: tempo de extração (min); Cl a: Clorofila a (µg/g do liofilizado); Cl b: Clorofila b (µg/g do liofilizado); CT: carotenóides totais (µg/g do liofilizado); ΔE: variação total de cor; PT: proteína bruta (%); FAT: flavanóis totais (mg eq. catequina/g do liofilizado); CF: compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g do liofilizado); RCP: rendimento do concentrado proteico (%); REP: rendimento de extração de proteína (%); CAA: capacidade de absorção de água (g/g bs); CAO: capacidade de absorção de óleo (g/g bs).

**Tabela 4.7.** Efeito estimado, erro puro e grau de significância estatística ( $p$ ) para os fatores do modelo rendimento do concentrado proteico (RCP) e capacidade de absorção de água (CAA).

Fator	RCP			CAA		
	Efeito estimado	Erro puro	$p$	Efeito estimado	Erro puro	$p$
Média	<b>11,9385</b>	<b>0,3005</b>	<b>0,0006</b>	<b>7,6664</b>	<b>0,0541</b>	<b>&lt;0,0001</b>
$E$	1,4859	0,7359	0,1809	<b>-0,8743</b>	<b>0,1325</b>	<b>0,0222</b>
$E^2$	1,9121	0,5416	0,0717	<b>-0,8163</b>	<b>0,0975</b>	<b>0,0140</b>
$T$	<b>4,3642</b>	<b>0,7359</b>	<b>0,0273</b>	-0,0481	0,1325	0,7515
$T^2$	0,3592	0,5416	0,5755	-0,3588	0,0975	0,0666
$t$	1,2675	0,7359	0,2272	-0,1760	0,1325	0,3154
$t^2$	0,9025	0,5416	0,2376	-0,2353	0,0975	0,1373
$E \times T$	<b>-6,0344</b>	<b>1,0408</b>	<b>0,0285</b>	0,6422	0,1874	0,0756
$E \times t$	<b>-4,6234</b>	<b>1,0408</b>	<b>0,0471</b>	<b>-0,8547</b>	<b>0,1874</b>	<b>0,0448</b>
$T \times t$	-1,9919	1,0408	0,1958	-0,5863	0,1874	0,0888

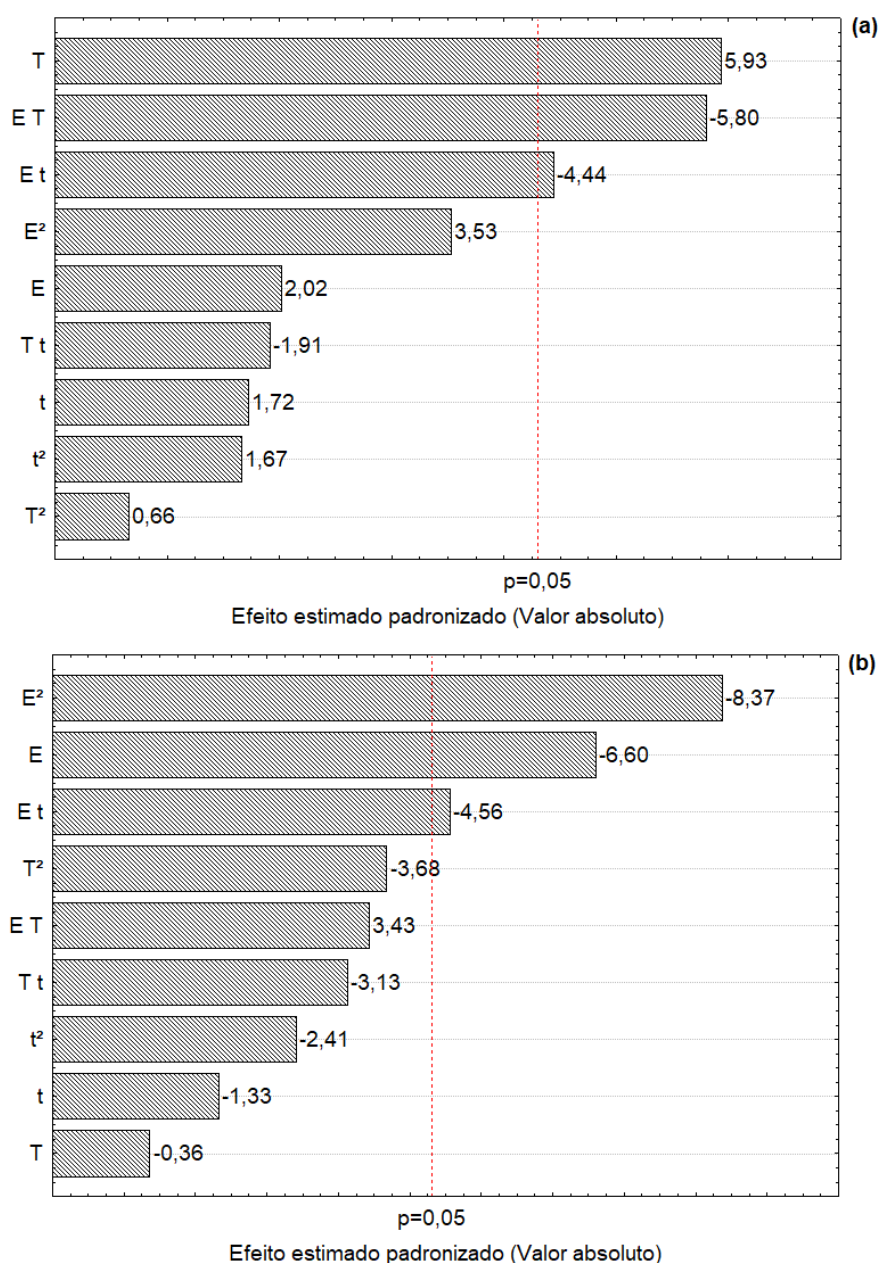
Variáveis significativas ( $p \leq 0,05$ ) em negrito.

A temperatura linear ( $T$ ) apresentou um efeito positivo sobre a resposta RCP, indicando que o aumento do nível mais baixo (-1) para o nível mais alto (+1) da variável temperatura ocorreu um aumento no valor do RCP, no processo de extração de proteínas, em meio alcoólico, com etanol. Foram também observados efeitos lineares significativos, com sinais negativos, para as interações concentração de etanol x temperatura e concentração de etanol x tempo de extração sobre a resposta RCP ( $p \leq 0,05$ ).

Os efeitos estimados dos fatores de entrada em relação a resposta (CAA), no domínio experimental, foram significativos para as variáveis independentes concentração de etanol, linear ( $E$ ) e quadrático ( $E^2$ ). O efeito negativo observado para  $E$  indica que a redução da concentração de etanol do maior nível (+1) para o menor nível (-1) provocou o aumento da CAA do concentrado proteico liofilizado. O efeito da interação entre as variáveis independentes concentração de etanol x tempo de extração foi também linear ( $Et$ ) também foi significativo sobre a resposta CAA ( $p \leq 0,05$ ).

O gráfico de Pareto (Figura 4.5) descreve os efeitos estimados padronizados que cada variável dependente desempenhou sobre as respostas. A linha vertical tracejada que atravessa os efeitos é indicativa do limite de rejeição da hipótese nula ( $p = 0,05$ ), considerando 95% de confiança. Logo,

apenas os efeitos posicionados à direita desta linha são considerados para efeitos de avaliação das respostas. Na Figura 4.5a, o gráfico de Pareto confirma que os efeitos T, ET e Et foram significativos para a resposta RCP e a Figura 4.5b mostra que os efeitos E, E<sup>2</sup> e Et foram os significativas para a resposta CAA, pois ultrapassaram o limite de rejeição da hipótese nula à 95% de significância.



**Figura 4.5.** Gráfico de Pareto para a resposta rendimento do concentrado proteico - RCP (a) e capacidade de absorção de água – CAA (b).

Na Tabela 4.8 são apresentados os resultados da ANOVA, para a regressão dos modelos ajustados às respostas RCP e CAA, utilizando apenas os efeitos significativos; sendo: a soma quadrática, os graus de liberdade, a média quadrática, os valores de F calculado e tabelado, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), bem como as equações ajustadas para as respostas.

O valor do  $R^2$  demonstra que o modelo explica 97% da variação total dos dados observados para a variável RCP e 86% para a variável CAA. A ANOVA evidencia que o modelo ajustado para a resposta RCP e CAA (equações na Tabela 4.8) foi significativo, com 95% de confiança; mas apenas preditivo para RCP por ser o único a apresentar regressão significativa, ou seja,  $F_{\text{calculado}}$  superior ao  $F_{\text{tabelado}}$ ; a falta de ajuste foi não significativa para RCP e CAA pois apresentou  $F_{\text{calculado}}$  inferior ao  $F_{\text{tabelado}}$ . As superfícies de resposta e as curvas de contorno obtidas pelos modelos de regressão para RCP e CAA, são apresentadas na Figura 4.6.

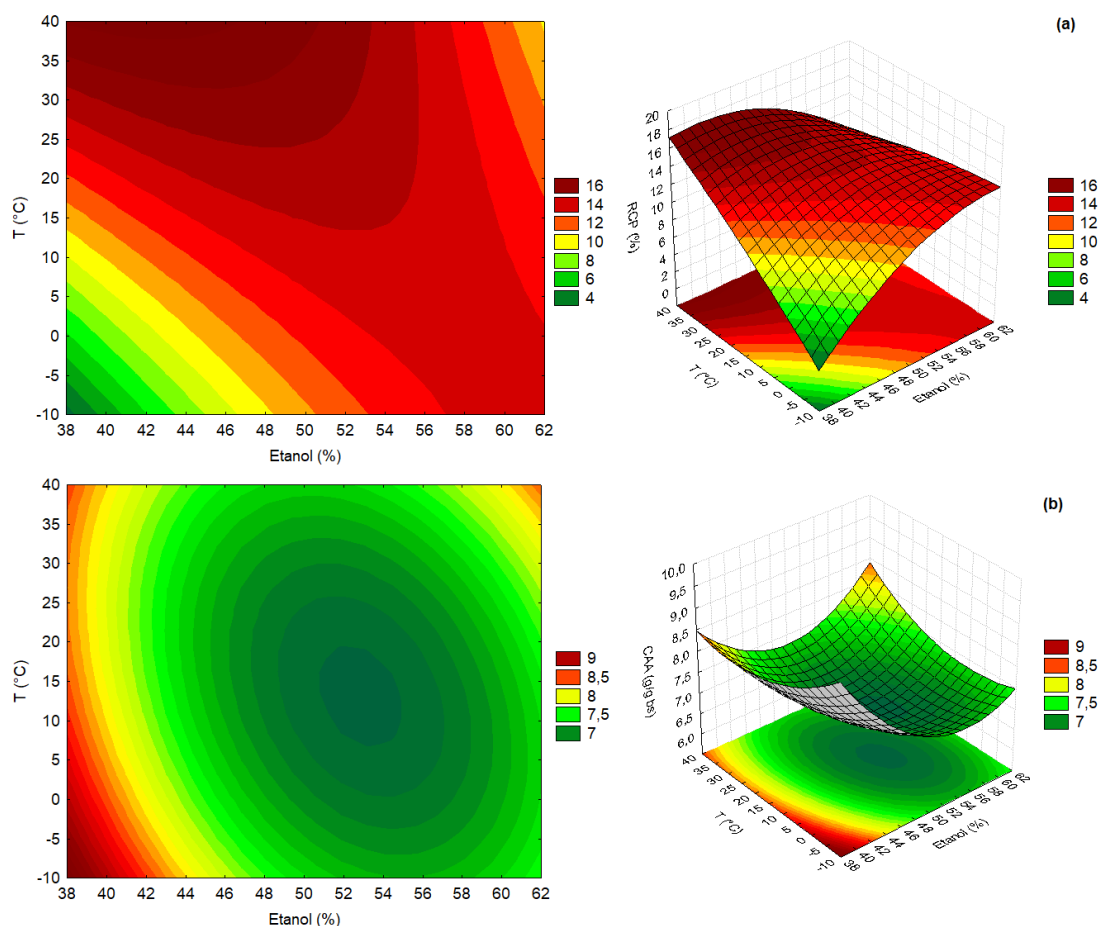
**Tabela 4.8.** Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo ajustado às respostas RCP e CAA.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$	$R^2$
<b>Rendimento do concentrado proteico (RCP)</b>						
Regressão	123,1898	9	13,6878	15,42	4,77	0,965
Resíduos	4,4372	5	0,8874			
Falta de ajuste	2,2708	3	3,9677	0,70	19,16	
Erro Puro	2,1664	2	0,7569			
Total	127,6270	14	1,0832			
RCP = $-68,74 + 2,51E - 0,02E^2 + 0,95T - 0,0009T^2 - 0,015ET - 0,002 \times 135E - 0,0005 \times 135T + 18,13$						
<b>Capacidade de absorção de água (CAA)</b>						
Regressão	5,9537	9	0,6615	3,53	4,77	0,864
Resíduos	0,9379	5	0,1876			
Falta de ajuste	0,8676	3	0,3437	8,24	19,16	
Erro Puro	0,0702	2	0,2892			
Total	6,8915	14	0,0351			
CAA = $28,22 - 0,83E + 0,008E^2 - 0,09T + 0,0009T^2 + 0,002ET - 0,0004 \times 135E - 0,0001 \times 135T + 2,53$						

SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

As equações obtidas para as respostas RCP e CAA (Tabela 4.8) produziram as curvas de contorno e a superfície de respostas, apresentadas na

Figura 4.6. A Figura 4.6a mostra que o RCP foi mais expressivo na faixa de temperatura de 30 a 40°C e concentrações de etanol de 38 a 50%. A Região ótima para CAA (Figura 4.6b) ocorre entre 38 e 42% de etanol e em menores temperaturas de processo (-10 a 10°C), ou seja, produziram concentrados proteicos com os maiores valores de CAA (> 8 g/g bs).

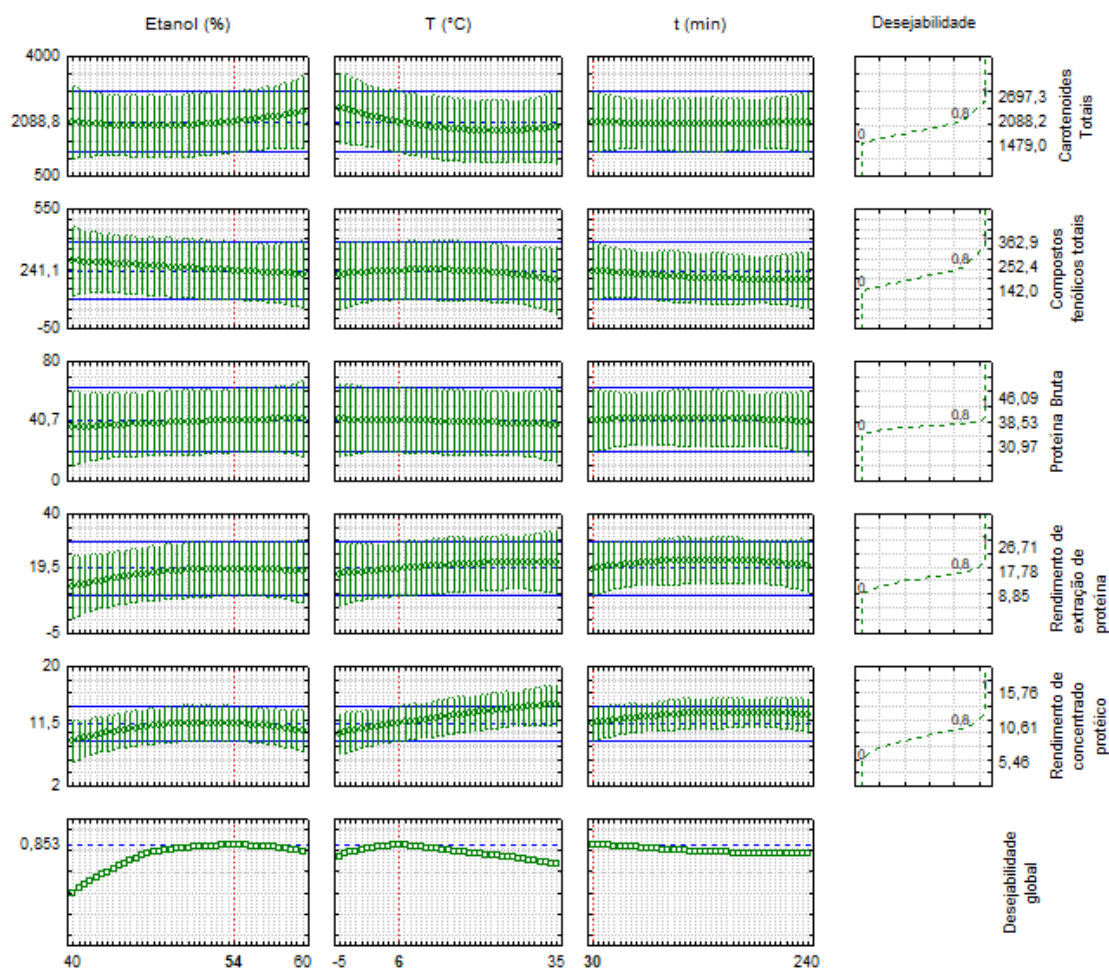


**Figura 4.6.** Curva de contorno e superfície de resposta para RCP (a) e CAA (b) a 135 min.

A condição ótima para o processo de extração de proteínas da mandioca foi definida, a partir da desejabilidade global, apresentada na Figura 4.7. Assim, a condição ótima para conduzir o processo de extração de proteínas da folha da mandioca é: solução extratora com 54% de etanol, temperatura de processo de 6°C e um tempo de extração de 30 min; para uma desabilidade global de 0,853, no domínio experimental. Nesta condição os valores estimados para as respostas foram 2000 µg de carotenóides totais/g do liofilizado, 240 mg eq. ácido gálico/g do liofilizado, 40% de proteína bruta, 19%



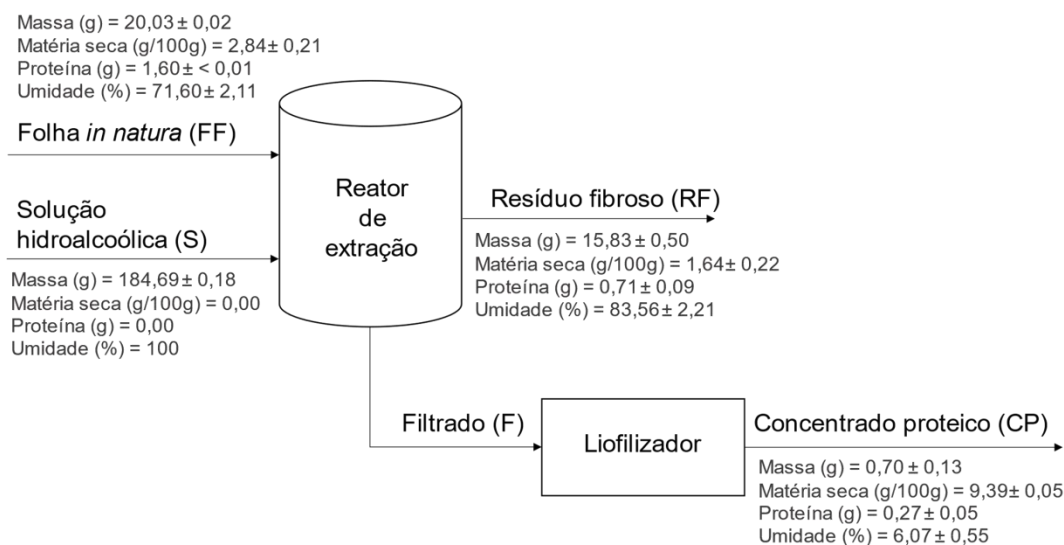
de rendimento de extração de proteína e 11% de rendimento de concentrado proteico.



**Figura 4.7.** Gráfico da função desejabilidade para carotenoides totais (CT), compostos fenólicos totais (CF), proteína bruta (PB), rendimento de extração de proteínas (REP) e rendimento de concentrado proteico (RCP).

### 3.3. BALANÇO DE MASSA DA EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE PROTEÍNAS COM ETANOL

Os valores de massa, matéria seca, proteína bruta e umidade para cada etapa do processo de extração são apresentados no fluxograma da Figura 4.8. A padronização das etapas foi realizada com intuito de disponibilizar ao final do processamento um material liofilizado com maior conteúdo de proteínas possível.



**Figura 4.8.** Balanço de massa para o processo de extração de proteínas da mandioca, utilizando o etanol como solvente.

As folhas da mandioca utilizadas apresentaram  $\approx 3$  g de matéria seca e  $\approx 30\%$  de proteína bruta, o equivalente a  $1,60 \text{ g} \pm < 0,01$  de proteína disponível para extração. Os valores médios da triplicata mostraram um maior valor de proteína no resíduo fibroso ( $0,71 \text{ g} \pm 0,09$ ) do que no concentrado proteico liofilizado ( $0,27 \text{ g} \pm 0,05$ ), o que confirma que a extração de proteínas da folha da mandioca, utilizando solução hidroalcoólica de etanol como solvente de extração, não foi satisfatória, havendo uma perda de  $0,62 \text{ g}$  de proteína ( $\approx 38\%$ ), a qual pode ser justificada pela etapa de filtração e pelo número de lavagens necessárias para a retirada do solvente antes da etapa de liofilização, o que ressalta a necessidade de uma adaptação do método para a recuperação das proteínas solúveis no meio. A caracterização do concentrado proteico (Tabela 9 a seguir) indica um rendimento de extração de proteínas de  $20,83\%$ , sendo assim, foi realizado efetivamente um REP de  $0,33 \text{ g}$  de proteína da mandioca, como citado anteriormente, o concentrado proteico liofilizado apresentou  $0,27 \text{ g}$  de proteína o que nos remete a uma diferença de massa  $0,06 \text{ g}$  de proteína.

### 3.4. CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO

O concentrado proteico liofilizado obtido da mandioca, na condição definida como ótima para o processo de extração ( $54\%$  de etanol,  $6^\circ\text{C}$  e  $30 \text{ min}$

de extração) foi caracterizado para compostos fenólicos totais (CF), carotenóides totais (CT), proteína bruta (PB), rendimento da extração de proteínas (REP) e rendimento do concentrado proteico (RCP). Os resultados são apresentados na Tabela 4.9. As corridas foram realizadas em dias diferentes, para assegurar a repetibilidade dos experimentos.

**Tabela 4.9.** Análises do concentrado proteico liofilizados obtido na condição definida como ótima, para o processo de extração de proteínas da mandioqueira.

Análise	Valor experimental	Valor teórico	Resíduo (%)
CFT (mg eq. ácido gálico/g do liofilizado)	191,16 ± 16,34	240	20,35
CT (µg/g do liofilizado)	1912,48 ± 36,40	2000	4,38
PB (%)	41,10 ± 0,83	40	2,75
RCP (%)	12,26 ± 2,23	11	11,45
REP (%)	20,83 ± 3,62	19	9,63

CFT: compostos fenólicos totais; CT: carotenóides totais; PB: proteína bruta; RCP: rendimento do concentrado proteico; REP: rendimento de extração de proteína.

Os valores médios determinados para as propriedades avaliadas foram muito similares aos valores estimados pela função desejabilidade, o que valida a metodologia utilizada para definir a condição ótima para o processo de extração de proteínas da folha da mandioqueira. A maior variabilidade foi observada para a propriedade compostos fenólicos totais o qual apresentou um percentual de resíduo de 20,35.

### 3.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE DO CONCENTRADO PROTEICO

A Tabela 4.10 apresenta os dados para a adsorção e a dessorção de umidade a 25°C, do concentrado proteico liofilizado, obtido nas condições definidas como ótimas para o processo de extração de proteínas da mandioqueira, utilizando o etanol.

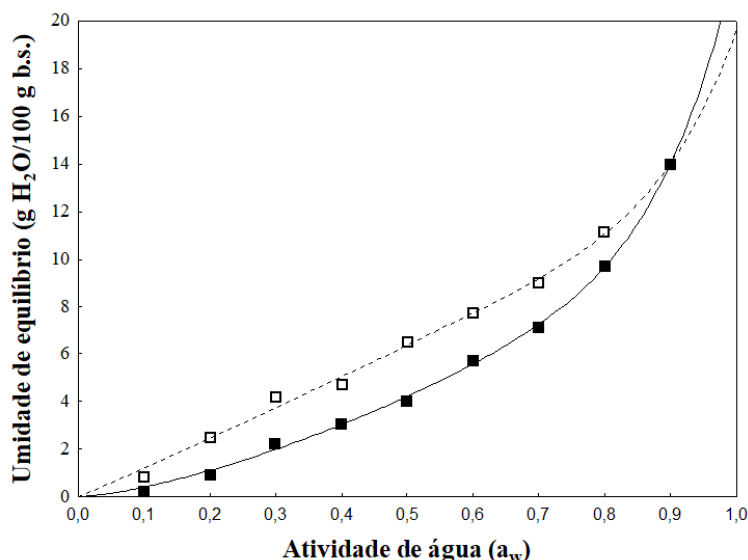
**Tabela 4.10.** Dados de sorção de umidade a 25°C para o concentrado proteico liofilizado da mandiocqueira.

Adsorção		Dessorção	
$a_w$	Umidade (m)	$a_w$	Umidade (m)
0,10	0,24	0,90	14,00
0,20	0,93	0,80	11,14
0,30	2,24	0,70	9,02
0,40	3,07	0,60	7,73
0,50	4,01	0,50	6,51
0,60	5,73	0,40	4,73
0,70	7,13	0,30	4,18
0,80	9,72	0,20	2,47
0,90	14,00	0,10	0,85

$a_w$ : atividade de água (adimensional); m: umidade de equilíbrio (g H<sub>2</sub>O/100 g bs)

De acordo com os valores tabelados, umidades inferiores a 5,73 g H<sub>2</sub>O/100 g bs asseguram a estabilidade microbiológica do produto ( $a_w < 0,6$ ) (SCOTT, 1957). O baixo nível de umidade de equilíbrio observado a 90% de umidade relativa do ar ( $a_w = 0,9$ ) (14 g H<sub>2</sub>O/100 g bs) indica que o concentrado proteico obtido da mandiocqueira, por extração com etanol, apresenta baixa higroscopicidade. Resultado semelhante ao encontrado para folhas de *Moringa oleifera* à 27°C, onde isoterma de adsorção ao alcançar uma  $a_w$  de 0,8 o material apresentou uma umidade de equilíbrio em torno de 12 H<sub>2</sub>O/100 g bs e para isoterma de dessorção a umidade de equilíbrio foi próximo a 10 H<sub>2</sub>O/100 g bs (SOBOWALE *et al.*, 2017).

De acordo com o método de classificação quantitativa proposto por Blahovec e Yanniotis (2009), a isoterma de adsorção do concentrado proteicos apresentou comportamento do tipo III e a isoterma de dessorção se comportou como tipo II (semelhante a Langmuir), conforme apresentado na Figura 4.9. De acordo Al-Muhtaseb, McMinn e Magee (2002) isotermas do tipo III são comumente relacionadas à alimentos ricos em componentes solúveis. Assim, uma vez que o concentrado proteico foi obtido por extração com solução hidroalcoólica, o comportamento observado para a isoterma de adsorção é altamente justificável. Por outro lado, segundo Damodaran *et al.* (2010) a forma de uma isoterma pode ser atribuída a fatores como: a composição da amostra, a estrutura física da matriz, os métodos aplicados e os pré-tratamentos.



**Figura 4.9.** Isothermas de adsorção (■) e dessorção (□) de umidade a 25°C, para o concentrado proteico da mandioca. As linhas representam as isothermas previstas pelo modelo de Peleg, para adsorção (\_\_\_\_) e dessorção (\_\_\_\_).

A isoterma de adsorção (Figura 4.9) apresenta um comportamento praticamente linear até um nível de  $a_w$  de 0,4, a partir do qual o comportamento passa a ser exponencial. Assim, embora o concentrado proteico apresente baixa higroscopicidade, ele requer maiores cuidados quando manipulado ou armazenado em ambiente com umidade relativa (UR) maior que 40%; pois ele estará mais susceptível a ganhar umidade. Em tais condições é recomendado que o produto permaneça acondicionado em uma embalagem com baixa permeabilidade ao vapor de água.

Na Figura 4.9 é possível observar também a histerese, laço formado entre as isothermas de adsorção e dessorção, o qual se estendeu em toda a faixa de  $a_w$  avaliada, sendo mais representativo na região de  $a_w$  intermediária; região de condensação capilar, a qual está mais intimamente ligada com o fenômeno de histerese (LABUZA, 1968). Histerese com comportamento semelhante foi observada por Kapsalis (1981), para a carne de porco liofilizada.

Na Tabela 4.11 são apresentados os valores dos parâmetros dos modelos, e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), desvio médio relativo (P), erro médio quadrático (RMSE) e distribuição de resíduos; estatísticas estas que

foram utilizadas para avaliar a qualidade dos ajustes dos modelos matemáticos aos dados de sorção de umidade, do concentrado proteico.

**Tabela 4.11.** Parâmetros dos ajustes dos modelos matemáticos aos dados de sorção de umidade do concentrado proteico da mandioca.

Modelo	Adsorção				Dessorção			
	Parâmetro	R <sup>2</sup>	P (%)	RMSE	Parâmetro	R <sup>2</sup>	P (%)	RMSE
Halsey	a = 4,97 b = 1,43 Resíduos (T)	0,957	90,80	0,87	a = 20,11 b = 1,93 Resíduos (T)	0,921	41,04	1,11
Henderson	a = 0,18 b = 0,97 Resíduos (A)	0,998	22,40	0,61	a = 0,05 b = 1,42 Resíduos (A)	0,992	14,16	1,06
Oswin	a = 4,08 b = 0,58 Resíduos (A)	0,982	57,20	0,57	a = 5,92 b = 0,42 Resíduos (T)	0,963	28,12	0,77
Ferro-Fontan	a = 2,51 b = 1,85 r = 0,47 Resíduos (A)	0,995	30,68	0,30	a = 4,56 b = 5,37 r = 0,36 Resíduos (A)	0,991	11,31	0,37
GAB	m <sub>0</sub> = 4,80 c = 1,50 K = 0,81 Resíduos (A)	0,997	23,60	0,22	m <sub>0</sub> = 6,72 c = 3,22 K = 0,67 Resíduos (A)	0,995	9,68	0,27
Blahovec & Yanniotis	a <sub>1</sub> = 0,18 b <sub>1</sub> = -0,13 a <sub>2</sub> = 15,49 b <sub>2</sub> = 16,63 Resíduos (A)	0,998	21,87	0,20	a <sub>1</sub> = 0,08 b <sub>1</sub> = 0,01 a <sub>2</sub> = 1,67 b <sub>2</sub> = 1,61 Resíduos (A)	0,996	7,87	0,23
Smith	a = -0,23 b = 6,21 Resíduos (A)	0,998	14,03	0,17	a = 1,67 b = 5,76 Resíduos (T)	0,966	26,32	0,74
Peleg	k <sub>1</sub> = 11,16 n <sub>1</sub> = 9,43 k <sub>2</sub> = 11,53 n <sub>2</sub> = 1,46 Resíduos (A)	0,999	11,94	0,15	k <sub>1</sub> = 13,01 n <sub>1</sub> = 1,04 k <sub>2</sub> = 6,63 n <sub>2</sub> = 9,81 Resíduos (A)	0,997	7,09	0,23

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; RMSE: erro médio quadrático; P: desvio médio relativo; m<sub>0</sub> = umidade da monocamada (g H<sub>2</sub>O/100 g bs); m = umidade de equilíbrio (g H<sub>2</sub>O/100 g bs); c = constante relacionada ao calor de sorção; a, b, c, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>, n<sub>1</sub> e n<sub>2</sub> = constantes dos modelos; A = aleatório; T = tendencioso.

Para a isoterma de adsorção, todos os modelos apresentaram R<sup>2</sup> > 0,99, exceto para os modelos de Halsey e Oswin; enquanto para a isoterma de dessorção apenas os ajustes dos modelos de Henderson, Ferro-Fontan, GAB, Blahovec & Yanniotis e Peleg apresentaram R<sup>2</sup> > 0,99. Segundo Peng *et al.* (2007) recomenda que o valor de P inferior a 10%, para efeitos práticos, o foi observado apenas para os modelos de GAB, Blahovec & Yanniotis e Peleg,

para a dessorção. Entre estes, o modelo de Peleg foi o que apresentou o menor valor de P para a adsorção (11,9%), bem como o menor valor de RMSE e distribuição aleatória dos resíduos, tanto para adsorção quanto para a dessorção. Desta, forma, embora seja uma equação de quatro parâmetros, o modelo de Peleg é o mais indicado para descrever as isotermas de adsorção e dessorção do concentrado proteico da folha da mandioqueira a 25°C. Os bons ajustes do modelo de Peleg aos dados experimentais de sorção podem ser observados Figura 9.

Os valores de umidade da monocamada ( $m_0$ ) estimados pelo modelo de GAB foram de 4,80 g H<sub>2</sub>O/100 g bs para a adsorção e de 6,72 g H<sub>2</sub>O/100 g bs para a dessorção (Tabela 4.11). Para a adsorção, o valor de  $m_0$  indica a condição de umidade na qual o produto estará menos susceptível aos processos degradativos, isto é, na região de maior estabilidade do produto. Por outro lado, o valor de  $m_0$  para a dessorção indica que o produto não deverá atingir valores menores que este durante um processo de secagem, para evitar gastos desnecessários de energia (POMBO *et al.*, 2019; ARAÚJO; PENA, 2022).

#### 4. CONCLUSÃO

O isolamento das proteínas das folhas da mandioca utilizando o etanol como solução extratora foi eficiente, mas foram observadas quantidades relevantes de carotenóides - CT (1479 a 2697  $\mu\text{g/g}$  do liofilizado), compostos fenólicos totais - CFT (142-362,9 mg eq. ácido gálico/g do liofilizado) e flavanóis totais - FT (0,69 a 4,10 mg eq. catequina/g liofilizado) no concentrado proteico. No ponto central do planejamento (50% de etanol, 15°C e 135 min de extração) foi observado o maior teor de proteína bruta (46%). Os maiores teores de clorofila b (Cl b) foram observados em baixa temperatura (-5°C), enquanto os maiores teores de clorofila a (Cl a) ocorreram em concentrações de 60% de etanol. A função desejabilidade indicou como condição ótima para o processo de isolamento das proteínas das folhas da mandioca, com solução hidroalcoólica de etanol, a concentração de etanol na solução extratora de 54%, uma temperatura de 6°C e um tempo de extração de 30 min. As isotermas de adsorção e dessorção de umidade do concentrado proteico se comportaram como tipo III e tipo II, respectivamente, e mostraram que o produto apresenta baixa higroscopicidade e que terá estabilidade microbiológica se apresentar umidade inferiores a 5,7 g  $\text{H}_2\text{O}/100$  g bs (5,4% base úmida). O modelo de Peleg se mostrou muito eficiente na predição das isotermas de adsorção e dessorção de umidade do produto, a 25°C.



## REFERÊNCIAS

ADEKUNTE, A. O.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; SCANNELL, A. G. M.; O'DONNELL, C. P. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. **Food Chemistry**, v.122, p. 500-507, 2010.

AKYÜZ, A.; ERSUS, S. Optimization of enzyme assisted extraction of protein from the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves for alternative plant protein concentrate production. **Food Chemistry**, v. 335, n. 127673, 2021.

AL-MUHTASEB, A. H.; McMINN, W. A. M.; MAGEE, T. R. A. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. **Transactions of the Institution of Chemical Engineers**, v. 80, Part C, p. 118-128, 2002.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Gaithersburg, Md: AOAC International; 1997.

ARAÚJO, A. L.; PENA, R. S. Moisture desorption behavior and thermodynamic properties of pulp and seed of jambolan (*Syzygium cumini*). **Heliyon**, v. 8, e09443, 2022.

AYDEMIR, L.Y.; YEMENICIOGLU, A. Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 686 – 694, 2013.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos**. 3 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007.

BLAHOVEC, J.; YANNIOTIS, S. Modified classification of sorption isotherms. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 72-77, 2009.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, E. O.; SILVA, B. C.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. C.; VISENTAINER, J. V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 48, p. 1-9, 2014.

CAO, X.; WEN, H.; LI, C.; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 2, p. 184-189, 2009.

CHEN, X.; LUO, H.; YU, J.; YUE, P.; ZHOU, L.; REN, Y.; WANG, Y.; FANG, W.; LI, X. Comparison of Two Protein Extraction Methods for Tea Residues. **Applied Mechanics and Materials**, v.138-139, p. 933-936, 2012.

CUI, Q.; NI, X.; ZENG, L.; TU, Z.; LI, J.; SUN, K.; CHEN, X.; LI, X. Optimization of Protein Extraction and Decoloration Conditions for Tea Residues. **Horticultural Plant Journal**, v.3, n. 4, p. 172-176, 2017.

DAMODARAN, S. Água e gelo (Capítulo 1). In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 Ed. Editora Artmed, Porto Alegre, p.25-74, 2010.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas (Capítulo 5). In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição. Editora Artmed, Porto Alegre, p.179-262, 2010.

DELCOUR, J.A. AND VAREBEKE, D.J. A new colourimetric assay for flavanoids in pilsner beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 91, p. 37-40, 1985.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables, **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

FONTAN, C. F.; CHIRIFE, J.; SANCHO, E.; IGLESIAS, H. A. Analysis of a model for sorption phenomena in foods. **Journal of Food Science**, v. 47, 1590-1595, 1982.

HALSEY, G. Physical desorption on non-uniform surfaces. **Journal of Chemistry and Physics**, v. 16, n. 10, p. 931-937, 1948.

