

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAFAELA TORREZAN PRIVATTI

**Recuperação de proteínas e isoflavonas para valorização do okara, coproduto da
agroindústria do extrato hidrossolúvel de soja**

Pirassununga

2023

RAFAELA TORREZAN PRIVATTI

Recuperação de proteínas e isoflavonas para valorização do okara, coproduto da agroindústria do extrato hidrossolúvel de soja

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

Pirassununga

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P961r Privatti, Rafaela Torrezan
Recuperação de proteínas e isoflavonas para
valorização do okara, coproduto da agroindústria do
extrato hidrossolúvel de soja / Rafaela Torrezan
Privatti ; orientadora Christianne Elisabete da
Costa Rodrigues. -- Pirassununga, 2023.
203 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
Paulo.

1. etanol. 2. extração assistida por ultrassom.
3. extração sequencial. 4. globulinas. 5. secagem.
I. Rodrigues, Christianne Elisabete da Costa,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e Santa Rita de Cássia pela vida! Pela nova oportunidade de viver com saúde e alcançar meus objetivos e sonhos!

Agradeço aos meus pais, José Luis e Zélia, por tanto carinho, apoio incondicional e compreensão, sobretudo nos meus momentos de nervosismo e ansiedade. Particularmente, meu pai pelas longas esperas, sem cobrança e pressa, mesmo cansado do dia de trabalho.

Minha mãe pelas marmitas e conselhos.

Ao meu noivo Marcelo Candido não sei nem por onde começar, ele foi essencial. Primeiro, pelo incentivo em me inscrever e lutar pelo meu sonho. Durante o período de doutorado pelo companheirismo, conselhos, puxões de orelha e amor. E agora na reta final, pelas correções, pela compreensão da minha ausência, pela paciência com minhas crises de baixa-estima e nervoso, entre outros inúmeros momentos de dificuldade. Minha eterna gratidão!!!

Aos meus tios, tias, primos, sogro e sogra e em especial a minha avó Ana pelas orações e ao meu avô paterno Ângelo (*in memoriam*) que faleceu durante o período de doutorado e reencontrou minha amada avó Ivanira (*in memoriam*).

Agradeço à minha orientadora Christianne Elisabete da Costa Rodrigues pela confiança depositada em mim e em meu trabalho, sendo que só tinha tido contato comigo na graduação. Pelos aprendizados e desafios, os quais me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente.

Pelo carinho, dedicação com meus trabalhos e inúmeras correções para ficarem perfeitos. Chris, seu carisma é fundamental para nosso sucesso, muito obrigada!!! Também, agradeço os ensinamentos como docente durante minhas participações no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), na disciplina de Operações Unitárias III.

Agradeço à Maria Carolina Capellini, pela amizade, parceria profissional, longas conversas de autoajuda, risadas e até choros. Obrigada pelo companheirismo!

Keila, muito além da técnica do laboratório, aquela que naqueles dias que me encontrava cabisbaixa, me fazia sorrir e sempre enxergar as dificuldades por outro ângulo. Suas palavras

foram fundamentais, principalmente nessa reta final. Os cuidados, os mimos, as risadas e a ajuda nos experimentos foram de suma importância para mim.

Agradeço as amigas Ingrid, Paola, Paloma, Tatiane, novamente a Maria Carolina e a Keila pela amizade e apoio em todos os momentos durante essa jornada. Levarei vocês para minha vida!!!

As alunas de Iniciação Científica, Isabela C. Rodrigues Souza e Isabela Gayola Junqueira que realizaram um excelente trabalho a distância, devido a pandemia causada pelo vírus *SARS-CoV-2*. Aos demais alunos de iniciação científica que auxiliaram em meu projeto: André, Luiza e Marina.

A Prof^a. Dra. Cintia Bernardo Gonçalves (*in memoriam*) pelos ensinamentos durante minha participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), na disciplina de Fundamentos em Engenharia de Alimentos. Pelas risadas, conversas e trocas de experiências. Sua perda foi muito dolorosa, até hoje espero aquele “OI”!

Aos técnicos e especialistas, Alan Cleber Borim, Carla Alves Monaco Lourenço, Cibele Maria Prado Zinni, Marcelo Thomazini e Silvana Marina Piccoli Pugine responsáveis pelos respectivos laboratórios: Tecnologia de Biopolímeros, Centro Multiusuário de Funcionalidade de Macromoléculas, Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, Encapsulação e Alimentos Funcionais e Química Biológica, por toda ajuda com análises e experimentos.

As professoras Carmen Sílvia Fávoro Trindade, Maria Inés Genovese Rodriguez, Mariza Pires de Melo, Rosemary Aparecida de Carvalho e Samantha Cristina de Pinho pelas contribuições nesse estudo e redação de artigos científicos.

Agradeço à toda comunidade da FZEA/USP, em especial aos demais discentes da pós-graduação em Engenharia de Alimentos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à Unidade de Desenvolvimento e Produção de Produtos de Soja (Universoja, Araraquara, SP) pela gentil doação do okara úmido, material de partida para essa pesquisa.

Agradeço a participação dos membros componentes da banca examinadora e pelas valiosas contribuições.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível) pela concessão da bolsa de Doutorado (Código de Financiamento 001) e as agências de fomento à pesquisa FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - 2014/21252-0 e 2017/20840-4) e CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - 302225/2019-6 e 306020/2022-0).

" A vida é uma corrida que não se corre sozinho.

E vencer não é chegar, é aproveitar o caminho sentindo o cheiro das flores e aprendendo com as dores causadas por cada espinho.

Aprenda com cada dor, com cada decepção, com cada vez que alguém lhe partir o coração.

O futuro é obscuro e às vezes é no escuro que se enxerga a direção"

Bráulio Bessa

RESUMO

PRIVATTI, R. T. **Recuperação de proteínas e isoflavonas para valorização do okara, coproduto da agroindústria do extrato hidrossolúvel de soja.** 2023, 203 p. Tese de doutorado, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a viabilidade técnica da extração simultânea de proteínas e isoflavonas (IFs) de okara, coproduto sólido do processamento para obtenção de extrato hidrossolúvel de soja. Tal objetivo foi derivado da lacuna revelada pela revisão da literatura, que compilou as técnicas utilizadas para o isolamento de componentes específicos do okara. Foi evidenciado o descarte dos demais nutrientes ao focar apenas na extração de um composto específico, gerando assim novos resíduos. Desse modo, técnicas para a extração simultânea de proteínas e IFs foram avaliadas. Realizaram-se extrações convencionais (30 ou 60 minutos/ 400 rpm/ 50 °C) em estágio único e sequencial (dois estágios em correntes cruzadas), avaliando o emprego de solução de $MgCl_2$ 0,05 M como solvente e etanol como agente purificador em diferentes etapas de recuperação dos compostos (precipitação e lavagem). Ademais, foi realizado um estudo da intensificação do processo de recuperação de proteínas e IFs, por meio de extração assistida por ultrassom (UAE, 20 kHz). Diferentes valores de intensidade de potência do ultrassom (165, 240 e 400 W), tempo de tratamento ultrassônico (15, 30 e 60 minutos) e número de estágios (1 ou 2 em correntes cruzadas) foram avaliados. Complementarmente, as propriedades funcionais e nutricionais dos produtos extraídos foram monitoradas. Os períodos de 15 minutos de UAE e 30 minutos de extração convencional favoreceram a extração das proteínas e IFs. Em relação as extrações convencionais, a configuração por estágios em correntes cruzadas combinando os solventes (1° estágio utilizando água+solução de NaOH 2 N e solução de $MgCl_2$ 0,05 M+solução de NaOH 2 N no 2° estágio) ocasionou aumento de 3 % no teor de proteínas extraídas, possivelmente devido ao maior conteúdo de globulinas 7S extraído, evidenciado pela análise do perfil molecular. Três lavagens etanólicas (etanol:água, 60:40 m/m) nos materiais proteicos recuperados promoveram redução (60 %) no teor de lipídios e consequente elevação no teor de proteínas. UAE proporcionou ganhos expressivos na extração de IFs agliconas, sugerindo que o tratamento ultrassônico provocou conversões das classes de IFs glicosídeos em agliconas. Os maiores teores de proteínas (52 %) e IFs (4208 ± 108 µg de daidzeína e 3156 ± 179 µg de genisteína/ g de material proteico de okara) extraídos foram alcançados empregando 15 minutos de sonicação, 240 W em estágio único. Ademais, estes materiais obtidos via UAE apresentaram

alta qualidade nutricional, em termos de digestibilidade estática *in vitro* das proteínas (93 %) e bioacessibilidade das IFs agliconas (23 %). As configurações experimentais avaliadas permitiram a obtenção de materiais proteicos de okara com propriedades funcionais distintas, possibilitando delinear futuras aplicações em produtos destinados à alimentação humana. Adicionalmente aos protocolos de extração de proteínas e IFs, esta tese sugere um protocolo para o preparo do okara e demais produtos à base de soja para a extração e quantificação de IFs, indicando a liofilização como método de secagem, eliminação da fase de remoção de lipídios e dois estágios sequenciais de extração para total recuperação das IFs da matriz.

Palavras-chave: etanol; extração assistida por ultrassom; extração sequencial; globulinas; secagem.

ABSTRACT

PRIVATTI, R. T. **Recovery of proteins and isoflavones for valorizing okara, a byproduct of the water-soluble soy extract agroindustry.** 2023, 203 p. Ph.D. Thesis, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of Sao Paulo, Pirassununga, 2023.

The main objective of this work was to evaluate the technical viability of the simultaneous extraction of proteins and isoflavones (IFs) from okara, a solid byproduct of the process to obtain the water-soluble soy extract. This objective was derived from the gap revealed by the literature review, which compiled the techniques used to isolate specific components of okara. Focusing only on extracting a specific compound makes the disposal of other nutrients evident, thus generating new residues. Thus, techniques for the simultaneous extraction of proteins and IFs were evaluated. Conventional extractions (30 or 60 minutes/ 400 rpm/ 50 °C) were performed in single and sequential stages (two stages in cross currents), evaluating the use of 0.05 M MgCl₂ solution as solvent and ethanol as a purifying agent in different stages of recovery of compounds (precipitation and washing). In addition, a study of the intensification of the recovery process of proteins and IFs was carried out by ultrasound-assisted extraction (UAE, 20 kHz). Different values of intensity of power ultrasound (165, 240, and 400 W), ultrasonic treatment time (15, 30, and 60 minutes), and several stages (1 or 2 in cross currents) were evaluated. In addition, the functional and nutritional properties of the extracted products were monitored. The periods of 15 minutes of UAE and 30 minutes of conventional extraction favor the extraction of proteins and IFs. Concerning conventional extractions, the configuration in cross currents stages combining the solvents (1° stage using water+2 N NaOH solution and 0.05 M MgCl₂+2 N NaOH solution in the 2° stage) caused an increase of 3 % in the extracted proteins, possibly due to the higher content of 7S globulins extracted, evidenced by the analysis of the molecular profile. Ethanolic washes (ethanol:water, 60:40 w/w) in the recovered protein materials promoted a reduction (60%) in the lipid content and a consequent increase in the protein content. UAE provided significant gains in the extraction of IFs aglycones, suggesting that ultrasonic treatment caused conversions of the classes of glycoside IFs in aglycones. The highest levels of proteins (52 %) and IFs (4208 ± 108 µg of daidzein and 3156 ± 179 µg of genistein/g of okara protein material) were achieved using 15 minutes of sonication, 240 W in a single stage. Moreover, these materials obtained via UAE presented high nutritional quality regarding protein in vitro static digestion (93 %) and bioaccessibility of aglycones Ifs (23 %). The experimental configurations evaluated allowed obtaining okara protein materials with different functional properties, enabling the delineation of future applications in products

intended for human consumption. In addition, regarding the protein and IFs extraction protocols, this thesis suggests a protocol for the preparation of okara and other soy-based products for the extraction and quantification of IFs, indicating freeze-dried as the drying method, elimination of the lipid removal phase and two sequential extraction stages for full recovery of the IFs of the matrix.

Keywords: drying; ethanol; globulins; sequential extraction; ultrasound-assisted extraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema ilustrativo da organização geral desta tese.	26
Figura I.1. Esquema de recuperação de polissacarídeos e fibras remanescentes do okara.	43
Figura II.1. Fluxograma da extração e quantificação de IFs em diferentes matrizes.	79
Figura II.2. Conteúdos de IFs em diferentes matrizes. (a) Soja quebrada (SB), flocos de soja laminados (SF), e collets (massa expandida) de soja (SC); (b) Okara úmido (WO), okara liofilizado (FDO), okara seco em estufa de convecção forçada (CDO), okara seco em estufa sob vácuo (VDO), okara desengordurado e liofilizado (FDDO), okara desengordurado e seco em estufa de convecção (CDDO), okara desengordurado e seco em estufa sob vácuo (VDDO); (c) Óleos brutos de soja, obtidos a partir de etanol (SFOE e SCOE) e hexano (SFOH e SCOH).	84
Figura II.3. Acúmulo dos teores de daidzina (●), genistina (■), daidzeína (○) e genisteína (□), em função do número de estágios de extração, na configuração de corrente cruzada. (a) Soja quebrada (SB); (b) Flocos de soja laminados (SF); (c) Collets (massa expandida) de soja (SC); (d) Okara úmido (WO).	88
Figura II.4. Acúmulo dos teores de daidzina (●), genistina (■), daidzeína (○) e genisteína (□), em função do número de estágios de extração, na configuração de correntes cruzadas. (a) okara liofilizado (FDO); (b) okara desengordurado e liofilizado (FDDO); (c) okara seco em estufa de convecção forçada (CDO); (d) okara desengordurado e seco em estufa de convecção forçada (CDDO); (e) okara seco em estufa sob vácuo (VDO); (f) okara desengordurado e seco em estufa sob vácuo (VDDO).	89
Figura II.5. Acúmulo de teores de daidzina (●), genistina (■), daidzeína (○) e genisteína (□), em função do número de estágios de extração, na configuração de correntes cruzadas. (a) Óleos brutos de soja obtidos a partir de etanol (SFOE e SCOE); (b) Óleos brutos de soja obtidos a partir de hexano (SFOH e SCOH).	90
Figura III.1. Configuração experimental para a obtenção das OPs a partir de WO.	104
Figura III.2. Diagrama representando a configuração de extração em correntes cruzadas. ...	108
Figura III.3. Índice de solubilidade do nitrogênio (NSI, %) das proteínas do okara em função do solvente e pH, a 25 °C.	113

Figura III.4. Índice de solubilidade do nitrogênio (NSI, %) das proteínas do okara em função da temperatura, tipo de solvente e pH.	115
Figura III.5. Teores de IFs nas proteínas de okara. (a) extração convencional por 60 minutos, seguida por diferentes tratamentos alcoólicos; (b) extração convencional por 30 minutos, em função do solvente e da configuração por estágios em correntes cruzadas.	120
Figura III.6. SDS-PAGE das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas. (1) Padrões de massas molares (15-260 kDa); (2) OP30-IP+AW3; (3) OP30-S-IP+AW3; (4) OP30+OP30-IP+AW3; (5) OP30+OP30-S-IP+AW3.	124
Figura III.7. Imagens das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.	133
Figura IV.1. Fluxograma de preparação das OPs.	153
Figura IV.2. Diagrama da configuração por estágios em correntes cruzadas aplicando UAE para a recuperação de proteínas e IFs de okara.	156
Figura IV.3. Conteúdo de IFs recuperadas simultaneamente às proteínas de okara. (a) extração por 60 minutos em função da intensidade de potência (0, 165, 240 e 400 W); (b) UAE (20 kHz, 240 W), em função do tempo de tratamento ultrassônico (15, 30 ou 60 minutos); (c) UAE (20 kHz, 240 W), em função do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.	163
Figura IV.4. SDS-PAGE das OPs de okara em função do tipo de extração e da configuração (1 ou 2 estágios em correntes cruzadas). (1) Padrões de massas molares (10-260 kDa); (2) OP30-0; (3) OP15-240; (4) OP15-240+OP15-240; (5) OP15-240+OP30-0.	167
Figura IV.5. Imagens das OPs obtidas via UAE (20 kHz, 240 W), em função do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.	174
Figura IV.6. Conteúdos de proteínas e IFs durante digestão <i>in vitro</i> estática de OP obtida via UAE (20 kHz, 240 W) por 15 minutos, em estágio único (OP15-240).	178
Figura A1. Cromatograma dos padrões de daidzina (376 µg/g de solução), genistina (432 µg/g de solução), daidzeína (87 µg/g de solução) e genisteína (103 µg/g de solução).	195
Figura A2. Curvas de calibração para determinação de IFs. (a) daidzina (coeficiente de determinação $R^2 = 0,996$); (b) genistina ($R^2 = 0,997$); (c) daidzeína ($R^2 = 0,993$) e (d) genisteína ($R^2 = 0,996$).	196

Figura B1. Curva de calibração para glicose (coeficiente de determinação $R^2= 0,994$), a 490 nm.	197
Figura B2. Diferentes razões sólido: solvente para a extração de proteínas e IFs a partir de okara úmido (WO).....	198
Figura B3. Avaliação do período de condicionamento para estabilização do pH da mistura WO + solvente (1:15 sólido seco:solvente, m/m), a 50 °C, sob agitação constante (400 rpm).	199
Figura B4. Configuração experimental para a obtenção dos ORs a partir de WO.....	200
Figura C1. Sistema UAE em célula encamisada de vidro <i>pyrex</i> , conectada a banho termostático, com agitação magnética.	201
Figura C2. Configuração experimental para a obtenção dos ORs, via UAE, a partir de WO.	202

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1. Composição centesimal, parâmetros de cor e propriedades físico-químicas de okara (continua).....	33
Tabela I.2. Estruturas químicas das principais isoflavonas encontradas em okara.	37
Tabela I.3. Níveis das principais isoflavonas presentes no okara, solvente de extração utilizado nos processos de recuperação e as metodologias de quantificação.	38
Tabela I.4. Alimentos com okara adicionados na formulação, para consumo humano.	40
Tabela I.5. Propriedades físico-químicas de produtos proteicos de okara (continua).	49
Tabela III.1. Composição percentual média do WO, em base seca.	112
Tabela III.2. Composição percentual média das OPs, em base seca, em função do tratamento etanólico empregado.	117
Tabela III.3. Composição percentual média das OPs, em base seca, em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.	122
Tabela III.4. Estimativa da composição, em porcentagem, das subunidades proteicas das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.....	124
Tabela III.5. Propriedades funcionais das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.	128
Tabela III.6. Propriedades emulsificantes das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.	129
Tabela III.7. Análise colorimétrica das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.	134
Tabela III.8. WHC e OHC dos ORs em função do tempo de processo, solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.....	135
Tabela IV.1. Composição percentual média das OPs, em base seca, em função da intensidade de potência do tratamento ultrassônico.	159
Tabela IV.2. Composição percentual média das OPs, em base seca, em função do tempo de tratamento ultrassônico (20 kHz, 240 W) e do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.	166
Tabela IV.3. Estimativa da composição, em porcentagem, das subunidades da fração proteica das OPs em função do tipo de extração (convencional ou UAE) e do número de estágios, 1 ou 2 estágios em configuração de correntes cruzadas.	168

Tabela IV.4. Propriedades funcionais das OPs obtidas via UAE (20 kHz, 240 W), em função do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.	171
Tabela IV.5. Propriedades emulsificantes das OPs obtidas via UAE (20 kHz, 240 W), em função do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.	172
Tabela IV.6. Parâmetros de cor das OPs obtidas via UAE (20 kHz, 240 W), em função do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.	175
Tabela C1. Capacidades de absorção de água (WHC) e óleo (OHC) dos refinados de okara (ORs) obtidos após extração assistida por ultrassom (UAE), em função da intensidade de potência (0, 165, 240 e 400 W); do tempo de tratamento ultrassônico (15, 30 ou 60 minutos) e do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.	203

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AP = Precipitação Alcoólica (60:40 etanol:extrato, m/m)
- AW2 = 2 Lavagens com Solução Etanólica 60 % (60:40 etanol:água, m/m)
- AW3 = 3 Lavagens com Solução Etanólica 60 % (60:40 etanol:água, m/m)
- AW4 = 4 Lavagens com Solução Etanólica 60 % (60:40 etanol:água, m/m)
- CDO = Okara Seco em Estufa de Convecção Forçada
- CDDO = Okara Desengordurado e Seco em Estufa de Convecção Forçada
- DF = Fibra Dietética
- DH = Grau de Hidrólise ou Desamidação
- EAI = Índice de Atividade da Emulsão
- ESI = Índice de estabilidade da Emulsão
- FAI = Índice de Atividade da Espuma
- FSI = Índice de Estabilidade da Espuma
- FDO = Okara Liofilizado
- FDDO = Okara Desengordurado e Liofilizado
- HM = Higroscopicidade
- IAP = Precipitação Isoelétrica + Alcoólica (60:40 etanol:extrato, m/m)
- IDF = Fibra Dietética Insolúvel
- IFs = Isoflavonas
- IP = Precipitação Isoelétrica
- HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- MOPC = Concentrado Proteico de Okara por Membrana
- NSI = Índice de Solubilidade de Nitrogênio
- OHC = Capacidade de Absorção de Óleo
- OP = Proteína de Okara
- OP15-240 = UAE (240 W) por 15 minutos
- OP15-240+OP15-240 = UAE (240 W) em 2 estágios, 15 minutos cada
- OP15-240+OP30-0 = 1º estágio UAE (240 W) por 15 minutos e 2º estágio Extração Convencional (0 W) por 30 minutos
- OP30 = Extração Convencional (30 minutos) empregando água+solução de NaOH 2 N
- OP30-S = Extração Convencional (30 minutos) empregando solução de MgCl₂ 0,05 M+solução de NaOH 2 N
- OP30-0 = Extração convencional (0 W) por 30 minutos
- OP30-240 = UAE (240 W) por 30 minutos

OP60 = Extração Convencional (60 minutos) empregando água+solução de NaOH 2 N

OP60-0 = Extração Convencional (0 W) por 60 minutos

OP60-165 = UAE (165 W) por 60 minutos

OP60-240 = UAE (240 W) por 60 minutos

OP60-400 = UAE (400 W) por 60 minutos

OP30+OP30 = Extração Convencional em 2 estágios (30 minutos cada) usando água+solução de NaOH 2 N

OP30+OP30-S = Extração Convencional em 2 estágios (30 minutos cada), 1º estágio água+solução de NaOH 2 N e 2º estágio usando solução de MgCl₂ 0,05 M+solução de NaOH 2 N

OPI = Isolado Proteico de Okara

OR = Rafinado de Okara

OR30 = Extração Convencional (30 minutos) empregando água+solução de NaOH 2 N

OR60 = Extração Convencional (60 minutos) empregando água+solução de NaOH 2 N

OR30-S = Extração Convencional (30 minutos) empregando solução salina de MgCl₂ 0,05 M+solução de NaOH 2 N

OR30+OR30 = Extração Convencional em 2 estágios (30 minutos cada) empregando água+solução de NaOH 2 N

OR30+OR30-S = Extração Convencional em 2 estágios (30 minutos cada), 1º empregando água+solução de NaOH 2 N e o 2º utilizando solução salina de MgCl₂ 0,05 M+solução de NaOH 2 N

SB = Soja Quebrada

SC = Collets (massa expandida) de Soja

SCO = Óleo Bruto de Collets (massa expandida) de Soja

SCOE = Óleo Bruto de Collets (massa expandida) de Soja extraído com Etanol

SCOH = Óleo Bruto de Collets (massa expandida) de Soja extraído com Hexano

SDF = Fibra Dietética Solúvel

SDS-PAGE = Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil- Sulfato de Sódio

SF = Soja Laminada

SFO = Óleo Bruto de Soja Laminada

SFOE = Óleo Bruto de Soja Laminada extraído com Etanol

SFOH = Óleo Bruto de Soja Laminada extraído com Hexano

T0 = Diâmetro Médio das Gotículas de Óleo na Emulsão, imediatamente após a formação destas

T10 = Diâmetro Médio das Gotículas de Óleo na Emulsão, após 10 minutos da formação destas

TDF = Fibra Dietética Total

UAE = Extração Assistida por Ultrassom

UHPLC = Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

VDO = Okara Seco em Estufa sob Vácuo

VDDO = Okara Desengordurado e Seco em Estufa sob Vácuo

WHC = Capacidade de Absorção de Água

WO = Okara Úmido

WSSE = Extrato Hidrossolúvel de Soja

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	24
Capítulo I - Visão geral da composição, aplicações e técnicas de recuperação dos componentes do Okara visando a biovalorização deste resíduo do processamento de soja.....	27
I. Resumo.....	29
I. Abreviações e Siglas	29
I.1. Introdução	29
I.2. Composição do okara.....	31
I.3. Aplicações do okara	39
I.4. Recuperação de compostos do okara	41
I.4.1. Fibras e polissacarídeos digestíveis de okara.....	41
I.4.2. Recuperação de proteínas do okara.....	47
I.4.3. Recuperação do óleo de okara.....	55
I.4.4. Extração de isoflavonas de okara	56
I.5. Conclusões	60
I.6. Referências bibliográficas	61
Capítulo II - Perfil e teor de isoflavonas em soja laminada e extrusada e okara submetido a diferentes métodos de secagem	71
II. Resumo	73
II. Abreviações e Siglas	73
II.1. Introdução	73
II.2. Materiais e métodos	77
II.2.1. Material vegetal	77
II.2.2. Padrões e reagentes	77
II.2.3. Preparação das amostras	77
II.2.3.1. Amostras de soja.....	78
II.2.3.2. Amostras de okara	80
II.2.4. Extração de IFs	80
II.2.5. Quantificação das IFs.....	81
II.2.6. Análise estatística.....	82
II.3. Resultados e Discussão	82
II.3.1. Teores de IFs em amostras de soja e okara.....	82
II.3.2. Efeito dos métodos de redução da umidade do okara no teor de IFs.....	85
II.3.3. Teores de IFs em óleos de soja	86

II.3.4. Otimização da extração de IFs em relação a números de estágios	87
II.4. Conclusões	91
II.5. Referências bibliográficas.....	92
Capítulo III - Solução salina como solvente e etanol na etapa de purificação para recuperação de proteínas e isoflavonas de okara úmido.....	96
III. Resumo	97
III. Abreviaturas e Siglas	97
III.1. Introdução.....	98
III.2. Materiais e métodos.....	101
III.2.1. Materiais	101
III.2.2. Análises de caracterização.....	102
III.2.2.1. Composição centesimal	103
III.2.2.2. Extração e quantificação de IFs.....	103
III.2.3. Recuperação das proteínas e IFs de okara	103
III.2.3.1. Variáveis de processo	105
III.2.3.2. Extração convencional.....	105
<i>III.2.3.2.1. Precipitação das proteínas extraídas</i>	<i>106</i>
<i>III.2.3.2.2 Otimização da etapa de extração convencional.....</i>	<i>107</i>
III.2.4. Composição das OPs	109
III.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE)	109
III.2.6. Propriedades funcionais.....	110
III.2.6.1. Higroscopicidade (HM) e capacidades de absorção de água (WHC) e óleo (OHC).....	110
III.2.6.2. Propriedades emulsificantes	110
<i>III.2.6.2.1. Determinação do diâmetro médio das gotículas de óleo nas emulsões ...</i>	<i>111</i>
III.2.6.3. Propriedades espumantes.....	111
III.2.7. Parâmetros de cor	111
III.2.8. Análise estatística	112
III.3. Resultados e Discussão.....	112
III.3.1. Caracterização da matéria-prima	112
III.3.1.1. Composição do okara	112
III.3.1.2. Índice de solubilidade do nitrogênio proteico (NSI)	113
III.3.2. Caracterização da proteína recuperada de okara	117

III.3.2.1. Efeitos dos tratamentos empregando etanol na etapa de purificação sobre a fração proteica e isoflavonas	117
III.3.2.2. Otimização da etapa de extração convencional.....	121
III.3.2.3. SDS-PAGE	123
III.3.2.4. Propriedades Funcionais.....	126
III.3.2.4.1. Higroscopicidade (HM) e capacidade de absorção de óleo (OHC).....	126
III.3.2.4.2. Índices de capacidade de formação (FAI) e estabilidade (FSI) de espuma	130
III.3.2.4.3. Propriedades emulsificantes.....	130
III.3.2.5. Cor	132
III.3.3. WHC e OHC dos ORs.....	135
III.4. Conclusões.....	136
III.5. Referências bibliográficas	137
Capítulo IV - Extração simultânea de proteínas e isoflavonas de okara empregando ultrassom	145
IV. Resumo.....	146
IV. Abreviaturas e Siglas.....	146
IV.1. Introdução.....	147
IV.2. Materiais e métodos	151
IV.2.1. Materiais.....	151
IV.2.2. Composição do okara úmido.....	152
IV.2.3. Recuperação das proteínas e IFs	152
IV.2.3.1. Processos de extração das proteínas de okara: convencional e UAE.....	154
IV.2.3.2. Otimização da UAE	155
IV.2.4. Caracterização das OPs	156
IV.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE)	156
IV.2.6. Propriedades funcionais	157
IV.2.7. Parâmetros de cor	157
IV.2.8. Ensaio de digestão <i>in vitro</i> estática.....	157
IV.2.9. Análise estatística.....	158
IV.3. Resultados e Discussão	159
IV.3.1. Composição do material de partida, okara úmido.....	159
IV.3.2. Composição das OPs	159

IV.3.2.1. Composição das OPs obtidas via UAE empregando condições otimizadas ...	164
IV.3.3. Perfil molecular das OPs obtidas via UAE	167
IV.3.4. Propriedades funcionais das OPs obtidas via UAE.....	169
IV.3.5. Parâmetros de cor das OPs obtidas via UAE	173
IV.3.6. Digestão <i>in vitro</i> das OPs obtidas via UAE	176
IV.4. Conclusões	178
IV.5. Referências bibliográficas	179
2. CONCLUSÕES GERAIS	188
3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	190
4. MEMORIAL DA PÓS-GRADUAÇÃO	191
APÊNDICE A	195
APÊNDICE B.....	197
APÊNDICE C.....	201

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O reaproveitamento de materiais residuais oriundos da indústria de alimentos vem ganhando grande importância econômica e nutricional, visto que contribui para a redução dos gastos relacionados ao tratamento desses resíduos, minimiza o impacto ambiental e agrega valor a estes materiais, possibilitando assim que resíduos tornem coprodutos. Estudos recentes revelam que os sólidos residuais da indústria de extrato hidrossolúvel de soja (WSSE), o okara, apresenta alto valor nutricional, em particular devido ao seu conteúdo apreciável de proteínas e isoflavonas (IFs), tornando este material passível de se tornar coproduto.

Assim, tendo em vista a valorizar o okara, reduzir custos operacionais e possíveis danos ambientais gerados pelo descarte desse material e, especialmente, promover a circularidade econômica, o foco principal desta tese foi avaliar a viabilidade técnica da extração simultânea de proteínas e IFs a partir de okara úmido (WO). A hipótese de que a extração de proteínas e IFs a partir de WO é possível está suportada na interação entre esses componentes, por meio de diversas ligações e, também, por estes apresentarem características equivalentes, em termos de solubilidade.

