

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ELIAS PINHEIRO FONSECA

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM LEGUMINOSAS

PATOS DE MINAS

2019

ELIAS PINHEIRO FONSECA

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM LEGUMINOSAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo A. Moraes de Souza

Coorientadora: Prof. Dr. Letícia Rocha Guidi

PATOS DE MINAS

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Faculdade de Engenharia Química

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG,
CEP 38400-902

Telefone: (34) 3239-4285 - secdireq@feq.ufu.br - www.feq.ufu.br



HOMOLOGAÇÃO 10/2019/FEQUI

ELIAS PINHEIRO FONSECA

Métodos de Extração de Proteínas em Leguminosas

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado nesta data para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - *campus* Patos de Minas (MG) pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Rodrigo Aparecido Moraes de Souza
Orientador - UFU

Prof. Dr. Thiago Soares Leite
UFU

Prof.^a Dr.^a Isabela Costa Guimarães
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Patos de Minas, 2 de julho de 2019.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Aparecido Moraes de Souza, Presidente**, em 02/07/2019, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Soares Leite, Membro de Comissão**, em 02/07/2019, às 12:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela Costa Guimarães, Usuário Externo**, em 02/07/2019, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1289312** e o código CRC **BAF56F2A**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mara e David e à minha irmã Sara que sem o apoio e o esforço de cada um deles eu jamais teria a oportunidade de realizar e concluir este curso

Aos meus professores, sem exceção, que contribuíram e inspiraram a minha formação não apenas acadêmica, mas como pessoa e profissional e foram pacientes com as minhas dúvidas repentinas durante suas aulas

Ao meu professor e orientador deste trabalho, Dr. Rodrigo que durante anos aprendi com ele coisas que vão muito além das salas de aulas

A minha coorientadora Dr. Letícia a qual foi muito atenciosa durante este trabalho e durante a orientação no Programa Pomar

A toda a equipe do Programa Pomar que possui a capacidade de superar qualquer desafio e trabalhar de forma tão orgânica e agradável, além de cada membro contribuir verdadeiramente para a minha pessoa

À banca examinadora, Dr. Thiago, e Dra. Isabela, que fará grande esforço para se deslocar à Patos de Minas para participar da banca.

RESUMO

Proteínas de leguminosas podem ser utilizadas em diversas aplicações. A indústria de alimentos, conduzida por demandas de mercado, disponibilidade de matéria-prima e crescentes pressões ambientais, busca constantemente inovar em produtos e tecnologias. O interesse em proteínas de leguminosas se dá devido aos benefícios que estes compostos possuem, como uso tecnológico em formulações de alimentos e baixo impacto ambiental. Existem diversos métodos de obtenção de proteínas de leguminosas. Entre as técnicas mais estabelecidas estão: *air classification*, extração alcalina seguida de precipitação isoeletrica, extração alcalina seguida de ultrafiltração, extração aquosa e extração salina. Destas técnicas, a extração alcalina seguida de precipitação isoeletrica é a mais utilizada devido à sua relativa simplicidade e produção de concentrados com alta pureza proteica. Algumas tecnologias emergentes são promissoras, pois são capazes de obter produtos de alta pureza e buscam por rótulos de tecnologias verdes, seguras e mais nutritivas; entretanto, estas técnicas deverão superar diversos desafios para se estabelecerem comercialmente. Quanto à composição do produto obtido, a concentração proteica não é necessariamente decisiva na escolha de qual método utilizar. A composição de um produto proteico varia entre os métodos e entre as etapas e parâmetros empregados neles. Estas variáveis, que implicam na composição final, resultarão, principalmente, em alterações nas propriedades funcionais como solubilidade, capacidade de emulsão, formação de espuma, entre outras, além de alterações nas características sensoriais como cor, sabor e textura.

ABSTRACT

Pulse proteins can be used in many applications. The food industry, driven by market demands, raw material availability and growing environmental pressure, search constantly to innovate in products and technologies. The interest in pulse protein is due to benefits that these compounds have, such like technological applications in food formulas and low environment impact. There are many methods to obtain pulse proteins. The most established techniques are air classification, alkaline extraction followed by isoelectric precipitation, alkaline extraction followed by ultrafiltration, water extraction and salt extraction. Of these techniques, alkaline extraction followed by isoelectric precipitation is the most used due to its relative simplicity and capabilities of produce products with high protein purity. Some novel technologies are promising, because they are capable of produce high purity products and are looking for the label of green technologies, safer and more nutritious; however, these techniques should overcome many challenges to be establish commercially. Regarding composition, the protein concentration in the final product is not necessarily the only decisive choice to choose a extraction method. The composition of a protein product vary between the methods and between the steps and parameters employed. These variables, that will imply in the final composition, will result, mainly, in changes in the functional properties like solubility, emulsion, foaming, among others, besides alterations in sensory characteristics like color, flavor and texture.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1	Produção de leguminosas	8
2.2	Caracterização de leguminosas.....	9
2.2.1	Morfologia e anatomia dos grãos	10
2.2.2	Composição de leguminosas.....	12
2.3	Microestrutura dos grãos de leguminosas	13
3	Metodologia	17
4	Técnicas de obtenção de concentrados e isolados proteicos de leguminosas.....	18
4.1.1	<i>Air classification</i>	18
4.1.2	Extração alcalina/Precipitação isoeletrica	23
4.1.3	Extração aquosa	32
4.1.4	Ultrafiltração.....	35
4.1.5	Extração salina	41
4.1.6	Similaridades entre métodos estabelecidos.....	46
4.1.7	Métodos emergentes para a obtenção de proteínas	48
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

Proteínas de origem vegetal são mais sustentáveis que proteínas de origem animal quando comparamos o uso de combustíveis fósseis, o uso de área para produção e o consumo de água. Com a população humana estimada para aumentar para 9,5 bilhões até o ano de 2050, será necessário que o consumo de nutrientes de origem vegetal tome maior proporção na dieta humana para suprir a qualidade nutritiva necessária. A primeira geração de fonte de proteínas vegetais para consumo humano foi a soja, uma leguminosa. Relatos de consumo de grãos de soja remontam ao século 3 A.E.C. na China (PREECE, HOOSHYAR & ZUIDAM, 2017).

A terminologia em inglês para leguminosas no contexto de estudo de concentrados proteicos é referida como “*pulse*”. A FAO define o termo *pulse* como leguminosas colhidas para obtenção de grãos secos, excluindo então leguminosas colhidas verdes para alimentação como ervilhas verdes e vagem. Também são excluídas do termo *pulse*, definido pela FAO, leguminosas com alta concentração lipídica ou destinadas majoritariamente para extração de óleo, como soja e amendoim (FAO, 1994). Pela definição citada, a soja não é *pulse*, mas a literatura a inclui em alguns estudos devido às suas muitas semelhanças com essas leguminosas.

As leguminosas são vegetais ricos em proteínas e incluem os feijões, as lentilhas, as ervilhas secas, a fava, a soja, o grão-de-bico, o amendoim e diversas outras espécies. Estes vegetais são uma das principais fontes de proteínas na alimentação (BRASIL, 2008).

Em geral, as leguminosas apresentam um conteúdo proteico de 15 a 30%, podendo ser uma boa fonte de proteínas (BRAVO, SIDDHURAJU & SAURA-CALIXTO, 1999). A obtenção de leguminosas com maior conteúdo de proteínas a fim de melhorar a viabilidade para extração deste nutriente pode ser possível através de técnicas ainda não praticadas em grande escala. Por exemplo, a produção de grão-de-bico em simbiose com microrganismos gerou um aumento de 22% no conteúdo proteico desta leguminosa (OLIVEIRA et al., 2017).

Durante o século XX, em países Ocidentais, uma transição nutricional ocorreu, fazendo dos animais a principal fonte de proteínas, que antes era o pão. Esta transição foi acompanhada de um enorme aumento na criação de animais com fins de abate para produção de carne que, de acordo com projeções recentes, terá sérias consequências na manutenção da segurança alimentar. Quando comparado animais à plantas, o uso de recursos necessários para produzir uma mesma quantidade de proteínas é muito maior em animais, portanto, em termos de eficiência de produção de proteínas, as plantas são superiores (BOER, 2011).

Recentemente, o uso de leguminosas e seus constituintes pela indústria de alimentos estão tomando cada vez mais a atenção destes produtores e dos consumidores em países mais desenvolvidos.

Diversos fatores contribuem para este crescimento, como os benefícios nutricionais e para a saúde, mudanças na preferência de consumidores, crescente demanda por variedade de alimentos nutritivos, mudanças demográficas que inserem costumes culinários estrangeiros e o aumento da incidência de alergias alimentares majoritariamente a partir de soja, amendoim, nozes, leite, ovos, glúten, peixe e frutos-do-mar (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010).

Alergias à proteínas de leguminosas também podem ocorrer, mas variam entre as diversas espécies e variedades pois dependem de quais proteínas as compõem. Embora proteínas de leguminosas serem capazes de causar alergias, estes alimentos não estão nas listas prioritárias de atenção da União Europeia e América do Norte e os estudos sobre o tema são relativamente recentes, entretanto, devido à tendência de alimentos ricos em proteínas, como os citados acima, reportarem mais casos de alergias, indivíduos sensíveis devem sempre exercitar maiores precauções verificando os ingredientes dos alimentos que consomem (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010).

Pesquisas recentes demonstram a aplicabilidade dos constituintes de leguminosas como ingredientes tecnológicos e nutricionais. As origens destes constituintes pode ser alterada entre as diversas espécies e variedades a fim de evitar possíveis aspectos negativos como alergias e fatores antinutricionais. As oportunidades de aplicação de proteínas e demais frações de leguminosas em novos produtos estão emergindo em diferentes categorias. Exemplos de produtos em desenvolvimento ou consolidados que tem como ingrediente proteínas de leguminosas são: alimentos infantis, imitações de leite, queijos vegetais, produtos cárneos, produtos de panificação, coberturas, glacês, pastas, produtos extrudados e macarrão (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010).

Diante do exposto, fica clara a importância do estudo e do desenvolvimento de métodos de extração de proteínas de leguminosas. Por isso, o objetivo geral deste trabalho foi fazer um levantamento dos métodos de extração de proteínas em leguminosas encontrados na literatura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de leguminosas

A produção global de leguminosas, com exceção da soja, atingiu 72,3 milhões de toneladas métricas na média entre os anos de 2011 e 2013. O feijão comum domina a produção de leguminosas com 23,1 milhão de toneladas métricas (32%), como mostrado na Tabela 1 (JOSHI & RAO, 2016).

Tabela 1 – Produção mundial de leguminosas, em média, entre 2011 e 2013.

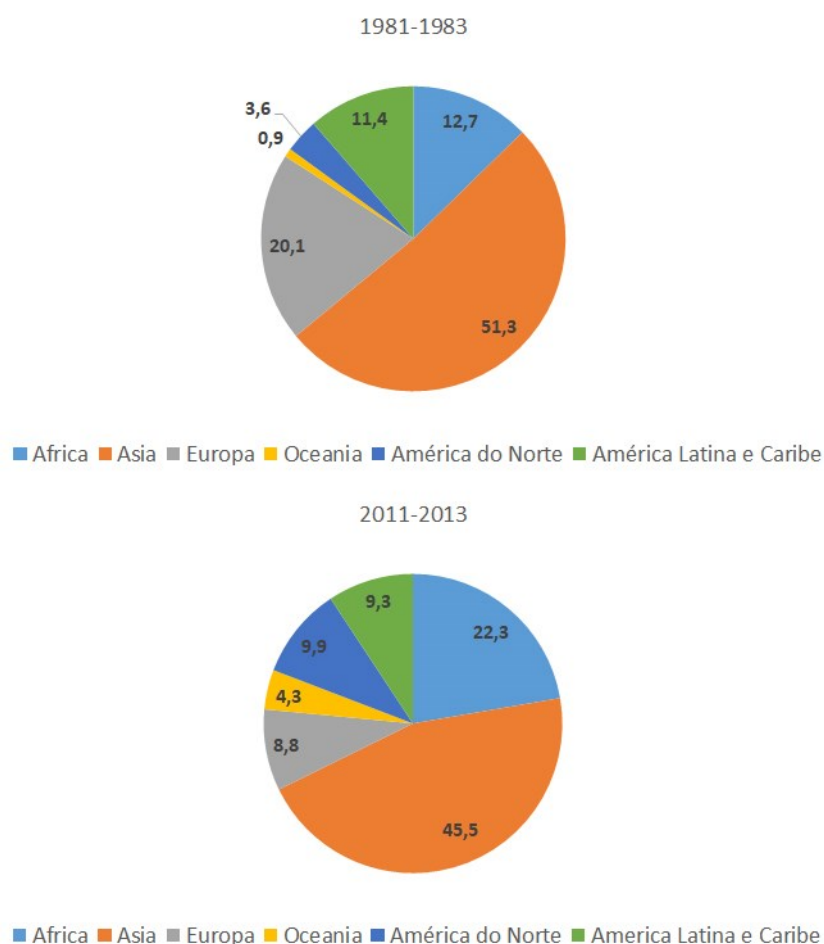
Leguminosa	Porcentagem (%)
Feijão comum	32
Grão-de-bico	16
Ervilha seca	14,6
Feijão-de-corda	8,9
Lentilhas	6,5
Feijão guandu	6,2
Fava	5,8
Outras	-

Fonte: Adaptado de JOSHI & RAO (2016).

As proporções de contribuição por espécie na produção total de leguminosas mudam constantemente. O feijão-de-corda aumentou sua contribuição de 3% para 9% e a ervilha seca, em contraste, caiu de 21% para 14%. Ambas as leguminosas tiveram suas áreas plantadas alteradas, aumentando e reduzindo respectivamente, entre 1981 e 2013 (JOSHI & RAO, 2016).

A Ásia dominou 51,3% da produção mundial de leguminosas, sofrendo uma redução para 45,5% entre a média dos anos 1981-1983 e 2011-2013. Houve uma grande redução na contribuição da Europa para a produção mundial, deixando a marca de 20,1% e passando para 8,8%, em razão, principalmente, da maior valorização de outras commodities concorrentes como os cereais. A América Latina reduziu de 11,4% para 9,3% no mesmo período. A dinâmica produção mundial de leguminosas compensou as reduções das demais regiões com o aumento de parcelas da América do Norte de 3,6% para 9,9%, da África de 12,7% para 22,3% e da Oceania de 0,9% para 4,3%. Apesar de reduções nas contribuições da Europa, Ásia e América Latina, não houve redução de área plantada nestes locais e a produção aumentou lentamente (JOSHI & RAO, 2016). A Figura 1 representa graficamente as variações em dois momentos diferentes.

Figura 1 – Distribuição geográfica total de leguminosas em porcentagem.



Fonte: Adaptado de JOSHI & RAO (2016).

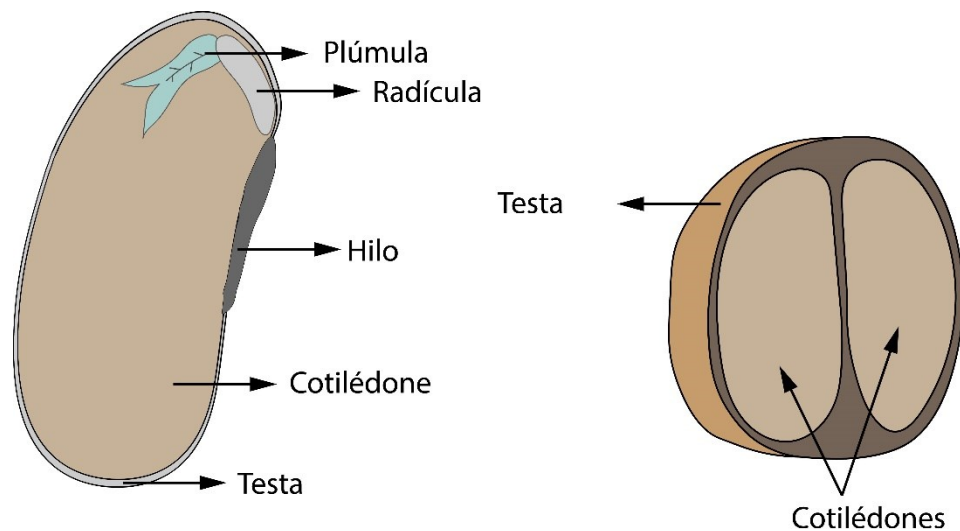
2.2 Caracterização de leguminosas

As características dos grãos são importantes para a elaboração de processos alimentícios e fornece uma base para o estudo de mudanças induzidas nos grãos por diversas operações de processamento de alimentos. Estudos da morfologia, composição e microestrutura de leguminosas, são essenciais para o desenvolvimento de processos mais eficientes, possibilitar extratos de maior pureza e de propriedades funcionais mais adequadas (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010).

2.2.1 Morfologia e anatomia dos grãos

Em termos gerais, as angiospermas são classificadas em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Sementes de monocotiledôneas têm um cotilédone, enquanto embriões de dicotiledôneas têm dois cotilédones. Cereais como arroz, trigo e aveia são monocotiledôneas e leguminosas são dicotiledôneas, ou seja, suas sementes podem ser separadas em duas metades. Em geral, as sementes de leguminosas distinguem-se em três partes - cotilédone (endosperma), gérmen (embrião) e casca (testa), como mostrado na Figura 2 abaixo (TIWARI & SINGH, 2012).

Figura 2 – Estrutura geral de leguminosas.



Fonte: O autor.