HENDERSON, S. M. A basic concept of equilibrium moisture. **Agricultural Engineering**, v. 33, n. 1, p. 29-32, 1952.

HOUDE, M.; KHODAEI, N.; BENKERROUM, N.; KARBOUNE, S. Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. **Food Chemistry**, v. 245, p. 367-376, 2018.

KALA, A.; PRAKASH, J. Nutrient Composition and Sensory Profile of Differently Cooked Green Leafy Vegetables. **International Journal of Food Properties**, v. 7, n. 3, p. 659-669, 2007.

KAPSALIS, J. G. Moisture sorption hysteresis. In: Rockland, L. B.; Beuchat, L. R. **Water Activity: Theory and Applications to Food**. New York: Marcel Dekker Inc; p. 143-177 1981.

KULKARNI, S.; NIKOLOV, Z. Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 35, p. 185-193, 2018.

LABUZA, T. P. Sorption phenomena in foods. **Food Technology**, v. 22, n. 3, p. 263-272, 1968.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. v. 1, n. 1, p. F4.3.1-8, 2001.

MAROULIS, Z. B.; TSAMI, E.; MARINOS-KOURIS, D. Application of the GAB Model to the Moisture Sorption Isotherms for Dried Fruits. **Journal of Food Engineering**, v. 7, p. 63-78, 1988.

MCMURROUGH, I.; BAERT, T. Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 100: p. 409-416, 1994.

OSWIN, C. R. The kinetics of package life. III isotherm. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 65, n. 12, p. 419-421, 1946.

PAIVA, A. C.; ALFENAS, R. C. G.; BRESSAN, J. Efeitos da alta ingestão diária de proteínas no metabolismo. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 22, n. 1, p. 83-88. 2007.

PALAVICINI, S. M. S.; SOUZA, R. C.; MARCO, M.; BERNARDI, J. L.; PAROUL, N.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L.; STEFFENS, C. Sequential and fractional cold extraction of *Plantago major* and *Plantago tomentosa* seeds. *Scientia Plena*, v. 18, n. 2, 020201, 2022.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 36 - 60, 2013.

PELEG, M. Assessment of a semi-empirical four parameter general model for sigmoid moisture sorption isotherms. **Journal of Food Process Engineering**, V. 16, p. 21-37, 1993.

PENG, G.; CHEN, X.; WU, W.; JIANG, X. Modeling of water sorption isotherm for corn starch. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 562-567, 2007.

PÉREZ SIMBA, B. P.; GARRIDO ESPINOSA, J. A.; ENDARA VARGAS, A. B.; LANDÁZURI FLORES, A. C.; RAMÍREZ CÁRDENAS, L. de L. Á. Optimization of the extraction and precipitation process of a leaf protein concentrate from *Moringa oleifera* Lam. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 75, n. 1, p. 9813-9821, 2022.

POMBO, J. C. P.; CARMO, J. R.; ARAÚJO, A. L.; MEDEIROS, H. H. B. R.; PENA, R. S. Moisture Sorption Behavior of Cupuassu Powder. **The Open Food Science Journal**, v. 11, p. 66 – 73, 2019.

RAHAYUNINGSIH, E.; PAMUNGKAS, M. S.; OLVIANAS, M.; PUTERA, A. D. P. Chlorophyll extraction from suji leaf (*Pleomele angustifolia* Roxb.) with ZnCl<sub>2</sub> stabilizer. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 1028-1036, 2018.

RIVERA, S.; CANE, R. Influence of Sample Processing on the Analysis of Carotenoids in Maize. **Molecules**, v. 17, p. 11255-11268, 2012.

RODSAMRAN, P.; SOTHORNVIT, R. Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing. **Food Chemistry**, v. 241, p. 364-371, 2018.

SANJEEWA, W. G. T.; WANASUNDARA, J. P. D.; PIETRASIK, Z.; SHAND, P. J. Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours and application in low-

fat pork bologna as a model system. **Food Research International**, v. 43, p. 617 – 626, 2010.

SANTAMARÍA-FERNÁNDEZ, M.; LÜBECK, M. Production of leaf protein concentrates in green biorefineries as alternative feed for monogastric animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 268, p. 114605-114624, 2020.

SCOTT, W.J. Water relations of food spoilage microorganisms. **Advances in Food Research**, v.7, p.83-127, 1957.

SILVA, D. A.; PENA, R. S. Thermodynamic properties of Buriti (*Mauritia flexuosa*) tree gum. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 390-398, 2018.

SILVA, J. L.; GOMES, S. D.; COELHO, S. R. M.; EVARINI, J.; FERRI, P.; CEREDAS, M. P.; LUCAS, S. D. Obtenção de concentrado proteico de folhas e parte aérea da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2279-2288, 2012.

SMITH, S. E. The Sorption of Water Vapor by High Polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, n. 3, p. 646-651, 1947.

SOARES, I. A.; TÉO, M. S.; DEBASTIANI, C.; RETUCI, V. S.; BARONI, S. Concentrado proteico obtido das folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de três variedades comerciais. **Acta Ambiental Catarinense**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2016.

SOBOWALE, S. S.; OKE, M. O.; ODUNMBAKU, L. A.; ADEBO, O. A. Equilibrium sorption isotherms of *Moringa oleifera* leaves at different temperatures, **African Journal of Science, Technology, Innovation and Development**, ISSN: 2042-1338, 2017.

TEO, C. R. P. A.; PRUDENCIO, S. H.; COELHO, S. R. M.; TEO, M. S. Obtenção e caracterização físico-química de concentrado proteico de folhas de mandioca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, p. 993-999, 2010.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 6, n. 1 p. 1.1.1-1.1.8, 2002.

ZHANG, W.; GRIMI, N.; JAFFRIN, M. Y.; DING, L.; TANG, B. A short review on the research progress in alfalfa leaf protein separation technology. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, p. 2894-2900, 2017.

**CAPÍTULO V**

---

**EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS FOLHAS DA MANDIOQUEIRA  
POR VIA ÁCIDA**

## RESUMO

Essa pesquisa analisou o processo de extração de proteínas da mandioca, utilizando solução ácida tamponada como solvente extrator. Um planejamento Box-Behnken foi utilizado para avaliar o efeito do pH (2, 3,5 e 5), da temperatura (5, 32,5 e 60°C) e do tempo (30, 135 e 240 min) do processo. Os concentrados proteicos liofilizados foram avaliados de acordo com o rendimento de extração de proteína (REP), rendimento do concentrado proteico (RCP), o teor de composto fenólicos totais (CFT), flavanóis totais (FT), clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), carotenóides totais (CT), cor instrumental, capacidade de absorção de água (CAA) e óleo (CAO). Os resultados encontrados de REP foram superiores ao RCP em todas as corridas. Os produtos mantiveram teores relevantes de CT, CFT e FT. A um nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ) as repostas Cl a, Cl b, CT,  $\Delta E$ , CFT, FT e PB apresentaram efeito significativo. Mediante a metodologia de superfície de resposta e a função desejabilidade foi estipulado como condição ótima de processo para a extração de proteínas da folha da mandioca um pH de 3,5, temperatura de 16°C e tempo de extração de 120 min. Os concentrados proteicos liofilizados gerados nessa condição foram avaliados segundo comportamento higroscópico, onde as isotermas de adsorção e dessorção de umidade do concentrado proteico se comportaram como tipo IIb e tipo III, respectivamente. Os resultados indicam que o produto possui baixa higroscopicidade, logo apresentará estabilidade microbiológica à umidade menor que 6,04 g H<sub>2</sub>O/100 g bs. O modelo de Peleg se mostrou muito eficiente na predição das isotermas de adsorção e dessorção de umidade do produto, a 25°C.

## 1. INTRODUÇÃO

O consumidor e a indústria de alimentos têm modificado seu perfil ao passar dos anos, no que se refere ao consumo de alimentos à base de plantas e, conseqüentemente, debate-se cada vez mais o uso de resíduos e folhas vegetais para a valorização do setor agroalimentar. Um exemplo é o uso de proteínas obtidas de matrizes e subprodutos vegetais (AHLSTRÖM *et al.*, 2022).

Pesquisas tem sido realizada com diferentes fontes de proteína, como as folhas de mandioca, de maneira a garantir um futuro para a oferta de proteínas alternativas. Além de serem fontes de proteínas, esses produtos apresentam antioxidantes, vitaminas, minerais, pigmentos adequados como corantes e outros compostos bioativos com alto valor de mercado (TENORIO *et al.*, 2018).

A utilização da mandiocueira se torna viável para a extração de proteína, por serem as folhas uma parte subutilizada desta espécie vegetais, que é cultivada principalmente para o uso da raiz. Quando avaliado o parâmetro produção, a mandioca é considerada a sétima cultura mais importante do mundo; imprescindível em países dos trópicos, onde é a principal cultura alimentar (AYELE *et al.*, 2021). Devido a duas características importantes, ser uma fonte mais barata e a abundância de proteína, a mandiocueira se torna uma opção promissora na nossa região, e a implementação de tratamentos tecnológicos adequados para a obtenção de concentrados proteicos manifesta-se como uma possibilidade (TEO *et al.*, 2010).

A extração de proteínas foliares envolve como etapas principais a ruptura do tecido, precipitação de proteínas por um ou mais tratamentos e concentração de proteínas (TENORIO *et al.*, 2016), a produção dos concentrados protéicos foliares pode ser realizada pela aplicação de condições ácidas como a coagulação ácida, termocoagulação ácida ou apenas pelo ajuste de pH para precipitação das proteínas com auxílio da centrifugação (TEO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2017). Em consideração a isso, este capítulo tem por objetivo avaliar o processo de extração de proteínas da mandiocueira, por via ácida, e avaliar as características do concentrado proteico obtido.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. MATÉRIA PRIMA

As folhas de mandioca foram coletadas em uma lavoura de 8 meses no município de Salvaterra (Pará, Brasil) (Latitude: 00° 45' 12" S, Longitude: 48° 31' 00" W, altitude de 5 m), durante o mês de junho em 2020. O acesso a espécie utilizada está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, sob o número A5D5AD2.

### 2.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA

A extração das proteínas foi realizada em reator cilíndrico de vidro encamisado com tampa esmerilhada com capacidade para 250 mL, com dimensões externa de 80 mm x 115 mm (H x D) e interna de 50 mm x 100 mm (H x D); com acesso para a entrada de um termômetro e avaliação constante de temperatura. As corridas foram realizadas tomando como base uma massa de 20 g de mandioca *in natura*, com proporção sólido :líquido de 1:10 (folha: tampão, m:v). A matéria prima e a solução extratora foram transferidas para um bécker; com um ultra turrax modelo T25 digital (IKA, Alemanha) a 13.000 rpm/min o material foi triturado e homogeneizado. O líquido verde formado foi colocado no reator para a realização das corridas nas condições pré-estabelecidas.

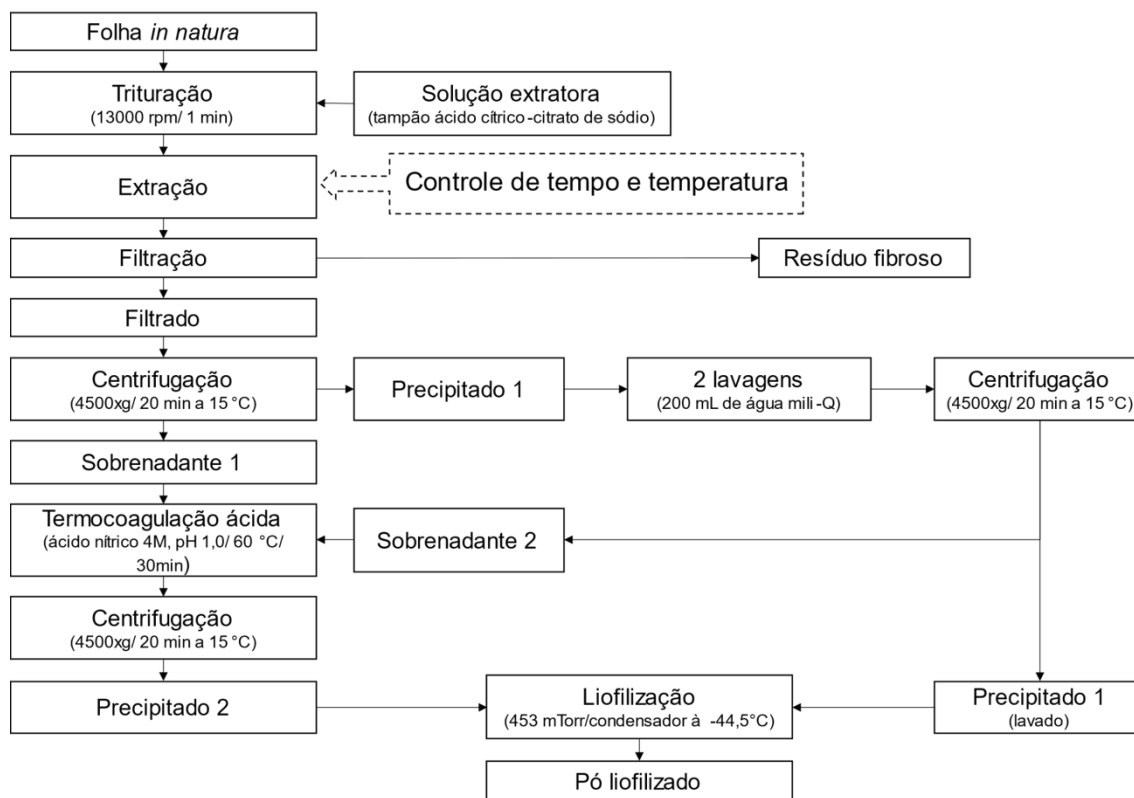
Foi utilizado um planejamento Box-Behnken para extrair proteínas da mandioca, utilizando como solvente de extração tampões ácidos (tampão ácido cítrico-citrato de sódio), para promoção da precipitação das proteínas. Neste planejamento de experimento de três níveis (-1, 0, +1) utilizou-se para as variáveis de entrada: pH, temperatura e tempo de extração. O pH foi utilizado em uma faixa de pH ácida: pH 2 (-1), pH 3,5 (0) e pH 5 (+1); para temperatura utilizou-se 5°C (-1), 32,5°C (0) e 60°C (+1) e para o tempo de extração aplicou-se 30 min (-1), 135 min (0) e 240 min (+1), totalizando 15 corridas com três repetições no ponto, conforme descrito na Tabela 5.1.



**Tabela 5.1.** Níveis codificados e originais das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial do tipo Box-Behnken para extração de proteínas da mandioca, por via ácida.

Corrida	Variável codificada			Variável original		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	pH	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	-1	-1	0	2,0	5	135
2	+1	-1	0	5,0	5	135
3	-1	+1	0	2,0	60	135
4	+1	+1	0	5,0	60	135
5	-1	0	-1	2,0	32,5	30
6	+	0	-1	5,0	32,5	30
7	-1	0	+1	2,0	32,5	240
8	+1	0	+1	5,0	32,5	240
9	0	-1	-1	3,5	5	30
10	0	+1	-1	3,5	60	30
11	0	-1	+1	3,5	5	240
12	0	+1	+1	3,5	60	240
13	0	0	0	3,5	32,5	135
14	0	0	0	3,5	32,5	135
15	0	0	0	3,5	32,5	135

A Figura 5.1 apresenta as principais etapas do processo de extração de proteínas da mandioca utilizando como solução extratora tampão em pH ácido. O material foi liofilizado para a determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT), de flavanóis totais (FT), o percentual de proteína bruta (PB), clorofila a (Cl a) e b (Cl b), carotenóides totais (CT), cor instrumental de acordo com leitura direta em colorímetro digital dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $c^*$ ,  $h$  e variação total de cor ( $\Delta E$ ), rendimento de extração de proteínas (REP), rendimento de concentrado proteico (RCP), capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO).



**Figura 5.1.** Etapas do processo de extração de proteínas da mandioca, por via ácida.

### 2.2.1. Determinação de compostos fenólicos totais e flavanóis totais

A determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) foram realizadas a partir da elaboração de extratos de cada corrida do planejamento experimental produzida, tendo como base o método de Boeing *et al.* (2014).

O método de Folin-Ciocalteu (WATERHOUSE, 2002) foi utilizado para a quantificação do teor de CFT a partir de uma curva analítica de ácido gálico de concentração de 1 a 60 mg de ácido gálico/L (absorbância entre 0,0258 e 0,8474). Este método é fundamentado na reatividade dos polifenóis, quando sujeitos a uma interação entre os ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, por 30 min; o que acontece por um mecanismo de reação engajado, devido a uma transferência de elétrons (mecanismo redox). A sequência reacional ocorreu da seguinte maneira: 250 µL de amostra ou água destilada para o branco, 250 µL de Folin-Ciocalteu 10% e 1250 µL de carbonato de sódio 7,5% foram misturados, após o tempo reacional necessário (30 min) a solução foi lida em espectrofotômetro UV-Visível (Modelo Cary 50, marca Varian) a 760 nm.

A determinação do teor de flavanóis totais (FT) foi realizada de acordo com o método de p-dimetilaminocinamaldeído (DMACA), o qual tem como princípio a condensação da molécula de flavanol com o DMACA, conforme o descrito por McMurrough, Baert (1994) e Delcour, Varebeke e Janssens (1985). A sequência reacional foi: 200 µL de extrato e 1000 µL de p-Dimetilaminocinamaldeído (DMACA) 1% diluído em HCl: metanol resfriado, na proporção de 1:3 (v/v), a mistura foi realizada seguida de um tempo reacional de 10 min, na ausência de luz, e seguiu para posterior leitura em espectrofotômetro a 640 nm.

### **2.2.2. Determinação de proteína bruta**

Para a determinação da proteína bruta das amostras foi utilizado o método de micro-Kjeldahl, de acordo com o método nº 920.87 da AOAC (1997). O método tem como base a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio, mediante digestão com ácido sulfúrico, com posterior destilação para liberação de amônia gasosa, a qual reage com solução de ácido bórico para formação de borato de amônio, seguido de titulação com solução de ácido clorídrico padronizada. O fator de conversão nitrogênio-proteína empregado foi de 5,75 (AOAC, 1997).

### **2.2.3. Determinação da clorofila a, clorofila b e carotenóides totais**

O método de Lichtenthaler e Buschmann (2001) foi utilizado para a determinação do teor de clorofila a (µg/g do liofilizado), clorofila b (µg/g do liofilizado) e carotenóides totais (µg/g do liofilizado). A elaboração dos extratos foi realizada utilizando uma massa de 0,02g do liofilizado obtido em cada corrida, o qual foi macerado com auxílio de grau e pistilo e adição de solução de etanol 95%, o extrato foi filtrado em papel qualitativo para posterior aferição em balão volumétrico de 10 mL com a próprio etanol 95%, seguido de leitura em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 664,1 nm, 648,6 nm e 470 nm.

#### 2.2.4. Análise colorimétrica

A análise colorimétrica dos produtos de cada corrida do planejamento foi feita por meio de leitura direta em um colorímetro digital (Chroma Meter CR-300, Konica Minolta, Japão), tendo como base o sistema CIELAB. A calibração do equipamento foi feita em fonte de luz D65, geometria de visão de 0° (componente especular incluído), valores do branco X = 0,3174 e do cinza Y = 0,3349. Foram determinados os parâmetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $c^*$  e  $h^\circ$  por intermédio da leitura no equipamento e a variação total de cor ( $\Delta E$ ) encontrada por meio da Equação 5.1 (PATHARE, OPARA E AL-SAID, 2013).

$$\Delta E = \left[ (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2 \right]^{1/2} \quad (5.1)$$

onde,  $\Delta L^*$  = variação da luminosidade, indicando a diferença em mais claro (+) e escuro (-),  $\Delta a^*$  = diferença em vermelho (+) e verde (-),  $\Delta b^*$  = diferença em amarelo (+) e azul (-) e  $\Delta E$  = diferença total de cor.

#### 2.2.5. Rendimento de extração de proteína

A partir do cálculo da massa de proteína no concentrado, em relação à massa de proteína na mandioca utilizada na extração foi possível obter o rendimento de extração de proteína (REP, %) (SILVA *et al.*, 2012), conforme a Equação 5.2.

$$\text{REP (\%)} = \frac{\text{PBCP}}{\text{PBIE}} \times 100 \quad (5.2)$$

onde, PBCP é a massa de proteína bruta do concentrado proteico (g) e PBIE é a massa de proteína bruta presente na amostra inicial (g).

#### 2.2.6. Rendimento de concentrado proteico

O rendimento do concentrado proteico (RCP, %) foi quantificado por intermédio da relação entre a massa do concentrado proteico obtido em cada corrida e a massa inicial de mandioca utilizada (SILVA *et al.*, 2012), pela Equação 5.3.

$$\text{RCP (\%)} = \frac{\text{MCP}}{\text{MIE}} \times 100 \quad (5.3)$$

onde, MCP é a massa do concentrado proteico (g) e MIE é a massa de matéria seca nas folhas utilizadas na extração (g).

### 2.2.7. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo

O método descrito por Cao *et al.* (2009) foi utilizado para determinar a capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção óleo (CAO) das proteínas da mandioca. Para isso manteve-se uma proporção de 1:10 (m/v), amostra:água ou amostra:óleo. Pesou-se em torno de 0,05 g de liofilizado em eppendorf, logo para manter a proporção misturou-se 0,5 mL de água destilada ou óleo vegetal refinado, a homogeneização foi realizada com o auxílio de um agitador de tubo vórtex (modelo K45-2820, marca KASVI basic, Brasil), posteriormente o material homogeneizado foi centrifugado (Modelo SL-5GR, marca Spmlaba, São Paulo) a 1200 x g por 25 min. As amostras foram mantidas inclinadas por 30 min com intuito de escoar o líquido remanescente (sobrenadante), não absorvido. O ganho de massa por unidade de massa de proteína, em base seca, foi registrado como a capacidade de absorção de água ou de óleo Equação 5.4.

$$\text{CAA ou CAO} = \frac{m_2}{m_1} \quad (5.4)$$

Onde  $m_1$  é o peso da amostra seca e  $m_2$  é o peso da amostra úmida após a drenagem da água ou óleo.

### 2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se análise de variância – ANOVA a 5% de significância estatística, segundo o teste F com auxílio do programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT INC., 1995). As estatísticas utilizadas para avaliar a qualidade dos ajustes dos modelos matemáticos foram o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o desvio relativo médio (P).

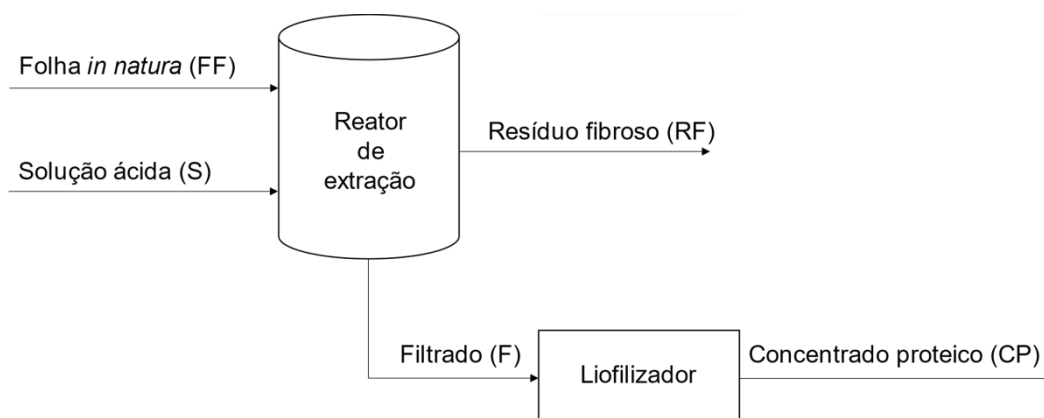
Para definir condições ótimas para o processo de extração de proteínas da mandioca foi utilizada metodologia de superfície de resposta e a função desejabilidade. Os valores de desejabilidade foram definidos como 0 para o

valor mínimo (não desejável), 0,5 como valor médio e 1 como o valor máximo (desejável), para todas as respostas.

Para a obtenção do gráfico da função desejabilidade utilizou-se um fator 40, as taxas de variação da desejabilidade  $s$  e  $t$  foram 1 e 2 para as respostas compostos fenólicos totais (CFT) e carotenóides totais (CT), 2 e 4 para as respostas proteína bruta (PB), rendimento de concentrado proteico (RCP) e rendimento de extração de proteína (REP).

#### 2.4. BALANÇO DE MASSA PARA A EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE PROTEÍNAS POR VIA ÁCIDA

Para um processamento em regime permanente foi feito o acompanhamento das seguintes propriedades: massa (g), matéria seca (g/100g), proteína bruta (g em base seca) e umidade (%). Foram obtidos dados suficientes para a realização do balanço de massa, apresentado na Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Balanço de massa para a extração otimizada de proteína da folha da mandioca por via ácida.

O concentrado proteico obtido na condição ótima foi liofilizado e submetido as análises de proteína bruta (PB), rendimento do concentrado proteico (RCP), rendimento de extração de proteína (REP), compostos fenólicos totais (CF) e carotenóides totais (CT). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 2.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE

Após a realização da condição otimizada do processo de extração das proteínas, o concentrado proteico liofilizado produzido foi avaliado em

equipamento gerador de isotermas (VSA) a 25°C, seguindo o método descrito por Silva e Pena (2018). A amostragem foi realizada, foi utilizado de 800 a 1000 mg do material, o qual foi pesado em cápsula de aço inoxidável, o registro da massa foi feito na própria balança micro analítica do equipamento. A programação do equipamento foi realizada para a coleta de dados de sorção (adsorção e dessorção) de umidade, em uma faixa de atividade de água ( $a_w$ ) de 0,1 a 0,9, pelo método DVS. O equipamento faz o registro ininterrupto das massas e da  $a_w$  até a obtenção de cada condição de equilíbrio, definida pelo registro de três medidas consecutivas, da variação massa/tempo ( $dm/dt$  %), com valor igual ou menor que 0,1. Posteriormente, a amostra foi submetida à secagem, pelo método 920.151 da AOAC (1997), para a determinação da matéria seca. O ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de adsorção e dessorção de umidade do produto são apresentados na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2.** Modelos utilizados na predição da isoterma de sorção.

Modelo matemático	Equação
Blahovec (BLAHOVEC; YANNIOTIS, 2009)	$m = \frac{a_w}{a_1 + (b_1 \cdot a_w)} + \frac{a_w}{a_2 - (b_2 \cdot a_w)}$
Ferro-Fontan (FONTAN <i>et al.</i> , 1982)	$m = \left[ \frac{B}{\ln\left(\frac{A}{a_w}\right)} \right]^{\frac{1}{C}}$
GAB (MAROULIS; TSAMI; MARINOS-KOURIS, 1988)	$m = \frac{a \cdot c \cdot k \cdot a_w}{[(1 - k \cdot a_w) \cdot (1 + (c - 1) \cdot k \cdot a_w)]}$
Halsey (HALSEY, 1948)	$m = \left[ \frac{-a}{\ln a_w} \right]^{\frac{1}{b}}$
Henderson (HENDERSON, 1952)	$m = \frac{-\ln(1 - a_w)}{1 - a_w}$
Oswin (OSWIN, 1946)	$m = a \cdot \left[ \frac{a_w}{1 - a_w} \right]^b$
Peleg (PELEG, 1993)	$m = k_1 \cdot a_w^{n_1} + k_2 \cdot a_w^{n_2}$
Smith (SMITH, 1947)	$m = b + a \cdot \ln(1 - a_w)$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. RESULTADOS PARA A EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA POR VIA ÁCIDA

##### 3.1.1. Compostos fenólicos totais e flavanóis totais

As corridas realizadas foram avaliadas segundo ao teor de compostos fenólicos totais (CFT) e flavanóis totais (FT), descritos na Tabela 5.3. Foram observados teores de CFT entre 395 e 688 mg eq. ácido gálico/g do liofilizado, e entre 4,0 e 12,5 mg eq. catequina/g do liofilizado para FT. Para estas duas propriedades os maiores valores foram observados para a corrida 1, no qual foi utilizado pH 2,0, temperatura de 5°C e tempo de extração de 135 min.

**Tabela 5.3.** Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g liofilizado) e flavanóis totais (mg eq. catequina/g liofilizado) nos pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioqueira por via ácida, em cada corrida do planejamento.

Corrida	Compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g liofilizado)	Flavanóis totais (mg eq. catequina/g liofilizado)
1	688,2±32,73	12,52±1,21
2	592,1±40,62	9,54±0,52
3	395,2±28,87	6,10±0,47
4	426,5±33,01	3,99±0,37
5	655,1±3,39	8,49±0,38
6	622,3±41,97	7,07±0,68
7	472,3±11,01	5,77±0,15
8	635,5±32,26	9,27±0,14
9	527,3±5,85	8,18±0,75
10	580,3±34,43	9,13±0,07
11	580,6±36,25	9,17±0,15
12	417,0±5,53	5,77±0,32
13	529,3±28,03	6,29±0,58
14	587,9±76,34	3,97±0,20
15	535,8±21,75	5,02±0,69

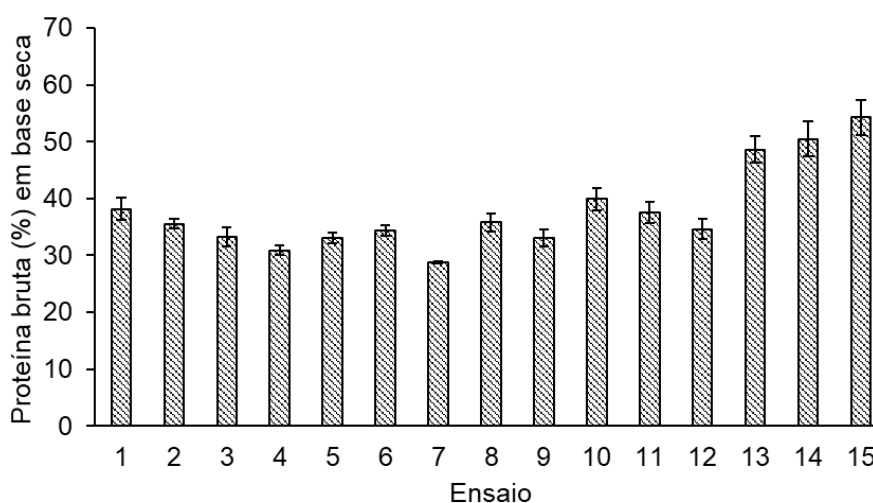
Valores de CFT superiores a 600 mg eq. ácido gálico/g do liofilizado foram observados para as corridas 1, 5, 6 e 8, nas quais a extração foi conduzida em temperaturas baixas (5°C) ou moderadas (32,5°C). Por outro lado, os menores valores de CFT foram observados nos concentrados proteicos obtidos em maiores níveis de temperatura (60°C), principalmente



quando maiores tempos de extração foram empregados. Os resultados de FT mostram os maiores teores encontrados para as corridas 1 e 2 (12,52 e 9,54 mg eq. catequina/g liofilizado, respectivamente), os quais trabalharam em menores temperaturas de extração (5°C), indicando que em temperaturas mais baixas tende-se a preservar essa classe de compostos fenólicos. Zapata, Sepúlveda e Álvarez (2022) constataram a degradação térmica de compostos fenólicos em folhas de urucum, e destacaram a vulnerabilidade desses compostos à luz, pH, oxigênio e ao tipo de solvente utilizado na extração.

### 3.1.2. Proteína bruta

A Figura 5.3, apresenta os percentuais de proteína bruta obtido em cada corrida do planejamento experimental. Os dados mostram que os maiores teores de proteínas ( $\approx 54\%$  de proteína bruta) foram observados para as corridas realizadas no ponto central, no qual a extração foi utilizada em pH 3,5, temperatura 32,5°C, com um tempo de extração de 135 min.



**Figura 5.3.** Teores de proteína bruta (% bs) para os pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca por via ácida, em cada corrida do planejamento.

Damborg *et al.* (2020) avaliaram a precipitação de proteínas de gramíneas, com solução extratora contendo ácido clorídrico (pH 3,0 a 5,0). Os autores verificaram que o método de precipitação utilizado apresentou bons resultados. Teo *et al.* (2010) obtiveram concentrados proteicos das folhas de

mandioca, por termocoagulação ácida. No estudo, as folhas de mandioca foram homogeneizadas em água destilada (1:20, p/v) em pH 7, por 5 min. O material foi filtrado e homogeneizado, como na etapa anterior, e filtrado novamente. O filtrado teve o pH ajustado para 4,0 e foi aquecido a 50°C para a precipitação da proteína. Os autores observaram 51% de proteína bruta.

Quando comparada com o trabalho de Teo *et al.* (2010), a pesquisa atual apresenta algumas vantagens, tais como: as folhas de mandioca não passaram por uma etapa de secagem e não foi necessária uma etapa de padronização do tamanho das partículas; não houve pré-tratamento das folhas em pH diferente ao utilizado na extração, ou seja, a homogeneização e a extração foram realizadas de uma única vez e em um só pH (3,5); não houve a extração de proteínas do resíduo oriundo das filtrações; e a extração foi realizada em temperatura próxima a ambiente (32,5°C).

### **3.1.3. Clorofila a, clorofila b, carotenóides totais e cor instrumental**

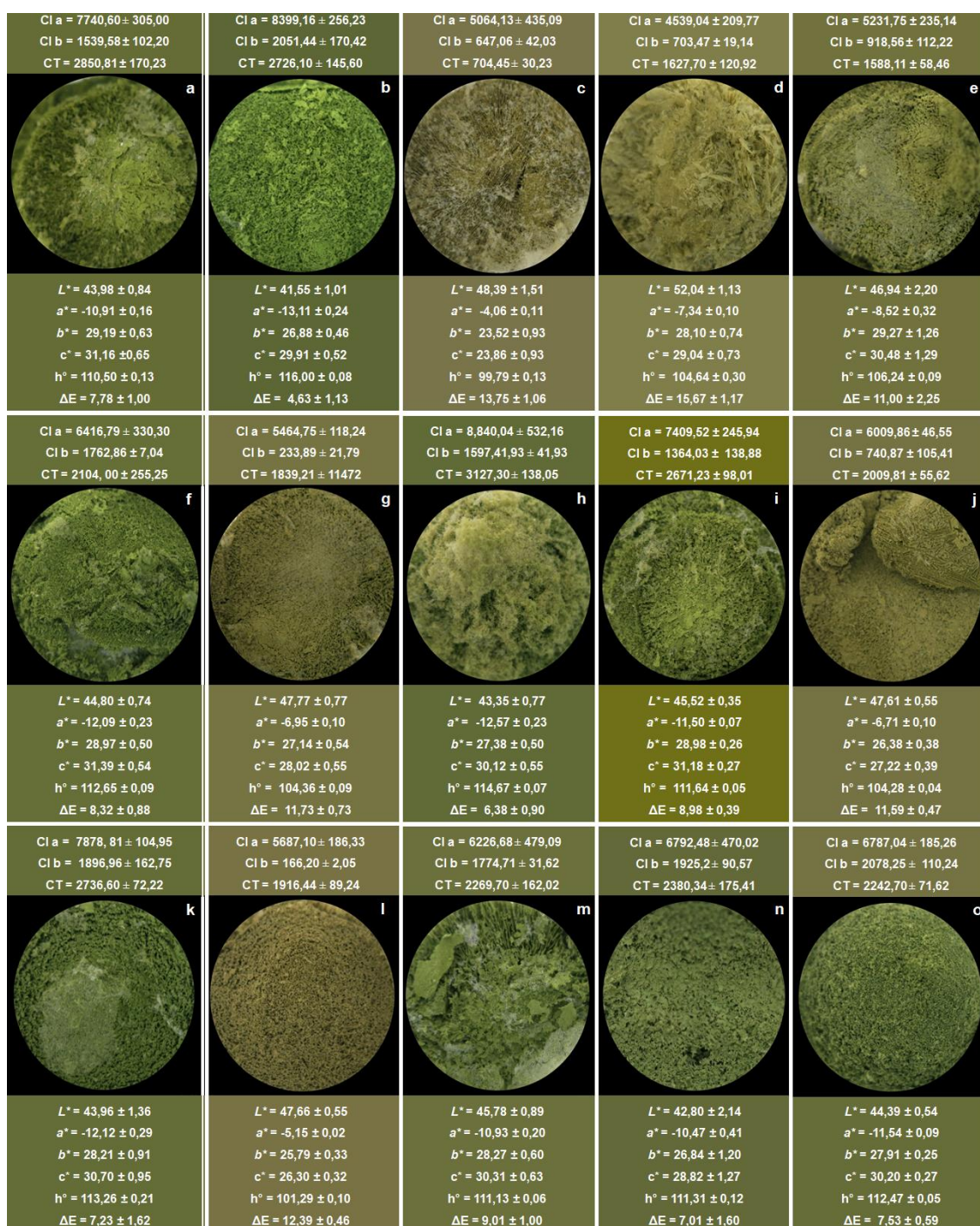
A Figura 5.4 apresenta os resultados para clorofila a (Cl a) ( $\mu\text{g/g}$  do liofilizado), clorofila b Cl b ( $\mu\text{g/g}$  do liofilizado), carotenóides totais (CT) ( $\mu\text{g/g}$  do liofilizado) (Apêndice 5.I) e cor instrumental (Apêndice 5.II), dos concentrados proteicos liofilizados obtidos nas diferentes condições da extração por via ácida.