Para esse fim, este documento foi organizado em quatro capítulos (Figura 1), dentre estes uma revisão da literatura, a qual enfatizou as técnicas de extração dos componentes do okara reportadas na literatura disponível. Esta revisão originou o objetivo principal desta pesquisa, devido a observação de que as técnicas propostas para recuperar um composto ou classe de compostos em específico geram o descarte dos demais compostos, gerando conseqüentemente novos resíduos, os quais apresentam potencial para serem reaproveitados. Também, foi evidenciado por esta revisão uma gama de protocolos divergentes em termos de preparação do okara para a extração de IFs levando a uma avaliação aprofundada da metodologia mais adequada para o preparo desse coproduto para as etapas subsequentes de extração e quantificação desses biocompostos.

Dessa forma, no contexto do objetivo principal deste trabalho foram investigadas técnicas para viabilizar a extração simultânea de proteínas e IFs a partir desse coproduto *in natura*, visto que estudos reportando a recuperação conjunta desses componentes são incipientes, sobretudo empregando okara úmido como material de partida. Os estudos para esse fim abordaram a utilização do etanol como agente purificador das proteínas recuperadas, assim como o emprego de solução salina como solvente, visando maximizar a extração tanto de proteínas como de IFs da matriz. Complementarmente, a extração assistida por ultrassom (UAE) foi avaliada afim de intensificar o processo de recuperação dos compostos alvo (proteínas e IFs) desse coproduto. Ademais, as propriedades funcionais e nutricionais dos

produtos extraídos foram monitoradas, gerando informações que possibilitam delinear futuras aplicações em produtos destinados à alimentação humana.

Assim, como já mencionado, no **Capítulo I** é reportado o estado da arte da valorização do okara, trazendo uma breve descrição da composição química desse material e suas recentes aplicações na indústria alimentícia, na alimentação animal, assim como outras reutilizações. No entanto, o foco principal deste capítulo foi enfatizar as técnicas de recuperação dos compostos (polissacarídeos digestíveis, fibras alimentares, proteínas, lipídios e IFs), fornecendo os detalhes dos processos de extração que são aplicados para o isolamento desses e as principais características dos produtos segregados. Este capítulo refere-se ao artigo científico intitulado originalmente “*An overview of the composition, applications and recovery techniques of the components of okara aimed at the biovalorization of this soybean processing residue*” publicado na ***Food Reviews International***, com a permissão para publicação nesta tese pela Editora Taylor e Francis.

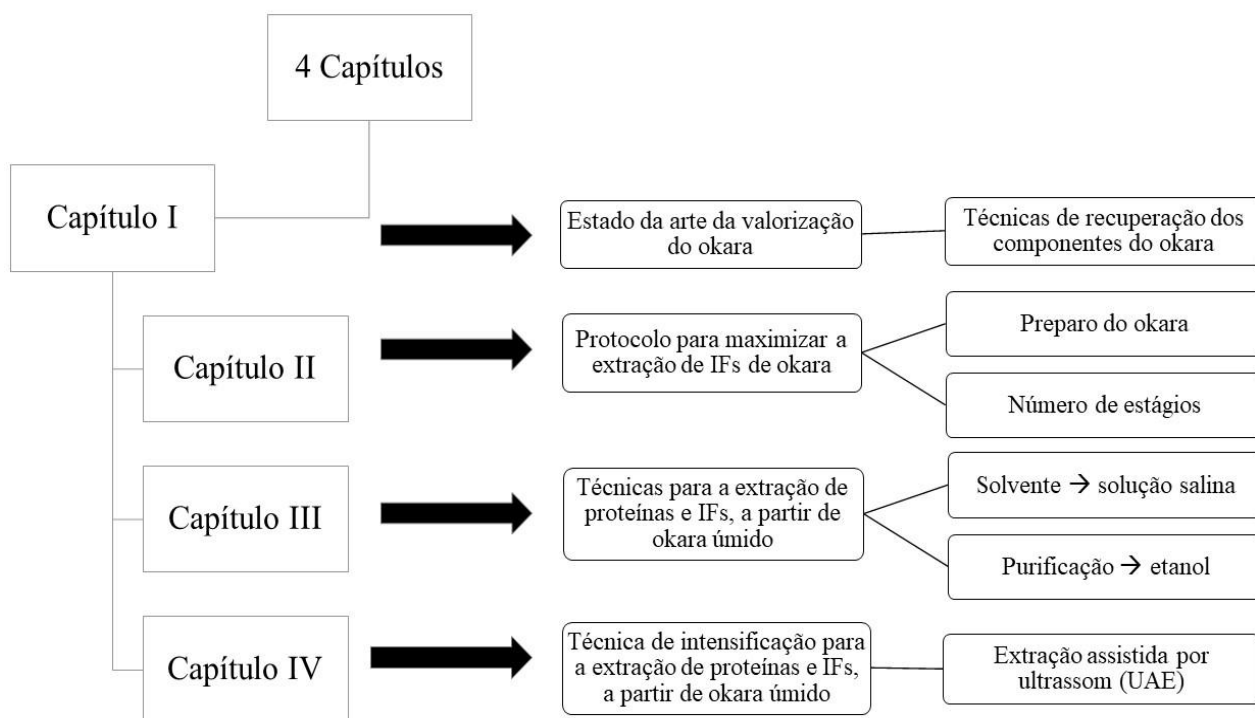
O **Capítulo II**, originalmente denominado “*Profile and contents of isoflavones on soybeans industrially pretreated for oil extraction and on okara*” publicado na ***Food Chemistry***, e com todos os direitos para publicação da Elsevier, aborda os efeitos de pré-tratamentos térmicos e mecânicos sobre o teor e perfil de IFs em três materiais à base de soja, okara, grãos de soja submetidos a diferentes pré-tratamentos industriais (quebra, laminação e expansão) e óleo de soja. Em relação ao okara (material de trabalho desta tese) foi realizado um estudo avaliando os possíveis impactos sobre o teor e perfil de IFs dos métodos de preparo do okara. Foram analisadas diferentes técnicas de secagem (liofilização, secagem em estufa de convecção forçada e sob vácuo) frente a extração de IFs, a partir de WO, assim como a remoção ou não dos lipídios. Além disso, investigou-se o número de estágios necessários para a extração total desses compostos, possibilitando delinear um protocolo de extração para maximização da recuperação total das IFs dessa matriz, evitando a degradação e/ou decomposição destas.

Os Capítulos III e IV investigam a viabilidade técnica para a extração simultânea de proteínas e IFs, a partir de okara *in natura* (WO). O **Capítulo III** traz a caracterização do okara empregado para a recuperação de proteínas e IFs, em termos de composição e perfil de solubilidade da fração proteica. Extração convencional em um ou dois estágios em correntes cruzadas foi a técnica utilizada para a recuperação desses compostos, avaliando a inserção de uma solução salina como solvente. Em adição, com o objetivo de purificar as proteínas extraídas, etanol foi incorporado ao processo em diferentes etapas do processo de segregação da fração proteica (lavagem ou precipitação). Ademais, este capítulo apresenta os efeitos da adição do sal e da configuração em um ou dois estágios em correntes cruzadas sobre as

propriedades funcionais, parâmetros de cor e o perfil molecular das proteínas extraídas do okara.

A intensificação do processo de recuperação de proteínas e IFs, por meio de UAE foi estudada no **Capítulo IV**. Três intensidades de potência de ultrassom, a cinética da UAE e a configuração em estágios em correntes cruzadas foram avaliadas. Foi possível verificar o potencial do tratamento ultrassônico para a extração simultânea de IFs junto às proteínas de okara, especialmente a classe das agliconas sugerindo que os efeitos cavitacionais promovidos pelo UAE ocasionam a conversão de classes de IFs glicosiladas nestas. Adicionalmente, foi realizado um estudo da bioacessibilidade *in vitro* das IFs recuperadas, assim como uma caracterização das funcionalidades das proteínas recuperadas via UAE.

Figura 1. Esquema ilustrativo da organização geral desta tese.



Fonte: Própria autoria.

Capítulo I

Visão geral da composição, aplicações e técnicas de recuperação dos componentes do Okara visando a biovalorização deste resíduo do processamento de soja

Rafaela Torrezan Privatti e Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

Trabalho publicado na revista *Food Reviews International*

192648, 2021



Food Reviews International



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/lfri20>

An Overview of the Composition, Applications, and Recovery Techniques of the Components of Okara Aimed at the Biovalorization of This Soybean Processing Residue

Rafaela Torrezan Privatti & Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

To cite this article: Rafaela Torrezan Privatti & Christianne Elisabete da Costa Rodrigues (2021): An Overview of the Composition, Applications, and Recovery Techniques of the Components of Okara Aimed at the Biovalorization of This Soybean Processing Residue, Food Reviews International, DOI: [10.1080/87559129.2021.1926484](https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1926484)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1926484>



Published online: 18 May 2021.



RightsLink



Home



Help ▾



Live Chat



Sign in



Create Account

An Overview of the Composition, Applications, and Recovery Techniques of the Components of Okara Aimed at the Biovalorization of This Soybean Processing Residue



Author: Rafaela Torrezan Privatti, , Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

Publication: Food Reviews International

Publisher: Taylor & Francis

Date: May 18, 2021

Rights managed by Taylor & Francis

Thesis/Dissertation Reuse Request

Taylor & Francis is pleased to offer reuses of its content for a thesis or dissertation free of charge contingent on resubmission of permission request if work is published.

BACK

CLOSE

Capítulo I

I. Resumo

Esta revisão aborda a biovalorização do okara, um coproduto da indústria de extrato hidrossolúvel de soja. Este material é altamente suscetível à decomposição devido ao seu alto teor de água e níveis apreciáveis de nutrientes (proteínas, fibras dietéticas e isoflavonas). São enfatizados detalhes sobre os processos de extração que são aplicados para o isolamento dos principais compostos, bem como as principais características desses produtos. O desenvolvimento de novos e mais seguros processos é necessário para alcançar o reaproveitamento global dos componentes do okara, evitando a geração de novos resíduos agroindustriais e aplicando os nutrientes isolados aos produtos destinados aos seres humanos.

Palavras-chave: fibra dietética; isoflavonas; óleo; proteínas; resíduo do extrato hidrossolúvel de soja.

I. Abreviações e Siglas

DF = fibra dietética; DH = grau de hidrólise ou desamidação; EAI = índice de atividade da emulsão; ESI = índice de estabilidade da emulsão; FAI = índice de atividade da espuma; FSI = índice de estabilidade da espuma; IDF = fibra dietética insolúvel; IFs = isoflavonas; HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência; MOPC = concentrado proteico de okara por membrana; NSI = índice de solubilidade do nitrogênio; OHC = capacidade de absorção de óleo; OP = proteína de okara; OPI = isolado proteico de okara; SDF = fibra dietética solúvel; TDF = fibra dietética total; UHPLC = cromatografia líquida de ultra eficiência; WHC = capacidade de absorção de água; WSSE = extrato hidrossolúvel de soja.

I.1. Introdução

Originária da Ásia, a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma planta de grande interesse comercial, tanto para uso em alimentos e ração animal, quanto como matéria-prima para produtos derivados, como extrato hidrossolúvel de soja (WSSE) (SINGH et al., 2008; ZHANG et al., 2018). Em geral, o WSSE é produzido por meio de extração sólido-líquido utilizando água quente como solvente, em proporções soja:água variando de 1:6 a 1:10 (m/v) (GUIMARÃES et al., 2018; O'TOOLE, 2016). Após o processo de produção, um extrato enriquecido em proteínas e um material fibroso, conhecido como okara são obtidos (VAN DER RIET et al., 1989).

De acordo com Khare et al. (1995), durante o processo utilizado para obtenção do WSSE, aproximadamente 1,1 kg de okara é gerado a partir de 1 kg de soja processada. A

Capítulo I

produção mundial de soja, em 2019, foi de 342 milhões de toneladas (SOYSTATS, 2020); estimando que 4 % desse montante foi destinado à fabricação do WSSE, Liu et al. (2017) sugeriram uma geração de aproximadamente 14 milhões de toneladas de okara em todo o mundo. Este subproduto contém alto teor de água, tornando seu descarte um problema ambiental, devido à suscetibilidade à putrefação (RINALDI; NG; BENNINK, 2000). No entanto, o okara contém conteúdo apreciável de nutrientes de alto valor biológico, como proteínas (11-43 %) (GRIZOTTO et al., 2012; PARK; CHOI; KIM, 2015), fibras dietéticas totais (TDF) (13-63 %) (NGUYEN et al., 2018; PARK; CHOI; KIM, 2015), lipídios (5-25 %) (LU; LIU; LI, 2013; PARK; CHOI; KIM, 2015) e isoflavonas (IFs) (0,5-1 mg/g okara seco (JANKOWIAK et al., 2014a), justificando a sua reutilização.

Os estudos realizados até o momento demonstram o reaproveitamento do okara para alimentação animal (EL-SAIDY, 2011; HARTHAN; CHERNEY, 2017; HERMANN; HONEYMAN, 2004) e em produtos alimentícios destinados a seres humanos, principalmente em pó, tipo farinha (APPELT et al., 2015; HAWA; SATHEESH; KUMELA, 2018; KANG; BAE; LEE, 2018; LU; LIU; LI, 2013; OSTERMANN-PORCEL et al., 2017a, 2017b), bem como a incorporação direta em alimentos (okara úmido) (PARK; CHOI; KIM, 2015; RINALDI; NG; BENNINK, 2000; ZHANG et al., 2019) e fermentados (MORAES FILHO et al., 2018; MBAEYI-NWAOHA; UCHENDU, 2016). Entretanto, a aplicação de okara como ingrediente em alimentos humanos e animais é limitada devido a fatores antinutricionais, como oligossacarídeos, destacando-se a rafinose, que causam flatulência, inibidores enzimáticos, lisinoalanina, ácido fítico, taninos, saponinas e as características sensoriais típicas de soja (LIENER, 1994; O'TOOLE, 1999; VAN DER RIET et al., 1989; VONG; LIU, 2016). Assim, outras aplicações do okara incluem o uso como agente biorremediador em solos (ORTS et al., 2017), como substrato fermentativo para a produção de novos compostos (KHARE; JHA; GANDHI, 1995; LIU et al., 2017) e produção de etanol (NGUYEN et al., 2018). Outra possibilidade de valorização desse material é a recuperação dos componentes individuais específicos, por meio de metodologias de extração, como mostrado para proteínas (CHAN; MA, 1999a, 1999b; MA et al., 1996; TAO et al., 2019; VISHWANATHAN et al., 2011; VISHWANATHAN; SINGH; SUBRAMANIAN, 2011), lipídios (QUINTANA; GERBINO; GÓMEZ-ZAVAGLIA, 2018; QUITAIN et al., 2006), TDF (LI et al., 2012a, 2018; MATEOS-APARICIO; MATEOS-PEINADO; RUPÉREZ, 2010; ULLAH et al., 2017) e IFs (JANKOWIAK et al., 2014a, 2014b; SANTOS et al., 2018; SEVILLANO et al., 2014).

Considerando a quantidade considerável de okara gerada pelas indústrias de produção do WSSE e seu potencial de biovalorização, O'Toole (1999 e 2016), Li et al. (2012) e Kamble

Capítulo I

e Rani (2020) propuseram tópicos relacionados a composição e aplicações de okara nos alimentos e produtos não alimentícios. Além disso, Vong e Liu (2016) se concentraram na biotransformação microbiana do okara, enquanto Kamble e Rani (2020) também se concentraram nas características estruturais e digestivas. Esta revisão, por sua vez, enfatiza a recuperação dos componentes de okara (polissacarídeos digestíveis, TDF, proteínas, lipídios e IFs), fornecendo os detalhes das técnicas de extração propostas até o momento. Além disso, esta revisão destaca os estudos realizados em termos da composição do okara e aplicações para consumo animal e humano, bem como os estudos realizados em outras áreas.

I.2. Composição do okara

Os diferentes cultivares de soja variam em termos de: teor e perfil de lipídios, conteúdo proteico, bem como em termos de atividade enzimática. Além disso, o método de obtenção do WSSE, bem como a quantidade de compostos solúveis presentes na soja, extraíveis pela água, formam o conjunto de fatores que influenciam a composição química do okara (FARAJ; VASANTHAN, 2004; VONG; LIU, 2016). Quanto ao método de produção do WSSE, maceração, lavagem, drenagem, ressuspensão em água, moagem e filtração são as etapas recomendadas pelo método tradicional chinês, de acordo com O'Toole (2016) e Giri e Mangaraj (2012). No entanto, esse método passou por diversas mudanças, visando melhorias nas características sensoriais e viabilidade técnica da fabricação, principalmente relacionadas ao uso do calor no processo (adição de uma etapa de cozimento dos grãos e/ou durante a moagem) (GIRI; MANGARAJ, 2012; KAMBLE; RANI, 2020; ZHANG et al., 2018), bem como a produção do WSSE, a partir da soja descascada. Tal diferenciação no método de produção do WSSE, combinada com os fatores mencionados, geram variações como mostrado na Tabela I.1, que compila dados da literatura de composição e propriedades químicas do okara.

A consistência do okara remete a serragem úmida, como consequência de seu alto teor de água (aproximadamente 80 % em massa), a qual está ligada às fibras (VONG; LIU, 2016). Como mostrado na Tabela I.1, o okara seco é predominantemente composto por fibras dietéticas (DF), principalmente fibras dietéticas insolúveis (IDF), destacando os monossacarídeos: arabinose (1,52-6,64 %), glicose (7,95-14,86 %), galactose (4,35-10,43 %), xilose (0,41-10,72 %) e ácido urônico (3,1-7,73 %) (ESPINOSA-MARTOS; RUPÉREZ, 2009; LI et al., 2012a, 2012b; LU; LIU; LI, 2013; MATEOS-APARICIO et al., 2010a; PORFIRI et al., 2017; REDONDO-CUENCA; VILLANUEVA-SUÁREZ; MATEOS-APARICIO, 2008).

Outro composto que deve ser notado, devido ao seu alto teor em okara seco são as proteínas, das quais globulinas 7S e 11S são as principais formas observadas no okara (MA et

Capítulo I

al., 1996; SINGH et al., 2015). As proteínas do okara contêm aminoácidos essenciais em proporções semelhantes aos isolados comerciais de proteína de soja, e em níveis de ingestão sugeridos pela FAO, a saber: leucina (7,6-8,31 %), lisina (5,81-6,9 %) e valina (4,7-5,28 %) (CHAN; MA, 1999a, 1999b; FIGUEIREDO et al., 2018; MA et al., 1996; SINGH et al., 2008).

Tabela I.1. Composição centesimal, parâmetros de cor e propriedades físico-químicas de okara (continua).

Umidade	Umidade após secagem	Proteínas	Lipídios	Carboidratos digeríveis	TDF	SDF	IDF	Cinzas	Cor			WHC	OHC	Referências
(g/ 100 g matéria)				g/ 100 g matéria seca					L*	a*	b*	mL ou g/g		
78,4	4,0*	14,1	15,2	nd	21,5	nd	nd	3,2	85	-2	16	nd	nd	(SHI et al., 2020)
nd	nd	26,0	10,0	0,87	56,7	2,9	53,8	3,5	nd	nd	nd	4	nd	(HU et al. 2019)
nd	6,46***	24,74	15,96	nd	58,27	13,71	44,56	2,73	79,12	3,49	20,16	4	4	(SANTOS et al. 2019)
80,17	nd	29,43	11,65	nd	34,67	16,88	17,79	3,87	nd	nd	nd	nd	nd	(VOSS et al., 2018)
nd	4,91	18,10	3,60	nd	76,38	1,40	75,04	3,40	nd	nd	nd	13	3,3	(LI et al., 2019)
76,22	nd	27,46	6,6	nd	52,56	1,30	51,26	2,48	nd	nd	nd	nd	nd	(FAYAZ et al., 2019)
nd	6,27*	24,79	10,52	37,71	19,83	nd	nd	3,58	nd	nd	nd	9,47	0,26	(AMBAWAT; KHETARPAUL, 2018)
74,00	nd	32,80	1,98	nd	23,4	nd	nd	1,26	nd	nd	nd	nd	nd	(SANTOS et al., 2018)
nd	nd	30,60	16,42	34,43	13,43	nd	nd	5,03	nd	nd	nd	nd	nd	(NGUYEN et al., 2018)
nd	8,37	23,64	12,63	1,47	51,86	nd	nd	2,03	nd	nd	nd	nd	nd	(JIANG et al., 2018)
nd	4,9	25,3	11,4	nd	53,8	nd	nd	3,6	nd	nd	nd	nd	nd	(ULLAH et al., 2017)
nd	9,64*	20,90	13,40	nd	54,51	nd	nd	1,54	nd	nd	nd	nd	nd	(QUINTANA; GERBINO; GÓMEZ-ZAVAGLIA, 2017)
nd	nd	33,40	8,50	3,90	54,3	4,20	50,10	3,70	nd	nd	nd	nd	nd	(MATEOS-APARICIO et al., 2010b)
80,50	13,0**	13,00	11,00	nd	63,70	nd	nd	6,60	81,9	1,7	30,7	nd	nd	(PARK; CHOI; KIM, 2015)

Tabela I.1. Composição centesimal, parâmetros de cor e propriedades físico-químicas de okara (conclusão).

Umidade	Umidade após secagem	Proteínas	Lipídios	Carboidratos digeríveis	TDF	SDF	IDF	Cinzas	Cor			WHC	OHC	Referências
(g/ 100 g matéria)				g/ 100 g matéria seca					L*	a*	b*	mL ou g/g		
80,00	nd	32,00	15,00	nd	44,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(JANKOWIAK et al., 2015)
81,60	6,71*	15,31	5,90	nd	58,60	1,91	55,63	3,85	nd	nd	nd	nd	nd	(LU; LIU; LI, 2013)
85,00	5,48***	28,65	9,79	nd	48,18	2,30	45,88	2,80	87,13	1,88	15,84	5,39	3,20	(LI et al., 2012b)
80,75	nd	43,68	16,23	33,11	19,17	nd	nd	3,98	nd	nd	nd	17,10	nd	(GRIZOTTO et al., 2012)
nd	nd	32,29	14,72	nd	41,57	2,55	39,02	3,18	nd	nd	nd	8,87	0,20	(ESPINOSA-MARTOS; RUPÉREZ, 2009)
nd	nd	28,52	9,84	2,56	55,48	nd	nd	3,61	nd	nd	nd	nd	nd	(REDONDO-CUENCA; VILLANUEVA-SUÁREZ; MATEOS-APARICIO, 2008)
77,65	nd	24,21	9,83	nd	53,25	9,98	43,27	4,06	nd	nd	nd	nd	nd	(RINALDI; NG; BENNINK, 2000)

Parâmetros de cor = luminosidade (L*), coordenada vermelho/verde (a*) e coordenada amarelo/azul (b*); nd: não determinado.

* Secagem por liofilização; ** Secagem do em estufa a 105 °C; Secagem em estufa a 60 °C; *** Secagem em estufa a 55 °C.

Fonte: Própria autoria.

Capítulo I

Essa composição faz da fração proteica do okara um ingrediente potencial, principalmente em produtos destinados a pessoas com problemas cardíacos e crianças (FIGUEIREDO et al., 2018). Além disso, as proteínas do okara têm quantidades significativas de aminoácidos contendo enxofre (cisteína e metionina) e lisina, quando comparadas a outras fontes de proteína vegetal (CHAN; MA, 1999a, 1999b; FIGUEIREDO et al., 2018; STANOJEVIC et al., 2012), além de apresentarem alta digestibilidade *in vitro* (AMBAWAT; KHETARPAUL, 2018; MA et al., 1996).

O óleo contido no okara, semelhantemente ao óleo de soja, é composto principalmente por ácidos graxos insaturados, predominantemente o ácido linoleico (C18:2), com percentual de aproximadamente 48,86-54,61 %, seguido pelo ácido oleico (C18:1) variando de 20,04 % a 21,8 % (MATEOS-APARICIO et al., 2010b; QUINTANA; GERBINO; GÓMEZ-ZAVAGLIA, 2018; VOSS et al., 2018). O ácido palmítico (C16:0) representa 11,57-14,75 % (QUINTANA; GERBINO; GÓMEZ-ZAVAGLIA, 2018; VOSS et al., 2018), e pequenas proporções de ácidos linolênico (C18:3), esteárico (C18:0), mirístico (C14:0) e eicosanoico (C20:0), dentre outros (MATEOS-APARICIO et al., 2010b; QUINTANA; GERBINO; GÓMEZ-ZAVAGLIA, 2018; VOSS et al., 2018) podem ser detectados.

Potássio, cálcio, sódio, magnésio, manganês, zinco, ferro, cromo e cobre constituem os minerais mais importantes presentes no okara (KAMBLE; RANI, 2020; LU; LIU; LI, 2013; MATEOS-APARICIO et al., 2010b; O'TOOLE, 2016; VONG; LIU, 2016). Vitaminas do complexo B, como riboflavina, tiamina e niacina, também são encontradas neste coproduto (O'TOOLE, 2016; VONG; LIU, 2016).

Originários do metabolismo secundário, as IFs são componentes que pertencem a um grupo de polifenóis, formado por um núcleo de flavona, composto por dois anéis de benzeno, os quais são ligados a um anel heterocíclico; as posições do anel de benzeno são determinantes para a classificação nos grupos flavonoides e isoflavonóides. Agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) e as três formas glicosiladas, acetilglicosídeos (acetil-genistina, acetil-daidzina, e acetil-glicitina), β -glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina), e malonilglicosídeos (malonil-genistina, malonil-daidzina e malonil-glicitina) são os quatro grupos de IFs encontrados em soja e derivados, totalizando 12 tipos. No entanto, a conversão de formas β -glicosídeos em agliconas pode ocorrer devido ao processamento ou hidrólise enzimática ou às condições de armazenamento (FARAJ; VASANTHAN, 2004; JANKOWIAK et al., 2015; MULITERNO et al., 2017; ROSTAGNO et al., 2009; SANTOS et al., 2018).

As IFs também estão presentes no okara, como demonstrado por Genovese et al. (2006), que encontraram 0,528 mg IFs por grama de okara úmido. Jankowiak et al. (2014a,

Capítulo I

2014b) observaram variações de 0,479 a 1,018 mg e 0,8499 a 0,9234 mg IFs/g okara seco, respectivamente, enquanto Rinaldi et al. (2000) e Voss et al. (2018) relataram conteúdos de IFs de 0,668 e 1,241 mg por g okara seco, respectivamente.

A redução dos sintomas da menopausa (BRZEZINSKI et al., 1997; TAKU et al., 2012) e a prevenção de cânceres, especialmente cânceres de mama e próstata (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; GUO et al., 2019; HU et al., 2020), doenças cardiovasculares e osteoporose (ANDERSON et al., 1999; HO et al., 2003; SCHEIBER et al., 2001) são alguns dos benefícios para a saúde humana associados ao consumo de IFs. Atividade estrogênica/antiestrogênica, indução a parada do ciclo celular e apoptose, potenciais antioxidantes e anti-inflamatórios, regulação do sistema imunológico e alterações na sinalização celular são os possíveis modos de atuação das IFs sobre a saúde humana (ANDERSON et al., 1999; BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; BRZEZINSKI et al., 1997; ESSAWY et al., 2019; FARAJ; VASANTHAN, 2004; HUANG et al., 2010; HU et al., 2020; NAIM et al., 1976; WANG; MURPHY, 1994).

A Tabela I.2 apresenta as estruturas das principais IFs encontrados em okara e a Tabela I.3 apresenta o conteúdo dos principais tipos de IFs em okara que foram relatados na literatura. Além disso, mais informações sobre os benefícios dos compostos presentes no okara, para a saúde humana podem ser encontradas na publicação de Li et al. (2012).

Os níveis de IFs presentes em okara são muito divergentes entre os estudos, como mostra a Tabela I.3. Essa divergência pode ser atribuída a diversos fatores, como o método de produção do WSSE, a preparação da amostra para a extração, solvente de extração e métodos de quantificação (FARAJ; VASANTHAN, 2004; JACKSON et al., 2002; MULITERNO et al., 2017; ROSTAGNO et al., 2009; SANTOS et al., 2018; VOSS et al., 2018), dos quais os dois últimos exibem uma ampla gama (Tabela I.3) para o mesmo propósito. Além disso, os estudos não garantem que todas as IFs presentes em okara foram extraídas.

Tabela I.2. Estruturas químicas das principais isoflavonas encontradas em okara.

Grupo	IFs	R1	R2	R3	Estrutura química
Agliconas	Daidzeína	H	H	H	
	Gliciteína	H	OCH ₃	H	
	Genisteína	OH	H	H	
β-glicosídeos	Daidzina	H	H	C ₆ O ₅ H ₁₁	
	Glicitina	H	OCH ₃	C ₆ O ₅ H ₁₁	
	Genistina	OH	H	C ₆ O ₅ H ₁₁	
Malonilglicosídeos	Malonil-daidzina	H	H	C ₆ O ₅ H ₁₁ -COCH ₂ COOH	
	Malonil-glicitina	H	OCH ₃	C ₆ O ₅ H ₁₁ -COCH ₂ COOH	
	Malonil-genistina	H	OH	C ₆ O ₅ H ₁₁ -COCH ₂ COOH	
Acetilglicosídeos	Acetil-daidzina	H	H	C ₆ O ₅ H ₁₁ -COCH ₃	
	Acetil-glicitina	H	OCH ₃	C ₆ O ₅ H ₁₁ -COCH ₃	
	Acetil-genistina	OH	H	C ₆ O ₅ H ₁₁ -COCH ₃	

Fonte: adaptado de Luthria e Natarajan (2009).

Capítulo I

Tabela I.3. Níveis das principais isoflavonas presentes no okara, solvente de extração utilizado nos processos de recuperação e as metodologias de quantificação.