Em geral, todas as leguminosas têm uma estrutura bastante similar, mas diferem em cor, formato, tamanho e espessura do revestimento das sementes, como pode ser visto na Figura 3. A morfologia dos grãos de leguminosas pode variar de espécie para espécie e, também, dentro de uma dada espécie. As variações em uma mesma espécie são provavelmente devido às diferenças ambientais e às práticas agronômicas. A identificação das classes reconhecidas no mercado pelo mundo se dá por dois critérios principais: a cor e o tamanho da semente (TIWARI & SINGH, 2012).

Figura 3 –Diferentes espécies e variedades de leguminosas.



Fonte: OSESEK.PL. (2019).

Leguminosas podem ser melhor estudadas considerando suas três partes principais: casca da semente, endosperma e o gérmen. Em geral, o cotilédone (endosperma) é a maior parte do grão, totalizando de 80 a 90% do volume da semente. O gérmen contribui entre 8 e 16% e a casca entre 1 a 3%. Apesar de leguminosas de diversas cores estarem disponíveis, as cores predominantes são marrom e uma combinação de marrom com branco. A espessura da casca varia entre espessa com uma superfície suave até cascas finas com superfícies irregulares (TIWARI & SINGH, 2012).

O endosperma ou cotilédone do grão é o estoque nutritivo que permite o crescimento inicial da semente. Nele encontra-se a grande maioria das proteínas da semente. Diferente do gérmen, o endosperma não é metabolicamente ativo e consiste em um grande número de células parenquimáticas sem núcleo, preenchidas de grânulos de amido incorporados em uma matriz de proteínas. Esta região da semente tem o amido como estrutura mais abundante e o tamanho das células que a compõem varia de 70 a 100 μm (TIWARI & SINGH, 2012).

Na Tabela 2 nota-se a proximidade da proporção entre as diversas leguminosas. O cotilédone é a maior parte da semente, seguido da casca e em menor proporção, o gérmen.

Tabela 2 – Proporção anatômica de algumas leguminosas.

Leguminosa	Proporção do grão integral (%)		
	Casca da semente	Cotilédone	Gérmen
Grão de Bico	12,5	85,5	2,0
Feijão guandu	15,5	83,0	1,5
Feijão mungo	12,0	87,0	1,0
Lentilha	8,0	89,9	2,1
Feijão-de-corda	10,6	87,3	2,1
<i>Kidney Bean</i>	9,7	89,3	1,0
Ervilha	10,0	88,3	1,7

Fonte: TIWARI & SINGH (2012.)

2.2.2 Composição de leguminosas

Leguminosas secas contêm aproximadamente, 10% de umidade, 20-25% de proteína, 2-7% de lipídeos, 50-65% de carboidratos e 2,5-4% de cinzas, como pode ser visto na Tabela 3. Entretanto, algumas leguminosas com alto teor de lipídeos como a soja e o amendoim, também conhecidas como oleaginosas, possuem composições mais distantes média das leguminosas.

Tabela 3 – Composição de algumas leguminosas.

Leguminosa	Variedade	Composição (g/100g de amostra)						Referência
		Proteínas	Carboidratos	Fibras	Cinzas	Lipídeos	Umidade	
Feijão	Guandu	19,3	-	5,56	4,05	3,24	-	Boye, Zare & Pletch (2010)
	Feijão-de-corda	24,5	51,4	19,4	2,6	2,2	6,0	Frota, Soares & Arêas (2008)
	Comum	20,9	54,3	8,55	3,80	2,49	9,93	Ermetice, et al. (2016)
Grão-de-bico	Kabuli (Iraque)	23,6	-	4,4	3,1	4,9	-	Boye, Zare & Pletch (2010)
	Kabuli (India)	20,6	-	3,0	3,5	6,6	-	Boye, Zare & Pletch (2010)
	Kabuli (Canada)	22,1	-	7,8	2,6	6,5	-	Boye, Zare & Pletch (2010)
	Desi (India)	18,4	-	6,2	3,4	5,8	-	Boye, Zare & Pletch (2010)
	Desi (Canada)	25,1	-	8,4	2,8	6,1	-	Boye, Zare & Pletch (2010)
Lentilha	<i>Lens culinaris</i> <i>Med. cv. Silvina</i>	20,6	56,4	6,83	2,80	2,15	11,2	Ermetice, et al. (2016)

Ervilha	<i>Pisum sativum L.</i> <i>cv. Maria</i>	21,9	52,5	10,4	3,00	2,34	9,88	Ermetice, et al. (2016)
Soja	BRS 284	33,2	31,63	26,64	4,6	22,54	7,99	Gonçalves (2014)

Os campos sem dados (-) são devidos a ausência de menção pela referência.

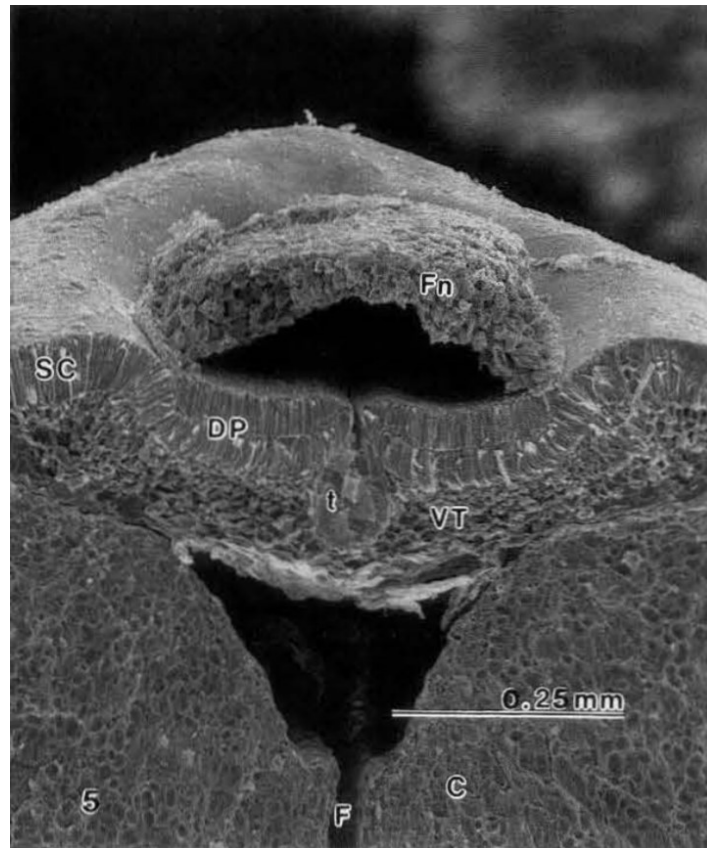
Os fatores antinutricionais também são relevantes na composição de leguminosas, uma vez que acarretam diversos problemas para a saúde humana após a ingestão, como a interferência na digestibilidade, absorção ou utilização de nutrientes. Alguns compostos associados à ação antinutricional são os fitatos, os inibidores enzimáticos, os polifenóis, as lectinas e as saponinas (SINGH, 2017). Estes fatores antinutricionais podem ter seu impacto drasticamente reduzido caso o método de preparo ou processamento inclua altas temperaturas, que irão destruir estes componentes termolábeis. A temperatura de destruição é geralmente atingida nas condições tradicionais de preparo destas leguminosas *in natura* (BENEVIDES et al., 2011). Uma etapa de repouso em água a baixa temperatura anterior ao cozimento, com o objetivo de aumentar o conteúdo aquoso do alimento e facilitar a cocção, também promove uma lixiviação parcial destes compostos antinutricionais; entretanto, também pode levar à perda de componentes antioxidantes (PINTO et al., 2016).

2.3 Microestrutura dos grãos de leguminosas

A maioria dos elementos que são críticos nas propriedades de transporte, comportamento reológico, comportamento físico e características sensoriais, estão abaixo da ordem de 100 μm , implicando em grande importância da microestrutura do grão no processamento. Além de grandes implicações no processo tecnológico, aspectos microestruturais também controlam a digestibilidade e biodisponibilidade de nutrientes de produtos alimentícios, que também devem ser abordados pela indústria (TIWARI & SINGH, 2012).

A abordagem da literatura sobre a microestrutura de leguminosas está limitada a sua relação com a textura do alimento, que tem grande influência sensorial. Ainda são escassos estudos que relacionam a microestrutura de leguminosas com o processo de moagem e demais fatores que influenciem na obtenção do concentrado proteico e em suas propriedades funcionais (TIWARI & SINGH, 2012). Na Figura 4, obtida a partir de uma Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), pode-se ter uma perspectiva da dimensão de alguns componentes anatômicos das leguminosas.

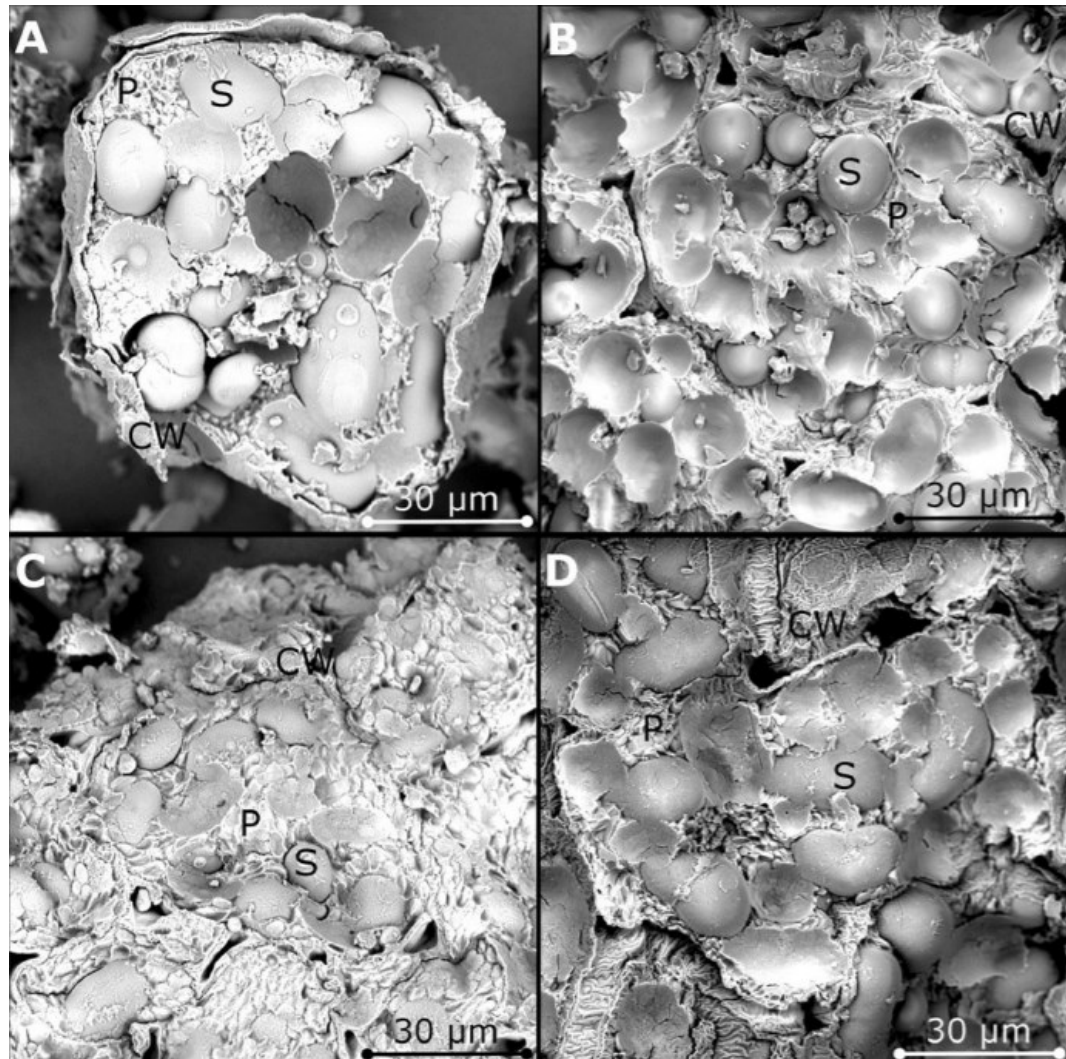
Figura 4 - Seção transversal de feijão mungu (*Vigna radiata*).



Casca da semente (SC), camadas paliádicas (DP), camadas celulares na região do hilo (t), tecido vascular (VT), cotilédones (C), fissuras (F), funículo (Fn). Fonte: JOSEPH, CRITES & SWASON (1993).

A Figura 5 apresenta, através de uma Microscopia Eletrônica de Varredura, que os corpos proteicos estão claramente localizados entre os grânulos de amido das principais espécies de leguminosas. As configurações destes corpos proteicos diferem entre as espécies em tamanho, disposição e formato (TIWARI & SINGH, 2012).

Figura 5 - Morfologia de algumas leguminosas.



Ervilha (A), feijão (B), grão-de-bico (C) e lentilha (D). Grânulos de amido (S), corpos proteicos (P), parede celular (CW). Fonte: PELGROM, BOOM & SCHUTYSER (2015).

As células dos cotilédones de feijões, quando observadas na Figura 5, mostram que os grânulos esféricos de amido possuem entre 10 e 50 μm e a matriz proteica em que se encontra esse amido é composta por corpos proteicos de 1 a 10 μm . O conjunto destes grânulos e corpos proteicos formam a maior parte das células que preenchem os cotilédones, sendo que tais células se estendem de 70 a 100 μm (TIWARI & SINGH, 2012).

Processos de obtenção de concentrados e isolados proteicos em geral submetem as leguminosas a etapas de fracionamento e moagem para a obtenção de farinhas com o objetivo de tornar a extração viável (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010). A qualidade da moagem dos grãos de leguminosas tem implicações diretas nos subsequentes processamentos da farinha obtida e no resultado final (TYLER, 1984). Alguns métodos de obtenção de concentrados proteicos envolvem a moagem a seco e uma

subsequente classificação do material pelo método *air classification*, que utiliza da diferença de peso entre as partículas da farinha para promover a separação entre fração proteica e fração amilácea, com as vantagens de alta eficiência energética e manutenção da funcionalidade nativa da proteína. Entretanto, o método tem o rendimento limitado devido à configuração entrelaçada entre a matriz proteica com os glóbulos de amido, tornando essencial o conhecimento sobre as propriedades estruturais do cotilédone e as consequências destas no comportamento do grão durante a moagem para que o fluxo de ar arraste a fração desejada com maior precisão (PELGROM, SCHUTYSER & BOOM, 2012).

A moagem deve ser seletiva o bastante para que os grânulos de amido não sejam severamente danificados e fragmentados, mas também deve ser intensa o suficiente para produzir uma farinha bastante fina que facilite a separação das proteínas (TYLER, 1984).

Em geral, as células são mais arredondadas e mais frouxamente comprimidas na parte central do cotilédone, com grandes espaços intercelulares. Diferentemente do centro, as camadas mais exteriores são mais firmemente comprimidas. Esta condição de diferença estrutural entre as camadas interiores e exteriores gera comportamentos diferentes entre as regiões durante a moagem de leguminosas (TIWARI & SINGH, 2012).

Pelgrom, Schutyser e Boom (2012) investigaram o estado termomecânico de ervilhas em função da umidade e da temperatura do grão e confirmou a grande influência do estado termomecânico do grão no comportamento durante a moagem. Foram identificadas três diferentes regiões no diagrama de estado: proteína e amido vítreo, proteína elástica e amido vítreo e proteína e amido elástico. Análises nas três distintas regiões constatarem comportamentos diferentes para cada estado. Os diferentes estados termomecânicos em função da temperatura e da umidade podem ser estudados previamente aos processos de fracionamento para maximizar a separação das frações proteicas e amiláceas.

3 METODOLOGIA

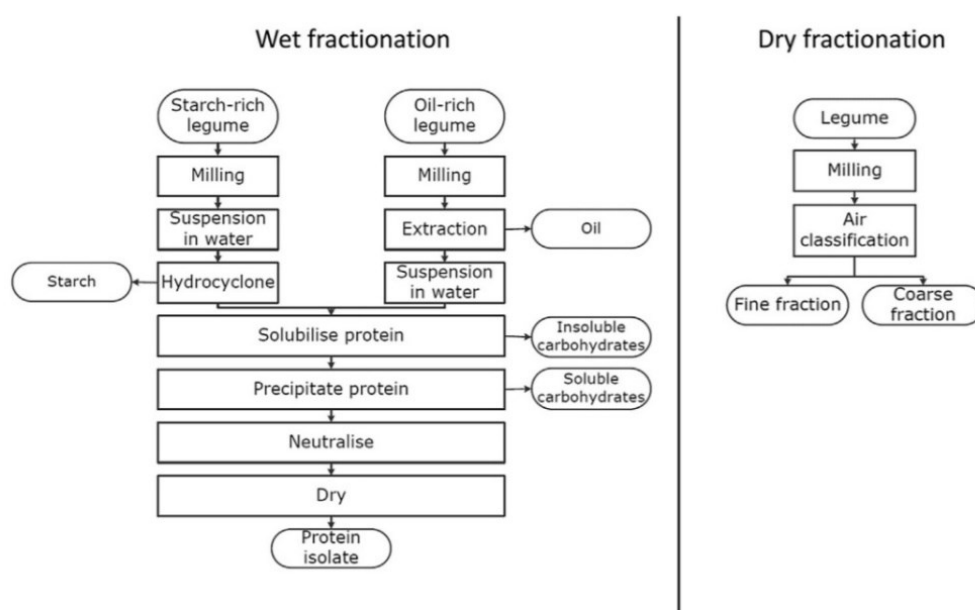
A estratégia metodológica para a produção do conteúdo deste trabalho foi a revisão bibliográfica, através do levantamento de artigos, teses, monografias e dissertações disponíveis na literatura.