Os concentrados proteicos liofilizados que apresentaram maiores valores de clorofila a (em torno de 8000  $\mu\text{g/g}$  do liofilizado) foram as corridas número 2 e 8, ambos utilizaram temperaturas mais amenas (5°C e 32,5°C) em mesma faixa de pH (pH 5,0), os menores resultados foram encontrados para as corridas 3 e 4, os quais utilizaram os maiores níveis de temperatura (60°C). Ao avaliar os valores de clorofila b nota-se que os maiores teores foram registrados nas corridas 2 (5°C) e 15 (T= 32,5°C, ponto central), alcançando um valor em torno de 2000  $\mu\text{g/g}$  do liofilizado; os menores resultados se deram nas corridas 7 (32,5°C) e 12 (60°C), os quais apresentaram 233,89 e 166,20  $\mu\text{g/g}$  do liofilizado. Os teores de Cl a serem maiores que os de Cl b já eram esperados, levando-se em conta que na natureza a Cl a apresenta uma proporção maior que a Cl b (3:1) (STREIT *et al.*, 2005). Mediante a comparação dos resultados obtidos em cada corrida, observou-se que ao trabalhar em níveis de temperatura mais elevadas há maior degradação das

clorofilas a e b; diferente do pH, onde o uso de pH níveis mais baixos (pH 2) produziram concentrados proteicos liofilizados com menor teor de Cl a e Cl b.

Ao examinar os valores de Cl a e Cl b em mesma condições de pH e tempo de extração é possível visualizar uma tendência nos teores desses compostos, sendo uma redução de Cl a e Cl b com a mudança de temperatura, ao aumentar de 5°C para 60°C.

Para Cl a com a mudança de temperatura de 5°C para 60°C ocorreu uma redução em 35% em 135 min de extração a pH 2, redução em 20% em 30 min de extração a pH 3,5, redução em 28% em 240 min de extração a pH 3,5, e uma redução em 46% para pH 5 e 135 min de extração.



**Figura 5.4.** Teores de clorofila a (CI a), clorofila b (CI b) e carotenoides totais (CT), expressos em  $\mu\text{g/g}$  do liofilizado, e parâmetros de cor instrumental e imagens para os pós liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca por via ácida, em cada corrida do planejamento. (a) corrida 1, (b) corrida 2, (c) corrida 3, (d) corrida 4, (e) corrida 5, (f) corrida 6, (g) corrida 7, (h) corrida 8, (i) corrida 9, (j) corrida 10, (k) corrida 11, (l) corrida 12, (m) corrida 13, (n) corrida 14 e (o) corrida 15.

A variação de temperatura (5°C para 60°C) também influenciou o teor de Cl b, o qual apresentou comportamento semelhante a Cl a. Ao analisar esses teores em mesmo pH e tempo de extração, constata-se uma redução em função da temperatura, onde em 135 min de extração a pH 2 a redução é de 58%, uma redução de 46% ocorre em 30 min a pH 3,5, a 240 min e pH 3,5 essa redução chega a 91%, em 135 min a pH 5,0 a redução do teor de Cl b é 66%.

Os resultados apresentados de clorofila a e b nos faz inferir que a temperatura apresentou grande influência na degradação das clorofilas, a qual é ratificada pela redução dos teores destes compostos com a variação de temperatura (de 5°C para 60°C). Putriani, Perdana e Nugrahedi (2020) citam degradações que ocorrem devido a ação da temperatura às clorofilas, promovendo a conversão de clorofila em outros derivados como a feofitina, pirofeofitina e feoforbideo durante o processamento.

Quanto aos teores de carotenoides totais (CT) encontrados para cada corrida do planejamento, foi observada uma tendência de extração dos CT no processo de obtenção das proteínas das folhas de mandioca. Ao avaliar individualmente as faixas de pH nota-se que à medida que há o aumento da temperatura ocorre a redução dos teores de CT.

Comparou-se então as mesmas condições de tempo de extração e pH, os quais foram possíveis constatar as reduções dos teores de CT em função da variação de temperatura (5°C para 60°C), respectivamente teve-se a redução em 75% em 135 min de extração a pH 2; redução em 25% em 30 min de extração a pH 3,5, redução em 30% em 240 min de extração a pH 3,5, e uma redução em 40% para pH 5 e 135 min de extração.

Pénicaud *et al.* (2011), afirma que a degradação, por exemplo do  $\beta$ -caroteno, tende a ser maior com elevação da temperatura independente das vias de degradação (oxidação enzimática, foto oxidação, etc.).

Os concentrados proteicos oriundos das corridas 3 (Figura 5.4c), 4 (Figura 5.4d), 7 (Figura 5.4g), 10 (Figura 5.4j) e 12 (Figura 5.4l) apresentaram colorações marrom-oliva (valores de  $h^\circ$  próximos), o que pode ser atribuído à saída do grupo fitol, devido ao baixo pH e a alta temperatura, enfatiza-se que na corrida 7 a temperatura de extração utilizada foi de 32,5°C, diferente das demais corridas (60°C); mesmo não sendo uma temperatura tão elevada o

tempo de exposição (240 min) do material à condição de pH (2,0) e temperatura (32,5°C) pode ter sido suficiente para atingir a mesma matiz das corridas 3, 10 e 12, variando apenas a intensidade da coloração. De acordo com Haisman e Clarke (1975) a conversão de clorofila/feofitina pode ser facilitada por temperaturas a partir de 60°C; o mesmo é citado por Ahmed, Kaur e Shivhare (2002), os quais afirmam que a coloração verde brilhante para marrom-oliva ocorre por ação da temperatura, a qual é acompanhada pela conversão da clorofila em feofitina.

Alguns concentrados proteicos liofilizados apresentaram coloração verde mais intensa: corridas 1 (Figura 5.4a), 2 (Figura 5.4b), 5 (Figura 5.4e), 6 (Figura 5.4f), 8 (Figura 5.4h), 11 (Figura 5.4k), 13 (Figura 5.4m), 14 (Figura 5.4n) e 15 (Figura 5.4o), onde a coloração verde brilhante característica da clorofila tende a ser alterada em meio contendo ácido fraco, motivo pelo qual há a saída do íon magnésio, causando a remoção do grupo fitol e promovendo a formação de feoforbídeo (cor verde oliva) (MERCADANTE, 2018).

A corrida 9 (Figura 5.4i) apresentou maior destaque visualmente mantendo sua coloração diferente das demais. Nesta corrida as condições de processo utilizadas foram pH 3,5, 5°C e 30 min de extração, condições mais brandas quando comparadas as demais do planejamento; a partir disso pode-se supor que a trituração das folhas facilitaram a ação enzimática sobre o material, seguida do uso de uma baixa temperatura de extração (5°C) que pode ter ativado a clorofilase e removido o grupo fitol, formando possivelmente clorofilidas (verde), já que a temperatura ótima de atividade enzimática é entre 60 e 82°C (STREIT *et al.*, 2005; MERCADANTE, 2018).

#### **3.1.4. Rendimento de extração de proteína e rendimento de concentrado proteico**

Tendo como base a quantidade de proteína disponível de 6,86g de proteínas/100 g de folha *in natura* ( $\approx 28,19\%$  bs) no início do processo, montou-se a Tabela 5.4, com os valores de RCP e REP. A corrida 14 (pH 3,5, 32,5°C e 135 min de extração) foi a que apresentou maior valor de RCP (23,72%) e maior valor de REP (49,55%). Os menores resultados de RCP e REP

ocorreram na corrida 3 (pH 2, 60°C e 135 min), 13,76% e 18,92%, respectivamente.

**Tabela 5.4.** Rendimentos de concentrado proteico (RCP) e de extração de proteína (REP), para a extração de proteínas da mandioca por via ácida, em cada corrida do planejamento.

Corrida	RCP (%)	REP (%)
1	22,17	35,01
2	18,25	26,82
3	13,76	18,92
4	14,91	19,04
5	15,55	21,31
6	15,46	21,96
7	16,06	19,11
8	18,35	27,18
9	13,92	19,05
10	17,15	28,33
11	19,35	30,08
12	16,37	23,47
13	20,55	41,28
14	23,72	49,55
15	16,75	37,62

Damborg *et al.* (2020) extraíram proteínas de materiais vegetais em processo semelhante a este estudo, contudo os autores aplicaram técnicas distintas para a precipitação das proteínas, sendo uma por meio da temperatura (60°C e 80°C) e outra por acidificação do meio (pH de 3,0 a 5,0, com variação de 0,5). Os autores observaram os maiores rendimentos de concentrado proteico (60-71% bs) em pH 4,0, e neste trabalho quando comparado o resultado foi inferior para REP (49,55%) em pH 3,5. Em estudo realizado com torta prensada de colza foi avaliado o efeito do pH no rendimento de concentrado proteico. Os autores correlacionaram altos rendimentos em função do pH baixo utilizado para precipitar a proteína, entre pH 3,5 - 4,0, alcançando um teor 33% (AHLSTRÖM *et al.*, 2022).

Em estudo com folha de capim como fonte de proteína foi realizada a extração de proteínas por um método combinado de acidificação e aquecimento (KAMMES *et al.*, 2011). A acidificação foi realizada com HCl (pH 3,3), e as folhas foram mantidas na solução extratora, sob aquecimento a

100°C e 140°C. Os concentrados proteicos obtidos nas diferentes condições apresentaram menos de 40% bs de proteína bruta, valor inferior ao encontrado neste estudo.

Embora os rendimentos de extração de proteína (REP) sejam considerados altos (18,9-49,5% bs), para o processo de extração de proteína da mandioca por via ácida, os rendimentos de concentrado proteico (RCP) (13,8-23,7% bs), no domínio experimental, foram inferiores aos citados nos estudos anteriores. Este resultado sugere que uma quantidade considerável de outros constituintes foi extraída juntamente com as proteínas.

### 3.1.5. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo

A Tabela 5.5, apresenta os dados de capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO), para o concentrado proteico da mandioca, obtido por via ácida.

**Tabela 5.5.** Capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO) para os pós liofilizado obtido da extração de proteínas da mandioca por via ácida, em cada corrida do planejamento.

Corrida	CAA (g/g bs)	CAO (g/g bs)
1	5,49±0,20	5,57±0,07
2	5,63±0,12	5,19±0,17
3	5,89±0,26	5,86±0,08
4	6,71±0,20	7,32±0,36
5	5,44±0,37	5,77±0,71
6	5,11±0,31	4,32±0,37
7	6,61±1,00	6,41±0,07
8	5,50±0,53	6,74±0,21
9	5,89±0,50	5,44±0,29
10	5,40±0,06	6,04±0,28
11	5,76±0,01	6,20±0,28
12	5,89±0,29	6,05±0,07
13	5,48±0,65	7,19±0,62
14	6,43±0,21	7,92±0,60
15	6,48±0,41	6,93±0,34

Para um isolado proteico obtido das folhas de moringa, Adewumi, Felix-Minnaar e Jideani (2021) obtiveram um valor de 1,5 g/g para CAA e 0,89 g/g para CAO; valores estes bem inferiores aos observados para o concentrado



proteico da mandioca, obtido no presente trabalho. Fuhrmeister e Meuser (2003) relataram para produtos comerciais valores de CAA de 4 g/g para um isolado proteico de ervilha e 4,6 g/g para um isolado de proteína de soja. Por sua vez, os autores observaram valores de CAA de 1,5 a 2,7 g/g, para isolados proteicos de ervilha, obtidos por meio aquoso, por precipitação ácida, calor e ácido-calor. Assim, os valores de CAA e CAO observados para o concentrado proteico da mandioca obtido por via ácida foram bem maiores do que os valores observados para concentrados proteicos de outras fontes vegetais. Supõem-se que as diferenças nas condições de extração (aquecimento e/ou ácido) facilitaram a exposição de maior número de sítios hidrofóbicos, o que permitiria maior agregação das proteínas; a possível presença de outros constituintes nos concentrados proteicos liofilizados, como os carboidratos, por exemplo, podem ter contribuído para este resultado, nas folhas de mandioca utilizadas nessa pesquisa há um teor considerável deste macronutriente ( $15,45 \pm 0,43$  g/100 g), podendo ter sido extraído juntamente com as proteínas; outra hipótese provável é o tamanho de partícula que os concentrados apresentam.

Segundo Kinsella (1979) um dos principais fatores que afetam a CAA é a desnaturação/desdobramento de proteínas e a presença de carboidratos e componentes não proteicos. Ma *et al.* (2022) relata que isolados de proteína de lentilha apresentaram maior CAA do que as farinhas obtidas para mesma matéria prima, os autores responsabilizaram o resultado ao menor teor de lipídios e menor tamanho de partícula que os isolados proteicos apresentavam. Afirmações que corroboram com as possibilidades levantadas anteriormente.

Os parâmetros CAA e CAO podem ser encarados como cruciais quando usados para descrever a funcionalidade dos concentrados proteicos, pois a ligação proteína-água e proteína-óleo influenciam a textura e outras propriedades de qualidade em produtos alimentícios, sendo utilizados concentrados proteicos como enchimentos, aglutinantes, emulsificantes ou extensores em carnes, por exemplo; assim essas interações se tornam importantes nas formulações de alimentos (SANJEEWA *et al.*, 2010).

### 3.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental foi realizado com intuito de estabelecer a faixa de pH, temperatura e tempo de extração de proteínas da mandioca. A Tabela 5.6 apresenta os resultados para as respostas.

A determinação da significância estatística dos efeitos das variáveis de entrada sobre as respostas REP, RCP, CAA e CAO não apresentaram efeitos significativos, no domínio experimental ( $p > 0,05$ ). As demais respostas (Cl a, Cl b, CT,  $\Delta E$ , CFT, FT e PB) sofreram efeitos significativos das variáveis independentes ( $p \leq 0,05$ ). São apresentados os resultados da análise estatística aplicada para as respostas Cl a, Cl b, CT e  $\Delta E$  na Tabela 5.7 e CFT, FT e PB na Tabela 5.8. Os gráficos de Pareto são apresentados nas Figuras 5.5 (Cl a e Cl b, CT e  $\Delta E$ ) e 5.6 (CFT, FT e PB), os efeitos padronizados significativos encontram-se à direita da reta vertical pontilhada indicativa do limite de rejeição da hipótese nula ( $p = 0,05$ ). Os gráficos de distribuição de resíduos indicaram a aleatoriedade dos resultados, os quais são apresentados nos Apêndices de 5.III a 5.IX.

Avaliando os efeitos individuais é possível observar que o pH linear (pH) e a temperatura linear (T) apresentaram influência sobre as respostas Cl a, Cl b e CT. O efeito do pH sobre estas respostas foi positivo e indesejável, pois o aumento do pH provocou um aumento das mesmas. Por outro lado, o efeito de T sobre estas mesmas respostas foi negativo, o que é desejável, uma vez que a temperatura promoveu a redução do teor deste composto.

A decomposição de clorofilas é afetada pelo pH, sendo que em pH ácido a clorofila se torna menos estável a ação do calor, e conseqüentemente pode promover alterações na cor do produto. Ressalta-se ainda que a Cl b é mais estável ao calor do que a Cl a (SCHWARTZ; VON ELBE; GIUSTI, 2010). A degradação de CT já era esperada, uma vez que os carotenóides apresentam alta reatividade, especialmente em elevadas temperaturas (PÉNICAUD *et al.* 2011).

**Tabela 5.6.** Matriz do planejamento fatorial Box-Behnken e os resultados para as respostas do Planejamento utilizando solução hidroalcoólica para extração de proteínas da mandioca.

Corrida	Variáveis originais (variáveis codificadas)			Respostas (Variáveis dependentes)										
	pH (X <sub>1</sub> )	T (X <sub>2</sub> )	t (X <sub>3</sub> )	Cl a	Cl b	CT	ΔE	PB	FT	CFT	RCP	REP	CAA	CAO
1	2,0	5,0	135	7740,60	1539,58	2850,81	8,36	38,17	12,52	688,2	22,17	35,01	5,49	5,57
2	5,0	5,0	135	8399,16	2051,44	2726,10	4,04	35,53	9,54	592,1	18,25	26,82	5,63	5,19
3	2,0	60,0	135	5064,13	647,06	704,45	13,16	33,24	6,10	395,2	13,76	18,92	5,89	5,86
4	5,0	60,0	135	4539,04	703,47	1627,70	15,06	30,87	3,99	426,5	14,91	19,04	6,71	7,32
5	2,0	32,5	30	5231,75	918,56	1588,11	12,24	33,12	8,49	655,1	15,55	21,31	5,44	5,77
6	5,0	32,5	30	6416,79	1762,86	2104,00	8,78	34,32	7,07	622,3	15,46	21,96	5,11	4,32
7	2,0	32,5	240	5464,75	233,89	1839,21	11,73	28,76	5,77	472,3	16,06	19,11	6,61	6,41
8	5,0	32,5	240	8840,04	1597,87	3127,30	6,84	35,79	9,27	635,5	18,35	27,18	5,50	6,74
9	3,5	5,0	30	7409,52	1364,03	2671,23	8,98	33,08	8,18	527,3	13,92	19,05	5,89	5,44
10	3,5	60,0	30	6009,86	740,87	2009,81	11,59	39,93	9,13	580,3	17,15	28,33	5,40	6,04
11	3,5	5,0	240	7878,81	1896,96	2736,60	6,34	37,58	9,17	580,6	19,35	30,08	5,76	6,20
12	3,5	60,0	240	5687,10	166,20	1916,44	12,39	34,64	5,77	417,0	16,37	23,47	5,89	6,05
13	3,5	32,5	135	6226,68	1774,71	2269,70	9,55	48,56	6,29	529,3	20,55	41,28	5,48	7,19
14	3,5	32,5	135	6792,48	1925,27	2380,34	7,01	50,48	3,97	587,9	23,72	49,55	6,43	7,92
15	3,5	32,5	135	6787,04	2078,25	2242,70	7,87	54,30	5,02	535,8	16,75	37,62	6,48	6,93

T: temperatura (°C); t: tempo (min); Cl a: clorofila a (µg/g do liofilizado); Cl b: clorofila b (µg/g do liofilizado); CT: carotenóides totais (µg/g do liofilizado); ΔE variação de cor (adimensional); PB: proteínas bruta (% bs); FT: flavanóis totais (mg eq. catequina/g do liofilizado); CFT: compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g do liofilizado); RCP: rendimento de concentrado proteico (%); REP: rendimento de extração de proteína (%); CAA: capacidade de absorção de água (g/g bs); CAO: capacidade de absorção de óleo (g/g bs).

**Tabela 5.7.** Efeito estimado, erro puro e grau de significância estatística ( $p$ ) para os fatores do modelo clorofila a (CI a), clorofila b (CI b), carotenoides totais (CT) e variação de cor ( $\Delta E$ ).

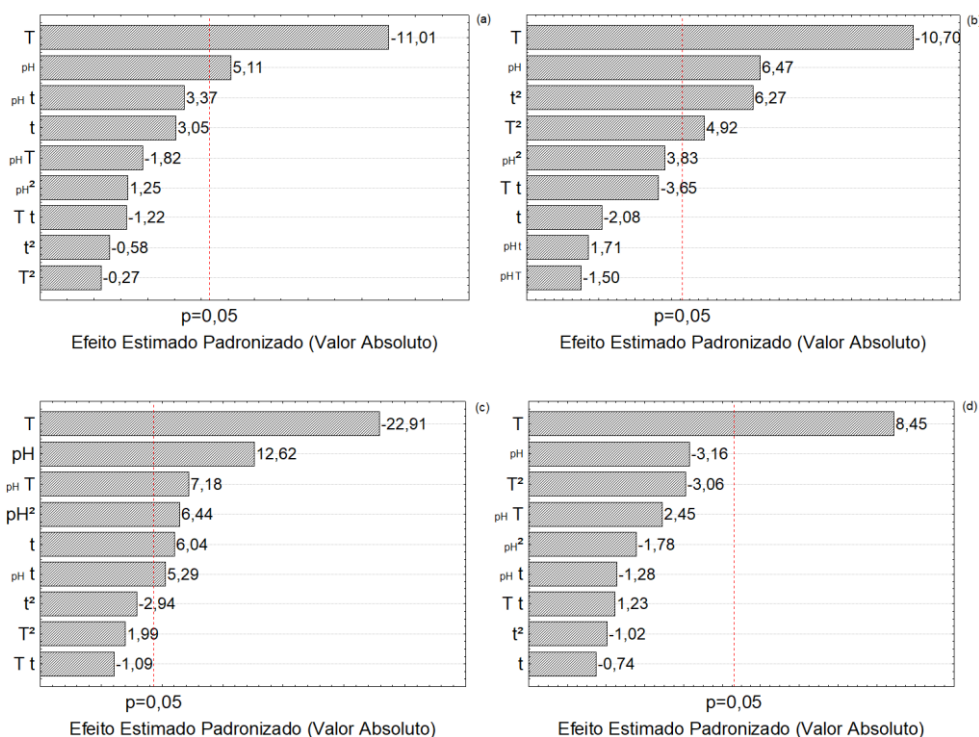
Fator	CI a			CI b			CT			$\Delta E$		
	Efeito estimado	Erro puro	$p$	Efeito estimado	Erro puro	$p$	Efeito estimado	Erro puro	$p$	Efeito estimado	Erro puro	$p$
Média	<b>6556,80</b>	<b>93,85</b>	<b>0,0002</b>	<b>1135,23</b>	<b>43,81</b>	<b>0,0015</b>	<b>2158,48</b>	<b>21,05</b>	<b>0,0001</b>	<b>9,95</b>	<b>0,2993</b>	<b>0,0009</b>
$pH$	<b>1173,45</b>	<b>229,88</b>	<b>0,0363</b>	<b>694,13</b>	<b>107,32</b>	<b>0,0231</b>	<b>650,63</b>	<b>51,57</b>	<b>0,0062</b>	-2,31	0,7331	0,0874
$pH^2$	212,16	169,19	0,3366	302,21	78,98	0,0620	<b>244,59</b>	<b>37,96</b>	<b>0,0232</b>	-0,96	0,5396	0,2178
$T$	<b>-2531,99</b>	<b>229,88</b>	<b>0,0081</b>	<b>-1148,60</b>	<b>107,32</b>	<b>0,0086</b>	<b>-1181,59</b>	<b>51,57</b>	<b>0,0019</b>	<b>6,19</b>	<b>0,7331</b>	<b>0,0137</b>
$T^2$	-45,83	169,19	0,8119	<b>388,48</b>	<b>78,98</b>	<b>0,0389</b>	75,72	37,96	0,1842	-1,65	0,5396	0,0923
$t$	700,70	229,88	0,0929	-222,85	107,32	0,1735	<b>311,60</b>	<b>51,57</b>	<b>0,0263</b>	-0,54	0,7331	0,5378
$t^2$	-98,43	169,19	0,6196	<b>495,58</b>	<b>78,98</b>	<b>0,0245</b>	-111,67	37,96	0,0987	-0,55	0,5396	0,4158
$pH \times T$	-591,83	325,11	0,2103	-227,72	151,77	0,2723	<b>523,97</b>	<b>72,93</b>	<b>0,0188</b>	2,54	1,0368	0,1340
$pH \times t$	1095,13	325,11	0,0780	259,84	151,77	0,2290	<b>386,10</b>	<b>72,93</b>	<b>0,0339</b>	-1,33	1,0368	0,3280
$T \times t$	-396,02	325,11	0,3474	-553,80	151,77	0,0676	-79,37	72,93	0,3901	1,27	1,0368	0,3439

Variáveis significativas ( $p \leq 0,05$ ) em negrito.

**Tabela 5.8.** Efeito estimado, erro puro e grau de significância estatística ( $p$ ) para os fatores do modelo compostos fenólicos totais (CFT), flavanóis totais (FT) e proteína bruta (PB).

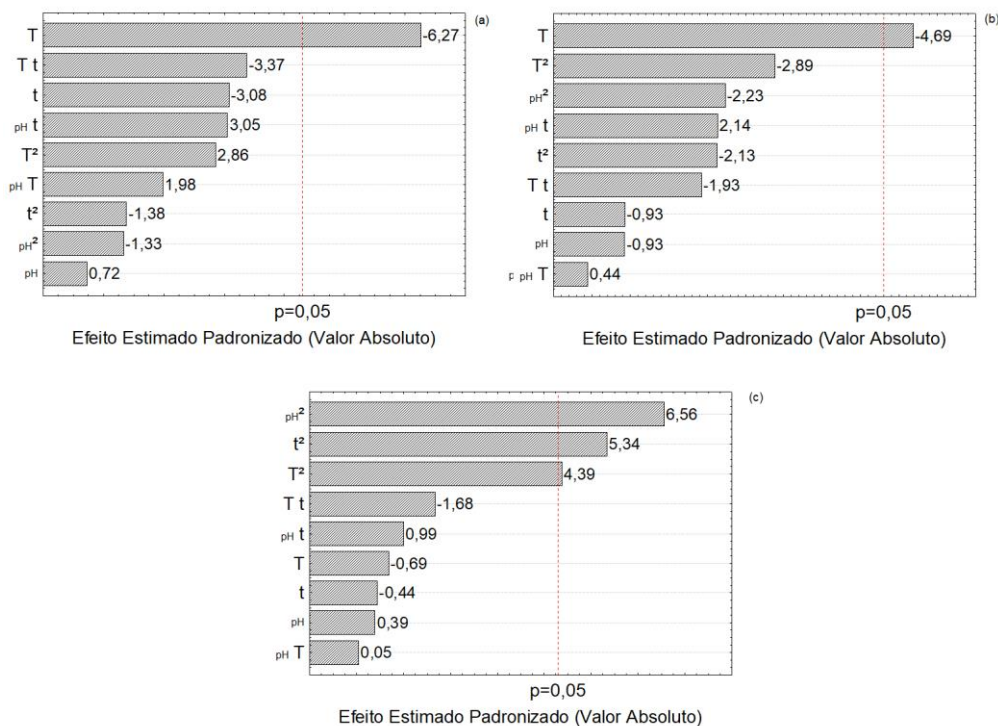
Fator	CFT			FT			PB		
	Efeito estimado	Erro puro	$p$	Efeito estimado	Erro puro	$p$	Efeito estimado	Erro puro	$p$
Média	<b>549,37</b>	<b>9,2700</b>	<b>0,0003</b>	6,57	0,2490	0,0014	34,58	0,8444	0,0006
$pH$	16,41	22,7069	0,5450	-0,56	0,6098	0,4526	0,81	2,0683	0,7345
$pH^2$	-22,26	16,7118	0,3143	-1,00	0,4488	0,1551	<b>9,99</b>	<b>1,5222</b>	<b>0,0225</b>
$T$	<b>-142,31</b>	<b>22,7069</b>	<b>0,0245</b>	<b>-2,86</b>	<b>0,6098</b>	<b>0,0426</b>	-1,42	2,0683	0,5634
$T^2$	47,77	16,7118	0,1037	-1,30	0,4488	0,1017	<b>6,68</b>	<b>1,5222</b>	<b>0,0483</b>
$t$	-69,91	22,7069	0,0913	-0,57	0,6098	0,4514	-0,92	2,0683	0,7005
$t^2$	-23,05	16,7118	0,3017	-0,95	0,4488	0,1673	<b>8,13</b>	<b>1,5222</b>	<b>0,0333</b>
$pH \times T$	63,70	32,1124	0,1858	0,38	0,8624	0,7014	0,14	2,9250	0,9671
$pH \times t$	98,00	32,1124	0,0927	1,84	0,8624	0,1662	2,91	2,9250	0,4243
$T \times t$	-108,30	32,1124	0,0778	-1,66	0,8624	0,1939	-4,90	2,9250	0,2359

Variáveis significativas ( $p \leq 0,05$ ) em negrito.



**Figura 5.5.** Gráfico de Pareto para a resposta clorofila a – Cl a (a), clorofila b – Cl b (b), carotenoides totais – CT (c) e variação de cor –  $\Delta E$  (d).

O fator temperatura linear (T) apresentou efeito positivo e indesejável para  $\Delta E$ , uma vez que com o aumento de T ocorreu alteração significativa dos parâmetros de cor de cada corrida. De acordo com Dziki *et al.* (2018), as clorofilas estão fortemente relacionadas com as características de cor em produtos vegetais. Por conseguinte, com o aumento da temperatura pode ocorrer uma variação de cor do produto, isso devido a coloração dos vegetais verdes estarem associadas ao conteúdo de clorofila; assim o aumento da T pode induzir a degradação da clorofila e uma possível redução da cor verde.



**Figura 5.6.** Gráfico de Pareto para a resposta compostos fenólicos totais – CFT (a), flavanóis totais - FT (b) e proteína bruta - PB (c)

Ao observar a Tabela 5.8 e as Figuras 5.6a e 5.6b, o fator temperatura linear (T) foi o único efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) sobre as respostas CFT e FT. O efeito para ambos foi negativo, o que indica que o aumento de T provocou à degradação de compostos fenólicos totais e flavanóis totais. Zapata, Sepúlveda e Álvarez (2022) asseguram que no estudo da degradação dos compostos fenólicos das folhas de urucum ocorreu a influência da temperatura na redução do teor desses compostos. Em outra pesquisa foi acompanhada a oxidação avançada de compostos fenólicos, os autores avaliaram que o aumento da temperatura (27° a 45°C) sob as taxas de reação aumentam o processo oxidativo, alcançando 90% em maior temperatura (ALNAIZY; AKGERMAN, 2000). Song, Manganais e Ferruzzi (2015) também indicam que os flavanóis totais (FT) são suscetíveis a inúmeras degradações que podem ser aceleradas pela ação da temperatura. Esses estudos, mostram a ação da temperatura na degradação dos CFT assim como observado neste trabalho.

A variável de saída PB foi influenciada de forma significativa pelos efeitos quadráticos do modelo (Tabela 5.8 e Figura 5.6c). O efeito para a resposta (PB) foi positivo e desejável e percebe-se que mediante o gráfico de

Pareto a extração proteica é mais influenciada pelo pH, seguido do tempo de extração e em menor escala pela temperatura. Segundo Zhang *et al.* (2017) uma extração por aquecimento-ácido facilita a agregação das proteínas da folha, por elas apresentarem uma estrutura mais compacta favorecendo a separação das proteínas foliares.

Na Tabela 5.9 são apresentados os resultados da ANOVA, para a regressão dos modelos ajustados as respostas Cl a, Cl b, CT,  $\Delta E$ , CFT, FT e PB; sendo: a soma quadrática, os graus de liberdade, a média quadrática, os valores de F calculado e tabelado, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), bem como as equações ajustadas para as respostas.

Os resultados da ANOVA mostraram elevados valores de  $R^2$  para a regressão do modelo quadrático a todas as respostas e a falta de ajuste foi não significativa ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ ) para todas as respostas. Porém, apenas para as respostas Cl b e PB a regressão do modelo foi significativa ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ). Assim, apenas para estas respostas os modelos podem ser utilizados para fins preditivos. Para as demais respostas os modelos podem ser utilizados apenas para efeitos de estimar tendências. Os valores de  $R^2$  indicam que os modelos explicaram 92% da variação dos dados experimentais observados para as respostas Cl b e PB.

**Tabela 5.9.** Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo ajustado as respostas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$	$R^2$
<b>Clorofila a (Cl a)</b>						
Regressão	18490233,3	9	2054470,4	2,27	4,77	0,803
Resíduos	4532676,5	5	906535,3			
Falta de ajuste	4321289,7	3	1440429,9	13,63	19,16	
Erro Puro	211386,8	2	105693,4			
Total	23022909,8	14				
Modelo: Cl a = $5876,19 + 815,01\text{pH} - 94,29\text{pH}^2 - 15,61\text{T} + 0,06\text{T}^2 - 7,17\text{pH.T} + 3,48.135\text{pH} - 0,07.135\text{T} - 1054,07$						
<b>Clorofila b (Cl b)</b>						
Regressão	5703717,1	9	633746,3	6,81	4,77	0,924
Resíduos	465476,2	5	93095,2			
Falta de ajuste	419407,1	3	139802,4	6,07	19,16	
Erro Puro	46069,1	2	23034,5			
Total	6169193,3	14				
Modelo: Cl b = $-1413,89 + 1149,92\text{pH} - 134,31\text{pH}^2 + 35,11\text{T} - 0,51\text{T}^2 - 2,76\text{pH.T} + 0,83.135\text{pH} - 0,10.135\text{T} + 706,94$						



**Tabela 5.9.** Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo ajustado as respostas. (Continuação)

<b>Carotenoides totais (CT)</b>						
Regressão	4563550,4	9	507061,1	3,44	4,77	0,861
Resíduos	737636,4	5	147527,3			
Falta de ajuste	726997,7	3	242332,5	45,56	19,16	
Erro Puro	10638,7	2	5319,3			
Total	5301186,7	14				
Modelo: CT = 2024,86 + 605,95pH - 108,71pH <sup>2</sup> - 35,35T - 0,10T <sup>2</sup> + 6,35pH.T + 1,23.135pH - 0,014.135T - 503,13						
<b>Varição total de cor (ΔE)</b>						
Regressão	110,95	9	12,33	3,31	4,77	0,856
Resíduos	18,62	5	3,72			
Falta de ajuste	16,47	3	5,49	5,11	19,16	
Erro Puro	2,15	2	1,07			
Total	129,57	14				
Modelo: ΔE = 18,14 - 4,18pH + 0,43 pH <sup>2</sup> - 0,17T + 0,002T <sup>2</sup> + 0,03pH.T - 0,004.135pH + 0,0002.135T - 0,23						
<b>Compostos fenólicos totais (CFT)</b>						
Regressão	89439,9	9	9937,8	2,22	4,77	0,800
Resíduos	22408,0	5	4481,6			
Falta de ajuste	20345,6	3	6781,9	6,58	19,16	
Erro Puro	2062,4	2	1031,2			
Total	111847,9	14				
Modelo: CFT = 906,04 - 130,88 pH + 9,89 pH <sup>2</sup> + 1,35T - 0,06T <sup>2</sup> + 0,77pH.T + 0,31.135 pH - 0,02.135T - 147,77						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	R <sup>2</sup>
<b>Flavanóis totais (FT)</b>						
Regressão	35,48	9	3,94	1,60	4,77	0,743
Resíduos	12,28	5	2,46			
Falta de ajuste	10,80	3	3,60	4,84	19,16	
Erro Puro	1,49	2	0,74			
Total	47,77	14				
Modelo: FT = 17,99 - 4,25pH + 0,45pH <sup>2</sup> - 0,14T + 0,002T <sup>2</sup> + 0,005pH.T + 0,006.135pH - 0,0003.135T - 3,44						
<b>Proteína bruta (PB)</b>						
Regressão	717,27	9	79,70	6,39	4,77	0,920
Resíduos	62,35	5	12,47			
Falta de ajuste	45,23	3	15,08	1,76	19,16	
Erro Puro	17,11	2	8,56			
Total	779,62	14				
Modelo: PB = -24,7 + 30,04pH - 4,44pH <sup>2</sup> + 0,66T - 0,009T <sup>2</sup> + 0,002 pH.T + 0,009.135pH - 0,0008.135T + 12,21						

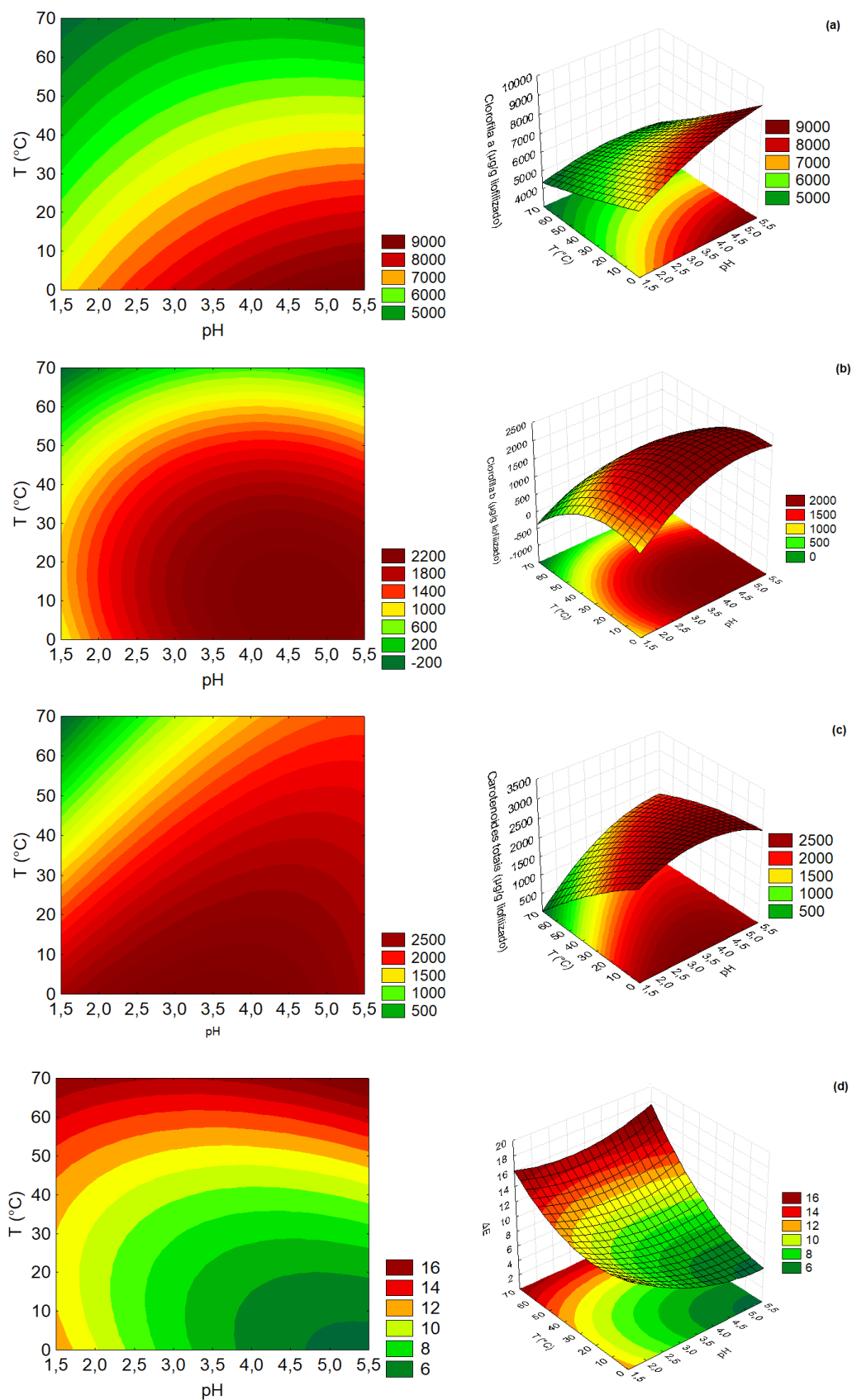
SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

As superfícies de resposta e as curvas de contorno obtidas pelos modelos ajustados para as respostas CI a, CI b, CT e ΔE são apresentadas na

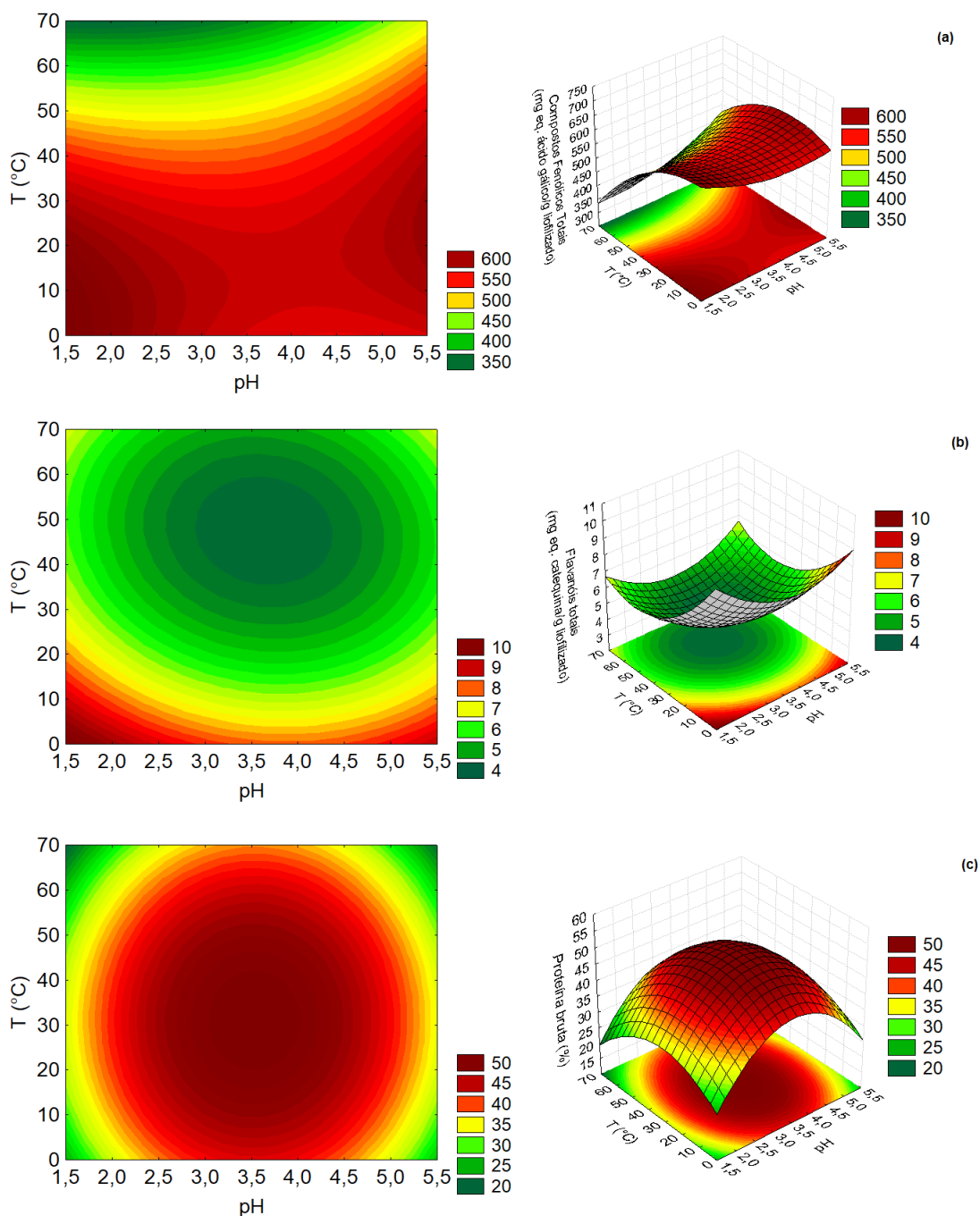
Figura 5.7, e para as respostas CFT, FT e PB na Figura 5.8. Na Figura 5.7a é possível observar que em maiores níveis de pH e menores níveis de temperatura de extração foram observados os maiores valores de Cl a (8000-9000  $\mu\text{g/g}$  do liofilizado), sendo os valores mais elevados para pH entre 4,0 e 5,5 e temperaturas entre 0°C a 10°C.