Unidade	Solvente de extração	Método de quantificação	Agliconas			β-glicosídeos			Malonilglicosídeos			Referências
			Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Daidzina	Glicitina	Genistina	Malonil-daidzina	Malonil-glicitina	Malonil-genistina	
μg/g okara seco	Acetonitrila	HPLC*	ni	ni	24	108	ni	141	399	ni	489	(RINALDI; NG; BENNINK, 2000)
μg/g okara seco	Acetonitrila 0,1 N HCl (5:1)	HPLC**	22000	1100	31000	48000	2200	53000	64000	2800	130000	(JACKSON et al., 2002)
μg/g okara seco	Metanol:água (80:20 v/v)	HPLC***	nd	nd	0	118	nd	200	308	nd	712	(SUREL; COUPLET, 2005)
μg/L wet extract	Água alcalina (pH 10.0)	UHPLC****	2492	ni	1190	6191	1325	4969	4225	nd	5641	(SEVILLANO et al., 2014)
μg/g extrato seco	Etanol:água (70:30 v/v)	HPLC****	17	19	194	160	26	171	85	15	169	(JANKOWIAK et al., 2014a)
	Água		22	8	3	108	19	71	85	14	144	
μg/g extrato seco	Água	HPLC****	900	100	650	3900	600	3650	2500	500	4150	(JANKOWIAK et al., 2015)
μg/g okara seco	Acetonitrila	HPLC**	140	50	125	206	55	262	nq	nq	nq	(VONG; LIM; LIU, 2017)
μg/g okara seco	Água:etanol: acetona (1:1:1)	UHPLC*****	12,7	3,98	21,06	58,24	66,01	211,68	35,14	ni	82,88	(MULITERNO et al., 2017)
μg/g okara seco	Metanol:água (80:20 v/v)	HPLC**	1000	250	1750	250	100	950	nq	nq	nq	(SANTOS et al., 2018)
μg/g okara seco	Acetonitrila	HPLC**	170	40	150	160	50	175	nq	nq	nq	(VONG; LIU, 2019)

nd: não determinado; ni: não identificado; nq: não quantificado.

*Fase móvel A: água:metanol:ácido acético e fase móvel B: metanol:ácido acético; **Fase móvel A: água:ácido acético e fase móvel B: acetonitrila:ácido acético; ***Fase móvel A: água:ácido trifluoroacético e fase móvel B: acetonitrila; ****Fase móvel A: água:ácido fórmico e fase móvel B: acetonitrila:ácido fórmico; *****Fase móvel A: água:ácido acético e fase móvel B: acetonitrila. Fonte: Própria autoria.

I.3. Aplicações do okara

Incineração ou aterros sanitários são os destinos comumente dados ao okara, segundo O'Toole (1999); no entanto, segundo Rinaldi, Ng e Bennink (2000) esses tipos de descarte podem causar problemas ambientais, devido à suscetibilidade desse material à putrefação. Com o objetivo de resolver esse problema, novos propósitos foram avaliados. Por exemplo, Orts et al. (2017) e Gao, Si e He (2015) relataram o potencial do okara para biorremediação de solos contaminados por inseticidas clorpirifós e seu potencial como adsorvente para a remoção do corante azul brilhante KN-R, respectivamente. Os nutrientes do okara foram usados como fertilizantes para plantas, através do desenvolvimento de um hidrogel, a partir de okara seco, glutaraldeído e um polímero (álcool poli-vinil) (SONGSRIROTE et al., 2017). O açúcar contido no coproduto da indústria de WSSE foi utilizado para a produção de etanol por Nguyen et al. (2018).

A composição nutricional, a alta quantidade produzida e a capacidade como coproduto agroindustrial (baixo custo) fazem do okara um ingrediente potencial para ração animal (LI; QIAO; LU, 2012). Okara é um suplemento proteico para alimentar suínos jovens, representando até 25 % da dieta (HERMANN; HONEYMAN, 2004). A suplementação com okara não influencia a composição do leite de ovelhas lactantes ou o crescimento de seus cordeiros, de acordo com Harthan e Cherney (2017). Sinha et al. (2013) verificaram que a alimentação com farinha de okara foi benéfica para o crescimento de frangos de corte. A suplementação com okara na aquicultura também foi avaliada positivamente por El-Saidy (2011).

Eritritol de baixo custo foi produzido a partir de okara fermentado, primeiramente com *Mucor flavus* e, posteriormente, com *Yarrowia lipolytica* (LIU et al., 2017). Ácido cítrico foi produzido a partir de uma única fermentação com mistura de *Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger*, de acordo com Khare, Jha e Gandhi (1995).

A Tabela I.4 apresenta um resumo dos alimentos para consumo humano complementados com okara nas formas: fresco, em pó ou fermentado. Vale ressaltar que as revisões realizadas por O'Toole (1999 e 2016) e Vong e Liu (2016) introduziram várias aplicações do okara fermentado para a produção de novos compostos, em formulações alimentares e produtos não alimentícios, que não são o alvo desta revisão.

Tabela I.4. Alimentos com okara adicionados na formulação, para consumo humano.

Okara	Alimento	Quantidade de okara adicionado	Referência
Fresco	Tofu com fibras	60 % 50 % DF okara (370 nm)	(ZHANG et al., 2019) (ULLAH et al., 2019)
	Hambúrguer de carne bovina	5-25 % 20 %	(OLIVEIRA et al., 2016) (SU et al., 2013)
	Patê vegetal	33,87 %	(GUIMARÃES et al., 2018)
	Rissoles de carne bovina	7,5-22,5 %	(TURHAN; TEMIZ; SAGIR, 2007)
	Extrato de soja e tofu	na	(TODA; CHIBA; ONO, 2007)
	Bolinhos	na	(PARK; CHOI; KIM, 2015)
	Cereal	33,33-40 %	(RINALDI; NG; BENNINK, 2000)
	Pó	Barra de cereal	14.8 %
Cookies		15-30 %	(OSTERMANN-PORCEL et al., 2017a)
		45-47 %	(HAWA; SATHEESH; KUMELA, 2018)
Wrappes ricos em fibras		na	(TAVARES et al., 2016)
		7,5-12,5 %	(JIANG et al., 2018)
Patê de carne		2,5-7,5 %	(TURHAN; TEMIZ; SAGIR, 2009)
Iogurte de soja probiótico		27,62 %	(BEDANI et al., 2014)
Massa		10-50 %	(KAMBLE et al., 2019)
Macarrão		5 %	(PAN; LIU; SHIAU, 2018)
Macarrão de arroz		10 %	(KANG; BAE; LEE, 2018)
Lanche	13 %	(KATAYAMA; WILSON, 2008)	
Fermentado	Salsicha	10-20 %	(NORIHAM et al., 2016)
	Cereais	1,5-4,0 %	(GRIZOTTO et al., 2012)
	Meitauza	30 %	(MBAEYI-NWAOHA; UCHENDU, 2016)
	Molho probiótico	na	(XU; LIU; ZHOU, 2012)
Fermentado	Extrato de soja	3 %	(MORAES FILHO et al., 2018)
		3 %	(MORAES FILHO; BUSANELLO; GARCIA, 2016)

na: não disponível. Fonte: Própria autoria.

A quantidade de okara incorporada nos alimentos é variável, como mostra a Tabela I.4, principalmente devido às mudanças sensoriais (textura, cor e sabor) causadas pela sua introdução nesses alimentos, além da presença de compostos antinutricionais. O oligossacarídeo rafinose, ácido fítico, saponinas e inibidores da atividade enzimática são os compostos antinutricionais mais comuns presentes em okara, os quais estão associados a

Capítulo I

problemas simples como flatulência, mas também a danos ao sistema digestivo, principalmente pâncreas e intestino, afetando a absorção de nutrientes e, conseqüentemente o crescimento (LIENER, 1994). Assim, uma alternativa potencial é a recuperação dos compostos (proteínas, óleo, polissacarídeos, TDF e IFs) para a produção de novos produtos alimentícios ou agentes farmacêuticos, e assim obter a valorização total desse coproduto.

I.4. Recuperação de compostos do okara

A extração de compostos valiosos de fontes vegetais ou animais é de suma importância para a nutrição, especialmente no que se refere ao reaproveitamento de coprodutos industriais para este fim. A composição química e a forma física, o método de extração, a afinidade (polaridade e solubilidade) entre o solvente e o composto alvo, particularmente no contato sólido-líquido, o tempo de contato entre as fases, a temperatura durante a extração e a razão solvente para material sólido são variáveis de processo que influenciam a quantidade de composto que pode ser extraído da fonte primária (ĐUROVIĆ et al., 2018; JANKOWIAK et al., 2014a).

A recuperação dos compostos remanescentes (polissacarídeos, TDF, proteínas, óleo e IFs) isolados de okara utilizando diferentes métodos de extração e solventes foi proposta para sua biovalorização e será relatada nas próximas seções.

I.4.1. Fibras e polissacarídeos digestíveis de okara

Poli-hidróxi-aldeídos e poli-hidróxi-cetonas de inúmeros tamanhos e composições, além de diferentes ligações, é a definição simplificada dada aos carboidratos. Entre os carboidratos podemos destacar: açúcares (monossacarídeos e dissacarídeos), oligossacarídeos e polissacarídeos, os quais são divididos em digestíveis (amidos) e não digestíveis (TDF) (CLEMENS et al., 2016). TDF são carboidratos de origem vegetal, não digestíveis e não absorvíveis no intestino delgado humano, mas são totalmente ou parcialmente fermentáveis pelo intestino grosso, conforme definido pela Associação Americana de Químicos de Cereais (AACC) (AACC, 2001). Entre as múltiplas classificações atribuídas as TDF, destacam-se: SDF (gomas, mucilagens, pentosanas e pectinas), que são caracterizadas pela formação de uma pasta em água, e IDF (celulose, hemicelulose e lignina) (AACC, 2001; CLEMENS et al., 2016). De acordo com a AACC (2001), a composição final do TDF é resultado dos processos físicos, químicos, térmicos e enzimáticos aos quais são submetidos. TDF é o principal componente do okara, como mostrado na Tabela I.1, tornando-se uma fonte potencial para uso em alimentos funcionais e extração de frações fibrosas e polissacarídicas.

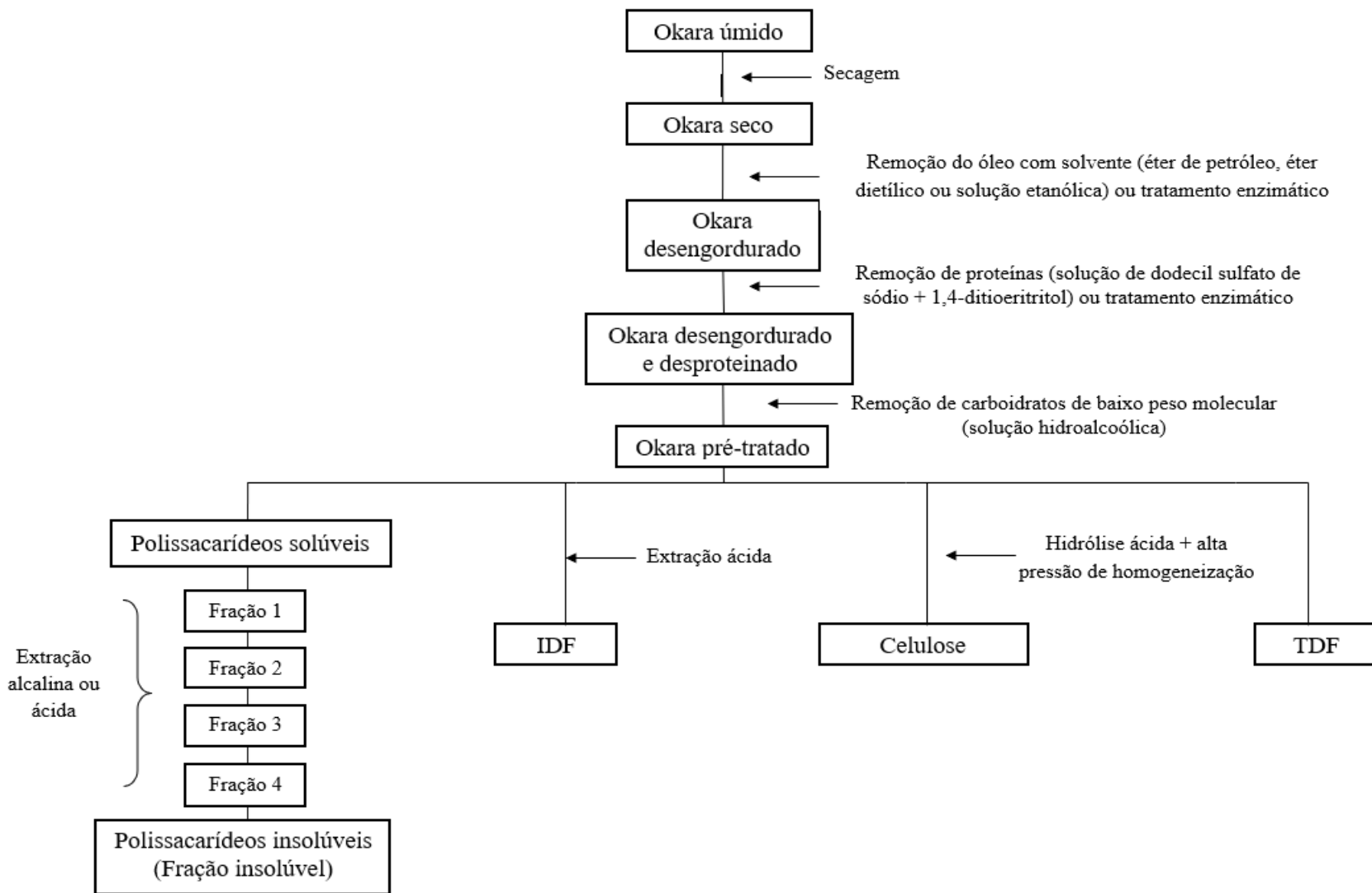
Capítulo I

A Figura I.1 apresenta um fluxograma simplificado, no qual são listadas as principais etapas de recuperação de polissacarídeos, monossacarídeos e fibras de okara.

O perfil de monossacarídeos do okara foi caracterizado pelo fracionamento dos polissacarídeos em quatro estágios de extração por Li et al. (2012a). Okara liofilizado e finamente moído, foi previamente tratado para a remoção do óleo (método Soxhlet), proteínas (solução de dodecil sulfato de sódio + 1,4-ditioeritritol) e carboidratos de baixo peso molecular (solução hidroalcolólica (85 % de etanol:15 % de água, v/v)). As amostras de okara tratadas foram submetidas a 4 extrações sequenciais para isolar 4 frações de polissacarídeos solúveis e 1 fração de polissacarídeos insolúveis. A fração 1, foi obtida utilizando 0,05 M EDTA + 0,05 M NH₄ oxalato em tampão de acetato de sódio (0,05 M), pH 5,0 por 60 minutos a 70 °C; para fração 2, 0,05 M NaOH por 60 minutos a 4 °C foi utilizado; fração 3, foi obtida à temperatura ambiente com 1 M NaOH + 0,02 M NaBH₄ por 120 minutos; finalmente, a fração 4, foi obtida com 4 M NaOH + 0,02 M NaBH₄ por 120 minutos em temperatura ambiente. O resíduo dessas extrações forneceu a fração 5, composta de polissacarídeos insolúveis. Okara bruto apresentou um teor total de polissacarídeos de 56,8 %, enquanto os polissacarídeos insolúveis apresentaram o maior teor de 27,9 %, seguido pelas frações 3 (20,7 %), 4 (16,0 %), 1 (7,7 %) e 2, a qual apresentou o menor teor de polissacarídeos, 3,6 %. O ácido galacturônico foi o monossacarídeo predominante nas frações 1 e 2, mostrando a presença de substâncias pécticas, enquanto as frações 3 e 4, provavelmente eram compostas de galactanos e arabinogalactanos, uma vez que a galactose estava presente em maiores proporções. Os polissacarídeos insolúveis do okara podem ser compostos de celulose, xilano e xiloglucano, já que a fração 5 apresentava altos níveis de glicose e xilose.

Polissacarídeos estruturais de okara foram fracionados por Mateos-Aparicio et al. (2010a) usando uma solução básica para a extração. Além disso, foram avaliados o potencial antioxidante e a estrutura dos polissacarídeos. Os pré-tratamentos realizados no okara para extração foram: liofilização e remoção dos lipídios, proteínas e açúcares solúveis. O sólido resultante (63,6 % do material inicial) foi chamado de resíduo insolúvel em álcool, contendo 55,7 % de açúcares. Este resíduo foi submetido a três extrações alcalinas sequenciais, produzindo uma fração de polissacarídeo insolúvel (fração 4) e 3 frações solúveis de polissacarídeos: fração 1 (0,05 M NaOH), fração 2 (1 M KOH) e fração 3 (4 M KOH). As frações solúveis de polissacarídeos mostraram potencial antioxidante *in vitro*, e a fração 1, composta principalmente de pectinas, apresentou a maior atividade antioxidante. Além disso, as frações 2 e 3 eram compostas por uma mistura de polissacarídeos (compostos xilose, arabinose e galactose). A fração insolúvel continha celulose e pectinas residuais.

Figura I.1. Esquema de recuperação de polissacarídeos e fibras remanescentes do okara.



Fonte: Própria autoria.

O fracionamento da celulose microfibrilada de okara usando ácido e tratamentos de alta pressão foi proposto por Li et al. (2018). Para este processo, sólidos solúveis (lavagem com água); água (55 °C/ 24 horas), óleo (éter de petróleo, 50 °C/ 8 horas) e proteínas (tratamento enzimático 50 °C/ 2 horas) foram previamente removidos do okara. A extração da celulose foi realizada por hidrólise ácida (6 % HCl, razão sólido:solvente 1:20 (m/v), 60 minutos a 88 °C), seguida por um processo de homogeneização a alta pressão, 60 MPa, para a produção de nanopartículas. Quanto ao teor de fibras do material inicial, o rendimento da extração química-mecânica da celulose microfibrilada foi de aproximadamente 30 % com diâmetro variando de 9 a 93 nm. Além disso, foram observadas alterações na composição química, o que aumentou a área superficial das fibras e impactou positivamente nas propriedades térmicas e no grau de cristalização da celulose.

Os tratamentos químicos (ácido com ou sem um agente quelante) foram realizados por Yoshii et al. (1996) para desencadear a hidrólise em okara e facilitar a extração de polissacarídeos solúveis em água. O mecanismo da hidrólise e a influência do processo na estrutura e propriedades funcionais das fibras foram elucidados. Os autores mostraram que as fibras do okara são formadas por duas regiões principais: regiões de caixa de ovo (polímeros de galacturonato transversais com Ca^{2+} entre os grupos carboxílicos) e regiões não caixa de ovo (proteínas ligadas aos polissacarídeos) hidrólise começa nas regiões das caixas de ovos e segue para as regiões proteicas. Os autores sugeriram ainda que os agentes quelantes (EDTA e hexametáfosfato de sódio) interagem com o Ca^{2+} , causando hidrólise mais rápida, e que os polissacarídeos solúveis obtidos a partir desses processos possuem capacidade emulsificante.

Nakamura et al. (2001) chamaram de okara o produto obtido a partir de soja descascada, desengordurada, desproteínada e livre de sólidos solúveis, o qual foi submetido à extração de polissacarídeos solúveis. Para obter os polissacarídeos crus do okara, água acidificada a 100 °C foi utilizada durante 180 minutos, seguida de centrifugação, diálise e precipitação alcoólica. Quatro frações de polissacarídeos foram recuperadas usando 50 mM NaHCO_3 , 100 mM NaHCO_3 (1500 mL), 100 mM Na_2CO_3 e 100 mM NaOH , respectivamente. Além disso, a fração 3 foi submetida a tratamento enzimático com quatro hemiceluloses diferentes e uma pectinase. Os autores recuperaram 66 % dos açúcares contidos no okara, principalmente na fração 2 (42 %), seguidos pelas frações 3 (26 %), 1 (22 %) e 4 (9 %). Este estudo forneceu informações valiosas sobre a estrutura e construção dos polissacarídeos de soja que não estão no escopo desta revisão, mas podem orientar aplicações e novos métodos de recuperação desses componentes.

Capítulo I

Três tratamentos preliminares foram aplicados ao okara úmido por Surel e Couplet (2005), para maximizar a extração de TDF deste material. O primeiro tratamento foi realizado em okara seco (80 °C/ 16 horas) e desgordurado (Soxhlet; 60 °C/ 4 horas) que foi misturado com tampão fosfato, em valores específicos de pH e temperatura para cada enzima: Neutrase – pH 6 e 50 °C, Alcalase e P-5380 protease - pH 7,5 e 60 °C. Estas amostras foram incubadas de 3 a 480 minutos. O segundo tratamento consistiu em proteólise enzimática, como no tratamento 1, seguido da remoção lipídica com solventes (94 % de etanol: 6 % água e 78 % etanol: 22 % água). O terceiro tratamento foi realizado no okara, após proteólise com Alcalase, seguido de lipólise utilizando Lipolyve R a 40 °C, em tampão fosfato (pH 7,0) para remoção lipídica. O maior teor de fibras (81,8 %) foi obtido no tratamento 1 utilizando Alcalase (pH 7,29, 60 °C, 270 minutos), enquanto para o okara úmido, o melhor resultado (75,5 % TDF) foi obtido utilizando-se o segundo tratamento utilizando Alcalase (pH 7,5, 60 °C, 270 minutos), após o desgorduramento enzimático não proporcionar a purificação adequada das TDF.

Os efeitos do tratamento com alta pressão hidrostática combinada com temperatura nas TDF de okara e propriedades funcionais foram avaliados por Mateos-Aparicio, Mateos-Peinado e Rupérez (2010). O tratamento foi realizado por 15 minutos em dois níveis de pressão (200 e 400 MPa), 2 temperaturas (30 e 60 °C) e com 3 preparações do okara (seco e desgordurado, hidratado e hidratado + autoclavado). O tratamento do okara hidratado a 400 MPa, 60 °C, resultou no maior teor de TDF (64,8 %), SDF (19,67 %) e IDF (45,16 %). Em geral, tratamentos combinados, especialmente utilizando okara hidratado, causaram alterações nas IDF para SDF. Okara hidratado + autoclavado a 60 °C, em ambas as pressões, levou ao maior inchaço (~ 13 mL/g), e capacidades de retenção de água (~ 10 g/g) e óleo (~ 8 g/g).

Pérez-López, Mateos-Aparicio e Rupérez (2016) associaram alta pressão hidrostática e complexos enzimáticos para degradar as TDF, com o objetivo de aumentar o teor de carboidratos de baixa massa molar. Os tratamentos foram realizados a 40 °C, em dispersões de okara (1 %, m/v), previamente seco e desgordurado, avaliando 2 pressões (400 e 600 MPa), 2 tempos (15 e 30 minutos) e 2 tipos de carboidrases comerciais (*Ultraflo*[®] L e *Viscozyme*[®] L: razão enzima:dispersão, 1:40, m/v). O tratamento com maior potencial, em termos de redução da massa molar dos carboidratos de okara, foi com *Viscozyme*[®] L a 600 MPa por 30 minutos, com uma redução de cerca de 87,5 %, enquanto para *Ultraflo*[®] L, a maior redução foi de 60 % a 600 MPa por 15 minutos. Em um estudo posterior, Pérez-López, Mateos-Aparicio e Rupérez (2017) confirmaram esses resultados, afirmando o potencial do tratamento de alta pressão combinado com o complexo enzimático *Viscozyme*[®] L.

Capítulo I

Polissacarídeos insolúveis foram obtidos de okara, o qual foi produzido a partir de farinha de soja desengordurada e extração alcalina. Esses produtos foram avaliados por meio de três processos descritos por Porfiri et al. (2017). As extrações foram realizadas utilizando dispersões de okara em água (25 % m/m). Para o experimento 1, a dispersão foi submetida à extração ácida (pH 3 por 120 minutos, a 120 °C); nos experimentos 2 e 3, as dispersões foram submetidas ao processo de homogeneização (2 válvulas de alta pressão em 3 ciclos a 1000 bar e 100 bar, na primeira e segunda, respectivamente) e ao processo de sonicação de alta intensidade (homogeneizador ultrassônico tipo sonda, 750 W por 3 minutos), respectivamente, seguida de extração ácida. Os resíduos insolúveis dessas extrações foram secos, em estufa (70 °C) ou sob vácuo (40 °C, pré-tratamento com 2-propanol), para obter polissacarídeos insolúveis. Ambos os processos atribuídos como 2 e 3, associados à secagem sob vácuo (pré-tratado com propanol), causaram uma redução nos teores de polissacarídeos insolúveis, provavelmente devido ao aumento da solubilidade dos compostos em meios ácidos, segundo os autores os processos de homogeneização e sonicação causaram alterações estruturais no okara, levando à exposição das estruturas internas dos polissacarídeos e proteínas.

A moagem de alta energia em meio úmido foi usada por Ullah et al. (2017a) para a produção de partículas nanométricas de IDF a partir de okara. Os autores avaliaram o impacto do processo na estrutura e nas propriedades físico-químicas do material obtido. Para o isolamento das IDFs do okara, a amostra foi primeiramente seca, desengordurada e desproteïnada. Na sequência, a amostra foi submetida à extração em meio ácido (pH 2,0 por 2 horas, a 60 °C), seguida por filtragem, neutralização e secagem. Uma suspensão contendo IDF moído e água deionizada (3 % de teor sólido) foi submetida a moagem úmida de alta energia (diâmetro médio de 0,8 mm, taxa de preenchimento de 80 % e velocidade de agitação de 3000 rpm), para obter as partículas de IDF. O processo de moagem causou uma grande redução no tamanho médio das partículas de 66,7 µm para 819 nm após 3 horas. Em relação à cor das IDF, após 5 horas de processamento houve aumento nos índices de luminosidade (42 para 56,3) e brancura (41,2 a 56,1). As propriedades físico-químicas foram positivamente afetadas pelo processo, com ganhos máximos em potência de inchaço (6,2 a 40,3 g/g, após 1 hora) e índice de solubilidade em água (16,4 a 33,8 %, após 6 horas). Além disso, os autores constataram que o processo de moagem causou alterações no perfil das IDF, devido à quebra das ligações intermoleculares e ao rompimento das estruturas cristalinas.

Em contrapartida, focando nas SDF em farinha de okara, Li et al. (2012b) propuseram uma técnica de extrusão com jatos otimizada com NaHCO₃ e C₆H₈O₇. A SDF extrusada foi produzida em condições ideais da seguinte forma: a farinha de okara foi enriquecida com 35 %

Capítulo I

de $C_6H_8O_7$ e umedecida (umidade = 35,5 %), a solução ficou em repouso por 20 minutos, a 25 °C; transcorrido esse período, o $NaHCO_3$ foi adicionado na mesma proporção e a mistura foi submetida ao processo de extrusão (temperatura na quarta zona extrusora de 170 °C e velocidade de parafuso de 191 rpm). A adição de precursores de CO_2 favoreceu a solubilização das fibras do okara, e o teor de SDF nos extrusados enriquecidos foi de 21,35 %, contra 4,67 % para os extrusados não enriquecidos e 2,3 % para os componentes não extrusados. Aplicando o tratamento de explosão de vapor, Li et al. (2019) também obtiveram ganhos no teor de SDF de okara, em níveis variando entre 5,19 % e 36,28 %, utilizando pressões de 0,5 MPa e 1,5 MPa por 30 segundos, respectivamente. Tal aumento foi atribuído às mudanças estruturais causadas nas fibras, bem como à formação de oligossacarídeos a partir de polissacarídeos de alta massa molar. Outra técnica que resultou em aumento das SDF em dispersões aquosas de okara (0,1 % m/m) foi a homogeneização de alta pressão empregada por Fayaz et al. (2019). Os autores verificaram um aumento progressivo da relação SDF/TDF sincronizado com o aumento na pressão de 50, 100 e 150 MPa em uma única passagem e um salto de 2,49 % para 10,72 % ao utilizarem 5 passagens (ou estágios) a 150 MPa.

Como apresentado, em geral, para a recuperação de polissacarídeos e frações de fibras do okara, os autores primeiro removem a água, os lipídios, as proteínas e os carboidratos de baixa massa molar da matéria-prima. Na sequência, com o material resultante, nomeado por alguns autores como TDF, propõe-se o fracionamento utilizando inúmeros agentes ácidos, básicos e quelantes, obtendo assim as frações desejáveis de polissacarídeos solúveis, uma fração insolúvel, celulose e IDF (Figura I.1). Diversas variações nos processos e otimizações estão disponíveis, sempre visando fins específicos (melhoria nas propriedades físico-químicas e estruturais, solubilidade, cor, capacidade antioxidante, entre outros). No entanto, enfatiza-se a geração de novos resíduos (lipídios, proteínas e carboidratos de baixa massa molar) durante a recuperação de polissacarídeos e TDF, demonstrando a subutilização dos componentes do okara. Além disso, não há evidência de conteúdo de IFs em materiais isolados.

I.4.2. Recuperação de proteínas do okara

De acordo com Wolf, Cowan e Wolff (1971) e Luthria et al. (2018), os pHs ácidos e alcalinos são comumente usados para extração de proteínas. O pH e o método de extração dependem das interações entre as proteínas e outros constituintes da matriz (óleo, carboidratos digestíveis, TDF, entre outros); além disso, a combinação de variáveis de processo deve evitar a desnaturação e degradação das proteínas (LUTHRIA et al., 2018). As condições de centrifugação e solubilidade proteica também são fatores que influenciam o processo de

Capítulo I

extração de proteínas (MA et al., 1996; VISHWANATHAN; SINGH; SUBRAMANIAN, 2011).

As proteínas do okara possuem solubilidade reduzida em comparação com a proteínas de soja, o que dificulta sua extração (LI; QIAO; LU, 2012; MA et al., 1996; VISHWANATHAN; SINGH; SUBRAMANIAN, 2011). Ma et al. (1996) sugeriram que a menor solubilidade ocorre devido à agregação das proteínas, com base nos componentes de elevada massa molar, observados através da eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio. Vishwanathan, Singh e Subramanian (2011) atribuíram esse fenômeno à presença de proteínas insolúveis no okara. Chan e Ma (1999a, 1999b) aumentaram a solubilidade proteica dos isolados de proteína de okara (OPI) empregando tratamentos ácidos e enzimáticos. Os autores atribuíram esse fenômeno à redução do tamanho das moléculas e ao aumento da afinidade entre água e proteínas, devido à exposição de grupos polares causados pela quebra das ligações peptídicas. Li et al. (2019) observaram altos níveis de dissociação de aglomerados proteicos no okara, aplicando tratamento de explosão de vapor, onde o nível de dissociação foi proporcional ao aumento da pressão e do tempo de tratamento. A Tabela I.5 detalha as propriedades físico-químicas das proteínas recuperadas do okara

Tabela I.5. Propriedades físico-químicas de produtos proteicos de okara (continua).

Produto	Proteína (g/100 g)	DH	Superfície hidrofóbica (S ₀)	NSI (%) (pH 9,0)	WHC	OHC	Densidade aparente (g/mL)	EAI (m ² /g)	ESI (min)	FAI (%)	FSI (%)		Digestão <i>in vitro</i> (%)	Referências	
					(mL/g ou g/g)	(g/g)					30	60			
												min			
OPI	77,8	0	156	22	1,73	3,45	0,48	20,8	7,2	83	33	28	78,87		
OPI por desamidação o ácida	76,2	6,1	657	43	1,12	3,46	0,51	37,2	7,6	128	33	14	77,61	(CHAN; MA, 1999a)	
	74,8	9,8	370	54	0,98	3,46	0,46	42,8	7,9	164	6	6	77,97		
	71,9	14,9	123	61	0,65	3,46	0,49	49,3	7,1	189	0	0	74,98		
OPI	77,9	0	483	9	4,01	9,29	0,09	37,2	3,1	128	73	38	79,61		
OPI por hidrólise com tripsina	76,4	4,9	168	20	5,33	6,56	0,24	51,7	1,2	38	23	9	75,00	(CHAN; MA, 1999b)	
	74,2	8,3	145	79	5,83	6,34	0,26	56,6	0,7	78	20	6	74,14		
	73,5	13,7	106	88	5,86	6,29	0,30	79,4	0,6	90	0	0	73,48		
OPI (25 °C)	58,8	na	125	20	4,3	2,9	0,29	34,2	3,9	41,0	20,2	nd	94,6	(MA et al., 1996)	
OPI (80 °C)	55,3	na	150	50	5,1	3,0	0,31	29,6	2,2	44,7	27,1	nd	94,9		
MOPC	80,0	na	nd	35	3,57	1,97	2,54	10,67	14,74	nd	Nd	nd	nd	(VISHWANATHAN et al., 2011)	

Tabela I.5. Propriedades físico-químicas de produtos proteicos de okara (conclusão).