4 TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS E ISOLADOS PROTEICOS DE LEGUMINOSAS

4.1.1 Air classification

A técnica *air classification* visa a separação das frações proteicas (leve) e amiláceas (pesada) através da classificação de uma farinha muito fina submetida a um fluxo espiral de ar que separa as duas frações, utilizando a diferença de densidade e o tamanho entre elas (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010). Na Figura 6, o fluxograma do processo de *air classification* é demonstrado e comparado com um método úmido genérico. O método úmido é discutido em sequência deste.

Figura 6 – Fluxograma de obtenção de proteínas por método úmido e método *Air Classification*.



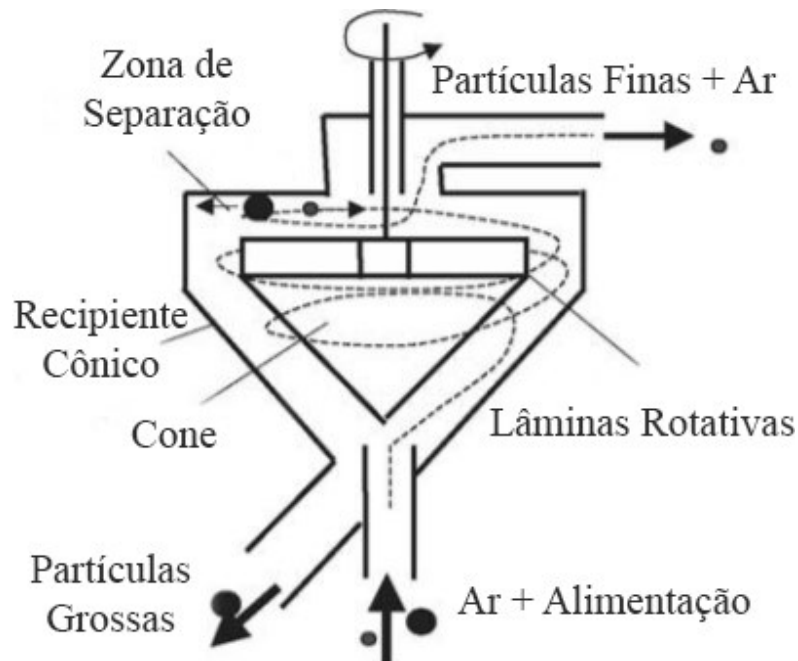
Fonte: Adaptado de PELGROM, SCHUTYSER & BOOM (2012).

A obtenção da farinha de leguminosas secas é feita em geral por moinhos de impacto e o modelo de pinos é o tipo amplamente utilizado, como encontrado na literatura desde a década de 1970 (VOSE, 1978; SOSULSKI & YOUNGS, 1979; CLOUTT, WALKER & PIKE, 1986; WU & NICHOLS, 2005; DIJKINK et al., 2007; REMPEL, GENG & ZHANG, 2019). O fracionamento por impacto é preferido por romper as paredes celulares e produzir farinhas com partículas de dimensão pequena o suficiente para que o seu conteúdo de grânulos de amido e matriz proteica bastante entrelaçado seja

apropriadamente exposto para separação, sem que o grânulo de amido seja severamente danificado a ponto de interferir na classificação posterior (VOSE, 1978).

Classificadores rotativos, como visto na Figura 7, são os mais utilizados para o processamento de farinhas finas. O processo inicia com a dispersão da farinha fina em um grande fluxo de ar; em seguida, o fluxo entra em uma câmara cônica onde encontra um disco classificador com lâminas que cria um contrafluxo centrífugo que separa as grandes partículas das pequenas, sendo que a densidade também influencia na separação. As partículas em que a força de arrasto supera a força centrífuga passam entre as lâminas do disco classificador e são separadas da fração pesada, que descende (SCHUTYSER et al., 2015).

Figura 7 - Classificador rotativo: o equipamento mais difundido para *air classification* de farinhas.



Fonte: Adaptado de SHAPIRO & GALPERIN (2005).

Como alternativa aos processos de concentração realizados em meios úmidos, o método *air classification* é executado a seco e diferentemente dos processos úmidos, o custo e o trabalho são menores; não há custo com reagentes e tratamento de efluentes; as possibilidades de problemas sanitários são mínimas e o único subproduto são possíveis cascas dos grãos (SOSULSKI & YOUNGS, 1979). O fracionamento de leguminosas pode ser obtido de forma mais sustentável pelo método *air classification* por utilizar rotas nas quais a demanda de energia e de recursos são menores, os produtos obtidos atendem à busca por ingredientes saudáveis e os concentrados proteicos mantêm as propriedades funcionais, além de ser considerado um processo orgânico (SCHUTYSER et al., 2015).

Vose (1978) aborda em maiores detalhes o mecanismo de separação em termos físicos e matemáticos e reúne informações e parâmetros sobre o material a ser classificado e equipamentos empregados. Na prática, o ajuste do tamanho de corte de partículas é feito pela variação do fluxo de ar, da rotação do rotor do disco classificador e também sofre influência do dimensionamento da câmara de separação. Este dimensionamento também determina o intervalo de tamanhos possíveis de separação.

A relativa pouca eficiência de extração produz um concentrado com uma variedade de compostos muito mais elevada do que métodos úmidos, desta forma os demais componentes do grão como lipídeos, fibras e fatores antinutricionais se tornam mais expressivos na fração proteica produzida. Esta diversidade de compostos gera consequências no produto em termos de propriedades funcionais (solubilidade, capacidade de emulsão, de formação de espuma, de formação de gel e entre outras) e nutricionais. Tais implicações podem ser desejáveis ou não, a exemplo dos lipídeos, que são indesejados para o adequado comportamento da espuma. As fibras solúveis, em contraponto, são desejáveis para a formação de géis (SCHUTYSER et al., 2015).

Na pode-se observar que a fração fina ainda possui grande contribuição em massa de componentes não-proteicos, pois o tamanho das partículas destes componentes são muito mais próximos das proteínas, que são finas (pequenas), do que de corpos de amido, que são grossos (grandes). Apesar da proximidade de composição entre as farinhas das espécies, as configurações da microestrutura e as diferentes proteínas das leguminosas, resultam nestas variações dos produtos classificados, observadas na (SOSULSKI & YOUNGS, 1979; SCHUTYSER et al., 2015).

Tabela 4 – Rendimento e eficiência de fracionamento de produtos pelo método *air classification*, proteína (fina) e amido (grosso).

Leguminosa	Rendimento: Razão Fina/Grossa	% de proteína total na fração fina	% de amido total na fração grossa
Soja	72:28	74,1	-
Tremoço (<i>Lupinus albus L.</i>)	82:18	85,7	-
Grão-de-bico	29:71	43,0	81,4
Ervilha	26:74	55,2	99,4
Feijão branco (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	22.5:77.5	50,0	99,9
Fava	28:72	62,6	98,6
Feijão-de-lima (<i>Phaseolus lunatus</i>)	27:73	56,0	98,0
Feijão mungu	29:71	66,1	96,3
Lentilha	26:74	63,0	95,6

Fonte: SOSULSKI & YOUNGS (1979.)

O tamanho dos grânulos de amido tem grande influência no sucesso de classificação de algumas leguminosas. A relação ótima de tamanho é grânulos de amido grandes e corpos proteicos pequenos. Óleos podem afetar negativamente a separação das frações pois podem impedir a dispersão dos pós da farinha, este fator tem grande impacto no sucesso de classificação de oleaginosas como a soja (SCHUTYSER et al., 2015).

O conteúdo proteico dos concentrados produzidos por este método variaram de 49 a 70 g de proteína/100 g de massa seca (Tabela 5). Embora processos de *air classification* com excelentes níveis de ajustes produzam resultados satisfatórios, a pureza das frações de proteína e amido produzidas frequentemente não alcançam as de processos úmidos adequadamente ajustados. Esta relativa ineficiência de separação é a principal desvantagem do método *air classification* (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010).

Tabela 5 – Concentração de proteína em leguminosas por *air classification*.

Leguminosa	Conteúdo proteico inicial (g/ 100g de massa seca)	Conteúdo proteico da fração fina (g/ 100g de massa seca)
Feijão-de-lima (<i>Phaseolus lunatus</i>)	23,7	48,9
Feijão-de-corda	27,2	50,9
Feijão comum	26,3	54,7
Feijão branco (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	27,2	56,7
Lentilha	23,7	57,6
Ervilha	23,8	58,5
Feijão mungu	27,2	62,3
Fava	31,0	69,9
Tremoço (<i>Lupinus albus L.</i>)	40,4	59,4

Fonte: SCHUTYSER et al. (2015).

4.1.1.1 Fatores que influenciam na qualidade da moagem e na eficiência de classificação

Assatory e colaboradores. (2019) revisam o método *air classification* e detalham diversos parâmetros e fatores que influenciam nas etapas de moagem e classificação. O objetivo da moagem dos grãos é desentrelaçar as proteínas dos grânulos de amido. A diferença de tamanho dos grânulos de amido com os corpos proteicos deve ser a maior possível para que a separação dos corpos proteicos que são menores que os grânulos de amido ocorra da forma mais eficiente. Os grãos duros também tendem a produzir menores rendimentos proteicos, a dureza pode ser acentuada quando os corpos proteicos se unem mais intensamente com os grânulos de amido.

Tyler (1984) mostrou que a composição química dos grãos de leguminosas também influencia na eficiência da moagem. Altas concentrações de fibra bruta e compostos da parede celular insolúveis em água se associam com um maior entrelaçamento entre os corpos proteicos e amiláceos. Em espécies de leguminosas com grande presença de fibras, se torna necessária a fragmentação do material em partículas ainda menores para que supere a adesão da fibra com os componentes celulares do grão. Neste caso, as fibras muito finamente particuladas contaminam a fração fina, reduzindo o rendimento proteico da separação (SCHUTYSER et al., 2015). Ao contrário do que possa parecer, a repetição da moagem como tentativa de melhorar a separação da matriz proteica dos grânulos de amido não retorna resultados satisfatórios pois pode promover a danificação dos grânulos de amido, reduzindo a eficiência de classificação (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010).

Após uma adequada moagem em que as frações foram desentrelaçadas, a farinha pode ser eficientemente classificada em seus componentes da fração fina (proteica) e grossa (amilácea). A velocidade de rotação do disco de classificação, que se associa ao diâmetro de corte das partículas da farinha, foi associada a um aumento da concentração proteica na fração fina com o estudo de Tyler, Youngs & Sosulski (1984) sobre os efeitos do diâmetro de corte durante o processo de classificação e mostraram que o aumento do diâmetro de corte, até certo limite, aumenta a eficiência de separação, enriquecendo a fração fina com proteínas sem comprometer tanto a composição pela contaminação por amido.

Assim como na moagem, a composição também tem relação com o rendimento de separação. Leguminosas oleosas como a soja e o amendoim são mais difíceis de fracionar no método *air classification* quando comparadas com leguminosas com baixo conteúdo lipídico. O conteúdo lipídico alto intensifica a adesão das partículas, dificultando a livre movimentação e consequente separação das frações pelo fluxo de ar (ASSATORY et al., 2019). O pré-tratamento de leguminosas oleosas para a redução do conteúdo lipídico, com por exemplo usando o método *Soxhlet*, aumentou consideravelmente a concentração proteica na fração fina (57% desengordurada e 45% gordurosa) (ASSATORY et al., 2019). Entretanto, o desengorduramento adiciona etapas químicas ao processo, comprometendo o mérito de “método orgânico” do *air classification*. Métodos úmidos podem ser uma alternativa em geral mais viável para um obter maior rendimento, caso métodos físicos com etapas químicas (métodos híbridos) não produzam resultados eficientes.

4.1.1.2 Propriedades funcionais de concentrados obtidos por *air classification*

Como mencionado anteriormente, o método *air classification* em geral preserva melhor as propriedades funcionais da fração proteica quando comparado aos métodos úmidos. A manutenção das

propriedades funcionais é essencial para a viabilidade do uso destes concentrados como ingredientes para fins tecnológicos em produtos alimentícios (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010). A manutenção das propriedades funcionais nativas das proteínas se refere, quando comparado a métodos convencionais, à melhor solubilidade, estabilidade de espuma, digestibilidade, emulsificação e menor viscosidade (SCHUTYSER, 2015; ASSATORY et al., 2019).

Os estudos que demonstram melhores propriedades funcionais analisaram apenas algumas espécies de leguminosas. Deve-se atentar à grande diversidade de espécies e à possível variabilidade que isso implica nas proteínas. Portanto, em termos gerais, o método *air classification* mantém melhor as propriedades funcionais das proteínas, mas pode haver leguminosas representantes verdadeiras ou não a esta afirmação. Nota-se na Tabela 6 abaixo um embasamento a esta reflexão.

Tabela 6 – Propriedades funcionais de concentrados por *air classification* de leguminosas, fração proteica (FP) e fração amilácea (FA).

	pH da farinha	<u>Absorção de água</u>			<u>Absorção de óleo</u>			<u>Emulsão em óleo</u>		
		Farinha	FP	FA	Farinha	FP	FA	Farinha	FP	FA
Soja	6,6	129	-	-	134	-	-	99	-	-
Tremoço	5,5	173	-	-	125	-	-	90	-	-
Grão-de-bico	6,3	75	68	78	78	85	67	94	92	79
Ervilha	6,2	89	84	93	70	83	61	64	66	20
Feijão branco	6,3	122	144	113	73	85	66	92	98	57
Fava	6,4	86	33	124	74	94	61	47	77	24
Feijão-de-lima	6,3	63	32	102	63	81	54	53	70	27
Feijão mungu	6,3	72	41	92	65	90	49	64	64	22
Lentilha	6,3	85	95	93	66	92	51	56	58	50

O autor afirma que os valores da tabela têm caráter apenas ilustrativo. Fonte: SOSULSKI & YOUNGS (1979).

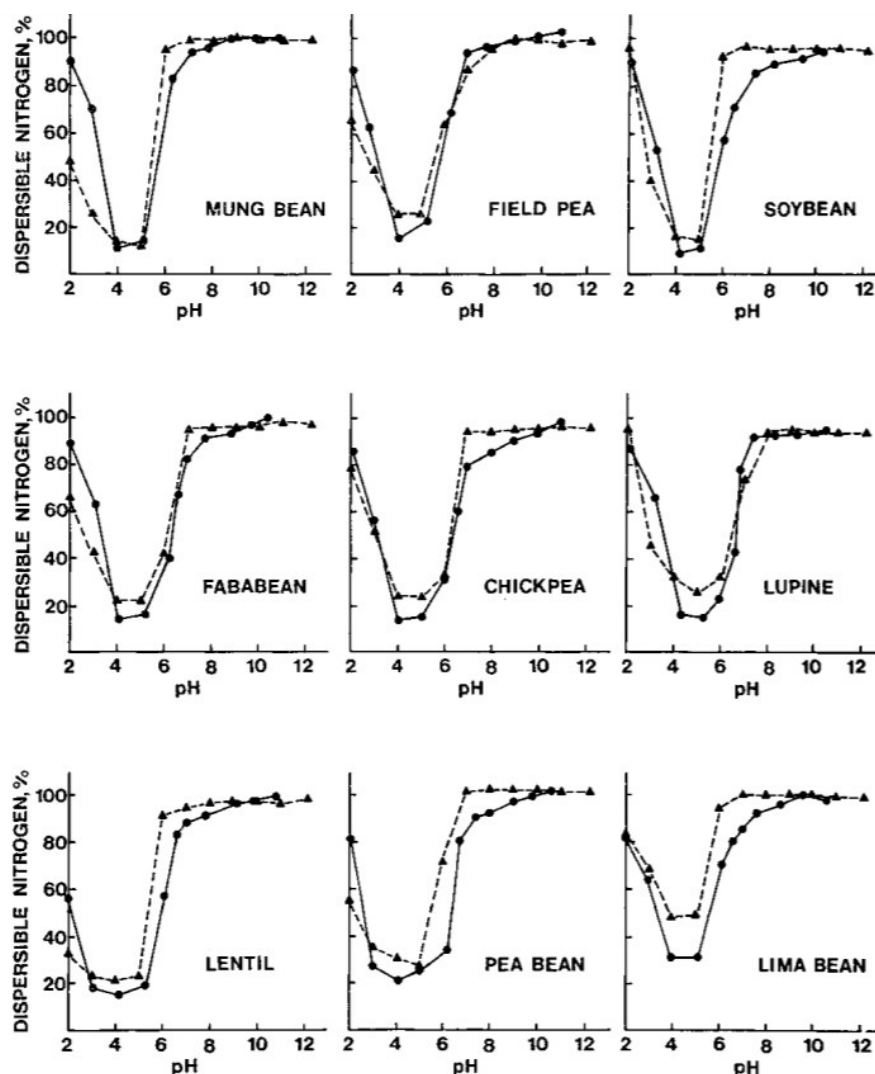
A intensidade da propriedade funcional não determina a superioridade das frações de uma leguminosa ou método, pois na indústria de alimentos são necessários ingredientes com propriedades de intensidades baixas, médias e fortes (SOSULSKI & YOUNGS, 1979).

4.1.2 Extração alcalina/Precipitação isoelétrica

Ao estudar o perfil de extração de nitrogênio em nove farinhas de leguminosas, Fan e Sosulski (1974) mostraram que a solubilização de proteínas de leguminosas é favorecida por pH distantes da

neutralidade (2-3 e 7-12), como representado na Figura 8. A figura também mostra que o ponto isoelétrico das proteínas de leguminosas é entre pH 3 e 6. Lentilha, ervilha e tremço (*Lupinus albus*) são as espécies que mais aumentam este intervalo pois, para os demais representantes, o ponto isoelétrico é precisamente entre pH 4 e 5,5. No ponto isoelétrico as proteínas perdem sua conformação estrutural e reduzem suas solubilidades.