Para a Cl b (Figura 5.7b), os maiores valores (1800-2200  $\mu\text{g/g}$  liofilizado) foram observados em valores de pH entre 3,0 e 5,5 e temperaturas entre 0°C a 40°C. As tendências observadas para Cl a e Cl b são justificáveis, uma vez que a clorofila b é mais estável ao calor do que a clorofila a (SCHWARTZ; VON ELBE; GIUSTI, 2010).

Para a resposta de CT (Figura 5.7c), em níveis de temperatura inferior a 20°C, com pouca interferência do valor de pH, foram observados os maiores teores de CT (entre 2000 a 2500  $\mu\text{g/g}$  liofilizado). Porém, para valores de pH entre 4,0 e 5,5, os teores de CT permaneceram elevados, mesmo em níveis de temperatura mais elevados, como 40°C.



**Figura 5.7.** Curva de contorno e superfície de resposta para Cl a (a), Cl b (b), CT (c) e  $\Delta E$  (d) a 135 min.

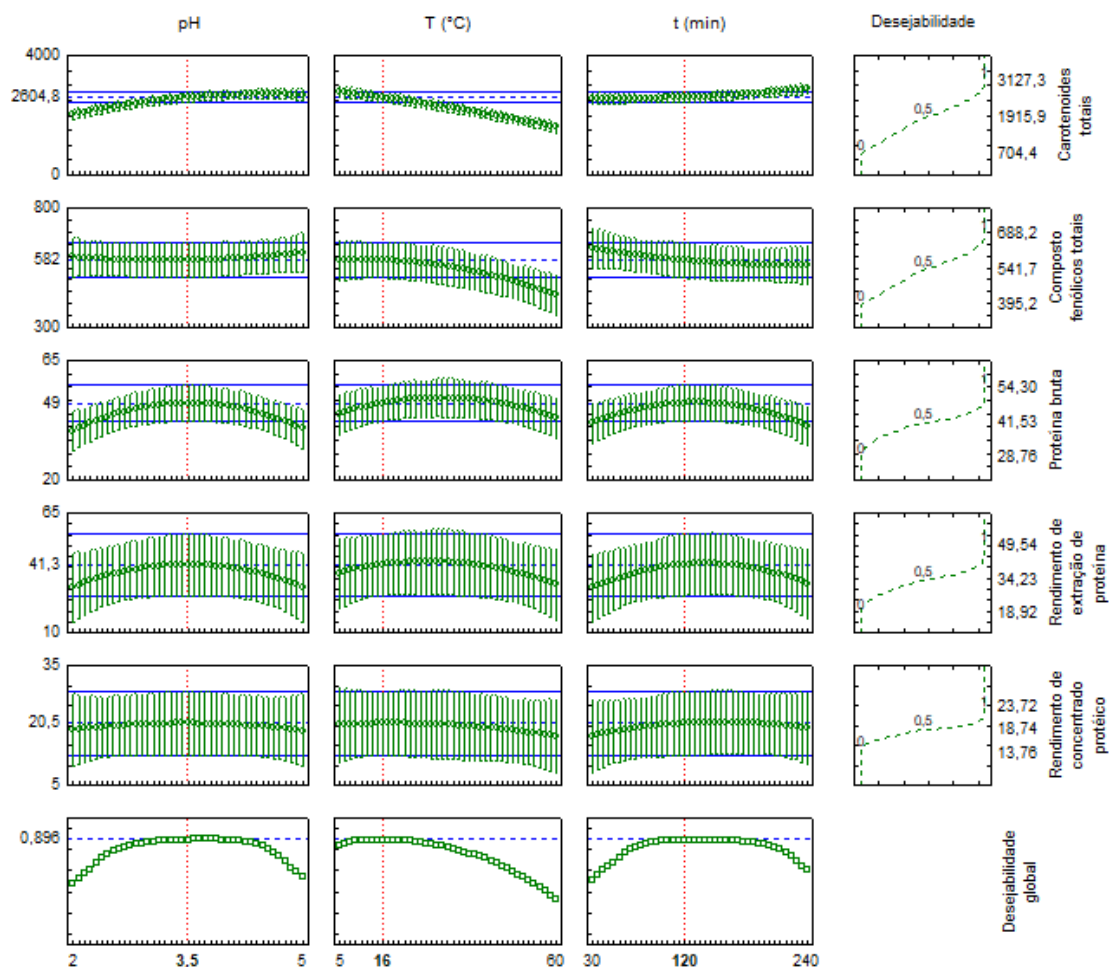


**Figura 5.8.** Curva de contorno e superfície de resposta para CFT (a), FT (b) e PB (c) a 135 min.

A variação total de cor ( $\Delta E$ ) (Figuras 5.7d) foi menor para a faixa de pH entre 4,5 e 5,5 e para temperaturas de extração inferior a 10°C. Os teores de CFT (Figura 5.8a) foram maiores (550 a 600  $\mu\text{g/g}$  liofilizado) para níveis de temperatura menores que 40°C, independentemente do nível de pH. Os maiores teores de FT (Figura 5.8b) foram observados em níveis de temperatura inferiores a 10°C e para níveis de pH nos extremos do domínio experimental;

pH < 2,5 e em pH > 5. Finalmente, os maiores valores de PB (Figuras 5.8c) foram observados em valores intermediários de pH (2,5-4,5) e temperatura (10-50°C).

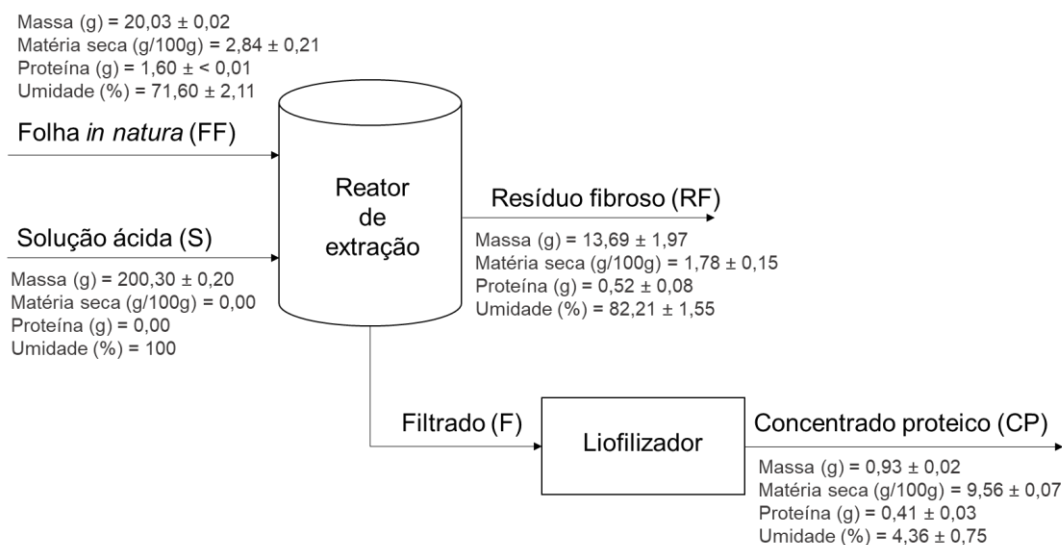
A função desejabilidade foi utilizada para a determinar uma condição ótima para o processo de extração de proteínas da mandioca, por via ácida, em função das respostas RCP, REP, CFT e CT, e os resultados são apresentados na Figura 5.9. De acordo com os resultados da função desejabilidade, as condições definidas como ótimas, para o processo de extração de proteínas da mandioca, por via ácida, foram: pH 3,5, temperatura de 16°C e tempo de extração de 120 min para uma desejabilidade global de 0,89599, no domínio experimental. Os valores previstos nessa condição experimental para as respostas foram 2600 µg de carotenóides totais/g do liofilizado, 580 mg eq. ácido gálico/g do liofilizado, 49% de proteína bruta, 41% de rendimento de extração de proteína e 20% de rendimento de concentrado proteico.



**Figura 5.9.** Gráfico da função desejabilidade para carotenoides totais (CT), compostos fenólicos totais (CF), proteína bruta (PB), rendimento de extração de proteínas (REP) e Rendimento de concentrado protéico (RCP).

### 3.3. BALANÇO DE MASSA EM CONDIÇÕES ESTABELCIDAS POR DESEJABILIDADE GLOBAL POR VIA ÁCIDA

A partir dos dados coletados na entrada e saída do processo (massa, matéria seca, proteína bruta e umidade) obteve-se o fluxograma apresentado na Figura 5.10. Tomando como base um valor fixo de matéria seca na mandioca, no início do processo ( $\approx 3$  g de matéria seca e  $\approx 30\%$  bs de proteína bruta (o equivalente a  $1,60 \text{ g} \pm < 0,01$  de proteína disponível para extração), foram realizadas três corridas para a obtenção do concentrado protéico, na condição definida como ótima para o processo de extração de proteínas da mandioca, por via ácida.



**Figura 5.10.** Balanço de massa do processo de extração de proteínas utilizando tampão em pH's ácidos.

O valor médio obtido de proteína bruta no resíduo fibroso foi de  $0,52 \text{ g} \pm 0,08$ , um valor superior ao encontrado no concentrado proteico liofilizado que foi de  $0,41 \text{ g} \pm 0,03$ . Os resultados expressam uma extração por via ácida ineficiente das proteínas da mandioca, onde há a perda de  $0,66 \text{ g}$  de proteína, em torno de 41%. Supõem-se que a perda tenha ocorrido na etapa de filtração e pelo número de lavagens necessárias para a retirada da solução extratora. A partir disso entende-se que o método de recuperação das proteínas solúveis no meio deve ser reavaliado.

### 3.4. CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO

Os concentrados proteicos liofilizados, obtidos na condição definida como ótima, foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais (CF), carotenóides totais (CT), proteína bruta (PB), rendimento de extração de proteínas (REP) e rendimento de concentrado proteico (RCP) (Tabela 5.10).

**Tabela 5.10.** Análises dos pós liofilizados do processo de extração de proteínas de acordo com as condições definidas pela desejabilidade.

Análise	Valor experimental	Valor teórico	Resíduo (%)
CFT (mg eq. ácido gálico/g do liofilizado)	363,7 ± 35,0	582,0	37,51
CT (µg/g do liofilizado)	2747,5 ± 515,0	2604,8	5,48
PB (%)	45,81 ± 2,07	49,0	6,51
RCP (%)	16,44 ± 0,40	20,5	19,80
REP (%)	31,18 ± 1,94	41,3	24,50

CFT: compostos fenólicos totais; CT: carotenóides totais; PB: proteína bruta; RCP: rendimento do concentrado proteico; REP: rendimento de extração de proteína.

Os resultados obtidos experimentalmente foram inferiores aos valores teóricos, exceto para o teor de carotenóides totais (CT), que quando comparados apresentaram valores percentuais de resíduo que variaram de 5,48 a 37,5. Menores valores de resíduo foram observados para CT e PB, que apresentaram menor variabilidade no resultado. Quanto menor o valor de resíduo encontrado, maior a aproximação entre valores experimentais e teóricos, o que fornece uma avaliação mais precisa do desempenho e repetibilidade dos métodos empregados nos concentrados proteicos liofilizados, sendo assim, percebe-se uma variabilidade alta para CFT (≈37%).

### 3.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE

A Tabela 5.11 apresenta os dados para a adsorção e a dessorção de umidade a 25°C, do concentrado proteico liofilizado, obtido nas condições definidas como ótimas para o processo de extração de proteínas da mandioca, por via ácida. As isotermas de adsorção e a dessorção de umidade geradas com estes dados estão representadas na Figura 5.11.



**Tabela 5.11.** Dados de sorção de umidade para o concentrado proteico liofilizado extraído por solução hidroalcoólica a 25°C.

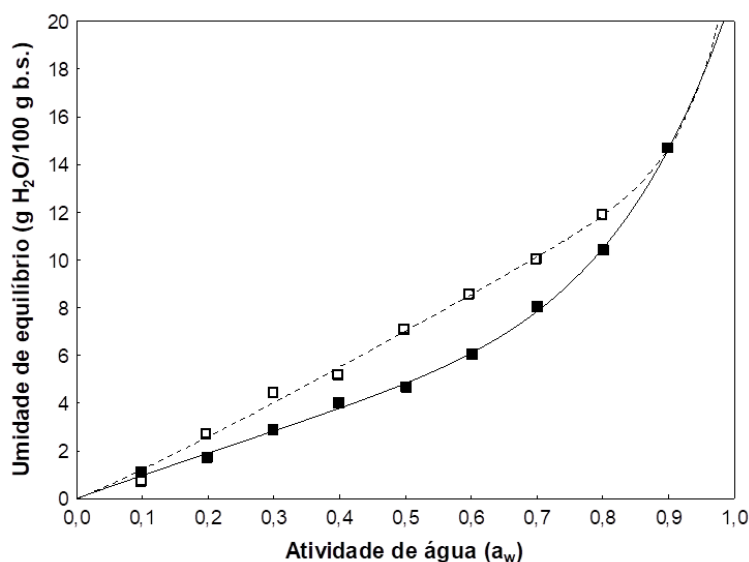
Adsorção		Dessorção	
$a_w$	Umidade (m)	$a_w$	Umidade (m)
0,10	1,10	0,90	14,69
0,20	1,70	0,80	11,89
0,30	2,84	0,70	10,02
0,40	4,01	0,60	8,58
0,50	4,68	0,50	7,09
0,60	6,04	0,40	5,19
0,70	8,04	0,30	4,41
0,80	10,40	0,20	2,72
0,90	14,69	0,10	0,74

$a_w$ : atividade de água (adimensional); m: umidade (g H<sub>2</sub>O/100 g bs)

O processo de sorção do concentrado proteico liofilizado não foi completamente reversível, o que é caracterizado pela diferença entre as isotermas de adsorção e dessorção de umidade (Figura 5.11), denominada de efeito de histerese, a qual se prolongou por toda faixa de  $a_w$  avaliada, sendo mais representativo na região de  $a_w$  intermediária; apresentando maior expressividade na região de condensação capilar que é intimamente ligada ao fenômeno de histerese (LABUZA, 1968). O efeito de histerese pode ser utilizado como um índice de qualidade para alimentos, onde uma histerese pronunciada é indicativo de baixa estabilidade, enquanto que uma pequena histerese ou ausência da mesma é indicativo de uma maior estabilidade do produto durante o armazenamento. De acordo com a definição de Kapsalis (1981), essa histerese pode ser considerada do tipo II, ou seja, se inicia em alta  $a_w$  ( $a_w = 0,8$ ) e se estende por toda a faixa das isotermas de sorção, sendo este comportamento esperado em alimentos ricos em proteínas.

A partir das isotermas de adsorção e dessorção é possível avaliar a estabilidade microbiológica do liofilizado, uma vez que em um nível de  $a_w$  inferior a 0,6, geralmente não há desenvolvimento de nenhum microrganismo (SCOTT, 1957; LAVELLI; SEREIKAITĖ, 2022). A partir dos resultados expostos, pressupõem-se que valores de umidade menores que 6,04 g H<sub>2</sub>O/100 g b.s. para a adsorção e 8,58 g H<sub>2</sub>O/100 g b.s. para a dessorção, garantem a estabilidade microbiológica do liofilizado a 25°C. O baixo valor de

umidade aponta que o concentrado proteico liofilizado da mandioca obtido por via ácida apresenta baixa higroscopicidade. Quando comparados a outros trabalhos como folhas de *Moringa oleifera* à 27°C, onde isoterma de adsorção ao alcançar uma  $a_w$  de 0,6 o material apresentou uma umidade de equilíbrio de aproximadamente 8 g H<sub>2</sub>O/100 g bs e tanto para a isoterma de dessorção quanto para a adsorção (SOBOWALE *et al.*, 2017) valor aproximado a este estudo; para folhas de hortelã liofilizadas ao atingir uma  $a_w$  de 0,6 para a isoterma de adsorção encontrou-se uma umidade de equilíbrio de  $\approx$  17 g H<sub>2</sub>O/100 g bs e para dessorção  $\approx$  15 g H<sub>2</sub>O/100 g bs, valores superiores ao encontrado para este estudo (DALGIÇ; PEKMEZ; BELIBAĞLI, 2012).



**Figura 5.11.** Isotermas de adsorção (■) e dessorção (□) de umidade a 25°C, para o concentrado proteico da mandioca, obtido por via ácida. As linhas representam as isotermas preditas pelo modelo de Peleg, para adsorção (\_\_\_\_) e dessorção (\_\_\_\_).

Na Figura 5.11 é possível visualizar que a isoterma de adsorção apresenta um comportamento praticamente linear até um nível de  $a_w$  de 0,5, seguido de um comportamento exponencial. Contudo, mesmo com a baixa higroscopicidade apresentada pelo concentrado proteico liofilizado, o produto necessita de cautela durante sua manipulação ou armazenamento em ambiente com umidade relativa (UR) maior que 50%; pois ele estará mais susceptível a ganhar umidade. Em tais condições é recomendado que o

produto permaneça acondicionado em uma embalagem com baixa permeabilidade ao vapor de água.

De acordo com a classificação proposta por Blahovec e Yanniotis (2009), a isoterma de adsorção do produto apresentou comportamento tipo II (sigmóide), que é a forma mais comum de isotermas para alimentos e é característica de produtos proteicos. Já a isoterma de dessorção apresentou comportamento característico tipo III, que é característico de produtos que contém sólidos solúveis (AL-MUHTASE; MCMINN; MAGEE, 2002).

Na Figura 5.11 é possível observar também a histerese, a qual se prolongou por toda faixa de  $a_w$  avaliada, sendo mais representativo na região de  $a_w$  intermediária; apresentando maior expressividade na região de condensação capilar que é intimamente ligada ao fenômeno de histerese (LABUZA, 1968). De acordo com a definição de Kapsalis (1981), essa histerese pode ser considerada do tipo II, ou seja, se inicia em alta  $a_w$  ( $a_w = 0,8$ ) e se estende por toda a faixa das isotermas de sorção, sendo este comportamento esperado em alimentos ricos em proteínas.

A Tabela 5.12 apresenta os dados de coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o desvio médio relativo (P), o erro médio quadrático (RMSE) e a distribuição de resíduos, para os ajustes dos modelos matemáticos aos dados de sorção de umidade do concentrado proteico liofilizado.

Com base nos maiores valores de  $R^2$  e menores valores de P, recomenda-se a utilização do modelo de Peleg, seguido do modelo de GAB para a predição das isotermas de adsorção e dessorção de umidade do concentrado proteico da mandioca liofilizada.

O bom ajuste do modelo de Peleg pode ser observado nas Figuras 5.5 e 5.6. Embora Peng et al. (2007) recomende valores de P menores que 10%, como indicadores de bons ajustes para isotermas de sorção, para propósitos práticos, em alguns casos esse limite não foi atingido. Esse fato é atribuído a desvios relativos grandes gerados em baixos níveis de  $a_w$ , região de pouco interesse prático, devido ser uma região na qual a estabilidade do produto está garantida.

O modelo de Smith, por ter apresentado um bom ajuste e possuir apenas dois parâmetros, o que facilita a sua solução matemática, pode ser

utilizado para efeitos práticos na predição da isoterma usando concentrado proteico da mandioca liofilizado.

Para os dados de adsorção foram observados valores de  $R^2 > 0,99$  para todos os modelos testados, exceto para o modelo de Halsey, que apresentou  $R^2$  de 0,97. Adicionalmente, foram observados valores de  $P < 10\%$ , exceto para os modelos de Halsey e Oswin. De acordo com Peng *et al.* (2007), para efeitos práticos, os valores de  $P$  devem ser inferiores a 10%. Para os dados de dessorção foram observados valores de  $R^2 > 0,99$  apenas para os modelos de Ferro-Fontan, GAB, Blahovec & Yanniotis e Peleg, sendo que apenas para o modelo Peleg o valor de  $P$  foi inferior a 10%.

**Tabela 5.12.** Parâmetros dos ajustes dos modelos matemáticos aos dados de sorção de umidade do liofilizado a 25°C, obtido na condição ótima do processo de extração de proteínas, utilizando tampão em pH ácido.

Modelo	Adsorção				Dessorção			
	Parâmetro	R <sup>2</sup>	P (%)	RMSE	Parâmetro	R <sup>2</sup>	P (%)	RMSE
Halsey	a = 7,86 b = 1,58 Resíduos (T)	0,971	23,04	0,71	a = 26,41 b = 1,99 Resíduos (T)	0,901	53,04	1,34
Henderson	a = 0,12 b = 1,10 Resíduos (A)	0,998	5,38	0,58	a = 0,04 b = 1,47 Resíduos (T)	0,987	20,94	1,47
Oswin	a = 4,80 b = 0,52 Resíduos (A)	0,991	11,74	0,39	a = 6,44 b = 0,41 Resíduos (T)	0,948	37,88	0,96
Ferro-Fontan	a = 3,24 b = 1,40 r = 0,74 Resíduos (A)	0,997	6,26	0,21	a = 5,88 b = 22,46 r = 0,23 Resíduos (A)	0,993	13,70	0,35
GAB	M <sub>0</sub> = 3,91 c = 3,43 K = 0,84 Resíduos (A)	0,999	4,03	0,14	M <sub>0</sub> = 10,09 c = 2,50 K = 0,56 Resíduos (A)	0,995	11,99	0,29
Blahovec & Yanniotis	a <sub>1</sub> = 0,13 b <sub>1</sub> = 0,20 a <sub>2</sub> = 0,33 b <sub>2</sub> = 0,28 Resíduos (A)	0,999	4,16	0,14	a <sub>1</sub> = 0,08 b <sub>1</sub> = -0,01 a <sub>2</sub> = 23,53 b <sub>2</sub> = 25,41 Resíduos (A)	0,996	10,68	0,25
Smith	a = 0,52 b = 6,15 Resíduos (A)	0,999	4,15	0,16	a = 1,91 b = 6,09 Resíduos (T)	0,950	35,61	0,95
Peleg	k <sub>1</sub> = 9,14 n <sub>1</sub> = 0,97 k <sub>2</sub> = 12,19 n <sub>2</sub> = 6,09 Resíduos (A)	0,999	4,28	0,14	k <sub>1</sub> = 8,43 n <sub>1</sub> = 17,02 k <sub>2</sub> = 14,89 n <sub>2</sub> = 1,09 Resíduos (A)	0,997	9,64	0,23

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; RMSE: erro médio quadrático; P: desvio médio relativo; m<sub>0</sub>: umidade da monocamada (g H<sub>2</sub>O/100 g bs); m: umidade (g H<sub>2</sub>O/100 g bs); c: constante relacionada ao calor de sorção; a, b, c, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>, n<sub>1</sub> e n<sub>2</sub>: constantes dos modelos; A: aleatório. T: tendencioso.

Os valores de umidade da monocamada estimados pelo modelo de GAB foram de 3,9 g H<sub>2</sub>O/100 g bs para a adsorção e 10,1 g H<sub>2</sub>O/100 g bs para a dessorção (Tabela 5.12). A umidade da monocamada de um alimento indica a condição de maior estabilidade para o produto, onde a perda de qualidade em temperatura constante será mínima. Abaixo da monocamada as taxas da maioria das reações de degradação que ocorrem nos alimentos são baixas (GOULA *et al.*, 2008). O valor de m<sub>0</sub> da isoterma de adsorção indica a condição de umidade na qual o produto estará menos susceptível aos processos degradativos. Por outro lado, para a dessorção indica que o produto não deverá atingir valores menores que este durante um processo de secagem, para evitar gastos desnecessários de energia (POMBO *et al.*, 2019; ARAÚJO; PENA, 2022).

#### 4. CONCLUSÃO

Os concentrados proteicos liofilizados apresentaram teores relevantes de carotenóides totais, compostos fenólicos totais e flavanóis totais. As respostas clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), carotenoides totais (CT), variação de cor ( $\Delta E$ ), compostos fenólicos totais (CFT), flavanóis totais (FT) e proteína bruta (PB) indicam que a pesquisa apresenta repetibilidade no intervalo estudado. Os maiores teores de proteínas ( $\approx 54\%$ ) foram observados nas corridas realizadas no ponto central (pH de 3,5, temperatura de 32,5°C e tempo de extração de 135 min). A metodologia de superfície de resposta e a função desejabilidade definiram como condições operacionais ótimas para o processo de isolamento de proteínas das folhas da mandioqueira com água acidificada, um pH de 3,5, temperatura de 16°C e tempo de extração de 120 min. O isolamento de proteínas da folha da mandioqueira, por via ácida, mostrou ser um processo viável, em relação a recuperação da proteína, sem a necessidade da extração adicional da fração proteica carregada com o resíduo fibroso, e de pré-tratamentos das folhas, como a secagem e a padronização do tamanho de partículas. As isotermas de adsorção e dessorção de umidade do concentrado proteico se comportaram como tipo IIb e tipo III, respectivamente; e indicaram que o concentrado proteico liofilizado apresentou baixa higroscopicidade e terá estabilidade microbiológica umidade inferior a 6,04 g H<sub>2</sub>O/100 g bs. O modelo de Peleg se mostrou muito eficiente na predição das isotermas de adsorção e dessorção de umidade do produto, a 25°C.

## REFERÊNCIAS

ADEWUMI, O. O.; FELIX-MINNAAR, J. V.; JIDEANI, V. A. Functional Properties and Amino Acid Profile of Bambara Groundnut and *Moringa oleífera* Leaf Protein Complex. **Processes**, v.10, n. 2, p.205-220, 2021.

AHMED, J.; KAUR, A.; SHIVHARE, U. Color Degradation Kinetics of Spinach, Mustard Leaves, and Mixed Puree. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 3, p. 1088-1091, 2002.

AHLSTRÖM, C.; THUVANDER, J.; RAYNER, M.; MATOS, M.; GUTIÉRREZ, G.; ÖSTBRING, K. The Effect of Precipitation pH on Protein Recovery Yield and Emulsifying Properties in the Extraction of Protein from Cold-Pressed Rapeseed Press Cake. **Molecules**, v. 27, p. 2957-2975, 2022.

AL-MUHTASEB, A. H.; McMINN W. A. M.; MAGEE, T. R. A. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 80, n. 2, p. 118-128, 2002.

ALNAIZY, R.; AKGERMAN, A. Advanced oxidation of phenolic compounds. **Advances in Environmental Research**, v. 4 p. 233 – 244, 2000.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Gaithersburg, Md: AOAC International; 1997.

AYELE, H. H.; LATIF, S.; BRUINS, M. E.; MÜLLER, J. Partitioning of Proteins and Anti-Nutrients in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Leaf Processing Fractions after Mechanical Extraction and Ultrafiltration. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1714-1726, 2021.

BLAHOVEC, J.; YANNIOTIS, S. Modified classification of sorption isotherms. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 72-77, 2009.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, E. O.; SILVA, B. C.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. C.; VISENTAINER, J. V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 48, p. 1-9, 2014.

CAO, X.; WEN, H.; LI, C.; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 2, p. 184-189, 2009.

DALGIÇA. C.; PEKMEZ, H.; BELIBAĞLI, K. B. Effect of drying methods on the moisture sorption isotherms and thermodynamic properties of mint leaves. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 4, p. 439 – 449, 2012.

DAMBORG, V. K.; JENSEN, S. K.; WEISBJERG, M. R.; ADAMSEN, A. P.; STØDKILDE, L. Screw-pressed fractions from green forages as animal feed: Chemical composition and mass balances. **Animal Feed Science and Technology**, v. 261, 2020.

DELCOUR, J.A. AND VAREBEKE, D.J. A new colourimetric assay for flavanoids in pilsner beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 91, p. 37-40, 1985.

DZIKI, D.; POLAK, R.; RUDY, S.; KRZYKOWSKI, A.; GAWLIK-DZIKI, U.; RÓŻYŁO, R. MIŚ, A.; COMBRZYŃSK, M. Simulation of the process kinetics and analysis of physicochemical properties in the freeze drying of kale. **International Agrophysics**, v. 32, n. 1, p. 49-56, 2018.

FONTAN, C. F.; CHIRIFE, J.; SANCHO, E.; IGLESIAS, H. A. Analysis of a model for sorption phenomena in foods. **Journal of Food Science**, v. 47, 1590-1595, 1982.

FUHRMEISTER, H.; MEUSER, F. Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 119-129, 2003.

GOULA, A. M.; KARAPANTSIOS, T. D.; ACHILIAS, D. S.; ADAMOPOULOS, K. G. Water sorption isotherms and glass transition temperature of spray dried tomato pulp. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 1, p. 73-83, 2008.

HAISMAN, D. R.; CLARKE, M. W. The Interfacial Factor in the Heat-induced Conversion of Chlorophyll to Pheophytin in Green Leaves. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26, p. 1111-1126, 1975.

HALSEY, G. Physical desorption on non-uniform surfaces. **Journal of Chemistry and Physics**, v. 16, n. 10, p. 931-937, 1948.

HENDERSON, S. M. A basic concept of equilibrium moisture. **Agricultural Engineering**, v. 33, n. 1, p. 29-32, 1952.

KAMMES, K. L.; BALS, B. D.; DALE, B. E.; ALLEN, M. S. Grass leaf protein, a coproduct of cellulosic ethanol production, as a source of protein for livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 14, n.1-2, p. 79-88, 2011.

KAPSALIS, J. G. Moisture sorption hysteresis. In: Rockland, L. B.; Beuchat, L. R. **Water Activity: Theory and Applications to Food**. New York: Marcel Dekker Inc; p. 143-177 1981.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil chemists' society**, v. 56, p. 242-258, 1979.

LABUZA, T. P. Sorption phenomena in foods. **Food Technology**, v. 22, n. 3, p. 263-272, 1968.

LAVELLI, V.; SEREIKAITĖ, J. Kinetic Study of Encapsulated  $\beta$ -Carotene Degradation in Aqueous Environments: A Review. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 317-334, 2022.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. V. 1, n. 1, p. F4.3.1-F4.3.8, 2001.



MA, K. K.; GREIS, M.; LU, J.; NOLDEN, A. A.; MCCLEMENTS, D. J.; KINCHLA, A. J. Functional Performance of Plant Proteins. **Foods**, v. 11, p 594-616, 2022.

MAROULIS, Z. B.; TSAMI, E.; MARINOS-KOURIS, D. Application of the GAB Model to the Moisture Sorption Isotherms for Dried Fruits. **Journal of Food Engineering**, v. 7, p. 63-78, 1988.

MCMURROUGH, I.; BAERT, T. Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 100, p. 409-416, 1994.

MERCADANTE, A. Z. Pigmentos naturais (Capítulo 7), in: LAJOLO, F. M.; MERCADANTE, A. Z. (Eds.); SANT'ANA A. S. **Química e bioquímica dos alimentos**. Primeira Edição. Editora Atheneu, Belo Horizonte, 2018.

OSWIN, C. R. The kinetics of package life. III isotherm. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 65, n. 12, p. 419-421, 1946.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 36 - 60, 2013.

PELEG, M. Assessment of a semi-empirical four parameter general model for sigmoid moisture sorption isotherms. **Journal of Food Process Engineering**, V. 16, p. 21-37, 1993.

PENG, G.; CHEN, X.; WU, W.; JIANG, X. Modeling of water sorption isotherm for corn starch. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 562-567, 2007.

PÉNICAUD, C.; ACHIR, N.; DHUIQUE-MAYER, C.; DORNIER, M.; BOHUON, P. Degradation of  $\beta$ -carotene during fruit and vegetable processing or storage: reaction mechanisms and kinetic aspects: a review. **EDP Sciences**, v. 66, p. 417-440, 2011.

PUTRIANI, N.; PERDANA, J.; NUGRAHEDI, M. P. Y. Effect of Thermal Processing on Key Phytochemical Compounds in Green Leafy Vegetables: A Review. **Food Reviews International**, v. 38, n. 4, p. 783 – 811, 2022.

SANJEEWA, W. G. T.; WANASUNDARA, J. P. D.; PIETRASIK, Z.; SHAND, P. J. Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours and application in low-fat pork bologna as a model system. **Food Research International**, v. 43, p. 617 – 626, 2010.

SCHWARTZ; VON ELBE; GIUSTI. Corantes (Capítulo 9). In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição. Editora Artmed, Porto Alegre, p.445-499, 2010.

SCOTT, W.J. Water relations of food spoilage microorganisms. **Advances in Food Research**, v.7, p.83-127, 1957.

SILVA, D. A.; PENA, R. S. Thermodynamic properties of Buriti (*Mauritia flexuosa*) tree gum. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 390-398, 2018.

SILVA, J. L., GOMES, S. D.; COELHO, S. R. M. EVARINI, J.; FERRI, P.; CEREDA, M. P.; LUCAS, S. D. M. Obtenção de concentrado proteico de folhas e parte aérea da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2279-2288, 2012.