Produto	Proteína (g/100 g)	DH	Superfície hidrofóbica (S ₀)	NSI (%) (pH 9,0)	WHC	OHC	Densidade aparente (g/mL)	EAI (m ² /g)	ESI (min)	FAI (%)	FSI (%)		Digestão <i>in vitro</i> (%)	Referências
					(mL/g ou g/g)	(%)					30	60		
OPI	79,5	0	nd	95	nd	nd	nd	27	23	70	nd	7,5	nd	(FIERENS; BRIJS; DELCOUR, 2016)
OPI por hidrólise enzimática	60,1- 83,5	2,4- 18,9	nd	100	nd	nd	nd	37- 80	36- 80	43-78	nd	4,8- 8,0	nd	
OP	68,86	nd	730,57	39,67	12,81	13,40	nd	nd	nd	14	38	nd	nd	(TAO et al., 2019)
OP por homogeneiza dor	73,19	nd	700	33,04	13,75	13,06	nd	nd	nd	18	60	nd	nd	
OP por ultrassom	77,56	nd	700	29,87	11,78	12,93	nd	nd	nd	12	85	nd	nd	
OP por cozimento a vapor	68,56	nd	735	63,34	14,69	14,08	nd	nd	nd	15	80	nd	nd	

nd = não determinado.

Fonte: Própria autoria.

Capítulo I

Ma et al. (1996) alcançaram um percentual de recuperação das proteínas do okara de 53,4 %, avaliando as potenciais variáveis de processo que poderiam influenciar a extração, como: razão sólido (okara úmido): solvente (água), em uma faixa de 1:8 a 1:20, valores de pH de 2,0 a 11,0 ajustado com 2 N NaOH ou HCl e temperatura de 20 a 90 °C. A extração foi realizada com agitação por 30 minutos, seguida de centrifugação a 9.000 x g por 30 minutos e precipitação ácida (pH 4,5) para a recuperação das proteínas extraídas. O pH e a temperatura são as principais variáveis de processo que influenciam a extração, com maior teor de proteínas sendo extraído a valores de pH altamente ácidos e básicos e altas temperaturas, uma vez que a razão sólido:solvente não afetou significativamente o processo. Com base nesses resultados, os autores optaram pelo pH 9,0, 80 °C e razão sólido:solvente de 1:10 para extração, uma vez que níveis mais elevados de pH causaram o aparecimento da cor verde, e temperaturas mais altas causaram aumento da viscosidade. Quanto à qualidade dos OPI produzidos a 80 °C, é mencionada uma redução nas propriedades emulsificantes, associadas ao aumento das capacidades espumante e de absorção de água e óleo, quando comparado com os OPI produzidos a 25 °C e isolado comercial de soja.

Empregando as variáveis de processo otimizadas e a mesma metodologia para a extração de proteínas do okara de Ma et al. (1996), Chan e Ma (1999a, 1999b) propuseram pós-tratamentos ácidos e enzimáticos, respectivamente, para os OPI obtidos, com a intenção de melhorar as propriedades funcionais. Incubação (65 °C por 48 horas) com HCl em diferentes proporções e adição de tripsina em tampão fosfato (pH 8,2) a 37 °C, durante 24 horas foram as condições utilizadas para os tratamentos ácido e enzimático dos OPI, respectivamente. Foram observados índices de atividades emulsificantes e de espuma aumentados, entretanto os tratamentos causaram perdas na estabilidade dessas propriedades, na digestibilidade *in vitro* e no teor proteico dos isolados. O perfil de aminoácidos não foi afetado pelos tratamentos.

O método de extração de proteínas do okara utilizado por Ma et al. (1996) foi alterado por Fierens, Brijs e Delcour (2016). A extração foi realizada com agitação por 1 hora, seguida de centrifugação a 10.000 x g e precipitação. Os autores mudaram o solvente empregado por Ma et al. (1996) utilizando 0,1 M NaOH, atingindo pH 12,6 durante a extração, e avaliaram duas temperaturas (60 °C e 80 °C) e o pH usado para precipitação (de 3,5 até 5,5). O pH 5,0 foi selecionado para precipitação proteica, pois não foram observadas diferenças na recuperação em valores de pH mais baixos, e um pH mais elevado não proporcionou boa recuperação, enquanto a temperatura de 60 °C permitiu uma melhor recuperação, 63 %, em comparação com 48 % a 80 °C. Os autores realizaram tratamentos utilizando cinco enzimas isoladas de microrganismos (Alcalase, Validase, Esperase, Neutrase e Flavourzyme) sendo verificados

Capítulo I

ganhos na solubilidade, juntamente com propriedades emulsificantes e formação de espuma, devido aos diferentes níveis de hidrólise promovidos por cada enzima avaliada.

Vishwanathan, Singh e Subramanian (2011) avaliaram a extração de proteínas de okara desengordurado, empregando diferentes proporções sólido:solvente (m/v), tamanhos de partículas (75 a 710 μm), e avaliando o emprego de três estágios de extração. A extração alcalina (pH 9) foi o método utilizado, e os processos de extração seguiram os mesmos passos: ajuste de pH, aquecimento com agitação a 80 °C por 30 minutos, filtração e coleta de resíduos para posterior extração. A maior recuperação proteica, 93,4 %, foi obtida empregando 3 estágios, com razões sólido:solvente de 1:20, 1:10 e 1:10, respectivamente, e tamanho de partícula < 75 μm .

Para purificar as proteínas extraídas, Vishwanathan et al. (2011) produziram concentrados proteicos a partir de okara desengordurado e extração alcalina (pH 9,0) sequencial, em 2 estágios, razões sólido:solvente de 1:20 e 1:10, seguido por microfiltração em membrana (tamanhos de poros 200 e 450 nm) ou ultrafiltração em membrana (massas molares de 50, 100 e 500 kDa). Independentemente do tipo de membrana, houve aumento semelhante nos teores de proteínas dos concentrados; a membrana de ultrafiltração de 500 kDa foi preferida porque proporcionou mais agilidade para o processo de extração.

Jankowiak et al. (2014a), com o objetivo de extrair IFs a partir de okara úmido, relataram a extração de 416 mg de proteínas por grama de okara, em pH 10,0, usando razão sólido:solvente de 1:20 (m/v), a 20 °C, sob agitação (140 rpm) por 60 minutos.

Peptídeos bioativos foram extraídos enzimaticamente, a partir de OPI, por Jiménez-Escrig et al. (2010). OPI foi produzido por extrações sequenciais em 3 estágios, a partir de okara liofilizado e desengordurado, usando água destilada como solvente (10 % m/v), pH 8,3, agitação por 30 minutos a 22 °C, seguido de centrifugação (12.000 x g/ 15 minutos) e precipitação (pH 4,5). OPI liofilizado foi submetido ao tratamento enzimático utilizando pepsina (60 minutos, pH 2) e pancreatina (195 minutos, pH 7,5). Os autores revelaram que o tratamento enzimático no OPI promoveu a liberação de peptídeos bioativos, os quais possuem benefícios para a saúde, especialmente contra doenças cardiovasculares, e também apresentam atividade antioxidante.

Tratamento enzimático em farinha de okara desengordurada foi utilizado por Figueiredo et al. (2018) para maximizar a extração de proteínas. Para este fim, utilizou-se uma mistura de carboidrases, considerando temperaturas diferentes (37 a 53 °C), concentrações enzimáticas (1,5 a 4 % m/m) e valores de pH (5,5 a 6,5). Após o tratamento enzimático, a extração de proteínas foi realizada em pH 9,0, com agitação por 30 minutos a 60 °C, seguida

Capítulo I

de centrifugação e precipitação isoelétrica, gerando o concentrado proteico de okara. O pré-tratamento enzimático em pH 6,2, 4,0 % de enzima e 53 °C maximizou a extração de proteínas, proporcionando a recuperação de 28 % das proteínas e concentrados com teor proteico de 56 %. Em trabalho subsequente, Figueiredo et al. (2019) avaliaram os parâmetros do processo (temperatura, razão enzima:substrato e pH) para a ação da enzima Alcalase nos OPI obtidos, visando o maior índice de hidrólise, ademais, investigaram a atividade antioxidante e o conteúdo de IFs. Observou-se um aumento de mais de 600 % na capacidade antioxidante dos hidrolisados de proteína produzidos a 55 °C, pH 9,0 e 5 % de razão enzima:substrato em comparação com o OPI. Os autores associaram o aprimoramento da atividade antioxidante ao aumento das IFs agliconas, e dos peptídeos bioativos contidos nos OPI hidrolisados. Empregando Alcalase e Flavourzyme juntos, Pereira et al. (2019) desenvolveram modelos preditivos para o grau de hidrólise enzimática em concentrados proteicos, produzidos utilizando a metodologia proposta por Figueiredo et al. (2018), 5 % da mistura enzimática, composta por 90 % Alcalase e 10 % Flavourzyme, a 40 °C e pH 7,1 foram os parâmetros que resultaram no melhor índice de hidrólise (22 %), também esses hidrolisados, apresentaram todos os aminoácidos essenciais e potenciais antioxidantes atenuados, em cerca de 40 %.

Peptidases foram usadas por Sbroggio et al. (2016), visando obter hidrolisados proteicos de okara. Para atingir esse objetivo, os autores utilizaram okara úmido e água (razão sólido:solvente, 1:2 m/m), sob agitação constante e proporção enzima:substrato de 10 g de enzima/100 g de proteína. As temperaturas de trabalho e os valores de pH foram: 55 °C e 9,0 para Alcalase e 50 °C e 7,0 para Flavourzyme, respectivamente. O aquecimento (85 °C/ 20 minutos) foi utilizado para conter a hidrólise, seguido de resfriamento, centrifugação (5.228 x g/ 4 °C/ 20 minutos) para separação das fases. Os autores relataram que os hidrolisados proteicos produzidos com as duas enzimas resultaram em ganhos no potencial antioxidante, os quais foram proporcionais ao nível de hidrólise. O uso de Alcalase em comparação com a Flavourzyme resultou em um nível de hidrólise mais acentuado. Hidrolisados proteicos de okara foram produzidos por Justus et al. (2019) utilizando endo e exopeptidases, combinadas ou individualmente. O maior valor de recuperação proteica do okara foi de 62,5 % utilizando Flavourzyme (pH 7,0, 40 °C, 2,5 % enzima:substrato), seguida do tratamento com Alcalase (pH 9,0, 50 °C, 2,5 % enzima:substrato).

Cozimento a vapor (120 °C por 20 minutos, em pH 12,0), homogeneização (500 bar, 3 vezes) e ultrassom (400 W por 30 minutos, a 50 °C) foram avaliados por Tao et al. (2019) como tratamentos prévios para a extração de proteínas de okara. O objetivo do trabalho foi investigar os efeitos dos pré-tratamentos sobre as características estruturais e propriedades

Capítulo I

funcionais das proteínas extraídas do okara. Os tratamentos foram realizados em okara desengordurado, após estes, a extração foi realizada em pH 12,0, razão sólido:solvente de 1:20 (m/v), com agitação por 60 minutos a 50 °C, seguida de centrifugação e precipitação (pH 4,2). O pré-tratamento ultrassônico permitiu a extração da maior quantidade de proteínas do okara (77,56 %), seguida pela homogeneização (73,19 %), amostra sem pré-tratamento (68,86 %) e cozimento a vapor (68,56 %). Em relação às características estruturais, apenas a estrutura terciária foi afetada, o que afetou positivamente as propriedades funcionais.

Preece et al. (2017a, 2017b) avaliaram o emprego de homogeneização sob alta pressão e assistidos por ultrassom, respectivamente, para extração de proteínas, a partir de dispersões de okara em água. A dispersão (13,7 % em peso) a 50 °C foi submetida a um homogeneizador de 2 estágios, a 100 MPa de pressão, com até 5 passagens pelo equipamento. Quanto à extração assistida por ultrassom, foi empregado um sistema de sonda (20 kHz, 400 W) em 0; 0,5; 1; 5 e 15 minutos em uma dispersão contendo 2,85 % de sólidos. Um rendimento de extração proteica de 50 % foi alcançado na primeira passagem pelo homogeneizador, com consequente diminuição do tamanho das partículas. Nas outras passagens, não houve alterações no teor de proteínas extraídas, porém o tamanho das partículas foi aumentado. Em relação à extração assistida por ultrassom, observou-se 70 % de rendimento proteico, após 15 minutos de tratamento ultrassônico com consequente elevação na temperatura do meio de 50 °C para 90 °C.

Dispersões aquosas de okara (0,1 % m/m) foram tratadas com homogeneização de alta pressão e as proteínas foram recuperadas por centrifugação refrigerada (12.000 x g/ 10 minutos/ 4 °C) por Fayaz et al. (2019). Os autores avaliaram 3 pressões (50, 100 e 150 MPa) em 1 passo e 150 MPa em 5 passos. A homogeneização de alta pressão aumentou a recuperação das proteínas do okara em níveis proporcionais ao aumento da pressão, de 11 % (amostra não tratada) para 37 %, 61 % e 66 % em 1 passe, respectivamente, e em 5 passagens o rendimento da extração de proteínas atingiu 90 %. A partir de análises da conformação proteica, os autores inferiram que o ganho na extração de proteínas foi devido as mudanças estruturais nas proteínas e à quebra de ambas as ligações, tanto com as fibras, quanto a dos aglomerados proteicos formados durante a produção do WSSE.

A extração de proteínas de okara seco com água subcrítica foi investigada por Wiboonsirikul et al. (2013). Os autores avaliaram as seguintes variáveis do processo: temperatura (170, 200, 240 e 260 °C) e tempo (2 a 120 minutos). No entanto, a pressão do sistema a cada temperatura não foi relatada. O maior teor de proteínas extraídas e atividade antioxidante foram encontrados a 240 e 260 °C nos minutos iniciais do processo (< 5 minutos),

Capítulo I

enquanto as temperaturas mais baixas não permitiram o mesmo rendimento de extração e atividade antioxidante, mesmo com tempos de extração prolongados.

Em geral, os estudos realizados até o momento, utilizaram pH alcalino (8,3-12,6) e temperaturas variando de 20 °C a 80 °C para a extração de proteínas do okara. Além disso, é possível destacar as estratégias utilizadas para aumentar a solubilidade proteica, utilizando pré-tratamentos no okara ou pós-tratamentos nas proteínas extraídas. No entanto, estudos adicionais são ainda necessários, visando utilizar processos seguros e baratos para maximizar a extração de proteínas do okara, como também proporcionar a recuperação simultânea de proteínas e IFs.

I.4.3. Recuperação do óleo de okara

Para a extração de óleo de oleaginosas vegetais, dois processos principais, além de sua combinação, são comumente empregados: prensagem e extração com solventes orgânicos (ANDERSON, 2005). No caso da soja e seus coprodutos, a extração com solventes orgânicos é indicada, devido ao baixo teor de óleo; uma vez que a prensagem é indicada para matrizes de médio a alto teor de óleo (> 25 % por massa) (ANDERSON, 2005). Altas temperaturas, próximas ao ponto de ebulição do solvente, são empregadas na extração com solventes para aumentar a transferência de massa entre solvente e material oleaginoso, devido aos ganhos gerados nas propriedades físicas (solubilidade, viscosidade e difusividade) (TREYBAL, 1981).

De acordo com Anderson et al. (2005) e Wolf, Cowan e Wolff (1971), o solvente mais adequado para extração de óleo de soja é a hexana, a qual é uma mistura de hidrocarbonetos compostos de isômeros de n-hexano, com uma faixa de ebulição de aproximadamente 70 °C. No entanto, o n-hexano é bioconvertido à hexano-2,5-diona, um composto relacionado a distúrbios neurológicos (DECAPRIO; OLAJOS; WEBER, 1982). Além disso, este solvente está relacionado a questões ambientais e tem sido relatado como perigoso e altamente poluente (EPA, 2001). Devido às desvantagens relacionadas a hexana, há uma demanda crescente por solventes seguros, renováveis e alternativos para a extração de óleo de soja com potencial para aplicação na extração de óleo de okara. Como potenciais substitutos, etanol absoluto e hidratado (RODRIGUES; ARACAVAL; ABREU, 2010; TODA; SAWADA; RODRIGUES, 2016; TUNTIWIWATTANAPUN; TONGCUMPOU; WIESENBORN, 2016), etanol com biodiesel etílico, como cosolvente (DAGOSTIN; CARPINÉ; CORAZZA, 2015), água com enzimas (CHENG et al., 2018; QIAN et al., 2019), água mais óleo de soja refinado (TU; WU, 2019), CO₂ supercrítico (WILKINSON et al., 2014), metanol, isopropanol e acetona (absolutos ou combinados) (TUNTIWIWATTANAPUN; TONGCUMPOU; WIESENBORN, 2016), e etanol pressurizado (RODRIGUES; CARDOZO-FILHO; SILVA, 2017) podem ser destacados.

Estudos que examinam a extração de óleo de okara são incipientes, apesar da quantidade significativa desse composto contido neste material, como mostra a Tabela I.1 (5,90-25,70 %), e a alta semelhança em termos do perfil lipídico com óleo de soja. Quintana, Gerbino e Gómez-Zavaglia (2018) extraíram óleo de okara liofilizado usando um sistema Soxhlet e éter dietílico como solvente. O óleo extraído foi utilizado para a formulação de emulsões estáveis de óleo/água, visando a proteção de *Lactobacillus plantarum* ao longo da vida útil. Os autores relataram que o óleo de okara é altamente estável e adequado para a formulação de emulsões, para transportar microrganismos ou outros compostos bioativos. A estabilidade foi atribuída ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados e a autoproteção contra oxidação, devido às IFs que provavelmente estão presentes no óleo.

Preece et al. (2017a, 2017b), com o objetivo de extrair proteínas a partir de dispersões de okara, utilizaram processos de homogeneização de alta pressão e tratamento ultrassônico, respectivamente, e extraíram simultaneamente o óleo contido no material. O processo de homogeneização foi realizado a 80 °C, 100 MPa e 2 estágios, e resultou em um aumento no rendimento da extração de óleo de 55 % para 86 %. Além disso, o tratamento ultrassônico proporcionou 75 % de rendimento de óleo, através do uso de um sistema de sonda (20 kHz, 400 W) por 15 minutos.

O método de extração com fluidos supercríticos, utilizando CO₂, foi empregado para a extração de óleo de okara por Quitain et al. (2006). Os autores investigaram as variáveis de processo: pressão (12-30 MPa), temperatura (40-80 °C) e adição de etanol como cosolvente (0-10 %), na composição e recuperação do óleo. Utilizando uma pressão de 20 MPa, concentração de etanol de 10 %, e temperatura de 40 °C, os autores obtiveram uma recuperação de 63,5 % de óleo de okara e além disso extraíram altos teores de IFs e compostos fenólicos.

I.4.4. Extração de isoflavonas de okara

Para a eficiente extração e recuperação de IFs de soja e seus derivados, recomenda-se que o solvente apresente alta afinidade pelas IFs e baixa afinidade com o material. A preparação da amostra para extração favorece a liberação de IFs da matriz sólida; outros fatores também influenciam o processo de extração, como temperatura, tempo, razão sólido:solvente e pH (FARAJ; VASANTHAN, 2004; JANKOWIAK et al., 2014a; ROSTAGNO et al., 2009).

Os principais solventes orgânicos utilizados para a extração de IFs são: etanol, metanol, acetonitrila e acetona, combinados, puros, aquosos, acidificados ou não (ROSTAGNO et al., 2009). No entanto, a água tem sido estudada como um solvente preferencial para a extração de IFs de soja e coprodutos (COSCUETA; MALPIEDI; NERLI, 2018; JANKOWIAK

Capítulo I

et al., 2014b, 2014a, 2015; SEVILLANO et al., 2014). Estudos que aplicam a água como solvente para a extração de IFs são de suma importância, pois este é um solvente renovável e de baixo custo.

Existem vários métodos de extração de IFs, tais como: simples agitação (JACKSON et al., 2002; JANKOWIAK et al., 2014a, 2014b, 2015), Soxhlet (NKURUNZIZA; PENDLETON; CHUN, 2019), extração assistida por ultrassom (UAE) (HANDA et al., 2014; ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2003), extração com líquido pressurizado (PLE) (NKURUNZIZA; PENDLETON; CHUN, 2019; ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2004), extração com fluido supercrítico (QUITAIN et al., 2006), extração com sistemas aquosos bifásicos (CORDISCO et al., 2016; COSCUETA; MALPIEDI; NERLI, 2018), extração em fase sólida (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2005), entre outros.

Como mencionado anteriormente, o solvente e o método de extração têm grande influência na extração e recuperação das IFs de okara. Genovese, Davila e Lajolo (2006) extraíram 528 µg de IFs agliconas/g okara úmido, com agitação por 2 horas a 4 °C, razão sólido:solvente 1:20 (m/v), e solução metanol:água (80:20 %, v/v), como solvente. Jankowiak et al. (2014b) obtiveram conteúdo de IFs de ~ 923, 849, 907 µg/g okara úmido, utilizando soluções de acetonitrila:água (50:50 %, v/v), metanol:água (50:50 %, v/v) e etanol:água (50:50 %, v/v), respectivamente, também aplicando razão sólido:solvente de 1:20 (m/v) e agitação por 2 horas, em temperatura ambiente. No entanto, nestes estudos, não foram aplicadas etapas subsequentes ao sólido remanescente; portanto, não é possível garantir que o total de IFs presentes no okara foi extraído. Figueiredo et al. (2019) e Justus et al. (2019), avaliaram os teores de IFs contidas em hidrolisados proteicos de okara. Os autores obtiveram 4.808,84 µg/g de okara seco e 375,70 µg/g de okaraseco, respectivamente, utilizando solução etanol:água:acetonitrila (1:1:1, v/v/v) para a extração.

Utilizando extração à temperatura ambiente e uma solução de acetonitrila: 0,1 N HCl (razão 5:1), razão sólido:solvente 1:24 (m/v), com agitação durante toda a noite, Jackson et al. (2002) avaliaram o conteúdo e o perfil das IFs retidas e subutilizadas do okara, em relação à soja utilizada para a produção do WSSE. Os autores extraíram 355.000 µg IFs/g de okara seco, o que representou 26,79 % das IFs do material inicial. Os autores observaram que as etapas envolvendo calor e alterações físicas alteram o perfil das IFs (conversão de grupos glicosídeos para agliconas). A ampla conversão de IFs β-glicosídeos em agliconas foi observada por Santos et al. (2018), após a fermentação sólida de okara fresco com *Saccharomyces cerevisiae*, por 72 horas. A extração das IFs foi realizada em okara liofilizado, desengordurado e fermentado

Capítulo I

utilizando uma solução metanólica (metanol:água, 80:20 % v/v), durante 2 horas com agitação à temperatura ambiente, seguida de centrifugação e quantificação por HPLC.

O impacto da secagem do okara no conteúdo e perfil das IFs foi investigado por Muliterno et al. (2017), Guimarães et al. (2020) e Surel e Couple (2005). Surel e Couple (2005) extraíram as IFs a partir de okara que foi liofilizado ou seco (85 °C ou 100 °C), usando solução aquosa de metanol (80:20 % (v/v)), com agitação por 2 horas e quantificação por HPLC. Os autores concluíram que os diferentes métodos de secagem não afetaram o teor total de IFs. Por outro lado, esses métodos causaram alterações no perfil das IFs, especialmente nas formas malonilglicosídeos, que foram reduzidas quando o okara foi seco a 100 °C. Esses resultados levaram os autores a utilizar um processo de secagem mais brando para isolar as TDF do okara, para evitar possíveis alterações no perfil das IFs nele contidas. No entanto, o conteúdo de IFs extraído junto as fibras não foi avaliado. Por outro lado, Muliterno et al. (2017) observaram uma grande redução no teor de IFs em okara seco por 10 horas, a 70 °C, tal redução foi de aproximadamente 60 % nas formas β -glicosídeos e agliconas, e 50 % nas formas malonilglicosídeos. Resultados semelhantes foram obtidos por Guimarães et al. (2020), os quais encontraram apenas traços das formas malonilglicosídeos e ausência de formas de β -glicosídeos, em amostras de okara desengordurado e seco em estufa de convecção forçada de ar, a 70 °C, por 12 horas, e em um forno de micro-ondas (800 W) por 60 minutos, respectivamente, frente a amostras de okara desengordurado e liofilizado. As reduções no conteúdo total de IFs foram de 9 % para o tratamento em convecção forçada de ar e 11 % no forno de microondas. Ambos os autores utilizaram para a extração das IFs do okara seco e desengordurado, soluções (água:etanol:acetona (1:1:1, v/v/v)) como solvente, 200 mg de sólido e 4 mL de solvente, com agitação a cada 15 minutos por 1 hora à temperatura ambiente, seguido de tratamento ultrassônico por 15 minutos, centrifugação e quantificação das IFs por UPLC.

A extração das IFs de okara usando solventes alternativos, seguros, eficientes e ecologicamente corretos está em ascensão. Jankowiak et al. (2014b) investigaram a extração de IFs a partir de okara úmido e seco, utilizando diferentes proporções de etanol e água como solventes, com agitação por 2 horas em temperatura ambiente e razão sólido:líquido 1:10 (m/v). Os autores extraíram os mais altos níveis de IFs (~ 900 μ g/g okara) utilizando concentrações de etanol entre 50 e 70 % para okara úmido, e concentrações de etanol entre 40 e 60 % para okara seco. Os autores propuseram que as IFs podem ser extraídas do okara úmido, evitando assim possíveis alterações no perfil das IFs devido à etapa de secagem; além disso, os autores sugeriram o uso de soluções aquosas contendo concentrações de etanol entre 50 e 60 %, uma vez que essa faixa permite a extração de todas as formas de IFs (malonil, β -glicosídeos e

Capítulo I

agliconas). O uso de água pura como solvente foi verificado por Jankowiak et al. (2014a); os ensaios de extração de IFs foram realizados utilizando okara úmido com agitação por 1 hora, avaliando as seguintes variáveis de processo: razão sólido:solvente (1 (sólido seco): 20 a 100 (volume de água pura)), temperatura (20 a 95 °C) e pH (2 a 10). As IFs do okara, também foram extraídas da mesma forma usando solução etanol:água (70:30 %, v/v) a 20 °C, para comparação. A solução etanólica extraiu 1.018 µg de IFs/g okara, e sob as mesmas condições de extração utilizando água, foram extraídos 479 µg de IFs/g okara; no entanto, ao aumentar o volume de água, os autores alcançaram uma extração de 700 µg de IFs/g okara, a uma razão de 1:50 (m/v), sem alterações na quantidade de IFs extraídas, com volumes maiores de água. A temperatura não impactou o teor total de IFs extraídas; no entanto, a 50 °C, foi alcançada a extração máxima de todas as formas de IFs. O pH 10 apresentou alta extratibilidade de IFs (900 µg de IFs), mas este pH resultou no decréscimo de IFs da classe malonil. Um novo protocolo para extração de IFs de okara úmido pode ser sugerido com base nos estudos mencionados, utilizando um pH alcalino, temperatura de 50 °C e razão sólido:solvente de 1:50 (m/v).

Sevillano et al. (2014) propuseram o fracionamento de IFs de okara, em pH alcalino (10), razão sólido:solvente de 1:20 (m/v), com agitação por 1 hora a 50 °C, seguida de redução no pH (4,5), visando separar as proteínas. Para a purificação do extrato (separação das IFs e proteínas remanescentes), foram realizados testes com seis resinas poliméricas macroporosas disponíveis comercialmente, as quais atuaram como adsorventes. Os autores verificaram que a formação de uma bicamada ocorreu na adsorção e a resina XAD4 mostrou equilíbrio com todos os grupos de IFs. No mesmo contexto, Jankowiak et al. (2015) propuseram um processo integrado de extração e purificação de IFs de okara utilizando resina Amberlite XAD7HP, água como solvente extrator, pH 7,0, razão sólido:solvente 1:20 (m/m), e etanol aquoso como eluente para as IFs adsorvidas na resina.

Água e solução metanólica (80:20 (v/v), metanol:água) foram empregados como solventes por Yu e Yang (2019), para extrair IFs de okara seco. Os autores utilizaram agitação (120 rpm) durante 1 hora, razão sólido:solvente 1:50 (m/v) a 35 °C e HPLC, para a extração e quantificação das IFs, respectivamente. A solução metanólica mostrou-se mais eficiente, extraíndo cerca de 400 µg de IFs/g de okara seco, contra água (~ 310 µg de IFs/g okara seco). Essa redução no teor de IFs deveu-se ao menor teor de IFs β-glicosídeos recuperados pela água, no entanto, a água mostrou-se um solvente eficaz para a recuperação das formas agliconas. Os autores avaliaram o uso de extração assistida por ultrassom (300 W/ 40 kHz), utilizando água como solvente e analisando as variáveis: temperatura (35, 50 e 60 °C), razão sólido:solvente (30, 50 e 70 mL para 1 grama de okara seco) e tempo de processamento (1, 2 e 3 horas).

Capítulo I

Empregando a extração com água sob agitação simples, o tratamento ultrassônico aumentou a extração em 42 %, utilizando os parâmetros de processo: razão sólido:solvente, 1:50 (m/v), 60 °C e 3 horas.

As variáveis de processo para a extração de IFs de okara seco com água subcrítica foram avaliadas por Nkurunziza, Pendleton e Chun (2019). As variáveis avaliadas foram as seguintes: pressão (2 a 5 MPa); temperatura (100 a 200 °C), razão sólido:líquido (10 a 30 g/mL) e 5 minutos de extração. Com os parâmetros otimizados, o tempo de extração (5 a 275 minutos) foi avaliado. Um total de 938,5 µg IFs/g okara seco foram extraídos em 5 minutos, utilizando as variáveis otimizadas: pressão 3,98 MPa, temperatura de 146 °C e razão sólido:solvente 1:20 (m/v). Dessas IFs, 891,1 µg eram β-glicosídeos e 47,4 µg agliconas. O teor máximo de IFs (1.084,3 µg/g okara seco) foi obtido estendendo o tempo de extração para 125 minutos; também, após 245 minutos, observou-se o maior teor de agliconas (384,9 µg/g okara seco). Assim, os autores relataram que o tempo ideal de extração, para a recuperação total das IFs e a conversão de formas glicosiladas em agliconas foi de 213,5 minutos.