Figura 8 - Diagrama de processo para extração alcalina e precipitação isoelétrica de proteínas de leguminosas.



Fonte: FAN & SOSULSKI (1974).

O comportamento das proteínas diante de um determinado pH é a chave para o processo de obtenção de isolados proteicos pelo método de extração alcalina, seguido de precipitação isoelétrica, e

esta é a técnica mais largamente difundida para obtenção de produtos proteicos de leguminosas (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010).

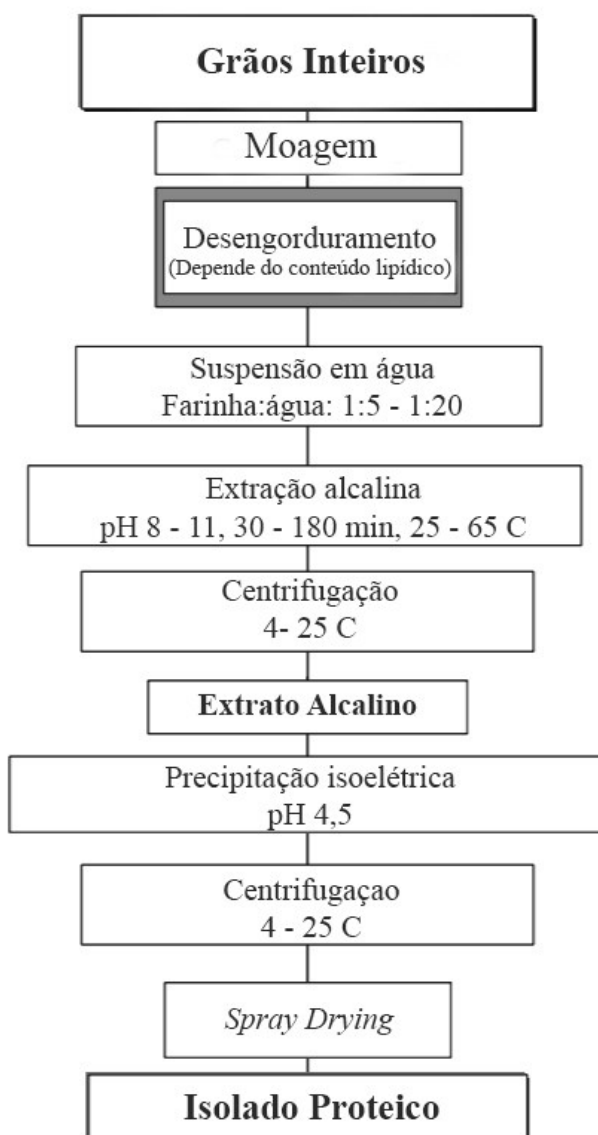
Globulinas constituem a maioria das proteínas em leguminosas, cerca de 70% e albuminas constituem entre 10 e 20%. Gluteninas e prolaminas estão presentes em menores proporções. A solubilidade destes componentes depende da composição e sequência de seus aminoácidos, do peso molecular e da conformação e conteúdo de grupos polares e apolares nos aminoácidos. Fatores externos também afetam a solubilidade, forças iônicas, tipo de solvente, pH, temperatura e condições de processamento são alguns destes fatores (TIWARI & SINGH, 2012).

Dependendo da finalidade dos concentrados e isolados proteicos nos produtos alimentícios, os parâmetros de extração e precipitação podem ser ajustados a fim de focar em obter proteínas específicas (FAN & SOSULSKI, 1974). A soja, em contraste com a lentilha, possui mais proteínas solúveis em pH ácido (2-3), essencial para se solubilizar em muitas bebidas e alguns alimentos. Caso esta característica seja exigida para o isolado, um processo de extração em pH ácido poderá trazer melhores resultados.

Fan e Sosulski (1974) atribuíram o comprometimento da pureza proteica entre as leguminosas a diferenças na solubilidade alcalina, perdas durante a recuperação e contaminação por compostos não proteicos (peptídeos, aminoácidos livres e ácidos nucleicos). Entretanto, apesar de tais fatores lesivos, é possível obter isolados com 90% ou mais de pureza proteica em algumas espécies. Lee, Htoon e Paterson (2007) mostraram que para cultivares diferentes de uma mesma espécie de lentilha se comportaram diferentemente em função das condições de processo e resultaram em diferentes rendimentos de extração de proteína, mesmo com composição química muito próxima. O estudo destes autores indica a relevância da variedade da espécie na eficiência de separação da técnica.

O processo de obtenção de isolados proteicos por extração alcalina e precipitação isoelétrica, representado na Figura 9, é composto por etapas e operações unitárias de relativa simplicidade. A técnica inicia a partir de uma dispersão da farinha de leguminosa em água na proporção de 1:5 até 1:20. O pH é elevado entre pH 8 – 11, pois a solubilidade das proteínas de leguminosas é máxima em pH mais alcalino. A mistura permanece por intervalos de 30 a 180 minutos e a temperatura pode ser elevada a até 65 °C para melhorar a solubilização. Compostos não solubilizados na solução alcalina são retirados por filtração e, em seguida, a solução tem o seu pH ajustado ao ponto isoelétrico das proteínas da leguminosa, em geral entre pH 4-5. Após a precipitação isoelétrica das proteínas, o material passará por etapas de purificação que inclui lavagem, neutralização e secagem (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010).

Figura 9 - Diagrama de processo para extração alcalina e precipitação isoeletrica de proteínas de leguminosas.



Fonte: Adaptado de BOYE, ZARE & PLETCH (2010).

4.1.2.1 Fatores que afetam a eficiência da extração alcalina

São muitas as condições de processo e características do material que afetam a eficiência de extração proteica alcalina. Por muitas razões, o rendimento pode ser considerado a característica mais importante da técnica, entretanto, a funcionalidade dos isolados como ingredientes tecnológicos em alimentos também pode se tornar igualmente importante. No entanto, realizar a técnica visando obter determinadas características funcionais adiciona graus de complexidade ao processo.

Em farinhas de fava, estudos com vários tamanhos de partículas no intervalo de distribuição entre 80 µm e 810 µm concluíram que esta diferença de tamanho não afeta significativamente o pH ótimo de solubilização ou o rendimento de recuperação de proteínas (correspondente à solubilidade de nitrogênio). Porém, em tamanhos maiores, ocorre maior permanência de compostos proteicos na fração amilácea. O tamanho ideal seria entre 100 µm e 150 µm (GUEGUEN, 1983). Russin, Arcand & Boye (2007) também estudaram a relação do tamanho das partículas da farinha com o rendimento de extração e encontraram que a redução de tamanho de 223,4 para 89,4 µm não promoveu mudanças na pureza do isolado proteico. Ruiz e Hove (1976), em concordância com os autores citados anteriormente, afirmaram que a remoção das grandes partículas da farinha (>700 µm) maximiza o rendimento e promove resultados mais constantes. O estudo também descreveu o tamanho ideal de partículas bastante próximo ao dos demais autores, entre 250 µm e 149 µm, registrado na Tabela 7.

Tabela 7 – Efeito de tamanho de partícula em solubilidade de nitrogênio de farinha de tremçoço.

Tamanho de partícula (mesh/in²)	Solubilidade de Nitrogênio
16-25	55
25-100	93
60-100	94
85-100	96
100	96

Fonte: RUIZ & HOVE (1976).

Okezie e Bello (1988) compararam o isolado proteico de feijão alado (*Psophocarpus tetragonolobus*) com isolado de soja comercial. Apesar de realizar a comparação apenas do isolado (90%) de feijão alado com o isolado de soja, os autores mostraram que a extração realizada a pH 12 produziu um concentrado com 80% de proteína, diferente do isolado extraído a pH 10 que alcançou 90% de pureza, como pode ser visto na Tabela 8. Lee, Htoon e Paterson (2007) também exemplificaram a discussão acima ao estudar lentilhas e encontraram diferenças de rendimento em função do pH, registrado na Tabela 9. O pH, portanto, possui significativo impacto no rendimento de extração de proteína de leguminosas.

Tabela 8 – Comparação de concentração proteica entre feijão alado e isolado de soja.

Amostra de feijão alado	Porcentagem proteica
Isolado (pH 10: proteínas isoeletricas)	89,80
Isolado (pH 10: proteínas neutras)	91,10
Concentrado (pH 12: proteínas isoeletricas)	79,60
Concentrado (pH 12: proteína neutras)	79,60
Isolado de soja comercial	96,50

Fonte: Adaptado de OKEZIE & BELLO (1988).

Tabela 9 - Efeito da temperatura e pH no rendimento de extração de proteína lentilha.

Temperatura (°C)	pH 8,0	pH 8,5	pH 9,0	pH 9,5
22	54,3	54,3	56,7	59,1
30	56,3	57,6	58,0	59,6
35	57,9	59,3	59,5	60,3
40	60,2	60,4	61,0	62,0

Fonte: Adaptado de LEE, HTOON & PATERSON (2007).

Ruiz e Hove (1976) estudaram diversas condições que podem afetar a extração de proteínas em farinha de tremço. Não foi encontrado aumento significativo de extração de nitrogênio após 30 minutos de operação. Ao usar a proporção de solvente para tremço de 10:1 e 40:1, também não foi encontrada diferença na solubilidade de nitrogênio, indicando que podem ser utilizadas menores quantidades de solvente sem comprometer a extração.

Boye, Zare e Pletch (2010) mencionaram a possibilidade de aumento de solubilidade de proteínas com o aumento da temperatura, fundamentado em resultados de experimentos de outros autores. Entretanto, Ruiz e Hove (1976) não encontraram mudança significativa no intervalo de 20-60 °C, recomendando então a menor temperatura. Lee, Htoon & Paterson (2007), ao estudarem a extração de amido e proteína pela mesma técnica de duas cultivares de lentilha, encontraram um aumento significativo de rendimento (11%) em função da temperatura, registrado na Tabela 9, em discordância com Ruiz e Hove (1976).

O desengorduramento como pré-tratamento para aumento de rendimento de extração nas principais técnicas abordadas neste trabalho desperta interesse de autores do segmento. Apesar de o favorecimento da extração pelo desengorduramento prévio não ser conclusivo pelos estudos não avaliar este fator isoladamente, alguns trabalhos encontraram aumento de rendimento (RUIZ & HOVE, 1976;

SUMMER, NIELSEN & YOUNGS, 1981). O desengorduramento é realizado comumente para aumentar o rendimento de extração de proteínas e é dependente do tipo de solvente utilizado na técnica (LEYVA-LOPEZ et al., 1995). Boye, Zare e Pletch (2010) sugere através do diagrama de processo proposto e representado na Figura 9, que a etapa de desengorduramento pode depender do conteúdo lipídico da leguminosa. Além do aumento de rendimento, o desengorduramento pode ser interessante para o aproveitamento destes compostos financeiramente, maximizando lucro com a venda e a redução de resíduo. Devido às questões levantadas, o desengorduramento e seu impacto em concentrados proteicos de leguminosas ainda precisa ser melhor estudado, a fim de deixar claro porque essa etapa pode ser mais interessante no aumento de rendimento.

Boye, Zare & Pletch (2010) citaram em seu trabalho de revisão as principais condições de processo que afetam o rendimento da extração: temperatura e tempo de processamento, razão de farinha:solvente, condições da solubilidade proteica inicial do material, tipo de equipamento, força de centrifugação, escala piloto vs., extração contínua vs. batelada. Todas as condições mencionadas pelos autores acima estão de acordo com trabalhos citados na discussão deste tópico.

4.1.2.2 Fatores que afetam as propriedades funcionais do isolado proteico

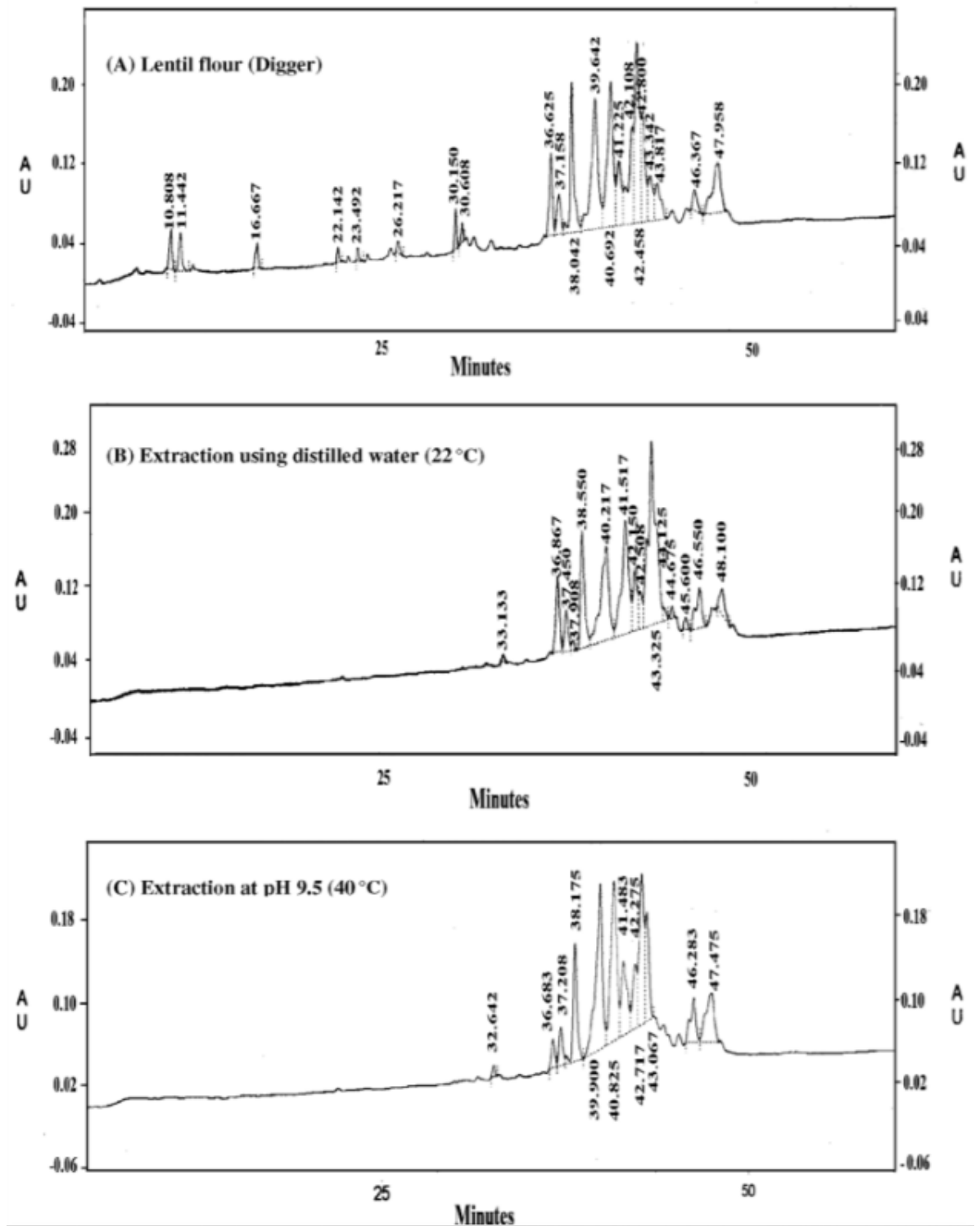
Em um raro estudo de planta piloto para extração de proteína de leguminosas, o trabalho de Summer, Nielsen & Youngs (1981) obteve resultados de rendimento proteico muito próximo da escala laboratorial. Summer, Nielsen & Youngs (1981) e Tian, Kyle & Small (1999) estudaram diferentes técnicas de secagem dos extratos e as consequências nas propriedades e nas características do isolado. Ambos os trabalhos encontraram apenas valores muito próximos entre os métodos de *spray drying* e liofilização na solubilidade de nitrogênio em diferentes pH, indicando que ambos os métodos de secagem podem ser utilizados sem comprometer a solubilidade do isolado, dando liberdade à escolha do mais viável economicamente ou de mais simples operação e controle. Summer, Nielsen & Youngs (1981) foram além dos outros autores e avaliaram outras propriedades do isolado. As diferenças entre *spray drying* e liofilização permanecem bastante pequena também na capacidade de emulsão e absorção de água, entretanto, a formação de espuma, cor, sabor e a absorção de gordura se tornam desiguais entre os métodos de secagem, com destaque para a formação de espuma que foi 188% maior no *spray drying* em relação ao liofilizador. Pelo método de liofilização ambos os trabalhos encontraram que este resulta em um isolado mais escuro.

O desengorduramento promoveu grande impacto nas propriedades funcionais do isolado proteico de tremço ao aumentar a capacidade de absorção de água e óleo (g/g) em 18 e 103% respectivamente, em relação ao tremço integral (SATHE, DESHPANDE & SALUNKHE, 1982).

A variação do pH durante a etapa de extração não afeta somente o rendimento, como mostram Mwasaru e colaboradores (1999) ao avaliarem crescentes valores de pH alcalinos a partir 8,5 na obtenção de isolado de feijão guandu e feijão-de-corda. A mudança na composição química do isolado foi bastante significativa em função do pH de extração para as duas espécies de leguminosas. A proporção de aminoácidos não variou de forma considerável entre os valores de pH, mesmo com variação na composição de macronutrientes. Quanto à hidrofiliabilidade, o comportamento entre as leguminosas foi inverso, aumentando com o aumento do pH para o feijão guandu e diminuindo com o aumento do pH para feijão-de-corda, indicando que a hidrofiliabilidade é fortemente dependente da composição de proteínas de cada espécie. Os valores de luminosidade *Hunter* (L^*) mudaram progressivamente com o aumento do pH. Houve uma significativa relação do escurecimento do isolado com o aumento do pH em ambas as espécies. Para os demais parâmetros de cores *Hunter* (a^* e b^*), os valores foram inconsistentes e não foi possível estabelecer relação com pH.