SMITH, S. E. The Sorption of Water Vapor by High Polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, n. 3, p. 646-651, 1947.

SOBOWALE, S. S.; OKE, M. O.; ODUNMBAKU, L. A.; ADEBO, O. A. Equilibrium sorption isotherms of *Moringa oleifera* leaves at different temperatures. **African Journal of Science, Technology, Innovation and Development**, ISSN: 2042-1338, 2017.

SONG, B. J.; MANGANAI, C.; FERRUZZI, M. G. Thermal degradation of green tea flavan-3-ols and formation of hetero- and homocatechin dimers in model dairy beverages. **Food Chemistry**, v. 173, p. 305 - 312, 2015.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

TENORIO, A. T.; KYRIAKOPOULOU, K. E.; SUAREZ-GARCIA, E.; VAN DEN BERG, C.; VAN DER GOOT, A. J. Understanding differences in protein fractionation from conventional crops, and herbaceous and aquatic biomass - Consequences for industrial use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 235-245, 2018.

TEO, C. R. P. A.; PRUDENCIO, S. H.; COELHO, S. R. M.; TEO, M. S. Obtenção e caracterização físico-química de concentrado proteico de folhas de mandioca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, p. 993-999, 2010.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 6, n. 1, p. I1.1.1 - I1.1.8, 2002.

ZAPATA, J. E.; SEPÚLVEDA, C. T.; ÁLVAREZ, A. C. Kinetics of the thermal degradation of phenolic compounds from achiote leaves (*Bixa orellana* L.) and its effect on the antioxidant activity. **Food Science e Technology**, v. 42, e30920, 2022.

ZHANG, W.; GRIMI, N.; JAFFRIN, M. Y.; DING, L.; TANGA, B. A short review on the research progress in alfalfa leaf protein separation technology. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 12, p. 2894 - 2900, 2017.

**CAPÍTULO VI**

---

**EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS FOLHAS DA MANDIOQUEIRA  
EM MEIO ALCALINO**

## RESUMO

O aumento relevante de consumidores adeptos às dietas consideradas mais ética, sustentável e saudável tem despertado o interesse para pesquisas de diferentes proteínas vegetais, como a mandioqueira. Assim, faz-se necessário avaliar suas características e a forma de extração das proteínas foliares. Baseado nisso, este capítulo estuda o efeito do pH alcalino (8, 10 e 12), temperatura (5°, 32,5° e 60°C) e tempo de processo (30, 135 e 240 min) na extração de proteína da mandioqueira. Os concentrados proteicos liofilizados foram quantificados de acordo com o rendimento de extração de proteína (REP), rendimento do concentrado proteico (RCP), o teor de composto fenólicos totais (CFT), flavanóis totais (FT), clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), carotenóides totais (CT), cor instrumental, capacidade de absorção de água (CAA) e óleo (CAO). Os resultados de REP foram superiores ao de RCP, exceto para a corrida 11 (pH 10, T = 5°C e t = 240 min) que o REP foi semelhante ao RCP. As corridas obtidas apresentaram quantidades relevantes de carotenóides, compostos fenólicos e flavanóis no concentrado proteico. As respostas clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), carotenóides totais (CT) e variação de cor ( $\Delta E$ ) foram significativas a um nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ). A função desejabilidade ( $D=0,78385$ ) definiu como condição ótima de extração de proteínas pH 8,0, temperatura de 37°C e 30 min de extração. A isoterma de adsorção apresentou comportamento tipo II b e a isoterma de dessorção do tipo III. Os resultados indicam que o concentrado proteico liofilizado possui baixa higroscopicidade e terá estabilidade microbiológica se apresentar umidade inferiores a 6,09 g H<sub>2</sub>O/100 g bs. O modelo de GAB se mostrou eficiente na predição das isotermas de adsorção e dessorção de umidade do produto, a 25°C.

## 1. INTRODUÇÃO

Um crescimento de tendências em escala global está comprometendo a sustentabilidade dos sistemas alimentares e agrícolas. Com isso, um número cada vez maior de consumidores adeptos às dietas consideradas mais éticas, sustentáveis e saudáveis (ex. flexitarianas, vegetarianas, veganas, entre outras) tem ganhado espaço (FASOLIN *et al.*, 2019; MA *et al.*, 2022).

A indústria de alimentos, por sua vez, vem se adequando a essas mudanças no mercado mundial, e o crescimento de produtos à base de plantas passou a ser uma opção na substituição de produtos de origem animal (MA *et al.*, 2022). Assim, avaliar proteínas vegetais tem se tornado cada vez mais necessário, bem como métodos de extração que podem ser empregados, de maneira a ampliar o conhecimento e identificar possíveis aplicações dessas proteínas na formulação de alimentos, com base em suas propriedades e funcionalidades (MA *et al.*, 2022).

A folha de mandioca é uma importante fonte proteica, a qual pode ser estudada para possível aplicação, como por exemplo na formulação de produtos à base de plantas. O consumo das folhas de mandioca é bastante difundido na região Norte do Brasil e em diferentes países, e tem se tornado na Europa, América e Ásia, uma opção para a avaliação das proteínas (CÂMARA; MADRUGA, 2001; SILVA *et al.*, 2012). Contudo, o potencial dessas folhas pode ser melhor explorado, por meio de estudos que visem identificar e melhorar a extração de proteínas da matriz vegetal. A partir disso, este capítulo tem por objetivo avaliar o processo de extração de proteínas da folha de mandioca, por via alcalina, bem como as características do concentrado proteico obtido.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. MATÉRIA PRIMA

As folhas de mandioca de 8 meses de cultivo foram coletadas no município de Salvaterra (Pará, Brasil) (Latitude: 00° 45' 12" S, Longitude: 48° 31' 00" W, altitude de 5 m), durante o mês de junho em 2020. O acesso a espécie utilizada está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, sob o número A5D5AD2.

### 2.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA

Para o processo de extração das proteínas das folhas de mandioca foi utilizado um reator cilíndrico de vidro encamisado com tampa esmerilhada com capacidade para 250 mL, com dimensões externa de 80 mm x 115 mm (H x D) e interna de 50 mm x 100 mm (H x D); com acesso para avaliação constante de temperatura com auxílio de um termômetro. A realização de cada corrida foi feita a partir de uma massa definida de mandioca *in natura* (20 g), mantendo uma proporção sólido :líquido de 1:10 (folha: tampão, m:v). A matéria prima e a solução extratora foram transferidas para um bécker; com um ultra turrax modelo T25 digital (IKA, Alemanha) a 13.000 rpm/min o material foi triturado e homogeneizado. O líquido verde formado foi colocado no reator para a realização das corridas nas condições pré-estabelecidas.

No estudo foi utilizado um planejamento Box-Behnken. Como solvente de extração foram utilizados o tampão fosfato monobásico-fosfato dibásico (pH 8,0) e o tampão carbonato de sódio-bicarbonato de sódio (pH 10 e 12), para a separação de proteínas da mandioca. As variáveis operacionais avaliadas no processo de extração foram pH da solução extratora, temperatura (°C) e tempo (min) de extração; em três níveis (+1, 0 e -1), com uma triplicata no ponto central; totalizando 15 corridas (Tabela 6.1).

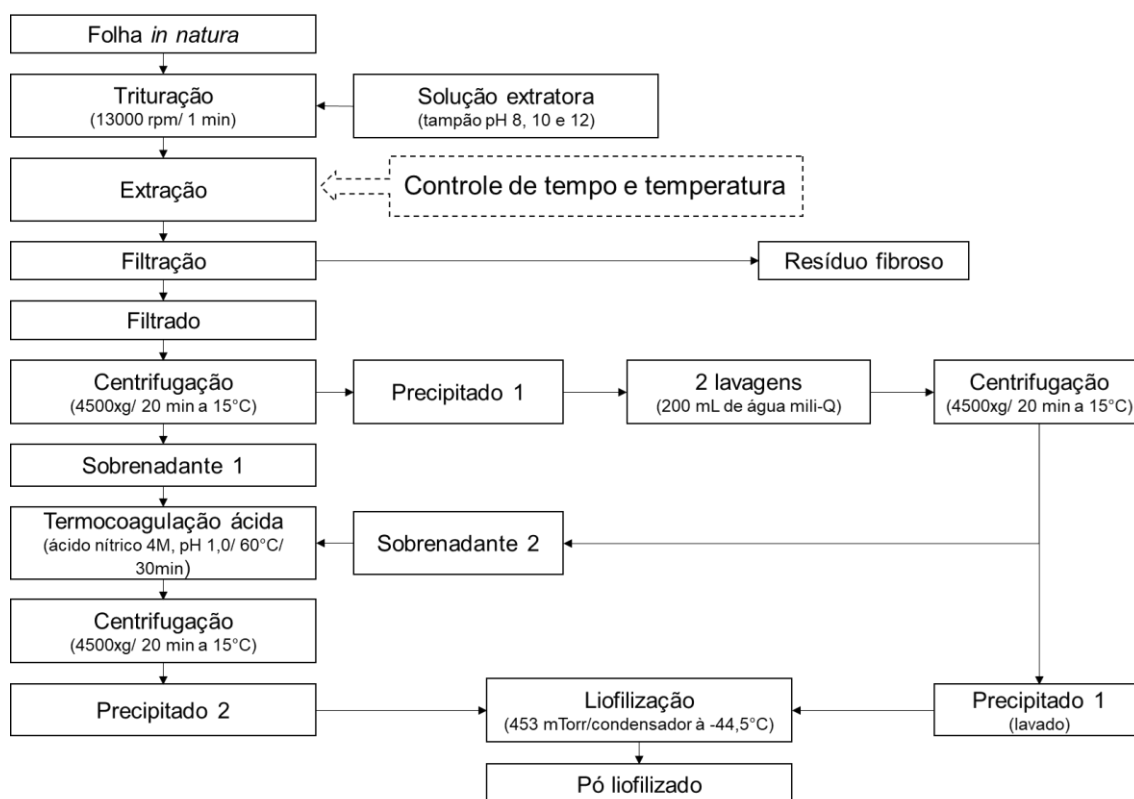
Os concentrados proteico liofilizados produzido de cada corrida do planejamento experimental foram analisados quanto ao teor de compostos fenólicos totais (mg ácido gálico/g do liofilizado), flavanóis totais (mg catequina/g do liofilizado), proteína bruta (%), clorofila a e b (µg/g do liofilizado),

carotenóides totais ( $\mu\text{g/g}$  do liofilizado), cor instrumental ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $c^*$ ,  $h$  e  $\Delta E$ ), rendimento de extração de proteínas (%), rendimento de concentrado proteico (%), capacidade de absorção de água ( $\text{g/g}$  bs) e capacidade de absorção de óleo ( $\text{g/g}$  bs).

**Tabela 6.1.** Níveis codificados e originais das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial do tipo Box-Behnken, para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino.

Corrida	Variável codificada			Variável original		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	pH	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo (min)
1	-1	-1	0	8,0	5	135
2	+1	-1	0	12,0	5	135
3	-1	+1	0	8,0	60	135
4	+1	+1	0	12,0	60	135
5	-1	0	-1	8,0	32,5	30
6	+1	0	-1	12,0	32,5	30
7	-1	0	+1	8,0	32,5	240
8	+1	0	+1	12,0	32,5	240
9	0	-1	-1	10,0	5	30
10	0	+1	-1	10,0	60	30
11	0	-1	+1	10,0	5	240
12	0	+1	+1	10,0	60	240
13	0	0	0	10,0	32,5	135
14	0	0	0	10,0	32,5	135
15	0	0	0	10,0	32,5	135

O fluxograma da Figura 6.1 mostra as principais etapas do processo de extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino.



**Figura 6.1.** Processo de extração de proteínas da mandioca utilizando tampão fosfato monobásico-fosfato bibásico e tampão carbonato de sódio-bicarbonato de sódio.

### 2.2.1. Determinação de compostos fenólicos totais e flavanóis totais

Os extratos produzidos de cada corrida do planejamento experimental foram baseados no método de Boeing *et al.* (2014). O método descrito de Folin-Ciocalteu (WATERHOUSE, 2002) foi utilizado para a quantificação do teor de CFT a partir de uma curva analítica de ácido gálico de concentração de 1 a 60 mg de ácido gálico/L (absorbância entre 0,0258 e 0,8474). O princípio do método é baseado na reatividade dos polifenóis, quando sujeitos a uma interação entre os ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, (30 min); o que acontece por um mecanismo de reação engajado, devido a uma transferência de elétrons (mecanismo redox).

A sequência reacional tomada foi: 250 µL de amostra (ou água destilada para o branco), 250 µL de Folin-Ciocalteu 10% e 1250 µL de carbonato de sódio 7,5% foram misturados, após o tempo reacional necessário (30 min) a



solução foi lida em espectrofotômetro UV-Visível (Modelo Cary 50, marca Varian) a 760 nm.

A determinação do teor de flavanóis totais (FT) foi realizada de acordo com o método de p-dimetilaminocinamaldeído (DMACA), o qual tem como princípio a condensação da molécula de flavanol com o DMACA, conforme o descrito por McMurrough, Baert (1994) e Delcour, Varebeke e Janssens (1985). A sequência reacional foi: 200 µL de extrato e 1000 µL de p-Dimetilaminocinamaldeído (DMACA) 1% diluído em HCl: metanol resfriado, na proporção de 1:3 (v/v), a mistura foi realizada seguida de um tempo reacional de 10 min, na ausência de luz, e seguiu para posterior leitura em espectrofotômetro a 640 nm.

### **2.2.2. Determinação de proteína bruta**

Para a determinação da proteína bruta das amostras foi utilizado o método de micro-Kjeldahl, de acordo com o método n° 920.87 da AOAC (1997). O método tem como base a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio, mediante digestão com ácido sulfúrico, com posterior destilação para liberação de amônia gasosa, a qual reage com solução de ácido bórico para formação de borato de amônio, seguido de titulação com solução de ácido clorídrico padronizada. O fator de conversão nitrogênio-proteína empregado foi de 5,75 (AOAC, 1997).

### **2.2.3. Determinação da clorofila a, clorofila b e carotenóides totais**

O método de Lichtenthaler e Buschmann (2001) foi utilizado para a determinação do teor de clorofila a (µg/g do liofilizado), clorofila b (µg/g do liofilizado) e carotenóides totais (µg/g do liofilizado). A elaboração dos extratos foi realizada utilizando uma massa de 0,02g do liofilizado obtido em cada corrida, o qual foi macerado com auxílio de grau e pistilo e adição de solução de etanol 95%, o extrato foi filtrado em papel qualitativo para posterior aferição em balão volumétrico de 10 mL com a próprio etanol 95%, seguido de leitura em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 664,1 nm, 648,6 nm e 470 nm.

#### 2.2.4. Análise colorimétrica

A análise colorimétrica dos produtos de cada corrida do planejamento foi feita por meio de leitura direta em um colorímetro digital (Chroma Meter CR-300, Konica Minolta, Japão), tendo como base o sistema CIELAB. A calibração do equipamento foi feita em fonte de luz D65, geometria de visão de 0° (componente especular incluído), valores do branco  $X = 0,3174$  e do cinza  $Y = 0,3349$ . Foram determinados os parâmetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $c^*$  e  $h^\circ$  mediante leitura no equipamento e a variação total de cor ( $\Delta E$ ) encontrada por meio da Equação 6.1 (PATHARE, OPARA E AL-SAID, 2013).

$$\Delta E = \left[ (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2 \right]^{1/2} \quad (6.1)$$

onde,  $\Delta L^*$  = variação da luminosidade, indicando a diferença em mais claro (+) e escuro (-),  $\Delta a^*$  = diferença em vermelho (+) e verde (-),  $\Delta b^*$  = diferença em amarelo (+) e azul (-) e  $\Delta E$  = diferença total de cor.

#### 2.2.5. Rendimento de extração de proteína

A partir do cálculo da massa de proteína no concentrado, em relação à massa de proteína na mandioca utilizada na extração foi possível obter o rendimento de extração de proteína (REP, %) (SILVA *et al.*, 2012), conforme a Equação 6.2.

$$\text{REP (\%)} = \frac{\text{PBCP}}{\text{PBIE}} \times 100 \quad (6.2)$$

onde, PBCP é a massa de proteína bruta do concentrado proteico (g) e PBIE é a massa de proteína bruta presente na amostra inicial (g).

#### 2.2.6. Rendimento de concentrado proteico

O rendimento do concentrado proteico (RCP, %) foi quantificado por meio da relação entre a massa do concentrado proteico obtido em cada corrida e a massa inicial de mandioca utilizada (SILVA *et al.*, 2012), pela Equação 6.3.

$$\text{RCP (\%)} = \frac{\text{MCP}}{\text{MIE}} \times 100 \quad (6.3)$$

onde, MCP é a massa do concentrado proteico (g) e MIE é a massa de matéria seca nas folhas utilizadas na extração (g).

### 2.2.7. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo

O método descrito por Cao *et al.* (2009) foi utilizado para determinar a capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção óleo (CAO) das proteínas da mandioca. Para isso manteve-se uma proporção de 1:10 (m/v), amostra:água ou amostra:óleo. Pesou-se em torno de 0,05 g de liofilizado em eppendorf, logo para manter a proporção misturou-se 0,5 mL de água destilada ou óleo vegetal refinado, a homogeneização foi realizada com o auxílio de um agitador de tubo vórtex (modelo K45-2820, marca KASVI basic, Brasil), posteriormente o material homogeneizado foi centrifugado (Modelo SL-5GR, marca Spmlaba, São Paulo) a 1200 x g por 25 min. As amostras foram mantidas inclinadas por 30 min com intuito de escoar o líquido remanescente (sobrenadante), não absorvido. O ganho de massa por unidade de massa de proteína, em base seca, foi registrado como a capacidade de absorção de água ou de óleo Equação 6.4.

$$CAA \text{ ou } CAO = \frac{m_2}{m_1} \quad (6.4)$$

Onde  $m_1$  é o peso da amostra seca e  $m_2$  é o peso da amostra úmida após a drenagem da água ou óleo.

### 2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

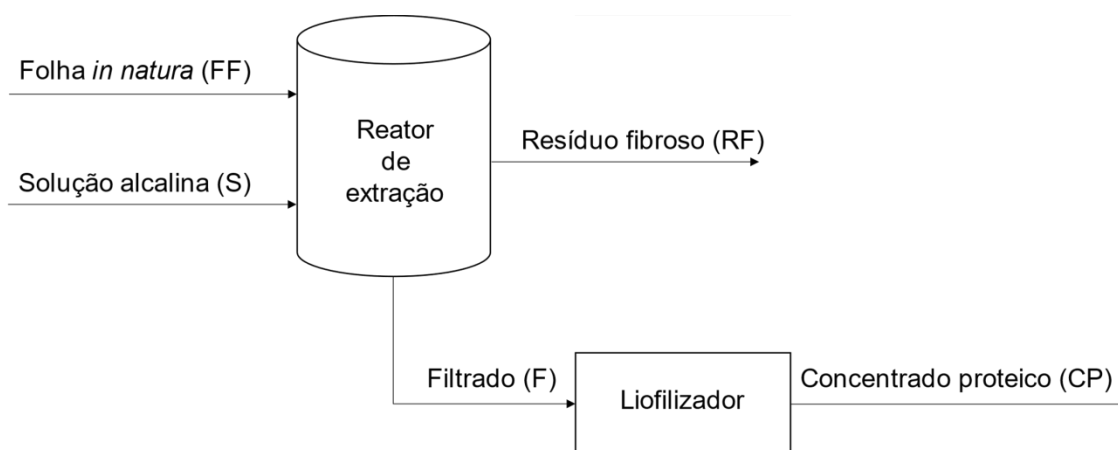
Utilizando o programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT INC., 1995), fez-se análise de variância – ANOVA a 5% de significância estatística, segundo o teste F; teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), e avaliou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o desvio relativo médio (P). Os resultados alcançados permitiram conhecer as regiões ótimas de processo para a extração de proteínas da mandioca, aplicando-se metodologia de superfície de resposta e a função desejabilidade.

Definiu-se os valores de desejabilidade em 0 para o valor mínimo, 0,8 como valor médio e 1 como o valor máximo para todas as respostas. O gráfico da função desejabilidade foi obtido com fator de grade igual a 55, as taxas de

variação da desejabilidade  $s$  e  $t$  foram iguais a 1 e 2 para os compostos bioativos (compostos fenólicos totais – CF e carotenóides totais – CT) e valores de  $s=2$  e  $t=4$  para as respostas: proteína bruta (PB), rendimento de concentrado proteico (RCP) e rendimento de extração de proteína (REP).

#### 2.4. BALANÇO DE MASSA DA EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE PROTEÍNAS EM FAIXA DE PH BÁSICO

Considerando o processamento em regime permanente obteve-se os resultados de entrada e saída de massa (g), matéria seca (g/100 g), proteína bruta (% bs) e umidade (%). O balanço de massa (Figura 6.2) foi realizado apenas para a condição encontrada pela função desejabilidade.



**Figura 6.2.** Balanço de massa da extração otimizada.

O concentrado proteico liofilizado foi avaliado quanto ao teor de composto fenólicos totais (CFT) e carotenóides totais (CT), proteína bruta (PB), rendimento de concentrado proteico (RCP) e rendimento de extração de proteína (REP).

#### 2.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE

O concentrado proteico liofilizado, obtido na condição ótima, foi avaliado higroscopicamente, mediante as isotermas de sorção de umidade. As isotermas foram obtidas em um analisador de sorção de vapor (VSA) (Aqualab VSA, Decagon, USA) a 25°C, conforme metodologia descrita por Silva e Pena (2018). Inicialmente, uma quantidade representativa de amostra, de 800 a 1000

mg, foi pesada em cápsula de aço inoxidável e o registro da massa foi efetuado na própria balança micro analítica do equipamento. O equipamento foi programado para obter dados de sorção (adsorção e dessorção) de umidade, em uma faixa de atividade de água ( $a_w$ ) de 0,1 a 0,9, pelo método DVS. Neste procedimento, equipamento promove o registro contínuo das massas e valores de  $a_w$  até o alcance de cada condição de equilíbrio, definida pelo registro de três medidas consecutivas, da variação massa/tempo ( $dm/dt$  %), com valor igual ou menor que 0,1. Ao final do processo, a amostra foi submetida à secagem, pelo método 920.151 da AOAC (1997), para a determinação da matéria seca. O ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de adsorção e dessorção de umidade do produto são apresentados na Tabela 6.2.

**Tabela 6.2.** Modelos utilizados na predição da isoterma de sorção.

Modelo matemático	Equação
Blahovec (BLAHOVEC; YANNIOTIS, 2009)	$m = \frac{a_w}{a_1 + (b_1 \cdot a_w)} + \frac{a_w}{a_2 - (b_2 \cdot a_w)}$
Ferro-Fontan (FONTAN <i>et al.</i> , 1982)	$m = \left[ \frac{B}{\ln\left(\frac{A}{a_w}\right)} \right]^{\frac{1}{c}}$
GAB (MAROULIS; TSAMI; MARINOS-KOURIS, 1988)	$m = \frac{a \cdot c \cdot k \cdot a_w}{[(1 - k \cdot a_w) \cdot (1 + (c - 1) \cdot k \cdot a_w)]}$
Halsey (HALSEY, 1948)	$m = \left[ \frac{-a}{\ln a_w} \right]^{\frac{1}{b}}$
Henderson (HENDERSON, 1952)	$m = \frac{-\ln(1 - a_w)}{1 - a_w}$
Oswin (OSWIN, 1946)	$m = a \cdot \left[ \frac{a_w}{1 - a_w} \right]^b$
Peleg (PELEG, 1993)	$m = k_1 \cdot a_w^{n_1} + k_2 \cdot a_w^{n_2}$
Smith (SMITH, 1947)	$m = b + a \cdot \ln(1 - a_w)$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MANDIOQUEIRA EM MEIO ALCALINO

##### 3.1.1. Compostos fenólicos totais e flavanóis totais

A Tabela 6.3 mostra os resultados encontrados para compostos fenólicos (CFT) e flavanóis totais (FT), nos concentrados proteicos liofilizados, obtidos nas diferentes condições experimentais, do Planejamento Box-Behnken.

**Tabela 6.3.** Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g liofilizado) e flavanóis totais (mg eq. catequina/g liofilizado) para cada corrida do planejamento.

Corridas	Compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g do liofilizado)	Flavanóis totais (mg eq. catequina/g do liofilizado)
1	467,1±23,33	6,13±0,40
2	61,6±4,05	0,20±0,01
3	313,1±8,96	3,86±0,25
4	145,1±3,12	0,09±0,10
5	565,9±14,20	6,95±0,41
6	93,3±3,51	1,70±0,13
7	530,1±29,50	6,28±0,33
8	42,3±3,28	0,49±0,07
9	147,1±7,86	2,00±0,06
10	76,8±0,13	0,97±0,19
11	138,8±10,26	2,36±0,07
12	132,9±7,87	2,24±0,37
13	245,2±18,18	4,46±0,36
14	206,8±10,71	4,89±0,30
15	459,6±15,96	7,98±0,30

De acordo com planejamento, os CFT variaram de 42,3 a 565,9 mg eq. ácido gálico/g do liofilizado e os FT apresentaram valores de 0,09 a 7,98 mg eq. catequina/g do liofilizado. A corrida 5 (pH 8, 32,5°C e 30 min de extração) foi o que apresentou maior conteúdo de CFT, enquanto para FT o maior conteúdo ocorreu na corrida 15 (pH 10, 32,5°C e 135 min de extração).

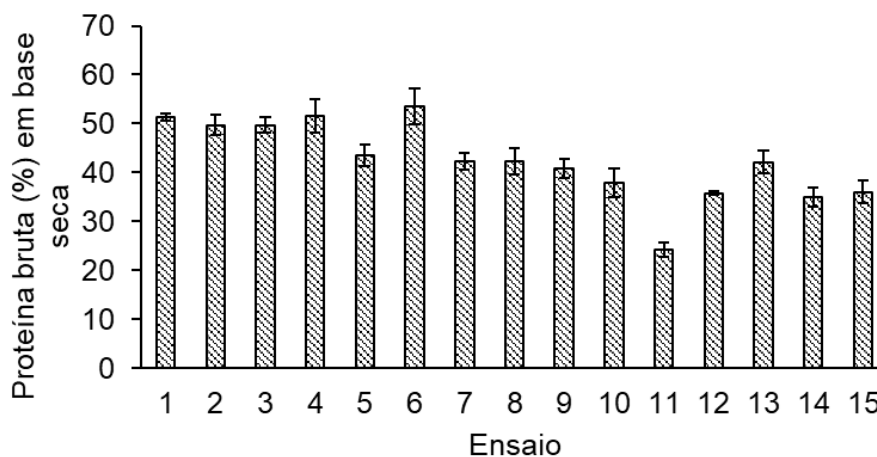
Em estudo realizado para avaliar o efeito do pH na estabilidade de CFT de vegetais, Friedman e Jürgens (2000) observaram que alguns compostos

fenólicos, como os ácidos cafeico, clorogênico e gálico (ácidos fenólicos) não foram estáveis em pH elevado. Tendência semelhante foi observada no planejamento experimental, em que maiores teores de CFT ocorreram em menores pH (pH 8 > pH 10 > pH 12,0). Ao avaliarem os espectros de absorção dos compostos fenólicos citados, os autores observaram que ocorreram alterações não reversíveis, e que o aumento do pH promoveu mudanças químicas nos produtos, o que foi atribuído a formação de intermediários quinona instáveis.

Friedman e Jürgens (2000) avaliaram flavanóis (catequina e epicatequina) e notaram que mudanças foram induzidas em pH elevados, contudo, de forma menos pronunciada que os ácidos fenólicos, devido à complexidade estrutural que os flavanóis possuem, mesmo havendo grupos OH fenólicos. Os flavan-3-ols possuem estruturas aromáticas multianéis, enquanto os ácidos fenólicos possuem monoanel, o que os torna mais suscetíveis aos efeitos do pH. Os concentrados proteicos obtidos nas corridas realizadas em pH 12 (corridas 2, 4, 6 e 8) apresentaram teores baixos de FT, comprovando que no nível mais elevado de pH utilizado na extração, os níveis de degradação desses compostos foram maiores.

### **3.1.2. Proteína bruta**

A Figura 6.3 apresenta os teores de proteína bruta para os concentrados proteicos liofilizado, obtidos nas diferentes condições de extração. O teor máximo de PB ( $\approx 53\%$ ) de proteína bruta (PB) foi observado para o concentrado proteico obtido na extração realizada em pH 12,0, temperatura de 32,5°C e tempo de extração de 30 min.



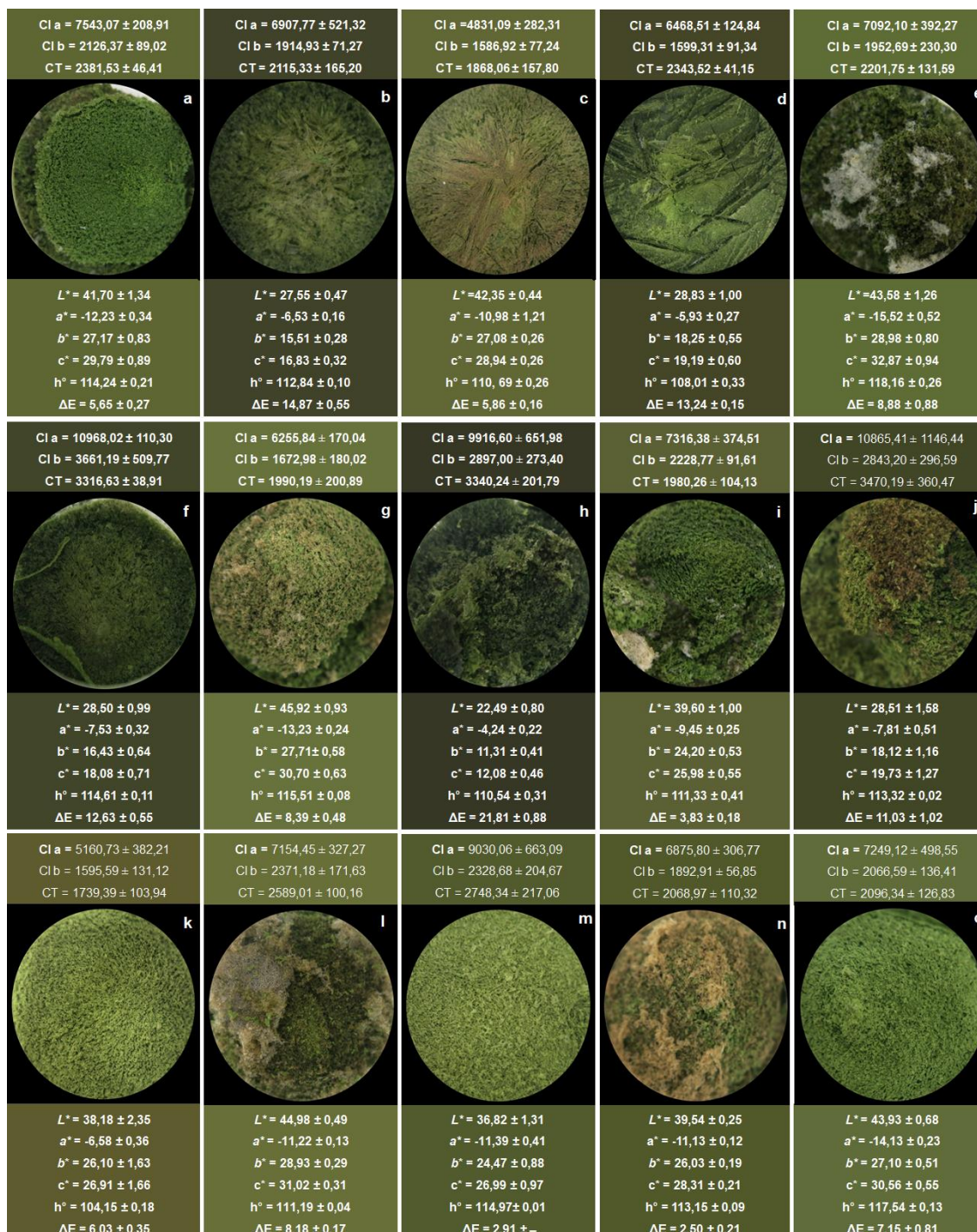
**Figura 6.3.** Valores de proteína bruta (%) em base seca dos concentrados proteicos liofilizados para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino.

Zhang *et al.* (2015) avaliaram o efeito da temperatura na extração de proteínas das folhas de chá verde, em solução alcalina. A 0,5 g de folhas foram adicionados 20 mL de solução de NaOH 0,1 M e o sistema foi mantido a 25°C, 60°C e 95°C por 2 h. O rendimento de extração de proteínas aumentou significativamente com a temperatura (23% a 25°C, 38% a 60°C e 84% a 95°C).

### 3.1.3. Clorofila a, clorofila b, carotenóides totais e colorimetria

A Figura 6.4 mostra os resultados para clorofila a – Cl a ( $\mu\text{g/g}$  do liofilizado), clorofila b – Cl b ( $\mu\text{g/g}$  do liofilizado), carotenóides totais – CT ( $\mu\text{g/g}$  do liofilizado) e cor instrumental, para os concentrados proteicos liofilizados extraídos da mandioca (Apêndices 6.I e 6.II).





**Figura 6.4.** Imagens dos concentrados proteicos liofilizados para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino e seus respectivos parâmetros colorimétricos, valores quantitativos de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais para cada corrida. (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5, (f) 6, (g) 7, (h) 8, (i) 9, (j) 10, (k) 11, (l) 12, (m) 13, (n) 14 e (o) 15.

O concentrado proteico liofilizado que apresentou maior teor de clorofila a ( $\approx 11000 \mu\text{g/g}$  do liofilizado) e clorofila b ( $\approx 3600 \mu\text{g/g}$  do liofilizado) foi a

corrida 6 (pH12, 32,5°C e 30 min de extração) e a corrida com menor valor de clorofila a ( $\approx 4800 \mu\text{g/g}$  do liofilizado) e clorofila b ( $\approx 1600 \mu\text{g/g}$  do liofilizado) foi a corrida 3 (pH8, 60°C e 135 min de extração). Segundo Streit *et al.* (2005) a clorofila é afetada pelo pH do meio, a qual é apontada com maior estabilidade em pH básico quando sujeita à aquecimento; nota-se também que tanto a corrida 6 quanto a 3, mantiveram suas proporções de clorofila a e b de 3:1 (Cl a:Cl b).

Quando avaliado o teor de carotenoides totais no concentrado proteico liofilizado, a corrida 10 apresentou melhor resultado, a qual teve como condições pH 10, 60°C e 30 min de extração, alcançando um valor de aproximadamente  $3500 \mu\text{g/g}$  de liofilizado. No domínio experimental utilizado não houve uma tendência para a quantificação de CT.

Os valores do parâmetro  $L^*$  foram inferiores a 50 em todas as corridas, indicando uma tendência a cores mais escuras. Os valores do parâmetro  $a^*$  foram negativos e do parâmetro  $b^*$  positivos, indicando que os concentrados proteicos apresentam coloração tendendo ao verde e a amarelo. Os valores de  $c^*$  se mantiveram entre 12 e 32, indicando que a cor dos produtos apresentou baixa saturação. Os valores de  $h^\circ$  ( $104 - 118^\circ$ ), por sua vez, confirmaram que a coloração dos concentrados proteicos foi amarela-esverdeada (PATHARE, OPARA E AL-SAID, 2013).

De acordo com o valor do parâmetro  $b^*$ , os concentrados proteicos com maior intensidade da coloração verde foram as corridas 1 (Figura 6.4a), 3 (Figura 6.4c), 5 (Figura 6.4e), 7 (Figura 6.4g), 12 (Figura 6.4l), 13 (Figura 6.4m), 14 (Figura 6.4n) e 15 (Figura 6.4o), supõem-se que o pH utilizado corroboram para uma possível manutenção da clorofila das corridas (pH 8,0 e 10,0). Como mencionado anteriormente, a clorofila é influenciada pelo pH, a qual é considerada mais estável em pH básico ( $\approx 9,0$ ), quando submetida à aquecimento. Os íons positivos da membrana celular interagem com as cargas negativas do meio básico. As cargas tendem a se manter em equilíbrio e, conseqüentemente, atuam na estabilidade das clorofilas evitando a degradação. Adekunle *et al.* (2010) propõem uma classificação a partir da variação total de cor ( $\Delta E$ ), neste caso a variação entre o concentrado proteico liofilizado e as folhas, foram muito distintas ( $\Delta E > 3$ ), exceto para os produtos

das corridas 13 (Figuras 6.4m) e 14 (Figura 6.4n), que foram obtidos em pH 10, 32,5°C e 135 min de extração e apresentaram os menores valores  $\Delta E$ .

### 3.1.4. Rendimento de extração de proteína e rendimento de concentrado proteico

A Tabela 6.4 apresenta os valores de rendimento de extração das proteínas (REP) e rendimento do concentrado proteico (RCP). Para a obtenção dos dados, partiu-se do pressuposto que a quantidade de proteína disponível era de 6,86 g de proteínas/100 g de folha *in natura* ( $\approx 28,2\%$  bs).

**Tabela 6.4.** Valores do rendimento de extração de proteínas (REP) e rendimento de concentrados proteico (RCP) para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino.