Quitain et al. (2006) empregando extração com fluido supercrítico (CO₂) para recuperação de óleo de okara, também extraíram aproximadamente 180 µg de genisteína e daidzeína/g de extrato, utilizando os seguintes parâmetros: 30 MPa, 40 °C e 5 % de etanol como cosolvente.

Como exposto nos estudos e na Tabela I.3, o okara é uma fonte potencial de IFs; há uma ampla gama de métodos e solventes utilizados para a recuperação de IFs de okara. Enfatiza-se o uso da água para este fim; no entanto, acredita-se que várias etapas de extração são requeridas, e o pré-tratamento da matriz sólida é necessário para aumentar a solubilidade desses compostos na água. Além disso, é possível utilizar temperaturas amenas para extrair IFs, evitando assim alterações no perfil destas.

I.5. Conclusões

Okara está emergindo como uma fonte promissora de proteínas, polissacarídeos digestíveis, TDF, IFs e óleo, devido aos altos níveis desses nutrientes que permanecem neste coproduto da indústria de WSSE, como apresentado nesta revisão, a qual se concentra nos processos de recuperação dos componentes do okara descritos na literatura. A recuperação dos componentes do okara é uma alternativa viável porque a incorporação desse coproduto em alimentos para humanos é possível, mas em baixas quantidades devido à presença de substâncias nutricionalmente indesejáveis e às características sensoriais negativas atribuídas aos alimentos à base de soja. Diversos trabalhos, como apresentado nesta revisão, propõem

Capítulo I

técnicas viáveis para a recuperação de um composto específico e pré-tratamentos destinados à melhoria do rendimento da extração e das propriedades (perfil, funcionalidade e estrutura) dos componentes isolados. No entanto, durante o isolamento de um composto alvo, ocorre a subutilização de outros compostos. Por exemplo, durante a recuperação das TDF e polissacarídeos, proteínas e lipídios são previamente removidos e, durante a produção de OPI de okara, as IFs são geralmente descartadas na etapa de precipitação. Assim, é necessário projetar novos processos voltados para o reaproveitamento global dos componentes do okara, como fracionamento evitando a geração de novos resíduos agroindustriais. Além do foco no processo, é necessário utilizar solventes seguros e renováveis, como água e álcoois de cadeia curta, para viabilizar a aplicação desses compostos em produtos farmacêuticos e alimentícios.

I.6. Referências bibliográficas

- AACC. The definition of dietary fiber. **Cereal Foods World**, v. 46, n. 3, p. 112–129, 2001.
- AMBAWAT, S.; KHETARPAUL, N. Comparative assessment of antioxidant, nutritional and functional properties of soybean and its by-product okara. **Annals of Phytomedicine: An International Journal**, v. 7, n. 1, p. 112–118, 2018.
- ANDERSON, D. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 6. ed. Hoboken, New Jersey: A. John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 1–56.
- ANDERSON, J. J. B. et al. Effects of phyto-oestrogens on tissues. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 75–116, 24 jun. 1999.
- APPELT, P. et al. Development and characterization of cereal bars made with flour of jabuticaba peel and okara. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 37, n. 1, p. 117, 6 jan. 2015.
- BEDANI, R. et al. Incorporation of soybean by-product okara and inulin in a probiotic soy yoghurt: texture profile and sensory acceptance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 1, p. 119–125, 15 jan. 2014.
- BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 2–3, p. 157–177, maio 2001.
- BRZEZINSKI, A. et al. Short-term effects of phytoestrogen rich diet on postmenopausal women. **Menopause**, v. 4, n. 2, p. 89–94, 1997.
- CHAN, W. -M.; MA, C. -Y. Acid modification of proteins from soymilk residue (okara). **Food Research International**, v. 32, n. 2, p. 119–127, mar. 1999a.
- CHAN, W. -M.; MA, C. -Y. Modification of proteins from soymilk residue (Okara) by trypsin. *Journal of Food Science*, v. 64, n. 5, p. 781–786, 1999b.
- CHENG, M. H. et al. Environmental impact assessment of soybean oil production: Extruding-exPELLing process, hexane extraction and aqueous extraction. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 58–68, 2018.

CLEMENS, R. A. et al. Functionality of sugars in foods and health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 3, p. 433–470, maio 2016.

CORDISCO, E. et al. Integrated extraction and purification of soy isoflavones by using aqueous micellar systems. **Food Chemistry**, v. 213, p. 514–520, dez. 2016.

COSCUETA, E. R.; MALPIEDI, L. P.; NERLI, B. B. Micellar systems of aliphatic alcohol ethoxylates as a sustainable alternative to extract soybean isoflavones. **Food Chemistry**, v. 264, n. May, p. 135–141, out. 2018.

DAGOSTIN, J. L. A.; CARPINÉ, D.; CORAZZA, M. L. Extraction of soybean oil using ethanol and mixtures with alkyl esters (biodiesel) as co-solvent: Kinetics and thermodynamics. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 69–75, 2015.

DECAPRIO, A. P.; OLAJOS, E. J.; WEBER, P. Covalent binding of a neurotoxic n-hexane metabolite: Conversion of primary amines to substituted pyrrole adducts by 2,5-hexanedione. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 440–450, 1982.

ĐUROVIĆ, S. et al. The impact of high-power ultrasound and microwave on the phenolic acid profile and antioxidant activity of the extract from yellow soybean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 223–231, out. 2018.

EL-SAIDY, D. M. S. D. Effect of using okara meal, a by-product from soymilk production as a dietary protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) mono-sex males. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 380–386, 2011.

EPA. **Final air toxics rule for solvent extraction in vegetable oil production**. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/vegetable_oil_fact_sheet.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2019.

ESPINOSA-MARTOS, I.; RUPÉREZ, P. Indigestible fraction of okara from soybean: composition, physicochemical properties and *in vitro* fermentability by pure cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 685–693, 2009.

ESSAWY, A. E. et al. Soybean isoflavone ameliorates cognitive impairment, neuroinflammation, and amyloid β accumulation in a rat model of Alzheimer's disease. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 25, p. 26060–26070, 5 set. 2019.

FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits. **Food Reviews International**, v. 20, n. 1, p. 51–75, 2004.

FAYAZ, G. et al. Impact of high-pressure homogenization on physical properties, extraction yield and biopolymer structure of soybean okara. **LWT- Food Science and Technology**, v. 113, n. April, p. 108324, 2019.

FIERENS, E.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. Emulsifying and foaming properties of okara protein hydrolysates. **Cereal Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 71–76, 2016.

FIGUEIREDO, V. R. G. de et al. Action of multi-enzyme complex on protein extraction to obtain a protein concentrate from okara. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. April, p. 1508–1517, 2018.

Capítulo I

- FIGUEIREDO, V. R. G. de et al. Production of hydrolysate of okara protein concentrate with high antioxidant capacity and aglycone isoflavone content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.
- GAO, J.; SI, C.; HE, Y. Application of soybean residue (okara) as a low-cost adsorbent for reactive dye removal from aqueous solution. **Desalination and Water Treatment**, v. 53, n. 8, p. 2266–2277, 20 fev. 2015.
- GENOVESE, M. I.; DAVILA, J.; LAJOLO, F. M. Isoflavones in processed soybean products from Ecuador. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 853–859, set. 2006.
- GIRI, S. K.; MANGARAJ, S. Processing influences on composition and quality attributes of soymilk and its powder. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 3, p. 149–164, 2012.
- GRIZOTTO, R. K. et al. Physical, chemical, technological and sensory characteristics of Frankfurter type sausage containing okara flour. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 3, p. 538–546, 17 jul. 2012.
- GUIMARÃES, R. M. et al. Okara: A soybean by-product as an alternative to enrich vegetable paste. **LWT- Food Science and Technology**, v. 92, n. February, p. 593–599, 2018.
- GUIMARÃES, R. M. et al. Evaluating technological quality of okara flours obtained by different drying processes. **LWT- Food Science and Technology**, v. 123, n. October 2019, p. 109062, abr. 2020.
- GUO, J. et al. Functional daidzein enhances the anticancer effect of topotecan and reverses BCRP-mediated drug resistance in breast cancer. **Pharmacological Research**, v. 147, n. 2, p. 104387, 2019.
- HANDA, C. L. et al. Optimization of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. **Food Chemistry**, v. 152, p. 56–65, 2014.
- HARTHAN, L. B.; CHERNEY, D. J. R. Okara as a protein supplement affects feed intake and milk composition of ewes and growth performance of lambs. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 171–174, 2017.
- HAWA, A.; SATHEESH, N.; KUMELA, D. Nutritional and anti-nutritional evaluation of cookies prepared from okara, red teff and wheat flours. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 5, p. 2042–2050, 2018.
- HERMANN, J. R.; HONEYMAN, M. S. Okara: A possible high protein feedstuff for organic pig diets. **Iowa State University Animal Industry Report**, v. 1, n. 1, [s.l: s.n.].
- HO, S. C. et al. Soy protein consumption and bone mass in early postmenopausal Chinese women. **Osteoporosis International**, v. 14, n. 10, p. 835–842, 1 out. 2003.
- HUANG, C. -C. et al. Anti-Photoaging effects of soy isoflavone extract (aglycone and acetylglucoside form) from soybean cake. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 4782–4795, 24 nov. 2010.
- HU, C. et al. Biochemistry and use of soybean isoflavones in functional food development. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 12, p. 2098–2112, 2020.

Capítulo I

- HU, Y. et al. Soybean residue (okara) fermentation with the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Food Bioscience**, v. 31, p. 100439, out. 2019.
- JACKSON, C. -J. C. et al. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1117–1123, maio 2002.
- JANKOWIAK, L. et al. Isoflavone extraction from okara using water as extractant. **Food Chemistry**, v. 160, p. 371–378, 2014a.
- JANKOWIAK, L. et al. The potential of crude okara for isoflavone production. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 166–172, 2014b.
- JANKOWIAK, L. et al. A process synthesis approach for isolation of isoflavones from okara. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 2, p. 691–699, 2015.
- JIANG, Y. et al. Influence of the addition of potato, okara, and konjac flours on antioxidant activity, digestibility, and quality of dumpling wrappers. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A. et al. Health-promoting activities of ultra-filtered okara protein hydrolysates released by *in vitro* gastrointestinal digestion: Identification of active peptide from soybean lipoxygenase. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 4, p. 655–663, 2010.
- JUSTUS, A. et al. Combined uses of an endo- and exopeptidase in okara improve the hydrolysates via formation of aglycone isoflavones and antioxidant capacity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 115, n. July, p. 108467, 2019.
- KAMBLE, D. B. et al. Physicochemical properties, *in vitro* digestibility and structural attributes of okara-enriched functional pasta. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 12, p. 1–9, 2019.
- KAMBLE, D. B.; RANI, S. Bioactive components, *in vitro* digestibility, microstructure and application of soybean residue (okara): a review. **Legume Science**, v. 2, n. 1, p. 2–10, 2020.
- KANG, M. J.; BAE, I. Y.; LEE, H. G. Rice noodle enriched with okara: Cooking property, texture, and *in vitro* starch digestibility. **Food Bioscience**, v. 22, n. August 2017, p. 178–183, abr. 2018.
- KATAYAMA, M.; WILSON, L. A. Utilization of okara, a byproduct from soymilk production, through the development of soy-based snack food. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 3, p. S152–S157, abr. 2008.
- KHARE, S. K.; JHA, K.; GANDHI, A. P. Citric acid production from Okara (soy-residue) by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 323–25, 1995.
- LI, B. et al. Isolation and structural characterisation of okara polysaccharides. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 753–761, 2012a.
- LI, B. et al. Effect of steam explosion on dietary fiber, polysaccharide, protein and physicochemical properties of okara. **Food Hydrocolloids**, v. 94, n. February, p. 48–56, 2019.

Capítulo I

LI, B.; QIAO, M.; LU, F. Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue). **Food Reviews International**, v. 28, n. 3, p. 231–252, 2012.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 31–67, jan. 1994.

LI, H. et al. A novel *in-situ* enhanced blasting extrusion technique - Extrudate analysis and optimization of processing conditions with okara. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 80–88, 2012b.

LI, P. et al. Isolation and Characterization of microfibrillated cellulose from agro-industrial soybean residue (Okara). **BioResources**, v. 13, n. 4, p. 7944–7956, 2018.

LIU, X. et al. Erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from okara pretreated with the in-house enzyme pools of fungi. **Bioresource Technology**, v. 244, n. August, p. 1089–1095, nov. 2017.

LU, F.; LIU, Y.; LI, B. Okara dietary fiber and hypoglycemic effect of okara foods. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, n. 2, p. 126–132, out. 2013.

LUTHRIA, D. L.; NATARAJAN, S. S. Influence of sample preparation on the assay of Isoflavones. **Planta Medica**, v. 75, p. 704-710, 2009.

LUTHRIA, D. L. et al. Recent update on methodologies for extraction and analysis of soybean seed proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5572–5580, dez. 2018.

MA, C.-Y. et al. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). **Food Research International**, v. 29, n. 8, p. 799–805, dez. 1996.

MATEOS-APARICIO, I. et al. Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 245–250, set. 2010a.

MATEOS-APARICIO, I. et al. Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1467–1470, nov. 2010b.

MATEOS-APARICIO, I.; MATEOS-PEINADO, C.; RUPÉREZ, P. High hydrostatic pressure improves the functionality of dietary fibre in okara by-product from soybean. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 3, p. 445–450, 2010.

MBAEYI-NWAOHA, I. E.; UCHENDU, N. O. Production and evaluation of breakfast cereals from blends of acha and fermented soybean paste (okara). **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 50–70, 25 jan. 2016.

MORAES FILHO, M. L.; BUSANELLO, M.; GARCIA, S. Optimization of the fermentation parameters for the growth of *Lactobacillus* in soymilk with okara flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 456–464, dez. 2016.

MORAES FILHO, M. L. et al. Soymilk with okara flour fermented by *Lactobacillus acidophilus*: Simplex-centroid mixture design applied in the elaboration of probiotic creamy sauce and storage stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, n. October 2017, p. 339–345, 1 jul. 2018.

Capítulo I

- MULITERNO, M. M. et al. Conversion/degradation of isoflavones and color alterations during the drying of okara. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 512–519, 2017.
- NAIM, M. et al. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 1174–1177, nov. 1976.
- NAKAMURA, A. et al. Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 10, p. 2249–2258, 2001.
- NGUYEN, T. H. et al. Bioethanol production from soybean residue via separate hydrolysis and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, p. 513–523, 2018.
- NKURUNZIZA, D.; PENDLETON, P.; CHUN, B. S. Optimization and kinetics modeling of okara isoflavones extraction using subcritical water. **Food Chemistry**, v. 295, n. May, p. 613–621, 2019.
- NORIHAM, A. et al. Potential use of Okara as meat replacer in beef sausage. **Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)**, v. 78, n. 6–6, p. 13–18, 2016.
- OLIVEIRA, R. B. S. de et al. Quality of beef burger with addition of wet okara along the storage. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 6, p. 706–717, dez. 2016.
- ORTS, A. et al. Use of okara in the bioremediation of chlorpyrifos in soil: Effects on soil biochemical properties. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 172–176, 1 dez. 2017.
- OSTERMANN-PORCEL, M. V. et al. Incorporation of okara into gluten-free cookies with high quality and nutritional value. **Journal of Food Quality**, v. 2017, 2017a.
- OSTERMANN-PORCEL, M. V. et al. Quality assessment of dried okara as a source of production of gluten-free flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 9, p. 2934–2941, jul. 2017b.
- O'TOOLE, D. K. Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production - A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, 363-371, 1999.
- O'TOOLE, D. K. Soybean, Soymilk, Tofu, and Okara. **Reference Module in Food Science**, v. 3, p. 185–195, 2016.
- PAN, W. -C.; LIU, Y. -M.; SHIAU, S. -Y. Effect of okara and vital gluten on physico-chemical properties of noodle. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 36, n. 4, p. 301–306, 3 set. 2018.
- PARK, J.; CHOI, I.; KIM, Y. Cookies formulated from fresh okara using starch, soy flour and hydroxypropyl methylcellulose have high quality and nutritional value. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 660–666, 2015.
- PEREIRA, D. G. et al. Enzymatic hydrolysis of okara protein concentrate by mixture of endo and exopeptidase. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 10, p. 1–9, 2019.
- PÉREZ-LÓPEZ, E.; MATEOS-APARICIO, I.; RUPÉREZ, P. Low molecular weight carbohydrates released from Okara by enzymatic treatment under high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 76–82, 2016.

- PÉREZ-LÓPEZ, E.; MATEOS-APARICIO, I.; RUPÉREZ, P. High hydrostatic pressure aided by food-grade enzymes as a novel approach for Okara valorization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 42, n. March, p. 197–203, 2017.
- PORFIRI, M. C. et al. Insoluble soybean polysaccharides: Obtaining and evaluation of their O/W emulsifying properties. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 262–273, 2017.
- PREECE, K. E. et al. Intensification of protein extraction from soybean processing materials using hydrodynamic cavitation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 47–55, 2017a.
- PREECE, K. E. et al. Intensified soy protein extraction by ultrasound. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 113, p. 94–101, 2017b.
- QIAN, J. et al. Study on lipids transfer in aqueous enzyme hydrolysis soybean protein and oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, 2019.
- QUINTANA, G.; GERBINO, E.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Okara: A nutritionally valuable by-product able to stabilize *Lactobacillus plantarum* during storage. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 641, p. 1–9, 2017.
- QUINTANA, G.; GERBINO, E.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Valorization of okara oil for the encapsulation of *Lactobacillus plantarum*. **Food Research International**, v. 106, n. 3, p. 81–89, abr. 2018.
- QUITAIN, A. T. et al. Recovery of oil components of okara by ethanol-modified supercritical carbon dioxide extraction. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 13, p. 1509–1514, set. 2006.
- REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. J.; MATEOS-APARICIO, I. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fiber. Measurement by AOAC and English methods. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1099–1105, jun. 2008.
- RINALDI, V. E. A.; NG, P. K. W.; BENNINK, M. R. Effects of extrusion on dietary fiber and isoflavone contents of wheat extrudates enriched with wet okara. **Cereal Chemistry Journal**, v. 77, n. 2, p. 237–240, mar. 2000.
- RODRIGUES, C. E. C.; ARACAVALA, K. K.; ABREU, F. N. Thermodynamic and statistical analysis of soybean oil extraction process using renewable solvent. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 11, p. 2407–2414, nov. 2010.
- RODRIGUES, G. de M.; CARDOZO-FILHO, L.; SILVA, C da. Pressurized liquid extraction of oil from soybean seeds. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 95, n. 12, p. 2383–2389, 2017.
- ROSTAGNO, M. A. et al. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 1, p. 2–29, 2009.
- ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, n. 2, p. 119–128, 2003.
- ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, p. 169–177, 2004.

Capítulo I

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Solid-phase extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, v. 1076, n. 1–2, p. 110–117, maio 2005.

SANTOS, D. C. et al. Okara flour: its physicochemical, microscopical and functional properties. **Nutrition and Food Science**, v. 49, n. 6, p. 1252–1264, 2019.

SANTOS, V. A. Q. et al. Solid-state fermentation of soybean okara: Isoflavones biotransformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 509–515, jun. 2018.

SBROGGIO, M. F. et al. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 375–381, 20 maio 2016.

SCHEIBER, M. D. et al. Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women. **Menopause**, v. 8, n. 5, p. 384–392, 2001.

SEVILLANO, D. M. et al. Mechanism of isoflavone adsorption from okara extracts onto food-grade resins. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 39, p. 15245–15252, 17 out. 2014.

SHI, H. et al. Solid-state fermentation with probiotics and mixed yeast on properties of okara. **Food Bioscience**, v. 36, n. April, p. 100610, ago. 2020.

SINGH, A. et al. Structural and functional analysis of various globulin proteins from soy seed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1491–1502, 19 set. 2015.

SINGH, P. et al. Functional and edible uses of soy protein products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, n. 1, p. 14–28, jan. 2008.

SINHA, S. et al. Study on the growth performance of the broiler after feeding of okara meal containing with or without non-starch polysaccharides degrading enzyme. **Veterinary World**, v. 6, n. 6, p. 325, 2013.

SONGSRIROTE, K. et al. The study of properties and nutrient determination of hydrogel made of soybean meal (okara) using microwave-assisted heating. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, n. 5, p. 6519–6527, 2017.

SOYSTATS. **International World Soybean Production**. Disponível em: <<http://soystats.com/international-world-soybean-production>>. Acesso em: 22 mai. 2020.

STANOJEVIC, S. P. et al. Composition of proteins in okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9221–9228, 2012.

SUREL, O.; COUPLET, B. Influence of the dehydration process on active compounds of okara during its fractionation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 8, p. 1343–1349, jun. 2005.

SU, S. I. T. et al. Okara, a soymilk industry by-product, as a non-meat protein source in reduced fat beef burgers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 52–56, 2013.

Capítulo I

- TAKU, K. et al. Extracted or synthesized soybean isoflavones reduce menopausal hot flash frequency and severity. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, v. 19, n. 7, p. 776–790, jul. 2012.
- TAO, X. et al. Effects of pretreatments on the structure and functional properties of okara protein. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 394–402, 2019.
- TAVARES, B. O. et al. Stability of gluten free sweet biscuit elaborated with rice bran, broken rice and okara. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 296–303, 2016.
- TODA, K.; CHIBA, K.; ONO, T. Effect of components extracted from okara on the physicochemical properties of soymilk and tofu texture. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 108–113, 2007.
- TODA, T. A.; SAWADA, M. M.; RODRIGUES, C. E. C. Kinetics of soybean oil extraction using ethanol as solvent: Experimental data and modeling. **Food and Bioprocess Processing**, v. 98, p. 1–10, 2016.
- TREYBAL, R. E. **Mass Transfer Operations**. Third ed. Singapura: McGraw-Hill Book Company, 1981.
- TU, J.; WU, W. Establishment of an aqueous method for extracting soybean oils assisted by adding free oil. **Grasas y Aceites**, v. 70, n. 3, 2019.
- TUNTIWIWATTANAPUN, N.; TONGCUMPOU, C.; WIESENBORN, D. Optimization of alcoholic soybean oil extraction as a step towards developing *in-situ* transesterification for fatty acid isopropyl esters. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 189–196, dez. 2016.
- TURHAN, S.; TEMIZ, H.; SAGIR, I. Utilization of wet okara in low-fat beef patties. **Journal of Muscle Foods**, v. 18, n. 2, p. 226–235, abr. 2007.
- TURHAN, S.; TEMIZ, H.; SAGIR, I. Characteristics of beef patties using okara powder. **Journal of Muscle Foods**, v. 20, n. 1, p. 89–100, jan. 2009.
- ULLAH, I. et al. Structural characteristics and physicochemical properties of okara (soybean residue) insoluble dietary fiber modified by high-energy wet media milling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 15–22, 2017.
- ULLAH, I. et al. Influence of okara dietary fiber with varying particle sizes on gelling properties, water state and microstructure of tofu gel. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 512–522, abr. 2019.
- VAN DER RIET, W. B. et al. Food chemical investigation of tofu and its byproduct okara. **Food Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 193–202, 1989.
- VISHWANATHAN, K. H. et al. Production of okara and soy protein concentrates using membrane technology. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. E158–E164, jan. 2011.
- VISHWANATHAN, K. H.; SINGH, V.; SUBRAMANIAN, R. Influence of particle size on protein extractability from soybean and okara. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 240–246, 2011.

Capítulo I

- VONG, W. C.; LIM, X. Y.; LIU, S. Biotransformation with cellulase, hemicellulase and *Yarrowia lipolytica* boosts health benefits of okara. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 19, p. 7129–7140, 11 out. 2017.
- VONG, W. C.; LIU, S. Q. Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 139–147, 1 jun. 2016.
- VONG, W. C.; LIU, S.-Q. The effects of carbohydrase, probiotic *Lactobacillus paracasei* and yeast *Lindnera saturnus* on the composition of a novel okara (soybean residue) functional beverage. **LWT- Food Science and Technology**, v. 100, n. October 2018, p. 196–204, fev. 2019.
- VOSS, G. B. et al. Impact of different thermal treatments and storage conditions on the stability of soybean byproduct (okara). **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 3, p. 1981–1996, 1 set. 2018.
- WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8, p. 1666–1673, 1994.
- WIBOONSIRIKUL, J. et al. Properties of extract from okara by its subcritical water treatment. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 5, p. 974–982, 4 jul. 2013.
- WILKINSON, N. et al. Study of process variables in supercritical carbon dioxide extraction of soybeans. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 1, p. 63–70, 2014.
- WOLF, W. J.; COWAN, J. C.; WOLFF, H. Soybeans as a food source. **Critical Reviews in Food Technology**, v. 2, n. 1, p. 81–158, 1971.
- XU, X.; LIU, H.; ZHOU, Y. Study on the Meitauza production from okara by *Actinomucor elegans* and *Zymomonas mobilis*. In: Zhu, E., Sambath, S. (eds) **Information Technology and Agricultural Engineering. Advances in Intelligent and Soft Computing**, v. 134. Springer, Berlin, Heidelberg.
- YOSHII, H. et al. Hydrolysis kinetics of okara and characterization of its water-soluble polysaccharides. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n. 9, p. 1406–1409, 12 jan. 1996.
- YU, C. A.; YANG, C. Y. Effect of ultrasound on the extraction of bioactive aglycone isoflavones for the green valorization of black soybean residue (okara). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 7, p. 1–8, 2019.
- ZHANG, M. et al. Microbial transglutaminase-modified protein network and its importance in enhancing the quality of high-fiber tofu with okara. **Food Chemistry**, v. 289, n. March, p. 169–176, 15 ago. 2019.
- ZHANG, Q. et al. Research progress in tofu processing: From raw materials to processing conditions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 9, p. 1448–1467, 2018.

Capítulo II

Perfil e teor de isoflavonas em soja laminada e extrusada e okara submetido a diferentes métodos de secagem

Rafaela Torrezan Privatti, Maria Carolina Capellini, Marcelo Thomazini, Carmen Sílvia Fávoro-Trindade, Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

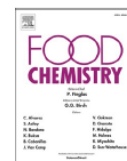
Trabalho publicado na revista *Food Chemistry*

v. 308, 132168, 2022



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

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

Profile and content of isoflavones on flaked and extruded soybeans and okara submitted to different drying methods

Rafaela T. Privatti^a, Maria C. Capellini^a, Marcelo Thomazini^b, Carmen S. Favaro-Trindade^b, Christianne E.C. Rodrigues^{a,*}

^a Laboratório de Engenharia de Separações (LES), Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), 13635-900 Pirassununga, São Paulo, Brazil

^b Laboratório de Encapsulação e Alimentos Funcionais (LENALIS), Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), 13635-900 Pirassununga, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

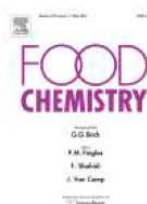
Aglycones
β-glucosides
Extraction
Okara
Soybean oil

Chemical compounds used in the study:

Daidzin, PubChem CID: 107971
Genistin, PubChem CID: 5281377
Daidzein, PubChem CID: 5281708
Genistein, PubChem CID: 5280961

ABSTRACT

Isoflavones (IFs) are biocompounds found in considerable amounts in soybean grains. However, to originate soybean-based materials, the grains must be subjected to numerous thermal and mechanical treatments, which can impair the IFs content. The influence of these treatments was investigated and a protocol for IFs extraction and quantification is proposed. Sequential extractions were performed on industrially pretreated soybean samples (broken, flakes, and collets), on okara submitted to different drying methods (freeze-drying, forced convection, and under vacuum), and on soybean oils extracted with hexane and ethanol. β-glucosides levels were decreased by the thermal processes of lamination, expansion, and drying, while the aglycone forms were not affected. Lyophilization was identified as the most viable drying method for the quantification of IFs in okara. Soybean oils extracted with ethanol presented significant amounts of aglycone. Furthermore, two stages of extraction were sufficient for the recovery of the IFs from different matrices.



Profile and content of isoflavones on flaked and extruded soybeans and okara submitted to different drying methods

Author:

Rafaela T. Privatti, Maria C. Capellini, Marcelo Thomazini, Carmen S. Favaro-Trindade, Christianne E.C. Rodrigues

Publication: Food Chemistry

Publisher: Elsevier

Date: 30 June 2022

© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

Capítulo II

II. Resumo

Isoflavonas (IFs) são biocompostos encontrados em quantidades consideráveis em grãos de soja. Entretanto, para originar materiais à base de soja, os grãos devem ser submetidos a inúmeros tratamentos térmicos e mecânicos, que podem prejudicar o teor de IFs. A influência desses tratamentos foi investigada e um protocolo para extração e quantificação de IFs é proposto. Extrações sequenciais foram realizadas em amostras de soja pré-tratadas industrialmente (quebradas, em flocos (laminada) e collets (massa expandida)), em okara submetido a diferentes métodos de secagem (liofilização, secagem em estufa de convecção forçada e estufa sob vácuo) e em óleos de soja extraídos com hexano e etanol. Os níveis de IFs β -glicosídeos diminuíram devido aos processos térmicos de laminação, expansão e secagem, enquanto as formas agliconas não foram afetadas. A liofilização foi identificada como o método de secagem mais viável para a quantificação de IFs em okara. Os óleos de soja extraídos com etanol apresentaram quantidades significativas de IFs agliconas. Além disso, duas etapas de extração foram suficientes para a recuperação das IFs de diferentes matrizes.

Palavras-chave: agliconas; β -glicosídeos; extração; okara; óleo de soja.

II. Abreviações e Siglas

CDO = okara seco em estufa de convecção forçada; CDDO = okara desengordurado e seco em estufa de convecção forçada; FDO = okara liofilizado; FDDO = okara desengordurado e liofilizado; IFs = isoflavonas; SB = soja quebrada; SC = collets (massa expandida) de soja; SCO = óleo bruto de collets (massa expandida) de soja; SCOE = óleo bruto de collets (massa expandida) de soja extraído com etanol; SCOH = óleo bruto de collets (massa expandida) de soja extraído com hexano; SF = flocos de soja laminados; SFO = óleo bruto de flocos de soja laminados; SFOE = óleo bruto de flocos de soja laminados extraído com etanol; SFOH = óleo bruto de flocos de soja laminados extraído com hexano; VDO = okara seco em estufa sob vácuo; VDDO = okara desengordurado e seco em estufa sob vácuo; WO = okara úmido; WSSE = extrato hidrossolúvel de soja.

II.1. Introdução

Isoflavonas (IFs) são fenólicos complexos compostos por três anéis, dois benzênicos e um heterocíclico. Estes anéis são diferentes dos flavonoides, em termos da posição de um dos anéis de benzeno, pois nas IFs esta ligação ocorre na posição 3 (LUTHRIA; NATARAJAN, 2009; ROSTAGNO et al., 2009).