Lee e colaboradores (2007) concluíram em seu estudo que maiores rendimentos de extração de lentilhas ocorrem em pH mais altos, em detrimento de grandes alterações no perfil proteico quando comparado à composição proteica original da farinha, como visto no cromatograma da Figura 10. O autor afirma que tais alterações podem acarretar consequências nas propriedades funcionais do isolado pois a funcionalidade de proteínas é perdida quando altos valores de temperatura e pH são utilizados para extração.

Figura 10 - Cromatograma de fase reversa de isolado proteico de lentilha.



(A) farinha de lentilha, (B) extração com água destilada a 22C, (C) extrato a pH 9,5 a 40 °C.

Fonte: LEE et al. (2007).

Alterações nas condições de extração promoveram mudanças crescentes ou decrescentes com a variação do pH e temperatura. As propriedades do isolado e as duas variedades seguiram igualmente a

mesma tendência (*Matilda* e *Digger*), mas, em média, a variedade de lentilha verde (*Matilda*) sofreu mudanças mais acentuadas como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Propriedades funcionais de duas variedades de lentilha.

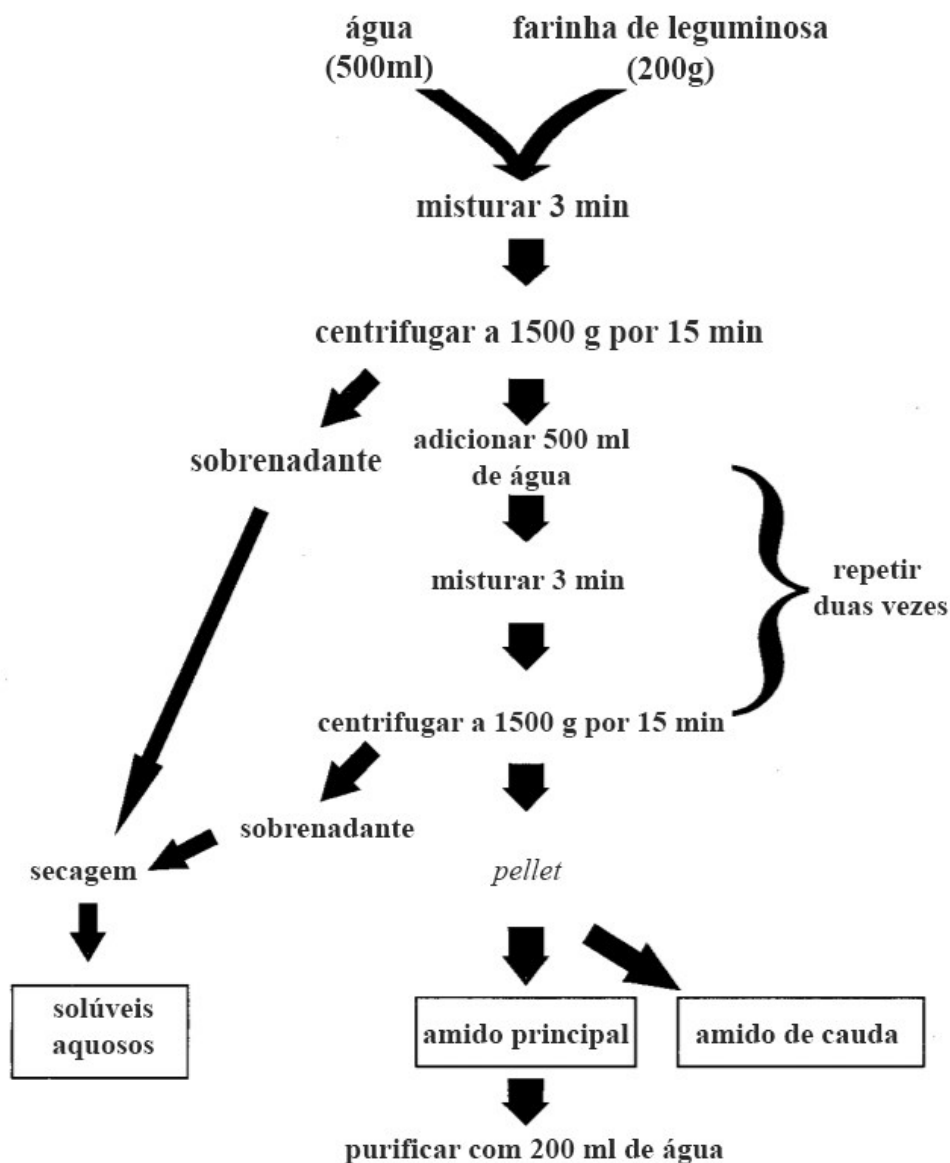
Condição de extração	Atividade de Emulsão (%)	Estabilidade de Emulsão (%)	Capacidade de Retenção de Água (%)	Expansão de Espuma (%)	Estabilidade de Espuma (%)
Lentilha vermelha (<i>Digger</i>)					
Água destilada, 22 °C	46,7	89,9	2,7	43,3	20,9
pH 8,5, 35 °C	45,9	83,2	2,8	31,3	22,8
pH 9,5, 40 °C	41,1	82,0	3,1	24,0	31,8
Lentilha verde (<i>Matilda</i>)					
Água destilada, 22 °C	46,3	89,4	2,1	68,0	13,3
pH 8,5, 35 °C	44,9	82,3	3,3	54,0	28,4
pH 9,5, 40 °C	42,9	79,1	3,8	42,0	62,4

Fonte: LEE et al. (2007).

4.1.3 Extração aquosa

O método consiste na utilização da natureza solúvel da maioria das proteínas, que diferentemente do amido insolúvel, tendem a se concentrarem dissolvidas em uma solução aquosa após a agitação da farinha de leguminosas em água natural ou de pH neutro. O amido tende a permanecer suspenso ou decantado, promovendo a separação de duas frações, uma solúvel e uma insolúvel, que serão em sequência purificadas, geralmente por centrifugação, e secas, a fim de obter produtos concentrados com interesse nas proteínas ou no amido de leguminosas (OTTO, BAIK & CZUCHAJOWSKA, 1997). Na Figura 11 está representado um exemplo de processamento pelo método de extração aquosa.

Figura 11 - Processo de fracionamento por extração aquosa.



Fonte: Adaptado de OTTO, BAIK & CZUCHAJOWSKA (1997).

Obtém-se uma pureza proteica em torno de 50 a 70% a partir do método de extração aquosa, como registrado na . Esta concentração é próxima do método *air classification* apresentado anteriormente neste trabalho. Os estudos encontrados para revisão sobre este método de extração aquosa (COLONNA, GALLANT & MERCIER, 1980; CZUCHAJOWSKA et al., 1994; CAREBJAS & ESTEBAN, 1995; OTTO, BAIK & CZUCHAJOWSKA, 1997; CAI, KLAMCZYNSKA & BAIK, 2001) não têm como foco a obtenção de concentrados proteicos, mas objetivos diversos, diferentemente de grande parte dos estudos encontrados sobre os demais métodos revisados neste trabalho. A fim de manter o mesmo termo da literatura encontrada, entende-se por fração solúvel como fração rica em proteína.

Tabela 11 – Composição de fração solúvel de algumas leguminosas obtida pelo método de extração aquosa.

Leguminosa (Variedade)	Composição em base seca (%)				Referência
	Proteínas	Lipídeos	Cinzas	Rendimento	
Grão-de-bico	41,79	-	6,41	39,3	OTTO, BAIK & CZUCHAJOWSKA (1997) CAI, KLAMCZYNSKA & BAIK (2001) CZUCHAJOWSKA (1994)
	54,1	7,5	6,6	-	
	53,03	-	-	23,09	
Lentilha	67,8	0,3	6,4	-	CAI, KLAMCZYNSKA & BAIK (2001)
Ervilha (<i>Latah</i>)	65,29	-	6,21	42,8	OTTO, BAIK & CZUCHAJOWSKA (1997) CZUCHAJOWSKA (1994)
	70,9	-	5,77	34,4	
Ervilha (<i>SS Alaska</i>)	56,81	-	7,21	37,1	OTTO, BAIK & CZUCHAJOWSKA (1997) CZUCHAJOWSKA (1994)
	63,3	-	6,55	27,2	
Ervilha (<i>Wrinkled</i>)	56,89	-	4,51	48,2	OTTO, BAIK & CZUCHAJOWSKA (1997) CZUCHAJOWSKA (1994)
	50,7	-	5,59	27,4	
Ervilha (<i>Smooth</i>)	67,4	0,2	6,4	-	CAI, KLAMCZYNSKA & BAIK (2001)
Feijão mungu	67,0	0,2	6,6	-	CAI, KLAMCZYNSKA & BAIK (2001)
Fava	69,7	0,2	8,0	-	CAI, KLAMCZYNSKA & BAIK (2001)

Fonte: O autor

Os trabalhos citados podem tender a focar na fração amilácea, talvez por esta ser mais favorecida pelo método em termos de pureza quando comparado à fração solúvel, pois a concentração de proteínas e cinzas pode ser menor que 1% na fração amilácea, desta forma o produto tem uma alta pureza em relação à fração solúvel, a qual pode possuir uma expressiva concentração de cinzas, como pode-se observar na .

Colonna, Gallant e Mercier (1980) afirmaram que a extração de proteínas a partir de leguminosas será viável apenas quando os subprodutos amiláceos obtidos sejam também valorizados, pois o amido é um grande constituinte da maioria das espécies de leguminosas. Czuchajowska e colaboradores (1994) registraram uma patente e destacaram a superioridade de seu método quanto à viabilidade econômica que até o momento não era possível para a produção de isolados de amido, pois os métodos existentes exigiam diversas repetições de algumas etapas como peneiramento, molho e lavagem, tornando-os demorados, trabalhosos e caros. O método patenteado consiste na moagem dos legumes descascados, seguido da separação a seco de partículas para obter um material com tamanho menor que 86 μm e do processamento úmido para obter as frações proteicas e amiláceas com separação por centrifugação. Essencialmente, os diferenciais do método patenteado são suas poucas etapas e o preciso tamanho das partículas (menores que 86 μm). O método foi reproduzido por Otto, Baik e Czuchajowska (1997) e

ilustrado na Figura 11. As características do concentrado de ambos os trabalhos podem ser observadas na .

Os estudos revisados para este método de extração aquosa não mencionaram ou avaliaram parâmetros, como temperatura e pH da mistura aquosa (COLLONA, GALLANT & MERCIER, 1980; CZUCHAJOWSKA et al., 1994; CAREBJAS & ESTEBAN, 1995; OTTO, BAIK & CZUCHAJOWSKA, 1997; CAI, KLAMCZYNSKA & BAIK, 2001). Tais parâmetros demonstraram grande impacto nos demais métodos úmidos avaliados neste trabalho, portanto, avaliá-los poderia aprofundar o conhecimento da técnica extração aquosa.

4.1.4 Ultrafiltração

A tecnologia de membrana atua no processo de separação após a extração alcalina (método discutido na seção 4.1.2) das proteínas, na qual o sobrenadante obtido pela centrifugação é submetido à ultrafiltração para concentrar estes compostos, desta forma, a ultrafiltração atua como tecnologia complementar, em geral, é uma alternativa à precipitação isoelétrica (BOYE, 2010).

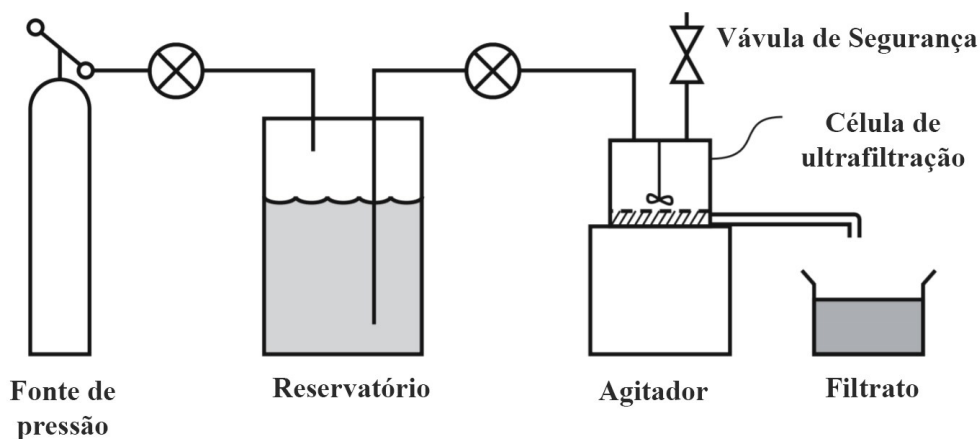
A técnica de extração de proteínas por ultrafiltração (UF) é uma extensão das tecnologias de membranas, as quais protagonizam uma ampla variedade de métodos de separação. O princípio da tecnologia é a exploração da habilidade que as membranas possuem de controlar a taxa de fluxo de espécies químicas pela membrana. O objetivo da aplicação é permitir a permeação de componentes específicos de uma mistura enquanto outros componentes têm o seu fluxo dificultado (BAKER, 2012).

Uma membrana é simplesmente uma interface que modera a permeação de determinadas espécies. Fisicamente a membrana é fina, de composição e estrutura homogênea ou heterogênea, sintética ou biológica. Entretanto, existe uma extensa variedade de membranas com as mais diversas características (BAKER, 2012). Pela ampla dimensão do tópico de tecnologias de membranas, o foco da revisão será apenas nas possibilidades de extração de proteínas de leguminosas por ultrafiltração.

Das tecnologias de membranas, a ultrafiltração é um processo com operações unitárias e fenômenos muito bem conhecidos e estabelecidos e, devido a isso, a tecnologia é bem desenvolvida industrialmente. A ultrafiltração usa uma membrana com poros muito finos (microporos) a fim de separar água e microsolutos de macromoléculas e coloides. O diâmetro médio dos poros é de 1 a 100 nm (10 a 1000 ångström), e portanto, estes poros impedem a passagem de corpos maiores do que eles. A origem do fluxo do processo é uma pressão aplicada na solução alimentada que será forçada a permear pelos poros da membrana. O permeado produzido é composto por partículas de diâmetro médio igual

ou menor que o da membrana (BAKER, 2012). Um exemplo muito simples de processo de ultrafiltração é representado na Figura 12.

Figura 12 - Processo de ultrafiltração em batelada.



Fonte: Adaptado de BAKER (2012).

Atribui-se a processos de filtração por membrana, menor consumo de energia comparado a outras técnicas de concentração como liofilização, tolerância para operar em temperaturas baixas, temperatura ambiente e temperatura alta e maior manutenção de propriedades funcionais por não usar calor ou tratamentos químicos. Entretanto, limitações da técnica podem inviabilizar uma operação. A resistência à filtração originada a partir do aparecimento de diversos fenômenos de difícil controle na membrana como concentração por polarização e *fouling* e o aumento da viscosidade e da concentração de sólidos, prolongam o processo de filtração e exigem constante aumento de pressão (SHALLOR et al., 2001).

O formato de proteínas em geral não é prático ou naturalmente compatível com a teoria matemática que modela o fluxo poroso nas membranas de ultrafiltração, a qual descreve o tamanho de exclusão das espécies em função do diâmetro do poro. Proteínas não possuem geometria esférica exata, forçando a utilização de um diâmetro aproximado da molécula proteica. Entretanto, o cálculo do diâmetro molecular pode ser impreciso quando estas proteínas não são globulares e, por esta razão, o peso molecular (Da) das moléculas proteicas são utilizados como uma aproximação representante de seu diâmetro (BAKER, 2012).

Na Tabela 12, os tamanhos de algumas espécies orgânicas são exemplificados, entre elas, diversas proteínas. Também nota-se pela Tabela 12 que os diâmetros das proteínas estão acima das dezenas de ângström (>100nm) colocando-as no mesmo patamar de diâmetro médio das membranas de ultrafiltração, portanto, proteínas podem permear a membrana e se concentrar na fase filtrada ou ficarem

retidas, concentrando-se na fase do retentado. Geralmente a maior concentração proteica se dá na fase retida, pois o peso molecular da maioria das proteínas de leguminosas está acima de 50 kDa. Devido a isso, membranas de ultrafiltração não conseguem ter seletividade suficiente para filtrar todas as espécies de proteínas (BAKER, 2012). A utilização de membranas com corte de peso molecular de 50 kDa recupera essencialmente todas as proteínas solubilizadas, entretanto, membranas com maiores poros (~100 kDa) podem ser mais adequadas para aplicações alimentícias, pois permitem a permeação de corpos oleosos, melhorando as características sensoriais e aumentando o fluxo do processo (MONDOR et al., 2004). As etapas anteriores à ultrafiltração como a solubilização de proteínas em pH ótimo e a seguinte centrifugação, promovem a remoção da maior parte dos contaminantes de um isolado proteico como amido e fibras, restando à membrana a responsabilidade de alcançar os patamares de alta pureza (FREDRIKSON et al., 2001).

Tabela 12 – Tamanhos de diferentes moléculas.

Espécie	Peso molecular (kDa)	Diâmetro molecular estimado (Å)
Sacarose	0,34	11
Rafinose	0,59	13
Vitamina B12	1,36	17
Bacitracina	1,41	17
Insulina	5,7	27
Citocromo C	13,4	38
Mioglobina	17	40
α -Quimotripsinogênio	25	46
Pepsina	35	50
Ovoalbumina	43	56
Albumina Bovina	67	64
Aldolase	142	82
γ -Globulina	150	84

Fonte: BAKER (2012).