Corrida	REP (%)	RCP (%)
1	34,33	16,18
2	32,61	15,85
3	34,73	16,88
4	29,94	14,03
5	38,62	21,44
6	25,73	11,61
7	37,35	21,29
8	21,48	12,24
9	23,19	13,73
10	22,03	14,07
11	33,24	33,11
12	24,82	16,75
13	26,46	15,18
14	25,71	17,78
15	33,03	22,17

O maior valor de REP foi observado para a corrida 5 (38,62%), que apresentou um valor de RCP de 21,44%; quando a extração foi realizada a pH 8,0, temperatura de 32,5°C e tempo de extração de 30 min. O maior valor de RCP, por sua vez, ocorreu na corrida 11 (pH 10, T = 5°C e t = 240 min) (33,11%), quando o valor de REP foi de 33,24%. Os resultados indicam que nestas condições toda proteína extraída foi recuperada.

Hojilla-Evangelista *et al.* (2016) extraíram proteínas das folhas de alfafa em solução alcalina de NaOH 0,1N (pH 10, por 2 h a 50°C). Os autores

conseguiram extrair e recuperar proteínas da folha de alfafa nestas condições, porém houve dificuldade na obtenção de altos rendimentos e de concentrado proteico com alta pureza.

Coldebella *et al.* (2013) estudaram quatro métodos de extração de proteínas da folha de mandioca. Em um dos métodos, as folhas de mandioca foram colocadas em água (1:10, p/v) e com uma solução de NaOH 0,1N foi ajustado o pH do meio para 8,0. Nesta condição, foi observado um teor de proteínas de 44% e uma recuperação de proteína 59,7%; valores estes superiores aos obtidos no presente estudo.

Pérez *et al.* (2022) estudaram a extração e precipitação de proteínas da folha de moringa, variando as condições de pH (10, 11 e 12) e concentração de NaCl (0; 0,25; 0,5 M). Os autores observaram que os maiores rendimentos de extração foram obtidos em pH 11 (40,4 g/100 g) e pH 12 (38,79 g/100 g). Estes rendimentos são da mesma ordem de grandeza dos observados, quando a extração de proteínas da mandioqueira foi realizada em pH 8, temperatura de 32,5°C e 30 min de extração (38,62%).

### **3.1.5. Capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo**

A capacidade de absorção de água (CAA) e a capacidade de absorção de óleo (CAO) dos concentrados proteicos são apresentados na Tabela 6.5. Os produtos obtidos nas diferentes condições experimentais apresentaram elevados valores de CAA (4,71-8,96 g/g bs) e CAO (4,66-8,70 g/g bs). Os maiores valores de CAA foram observados para os concentrados proteicos obtidos nas corridas 4 (8,96 g/g bs) e 6 (8,59 g/g b.s.), que foram produzidas em pH 12. Este resultado sugere que o aumento do pH favoreceu a hidratação das proteínas, o que foi também reportado por Fleming *et al.* (1975) para farinhas, concentrados e isolados de soja e girassol, normais e tratados com álcali.

Kinsella (1979) estudaram as propriedades funcionais de proteínas de soja, tanto na forma de isolada, como na forma de concentrado proteico. O autor observou que os concentrados proteicos apresentaram menor capacidade de ligação com moléculas de água do que os isolados proteicos, o que foi atribuído à presença de outros componentes não proteicos (ex. carboidratos), nos concentrados.

**Tabela 6.5.** Capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO) dos concentrados proteicos liofilizados para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino.

Corrida	CAA (g/g bs)	CAO (g/g bs)
1	5,67±0,90	7,05±0,64
2	7,70±0,07	6,68±0,45
3	5,84±0,63	7,46±0,50
4	8,96±0,52	7,01±0,21
5	6,37±0,45	7,34±0,11
6	8,59±0,33	6,52±0,36
7	5,76±0,42	6,08±0,48
8	8,07±0,27	6,26±0,52
9	4,71±0,52	4,66±0,50
10	8,02±0,11	7,17±0,27
11	5,06±0,35	5,16±0,30
12	7,12±0,50	8,70±1,35
13	6,46±0,24	6,98±0,23
14	6,75±0,64	5,75±0,13
15	6,36±0,17	6,69±0,10

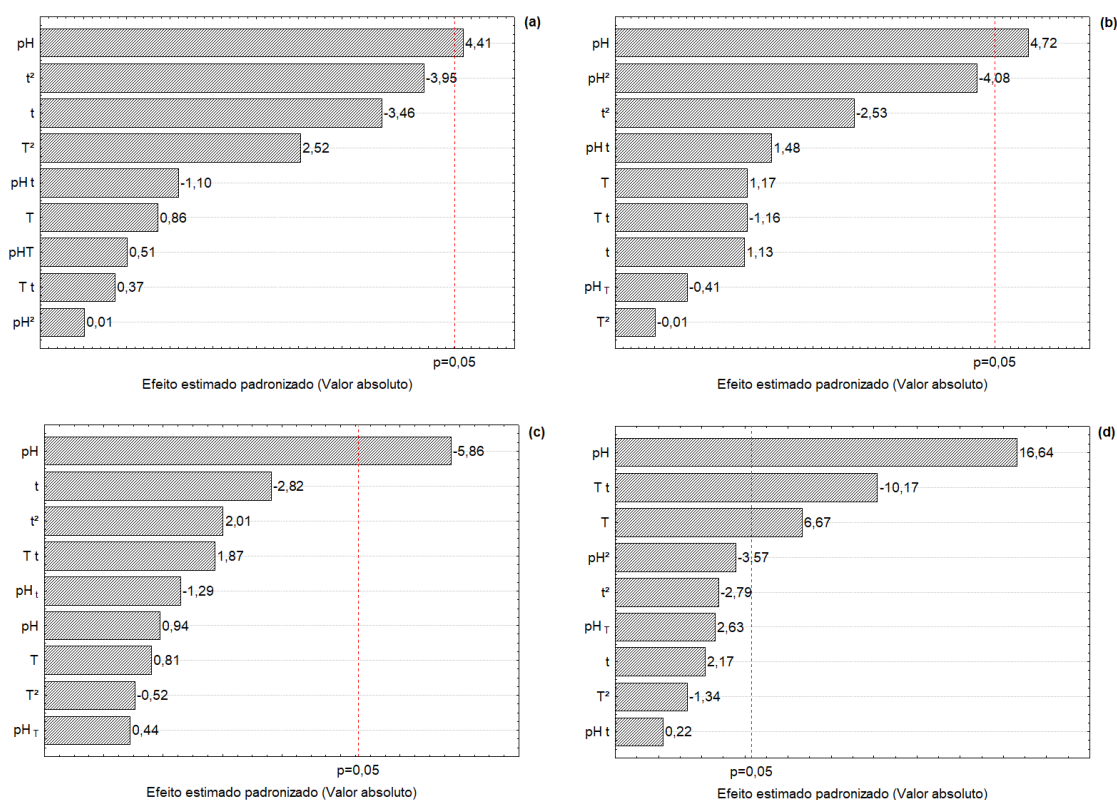
O maior resultado obtido para CAO foi de 8,70 g/g bs, referente a corrida 12 (pH12, 60°C e 240 min de extração). Ao comparar os resultados de CAO de concentrados proteicos de outras matrizes vegetais encontram-se diferentes valores, sendo superior ao de concentrados da soja e inferior ao concentrado proteico de grão de bico, 3,45 g/g bs e 10,9 - 14 6 g/g bs, respectivamente (MA *et al.*, 2022). Concentrados proteicos com boa capacidade de retenção de óleo podem ser utilizados como diluentes em carnes ou como produtos cárneos similares, à base de planta. Como relatado por 54 que utilizou concentrados de grão de bico e farinha de ervilha em mortadela suína promovendo menor perda de líquido do produto (SANJEEWA *et al.*, 2010).

### 3.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental foi realizado com intuito de estabelecer a faixa de pH, temperatura e tempo de extração de proteínas da mandioca. As variáveis dependentes foram: Clorofila a (Cl a) e b (Cl b), carotenóides totais (CT), variação de cor ( $\Delta E$ ), proteína bruta (PB), flavanóis totais (FT),

compostos fenólicos totais (CFT), Rendimento de concentrado proteico (RCP), Rendimento de extração de proteína (REP), capacidade de absorção de água (CAA), capacidade de absorção de óleo (CAO). A matriz do planejamento experimental e os resultados para as respostas avaliadas são apresentados na Tabela 6.6. A aleatoriedade dos dados pode ser confirmada nos gráficos de distribuição de resíduos apresentados nos Apêndices de 6.III a 6.VI.

Entre as variáveis dependentes, algumas não apresentaram efeitos significativos para as condições pré estabelecidas ( $p > 0,05$ ): clorofila a (Cl a), carotenóides totais (CT), compostos fenólicos totais (CFT), flavanóis totais (FT), rendimento de extração de proteína (REP), rendimento de concentrado protéico (RCP) e capacidade de absorção de óleo (CAO). As demais variáveis dependentes apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). Fez-se a ANOVA a partir do valor de  $p$  e gráficos de Pareto, apresentados na Tabela 6.7 e Figura 6.5.



**Figura 6.5.** Gráfico de Pareto para a resposta clorofila b – Cl b (a), variação de cor –  $\Delta E$  (b), proteína bruta – PB (c) e capacidade de absorção de água – CAA (d).

**Tabela 6.6.** Matriz do planejamento fatorial Box-Behnken e os resultados para as respostas do Planejamento.

Corrid a	Variáveis originais (variáveis codificadas)			Respostas (Variáveis dependentes)										
	pH (X <sub>1</sub> )	T (X <sub>2</sub> )	t (X <sub>3</sub> )	Cl a	Cl b	CT	ΔE	PB	FT	CFT	RCP	REP	CAA	CAO
1	8,0	5,0	135	7543,1	2126,4	2381,5	5,65	51,28	6,13	467,12	16,18	34,33	5,67	7,05
2	12,0	5,0	135	690787	1914,9	2115,3	14,87	49,74	0,20	61,57	15,85	32,61	7,70	6,68
3	8,0	60,0	135	4831,1	1586,9	1868,1	5,86	49,73	3,86	313,1	16,88	34,73	5,84	7,46
4	12,0	60,0	135	6468,5	1599,3	2343,5	13,24	51,59	0,09	145,1	14,03	29,94	8,96	7,01
5	8,0	32,5	30	7092,1	1952,7	2201,7	8,88	43,54	6,95	565,9	21,44	38,62	6,37	7,34
6	12,0	32,5	30	10968,0	3661,2	3316,6	12,63	53,57	1,70	93,3	11,61	25,73	8,59	6,52
7	8,0	32,5	240	6255,8	1673,0	1990,2	8,39	42,40	6,28	530,1	21,29	37,35	5,76	6,08
8	12,0	32,5	240	9916,6	2897,0	3340,2	21,81	42,42	0,49	42,3	12,24	21,48	8,07	6,26
9	10,0	5,0	30	7316,4	2228,8	1980,3	3,83	40,84	2,00	147,1	13,73	23,19	4,71	4,66
10	10,0	60,0	30	10865,4	2843,2	3470,2	11,03	37,85	0,97	76,8	14,07	22,03	8,02	7,17
11	10,0	5,0	240	5160,7	1595,6	1739,4	6,03	24,27	2,36	138,8	33,11	33,24	5,06	5,16
12	10,0	60,0	240	7154,4	2371,2	2589,0	8,18	35,80	2,24	132,9	16,75	24,82	7,12	8,70
13	10,0	32,5	135	9030,1	2328,7	2748,3	2,91	42,13	4,46	245,2	15,18	26,46	6,46	6,98
14	10,0	32,5	135	6875,8	1892,9	2069,0	2,50	34,94	4,89	206,8	17,78	25,71	6,75	5,75
15	10,0	32,5	135	7249,1	2066,6	2096,3	7,15	36,00	7,98	459,6	22,17	33,03	6,36	6,69

T: temperatura (°C); t: tempo de extração (min); Cl a: clorofila a (µg/g do liofilizado); Cl b: clorofila b (µg/g do liofilizado); CT: carotenóides totais (µg/g do liofilizado); ΔE variação de cor; PT: proteína bruta (%); FT: flavanóis totais (mg eq. catequina/g liofilizado); CFT: compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/g do liofilizado); RCP: rendimento de concentrado proteico (%); REP: rendimento de extração de proteína (%); CAA: capacidade de absorção de água (g/g bs); CAO: capacidade de absorção de óleo (g/g bs)

**Tabela 6.7.** Efeito estimado, erro puro e grau de significância estatística ( $p$ ) para os fatores do modelo clorofila b (CI b), variação de cor ( $\Delta E$ ), proteína bruta (PB) e capacidade de absorção de água (CAA).

Fator	CI b			$\Delta E$			PB			CAA		
	Efeito estimado	Erro puro	$p$	Efeito estimado	Erro puro	$p$	Efeito estimado	Erro puro	$p$	Efeito estimado	Erro puro	$p$
Média	<b>2204,18</b>	<b>63,33</b>	<b>0,0008</b>	<b>10,09</b>	<b>0,74</b>	<b>0,0054</b>	<b>43,58</b>	<b>1,12</b>	<b>0,0007</b>	<b>7,07</b>	<b>0,06</b>	<b>0,0001</b>
$pH$	<b>683,37</b>	<b>155,12</b>	<b>0,0479</b>	<b>8,60</b>	<b>1,82</b>	<b>0,0420</b>	2,59	2,74	0,4446	<b>2,42</b>	<b>0,15</b>	<b>0,0036</b>
$pH^2$	1,45	114,17	0,9910	-5,46	1,34	0,0552	<b>-11,84</b>	<b>2,02</b>	<b>0,0279</b>	-0,38	0,11	0,0703
$T$	133,74	155,12	0,4795	2,12	1,82	0,3635	2,21	2,74	0,5052	<b>0,97</b>	<b>0,15</b>	<b>0,0218</b>
$T^2$	287,73	114,17	0,1279	-0,01	1,34	0,9960	-1,05	2,02	0,6547	-0,14	0,11	0,3115
$T$	-537,27	155,12	0,0742	2,05	1,82	0,3762	-7,73	2,74	0,1063	0,31	0,15	0,1627
$t^2$	-451,35	114,17	0,0584	-3,39	1,34	0,1273	4,06	2,02	0,1824	-0,30	0,11	0,1084
$pH \times T$	111,92	219,37	0,6607	-1,05	2,57	0,7225	1,70	3,88	0,7037	0,54	0,21	0,1192
$pH \times t$	-242,24	219,37	0,3846	3,80	2,57	0,2779	-5,01	3,88	0,3260	0,05	0,21	0,8433
$T \times t$	80,58	219,37	0,7486	-2,99	2,57	0,3646	7,26	3,88	0,2022	<b>-2,09</b>	<b>0,21</b>	<b>0,0095</b>

Variáveis significativas ( $p \leq 0,05$ ) em negrito.



De acordo com os dados de efeito estimado apresentados, foi possível verificar que o pH linear (pH) ou pH quadrático (pH<sup>2</sup>) possuem influência sobre as respostas: clorofila b, variação de cor, proteína bruta e capacidade de absorção de água, sendo um efeito positivo e desejável, exceto para a resposta proteína bruta que o efeito foi negativo e indesejável. A variável dependente CAA, também apresentou efeito significativo para a T linear e para a interação T t.

O menor valor de Cl b encontrado ocorreu na corrida 3, o qual mesmo em pH básico (clorofila mais estável) ocorreu a degradação do composto, supõem-se que essa degradação tenha ocorrido devido a temperatura de processo (60°C) (Figura 6.5a). A variação de cor apresentou efeito significativo para o fator pH linear (pH), indicando que à medida que há o aumento do pH maior será a influência sobre a variação de cor. As corridas que apresentaram numericamente maior resultado de  $\Delta E$  foram as corridas 2, 4, 6 e 8, todos em pH 12 (visivelmente mais escuros) (Figura 6.5b). Ao avaliar o efeito estimado para a proteína bruta (PB), percebe-se que o efeito é negativo e indesejável sobre o percentual protéico encontrado no liofilizado, isso se deve o pH alcalino afetar a natureza e a distribuição de cargas das proteínas durante o processamento (Figura 6.5c).

Na Figura 6.5d, observa-se a grande interferência do pH linear (pH) e da temperatura linear (T) sobre CAA. A interferência de ambos pode ser aliada a ionização dos terminais hidrofílicos e a desestabilização interna da proteína. A interação T t, foi significativa e indesejável, pois tende a reduzir a CAA das proteínas com o aumento da temperatura e seu tempo de exposição a essas condições.

A partir dos resultados obtidos para os efeitos das variáveis de entrada, foi realizada a análise de variância para as respostas com efeitos significativos, gerando seus respectivos modelos de regressão, valores de  $F_{\text{calculado}}$  e  $F_{\text{tabelado}}$  e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (Tabela 6.8).

**Tabela 6.8.** Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo ajustado às respostas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	R <sup>2</sup>
<b>Clorofila b (Cl b)</b>						
Regressão	2763804,52	9	307089,39	0,79	4,77	0,586
Resíduos	1952612,74	5	390522,55			
Falta de ajuste	1856362,79	3	618787,60	12,86	19,16	
Erro Puro	96249,95	2	48124,98			
Total	4716417,26	14				
Modelo: Cl b = 575,31 + 222,88pH - 0,36pH <sup>2</sup> + 15,10T - 0,38T <sup>2</sup> + 1,02pH.T - 0,58*135.pH + 0,01.135.T - 374,09						
<b>Varição total de cor (ΔE)</b>						
Regressão	333,94	9	37,1044	3,70	4,77	0,869
Resíduos	50,19	5	10,0370			
Falta de ajuste	36,94	3	12,3144	1,86	19,16	
Erro Puro	13,24	2	6,6211			
Total	384,13	14				
Modelo: ΔE = 129,08 - 26,07pH + 1,37pH <sup>2</sup> + 0,20T + 0,00001T <sup>2</sup> - 0,01pH.T + 0,009.135.pH - 0,0005.135.T - 14,21						
<b>Proteína bruta (PB)</b>						
Regressão	833,58	9	92,6197	8,35	4,77	0,938
Resíduos	55,48	5	11,0954			
Falta de ajuste	25,36	3	8,4531	0,56	19,16	
Erro Puro	30,12	2	15,0589			
Total	889,05	14				
Modelo: PB = 320,12 - 57,45pH + 2,96pH <sup>2</sup> - 0,38T + 0,001T <sup>2</sup> + 0,02pH.T - 0,01.135.pH + 0,001.135.T + 12,31						
<b>Capacidade de absorção de água (CAA)</b>						
Regressão	19,26	9	2,1398	5,96	4,77	0,9147
Resíduos	1,80	5	0,3591			
Falta de ajuste	1,71	3	0,5704	13,51	19,16	
Erro Puro	0,08	2	0,0422			
Total						
Modelo: CAA = 10,09 - 1,48pH + 0,095pH <sup>2</sup> + 0,005T + 0,0002T <sup>2</sup> + 0,005pH.T + 0,0001.135.pH - 0,0004.135.T + 1,15						

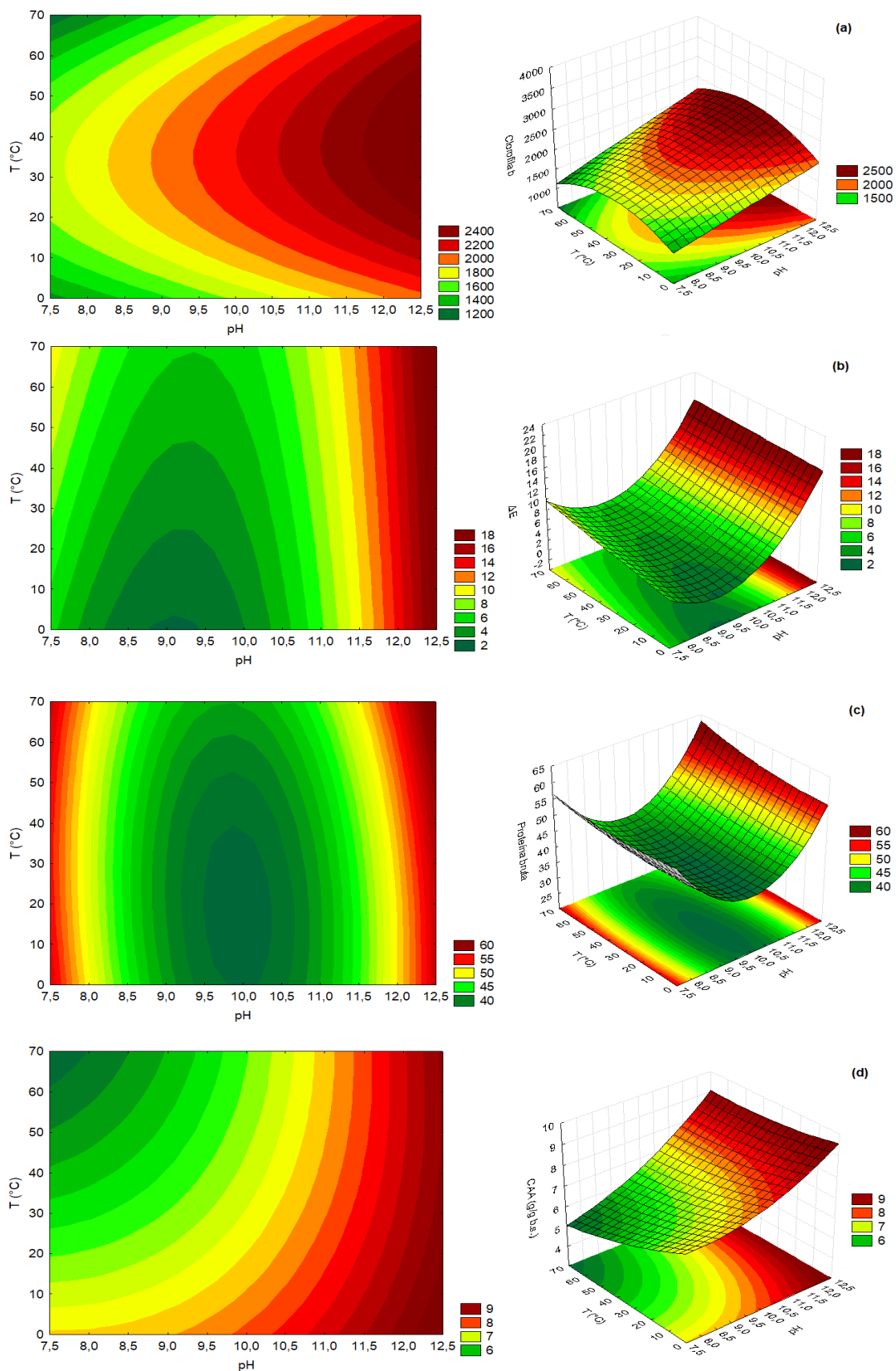
SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

Os resultados de PB e CAA foram as respostas que apresentaram valores de  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ , evidenciando que para estas variáveis a faixa de pH alcalina, o tempo de extração e a temperatura de processo pré estabelecidas atuam significativamente sobre o percentual de proteína bruta (PB) e a capacidade de absorver água (CAA) do produto. As respostas Cl b e ΔE apresentaram valores de  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ , não sendo significativo ao nível

de significância de 5%, ou seja, considera-se a hipótese nula e conclui-se que os efeitos não diferem entre si ao nível de significância 5%, logo possuem efeitos semelhantes. Os valores de  $R^2$  foram maiores para PB e CAA, explicando o modelo acima de 90% para ambas variáveis dependentes.

As superfícies de resposta e as curvas de contorno adquiridas pelas equações do modelo para Cl b,  $\Delta E$ , PB e CAA encontram-se na Figura 6.6. Ao avaliar a Figura 6.6a, observou-se que à medida que o pH alcalino (pH) aumenta na região de temperatura de 20° a 55°C há maior percentual de proteína bruta no produto, sendo esta a região ótima de trabalho. Schwartz, Von Elbe e Giusti (2010) afirmam que a clorofila sofre influência do pH. Em condições alcalinas, a clorofila apresenta grande estabilidade ao ser submetida à aquecimento quando comparada a pH's ácidos, por exemplo. As clorofilas possuem alta estabilidade em temperatura ambiente, contudo quando expostas a temperaturas superiores a 50°C sua estabilidade é comprometida, fato evidenciado em estudo realizado com suco de brócolis, onde avaliaram a degradação térmica e pressão-temperatura da clorofila, os quais afirmam uma extrema estabilidade à pressão das clorofilas a e b à temperatura ambiente, mas o arranjo entre temperatura e pressão promoveu degradações expressivas apenas à temperatura superiores a 50 °C (VAN LOEY *et al.* 1998).

As Figuras 6.6b mostram que em pH altamente básico (pH > 12) independente da temperatura estipulada (0° a 70°C) a  $\Delta E$  encontra-se em região ótima. Os liofilizados produzidos nessa faixa de pH foram as corridas 2, 4, 6 e 8, os quais apresentaram maiores valores de  $\Delta E$  (14,87; 13,24; 12,63 e 21,81, respectivamente) e coloração verde mais intensa e perceptível (Figuras 6.4b, 6.4d, 6.4f e 6.4g do item 3.1.3). Um estudo realizado para análise do potencial dos bioativos como biossensores para detecção de pH na faixa de 2 a 13, foi evidenciado que a degradação da cor ocorreu em faixa de pH ácida, promovendo a mudança da verde para um verde amarelado ou oliva. Contudo, quando a interação da clorofila em pH de 6 a 13 os extratos se mantiveram com a coloração indicando que a cor da clorofila é estável em verde nessa condição (WULANDARI *et al.*, 2020).

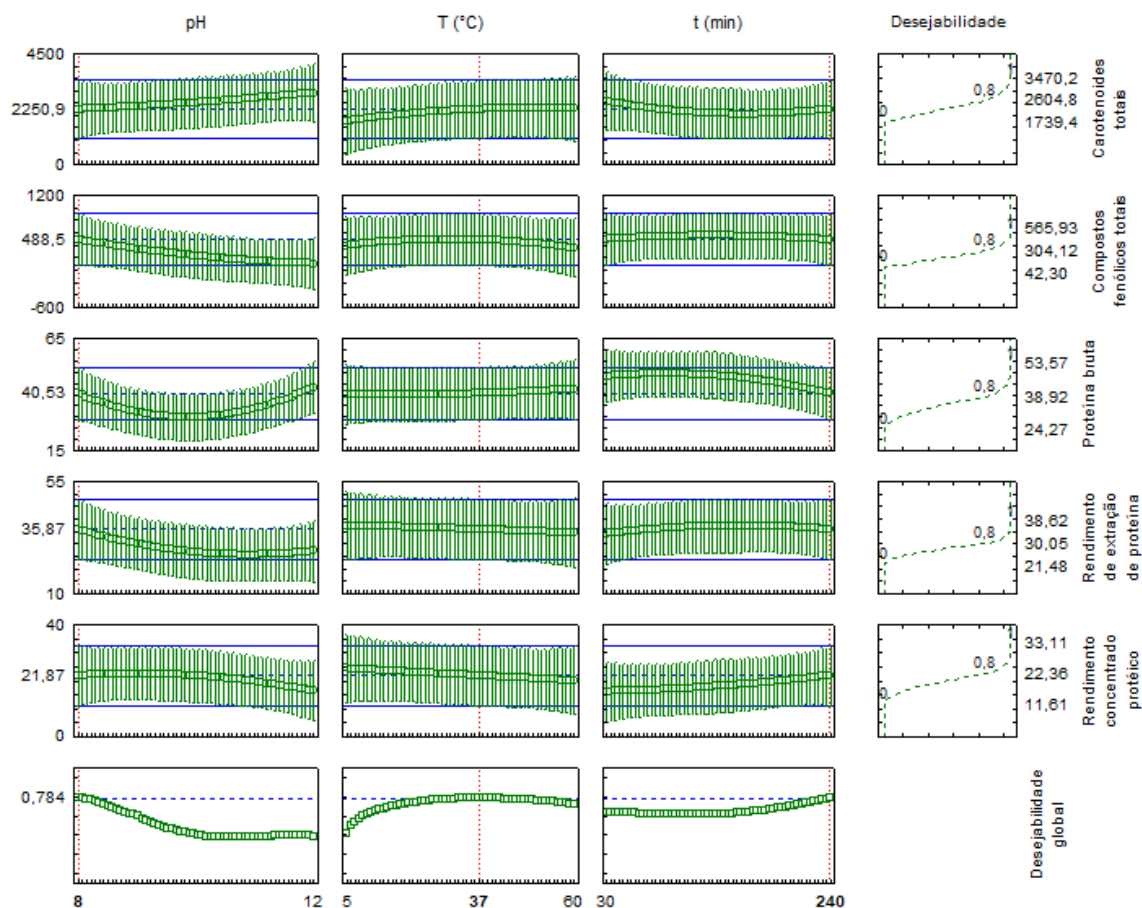


**Figura 6.6.** Gráfico da curva de contorno e gráfico da superfície de resposta em função do pH e da temperatura (T) para Cl b - (a),  $\Delta E$  - (b), PB - (c) a 135 min e CAA (d) a 240 min.

A avaliação da curva de contorno e superfície de resposta (Figura 6.6c) para variável dependente proteína bruta (PB) indica que a região ótima se dar em pH inferior a 7,5 e superior a 12, independente da temperatura de processo empregada. Grande parte das proteínas apresenta pH entre 6 e 7 (SGARBIERI, 1996), o uso de tampão alcalino pode ter facilitado a extração das proteínas com auxílio na quebra da parede celular vegetal, o que beneficia a solubilidade da proteína ou a hidrólise das proteínas folhosas geralmente consideradas insolúveis, ocorrência citada em estudo realizado com intuito de avaliar a ação alcalina na extração de proteínas em resíduos de folhas de chá verde para a viabilidade de uma base para a biorrefinaria integrada de folhas, onde foi observado que o uso de parâmetros de pH e temperatura mais extremas (95°C, pH 13), a rede de polissacarídeos complexos presentes na parede celular primária da planta e na lamela média tende a se romper, promovendo a disponibilização das proteínas de membrana e das proteínas de dentro das células (ZHANG *et al.* 2015).

A curva de contorno e a superfície de resposta (Figura 6.6d) para a variável CAA indicam que a região ótima para maiores valores de CAA encontra-se em maiores pH's, a partir de 11 e independente da faixa de temperatura empregada (0° a 70°C). As proteínas nessa região extrema de pH podem apresentar ionização dos terminais hidrofílicos das proteínas ocorrendo uma expansão e o desdobramento da proteína permitindo novas interações com a água (DAMODARAN; 2010). Quando avaliado a região de pH de 7,5 a 10,5, nota-se que à medida que se aumenta a temperatura, há a redução da CAA, devido a desestabilização interna da proteína. Isso ocorre pela redução do número de pontes de hidrogênio e a hidratação dos grupos iônicos presentes.

Para a realização da otimização das variáveis: carotenoides totais (CT), compostos fenólicos totais (CF), proteína bruta (PB), rendimento de extração de proteínas (REP) e Rendimento de concentrado protéico (RCP), a função desejabilidade foi aplicada dando origem a Figura 6.7.



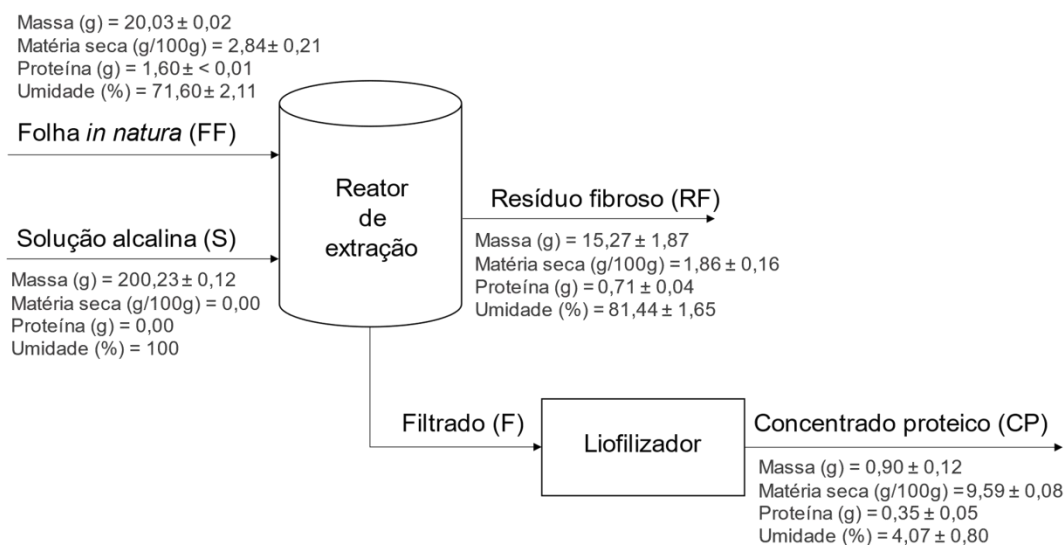
**Figura 6.7.** Gráfico da função desejabilidade para carotenóides totais (CT), compostos fenólicos totais (CFT), proteína bruta (PB), rendimento de extração de proteínas (REP) e Rendimento de concentrado protéico (RCP) para a extração de proteínas da mandioca.

As condições definidas pela desejabilidade foram pH 8,0, temperatura de 37°C e 30 min de extração, alcançando um valor de desejabilidade global de 0,78385. Os valores previstos nessa condição experimental para as respostas foram 2250 µg de carotenóides totais/g do liofilizado, ≈ 480 mg eq. Ácido gálico/g do liofilizado, 40% de proteína bruta, ≈36% de rendimento de extração de proteína e ≈ 22% de rendimento de concentrado proteico.

### 3.3. BALANÇO DE MASSA DA EXTRAÇÃO OTIMIZADA DE PROTEÍNAS EM MEIO ALCALINO

Considerando que em um processamento que o balanço de massa segue a lei da conservação de massa, logo nada pode ser criado nem

destruído, originou-se o fluxograma apresentado na Figura 6.8 a partir dos dados de massa, matéria seca, proteína bruta e umidade.



**Figura 6.8.** Balanço de massa do processo de extração de proteínas para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino.

Partindo como princípio que a mandioca apresenta um valor fixo de matéria seca ( $\approx 3$  g de matéria seca) e  $\approx 30\%$  bs de proteína bruta (o equivalente a  $1,60 \text{ g} \pm 0,01$  de proteína disponível para extração) no início do processo, foram realizadas três corridas para a obtenção do concentrado proteico liofilizado, na condição definida como ótima para a extração de proteínas da mandioca, em meio alcalino.

O valor médio obtido de proteína bruta no resíduo fibroso foi de  $0,71 \text{ g} \pm 0,04$ , um valor superior ao encontrado no concentrado proteico liofilizado que foi de  $0,35 \text{ g} \pm 0,05$ . Os resultados expressam uma extração em meio alcalino ineficiente das proteínas da mandioca, onde há a perda de  $0,54 \text{ g}$  de proteína, em torno de  $33,75\%$ . Supõem-se que a perda tenha ocorrido na etapa de filtração e pelo número de lavagens necessárias para a retirada da solução extratora. A partir disso entende-se que o método de recuperação das proteínas solúveis no meio deve ser reavaliado.

### 3.4. CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO

Os concentrados proteicos liofilizados, obtidos na condição definida como ótima, foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais

(CF), carotenóides totais (CT), proteína bruta (PB), rendimento de extração de proteínas (REP) e rendimento de concentrado protéico (RCP) (Tabela 6.9).

**Tabela 6.9.** Análises dos concentrados proteicos liofilizados otimizados para a extração de proteínas da mandiocueira, em meio alcalino.

Análises	Valor experimental	Valor teórico	Resíduo (%)
CFT (mg eq. Ácido gálico/g do liofilizado)	196,21 ± 6,49	488,5	59,83
CT (µg/g do liofilizado)	1925,89 ± 118,41	2250,9	14,44
PB (%)	40,18 ± 0,33	40,53	0,86
RCP (%)	15,74 ± 2,05	35,87	56,12
REP (%)	26,19 ± 3,62	21,87	19,75

CFT: compostos fenólicos totais; CT: carotenóides totais; PB: proteína bruta; RCP: rendimento do concentrado proteico; REP: rendimento de extração de proteína.

Os valores experimentais foram inferiores aos valores teóricos, exceto para o teor de proteína bruta (PB), o qual foi semelhante ao teórico. Ao comparar valores teóricos à práticos obteve-se o valor percentual de resíduo para cada parâmetro; o qual esclarece que o teor de PB apresentou menor variabilidade no resultado, permitindo uma avaliação mais precisa do desempenho e repetibilidade dos métodos empregados nos concentrados proteicos liofilizados, sendo assim, percebe-se uma variabilidade alta para CFT ( $\approx 60\%$ ) e RCP (56%).

### 3.5. ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE

Conforme mostrado na Tabela 6.10, o concentrado proteico liofilizado elaborado a partir dos parâmetros estipulados pela desejabilidade global foi avaliado a 25°C, com registro de atividade de água ( $a_w$ ) e de umidade para a elaboração das isotermas de sorção.

Considerando que produtos liofilizados podem apresentar uma estabilidade microbiológica a baixo de  $a_w$  0,6 (SCOTT, 1957), pode se estabelecer que valores de umidade menores que 6,09 g H<sub>2</sub>O/100 g b.s. para a adsorção e 8,39 g H<sub>2</sub>O/100 g bs para a dessorção sustentam a estabilidade microbiológica desse liofilizado a 25°C. O valor de umidade baixo obtido para o concentrado proteico liofilizado da mandiocueira aponta para um produto de baixa higroscopicidade. Quando comparados a outros trabalhos como folhas de *Moringa oleifera* a 27°C, onde isoterma de adsorção ao alcançar uma  $a_w$  de 0,6



o material apresentou uma umidade de equilíbrio de aproximadamente 8 g H<sub>2</sub>O/100 g bs tanto para a isoterma de dessorção quanto para a adsorção (SOBOWALE *et al.*, 2017).