Capítulo II

As IFs possuem funções biológicas importantes, destacando aquelas relacionadas aos sistemas reprodutivo e imunológico, sintomas da menopausa, prevenção de cânceres, osteoporose e doenças cardiovasculares (ANDERSON et al., 1999; BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; BRZEZINSKI et al., 1997; GUO et al., 2019; TAKU et al., 2012). Com valores entre 1,6 e 1325 mg de IFs por grama de sólido, a soja (*Glycine max*) destaca-se entre as leguminosas como fonte de IFs (ANDERSON et al., 1999; FALCÃO et al., 2019; JACKSON et al., 2002; LUTHRIA; NATARAJAN, 2009). Estudos têm demonstrado que fatores intrínsecos e extrínsecos, tipo de processamento dos grãos, bem como as metodologias de extração e quantificação constituem a gama de fatores que influenciam o conteúdo de IFs contido na soja (CHO et al., 2020; FERREIRA et al., 2019; GRÜN et al., 2001; JACKSON et al., 2002; ROSTAGNO et al., 2009).

Daidzeína (4', 7-dihidroxiisoflavona), genisteína (4', 5, 7-trihidroxiisoflavona) e gliciteína (4', 7-dihidroxi-6-metoxi-isoflavona) são as três IFs da classe agliconas, encontradas em soja e derivados. Esses compostos também podem aparecer nas formas conjugadas: β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), 6"-O-malonilglicosídeos (6"-O-malonil-daidzina, 6"-O-malonil-genistina e 6"-O-malonil-glicitina) e 6"-O-acetilglicosídeos (6"-O-acetil-daidzina, 6"-O-acetil-genistina e 6"-O-acetil-glicitina), totalizando doze isômeros (ROSTAGNO et al., 2009). Embora a gliciteína e a glicitina também sejam encontradas na soja, seus níveis representam menos de 10 % do total de IFs neste material oleaginoso e seus derivados (JACKSON et al., 2002; MULITERNO et al., 2017; PRIVATTI; RODRIGUES, 2021). Além disso, são raros os estudos que trazem evidências sobre a atividade biológica relacionada à gliciteína e à glicitina (ANDERSON et al., 1999; BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; BRZEZINSKI et al., 1997).

Em soja não processada, as formas conjugadas β -glicosídeos e 6"-O-malonilglicosídeos são as mais prevalentes (FALCÃO et al., 2019; JACKSON et al., 2002; KIM; KIM, 2020; LUTHRIA; NATARAJAN, 2009). No entanto, reações de descarboxilação (levando à conversão das IFs malonilglicosídeos à acetilglicosídeos e β -glicosídeos), desesterificação (conversão das malonil e acetil em β -glicosídeos) e hidrólise (conversão das formas conjugadas glicosiladas em agliconas), podem ser ativadas pelo processamento dos grãos de soja, resultando em perdas e/ou alterações no perfil desses compostos. Além disso, essas clivagens são potencializadas por mudanças no pH, processos mecânicos, enzimáticos e, principalmente, pelos térmicos. Esses processos, além das alterações químicas, também podem causar a degradação e/ou decomposição das IFs em metabólitos secundários (CHIEN et al.,

Capítulo II

2005; FERREIRA et al., 2019; MATHIAS et al., 2006; ROSTAGNO et al., 2009; YUE; ABDALLAH; XU, 2010).

Geralmente, os grãos de soja sofrem pré-tratamentos industriais antes da operação de extração de óleo usando solventes. Esses pré-tratamentos são aplicados para alterar as propriedades superficiais e estruturais da matriz oleaginosa, possibilitando melhorias na percolação do solvente e, conseqüentemente, no rendimento da extração de óleo, bem como a qualidade de seu coproduto, o farelo de soja desengordurado. Os pré-tratamentos industriais começam com processos mecânicos simples, como o descascamento e quebra dos grãos, resultando na soja quebrada (SB), processos térmicos (condicionamento na faixa de temperatura de 60 a 75 °C) e mecânicos (compressão e cisalhamento), são usados para a geração de flocos de soja laminados (SF), enquanto os collets de soja ou massa expandida (SC) são produzidos por expansores que combinam alta pressão e altas temperaturas (90 a 110 °C), com a inclusão de vapor vivo. A expansão leva a uma maior distorção celular e permite produzir um material poroso, mais denso que os flocos (KEMPER, 2005). Apesar do uso industrial generalizado e dos ganhos na fase de extração de óleo, não há evidências na literatura sobre o efeito desses pré-tratamentos no conteúdo e perfil das IFs. No entanto, as operações de laminação e expansão podem ser significativas, uma vez que esses tratamentos envolvem altas temperaturas e mudanças estruturais.

Além disso, o solvente industrialmente empregado para a extração da fração lipídica da soja é uma mistura de isômeros de n-hexano, derivados do petróleo, altamente não polar, conhecido como hexana (HAMMOND et al., 2005). A hexana não tem afinidade com as IFs uma vez que estas são preferencialmente extraídas por solventes polares, como metanol, etanol, água e outros (JANKOWIAK et al., 2014a; LUTHRIA; NATARAJAN, 2009; ROSTAGNO et al., 2009; SONG et al., 1998), assim, estudos que investiguem os níveis de IFs no óleo de soja são incipientes. As frações lipídicas obtidas da soja usando hexana como solvente não apresentaram níveis significativos de IFs, de acordo com Coward et al. (1993) e Eldridge & Kwolek (1983). No entanto, solventes obtidos a partir de fontes renováveis, como o etanol, são candidatos viáveis para a extração concomitante de óleo de soja e IFs. Além, dos menores impactos ambientais e da segurança dos alimentos, devido ao selo GRAS, atribuídos ao etanol, este solvente possibilitou a extração simultânea de compostos bioativos como tocoferóis e carotenoides (FDA, 2017; JEDIDI et al., 2020; OKIYAMA et al., 2019; POTRICH et al., 2020).

Além do óleo e do farelo de soja desengordurado, material base para a produção de isolados e concentrados proteicos, a soja pode ser submetida à extração de proteínas utilizando a água como solvente. Este processo produz o extrato hidrossolúvel de soja (WSSE) e o

Capítulo II

coproduto sólido, okara. Este material sólido tem alta umidade (cerca de 80 % em massa) e níveis consideráveis de fibras totais, proteínas e lipídios, em níveis máximos de 63 %, 43 % e 16 % (em base seca), respectivamente (GUIMARÃES et al., 2020; MULITERNO et al., 2017; PRIVATTI; RODRIGUES, 2021). A grande quantidade de água no okara resulta de uma série de etapas as quais a soja é submetida para gerar o WSSE, como processamento térmico em altas condições de umidade (maceração e cozimento), além de processos mecânicos (moagem e trituração) (GRÜN et al., 2001; JANKOWIAK et al., 2014a; PRIVATTI; RODRIGUES, 2021).

O okara retém cerca de 27 % das IFs contidas no material inicial, com níveis entre 0,5 e 355 mg de IFs por grama de okara seco (JACKSON et al., 2002; JANKOWIAK et al., 2014a). A divergência nos valores está relacionada a fatores intrínsecos da composição da soja, às etapas de produção para obtenção do WSSE, especialmente quando calor é utilizado (moagem e cozimento dos grãos) e perdas devido à lixiviação (GRÜN et al., 2001; LIMA; KUROZAWA; IDA, 2014; PRIVATTI; RODRIGUES, 2021). Além disso, as etapas de preparação do okara para a recuperação das IFs também podem causar alterações no perfil e degradação desses biocompostos, já que não há protocolo definido para extração de IFs de okara.

Entre as etapas prévias para a preparação do okara destacam-se a remoção de lipídios, aplicada por Muliterno et al. (2017) e Guimarães et al. (2020), bem como os diferentes métodos de secagem utilizados para reduzir a umidade desse material. Muliterno et al. (2017) avaliaram o comportamento das IFs durante 10 horas na secagem em estufa de convecção, em diferentes temperaturas (50, 60 e 70 °C), enquanto Guimarães et al. (2020) investigaram os níveis de IFs após secagem por liofilização, micro-ondas e em estufa de convecção, a 70 °C/12 horas. No entanto, os resultados mostrados por esses estudos são incertos. Guimarães et al. (2020) sugerem secagem em estufa de convecção a 70 °C por 12 horas, enquanto Muliterno et al. (2017) não encontraram nenhuma forma de IFs após 10 horas de secagem, na mesma temperatura.

Assim, é particularmente importante investigar a influência dessas etapas, uma vez que não há uma indicação clara na literatura sobre qual método de secagem é o mais adequado e se a etapa de remoção dos lipídios é realmente necessária. Portanto, é relevante propor uma metodologia que não cause novas mudanças no perfil e/ou degradação das IFs, permitindo assim medir o conteúdo real desses biocompostos no okara.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivos: medir os impactos que os processos térmicos e mecânicos utilizados na indústria da soja têm sobre o conteúdo e o perfil das IFs; analisar métodos de secagem e a influência da remoção dos lipídios para a recuperação das IFs de okara; avaliar, de forma inédita, o conteúdo de IFs em óleos de soja extraídos

Capítulo II

utilizando diferentes solventes; e investigar o número de estágios necessários para a recuperação total desses biocompostos das diferentes matrizes. Portanto, com base nos resultados deste estudo, será possível inferir sobre as condições operacionais mais adequadas para a recuperação total das IFs contidas nas diferentes matrizes estudadas, sejam elas relacionadas aos pré-tratamentos industriais dos grãos de soja, ao método de secagem do okara e ao solvente utilizado na extração do óleo de soja.

II.2. Materiais e métodos

II.2.1. Material vegetal

A soja quebrada (SB), os flocos de soja laminados (SF) e os collets (massa expandida) de soja (SC) foram gentilmente fornecidos pela Caramuru Alimentos (Itumbiara, GO, Brasil) e mantidos a -4 °C. O okara foi fornecido pela Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja (Universoja, Araraquara, SP); este material foi armazenado sob refrigeração a -20 °C, até a utilização.

II.2.2. Padrões e reagentes

Padrões analíticos para a determinação de agliconas (daidzeína, CAS 486-66-8, pureza $\geq 97,0$ %; e genisteína, CAS 446-72-0, pureza $\geq 97,0$ %) e β -glicosídeos (daidzina, CAS 552-66-9, pureza $\geq 98,0$ %; e genistina, CAS 529-59-9, pureza $\geq 98,0$ %) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Etanol absoluto (CAS 64-17-5, pureza $\geq 98,5$ %, Synth, São Paulo, Brasil) e n-hexano (CAS 110-54-3, pureza $\geq 98,5$ %, Synth, São Paulo, Brasil) foram utilizados para a extração de óleo de soja de SF e SC. Todos os reagentes relacionados à extração e quantificação das IFs foram de grau HPLC, sendo eles: metanol (CAS 67-56-1, pureza $\geq 99,9$ %, CAS 67-56-1, Merck, Darmstadt, Alemanha), dimetilsulfóxido (CAS 67-68-5, pureza $\geq 99,9$ %, Synth, São Paulo, Brasil), acetonitrila (CAS 75-05-8, pureza $\geq 99,9$ %, CAS 75-05-8, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e ácido acético glacial (CAS 64-19-7, pureza $\geq 99,7$ %, Synth, São Paulo, Brasil).

II.2.3. Preparação das amostras

As etapas de preparação das amostras, extração e quantificação das IFs, estão resumidas na Figura II.1.

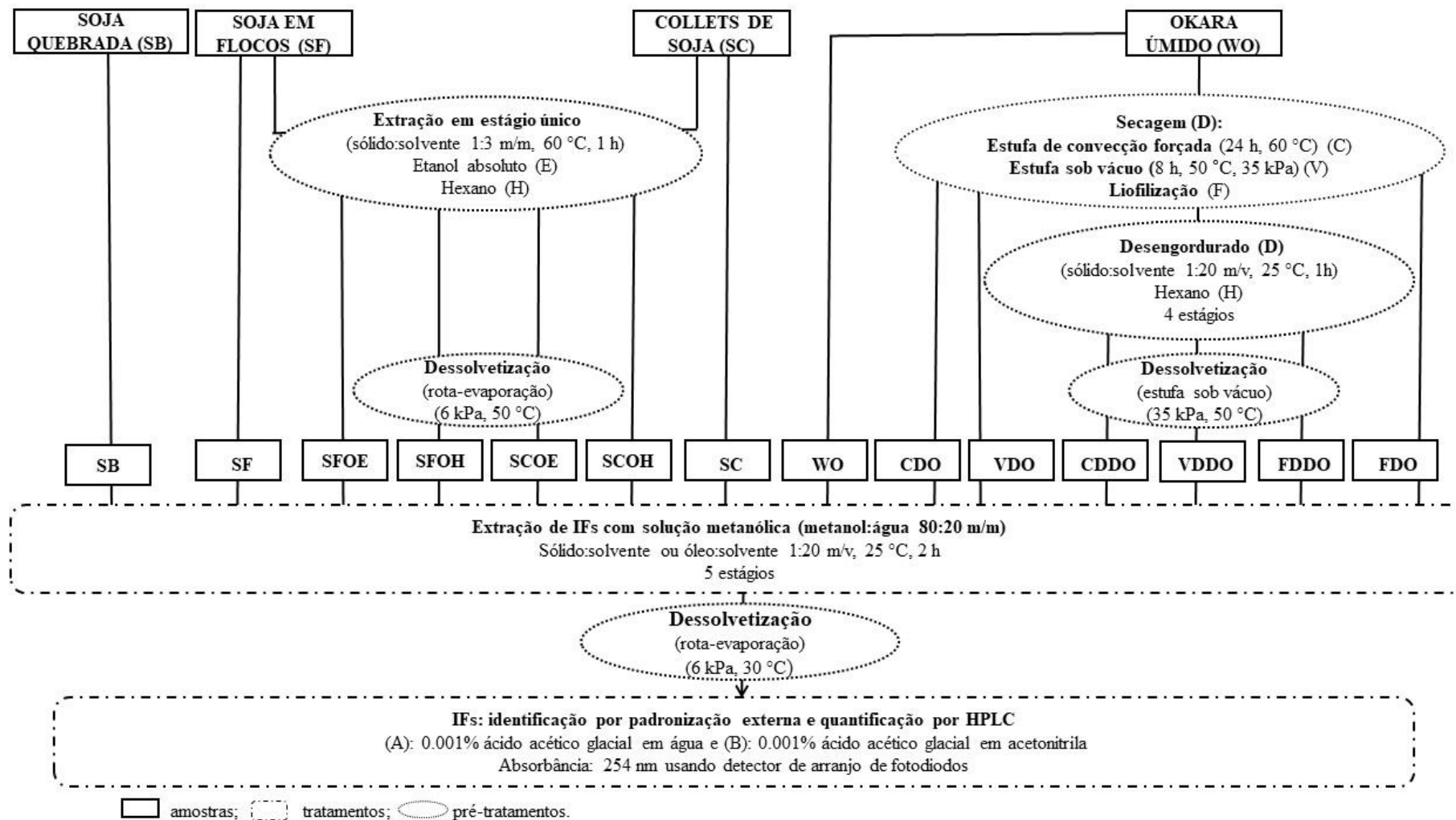
II.2.3.1. Amostras de soja

A quantificação das IFs, em termos das agliconas (daidzeína e genisteína) e seus β -glicosídeos conjugados (daidzina e genistina) foi realizada em SB, SF e SC, bem como em amostras de óleo extraídas de SF (SFO) e SC (SCO).

A extração do óleo das matrizes sólidas (SF e SC) foi realizada utilizando um extrator construído em aço inoxidável, hermeticamente selado, como descrito por Sawada et al. (2014).

SF e SC foram submetidos a extrações em batelada em um único estágio de contato utilizando como solventes: etanol absoluto (E) ou n-hexano (H) (este último utilizado para simular condições de processamento industrial). Razão sólido:solvente de 1:3 (m/m), agitação constante de 175 rpm a 60 °C por 60 minutos foram empregados, como proposto por Sawada et al. (2014). Após este procedimento, as fases extratos foram dessolvetizadas em um evaporador rotativo (pressão de 6 kPa, a 50 °C, Heidolph, modelo Hei-VAP Silver, Schwabach, Alemanha). Os óleos brutos de soja obtidos a partir de extrações com etanol (SFOE e SCOE) e hexano (SFOH e SCOH) foram reservados e posteriormente caracterizados

Figura II.1. Fluxograma da extração e quantificação de IFs em diferentes matrizes.



Fonte: Própria autoria.

II.2.3.2. Amostras de okara

Para analisar o efeito do método de redução de umidade do okara sobre o conteúdo de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína, okara úmido (WO) contendo $75,16 \pm 0,04$ % de água e três amostras oriundas de diferentes métodos de secagem foram submetidos ao processo de extração de IFs.

Foram estudadas as seguintes condições de secagem: secagem em estufa de convecção forçada (Nova Orgânica, modelo NO 35/3, Piracicaba, SP, Brasil), por 24 horas a 60 °C, produzindo CDO; secagem em estufa sob vácuo (35 kPa) (Tecnal, modelo TE395, Piracicaba, SP, Brasil), por 8 horas a 50 °C (designado como VDO); e secagem por liofilização (8 kPa) (equipamento de câmara única, modelo Scientz-10ND, Ningbo Scientz Biotechnology CO LTD, Ningbo, China) (atribuído como FDO). A liofilização foi conduzida sob as seguintes etapas: 30 minutos a -2 °C, -6 °C por 60 minutos (1,33 °C/ minutos), 15 °C durante 1260 minutos (0,3 °C/ minutos) e terminando por 1440 minutos a 20 °C (1 °C/ minutos). Para todos os ensaios de secagem, o teor de umidade residual foi inferior a 5 %.

As amostras de okara seco também foram submetidas a etapa de desengorduramento. CDO, VDO e FDO foram desengordurados com n-hexano, em proporção de 1:10 (m/v, amostra:solvente), empregando agitação rotativa contínua por 60 minutos a 25 °C (LIMA; KUROZAWA; IDA, 2014). Após esse período, o sobrenadante foi descartado e esse procedimento foi repetido quatro vezes, visando a remoção máxima dos lipídios. Para a remoção do solvente residual, os sólidos desengordurados (doravante atribuídos como CDDO, VDDO e FDDO) foram secos em estufa sob vácuo (35 kPa/ 1 hora/ 35 °C).

II.2.4. Extração de IFs

O protocolo utilizado para extrair as IFs de amostras de soja, óleos brutos de soja e okara foi baseado nas metodologias propostas por Genovese e Lajolo (2001), Grün et al. (2001) e Song et al. (1998). Essas metodologias foram otimizadas em termos de número de estágios necessários para extração, temperatura, agitação, filtração e centrifugação, afim de garantir a extração total das IFs das matrizes à base de soja.

A razão sólido:solvente para a extração das IFs a partir de WO foi de 1:3 (m/v), enquanto para soja (SB, SF e SC), óleos brutos de soja (SFOE, SFOH, SCOE e SCOH) e okara seco (CDO, VDO, FDO, CDDO, VDDO e FDDO) foi de 1:20 (m/v). Solução metanólica (metanol:água 80:20, em massa) foi usada como solvente. As misturas foram vigorosamente agitadas, em agitador de tubos (Heildolph, modelo Multi Reax) por 2 horas, em temperatura ambiente (~ 25 °C). Transcorrido esse período, os tubos foram centrifugados (1600 x g/15

Capítulo II

minutos) (ThermoElectron, modelo CR3i multifunção, EUA), a fim de separar os extratos metanólicos e os refinados (fases sólidas para amostras de soja e okara, e fases oleosas para os óleos de soja). As fases metanólicas foram filtradas, utilizando papel filtro (Whatman nº 1). Um evaporador rotativo (6 kPa a 30 °C, Heidolph, modelo Hei-VAP Silver, Schwabach, Alemanha) foi usado para a remoção do metanol dos extratos.

Este procedimento foi repetido quatro vezes, a partir dos refinados, totalizando cinco estágios de extração, a fim de avaliar o número de estágios necessários para a extração total das IFs das amostras.

II.2.5. Quantificação das IFs

Um sistema de cromatografia líquida (Prominence Modular HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando uma coluna Nova-Pak C18 (tamanho de partícula de 4 µm, 250 m× 4,6 mm, Waters, Milford, USA) foi usado para a determinação das IFs extraídas das amostras. Padronização externa foi empregada. Os picos de cada IF foram identificados, em comparação com os tempos de retenção dos padrões externos (daidzina, genistina, daidzeína e genisteína), conforme ilustrado na Figura A1 do Apêndice A.

A metodologia foi baseada em Song et al. (1998), com alterações em termos de coluna e condições cromatográficas. O gradiente cromatográfico linear adotado foi: 0 - 15 minutos, 15 % (B); 15 - 31 minutos, 29 % (B); 31 - 39 minutos, 35 % (B); 39 - 44 minutos, 80 % (B); 44 - 49 minutos, 15 % (B), onde as fases (A) e (B) eram compostas por: 0,001 % ácido acético glacial em água e 0,001 % ácido acético glacial em acetonitrila, respectivamente. A vazão do solvente foi mantida constante em 1,0 mL/ minutos. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e o volume de injeção foi de 20 µL. A absorbância foi monitorada a 254 nm usando um detector de arranjo de fotodiodos.

A quantificação foi realizada com base nas relações de área de pico de cada IF estudada, através da construção de curvas de calibração com alta linearidade ($R^2 \geq 0,99$) (Figura A2, Apêndice A). Massas conhecidas de cada um dos padrões (daidzina, genistina, daidzeína e genisteína) foram dissolvidas em dimetilsulfóxido e etanol absoluto (razão 1:3, m/m), seguida de aplicação de tratamento ultrassônico, em banho de ultrassom. Uma única solução estoque foi obtida com a seguinte concentração: 687 µg daidzina, 1210 µg genistina, 421 µg daidzeína e 621 µg genisteína por grama de solução de estoque. A solução estoque foi diluída com etanol absoluto para obter 7 composições diferentes. Os resultados foram expressos em µg IFs/g amostra seca.

II.2.6. Análise estatística

Os valores médios foram avaliados com nível de significância ($p \leq 0,05$) usando o teste de amplitudes múltiplas de Duncan (DMRT), com software SAS® (Versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

II.3. Resultados e Discussão

II.3.1. Teores de IFs em amostras de soja e okara

Os conteúdos de daidzeína, genisteína, daidzina e genistina em soja industrialmente pré-tratada (SB, SF e SC) e em todas as formas de okara analisadas são apresentados na Figura II.2a e 2b, respectivamente. Os conteúdos de IFs estão de acordo com os dados disponíveis na literatura, tanto para soja (FALCÃO et al., 2019; FERREIRA et al., 2019; JACKSON et al., 2002; KIM; KIM, 2020) bem como para okara (JACKSON et al., 2002; MULITERNO et al., 2017; RINALDI; NG; BENNINK, 2000).

Independentemente do tipo de pré-tratamento industrial e/ou método de secagem, as amostras de soja (SB, SF e SC) e okara (WO, FDO, CDO, VDO, FDDO, CDDO e VDDO) apresentaram perfis semelhantes de IFs, com a presença de formas conjugadas β -glicosídeos em maiores quantidades frente a suas respectivas agliconas. Em relação aos grãos de soja, esses resultados estão em consonância com os perfis apresentados por Falcão et al. (2019), Ferreira et al. (2019) e Genovese et al. (2007), os quais mostraram predominância de IFs malonilglicosídeos. No entanto, devido aos altos níveis de genistina e daidzina encontrados, acredita-se que as formas malonil possam ter sido convertidas em β -glicosídeos, por meio de reações de descarboxilação e desesterificação. Rostagno et al. (2009) relatam que períodos prolongados de armazenamento do material, temperatura e umidade, e as condições de extração das IFs, como tipo de solvente e tempo, podem causar as reações de conversão acima mencionadas. Este é um perfil esperado para okara, uma vez que essas conversões geralmente ocorrem durante as etapas de fabricação do WSSE, que incluem processos térmicos e mecânicos, em condições de alta umidade (maceração, ebulição e moagem) (JACKSON et al., 2002; MULITERNO et al., 2017). No caso da soja industrialmente pré-tratada, essas conversões podem estar relacionadas às condições de armazenamento dos grãos, além dos processos de laminação e expansão.

Os processos de expansão e laminação nos grãos de soja provocaram reduções de cerca de 29 % e 37 % para genistina e 17 % e 27 % para daidzina, respectivamente, em relação à SB ($p \leq 0,05$). Essas reduções sugerem que as IFs β -glicosídeos foram decompostas e/ou degradadas pela combinação de temperatura e mudanças estruturais na matriz oleaginosa. Esses

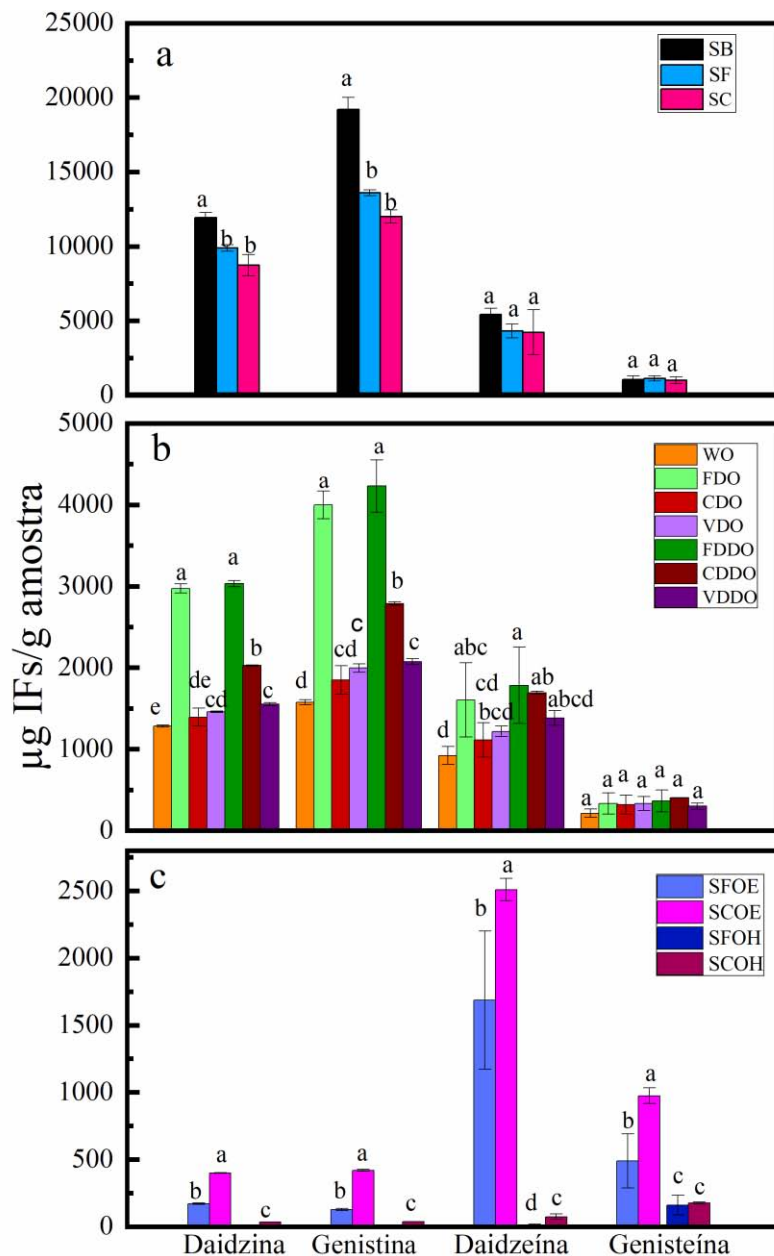
Capítulo II

resultados corroboram com os estudos de Chien et al. (2005) e Zhang e Chang (2016), os quais verificaram reduções significativas no conteúdo de IFs β -glicosídeos nos primeiros 30 a 40 segundos de processos de aquecimento úmido a temperaturas de 145 °C. Genovese et al. (2007), Mahungu et al. (1999) e Rinaldi et al. (2000) também observaram diminuição no conteúdo total de IFs em produtos de soja extrusados. Nesses trabalhos, essa diminuição foi correlacionada com a combinação de temperatura e alterações conformacionais nos produtos de extrusão.

No presente estudo, as formas agliconas não sofreram alterações significativas decorrentes das condições térmicas e processos mecânicos ($p > 0,05$), confirmando a maior estabilidade dessas IFs. Tais fatos podem ser atribuídos a três fatores principais: interações intermoleculares entre proteínas e IFs, às estruturas moleculares das classes de IFs avaliadas e aos curtos períodos dos tratamento térmicos.

Capítulo II

Figura II.2. Conteúdos de IFs em diferentes matrizes. (a) Soja quebrada (SB), flocos de soja laminados (SF), e collets (massa expandida) de soja (SC); (b) Okara úmido (WO), okara liofilizado (FDO), okara seco em estufa de convecção forçada (CDO), okara seco em estufa sob vácuo (VDO), okara desengordurado e liofilizado (FDDO), okara desengordurado e seco em estufa de convecção (CDDO), okara desengordurado e seco em estufa sob vácuo (VDDO); (c) Óleos brutos de soja, obtidos a partir de etanol (SFOE e SCOE) e hexano (SFOH e SCOH).



Resultados expressos como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais no mesmo tipo de IF não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

Capítulo II

De acordo com Mathias et al. (2006), Malaypally e Ismail (2010) e Muliterno et al. (2017), as proteínas exercem um efeito protetor sobre as IFs. No entanto, as altas temperaturas utilizadas nos processos de laminação e expansão, podem ter causado a desnaturação das proteínas, levando a uma maior exposição das IFs. Essa exposição pode ter levado à degradação e/ou decomposição das IFs β -glicosídeos em metabólitos secundários, uma vez que não foi observado aumento de IFs agliconas, indicando que não houve conversão. Este fato pode ser explicado pela curta exposição a altas temperaturas, como sugerido por Chien et al. (2005) e Yue, Abdallah e Xu (2010). De acordo com esses autores, a conversão de IFs β -glicosídeos em suas respectivas formas agliconas só ocorre após 30 minutos de aquecimento a 150 °C. Além disso, as condições térmicas inerentes aos processos de laminação e expansão podem levar à inativação ou redução da atividade enzimática da β -glicosidase (CHIEN et al., 2005; CHIOU et al., 2010; MULITERNO et al., 2017).

Em relação à estrutura molecular, a ligação glicosídica das IFs β -glicosídeos as tornam mais suscetíveis a clivagem quando expostas ao calor, em comparação com a estrutura polifenólica das agliconas (MATHIAS et al., 2006). Além disso, a genistina é mais sensível aos tratamentos térmicos e mecânicos em comparação com a daidzina. Esse fato pode ser atribuído ao grupo hidroxil adicional, presente na estrutura da genistina, tornando-a mais suscetível à oxidação, ademais esses resultados estão de acordo com os relatados por Malaypally e Ismail (2010).