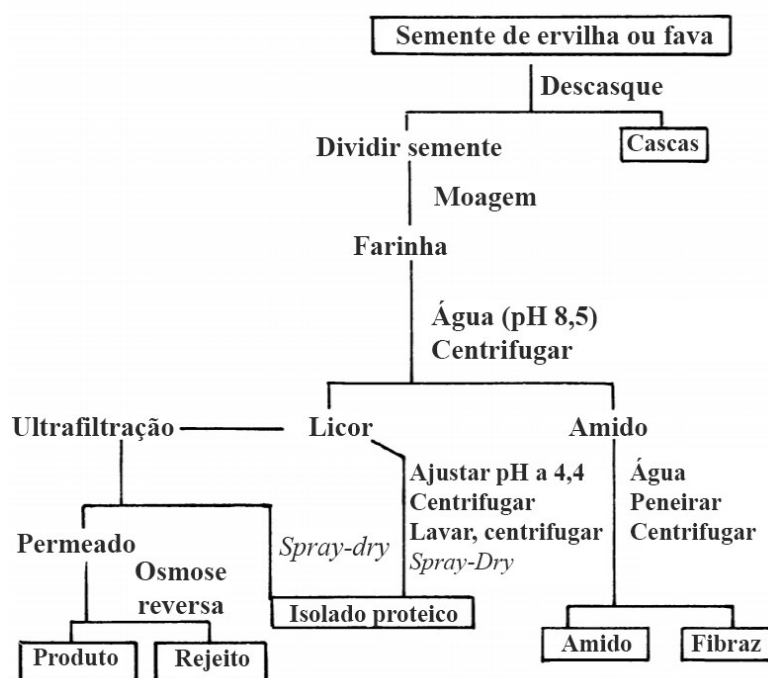
Lawnhon e colaboradores (1977), Lawnhon e colaboradores (1978) e Vose (1980) demonstraram que a tecnologia de membranas, quando devidamente ajustada, possibilita utilizar satisfatoriamente a ultrafiltração como uma alternativa à precipitação isoelétrica (etapa convencional do método de extração alcalina), produzindo isolados com pureza acima de 90%. Segundo Lawnhon e colaboradores (1977), a ultrafiltração para produção de isolados de soja e semente de algodão é superior por reduzir a quantidade

de etapas do processo convencional de extração alcalina, pois a repetição de etapas de centrifugação e de tratamento do subproduto elevam o custo e tempo de processamento.

Apesar das vantagens citadas pelos autores acima e discutidas nesta seção, o único método utilizado comercialmente para a produção de isolado de soja é através da extração alcalina convencional com precipitação isoelétrica (MONDOR et al., 2004). Em contradição ao autor acima, Boye, Zare & Pletch (2010) afirmam em sua revisão, várias décadas após os estudos primordiais iniciados na década de 1970, que a ultrafiltração é viável e se tornou uma alternativa utilizada frequentemente à precipitação isoelétrica.

Vose (1980) produziu isolado proteico de ervilha e de fava com uma combinação de extração alcalina seguida de ultrafiltração utilizando membranas não-celulósicas. Na Figura 13 é mostrado o diagrama de operação do método utilizado, que gera ao fim do fluxo o isolado proteico. Os resultados do autor foram de pureza igualmente elevada ao processo de extração alcalina seguida de precipitação isoelétrica. A ultrafiltração produziu isolado de ervilha com 89,5% de pureza e de fava com 94,1% de pureza. Em comparação, o método de convencional de extração alcalina produziu um isolado com 91% de pureza para ambas as leguminosas. Do total de proteínas que foram alimentadas na corrente para ultrafiltração, 88% destes compostos foram recuperados.

Figura 13 - Diagrama de planta piloto para produção de isolados proteicos e amido purificado a partir de ervilha e fava.

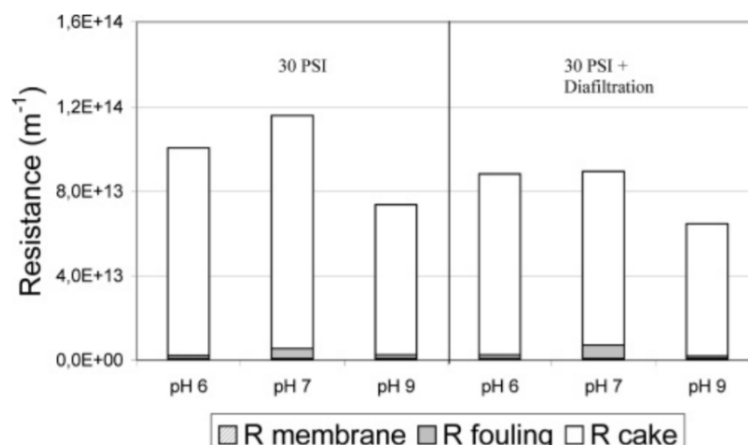


Fonte: Adaptado de VOSE (1980).

A etapa de ultrafiltração pode ser alterada entre os diversos procedimentos como ultrafiltração direta ou diafiltração descontínua para obter diferentes resultados. O primeiro procedimento é o mais comum e simples para ultrafiltrar, forçando diretamente a alimentação na membrana; o segundo consiste na contínua reposição do fluxo alimentado com solvente fresco de volume igual ao que é permeado pela membrana (BAKER, 2012). A diafiltração descontínua é superior pois assume-se que, com a diluição do fluxo alimentado, as interações entre solutos é reduzida e consequentemente retarda a polarização na membrana (fenômeno que reduz o fluxo). Desta forma, os solutos permeáveis são favorecidos, promovendo maior pureza na fração proteica retida (BARANZINI, FARÍAS & HOYOS, 1995).

Mondor e colaboradores (2004) encontraram resultados muito diferentes ao comparar a diafiltração com a simples ultrafiltração direta, ambas de fluxo ortogonal à face (*dead-end*) e a 30 *psi* de pressão. Fenômenos de resistência ao fluxo foram muito menos intensos na diafiltração. O depósito de sólidos nas membranas correspondeu entre 92 a 98% da resistência global final, o que sugere utilizar fluxo tangencial à membrana para minimizar o depósito de sólidos e a consequente redução da resistência. Esta resistência global variou significativamente em função do pH, mas não houve uma clara tendência linear, pois o pH de menor resistência foi a pH 9, resistência intermediária a pH 6 e máxima pH 7. Os efeitos discutidos acima podem ser observados na Figura 14.

Figura 14 - Resistência ao fluxo em função do procedimento e pH de ultrafiltração.



Fonte: MONDOR et al. (2004).

A composição do concentrado proteico de Mondor e colaboradores (2004) também foi alterada em função do procedimento utilizado. A diafiltração mostrou-se novamente superior à ultrafiltração direta ao alcançar a pureza de 87,6%. A ultrafiltração direta produziu um conteúdo proteico de 76,8%, 22% menor em relação à diafiltração. Naturalmente, a diafiltração possibilitou remover grande parte dos contaminantes, com 93,2% de carboidratos removidos, 46% a mais do que a ultrafiltração direta, e 55,1% de remoção de cinzas, 34% a mais do que ultrafiltração direta.

Baranzini, Farías e Hoyos (1995) concentraram as proteínas de farinha de grão-de-bico em 2,8 vezes, de 23,4% para 65% com um sistema de diafiltração descontínua. Em contraste, Vose (1980) produziu um concentrado de fava com pureza bem mais expressiva, à 94%. Entretanto, nas seções de métodos anteriores, concentrados de grão-de-bico por *air classification* e extração aquosa respectivamente, mostraram produtos de menor pureza proteica entre as leguminosas, portanto, uma relativa baixa pureza de Baranzini, Farías e Hoyos (1995) para concentrado de grão-de-bico, poderia ser esperada. A recuperação do nitrogênio total da farinha foi de 72,8%. As propriedades funcionais de absorção de água, de gordura, aumento de volume e capacidade de espuma foram muito próximas entre o concentrado de grão-de-bico e isolado de soja comercial. Com exceção da absorção de gordura, as variações entre as propriedades não foram maiores que 20%.

Com o objetivo de obter um isolado de ervilha para uso em formulações infantis, Fredrikson e colaboradores (2001) adicionaram uma etapa de incubação enzimática com fitase a fim de reduzir a presença de fitato no isolado, que é conhecido por ser inibidor da absorção de ferro e zinco. A ultrafiltração também foi empregada para reduzir os níveis de oligossacarídeos pois ela possibilita a permeação destes compostos responsáveis por flatulências, ao passo que as proteínas ficam retidas. Após

a ultrafiltração, o retentado foi incubado por até 2 horas para a atuação enzimática e foi seco em *spray dryer*. Foi utilizado neste estudo membranas com peso de corte de 50 kDa em um processo industrial (40 toneladas de sementes) e 100 kDa em um processo piloto (50 kg de sementes), com a pureza final do isolado de 92 e 89% respectivamente, concentrando em até 3,5 vezes as proteínas da farinha inicial. Foi possível remover 85% de oligossacarídeos pela membrana e a adição de fitase removeu completamente os fitatos no isolado, isso demonstra a possibilidade de associar técnicas para reduzir compostos antinutricionais em isolados. A remoção de compostos indesejados tem grande poder de valorizar o produto obtido como discutido na seção 2.2.2, especialmente em produtos específicos como na utilização de fórmulas infantis.

Leguminosas oleaginosas podem ter a pureza de seus produtos proteicos comprometida devido ao seu alto conteúdo lipídico como mostra Kim e Kim (2014). O estudo dos autores resultou em um concentrado proteico com 80% de pureza a partir de soja desengordurada. A soja integral gerou um concentrado proteico de 68,6%. O desengorduramento da leguminosa aumentou a pureza em 16%. Ao contrário do esperado teoricamente, a ultrafiltração não conseguiu separar os carboidratos do retentado na membrana de 100 kDa. A remoção destes compostos contaminantes foi de apenas 3,0% e 5,1% para o concentrado de soja desengordurada e para a soja integral respectivamente. Estes concentrados produzidos por ultrafiltração e outros dois igualmente desengordurados e integrais produzidos por precipitação isoeletrica, não apresentaram diferenças significantes em suas colorações e a avaliação estatística não encontrou diferença entre os quatro métodos para esta característica.

4.1.5 Extração salina

A presença de sais em um meio aquoso promove o surgimento de forças iônicas originadas da dissociação do sal e da interação dos íons gerados com as moléculas do meio. As forças de interação destes íons com as cargas superficiais de moléculas proteicas, aumenta a solubilidade destes compostos pela redução da interação proteína-proteína, pelo aumento da repulsão eletrostática e pela hidratação por pontes de hidrogênio. Este fenômeno é conhecido como “*salting-in*” (GRANDE, 2016).

Esta dinâmica de forças iônicas entre moléculas é alterada de acordo com a concentração e o tipo de sais no meio. A solubilização proteica ocorre apenas em concentrações de sais não maiores que $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; após esta faixa, os íons passam a interagir mais fortemente com a água, promovendo a desidratação das proteínas e a interação proteína-proteína volta a ser relevante o suficiente para reduzir as suas solubilidades. Este fenômeno é conhecido como “*salting-out*” (GRANDE, 2016).

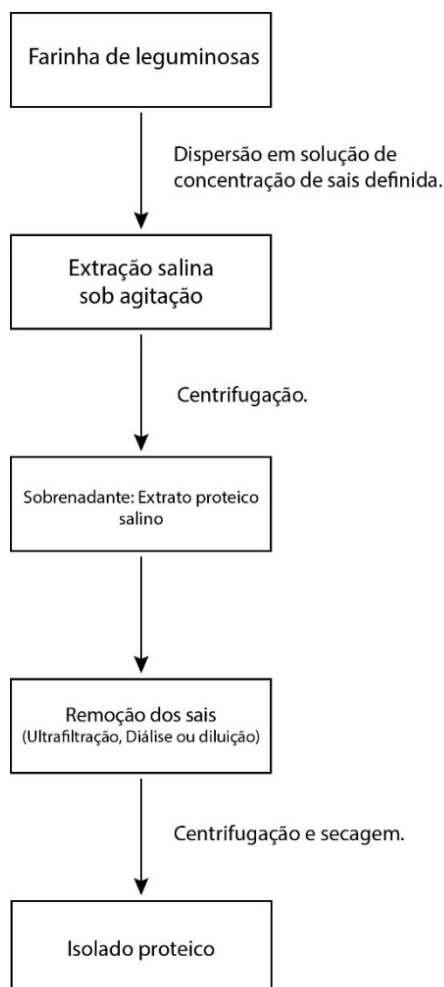
A associação dos fenômenos *salting-in* e *salting-out* em etapas distintas de um procedimento possibilita a extração proteica de uma dispersão aquosa, concentrando estes compostos para serem

purificados a fim de produzir isolados proteicos. A técnica é conhecida como extração salina ou *micellization* (AMBRIZ et al., 2005).

Estudos da literatura não estabeleceram ou convencionaram uma técnica de extração salina seguindo as mesmas etapas ou parâmetros (LÓPEZ & FALOMIR, 1986; LÓPEZ, FALOMIR & VÁZQUEZ, 1991; SZCZAPA, 1996; KHALID & ELHARDALLOU, 2016; HADNADEV et al., 2017). Alguns processos podem ter uma maior complexidade e execução significativamente mais trabalhosa como o incremento de mais de uma etapa de centrifugação ou secagem. Alguns autores combinam o uso de sais com o aumento de pH, como na extração alcalina, com o objetivo de elevar o rendimento de extração (HADNADEV et al., 2017).

O procedimento de extração salina consiste essencialmente na dispersão da farinha de leguminosa em uma solução salina aquosa e agitada entre 30 minutos e 2 horas. O extrato obtido é centrifugado a fim de remover impurezas insolúveis e o sobrenadante proteico é dissociado dos íons salinos por diluição em água gelada deionizada, ultrafiltração ou diálise. A proteína é recuperada por centrifugação e finalmente seca (HADNADEV et al., 2017). O procedimento geral da técnica é demonstrado Figura 15.

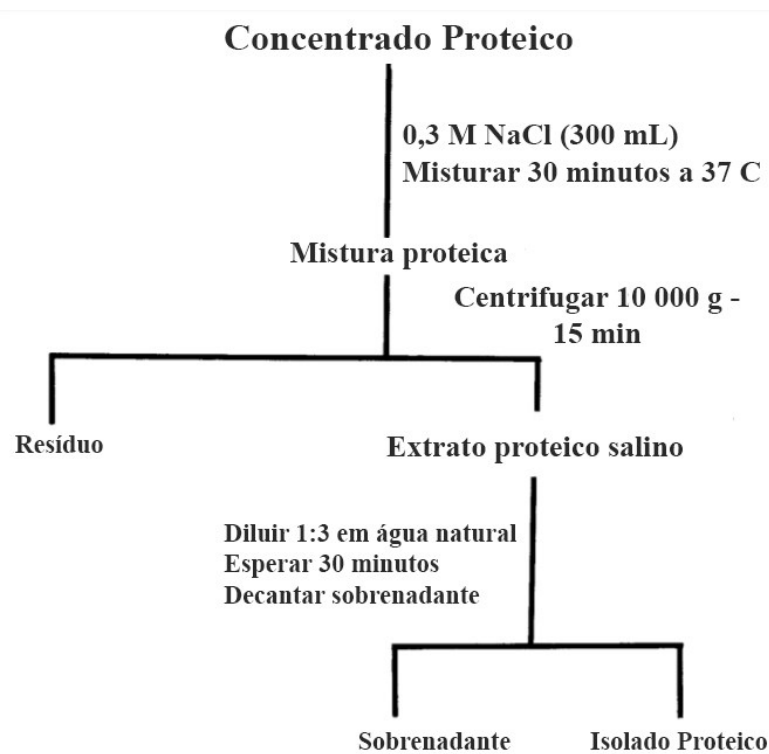
Figura 15 - Esquema da técnica de extração salina.



Fonte: Adaptado de HADNADEV et al. (2017).

A técnica de extração salina pode produzir isolados proteicos de elevada pureza. Arntfield, Ismond e Murray (1985) reportaram a produção de um isolado de fava com 93,8% de concentração proteica. O processo de extração salina se iniciou a partir de um concentrado de 63% de pureza, no produto final o rendimento de recuperação proteica foi de 42,5%. Os autores caracterizam o rendimento de recuperação proteica como razoável, mas afirmam ser possível uma recuperação de 60 a 80% utilizando escala piloto e não uma escala de bancada como a empregada no procedimento. Dentre as razões para a baixa recuperação estariam as perdas durante a manipulação devido à baixa quantidade de material utilizado no processo. O rendimento global também pode ter sido comprometido na etapa de solubilização inicial, que recuperou apenas 63,3% das proteínas. Um esquema do procedimento realizado pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 - Procedimento de produção de isolado proteico pela técnica de extração salina.



Fonte: Adaptado de Arntfield, Ismond & Murray (1985).

Arntfield, Ismond e Murray (1985) também reportaram a baixa concentração de compostos antinutricionais no isolado, a níveis apenas residuais. Parte desta drástica redução pode ser associada à exclusão de compostos não-proteicos, como os fatores antinutricionais, ao associar as diferentes etapas da técnica de extração salina que submete apenas as proteínas aos fenômenos de solubilidade e, de forma geral, acaba por excluir os demais compostos.

Alguns trabalhos obtiveram rendimento de extração entre 76 e 95% como visto na

Tabela 13.

Tabela 13 – Composição de isolados proteicos obtidos pela técnica de extração salina.