**Tabela 6.10.** Dados de sorção de umidade para o concentrado proteico liofilizado extraído de proteínas da mandioca, em meio alcalino a 25°C.

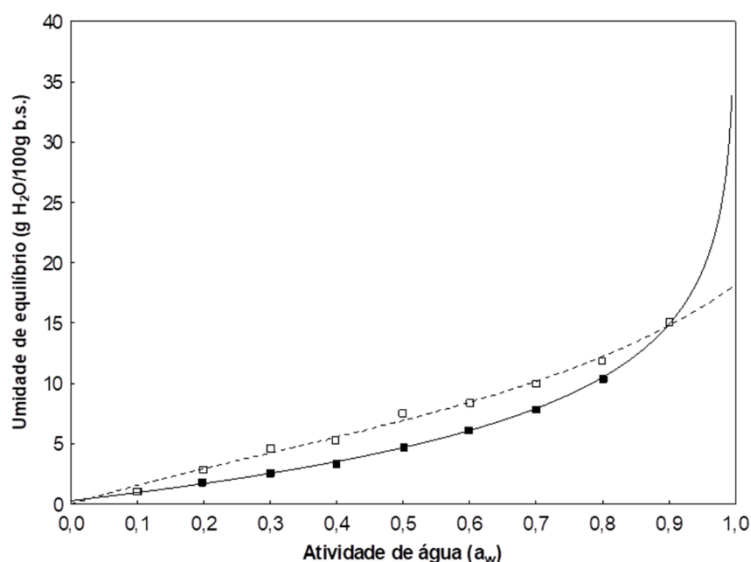
Adsorção		Dessorção	
$a_w$	Umidade (m)	$a_w$	Umidade (m)
0,10	1,03	0,90	15,03
0,20	1,78	0,80	11,84
0,30	2,56	0,70	10,01
0,40	3,32	0,60	8,39
0,50	4,75	0,50	7,53
0,60	6,09	0,40	5,28
0,70	7,82	0,30	4,58
0,80	10,41	0,20	2,82
0,90	15,03	0,10	1,02

$a_w$ : atividade de água (adimensional); m: umidade (g H<sub>2</sub>O/100 g bs).

A Figura 6.9, mostra as isotermas de sorção realizadas a 25°C no liofilizado produzido em condição alcalina. Com a aplicação do método de classificação quantitativa definido por Blahovec e Yanniotis (2009), define-se que a isoterma de adsorção possui um comportamento do tipo II b - *Langmuir* a isoterma de dessorção apresentou classificação do tipo III - *Solution-like*, formato tipo J, são comumente relacionadas à alimentos ricos em componentes solúveis (AL-MUHTASE; MCMINN; MAGEE, 2002).

Ao avaliar a Figura 6.9, percebe-se que o liofilizado ao atingir a  $a_w$  de 0,4 [Umidade relativa (UR) = 40%] a isoterma passa a apresentar característica exponencial, não apresentando mais comportamento linear. Apesar da baixa higroscopicidade apresentada pelo concentrado proteico liofilizado, a manipulação ou armazenamento em ambiente com umidade relativa (UR) maior que 40% deve ser cuidadosa; devido sua susceptibilidade a ganhar umidade. Em tais condições é recomendado que o produto seja acondicionado em uma embalagem com baixa permeabilidade ao vapor de água. A histerese torna-se presente em toda extensão de atividade de água estudada, apresentando mais representatividade na região de  $a_w$  intermediária; área de condensação capilar que é intimamente ligada ao fenômeno de histerese

(LABUZA, 1968). De acordo com a definição de Kapsalis (1981), essa histerese pode ser considerada do tipo II, ou seja, se inicia em alta  $a_w$  ( $a_w = 0,8$ ) e se estende por toda a faixa das isotermas de sorção, sendo este comportamento esperado em alimentos ricos em proteínas.



**Figura 6.9.** Isotermas de adsorção (■) e dessorção (□) de umidade a 25°C, para concentrado proteico da mandioca, obtido por via alcalina. As linhas representam as isotermas previstas pelo modelo de GAB, para adsorção (——) e dessorção (-----).

Os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o desvio médio relativo (P), o erro médio quadrático (RMSE) e a distribuição de resíduos são apresentados na Tabela 6.11 para os ajustes dos modelos matemáticos aos dados de sorção de umidade do concentrado proteico liofilizado.

Os valores de  $R^2$  para as isotermas de adsorção foram superiores à 0,97 para todos os modelos matemáticos avaliados. Os modelos de Halsey e Oswin foram os únicos a apresentarem resultados de P superiores a 10%, o qual necessita ser inferior a esse percentual segundo Peng *et al.* (2007), para ser considerado um indicativo de funcionalidade. Os menores valores de RMSE ocorreram nos modelos de GAB, Blahovec & Yanniotis e Smith (0,11 para os três modelos). As isotermas de dessorção apresentaram valores de  $R^2 > 0,99$  e valores de P inferiores a 10% para os modelos de GAB e Peleg. Esses

mesmos modelos apresentaram valores mais satisfatórios para o RMSE (0,34, e 0,26, respectivamente).

**Tabela 6.11.** Parâmetros dos ajustes dos modelos matemáticos aos dados de sorção de umidade para o concentrado proteico liofilizado extraído de proteínas da mandioca, em meio alcalino a 25°C.

Modelo	Adsorção				Dessorção			
	Parâmetro	R <sup>2</sup>	P (%)	RMSE	Parâmetro	R <sup>2</sup>	P (%)	RMSE
Halsey	a = 6,79 b = 1,51 Resíduos (T)	0,974	24,14	0,70	a = 27,88 b = 2,01 Resíduos (T)	0,915	38,86	1,23
Henderson	a = 0,14 b = 1,04 Resíduos (A)	0,999	5,81	0,47	a = 0,04 b = 1,49 Resíduos (T)	0,990	13,79	1,29
Oswin	a = 4,65 b = 0,55 Resíduos (A)	0,992	11,68	0,38	a = 6,55 b = 0,40 Resíduos (T)	0,959	26,81	0,86
Ferro-Fontan	a = 3,00 b = 1,38 r = 0,72 Resíduos (A)	0,999	3,94	0,16	a = 5,27 b = 9,49 r = 0,30 Resíduos (T)	0,990	10,48	0,43
GAB	M <sub>0</sub> = 3,90 c = 2,92 K = 0,85 Resíduos (A)	0,999	3,15	0,11	M <sub>0</sub> = 7,66 c = 3,43 K = 0,64 Resíduos (A)	0,993	8,96	0,34
Blahovec & Yanniotis	a <sub>1</sub> = 0,15 b <sub>1</sub> = 0,28 a <sub>2</sub> = 0,29 b <sub>2</sub> = 0,25 Resíduos (A)	0,999	3,03	0,11	a <sub>1</sub> = 0,07 b <sub>1</sub> = 0,002 a <sub>2</sub> = 6,51 b <sub>2</sub> = 6,85 Resíduos (T)	0,996	6,80	0,26
Smith	a = 0,28 b = 6,35 Resíduos (A)	0,999	2,76	0,11	a = 2,05 b = 6,07 Resíduos (T)	0,957	26,01	0,88
Peleg	k <sub>1</sub> = 12,98 n <sub>1</sub> = 6,17 k <sub>2</sub> = 9,15 n <sub>2</sub> = 1,03 Resíduos (A)	0,999	4,39	0,14	k <sub>1</sub> = 10,65 n <sub>1</sub> = 15,52 k <sub>2</sub> = 14,42 n <sub>2</sub> = 1,02 Resíduos (T)	0,996	6,56	0,26

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; RMSE: erro médio quadrático; P: desvio médio relativo; m<sub>0</sub>: umidade da monocamada (g H<sub>2</sub>O/100 g bs); m: umidade de equilíbrio (g H<sub>2</sub>O/100 g bs); c: constante relacionada ao calor de sorção; a, b, c, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>, n<sub>1</sub> e n<sub>2</sub> = constantes dos modelos; A: aleatório. T: tendencioso.

Por intermédio do elevado valor de R<sup>2</sup> e baixo valor de P e RMSE, verificou-se que o modelo de Smith se ajustou aos dados de sorção de umidade com boa precisão e pode ser utilizado na a predição da isoterma de adsorção (R<sup>2</sup> = 0,9994, P = 2,76 e RMSE = 0,11), além de ser um modelo bi-paramétrico, não havendo necessidade de uma regressão não linear; logo, possui solução matemática mais acessível em comparação a GAB e Peleg que

possuem três e quatro parâmetros, respectivamente. Os ajustes do modelo de GAB ( $R^2 = 0,9935$ ,  $P = 8,96$  e  $RMSE = 0,34$ ) aos dados experimentais de dessorção de umidade do liofilizado é apresentado na Figura 9, sendo este modelo o mais indicado em comparação à Peleg, devido GAB ser um modelo tri-paramétrico e por consequência ter solução matemática mais fácil.

A umidade de monocamada de GAB para a curva de adsorção foi de  $3,90 \text{ g H}_2\text{O}/100 \text{ g b.s.}$  e para a dessorção o valor de monocamada foi de  $7,66 \text{ g H}_2\text{O}/100 \text{ g b.s.}$ , com bom ajuste devido o  $R^2$  ser superior a  $0,99$  para ambos e possuir baixos valores de RMSE ( $0,11$  e  $0,34$ , respectivamente).

#### 4. CONCLUSÃO

O pH alcalino manteve as concentrações de compostos fenólicos totais (CFT) nos concentrados proteicos liofilizados. O melhor resultado obtido para o teor de proteína bruta (PB) no planejamento (53%) foi a extração realizada em pH 12,0, a 32,5°C e 30 min de extração. A função desejabilidade realizada a partir do Planejamento fatorial Box-Behnken indicou como condição ótima para o processo de isolamento de proteínas das folhas da mandioqueira, com solução alcalina, pH 8,0, temperatura de 37°C e 30 min de extração; atingindo um valor de desejabilidade global de 0,783. As isotermas de adsorção e dessorção de umidade do concentrado proteico são do tipo II b e tipo III, respectivamente. A baixa higroscopicidade fornece estabilidade microbiológica se apresentar umidade inferiores a 6,09 g H<sub>2</sub>O/100 g bs, essas isotermas foram ajustadas com o modelo de GAB, o qual se mostrou eficiente na predição a 25°C.

## REFERÊNCIAS

ADEKUNTE, A. O.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; SCANNELL, A. G. M.; O'DONNELL, C. P. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. **Food Chemistry**, v.122, p. 500-507, 2010.

AL-MUHTASEB, A. H.; McMINN W. A. M.; MAGEE, T. R. A. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. **Food and Bioprocess Processing**, v. 80, n. 2, p. 118-128, 2002.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Gaithersburg, Md: AOAC International; 1997.

ARAÚJO, A. L.; PENA, R. S. Moisture desorption behavior and thermodynamic properties of pulp and seed of jambolan (*Syzygium cumini*). **Heliyon**, v. 8, e09443, 2022.

BLAHOVEC, J.; YANNIOTIS, S. Modified classification of sorption isotherms. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 72-77, 2009.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, E. O.; SILVA, B. C.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. C.; VISENTAINER, J. V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 48, p. 1-9, 2014.

CÂMARA, F. S.; MADRUGA, M. S. Cyanic acid, phytic acid, total tannin and aflatoxin contents of a Brazilian multimistura preparation. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 33-36, 2001.

CAO, X.; WEN, H.; LI, C.; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 2, p. 184-189, 2009.

COLDEBELLA, P. F.; GOMES, S. D.; EVARINI, J. A.; CEREDA, M. P.; COELHO, S. R. M.; COLDEBELLA, A. Evaluation of protein extraction methods

to obtain protein concentrate from cassava leaf. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 6, p.1223-1233, 2013.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas (Capítulo 5). In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição. Editora Artmed, Porto Alegre, p.179-262, 2010.

DELCOUR, J.A. AND VAREBEKE, D.J. A new colourimetric assay for flavanoids in pilsner beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 91, p. 37-40, 1985.

FASOLIN, L. H.; PEREIRA, R. N.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; ANDRADE, C. C. P.; RAMOS, O. L.; VICENTE, A. A. Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. **Food Research International**, v. 125, n. 108586, 2019.

FLEMING, S. E.; SOSULSKI, F. W.; HAMON, N. W. Gelation and thickening phenomena of vegetable protein products, **Journal of Food Science**, v. 40, p. 805-807, 1975.

FONTAN, C. F.; CHIRIFE, J.; SANCHO, E.; IGLESIAS, H. A. Analysis of a model for sorption phenomena in foods. **Journal of Food Science**, v. 47, 1590-1595, 1982.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2001-2010, 2000.

HALSEY, G. Physical desorption on non-uniform surfaces. **Journal of Chemistry and Physics**, v. 16, n. 10, p. 931-937, 1948.

HENDERSON, S. M. A basic concept of equilibrium moisture. **Agricultural Engineering**, v. 33, n. 1, p. 29-32, 1952.

HOJILLA-EVANGELISTA, M. P.; SELLING, G. W.; HATFIELD, R.; DIGMAN, M. Extraction, composition, and functional properties of dried alfalfa (*Medicago*

*sativa* L.) leaf protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 3, p. 882-888, 2016.

KAPSALIS, J. G. Moisture sorption hysteresis. In: Rockland, L. B.; Beuchat, L. R. **Water Activity: Theory and Applications to Food**. New York: Marcel Dekker Inc; p. 143-177 1981.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil chemists' society**, v. 56, p. 242-258, 1979.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. 2001 Nov;1(1):F4.3.1-8, doi:10.1002/0471142913.faf0403s01.

MA, K. K.; GREIS, M.; LU, J.; NOLDEN, A. A.; MCCLEMENTS, D. J.; KINCHLA, A. J. Functional Performance of Plant Proteins. **Foods**, v. 11, p 594-616, 2022.

MAROULIS, Z. B.; TSAMI, E.; MARINOS-KOURIS, D. Application of the GAB Model to the Moisture Sorption Isotherms for Dried Fruits. **Journal of Food Engineering**, v. 7, p. 63-78, 1988.

MCMURROUGH, I.; BAERT, T. Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 100, p. 409-416, 1994.

OSWIN, C. R. The kinetics of package life. III isotherm. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 65, n. 12, p. 419-421, 1946.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 36 - 60, 2013.

PELEG, M. Assessment of a semi-empirical four parameter general model for sigmoid moisture sorption isotherms. **Journal of Food Process Engineering**, V. 16, p. 21-37, 1993.



PENG, G.; CHEN, X.; WU, W.; JIANG, X. Modeling of water sorption isotherm for corn starch. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 562-567, 2007.

PÉREZ SIMBA, B. P.; GARRIDO ESPINOSA, J. A.; ENDARA VARGAS, A. B.; LANDÁZURI FLORES, A. C.; RAMÍREZ CÁRDENAS, L. de L. Á. Optimization of the extraction and precipitation process of a leaf protein concentrate from *Moringa oleifera* Lam. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 75, n. 1, p. 9813-9821, 2022.

POMBO, J. C. P.; CARMO, J. R.; ARAÚJO, A. L.; MEDEIROS, H. H. B. R.; PENA, R. S. Moisture Sorption Behavior of Cupuassu Powder. **The Open Food Science Journal**, v. 11, p. 66 – 73, 2019.

SANJEEWA, W. G. T.; WANASUNDARA, J. P. D.; PIETRASIK, Z.; SHAND, P. J. Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours and application in low-fat pork bologna as a model system. **Food Research International**, v. 43, p. 617 – 626, 2010.

SCHWARTZ; VON ELBE; GIUSTI. Corantes (Capítulo 9). In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição. Editora Artmed, Porto Alegre, p.445-499, 2010.

SCOTT, W.J. Water relations of food spoilage microorganisms. **Advances in Food Research**, v.7, p.83-127, 1957.

SGARBIERI, V.C. Propriedades físico químicas dos aminoácidos e proteínas (Capítulo 1). Em **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 1996.

SILVA, D. A.; PENA, R. S. Thermodynamic properties of Buriti (*Mauritia flexuosa*) tree gum. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 390-398, 2018.

SILVA, J. L., GOMES, S. D.; COELHO, S. R. M. EVARINI, J.; FERRI, P.; CEREDA, M. P.; LUCAS, S. D. M. Obtenção de concentrado proteico de folhas e parte aérea da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2279-2288, 2012.

SMITH, S. E. The Sorption of Water Vapor by High Polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, n. 3, p. 646-651, 1947.

SOBOWALE, S. S.; OKE, M. O.; ODUNMBAKU, L. A.; ADEBO, O. A. Equilibrium sorption isotherms of *Moringa oleifera* leaves at different temperatures. **African Journal of Science, Technology, Innovation and Development**, ISSN: 2042-1338, 2017.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Revista Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-745, 2005.

VAN LOEY, A.; OOMS, V.; WEEMAES, C.; VAN DEN BROECK, I.; LUDI KHUYZE, L.; INDRAWATI, S. D.; HENDRICKX, M. Thermal and Pressure-Temperature Degradation of Chlorophyll in Broccoli (*Brassica oleracea* L. *italica*) Juice: A Kinetic Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5289-5294, 1998.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 6, n. 1, p. 1.1.1 - 1.1.8, 2002.

WULANDARI, A.; SUNARTI, T. C.; FAHMA, F.; ENOMAE, T. The potential of bioactives as biosensors for detection of pH. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 460, n. 12034, 2020.

ZHANG, C.; SANDERS, J. P.; XIAO, T. T.; BRUINS, M. E. How Does Alkali Aid Protein Extraction in Green Tea Leaf Residue: A Basis for Integrated Biorefinery of Leaves. **PLOS One**, v. 10, n. 7, e0133046, 2015.

## CONCLUSÃO GERAL

---

Para iniciar as considerações finais deste trabalho faz-se necessário resgatar a questão norteadora da pesquisa; a qual visou estudar alternativas para aumentar a valorização das folhas da mandioca, por meio da avaliação de um processamento mínimo e de condições de armazenamento para as folhas, bem como do isolamento e caracterização de frações proteicas oriundas das folhas.

Os resultados obtidos mostram que a sanitização inicial das folhas da mandioca é necessária para a obtenção de um produto minimamente processado para transporte, bem como a escolha adequada da embalagem e as condições de acondicionamento para o prolongamento da vida útil das folhas. A condição definida para a sanitização das folhas foi a imersão em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 250 mg/L por 20 min, seguida de lavagem, para a eliminar o cloro residual da superfície. Combinações de embalagem e atmosfera modificada mostraram diferentes tempos de armazenamento útil para as folhas processadas, sendo: 24 horas em PE-SV, 7 dias em PE-CV e 14 dias em PA-CV.

Além da preservação da qualidade durante o armazenamento, para a valorização das folhas da mandioca, considera-se imprescindível fornecer alternativas de consumo. Fato este que auxiliou a determinação da composição química, propriedades físico-químicas, bem como na avaliação; pela primeira vez; do fracionamento das proteínas solúveis das folhas da mandioca, utilizando o procedimento de Osborne. O uso do método foi satisfatório para o isolamento das frações proteicas: albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas. A quantificação das frações indicou que a maior fração foi constituída pelas prolaminas e atingiu um valor de 4,38 g/100 g de folha *in natura*. Esta foi a fração proteica de maior relevância para a pesquisa, por apresentar propriedades anfífilas. A quantificação das frações evidenciou o potencial das folhas de mandioca para a obtenção de concentrado proteico, bem como além do perfil majoritário das proteínas que podem ser extraídas.

Os concentrados protéicos obtidos a partir das folhas da mandioca utilizando solução hidroalcolica apresentaram quantidades relevantes de carotenóides, compostos fenólicos e flavanóis. Por meio da função

desejabilidade foi possível definir uma condição para o processo de extração de proteínas das folhas da mandioqueira, com uma desejabilidade global de 0,853; sendo: solução hidroalcoólica a 54%, 6°C e 30 min de extração. Nesta condição foi observado Nesta condição, o valor de REP foi de 19%, ou seja, extraiu-se 19% de proteínas presente nas folhas no início do processo de extração. O RCP foi de 11%, o que mostra que houve apenas a retenção da proteína em forma de liofilizado dos 19% disponíveis, havendo uma perda de 8% de proteína. Na condição de desejabilidade, o concentrado protéico apresenta 40% de proteína bruta, 2000 µg/g de carotenóides totais e 240 mg eq. ácido gálico/g, no produto liofilizado.

O tratamento estatístico aplicado aos concentrados protéicos obtidos por via ácida mostraram que as respostas clorofila a e b (Cl a e Cl b), carotenoides totais (CT), variação de cor instrumental ( $\Delta E$ ), compostos fenólicos totais (CFT), flavanóis totais (FT) e proteína bruta (PB) apresentam repetibilidade no intervalo estudado desta pesquisa. A função desejabilidade indicou como condição ótima para o processo de extração de proteínas das folhas da mandioqueira por via ácida, para uma desejabilidade global de 0,896, um pH 3,5, temperatura de 16°C e tempo de extração de 120 min. Nesta condição, o rendimento de extração de proteínas foi de 41% e o rendimento de concentrado proteico foi 20%, enquanto o produto liofilizado apresentou 49% de proteína bruta, 2600 µg de carotenóides totais/g e 580 mg eq. ácido gálico/g.

O tratamento estatístico aplicado aos concentrados protéicos obtidos em meio alcalino revelou que as variáveis dependentes: clorofila b (Cl b), variação de cor ( $\Delta E$ ), proteína bruta (PB) e capacidade de absorção de água (CAA) possuem repetibilidade na faixa de estudo utilizada nesta pesquisa. Para o processo de extração de proteínas das folhas da mandioqueira em meio alcalino, a função desejabilidade definiu como condição ótima, um pH 8,0, 37°C e 30 min de extração; para uma desejabilidade global de 0,784. Para estas condições foi observado um rendimento de extração de proteína de 36% e um rendimento de concentrado proteico de 22%, o qual, após liofilizado, apresentou 40% de proteína bruta, 2250 µg de carotenóides totais/g, 480 mg eq. ácido gálico/g.

As isotermas de adsorção e dessorção de umidade apresentaram, respectivamente, comportamentos tipo III e tipo II, para o concentrado proteico isolado com solução hidroalcóolica; e comportamentos tipo II e tipo III, para os concentrados proteicos obtidos por via ácido e por via alcalina. Os três concentrados proteicos apresentaram baixa higroscopicidade, e terão estabilidades microbiológicas garantidas se apresentarem umidades inferiores a 5,7 g H<sub>2</sub>O/100 g bs para a via hidroalcóolica, 6,04 g H<sub>2</sub>O/100 g bs para a via ácida e 6,09 g H<sub>2</sub>O/100 g bs para a via alcalina. O modelo matemático de Peleg se mostrou muito eficiente na predição das isotermas de sorção de umidade dos concentrados proteicos obtidos pelas vias hidroalcólicas e ácida, enquanto o modelo de GAB foi o mais eficiente na predição das isotermas de sorção de umidade do concentrado proteico obtido por via alcalina.

As pesquisas realizadas apresentaram importantes resultados para a conservação das folhas da mandioca, durante o transporte e o armazenamento, bem como alternativas viáveis para o isolamento das frações proteicas solúveis e para a obtenção de concentrados proteicos a partir das folhas da mandioca; por diferentes vias. Assim, o estudo apresenta alternativas para um melhor aproveitamento das folhas da mandioca, a qual ainda é subutilizada, e indica o potencial de uso dessas folhas, o qual poderá gerar benefícios econômicos tanto para o setor industrial, quanto para o estado do Pará e para os produtores de mandioca; e ainda poderá contribuir para a verticalização dessa cultura.

## APÊNDICES

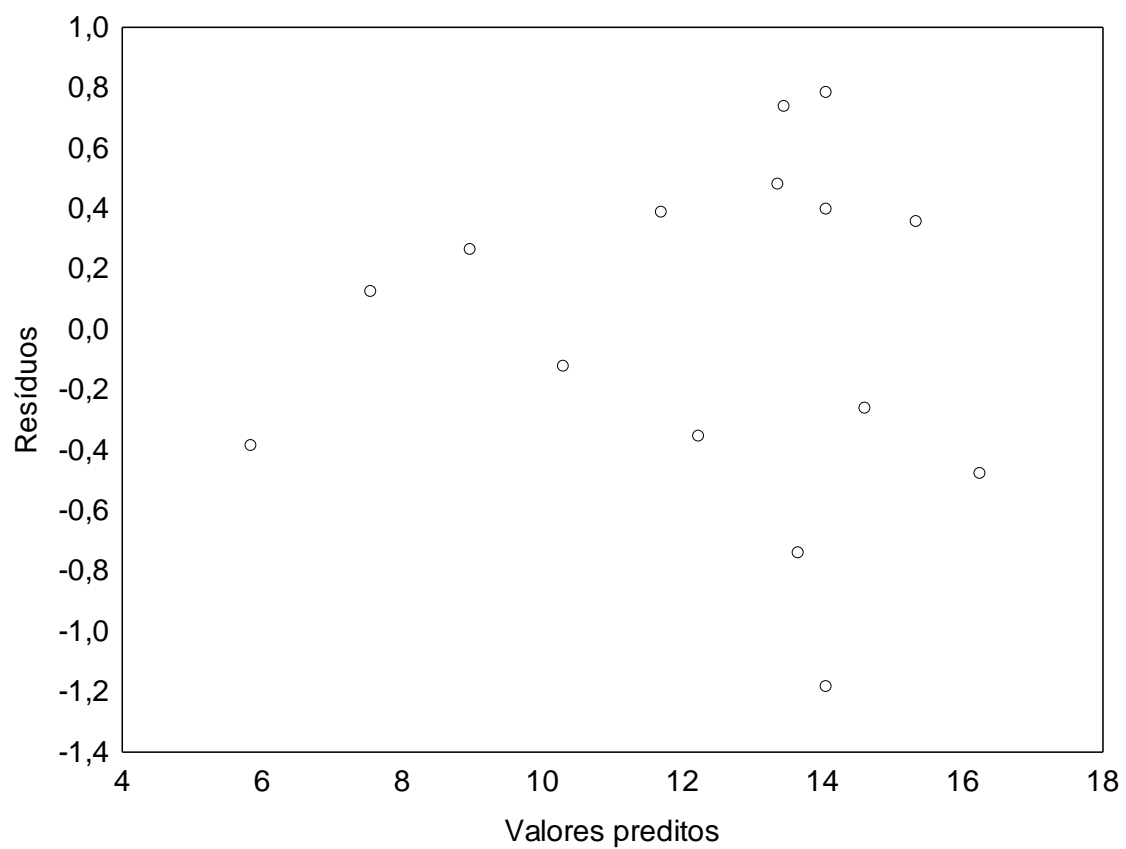
**Apêndice 4.I.** Valores médios dos teores de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b) e carotenoides totais (CT), expressos em  $\mu\text{g/g}$  de concentrado proteico liofilizado obtidos na extração de proteínas da mandioca com solução hidroalcolica.

Corrida	Cl a	Cl b	CT
1	8553,58	2385,13	2483,05
2	7671,20	2053,67	2519,84
3	5115,79	1194,70	1794,22
4	8968,13	1234,63	2295,79
5	6165,00	1745,37	1771,50
6	7179,60	1018,11	2583,91
7	5175,21	1082,25	1972,35
8	6187,26	1324,14	1796,08
9	7149,34	1300,03	2264,23
10	5514,52	1582,49	1665,57
11	8593,67	2457,65	2697,28
12	6494,27	1159,13	1869,11
13	4846,92	650,06	1568,11
14	5164,88	1529,75	1479,02
15	6653,29	1418,72	2126,84

**Apêndice 4.II.** Valores médios dos parâmetros de cor instrumental para os concentrados proteicos liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca com solução hidroalcolica.

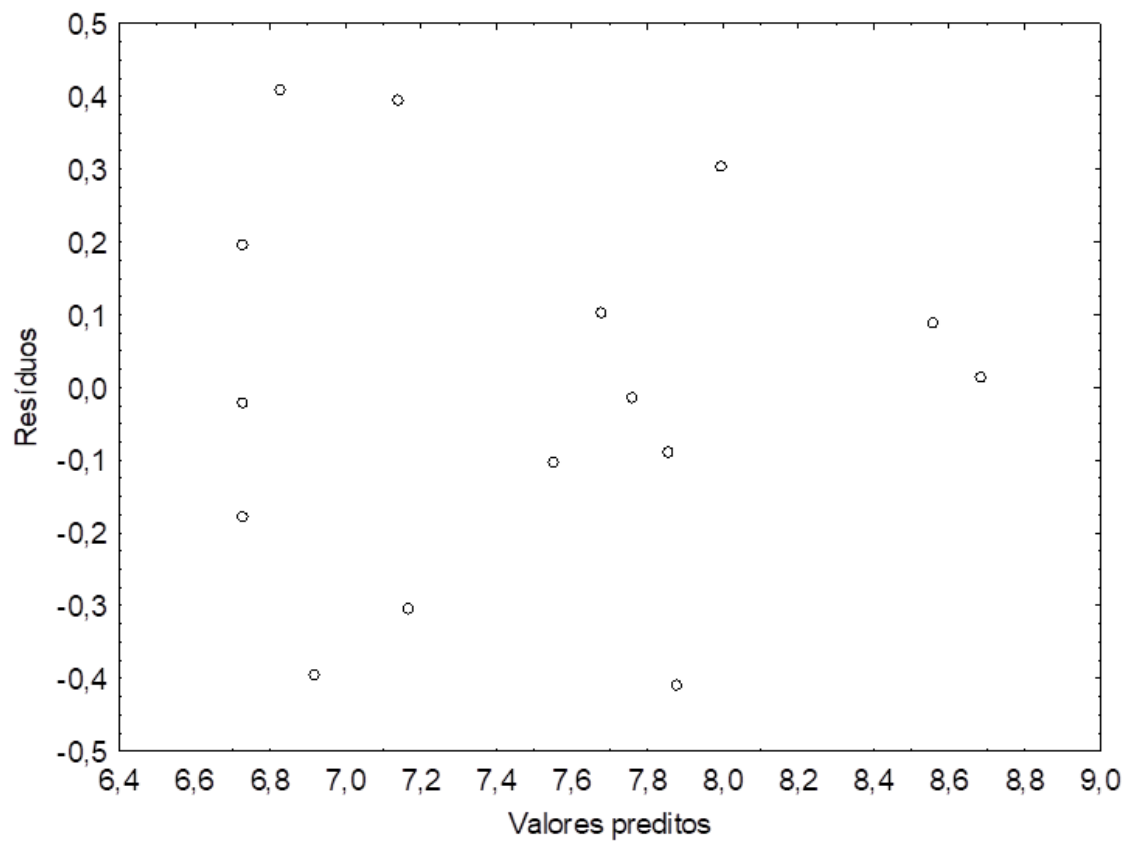
Corrida	Parâmetros					
	L*	a*	b*	c*	h°	ΔE
1	37,27	-8,70	22,27	31,16	110,50	4,12
2	37,09	-8,67	21,67	29,91	116,00	4,51
3	43,05	-7,20	23,72	23,86	99,79	7,31
4	42,96	-7,30	21,75	29,04	104,64	7,68
5	38,89	-10,48	24,82	30,48	106,24	3,13
6	43,55	-7,83	24,87	31,39	112,65	7,48
7	43,79	-8,94	24,25	28,02	104,36	6,21
8	45,78	-7,99	24,03	30,12	114,67	8,08
9	38,97	-8,50	22,96	31,18	111,64	4,64
10	43,00	-7,09	24,71	27,22	104,28	7,50
11	43,51	-11,29	24,62	30,70	113,26	5,85
12	43,31	-8,33	23,64	26,30	101,29	7,58
13	44,87	-6,51	25,91	30,31	111,13	8,46
14	45,31	-10,03	25,50	28,82	111,31	9,57
15	42,01	-9,41	23,68	30,20	112,47	5,11

**Apêndice 4.III.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta rendimento de concentrado protéico (RCP).





**Apêndice 4.IV.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta capacidade de absorção de água (CAA).



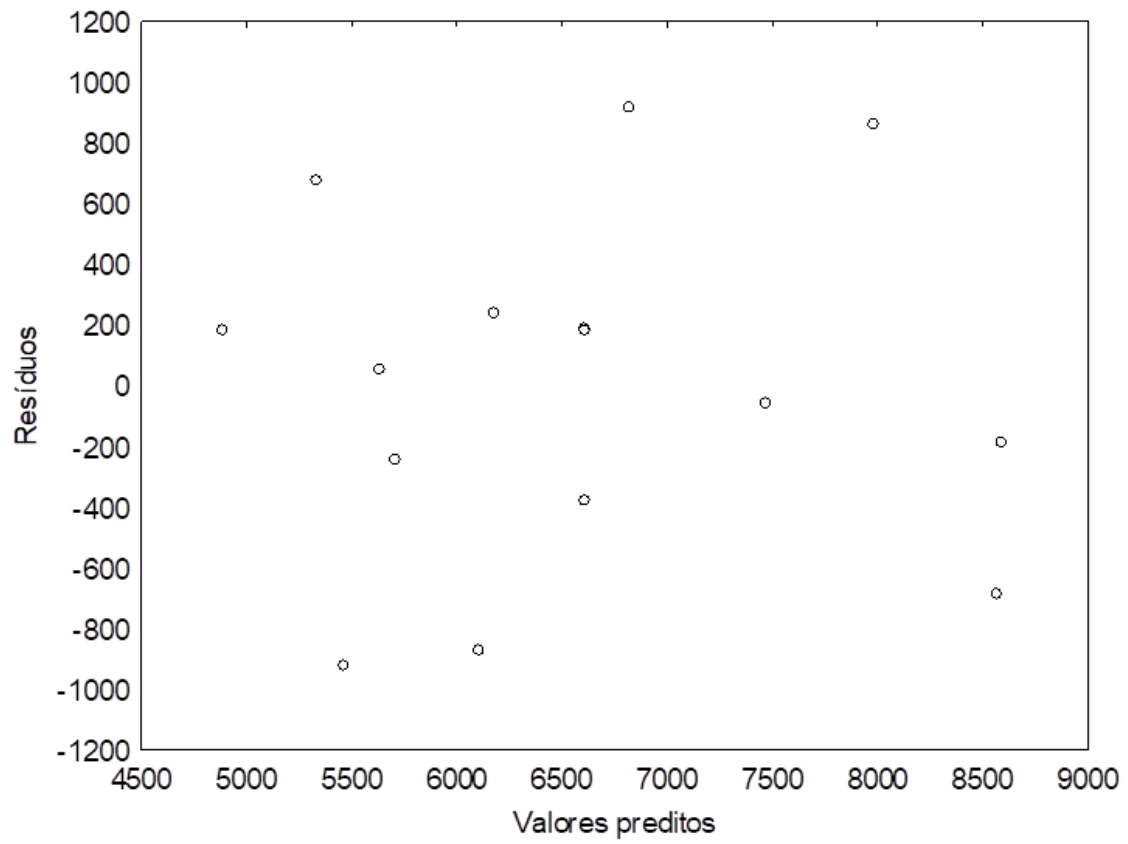
**Apêndice 5.I.** Valores médios dos teores de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b) e carotenoides totais (CT), expressos em  $\mu\text{g/g}$  de concentrado proteico liofilizado obtidos na extração de proteínas da mandioca por via ácida.

Corrida	Cl a	Cl b	CT
1	7740,60	1539,58	2850,81
2	8399,16	2051,44	2726,10
3	5064,13	647,06	704,45
4	4539,04	703,47	1627,70
5	5231,75	918,56	1588,11
6	6416,79	1762,86	2104,00
7	5464,75	233,89	1839,21
8	8840,04	1597,87	3127,30
9	7409,52	1364,03	2671,23
10	6009,86	740,87	2009,81
11	7878,81	1896,96	2736,60
12	5687,10	166,20	1916,44
13	6226,68	1774,71	2269,70
14	6792,48	1925,27	2380,34
15	6787,04	2078,25	2242,70

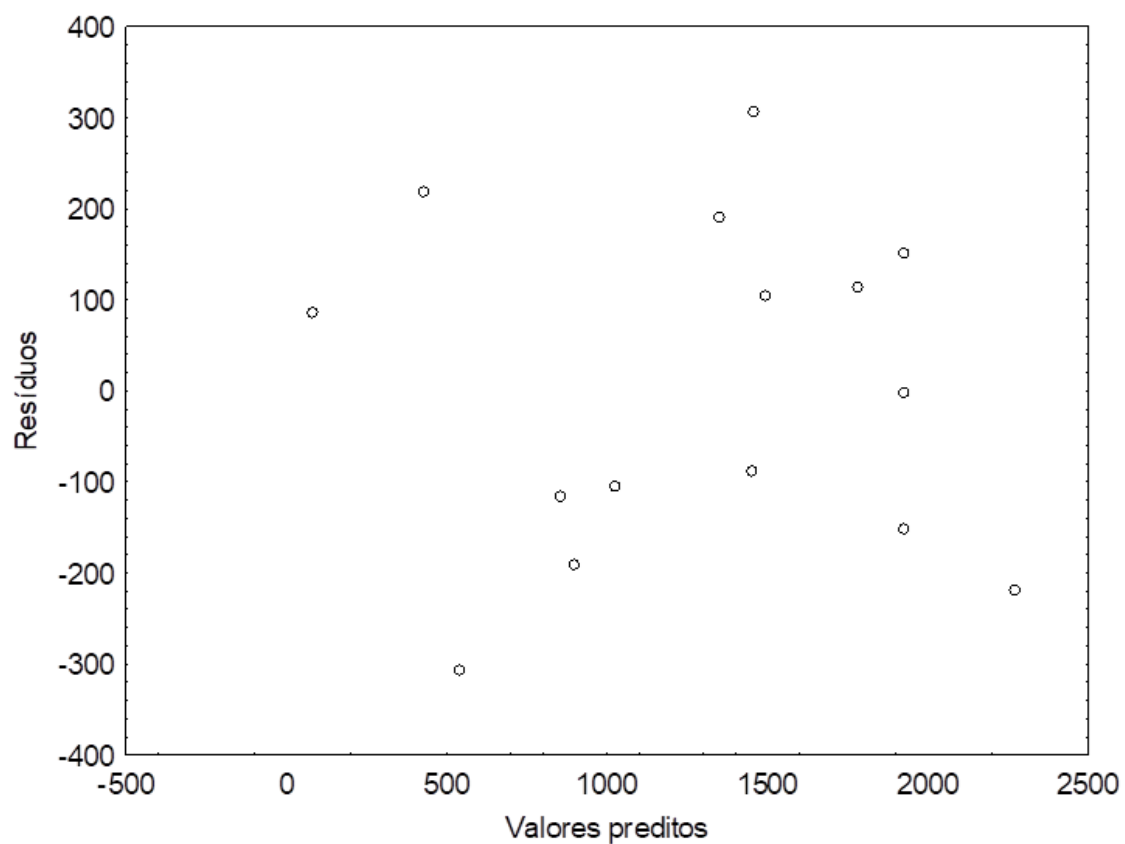
**Apêndice 5.II.** Valores médios dos parâmetros de cor instrumental para os concentrados proteicos liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca por via ácida.