II.3.2. Efeito dos métodos de redução da umidade do okara no teor de IFs

A Figura II.2b compara os níveis de IFs determinados em WO e em materiais submetidos a diferentes métodos de secagem. Como observado, a água no WO impactou negativamente a extração das IFs, retendo cerca de 60 % das formas β -glicosídeos no material, em comparação com a FDO. Este fato pode estar relacionado à maior afinidade desses compostos com a estrutura polar do WO (água, proteínas e carboidratos) em relação ao solvente de extração utilizado. Jankowiak et al. (2014b) alcançaram níveis semelhantes de IFs em okara úmido (~ 80 % de umidade) e liofilizado.

O método de redução da umidade do WO que proporcionou os mais altos níveis de genistina, daidzina e daidzeína foi a liofilização (FDO) ($p \leq 0,05$), em concordância com os resultados obtidos por Guimarães et al. (2020). Além disso, o processo de remoção dos lipídios não influenciou a extração de IFs, dos materiais submetidos a esse tipo de secagem (FDDO) ($p > 0,05$). Os métodos de secagem CDDO e VDDO permitiram níveis de recuperação em torno de 70 % e 52 % do conteúdo de IFs β -glicosídeos, respectivamente, em comparação com FDO.

Capítulo II

Em relação à daidzeína, não houve diferenças significativas para o CDDO e 86 % de recuperação em VDDO. Assim, pode-se sugerir que a remoção de lipídios do material, associado a esses tipos de secagem, proporciona ganhos na extração de IFs. É provável que o aumento no rendimento da extração de IFs seja resultado das mudanças na estrutura do okara, levando ao aumento na área superficial e facilitando o contato entre solvente e compostos-alvo.

Os demais tratamentos (CDO e VDO) resultaram em reduções de 52 % para formas conjugadas e 27 % para daidzeína, em relação ao FDO ($p \leq 0,05$). Assim, da mesma forma que a soja pré-tratada (SF e SC) (Figura II.2a), presume-se que os processos de secagem em estufa de convecção forçada ou sob vácuo, essencialmente afetam a daidzeína e genistina. Resultados semelhantes foram encontrados por Guimarães et al. (2020) e Muliterno et al. (2017). Tal fato, pode estar ligado à interação proteína-IF (MATHIAS et al., 2006; MALAYPALLY; ISMAIL, 2010; MULITERNO et al., 2017). Para a produção do WSSE, a soja é submetida a uma série de etapas envolvendo calor (moagem e cozimento dos grãos), que podem levar à desnaturação parcial ou total de proteínas (MULITERNO et al., 2017; PRIVATTI; RODRIGUES, 2021). A desnaturação pode levar a uma maior exposição das IFs ao calor decorrente dos processos de secagem utilizados. No entanto, a genisteína não foi afetada pela temperatura e tempo envolvidos nos processos de secagem do okara, corroborando com os estudos de Grün et al. (2001) para tofu e de Ungar, Osundahunsi & Shimoni (2003) que determinaram por análises microcalorimétricas, taxa máxima de degradação para genisteína a temperatura de 95 °C.

II.3.3. Teores de IFs em óleos de soja

A Figura II.2c mostra os níveis de IFs em óleos de soja extraídos de SF e SC, utilizando hexano e etanol como solventes. Cerca de 17 % da genisteína e 1 % da daidzeína, contidas nos materiais iniciais (SF e SC) foram recuperadas nos óleos extraídos com hexano. Esses resultados diferem dos relatados por Coward et al. (1993) e Eldridge & Kwolek (1983), os quais não encontraram níveis significativos de IFs em óleos de soja obtidos convencionalmente. Os teores de agliconas nesses óleos (SFOH e SCOH) podem ser decorrentes da maior hidrofobicidade dessas IFs e, conseqüentemente, maior afinidade por solventes com polaridade reduzida, como sugerido por Jankowiak et al. (2014b).

Por outro lado, nos óleos extraídos com etanol, foram observados níveis mais elevados para todas as IFs monitoradas, independentemente do pré-tratamento da matéria-prima. Cerca de 40 % das IFs agliconas contidas nos grãos de SF estavam presentes no SFOE, enquanto o

Capítulo II

SCOE apresentou 97,5 % da genisteína e 60 % da daidzeína contidas em SC. Os níveis de IFs β -glicosídeos nos óleos foram inferiores a 1 %, exceto para a daidzina em SCOE (~5 %).

Os níveis mais elevados de IFs em SCOE estão possivelmente relacionados as diferenças na estrutura da matriz sólida, uma vez que o processo de expansão proporciona melhor percolação do solvente de extração do óleo, devido a maior porosidade. Vale ressaltar que até agora não foram relatados na literatura dados de IFs em óleos de soja obtidos com este tipo de solvente alternativo, porém quantidades significativas de tocoferóis e carotenoides foram identificadas em óleo de *Tecoma stans* e gordura de cascas de amêndoas de cacau obtidos utilizando etanol como solvente (JEDIDI et al., 2020; OKIYAMA et al., 2019).

Assim, pode-se inferir que o uso do etanol como solvente para a extração de óleo de soja é interessante, uma vez que proporciona a extração concomitante de compostos nutracêuticos como genisteína e daidzeína, as quais estão associadas a diversos benefícios à saúde (ANDERSON et al., 1999; BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; BRZEZINSKI et al., 1997).

II.3.4. Otimização da extração de IFs em relação a números de estágios

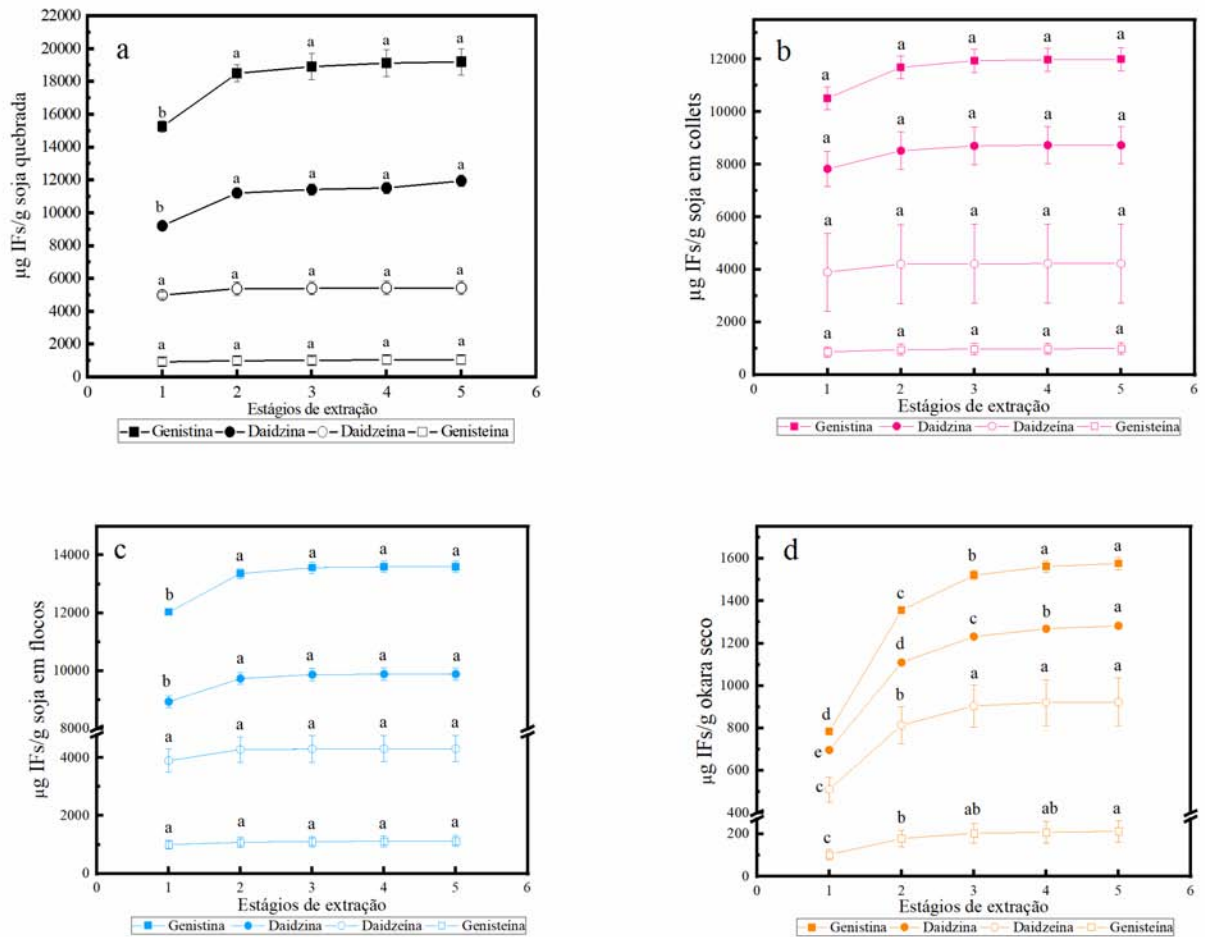
As Figuras II.3, II.4 e II.5 relatam os resultados para os níveis de IFs em soja, okara e óleos de soja, respectivamente, acumulados em cinco estágios de extração sequencial.

SB, SF e SC apresentaram comportamentos semelhantes, independentemente dos tratamentos industriais aplicados (Figura II.3a, II.3b e II.3c, respectivamente). As formas agliconas foram extraídas das matrizes no primeiro estágio de extração, sem diferença estatisticamente significativa nos demais estágios ($p > 0,05$), enquanto suas respectivas formas conjugadas necessitaram de duas etapas para extração completa.

O okara úmido (WO, Figura II.3d), além dos níveis mais baixos de IFs em comparação com amostras submetidas a diferentes tipos de secagem (Figura II.2b), necessitou de todos os estágios de extração avaliados para as IFs β -glicosídeos e três estágios para as agliconas, com mais estágios possivelmente necessários para a extração completa das IFs β -glicosídeos. Como resultado, a recuperação de IFs de WO utilizando o método de extração aplicado neste estudo pode ser cara, em termos de quantidade de solvente e tempo de processo.

Capítulo II

Figura II.3. Acúmulo dos teores de daidzina (●), genistina (■), daidzeína (○) e genisteína (□), em função do número de estágios de extração, na configuração de corrente cruzada. (a) Soja quebrada (SB); (b) Flocos de soja laminados (SF); (c) Collets (massa expandida) de soja (SC); (d) Okara úmido (WO).



Resultados expressos como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

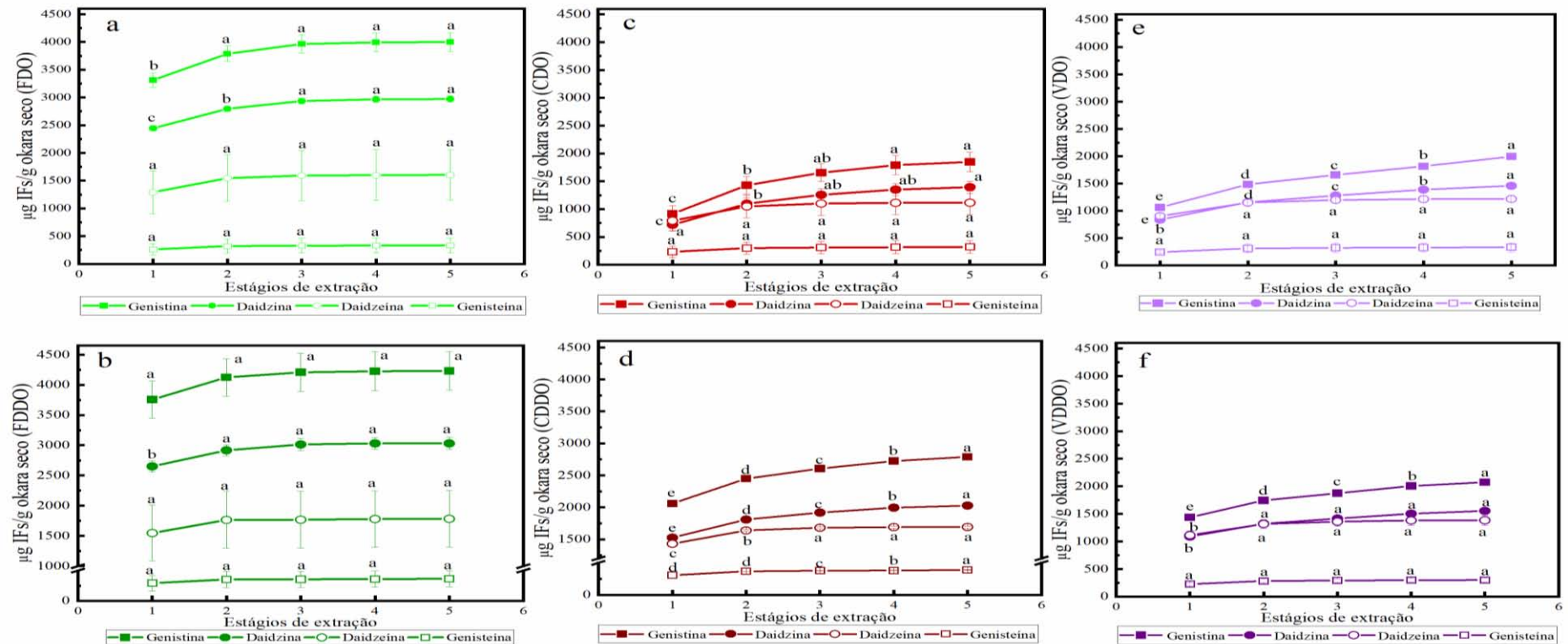
Médias seguidas por letras minúsculas iguais no mesmo tipo de IF não diferem entre si ao longo dos estágios, ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

Em relação às amostras de okara submetidas à secagem, a liofilização provou ser novamente o melhor método para reduzir a umidade, uma vez que geralmente proporcionou a extração total das IFs a partir do segundo estágio (Figura II.4a e II.4b). Três estágios de extrações sequenciais permitiram recuperar o total de IFs de CDO (Figura II.4c), enquanto os outros métodos (Figura II.4d, II.4e e II.4f) necessitaram de estágios adicionais para extração completa. A remoção de lipídios (Figura II.4b, II.4d e II.4f) não proporcionou ganhos em termos de diminuição do número de estágios de extração.

Capítulo II

Figura II.4. Acúmulo dos teores de daidzina (●), genistina (■), daidzeína (○) e genisteína (□), em função do número de estágios de extração, na configuração de correntes cruzadas. (a) okara liofilizado (FDO); (b) okara desengordurado e liofilizado (FDDO); (c) okara seco em estufa de convecção forçada (CDO); (d) okara desengordurado e seco em estufa de convecção forçada (CDDO); (e) okara seco em estufa sob vácuo (VDO); (f) okara desengordurado e seco em estufa sob vácuo (VDDO).



Resultados expressos como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

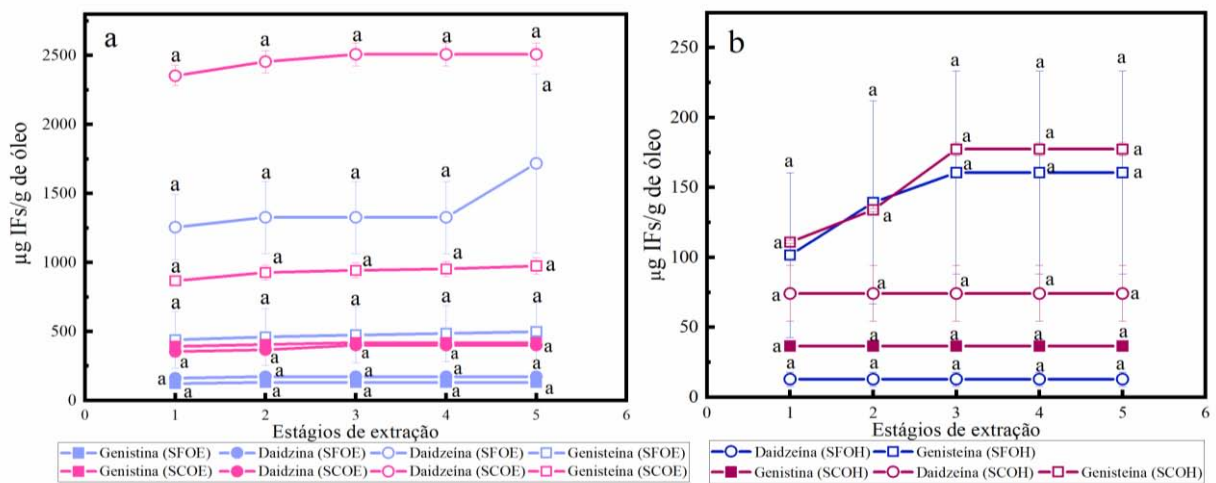
Médias seguidas por letras minúsculas iguais no mesmo tipo de IF não diferem entre si ao longo dos estágios, ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

Capítulo II

O tipo de solvente utilizado na extração de óleos de soja não influenciou o número de estágios de extração para a recuperação de IFs nesses materiais, uma vez que uma etapa de extração foi suficiente para sua quantificação (Figura II.5a e II.5b).

Figura II.5. Acúmulo de teores de daidzina (●), genistina (■), daidzeína (○) e genisteína (□), em função do número de estágios de extração, na configuração de correntes cruzadas. (a) Óleos brutos de soja obtidos a partir de etanol (SFOE e SCOE); (b) Óleos brutos de soja obtidos a partir de hexano (SFOH e SCOH).



Resultados expressos como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais no mesmo tipo de IF não diferem entre si ao longo dos estágios, ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

Independentemente da matriz, as agliconas foram extraídas no primeiro estágio, enquanto as IFs β -glicosídeos precisaram de estágios adicionais para recuperação completa. Esse fato pode ser atribuído à porosidade das matrizes avaliadas, uma vez que os collets de soja (massa expandida de soja) e o okara liofilizado proporcionaram a recuperação total das IFs em 2 estágios. A maior porosidade causada pela expansão e liofilização, favoreceu o contato entre o solvente e as IFs.

Além disso, a polaridade das IFs está diretamente relacionada à afinidade com o solvente empregado. Jankowiak et al. (2014a) relataram que a solubilidade das IFs β -glicosídeos em água foi cerca de 63 % maior do que a das agliconas, indicando a maior polaridade das β -glicosídeos. Assim, considerando que as IFs β -glicosídeos representam 80 % das IFs e que possuem alta afinidade com a água e menor afinidade com a solução metanólica utilizada neste estudo, que continha apenas 20 % de água, é possível sugerir que ocorreu

Capítulo II

saturação da fase extrato no primeiro estágio de extração. Tal fato justifica a necessidade de mais estágios de extração para a recuperação completa das IFs β -glicosídeos.

Portanto, pode-se supor que o mecanismo de extração das diferentes formas de IFs está intimamente associado à afinidade desses compostos com o solvente e com as características da estrutura sólida. Esta observação suporta sugerir o mesmo protocolo de extração de IFs para soja e derivados, através de dois estágios de extração sequenciais, com duração de 2 horas/estágio, e em temperatura ambiente, utilizando solução metanólica (80:20 m/m) como solvente e razão sólido seco:solvente de 1:20 (m/v). Além disso, sugere-se eliminar o estágio de remoção de lipídeos das matrizes para a recuperação das IFs.

II.4. Conclusões

Em geral, este estudo fornece informações sobre o efeito dos processos térmicos e mecânicos em IFs em três materiais, soja submetida a diferentes pré-tratamentos industriais (quebra, laminação e expansão), como também em okara e óleo de soja. Além disso, propõe um protocolo de extração em dois estágios para a recuperação total desses compostos, independentemente da matriz. No caso do okara, em uma abordagem inédita, recomenda-se a eliminação da fase de remoção lipídica para a recuperação das IFs.

A redução dos níveis de IFs β -glicosídeos nos materiais laminados, expandidos e secos à quente, está possivelmente associada à degradação e/ou decomposição desta classe de IFs, uma vez que a conversão para agliconas não foi observada. Esse comportamento pode ser devido à estrutura molecular, mais suscetível a clivagem térmica, além da maior exposição das IFs decorrente da desnaturação proteica devido ao uso de altas temperaturas. Quanto ao método de secagem do okara, a liofilização emergiu como a mais viável para este fim, uma vez que a recuperação das IFs de WO mostrou-se particularmente cara. O emprego de okara liofilizado e não desengordurado como material de partida na etapa de extração de IFs proporcionou a maior recuperação desses biocompostos, com menor número de estágios sequenciais. Assim, a liofilização com a eliminação da fase de remoção lipídica é o método indicado para preparar o okara, para a posterior extração de IFs.

O etanol mostrou-se um solvente alternativo eficaz para a extração concomitante de óleo e IFs de collets de soja, permitindo obter óleo de soja enriquecido com esses compostos nutracêuticos. Além disso, foi avaliada uma análise do número de estágios sequenciais para a recuperação total das IFs, onde dois estágios de extração são suficientes para este fim.

Capítulo II

Os resultados deste estudo contribuem para futuros projetos experimentais, bem como para o desenvolvimento de produtos enriquecidos com IFs, nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

II.5. Referências bibliográficas

ANDERSON, J. J. B. et al. Effects of phyto-oestrogens on Tissues. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, p. 75–116, 1999.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 2–3, p. 157–177, maio 2001.

BRZEZINSKI, A. et al. Short-term effects of phytoestrogen rich diet on postmenopausal women. **Menopause**, v. 4, n. 2, p. 89–94, 1997.

CHIEN, J. T. et al. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 425–434, 2005.

CHIOU, T. Y. et al. B-glucosidase isolated from soybean okara shows specificity toward glucosyl isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 15, p. 8872–8878, 2010.

CHO, C. H. et al. pH-adjusted solvent extraction and reversed-phase HPLC quantification of isoflavones from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Journal of Food Science**, v. 85, n. 3, p. 673–681, 2020.

COWARD, L. et al. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1961–1967, 1993.

ELDRIDGE, A. C.; KWOLEK, W. F. Soybean Isoflavones: Effect of environment and variety on composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 394–396, 1983.

FALCÃO, H. G. et al. Optimizing the potential bioactivity of isoflavones from soybeans via ultrasound pretreatment: Antioxidant potential and NF- κ B activation. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1–11, 23 nov. 2019.

FDA. **Guidance for Industry Q3C — Tables and List Guidance for Industry**. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm%5Cnhttp://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>>. Acesso em: 1 de mar. 2020.

FERREIRA, C. D. et al. Changes in phenolic acid and isoflavone contents during soybean drying and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 1146–1155, 2019.

Capítulo II

GENOVESE, M. I. et al. Commercial soy protein ingredients as isoflavone sources for functional foods. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, n. 2, p. 53–58, 2007.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 86–93, 2001.

GRÜN, I. U. et al. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2839–2843, 2001.

GUIMARÃES, R. M. et al. Evaluating technological quality of okara flours obtained by different drying processes. **LWT- Food Science and Technology**, v. 123, n. October 2019, p. 109062, abr. 2020.

GUO, J. et al. Functional daidzein enhances the anticancer effect of topotecan and reverses BCRP-mediated drug resistance in breast cancer. **Pharmacological Research**, v. 147, n. 2, p. 104387, 2019.

HAMMOND, E. G. et al. Soybean Oil. In: SHAHIDI, F. (Ed.) **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2005. 6th ed., v. 2, Cap. 13, p. 577-650.

JACKSON, C. -J. C. et al. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1117–1123, 2002.

JANKOWIAK, L. et al. Isoflavone extraction from okara using water as extractant. **Food Chemistry**, v. 160, p. 371–378, 2014a.

JANKOWIAK, L. et al. The potential of crude okara for isoflavone production. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 166–172, 2014b.

JEDIDI, B. et al. Effect of extraction solvents on fatty acid composition and physicochemical properties of *Tecoma stans* seed oils. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 4, p. 2468–2473, 2020.

KEMPER, T. G. (2005). Oil Extraction, In: Shahidi, F. (Ed.) **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. 6th ed., v. 5, Cap. 2, p. 57-98.

KIM, M. A.; KIM, M. J. Isoflavone profiles and antioxidant properties in different parts of soybean sprout. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 3, p. 689–695, 2020.

LIMA, F. S. DE; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I. The effects of soybean soaking on grain properties and isoflavones loss. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P2, p. 1274–1282, 2014.

LUTHRIA, D. L.; NATARAJAN, S. S. Influence of sample preparation on the assay of isoflavones. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 704–710, 2009.

Capítulo II

- MALAYPALLY, S. P.; ISMAIL, B. Effect of protein content and denaturation on the extractability and stability of isoflavones in different soy systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 8958–8965, 25 ago. 2010.
- MAHUNGU, S. M. et al. Stability of isoflavones during extrusion processing of corn/soy mixture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 279–284, 1999.
- MATHIAS, K. et al. Heat and pH effects on the conjugated forms of genistin and daidzin isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7495–7502, 1 out. 2006.
- MULITERNO, M. M. et al. Conversion/degradation of isoflavones and color alterations during the drying of okara. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 512–519, 2017.
- OKIYAMA, D. C. G. et al. Effect of the temperature on the kinetics of cocoa bean shell fat extraction using pressurized ethanol and evaluation of the lipid fraction and defatted meal. **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. September 2018, p. 96–103, 2019.
- POTRICH, E. et al. Replacing hexane by ethanol for soybean oil extraction: Modeling, simulation, and techno-economic-environmental analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, p. 118660, 2020.
- PRIVATTI, R. T.; RODRIGUES, C. E. C. An overview of the composition, application and fractionation techniques of okara for biovalorisation of this soybean residue. **Food Reviews International**, 2021.
- RINALDI, V. E. A.; NG, P. K. W.; BENNINK, M. R. Effects of extrusion on dietary fiber and isoflavone contents of wheat extrudates enriched with wet okara. **Cereal Chemistry Journal**, v. 77, n. 2, p. 237–240, mar. 2000.
- ROSTAGNO, M. A. et al. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 1, p. 2–29, 2009.
- SAWADA, M. M. et al. Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and protein solubility of defatted meal. **Food Research International**, v. 62, p. 662–670, 2014.
- SONG, T. et al. Soy isoflavone analysis: Quality control and a new internal standard. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6 SUPPL., p. 1474–1479, 1998.
- UNGAR, Y.; OSUNDAHUNSI, O. F.; SHIMONI, E. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4394–4399, 2003.
- TAKU, K. et al. Extracted or synthesized soybean isoflavones reduce menopausal hot flash frequency and severity. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, v. 19, n. 7, p. 776–790, jul. 2012.

Capítulo II

YUE, X.; ABDALLAH, A. M.; XU, Z. Original article: Thermal dynamic properties of isoflavones during dry heating. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 9, p. 1878–1882, set. 2010.

ZHANG, Y.; CHANG, S. K. Isoflavone profiles and kinetic changes during ultra-high temperature processing of soymilk. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 3, p. C593–C599, 2016.

Capítulo III

Solução salina como solvente e etanol na etapa de purificação para recuperação de proteínas e isoflavonas de okara úmido

Rafaela Torrezan Privatti, Maria Carolina Capellini, Keila Kazue Aracava, Silvana Marina Piccoli Pugine, Mariza Pires de Melo, Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

Trabalho a ser submetido na revista *Food Research International*

Capítulo III

III. Resumo

O okara é o coproduto sólido da indústria de extrato hidrossolúvel de soja, sendo uma fonte potencial de proteínas e isoflavonas (IFs). A extração destes compostos a partir de okara úmido foi investigada neste trabalho, com a proposição de diferentes configurações experimentais. Foi avaliado o desempenho do etanol em diferentes etapas do processo de recuperação de proteínas e IFs, visando a remoção de lipídios. Também foi avaliada a extração sequencial na configuração por estágios em correntes cruzadas e o emprego de solução salina de $MgCl_2$ como solvente, objetivando maximizar a recuperação dos compostos alvo. Três lavagens etanólicas (etanol:água, 60:40 em massa) dos sólidos obtidos após precipitação isoelétrica promoveram elevação de 20 % no teor de proteínas, devido à redução (60 %) do teor de lipídios. A configuração por estágios em correntes cruzadas empregando solução salina de $MgCl_2$ 0,05 M propiciou a obtenção de material contendo 248 μg de daidzeína e 236 μg de genisteína por g de material proteico de okara. Também foi observado um ganho de 3 % na extração da fração proteica do okara úmido, possivelmente relacionado ao aumento da extração de globulinas 7S. De maneira geral, as propriedades funcionais dos materiais proteicos foram distintamente afetadas pelas configurações empregadas.

Palavras-chave: etanol; extração por estágios; okara úmido; proteínas; solução salina.

III. Abreviaturas e Siglas

AP = precipitação alcoólica (60:40 etanol:extrato, m/m); AW2 = 2 lavagens com solução etanólica 60 % (60:40 etanol:água, m/m); AW3 = 3 lavagens com solução etanólica 60 %; AW4 = 4 lavagens com solução etanólica 60 %; EAI = índice de atividade da emulsão; ESI = índice de estabilidade da emulsão; FAI = índice de atividade da espuma; FSI = índice de estabilidade da espuma; HM = higroscopicidade; IAP = precipitação isoelétrica + alcoólica (60:40 etanol:extrato, m/m); IDF = fibras dietéticas insolúveis; IFs = isoflavonas; IP = precipitação isoelétrica; OHC = capacidade de absorção de óleo; OP = proteína de okara; OP30 = extração convencional (30 minutos) empregando água+solução de NaOH 2 N; OP30-S = extração convencional (30 minutos) empregando solução de $MgCl_2$ 0,05 M+solução de NaOH 2 N; OP60 = extração convencional (60 minutos) empregando água+solução de NaOH 2 N; OP30+OP30 = extração convencional em 2 estágios (30 minutos cada) utilizando água+solução de NaOH 2 N; OP30+OP30-S = extração convencional em 2 estágios (30 minutos cada), 1° estágio água+solução de NaOH 2 N e 2° estágio usando solução de $MgCl_2$ 0,05 M+solução de NaOH 2 N; OR = refinados de okara; OR30 = extração convencional (30 minutos) empregando

Capítulo III

água+solução de NaOH 2 N; OR60 = extração convencional (60 minutos) empregando água+solução de NaOH 2 N; OR30-S = extração convencional (30 minutos) empregando solução salina de MgCl₂ 0,05 M+solução de NaOH 2 N; OR30+OR30 = extração convencional em 2 estágios (30 minutos cada) empregando água+ solução de NaOH 2 N; OR30+OR30-S = extração convencional em 2 estágios (30 minutos cada), 1° empregando água+solução de NaOH 2 N e o 2° utilizando solução salina de MgCl₂ 0,05 M+solução de NaOH 2 N; NSI = índice de solubilidade de nitrogênio proteico; SDS-PAGE = eletroforese em gel de poli(acrilamida com dodecil- sulfato de sódio); SDF = fibras dietéticas solúveis; T0 = diâmetro médio das gotículas de óleo na emulsão, imediatamente após a formação destas; T10 = diâmetro médio das gotículas de óleo na emulsão, após 10 minutos da formação destas; TDF = fibras dietéticas totais; WHC = capacidade de absorção de água; WO = okara úmido; WSSE = extrato hidrossolúvel de soja.