Leguminosa	Composição (%)					Referência
	Proteínas	Carboidratos	Cinzas	Lipídeos	Fibras Totais	
Tremoço	78,6	-	-	1,01	-	SZCZAPA (1996)
	95,7	1,6	1,7	-	1,0	AMBRIZ et al. (2005)
Grão-de-bico	87,8	-	2,3	1,8	0,2	LÓPEZ, FALOMIR & VÁZQUEZ (1991)
Feijão-de-corda	76,0	13,1	2,3	traços	traços	KHALID & ELHARDALLOU (2016)
Soja	93,8	1,9	3,8	-	0,5	AMBRIZ et al. (2005)
Fava	93,8	-	-	-	-	ARNTFIELD, ISMOND & MURRAY (1985)

Fonte: O autor.

Na literatura pesquisada os autores empregaram soluções salinas de NaCl de concentração entre 0,1 e 0,5 M para promover a solubilização das proteínas na etapa inicial do processo (LÓPEZ & FALOMIR, 1986; LÓPEZ, FALOMIR & VÁZQUEZ, 1991; SZCZAPA, 1996; KHALID & ELHARDALLOU, 2016; HADNADEV et al., 2017). Estas concentrações estão sob o parâmetro de 1 M que Grande (2016) afirma ser o limite superior para possibilitar a solubilização proteica.

Grande (2016) avaliou alguns parâmetros durante a solubilização inicial de proteínas de amendoim e verificou qual possuía maior efeito no rendimento de extração. O autor encontrou do maior para o menor efeito no rendimento: razão de sólido:solução, concentração de sal, pH e temperatura. Para maximizar a extração, estes parâmetros devem ser utilizados na combinação adequada. Na medida em que a concentração de sal e temperatura aumenta, o rendimento de extração diminui, com a temperatura tendo menor influência. O rendimento de extração é maximizado com o aumento do pH e a razão sólido:solução, com a temperatura tendo menor influência. Devido ao exposto, Grande (2016) concluiu que para a extração química de proteínas, os maiores rendimentos de extração são obtidos em meio alcalino e na ausência de sal.

Pela análise de Grande (2016), a temperatura deverá ser fixada em 25°C e não deve haver a presença de sal, portanto o autor só avalia como relevante para maximizar o rendimento de extração a variação nas faixas de pH e razão sólido:solução. O autor citou outros trabalhos na literatura que encontraram os mesmos resultados. A partir destas conclusões, o autor passa a realizar essencialmente a técnica de extração alcalina para avaliar a extração de proteínas de amendoim. Entretanto, nota-se na

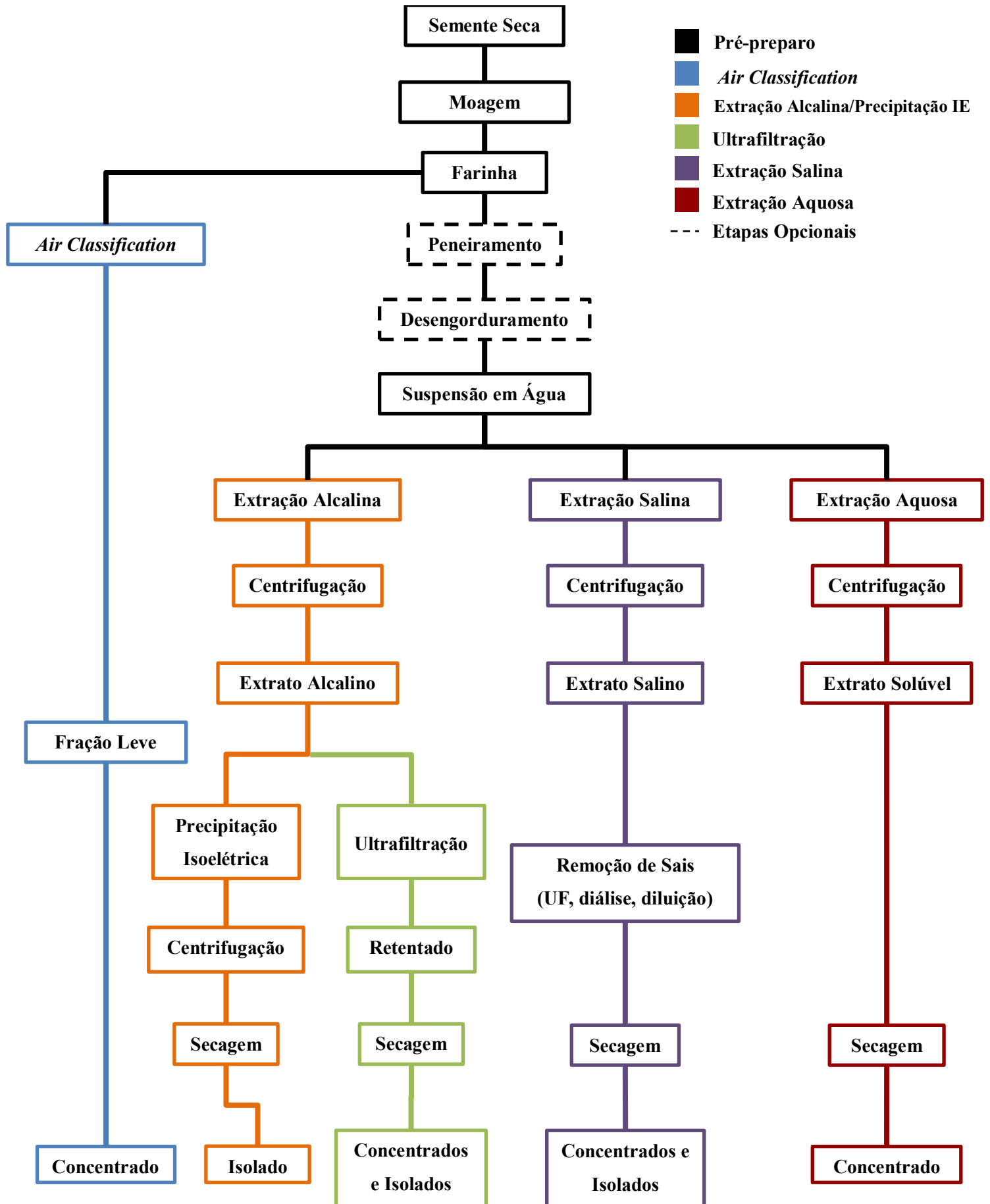
Tabela 13 que alguns autores empregaram a utilização de pequenas concentrações salinas e alcançaram altos padrões de pureza; portanto a técnica é eficiente mesmo quando o pH de extração é mantido neutro.

As afirmações de Grande (2016) demonstram a superioridade da extração alcalina sobre a extração salina em relação ao rendimento de extração proteica; entretanto, não implica superioridade de um isolado produzido sobre outro, uma vez que o produto pode ter aplicações distintas que não serão implicadas significativamente por pureza proteica. Mas, o maior rendimento realizado por uma extração exclusivamente alcalina tem sua clara vantagem econômica ao aproveitar melhor a matéria.

4.1.6 Similaridades entre os métodos estabelecidos

As técnicas majoritariamente difundidas comercialmente e mais discutidas na literatura para a extração de proteínas de leguminosas foram discutidas nas seções anteriores deste trabalho (BOYE, ZARE & PLETCH, 2010). Tais técnicas possuem etapas em comum, diferenciando os procedimentos majoritariamente na etapa de extração de proteínas e na subsequente concentração do extrato proteico. Algumas etapas de pré-preparo podem ser realizadas a fim de melhorar características ou pureza do produto final, como é o caso do peneiramento e do desgorduramento, que são aqui consideradas opcionais porque não são aplicadas em todos os trabalhos encontrados, apesar de estudos demonstrarem impactos benéficos. Na Figura 17 o fluxograma busca representar simultaneamente as etapas dos principais métodos de extração, a fim facilitar o entendimento sobre os procedimentos das técnicas.

Figure 17 – Métodos estabelecidos para extração de proteínas de leguminosas.



Fonte: O autor.

4.1.7 Métodos emergentes para a obtenção de proteínas

Os objetivos dos estudos de tecnologias emergentes para concentrados proteicos é aumentar o rendimento de extração, aumentar suas propriedades nutricionais e aumentar suas aplicações tecnológicas, como por exemplo em formulações alimentícias ou até mesmo cosméticas, especialmente para que consigam alcançar a inserção industrial. A escolha de qual processo de extração empregar não é dependente apenas das características citadas acima, que apesar de suas grandes influências na escolha, perdem a sua relevância caso o propósito final do produto não seja atingido, os recursos sejam indisponíveis ou a técnica não seja dominada. Além destas características quantitativas, algumas tecnologias emergentes podem ser consideradas seguras, eficientes, acessíveis e ecologicamente corretas. Este conjunto de características possibilita distingui-las como “tecnologias limpas” (POJIĆ, MIŠAN & TIWARI, 2018).

A maioria das técnicas emergentes para obtenção de proteínas ainda não conseguem ser aplicadas comercialmente, pois ainda são muito imaturas. Entre os maiores desafios destas propostas emergentes estão a escalabilidade e o alto consumo energético (POJIĆ, MIŠAN & TIWARI, 2018).

4.1.7.1 *Extração de proteínas assistida por enzimas*

A especificidade de enzimas para atuar em compostos específicos pode ser explorada para maximizar a extração de proteínas. Estes catalisadores de alta especificidade atuam para romper a parede celular através da degradação de seus constituintes como celulosas, hemicelulosas e pectinas. A ação enzimática rompe as células e provoca a liberação dos compostos em seu interior. Após esta exposição, o rendimento de extração é promovido, pois as proteínas estarão mais acessíveis (PEIXOTO, 2017). Além da acessibilidade ao composto alvo da extração, o rendimento também pode ser promovido ao utilizar proteases que hidrolisam parte das proteínas para aumentar a sua solubilidade (POJIĆ, MIŠAN & TIWARI, 2018).

Técnicas de extração assistidas por enzimas promovem o rendimento de extração proteica de material vegetal, assim como podem ser proveitosas para separar simultaneamente compostos indesejados no produto final, como lipídeos e compostos antinutricionais (FREDRIKSON, et al., 2001; NIU, et al., 2012; POJIĆ, MIŠAN & TIWARI, 2018). Rommi e colaboradores (2014) reportaram um aumento de 70% no rendimento de extração proteica de semente de colza (*Brassica napus*) quando comparado a procedimentos sem assistência enzimática.

Comparado ao método convencional de extração alcalina, a extração assistida por enzimas é considerada uma técnica com impacto ambiental reduzido. Os produtos obtidos também possuem superior qualidade ao preservar as características além de serem mais adequados para o consumo humano (POJIĆ, MIŠAN & TIWARI, 2018).

Utilizar enzimas a fim de obter concentrados proteicos insere diversas consequências que não apenas variações de rendimento. Enzimas aumentam a complexidade da técnica ao tornar necessário maior controle do processo como temperatura e dinâmica da quantidade de enzimas-sólidos-solvente. Ao comparar as técnicas unicamente enzimáticas, enzimas-solvente ou apenas solvente, a complexidade adicional do uso de catalisadores produz concentrados com diferentes composições em um mesmo valor de pureza proteica, ou seja, processos assistidos por enzimas resultam também em mudanças nas propriedades funcionais e no valor nutricional do produto final (POJIĆ, MIŠAN & TIWARI, 2018). O rompimento de paredes celulares e a degradação de compostos não-proteicos por enzimas pode também comprometer a composição do produto final ao inserir compostos indesejados que estavam em locais inacessíveis, permitindo a difusão destes no meio (PEIXOTO, 2017).

Em geral, processos assistidos por enzimas são associados a algumas características negativas como extenso tempo de processamento, alto custo operacional, alto consumo energético e a constante preocupação de parâmetros de processo como pH e temperatura (POJIĆ, MIŠAN & TIWARI, 2018).

4.1.7.2 Separação eletrostática de proteínas

Para alcançar padrões de pureza acima de 90%, é necessário empregar técnicas que utilizam solventes e realizar extrações úmidas. Entretanto, a utilização tecnológica de frações ricas em proteínas requer muitas vezes concentrações apenas moderadas destes componentes; portanto, métodos secos, apesar de não alcançarem altos níveis de pureza, são atrativos para a aplicação tecnológica em formulações de alimentos. A técnica *air classification* discutida neste trabalho é a mais utilizada para fracionar leguminosas por via seca (TABTABEI et al., 2016).

A literatura apresenta a separação eletrostática como alternativa para fracionamento a seco. O princípio da separação eletrostática é carregar as partículas negativamente ou positivamente, permitindo a separação destas partículas de acordo com suas diferentes características elétricas sob um campo elétrico externo. Os princípios da técnica de separação eletrostática já são bem aplicados em separação de plásticos e na indústria de mineração (TABTABEI et al., 2016; POJIĆ, MIŠAN & TIWARI, 2018).

Para carregar as partículas existem algumas técnicas comerciais disponíveis: indução condutiva, bombardeamento corona e tribo-eletrificação. Indução condutiva carrega partículas baseado em suas

polaridades e condutividades elétricas. Bombardeamento corona baseia-se no bombardeamento de íons gerados a partir da passagem de um gás ionizado entre dois eletrodos de alta voltagem que pode promover o carregamento de partículas que atravessam o campo corona. O princípio da separação tribo-elétrica é a exploração do efeito tribo-elétrico que promove a eletrificação por contato ou fricção com materiais diferentes. Após o carregamento das partículas, um campo elétrico irá separar estes materiais (TABTABELI et al., 2016).

O princípio de separação eletrostática já foi aplicado com sucesso em cereais e leguminosas. Utilizando o bombardeamento corona foi possível limpar e promover a qualidade de sementes de colza (TABTABELI et al., 2016). Indução condutiva foi aplicada com sucesso na separação de cascas e glúten de farinha de trigo (TABTABELI et al., 2016). A separação tribo-elétrica foi superior em 15% de pureza proteica quando comparado ao método *air classification* (POJIĆ, MIŠAN & TIWARI, 2018).

Barakat, Jérôme e Rouau (2015) concluíram que a separação eletrostática por separação tribo-elétrica é vantajosa para extrair e separar proteínas de compostos lignocelulósicos e fenólicos em condições secas. A concentração proteica aumentou de 30,8% no resíduo da extração de óleo de semente de girassol para 49% com a técnica. A fração mais rica em proteínas originou-se das partículas positivamente carregadas. As partículas negativamente carregadas resultaram em um material com 5% de concentração proteica. A composição também variou para os demais constituintes, de acordo com a carga das partículas como pode ser observado na Tabela 14.

Tabela 14 – Composição de frações positivas e negativas de biomassa de semente de girassol obtidas por separação eletrostática.

	Composição		
	Inicial	Partículas Negativas	Partículas Positivas
Tamanho médio [μm]	69,5	77,2	24,2
Rendimento [% peso/peso]	-	41,4	58,6
Hemiceluloses [%]	13,6	17,2	7,8
Celulose [%]	17,6	27,3	7,7
Lignina [%]	21,2	49,4	7,5
Proteínas [%]	30,8	5,1	48,9
Glicose [%]	17,5	24,3	7,7
Xilose [%]	9,5	12,4	4,4
Arabinose [%]	1,32	1,29	1,06
Galactose [%]	0,11	0,02	0,35

Fonte: Barakat, Jérôme & Rouau (2015).

4.1.7.3 Extração de proteínas assistidas por técnicas de ruptura celular

Devido à localização das proteínas no interior das células vegetais, a extração é maximizada quando estas barreiras físicas são rompidas para permitir fácil acesso a estes compostos. Tradicionalmente, a ruptura celular pode ser atingida por meios mecânicos, químicos ou térmicos. Algumas técnicas podem utilizar abordagens diferentes com potencial para promover o rendimento de extração, redução de custos e de impacto ambiental (POJÍČ, MIŠAN & TIWARI, 2018).

Técnicas empregadas em outros materiais alimentícios, diferentes de leguminosas, e em outras indústrias, como a farmacêutica, podem ter potencial de aplicação para produzir melhores produtos proteicos (KADAM, TIWARI & O'DONNELL, 2013). Extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom, extração com fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado e energia elétrica pulsada são técnicas promissoras para promover a ruptura celular de materiais vegetais, ao mesmo tempo que evita interações com componentes sensíveis (POJÍČ, MIŠAN & TIWARI, 2018).

Em extração assistida por micro-ondas, a energia de radiação induzida por ondas eletromagnéticas entre frequências de 300 MHz a 300 GHz promovem o rendimento de extração ao facilitar a penetração do solvente na matriz. Diferentes implicações favorecem a extração proteica com a ação da energia de radiação, que rompe ligações de hidrogênio, permite a migração de íons dissolvidos e aumenta a porosidade do material (POJÍČ, MIŠAN & TIWARI, 2018). Ochoa e colaboradores (2016) obtiveram um aumento de rendimento de extração proteica de farinha de amendoim desengordurada conforme empregava maiores potências de micro-ondas. Ao utilizar 725 W e 8 minutos de aplicação de micro-ondas, o rendimento de extração proteico foi máximo e alcançou 55%. Este resultado assistido por micro-ondas foi 77% maior do que somente com extração alcalina. Segundo o autor, este aumento é relacionado ao aumento de temperatura da solução provocado pelas micro-ondas e este aumento de temperatura pode favorecer a extração devido a desnaturação de proteínas.

Energia elétrica pulsada empregada como tecnologia para ruptura celular utiliza pulsos elétricos de curta duração e alta amplitude para danificar estas estruturas. Existem tipos diferentes de energia elétrica pulsada capazes de auxiliar na extração proteica, campos elétricos pulsados, aquecimento ôhmico pulsado e descargas elétricas de alta voltagem se destacam como atrativas para serem utilizadas na indústria alimentícia. A energia elétrica pulsada é capaz de aumentar o rendimento de extração de nutrientes dos alimentos como proteínas, amidos, açúcar e compostos de alto valor econômico (VOROBIEV & LEOVKA, 2016). Campos elétricos fortes (20 kV/cm) foram capazes de aumentar o rendimento de extração proteica em até 80% a partir de folhas de colza (POJÍČ, MIŠAN & TIWARI, 2018).