Corrida	Parâmetros					
	L*	a*	b*	c*	h°	ΔE
1	43,98	-10,91	29,19	31,16	110,50	8,36
2	41,55	-13,11	26,88	29,91	116,00	4,04
3	48,39	-4,06	23,52	23,86	99,79	13,16
4	52,04	-7,34	28,10	29,04	104,64	15,06
5	46,94	-8,52	29,27	30,48	106,24	12,24
6	44,80	-12,09	28,97	31,39	112,65	8,78
7	47,77	-6,95	27,14	28,02	104,36	11,73
8	43,35	-12,57	27,38	30,12	114,67	6,84
9	45,52	-11,50	28,98	31,18	111,64	8,98
10	47,61	-6,71	26,38	27,22	104,28	11,59
11	43,96	-12,12	28,21	30,70	113,26	6,34
12	47,66	-5,15	25,79	26,30	101,29	12,39
13	45,78	-10,93	28,27	30,31	111,13	9,55
14	42,80	-10,47	26,84	28,82	111,31	7,01
15	44,39	-11,54	27,91	30,20	112,47	7,87

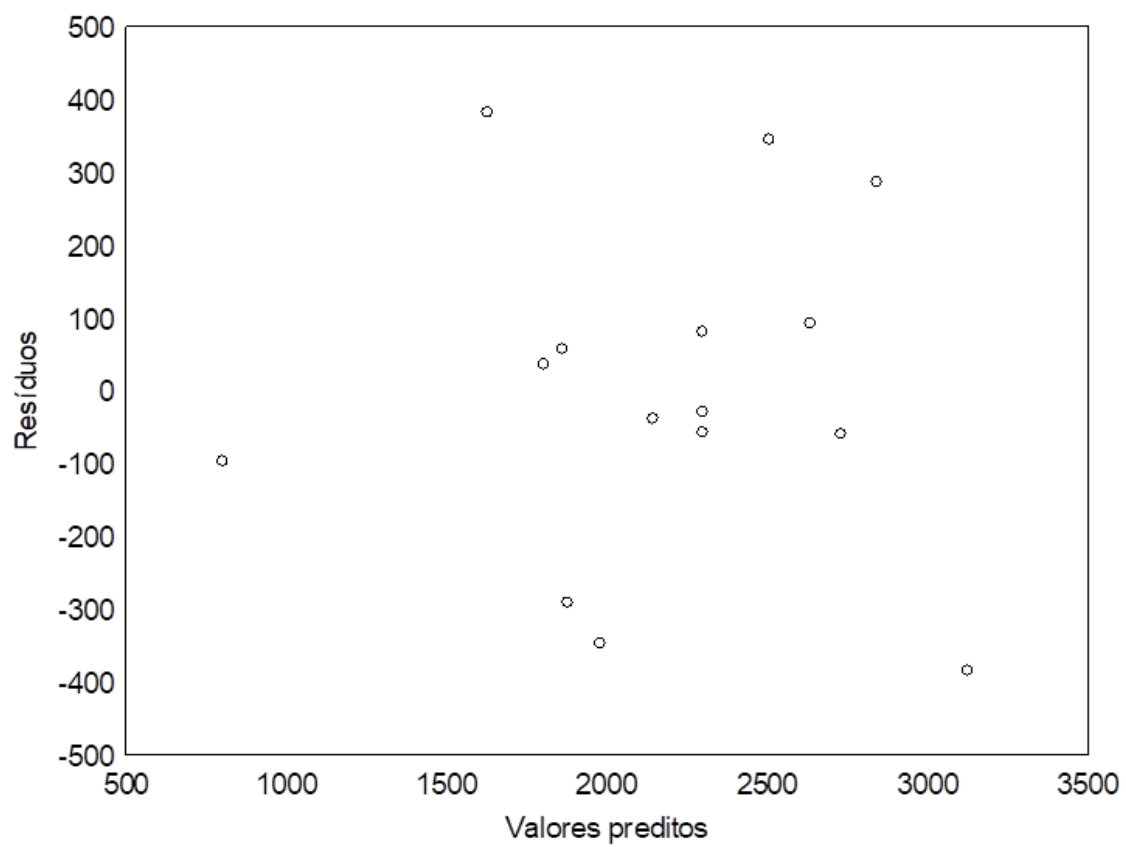
**Apêndice 5.III.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta teor de clorofila a (Cl a).



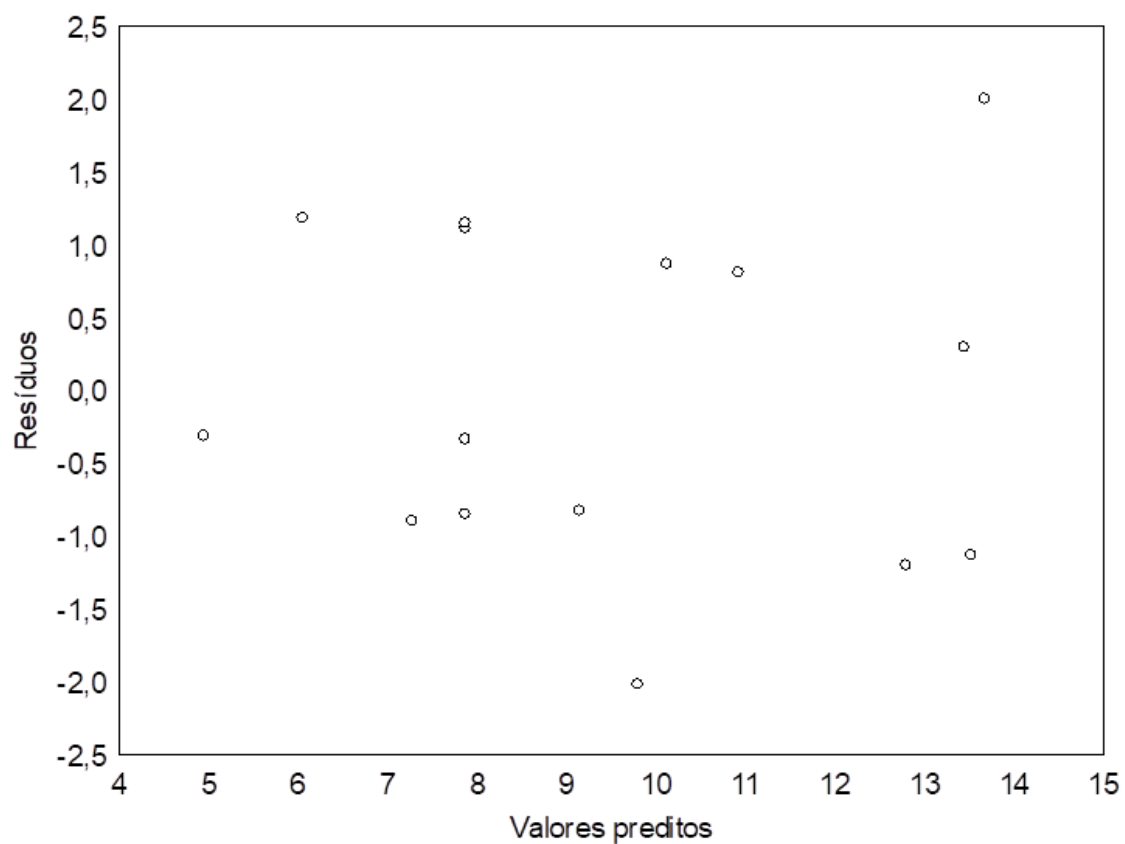
**Apêndice 5.IV.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta teor de clorofila b (Cl b).



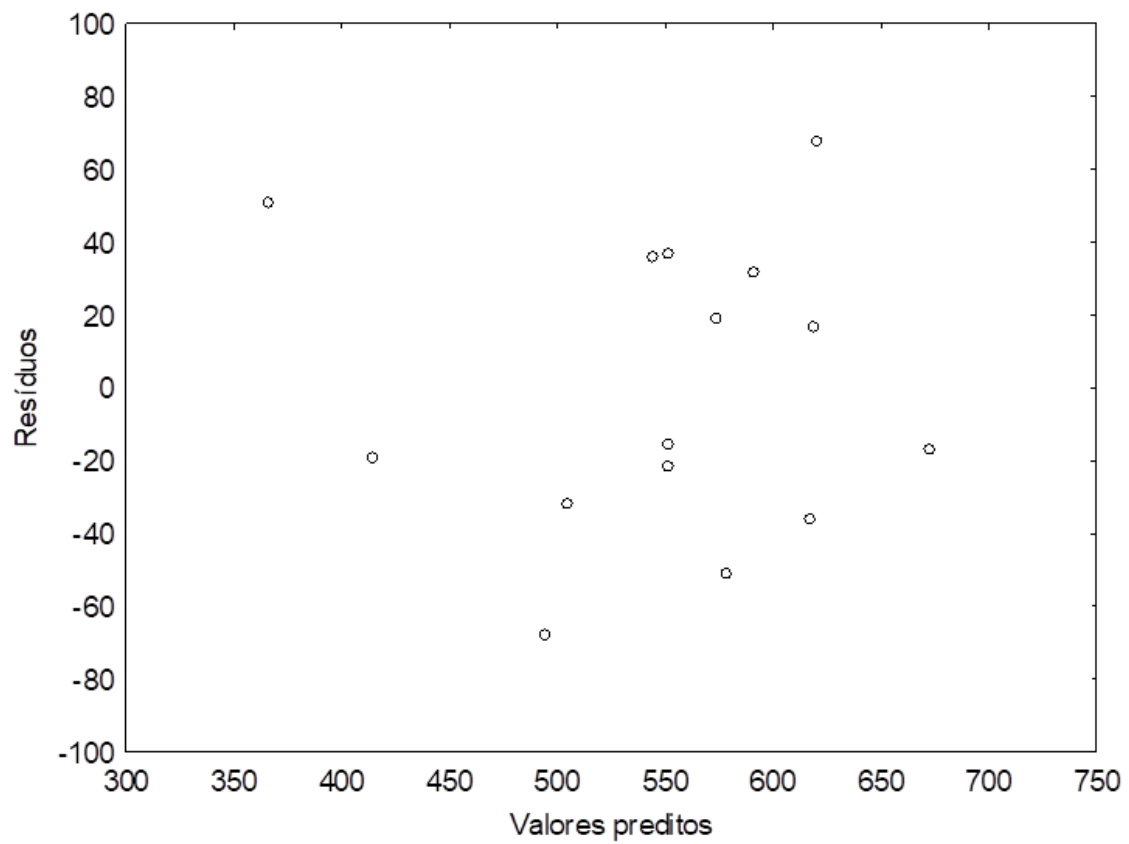
**Apêndice 5.V.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta teor de carotenoides totais (CT).



**Apêndice 5.VI.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta variação de cor instrumental ( $\Delta E$ ).

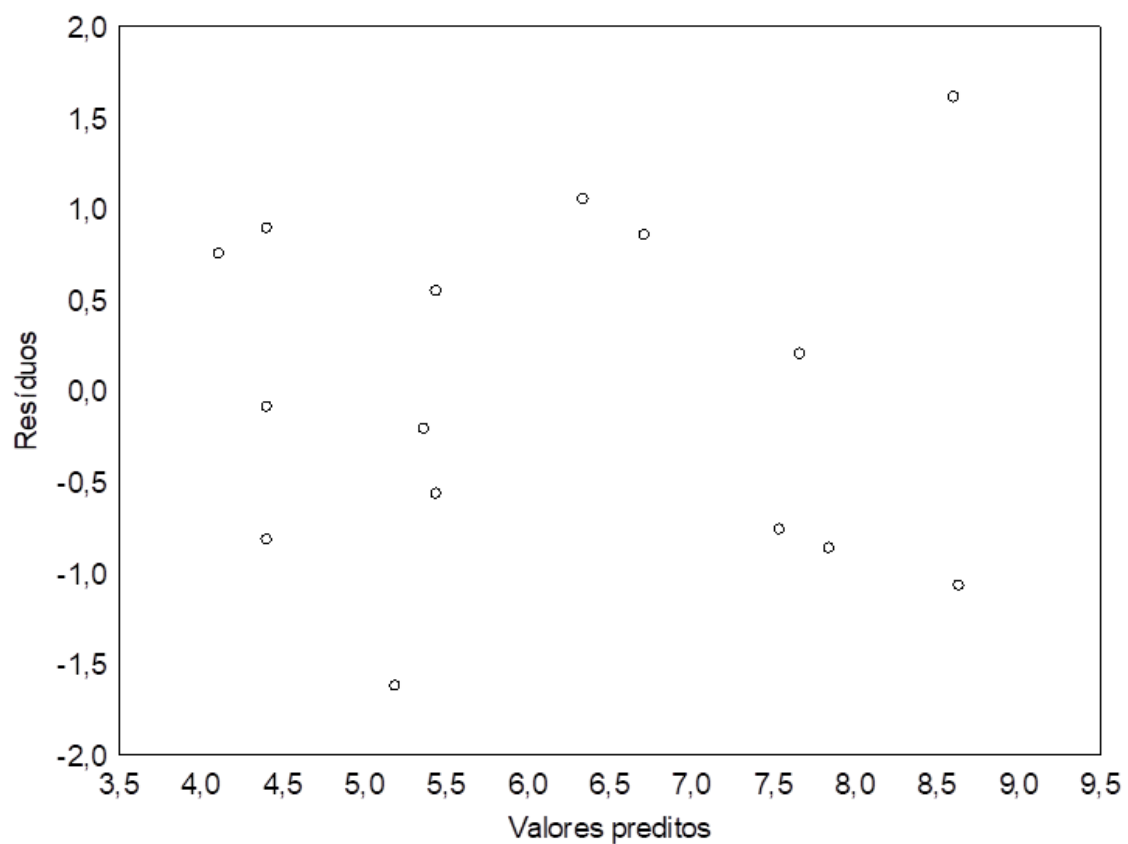


**Apêndice 5.VII.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta teor de compostos fenólicos totais (CFT).

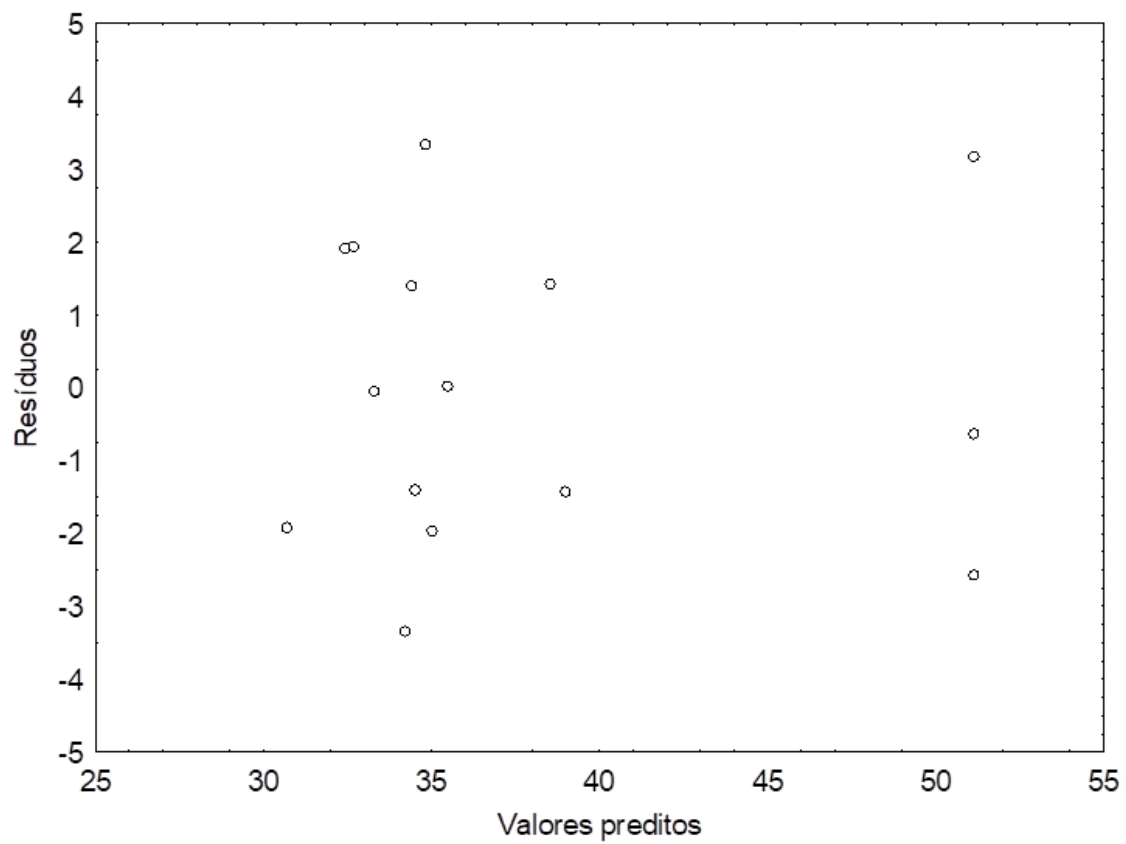




**Apêndice 5.VIII.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta teor de flavanóis totais (FT).



**Apêndice 5.IX.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta teor de proteína bruta (PB).



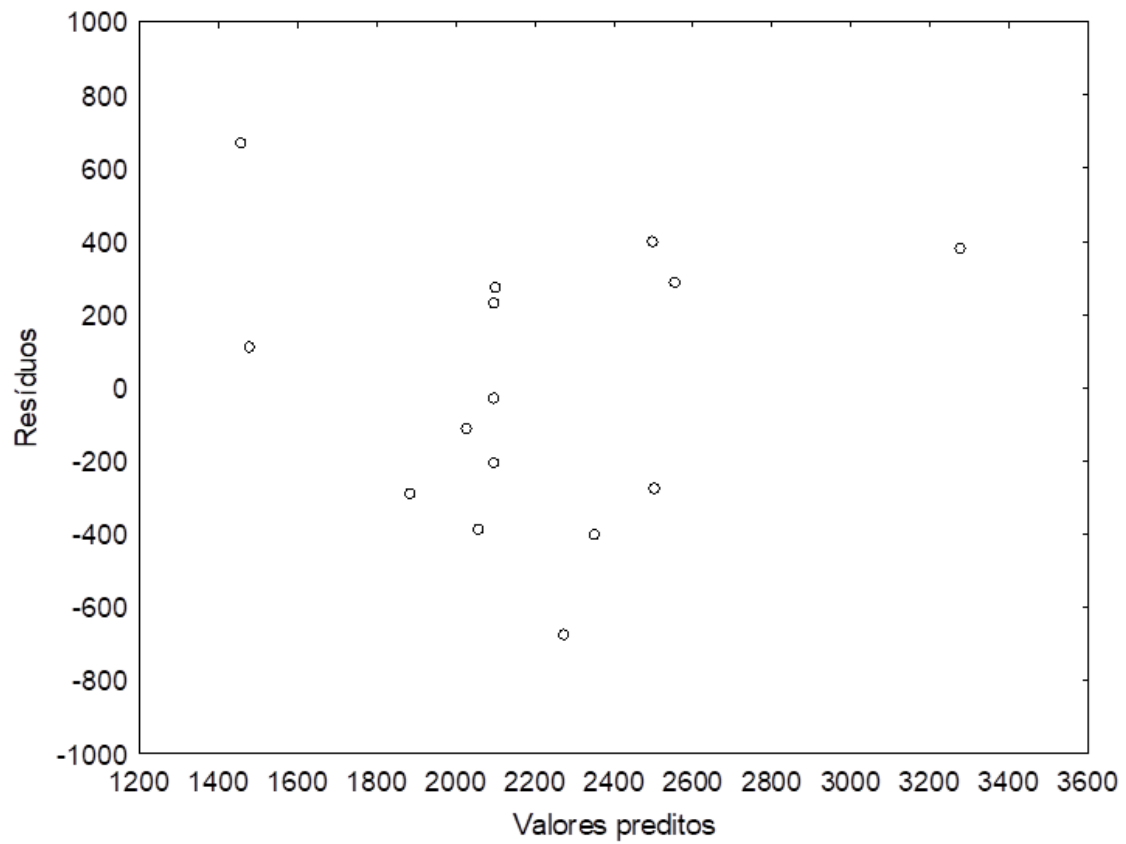
**Apêndice 6.I.** Valores médios dos teores de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b) e carotenoides totais (CT), expressos em  $\mu\text{g/g}$  de concentrado proteico liofilizado obtidos na extração de proteínas da mandioca por via alcalina.

Corrida	Cl a	Cl b	CT
1	7543,07	2126,37	2381,53
2	6907,77	1914,93	2115,33
3	4831,09	1586,92	1868,06
4	6468,51	1599,31	2343,52
5	7092,10	1952,69	2201,75
6	10968,02	3661,19	3316,63
7	6255,84	1672,98	1990,19
8	9916,60	2897,00	3340,24
9	7316,38	2228,77	1980,26
10	10865,41	2843,20	3470,19
11	5160,73	1595,59	1739,39
12	7154,45	2371,18	2589,01
13	9030,06	2328,68	2748,34
14	6875,80	1892,91	2068,97
15	7249,12	2066,59	2096,34

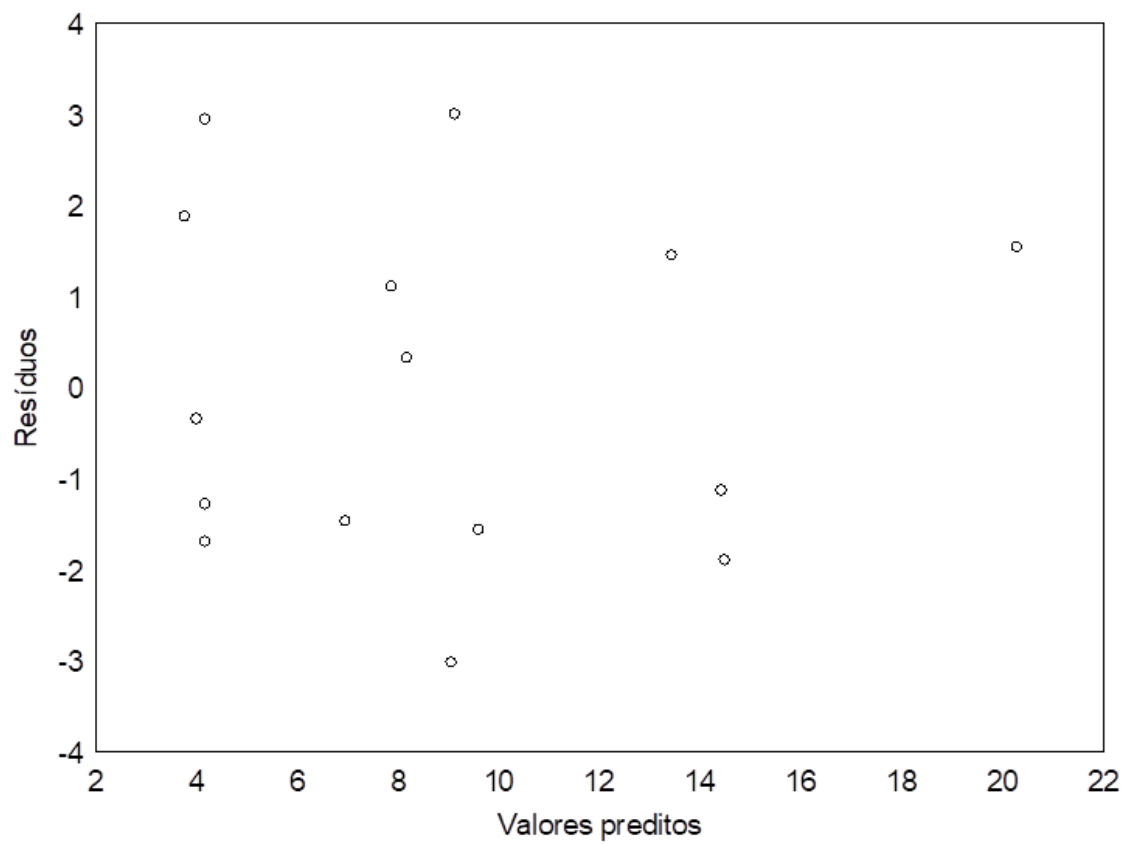
**Apêndice 6.II.** Valores médios dos parâmetros de cor instrumental para os concentrados proteicos liofilizados obtidos da extração de proteínas da mandioca por via alcalina.

Corrida	Parâmetros					
	L*	a*	b*	c*	h°	ΔE
1	41,70	-12,23	27,17	29,79	114,24	5,65
2	27,55	-6,53	15,51	16,83	112,84	14,87
3	42,35	-10,98	27,08	28,94	110,69	5,86
4	28,83	-5,93	18,25	19,19	108,01	13,24
5	43,58	-15,52	28,98	32,87	118,16	8,88
6	28,50	-7,53	16,43	18,08	114,61	12,63
7	45,92	-13,23	27,71	30,70	115,51	8,39
8	22,49	-4,24	11,31	12,08	110,54	21,81
9	39,60	-9,45	24,20	25,98	111,33	3,83
10	28,51	-7,81	18,12	19,73	113,32	11,03
11	38,18	-6,58	26,10	26,91	104,15	6,03
12	44,98	-11,22	28,93	31,02	111,19	8,18
13	36,82	-11,39	24,47	26,99	114,97	2,91
14	39,54	-11,13	26,03	28,31	113,15	2,50
15	43,93	-14,13	27,10	30,56	117,54	7,15

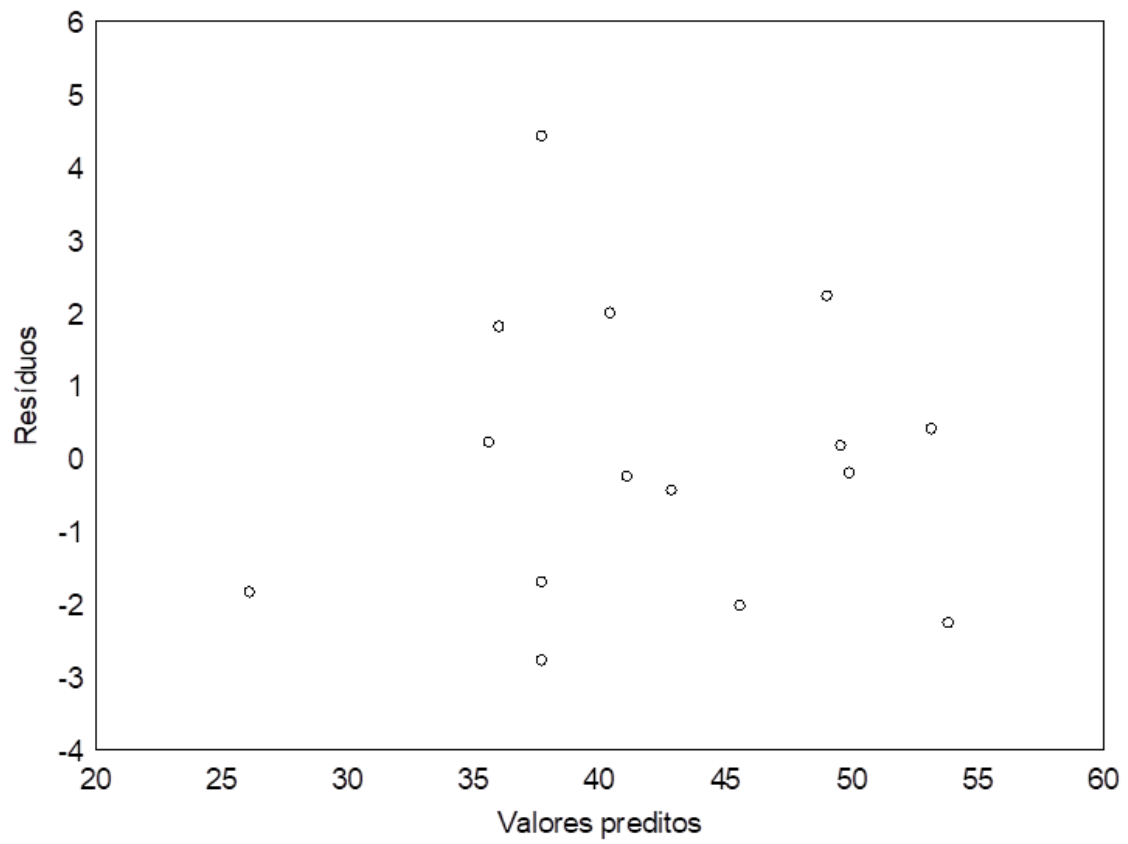
**Apêndice 6.III.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta teor de clorofila b (Cl b).



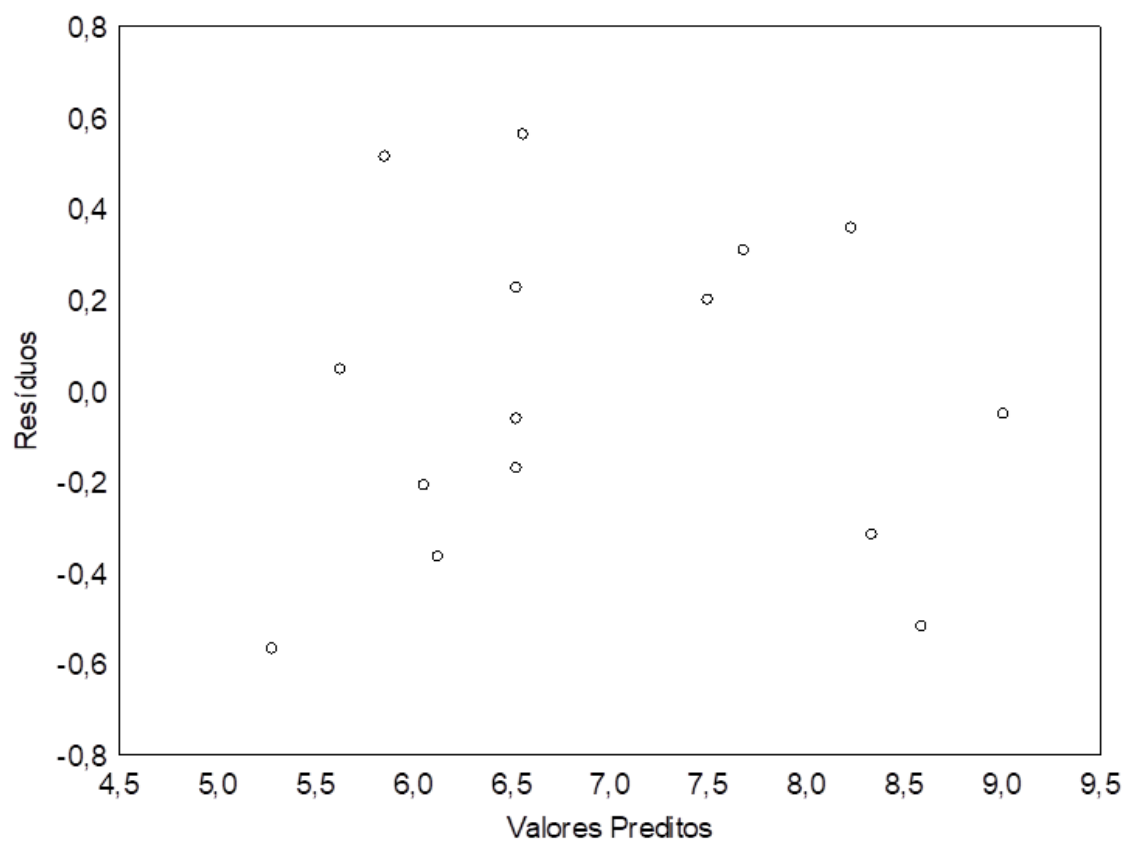
**Apêndice 6.IV.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta variação de cor instrumental ( $\Delta E$ ).



**Apêndice 6.V.** Gráfico de distribuição de resíduos para o teor de proteína bruta (PB).



**Apêndice 6.VI.** Gráfico de distribuição de resíduos para a resposta capacidade de absorção de água (CAA).





## ANEXO

**Anexo1.** Manuscrito “Minimally processed cassava leaves: effect of packaging on the microbiological and physical-chemical standards”.



SCIENTIA PLENA  
www.scientiaplenu.org.br

VOL. 17, NUM. 5

2021

doi: 10.14808/sci.plena.2021.051501

## Minimally processed cassava leaves: effect of packaging on the microbiological and physical-chemical standards

Folhas de mandioca minimamente processadas: efeito da embalagem sobre o padrão microbiológico e físico-químico

J. F. C. Moraes<sup>1</sup>; A. P. R. Campos<sup>1</sup>; A. L. Araújo<sup>1</sup>; A. S. Lopes<sup>2</sup>; R. S. Pena<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Pará, 66075-110, Belém-Pará, Brazil

<sup>2</sup>Institute of Technology/Faculty of Food Engineering, Federal University of Pará, 66075-110, Belém-Pará, Brazil

\*rspena@ufpa.br

(Recebido em 11 de outubro de 2020; aceito em 24 de maio de 2021)

The study presents itself as an alternative for the minimal processing of crushed cassava leaves, a product widely used in the Northern Brazilian cuisine. A Box-Behnken design was used to define the concentration of the sodium hypochlorite solution (NaClO) and the immersion time (t) capable of guaranteeing acceptable levels for thermotolerant coliforms and molds and yeasts in the leaves. The leaves sanitized in this condition were crushed, packed in polyethylene packaging under standard atmosphere (PE-WV) and under vacuum (PE-V); also packed in polyamide packaging under vacuum (PA-V), and stored at 7°C for 30 days. The following properties were monitored: fresh weight loss, water activity, pH, titratable acidity, soluble solids, instrumental color, chlorophyll *a* and *b*, and total phenolic contents. In addition, there were assessed *Salmonella* spp. coliform at 45°C, molds and yeasts and psychrotrophic bacteria. The 20 min immersion time and 250 mg/L NaClO solution were defined as the optimal conditions for the sanitization of the leaves and, after that, the leaves were rinsed with water. The behavior of the physical-chemical and microbiological properties indicated that the sanitized and crushed cassava leaves will be suitable for consumption for 24 h when packed in PE-WV; for 7 days when packed in PE-V and for 14 days when packed in PA-V, at 7°C storage.

Keywords: *Manihot esculenta* Crantz, sanitization, minimal processing.

O estudo apresenta uma alternativa para o processamento mínimo das folhas da mandioca trituradas: um produto amplamente utilizado na culinária da região Norte. Um planejamento Box-Behnken foi utilizado para definir a concentração da solução de hipoclorito de sódio (NaClO) e o tempo de imersão (t) capazes de garantir níveis aceitáveis para coliformes termotolerantes e bolores e leveduras, nas folhas. As folhas sanitizadas nesta condição foram trituradas; acondicionadas em embalagens de polietileno, em atmosfera padrão (PE-WV) e sob vácuo (PE-V), e em embalagem de poliamida sob vácuo (PA-V); e armazenadas a 7°C, por 30 dias. Foram acompanhadas as propriedades: perda de massa fresca, atividade de água, pH, acidez, sólidos solúveis, cor instrumental, clorofila *a* e *b*, e compostos fenólicos; além da avaliação de *Salmonella* spp. coliformes a 45°C, bolores e leveduras e bactérias psicrotóficas. Foi definida como condição ótima para a sanitização, a imersão das folhas por 20 min, em uma solução a 250 mg/L de NaClO, seguida de lavagem com água. O comportamento das propriedades físico-químicas e microbiológicas indicaram que as folhas da mandioca sanitizadas e trituradas estarão adequadas para o consumo por 24 h, se acondicionadas em PE-WV, por até 7 dias em PE-V e por 14 dias em PA-V, se armazenadas a 7°C.

Palavras-chave: *Manihot esculenta* Crantz, sanitização, processamento mínimo.

### 1. INTRODUCTION

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a tropical root crop, which has an abundant composition of starch. This species stands out for presenting a world production of 296.8 million tons and a cultivated area of 26.6 million hectares [1]. In Brazil, a cassava production of 20.2 million tons is estimated, as the Northern region accounting for 36.1% of this production [2].

In Brazil, cassava roots can be found in the minimally processed or pre-cooked and in frozen forms [3], as the main use of this root destined for the production of flour and tucupi, in the Northern region [4]. Cassava leaves, in turn, are used as an ingredient in typical dishes from the Amazonian culture [5], as maniçoba: a product obtained from the crushed cassava leaves that are boiled with water for several days to eliminate cyanide [6]. Cassava leaves are commonly commercialized in