A extração assistida por ultrassom explora o fenômeno de cavitação produzido por ondas sonoras de 20 kHz. A cavitação gera pontos de baixa pressão no solvente (geralmente água) gerando uma bolha gasosa que, ao se colapsar, libera uma energia capaz de criar fissuras na matriz vegetal. As fissuras produzidas facilitam a penetração do solvente e promovem a extração de proteínas (OCHOA et al., 2016). Esta tecnologia de assistência também é atrativa, pois tem vantagens como a mistura dos conteúdos, transferência de energia mais rápida, extração mais seletiva, gradiente térmico e temperaturas menores, reduzido tamanho de equipamentos, respostas mais rápidas a controle, *start up* mais rápido e maior produção. Aplicações intensas de ultrassom podem desnaturar e alterar a estrutura de proteínas resultando na perda de propriedades funcionais, assim como influenciar na modificação de demais compostos no material (POJIĆ, MIŠAN & TIWARI, 2018). Zhu e colaboradores (2019) empregaram a tecnologia de ultrassom para assistir na extração de proteínas de gérmen de trigo e aumentou a extração proteica de 37% para 57%. Nesta etapa de pré-extração, o autor aplicou ondas de 20 kHz com 363 W por 24 minutos para alcançar este aumento.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos métodos de extração de proteínas de leguminosas foram encontrados. Os princípios, processos e possibilidades dos métodos foram discutidos neste trabalho.

Na literatura encontrada, alguns métodos são mais ricos em estudos, como *air classification* e extração alcalina, outros métodos não apresentam a mesma quantidade de trabalhos. Alguns métodos podem ser pouco explorados devido aos estudos iniciais não apresentarem resultados ou oportunidades promissoras, como é o caso da extração salina. Outros métodos pouco dominados possuem grande espaço para serem expandidos conforme novos trabalhos são publicados.

O grande crescimento no consumo de produtos vegetarianos ou veganos promovendo a substituição de proteína animal, pode inserir um elemento inédito de motivação no desenvolvimento destes métodos, uma vez que as aplicações mercadológicas de produtos proteicos de leguminosas eram até recentemente limitadas. Novos métodos de extração podem surgir a partir da inspiração em técnicas aplicadas em outros alimentos ou em outras indústrias, como a separação eletrostática aplicada na indústria mineradora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, Y.; ESTEBAN, R. M.; BENÍTEZ, V.; MOLLÁ, E.; MARTÍN-CABREJAS, M. A. **Starch, Functional Properties, and Microstructural Characteristics in Chickpea and Lentil As Affected by Thermal Processing.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, e. 57, p. 10682 - 10688, 2009.

ARNTFIELD, S. D.; ISMOND, M. A. H.; MURRAY, E. D. **The fate of antinutritional factors during the preparation of fababean protein isolate using a micellization technique.** Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, v. 18, n. 2, p. 137 - 143, 1985.

ASSATORY, A; VITELLI, M.; RAJABZADEH, A. R.; LEGGE, L. **Dry fractionation methods for plant protein, starch and fiber enrichment: A review.** Trends in Food Science & Technology, e. 86, p. 340 – 355, 2019.

BAKER, Richard W. **Membrane Technology and Applications.** 3. ed., John Wiley and Sons Ltd, Reino Unido, 2012.

BARANZINI-ROMERO, Ana Lourdes; FARÍAS-YÁÑEZ, Greda Acela; HOYOS-BARRÓN, Jesus Manuel. **A high protein product from chickpeas (*cicer arietinum* L.) by ultrafiltration. Preparation and functional properties.** Journal of Food Processing and Preservation, e. 19, p. 319 - 329, 1995.

BARAKAT, Abdellatif; JÉRÔME, François; ROUAU, Xavier. **A Dry Platform for Separation of Proteins from Biomass Containing Polysaccharides, Lignin, and Polyphenols.** ChemSusChem, e. 8, n. 7, 2015.

BENEVIDES, Clícia Maria de Jesus; SOUZA, Mariana Vasconcelos; SOUZA, Raquel Dias Barros; LOPES, Mariângela Vieira. **Fatores antinutricionais em alimentos: revisão.** Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, v. 18, n.2, p. 67 - 79, 2011.

BIASZCZAK, W.; DOBLADO, R.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; SADOWASKA, J.; FORNAL, J. **Microstructural and biochemical changes in raw and germinated cowpea seeds upon high-pressure treatment.** Food Research International, e. 40, p. 415 – 423, 2007.

BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. **Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed.** Food Research International, v. 43, p. 414 - 431, 2010.

BOER, Joopde. **On the merits of plant-based proteins for global food security: Marrying macro and micro perspectives.** Ecological Economics, v. 70, p. 1259 - 1265, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**. Brasília, DF, 2008. 210 p.

BRAVO, L.; SIDDHURAJU, P.; SAURA-CALIXTO, F. **Composition of underexploited Indian pulses. Comparison with common legumes**. Food Chemistry, v. 63, p 185-192, 1999.

CAI, R.; KLAMCZYNSKA, B.; BAIK, B. K. **Preparation of Bean Curds from Protein Fractions of Six Legumes**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, p. 3068-3073, 2001.

CLOUTT, P.; WALKER, A. F.; PIKE, D. J. **Air classification of flours of three legume species: Effect of starch granule size distribution**. Journal of the Science of Food and Agriculture, e. 37, n.2, p. 173 – 184, 1986.

COLONNA, P.; GALLANT D.; MERCIER, C. **Pisum sativum and vicia faba carbohydrates: studies of fractions obtained after dry and wet protein extraction processes**. Journal of the Science of Food Science, v. 45, p. 1629 - 1636, 1980.

CZUCHAJOWSKA et al. **Process for fractionating legumes to obtain pure starch and a protein concentrate**. United States Patent 5,364,471, 15 de novembro de 1994.

DIJKINK, B. H.; SPERANZA, L.; PALTSIDIS, D.; VEREIJKEN, J.M. **Air dispersion of starch–protein mixtures: A predictive tool for air classification performance**. Powder Technology, e. 172, p. 113 – 119, 2007.

ERMETICE, G.; Monici, K.; Pissini, S.; Oliveira, A. **Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes**, Food Chemistry, Campinas, v. 94, e. 3, p. 327 - 330, 2006.

FAN, T. Y.; SOSULSKI, F. W. **Dispersibility and Isolation of Proteins from Legume Flours**. Canadian Institute of Food Science and Technology. Journal, e. 7, n. 4, 1974.

FAO. 4. **Pulses and derived products, In Definition and classification of commodities**. Roma, 1994

FROTA, K.; SOARES, R; ARÊAS, J. **Composição química do feijão caupi (Vigna unguiculata L. Walp), cultivar BRS-Milênio**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 28, n. 2, p. 470 - 476, junho. 2008.

GONÇALVES, Leidiane Cardoso. **Avaliação química e tecnológica de grãos de soja para elaboração e caracterização de tofus**. 62 f. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

GRANDE, Salvador Carlos. **Estudo da extração das proteínas dos farelos de oleaginosas através de métodos químico e enzimático.** Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, outubro de 2016.

GUEGUEN, J. **Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics.** Qual Plant Plant Foods Hum Nutr, e. 32, p. 267 - 303, 1983.

HADNADEV, Miroslav S.; HADNADEV, Tamara R. Dapčević; POJIC, Milica M. **Progress in vegetable proteins isolation techniques: a review.** Food and Feed Research, e. 44, n. 1, p. 11 - 21, 2017.

JOSEPH, Enamuthu; CRITES, Shelly G.; SWASON, G. Barry. **Microstructure of Black, Green and Red Gram.** Food Structure, Chicago, vol. 12, p. 155 - 162, 1993.

JOSHI, P.K.; RAO, P. Parthasarathy. **Global pulses scenario: status and outlook.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1392, 2016.

KADAM, S. U.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P. **Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, e. 61, n. 20, p. 4667-4675, 2013.

KIM, Hyun Jung; KIM, Byong Ki. **Comparison of Soy Protein Concentrates Produced Using Membrane Ultrafiltration and Acid Precipitation.** Food Science and Biotechnology, e. 24, n. 1, p. 67-73, 2015.

LAWHON, J. T.; HENSLEY, D. W.; MULSOW, D.; MATTIL K. F. **Optimization of protein isolate production from soy flour using industrial membrane systems.** Journal of Food Science, v. 43, p. 361-364, 1978.

LAWHON, J. T.; MULSOW, D.; CATER C. M.; MATTIL K. F. **Production of protein isolates and concentrates from oilseed flour extracts using industrial ultrafiltration and reverse osmosis systems.** Journal of Food Science, v. 42, n. 2, p. 389-394, 1977.

LEE, H. C.; HTOO, A. K.; PATERSON, J. L. **Alkaline extraction of starch from Australian lentil cultivars Matilda and Digger optimised for starch yield and starch and protein quality.** Food Chemistry, e.102. p 551–559, 2007.

LEYVA-LOPEZ, N. E.; VASCO, N.; BARBA DE LA ROSA, A. P.; PAREDES-LOPEZ, O. **Amaranth seed proteins: Effect of defatting on extraction yield and on electrophoretic patterns.** Plant Foods for Human Nutrition, e. 47, n. 1, p. 49–53, 1995.

LÓPEZ-PAREDES, Octavio; FALOMIR-ORDORICA, César. **Production of Safflower Protein Isolates: Composition, Yield and Protein Quality.** Journal of the Science of Food and Agriculture, e. 37, p. 1097-1103, 1986.

LÓPEZ-PAREDES, Octavio; FALOMIR-ORDORICA, César; VÁZQUEZ-OLIVARES, M. R. **Chickpea Protein Isolates: Physicochemical, Functional and Nutritional Characterization.** Journal of Food Science, v. 56, n. 3, 1991.

MA, Z.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K.; PRASHER, S. O.; MONPETIT, D.; MALCOLMSON, L. **Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours.** Food Research International, e. 44, p. 2534–2544, 2011.

MONDOR, Martin; ALI, Fadi; IPPERSIEL, Denis; LAMRCHE François. **Impact of ultrafiltration/diafiltration sequence on the production of soy protein isolate by membrane Technologies.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, e. 11, p. 491-497, 2010

MWASARU, M. A.; MUHAMMAD, K.; BAKAR, J.; MAN, Y. B. C. **Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties.** Food Chemistry, e. 67, n. 4, p. 435–443, 1999.

OCHOA-RIVAS, Ariana; NAVA-VALDEZ, Yazel; SERNA-SALDÍVAR, Sergio O.; CHUCK-HERNÁNDEZ, Cristina. **Microwave and Ultrasound to Enhance Protein Extraction from Peanut Flour under Alkaline Conditions: Effects in Yield and Functional Properties of Protein Isolate.** Food and Bioprocess Technology, v. 10, n. 3, p. 543 – 555, 2017.

OKEZIE, O., B.; BELLO, A. B. **Physicochemical and Functional Properties of Winged Bean Flour and Isolate Compared with Soy Isolate.** Journal of Food Science, v. 53, n. 2, 1988.

OLIVEIRA et. al. **Increased protein content of chickpea (*Cicerarietinum* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacteria under water deficit conditions.** Journal of the Science of Food and Agriculture, e. 97, p. 4370-4385, Society of Chemical Industry, 2017.

OSESEK.PL (2019) Disponível em: <https://www.osesek.pl/ksiazka-kucharska-dziecka/smaczne-strony/584-zimowa-dieta-rosliny-straczkowe.html>.

OTTO, Terri; BAIK, Byung-kee; CZUCHAJOWSKA, Zuzanna. **Wet Fractionation of Garbanzo Bean and Pea Flours.** Cereal Chemistry, v. 74, n. 2, p. 141-146, 1997.

PEIXOTO, Nayara Macêdo. **Obtenção de compostos bioativos a partir das sementes de *adenanthera pavonina* L. utilizando extração assistida por enzimas.** Dissertação de mestrado

apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

PELGROM, P. J. M.; BOOM, R. M.; SCHUTYSER, M. A. I. **Method Development to Increase Protein Enrichment During Dry Fractionation of Starch-Rich Legumes.** Food and Bioprocess Technology, v. 8, p. 1485-1402, 2015.

PELGROM, P. J. M.; SCHUTYSER, M. A. I.; BOOM, R. M. **Thermomechanical Morphology of Peas and Its Relation to Fracture Behaviour.** Food and Bioprocess Technology, v. 6, p. 3317-3325, 2012.

PINTO, Alexandra; et. Al. **Challenges and opportunities for food processing to promote consumption of pulses.** Revista de Ciências Agrárias, v. 39, n 4, p. 571-582, 2016.

POJIĆA, Milica; MIŠANA, Aleksandra; TIWARI, Brijesh. **Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin.** Trends in Food Science & Technology, e. 75, p. 93-104, 2018.

PREECE, K; HOOSHYAR, N; ZUIDAM, N. **Whole soybean protein extraction processes: A review.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, e. 43, p. 163-172, 2017.

REMPEL, Curtis; GENG, X.; ZHANG, Yachuan. **Industrial scale preparation of pea flour fractions with enhanced nutritive composition by dry fractionation.** Food Chemistry, e. 276, p. 119–128, 2019.

RODRÍGUEZ-AMBRIZ, S.L.; MARTÍNEZ-AYALA, A.L.; MILLÁN, F.; DAVILA-ORTÍZ, G. **Composition and Functional Properties of Lupinus campestris Protein Isolates.** Plant Foods for Human Nutrition, e. 60, p. 99-107, 2005.

ROMMI, Katariina; HAKALA, Terhi, K.; HOLOPAINEN, Ulla; NORDLUND, Emilia; POUTANEN, Kaisa; LANTTO, Raija. **Effect of Enzyme-Aided Cell Wall Disintegration on Protein Extractability from Intact and Dehulled Rapeseed (*Brassica rapa L.* and *Brassica napus L.*) Press Cakes.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, e. 62, p. 7989 – 7997, 2014.

RUIZ, L. P.; HOVE, E. L. **Conditions affecting production of a protein isolate from lupin seed kernels.** Journal of the Science of Food and Agriculture, e. 27, n. 7, p. 667–674, 1976.

RUSSIN, Ted A.; ARCAND, Yves; BOYE, Joyce I. **Particle size effect on soy protein isolate extraction.** Journal of Food Processing and Preservation, e. 31, p. 308–319, 2007.

SCHNEIDER, Anne V. C. **Overview of the market and consumption of pulses in Europe.** British Journal of Nutrition, v. 88, n. 3, p. 243-250, 2002.

SCHUTYSER, M. A. I.; PELGROM, P. J. M.; VAN DER GOOT, A. J.; BOOM, R. M. **Dry fractionation for sustainable production of functional legume protein concentrates.** Trends in Food Science & Technology, p. 1 – 11, 2015.

SHALLO, H. E.; RAO, A.; ERICSON, A. P.; THOMAS, R. L. **Preparation of Soy Protein Concentrate by Ultrafiltration.** Journal of Food Science, v. 66, n. 2, 2001.

SHAPIRO, M.; GALPERIN, V. **Air classification of solid particles: a review.** Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, e. 44 n. 2, p. 279–285, 2005.

SINGH, Narpinder. **Pulses: an overview.** Journal of Food Science and Technology, India, v. 54, p. 853-857, 2017.

SOSULSKI, F.; YOUNGS, C. G. **Yield and Functional Properties of Air-Classified Protein and Starch Fractions from Eight Legume Flours.** Journal of the American Oil Chemists' Society, e. 56, p. 292- 295, 1979

SUMMER, A. K.; M. A. NIELSEN; YOUNGS, C. G. **Production and Evaluation of Pea Protein Isolate.** Journal of Food Science, e. 46, 1981.

SZCZAPA-LAMPART, E. **Preparation of protein from lupin seeds.** Nahrung, e. 40, n. 2, p. 71-74, 1996.

TABTABAEI, Solmaz; JAFARI, Mousa; RAJABZADEH, Amin, Reza; LEGGE, Raymond L. **Solvent-free production of protein-enriched fractions from navy bean flour using a triboelectrification-based approach.** Journal of Food Engineering, e. 174, p. 21-28, 2016.

TIAN, S., KYLE, W. S. A., & SMALL, D. M. **Pilot scale isolation of proteins from field peas (*Pisum sativum* L.) for use as food ingredients.** International Journal of Food Science and Technology, e. 34, n. 1, p. 33–39, 1999.

TIWARI, Brijesh; SINGH Narpinder. **Pulse Chemistry and Technology.** The Royal Society of Chemistry, Reino Unido, ed. 1, 270 p, 2012.

TYLER, Robert T. **Impact Milling Quality of Grain Legumes.** Journal of Food Science, v. 49, n. 3, p. 925-930, 1984.

VOROBIEV, E.; LEOVKA, N. **Extraction From Foods and Biomaterials Enhanced by Pulsed Electric Energy.** Innovative Food Processing Technologies, p. 31-56, 2016.

VOSE, J. R. **Separating Grain Components by Air Classification.** Separation and Purification Methods, e. 7, n. 1, p. 1–29, 1978.

WU, V. Y.; NICHOLS, N. N. **Fine Grinding and Air Classification of Field Pea.** Cereal Chemistry, e. 82, n. 3, p. 341-344, 2005.

ZHU, Ke-Xue; SUN, Xiao-Hong; ZHOU, Hui-Ming. **Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles.** Journal of Cereal Science, e. 50, p. 266-271, 2002.