III.1. Introdução

Dentre as inúmeras fontes vegetais proteicas, a proteína de soja lidera o *ranking* de consumo com 243,6 milhões de toneladas (71 %), segundo os dados publicados pelo Soy Stats (2022). Essa proteína contém alta qualidade em termos nutricionais, digestivos e composicionais, em níveis comparados às proteínas de origem animal (ovo e leite). Ademais, contém todos os aminoácidos essenciais (GORISSEN et al., 2018; LIU et al., 2019; PREECE; HOOSHYAR; ZUIDAM, 2017; QIN; WANG; LUO, 2022).

Uma fonte proteica de soja subvalorizada é o okara, coproduto sólido do processamento da soja para obtenção de extrato hidrossolúvel de soja (WSSE). Este material contém teores de proteínas variando de 13 a 43,7 g proteínas/ 100 g de okara seco (PRIVATTI; RODRIGUES, 2021). Tal variação é decorrente de fatores ligados aos grãos de soja (composição, em termos de nutrientes e enzimas, maturação, umidade, entre outros), como também aos ligados ao processo de produção do WSSE, principalmente quando tratamentos térmicos como cozimento e trituração a quente são empregados (GRÜN et al., 2007; PRIVATTI; RODRIGUES, 2021; VONG; LIU, 2016). Preece et al. (2015) reportaram elevação (2,6 %) no teor de proteínas retidas em okaras produzidos termicamente frente aos produzidos a frio. Ademais, Rahman et al. (2021) relataram que apenas 5 % do okara gerado é reaproveitado na alimentação humana, sendo o montante remanescente destinado parte para ração animal e parte incinerado ou descartado em aterros sanitários. Assim, tendo em vista a alta demanda por produtos sustentáveis, recuperar as proteínas do okara (OP) torna-se de grande valia. De fato, o reaproveitamento do okara, além de aumentar a oferta de proteínas vegetais,

Capítulo III

suplementarmente contribui com a redução dos impactos ambientais e custos relacionados ao descarte desse material, altamente deteriorável, em razão do alto conteúdo de água (74-85 g água/100 g de okara) (PRIVATTI; RODRIGUES, 2021).

Em síntese, as proteínas de soja e, conseqüentemente, do okara são constituídas por globulinas, predominantemente β -conglucina (7S) e glicina (11S) (SINGH et al., 2015; STANOJEVIC et al., 2012). A fração proteica dos grãos de soja é comumente extraída em pHs alcalinos, devido a elevada eficiência, produtividade e baixo custo (POJIĆ; MIŠAN; TIWARI, 2018; PREECE; HOOSHYAR; ZUIDAM, 2017). No entanto, as globulinas tendem a se solubilizar completamente em soluções salinas (PREECE; HOOSHYAR; ZUIDAM, 2017; WOLF, 1970). Ganhos na solubilidade e/ou extração de proteínas de soja ou derivados sob diferentes forças iônicas foram reportados por Jiang, Xiong e Chen (2010), os quais duplicaram a solubilidade de isolados proteicos de soja utilizando NaCl 0,1 M, assim como por Anderson, Wolf e Glove (1973) que alcançaram a máxima extração de proteínas a partir de farelo de soja desengordurado empregando cloreto de cálcio 0,3 N e cloreto de sódio 0,7 N. Ademais, a valência dos sais influencia a eficiência da extração, sendo que os bivalentes prevalecem sobre os monovalentes (SMITH; CIRCLE, 1938; ZHAO et al., 2010).

A extração das OPs segue tendência similar, com pHs de extração variando de 8,3 a 12,6, segundo compilado por Privatti e Rodrigues (2021). Todavia, não há evidências na literatura sobre o efeito da adição de sais na recuperação desses compostos a partir de okara. A contribuição da força iônica pode acarretar ganhos na solubilidade das proteínas dessa matriz, uma vez que grande parcela das proteínas dos grãos de soja solúveis em água já se solubilizaram no WSSE, sendo as proteínas remanescentes no okara a fração não extraída (FIGUEIREDO et al., 2018; TAO et al., 2019). Adicionalmente, as mudanças nas cargas do meio causadas pela presença dos íons podem beneficiar a interação entre solvente e proteínas, visto que estas encontram-se no interior dos cotilédones intactos e/ou ligadas aos demais componentes da soja (em suma, fibras e lipídios), formando complexos insolúveis. Tais complexos advêm da desnaturação parcial e/ou total das proteínas, decorrentes dos tratamentos térmicos e mecânicos aplicados para a obtenção do WSSE (PREECE et al., 2015; PRIVATTI; RODRIGUES, 2021; TAO et al., 2019).

Averiguar técnicas para remover os componentes não proteicos das OPs recuperadas, notadamente lipídios, é essencial e mostra-se como um grande desafio. A matéria-prima comumente empregada para a extração de proteínas de soja é o farelo de soja desengordurado, sólido remanescente da extração de óleo com solventes (HAMMOND et al., 2005; WANG; JOHNSON; WANG, 2004). O solvente comumente utilizado na etapa de extração do óleo é

Capítulo III

uma mistura de isômeros do n-hexano, um hidrocarboneto alcano de origem fóssil, neurotóxico e poluente (DECAPRIO; OLAJOS; WEBER, 1982; U.S. EPA, 2000). A utilização de material desengordurado possibilita a obtenção de concentrados proteicos livres de lipídios. Por outro lado, a utilização de matéria-prima contendo lipídios para extração de proteínas leva a obtenção de concentrados proteicos de menor pureza, uma vez que a fração lipídica tende a ser extraída juntamente as proteínas, devido ao comportamento análogo a estas em meio alcalino (PREECE; HOOSHYAR; ZUIDAM, 2017; ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1998).

No caso do okara, diversos autores reportaram a recuperação de OP a partir de okara seco e desengordurado (EZE; CHATZIFRAGKOU; CHARALAMPOPOULOS, 2022; FIGUEIREDO et al., 2018, 2019; PEREIRA et al., 2019; TAO et al., 2019; VISHWANATHAN et al., 2011; VISHWANATHAN; SINGH; SUBRAMANIAN, 2011; WIBOONSIRIKUL et al., 2013). Entretanto, para obter esse material é necessário primeiramente remover a água através de processos que são, na maioria das vezes, dispendiosos em termos de tempo e consumo de energia. Além disso, a secagem pode acarretar em alterações na coloração do okara (escurecimento) e na qualidade das proteínas (desnaturação e redução nas propriedades funcionais), como também na degradação e/ou decomposição de compostos bioativos presentes nesse material (GRIZOTTO; AGUIRRE, 2011; GUIMARÃES et al., 2020; MULITERNO et al., 2017; PERUSSELLO; DO AMARANTE; MARIANI, 2009; PRIVATTI et al., 2022; TARUNA; JINDAL, 2002; VOSS et al., 2018; WACHIRAPHANSAKUL; DEVAHASTIN, 2005).

Poucos trabalhos reportam a extração de OP a partir de okara não submetido a pré-tratamento de secagem ou remoção de lipídios (CHAN e MA, 1999a; 1999b; FIERENS; BRIJS; DELCOUR, 2016; MA et al., 1996). Do mesmo modo, Justus et al. (2019) e Sbroggio et al. (2016) empregaram okara úmido (WO) como material de partida para a extração de proteínas deste coproduto. Entretanto, os autores aplicaram tratamentos enzimáticos no WO previamente a extração da fração proteica. Ma et al. (1996), com o objetivo de aumentar a pureza dos concentrados proteicos, reportaram a remoção dos lipídios de OPs empregando hexano. No entanto, como supramencionado, esse solvente apresenta uma série de implicações negativas.

Assim, uma alternativa para a remoção dos lipídios presentes nas OPs é a utilização do etanol, um solvente seguro (GRAS), renovável e ambientalmente amigável (FDA, 2017; POTRICH et al., 2020). A literatura disponível reporta alta capacidade do etanol na extração de lipídios de soja (BUENO-BORGES et al., 2017; FERREIRA et al., 2022; SAWADA et al., 2014; TODA; SAWADA; RODRIGUES, 2016; TUNTIWIWATTANAPUN; TONGCUMPOU; WIESENORN, 2016). Aumentos significativos nos teores de proteínas

Capítulo III

recuperadas de soja foram observados por Peng et al. (2021) e Hua et al. (2005) após lavagens alcoólicas nos materiais de partida. Adicionalmente, Kaneko e Ishhi (1980), Berk (1992) e Sessa, Nelsen e Snyder (1998) verificaram máxima insolubilidade de proteínas em soluções etanólicas 60 % (etanol:água, 60:40 em massa).

Com relação às isoflavonas (IFs), compostos bioativos predominantes no okara (HU et al., 2020; JACKSON et al., 2002; KAMBLE; RANI, 2020; PRIVATTI; RODRIGUES, 2021; VONG; LIU, 2016), estas apresentam características semelhante as proteínas, em termos de solubilidade. Ou seja, as IFs tendem a se solubilizarem em meio alcalino e precipitam no ponto isoelétrico proporcionando assim o enriquecimento nutracêutico das OPs (JANKOWIAK et al., 2014a; SPERONI AGUIRRE; MILESI; AÑÓN, 2007). Ademais, as proteínas interagem com as IFs exercendo uma função protetora sobre estas (MALAYPALLY; ISMAIL, 2010; MATHIAS et al., 2006; MULITERNO et al., 2017). No entanto, informações relacionadas a influência da força iônica para a extração concomitante de proteínas e IFs são escassas na literatura disponível. Zhao et al. (2010) reportaram que sais bivalentes, como o $MgCl_2$, demonstraram maior capacidade de extração de IFs em sistemas miscelares frente a sais monovalentes.

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi extrair proteínas e IFs a partir de okara úmido e não desengordurado. Foram avaliadas diversas configurações experimentais, como o emprego do etanol nas etapas de precipitação das proteínas contidas nos extratos ou lavagem dos precipitados, visando a purificação das OPs. Também foram estudadas a influência da adição de sal bivalente e da extração com configuração por estágios em correntes cruzadas. Com o propósito de indicar possíveis aplicações para as OPs recuperadas, propriedades funcionais e parâmetros de cor, além do perfil molecular, também foram investigados.

III.2. Materiais e métodos

III.2.1. Materiais

O material de partida, okara, foi gentilmente fornecido pela Unidade de Desenvolvimento e Produção de Produtos de Soja (Universoja, Araraquara, SP) e foi mantido sob refrigeração ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) até sua utilização. Água deionizada (Millipore, Mili-Q, Bedford, MA, EUA) foi utilizada em diversas etapas para obtenção de soluções alcalinas, ácidas e salinas com concentrações desejadas. Hidróxido de sódio (CAS 1310-73-2, pureza $\geq 99\%$, Merck, Darmstadt, Alemanha), cloreto de magnésio (CAS 7786-30-3, pureza $\geq 99\%$, Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido clorídrico (CAS 7647-01-0, pureza $\geq 36,5\text{-}38,0\%$, Synth, São Paulo, Brasil) foram empregados no preparo das soluções alcalina, salina (solventes) e ácida

Capítulo III

(precipitação isoelétrica e SDS-PAGE), respectivamente. Etanol (CAS 64-17-5, pureza $\geq 99,8$ %, Synth, São Paulo, Brasil) foi empregado nas etapas envolvendo solução etanólica.

Para a caracterização dos materiais foram utilizados os reagentes: EDTA (Leco, St Joseph, MI, EUA), padrão D-(+)-glicose (CAS 50-99-7, pureza $\geq 99,5$ %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), ácido sulfúrico (CAS 7664-93-9, pureza 95-98 %, Synth, São Paulo, Brasil), fenol (CAS 108-95-2, pureza ≥ 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), n-hexano (CAS 110-54-3, pureza $\geq 98,5$ %, Synth, São Paulo, Brasil), óleo de soja (Liza®, Rio Verde, GO, Brasil), soluções tampão pH 9,0, 10,0 e 11,0 (Merck, Darmstadt, Alemanha), cloreto de sódio (CAS 7674-14-5, pureza ≥ 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Os géis de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS) foram preparados empregando: azul de bromofenol (CAS 115-39-9, pureza $\geq 98,5$ %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), acrilamida (CAS 79-06-1, pureza ≥ 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), bis-acrilamida (CAS 17-1304-02, pureza ≥ 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), tris-acrilamida (CAS 77-86-1, pureza ≥ 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), persulfato de amônia (CAS 7727-54-0, pureza ≥ 98 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (temed) (CAS 110-18-9, pureza ≥ 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), dodecil-sulfato de sódio (CAS 151-21-3, pureza $\geq 98,5$ %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), glicerol (CAS 56-81-5, pureza ≥ 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), β -mercaptaetanol (CAS 60-24-2, pureza ≥ 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), glicina (CAS 56-40-6, pureza ≥ 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), comassie brilliant blue R-250 (CBB R-250 (CAS 6104-59-2, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA)) e padrão de amplo espectro multicolorido (10-260 kDa, Thermo Fisher Scientific, Vihus, Lituânia).

Padrões Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA) de daidzina (CAS 552-66-9, pureza $\geq 98,0$ %), daidzeína (CAS 486-66-8, pureza $\geq 97,0$ %), genistina (CAS 529-59-9, pureza $\geq 98,0$ %) e genisteína (CAS 446-72-0, pureza $\geq 97,0$ %) foram empregados para a análise de IFs. Metanol (CAS 67-56-1, pureza $\geq 99,9$ %, Merck, Darmstadt, Alemanha), acetonitrila (CAS 75-05-8, pureza $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e ácido acético glacial (CAS 64-19-7, pureza $\geq 99,7$ %, Synth, São Paulo, Brasil) grau HPLC foram empregados nas etapas referentes a extração e quantificação de IFs e soluções relacionadas ao SDS-PAGE.

III.2.2. Análises de caracterização

III.2.2.1. Composição centesimal

O okara utilizado para a recuperação das proteínas e IFs foi submetido a caracterização de umidade (Ac 2-41, AOCS, 1998), teor de lipídios através de sistema de extração com solvente (n-hexano) à alta temperatura (Am 5-04, AOCS, 1998), nitrogênio total (Ba 4f-00, AOCS, 1998) por meio de combustão (Leco, FP-528, St. Joseph, MI, EUA), empregando o fator 6,25 (AOAC, 2007) para a conversão do teor de nitrogênio total em proteínas, cinzas (AOAC, 2007), fibras dietéticas solúveis (SDF) e fibras dietéticas insolúveis (IDF), segundo AOAC 991.43 (1995). Ademais, foi mensurado o teor de carboidratos solúveis, expresso em g equivalente de glicose/100 g de okara seco, como sugerido por Giannoccaro et al. (2006), com modificações em termos de tempo de agitação (30 minutos), aplicação de tratamento ultrassônico em banho (10 minutos) e número de extrações sequenciais (3 estágios), empregando água deionizada como solvente, proporção 1:15 (m/m, sólido: solvente). Foi utilizado o método fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956), em espectrofotômetro na região do visível (Shimadzu, UV-1650PC) a 490 nm, utilizando curva padrão de glicose (Figura B1, Apêndice B).

III.2.2.2. Extração e quantificação de IFs

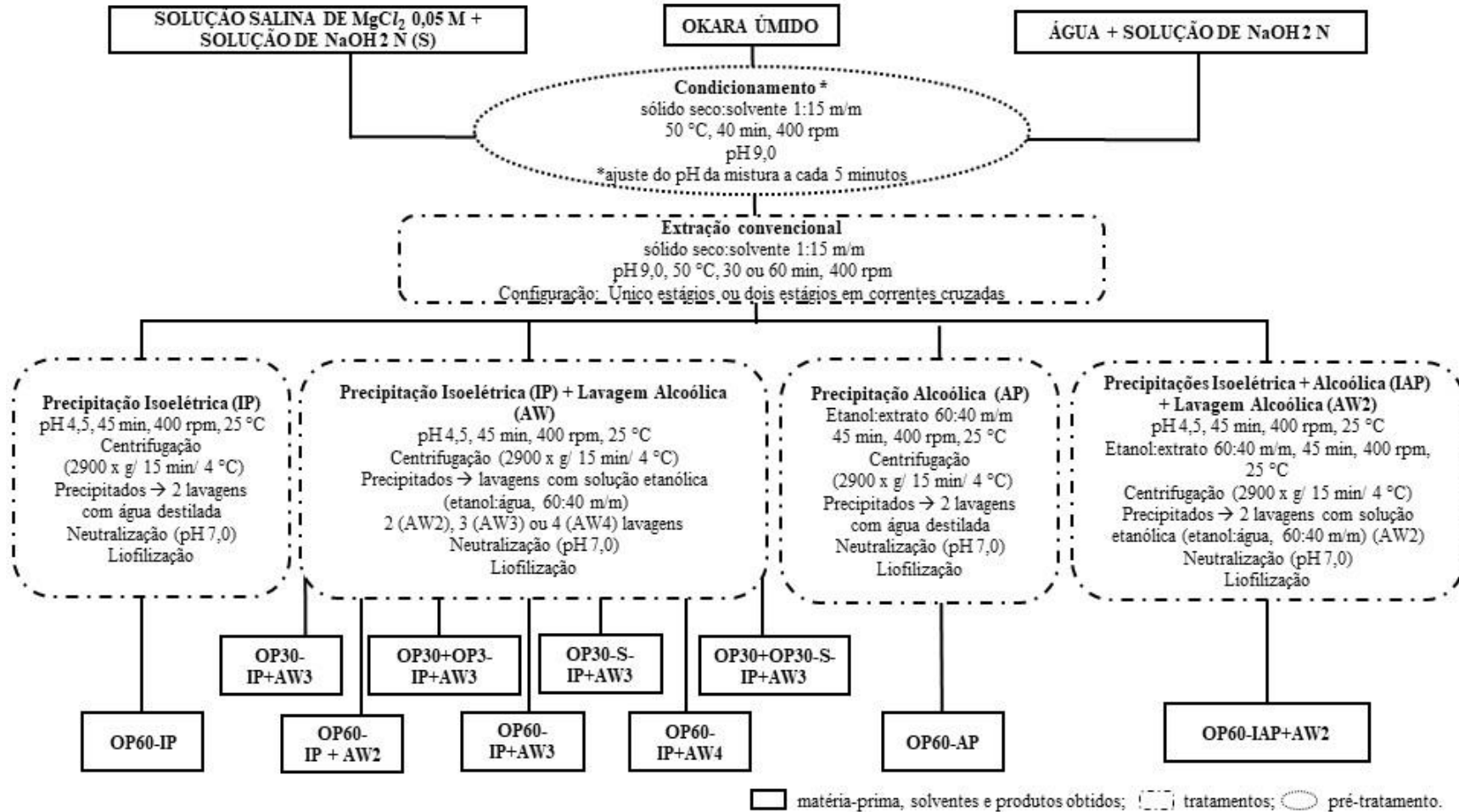
O protocolo sugerido por Privatti et al. (2022) para okara liofilizado, reportado no Capítulo II desta tese, foi utilizado para extração e quantificação dos teores de IFs agliconas (daidzeína e genisteína) e suas respectivas IFs β -glicosídeos (daidzina e genistina). Este protocolo foi utilizado uma vez que se mostrou o mais adequado para a extração de IFs dessa matriz.

Brevemente, WO foi liofilizado, seguindo os mesmos parâmetros descritos no Capítulo II (PRIVATTI et al., 2022), submetido a 2 estágios de extração (2 horas/estágio) e empregando solução metanólica 80 % (metanol:água, 80:20 m/m) como solvente. A identificação e quantificação das IFs foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por meio de curvas de calibração individuais dos padrões das IFs (Figura A2, Apêndice A), empregadas no Capítulo II (PRIVATTI et al., 2022). Os resultados foram expressos em μg IFs/g okara seco.

III.2.3. Recuperação das proteínas e IFs de okara

A Figura III.1 apresenta, de forma sucinta, as etapas realizadas para a obtenção das OPs a partir de WO, evidenciando as diferentes condições experimentais avaliadas.

Figura III.1. Configuração experimental para a obtenção das OPs a partir de WO.



Fonte: Própria autoria.

III.2.3.1. Variáveis de processo

Estudos preliminares com o material de partida (WO) foram conduzidos visando determinar os valores das seguintes variáveis de processo: razão sólido:solvente, agitação, pH e temperatura. O tempo de extração de 60 minutos foi baseado no estudo de Tao et al. (2019).

A razão sólido:solvente de 1:15 (sólido seco:solvente, em massa) foi definida com base em testes de dispersão do sólido úmido no solvente (água), ressaltando que a água presente no sólido (WO) foi contabilizada na quantidade total de solvente. Foi considerada a mínima quantidade de água que possibilitou a dispersão do sólido úmido, conforme ilustrado na Figura B2 (Apêndice B). Uma vez definido esse parâmetro, a dispersão do sólido úmido em água foi submetida a diversas velocidades de agitação, por meio de agitação magnética, onde 400 rpm propiciou a agitação adequada da mistura.

Um amplo estudo baseado no índice de solubilidade de nitrogênio proteico (NSI) do okara foi realizado para a determinação da temperatura e pH de extração. Para tal, foi utilizada a metodologia proposta por Morr et al. (1985) com modificações propostas por Sawada et al. (2014), em relação à proporção sólido:solvente (1:50 sólido seco:solvente, em massa), tempo de agitação da mistura, condições de centrifugação e método de determinação de proteínas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: valores de pH (2,0; 4,0; 4,5; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0), solventes (água, NaCl 0,1 M e tampões pHs 9,0; 10,0 e 11,0) e temperaturas (25 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C e 80 °C). Vale ressaltar que para viabilizar essas análises, tanto em termos de metodologia e reprodutibilidade quanto em relação a capacidade operacional (quantidade amostral, tempo e custos), o WO foi previamente seco em estufa de convecção forçada por 24 horas, a 60 °C.

III.2.3.2. Extração convencional

WO foi utilizado como material de partida para a extração das proteínas e IFs desse coproduto. As variáveis de processo definidas conforme item III.2.3.1 foram: pH 9,0, 50 °C, razão sólido:solvente 1:15 (sólido seco:solvente, em massa) e 400 rpm (agitação magnética).

As extrações foram conduzidas em célula encamisada de vidro *pyrex* (800 mL), fechada com tampa de teflon e sob condição de temperatura controlada por banho termostático (Marconi, MA184, Piracicaba, SP, Brasil). Quantidade conhecida de WO foi acondicionada na célula e água + solução de NaOH 2 N (solvente) foram adicionadas até a razão sólido seco:solvente pré-definida no item III.2.3.1 ser atingida. Importante reforçar que a quantidade de solvente adicionada levou em consideração a água contida no WO. Os 40 minutos iniciais de contato sólido/solvente foram denominados de etapa de condicionamento. Tal período foi

Capítulo III

definido por meio de experimentos preliminares (Figura B3, Apêndice B), visando a estabilização do pH de trabalho. Nessa etapa de condicionamento a mistura foi mantida sob agitação magnética constante (400 rpm), a 50 °C, com monitoramento e ajuste do pH com a solução de NaOH 2 N a cada 5 minutos.

Transcorrido o período de condicionamento, prosseguiu-se para a etapa de extração, a qual consistiu na agitação constante (400 rpm) da mistura, por mais 60 minutos a $50 \pm 0,5$ °C. Após o período de extração, a agitação foi cessada e coletou-se tanto a fase extrato quanto a fase sólida. Ambas as fases foram submetidas à centrifugação (5000 x g/ 15 minutos/ 25 °C) para maximizar a separação entre estas. O extrato foi filtrado (papel filtro Whatman nº 1) e submetido a etapa de precipitação. Os sólidos residuais foram lavados com água deionizada e submetidos a secagem em estufa de convecção forçada por 24 horas a 100 °C, originando os (refinados de okara (ORs) (Figura B4, Apêndice B).

III.2.3.2.1. Precipitação das proteínas extraídas

Diferentes tratamentos foram avaliados visando purificar as proteínas e IFs extraídas. Importante mencionar que para cada tratamento avaliado foram realizadas, no mínimo, quatro etapas de extração (item III.2.3.2) para formação de um único extrato.

(a) *Precipitação isoelétrica (IP)*: a metodologia proposta por L'Hocine, Boye e Arcand (2006) com modificações em relação aos parâmetros de centrifugação, foi utilizada para esse tratamento. Para tal, o pH do extrato foi ajustado para 4,5 com HCl 2 N. A mistura foi constantemente agitada (400 rpm) por 45 minutos, a 25 °C. Transcorrido esse período, a mistura foi centrifugada (2900 x g/ 4 °C/ 15 minutos), gerando 2 fases: precipitado e sobrenadante. O precipitado foi lavado com água deionizada e centrifugado por 10 minutos (2900 x g/ 4 °C), repetindo-se essa etapa novamente, totalizando 2 lavagens. Após as lavagens, este foi disperso em água deionizada e neutralizado, por meio do ajuste do pH (7,0), originando uma solução, denominada de solução proteica neutralizada, a qual foi submetida a liofilização. Vale ressaltar que alíquotas dessas soluções foram coletadas e armazenadas a -20 °C, para análises posteriores. A solução proteica liofilizada originou a OP60-IP (Figura III.1).

(b) *Precipitação isoelétrica (IP) + Lavagem alcoólica (AW)*: para esse tratamento novamente foi realizada a IP, entretanto, a água destilada utilizada nas lavagens foi substituída por solução etanólica 60 % (etanol:água, 60:40 m/m). Tal concentração etanólica foi baseada nos estudos de solubilidade de proteínas de soja em etanol conduzido por Sessa, Nelsen e Snyder (1998). Foram avaliados diferentes números de lavagens alcoólicas. Os produtos obtidos foram denominados, OP60-IP+AW2, OP60-IP+AW3 e OP60-IP+AW4, indicando o

Capítulo III

tempo de extração (60 minutos), o tipo de precipitação (IP) e o número de lavagens alcoólicas empregado, 2, 3 ou 4, respectivamente (Figura III.1).

(c) *Precipitação alcoólica (AP)*: as metodologias propostas por Kaneko e Ishii (1980) e Wang, Johnson e Wang (2004) foram adaptadas para este tratamento. Etanol absoluto foi adicionado ao extrato até a concentração da mistura atingir a proporção mássica, 60:40 etanol:extrato. Os parâmetros (tempo, agitação, temperaturas, centrifugação, lavagens, neutralização e liofilização) utilizados em IP foram mantidos constantes. O material obtido foi denominado OP60-AP (Figura III.1).

(d) *Precipitação isoelétrica + alcoólica (IAP) + Lavagem alcoólica (AW2)*: neste tratamento foi utilizada a metodologia sugerida por Wu et al. (2009) com modificações. Analogamente ao IP, o pH do extrato foi ajustado para 4,5, a mistura foi agitada (400 rpm) por 45 minutos, a 25 °C. Após esse período, ocorreu a adição de etanol absoluto, até a proporção mássica etanol:extrato atingir 60:40, como em AP. Novamente, a mistura foi agitada (400 rpm) por 45 minutos, a 25 °C, seguida por centrifugação (2900 x g/ 4 °C/ 15 minutos). Os precipitados foram lavados com solução etanólica 60 % (etanol:água, 60:40 m/m) por 2 vezes, neutralizados e liofilizados, originando a OP60-IAP+AW2 (Figura III.1).

Para cada condição experimental (a-d), ao mínimo uma repetição foi realizada.

III.2.3.3.2 Otimização da etapa de extração convencional

Os experimentos de otimização da etapa de extração convencional foram realizados em termos de tempo de extração, solvente e configuração por estágios em correntes cruzadas.

As variáveis razão sólido seco:solvente 1:15, m/m; pH 9,0; temperatura $50 \pm 0,5$ °C; agitação (400 rpm) e período de condicionamento de 40 minutos foram mantidas constantes. O parâmetro de processo avaliado foi a redução do período de extração de 60 para 30 minutos. O produto obtido foi designado como OP30-IP+AW3, uma vez que IP e 3 lavagens com solução etanólica 60 % (etanol:água, 60:40 m/m) foram consideradas como as melhores condições experimentais estabelecidas (III.2.3.2.1).

Em relação ao solvente, avaliou-se a adição de solução salina de $MgCl_2$ 0,05 M (ZHAO et al., 2010), a qual possui força iônica de 0,15 mol/L, ao sistema WO + solução de NaOH 2 N. As extrações foram conduzidas por 30 minutos e os demais parâmetros de processo foram mantidos constantes. Novamente optou-se por IP e 3 lavagens com solução etanólica 60 % (etanol:água, 60:40 m/m). O produto oriundo dessa investigação foi denominado OP30-S-IP+AW3, onde S faz referência ao sal (Figura III.1).

Capítulo III

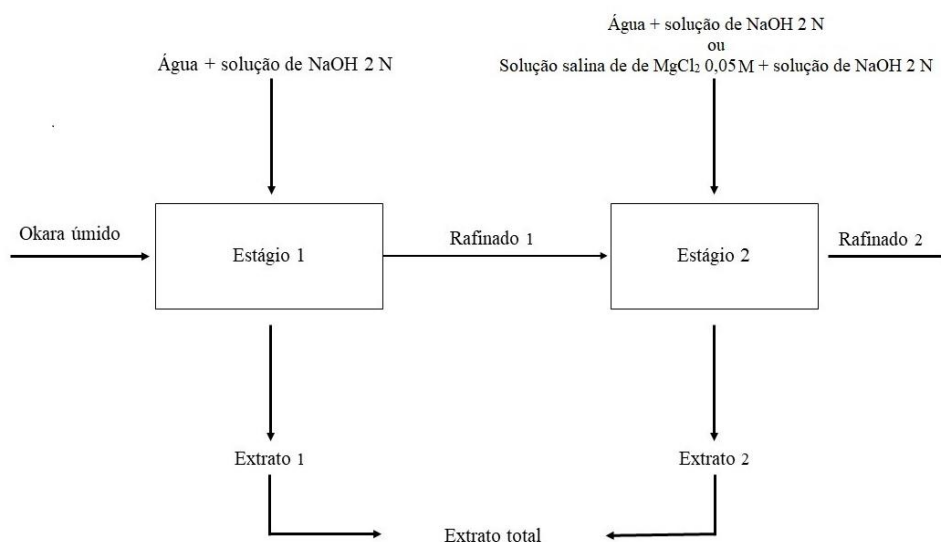
Ademais, foi pesquisada a configuração de estágios em correntes cruzadas, como esquematizado na Figura III.2. Nessa configuração, o sólido úmido oriundo do primeiro estágio de extração foi submetido a uma nova etapa de extração, visando maximizar a recuperação das proteínas do material de partida. Os extratos advindos dos 2 estágios foram combinados e submetidos as etapas subsequentes (IP, AW3, neutralização e liofilização). Duas configurações experimentais foram avaliadas:

(I) 2 estágios de extração de 30 minutos, empregando somente água + solução de NaOH 2 N como solvente, sendo o produto desta denominado OP30 + OP30-IP+AW3 (Figura III.1);

(II) 1º estágio utilizando água + solução de NaOH 2 N e 2º estágio empregando solução salina de $MgCl_2$ 0,05 M + solução de NaOH 2 N, ambos por 30 minutos, designado como OP30 + OP30-S-IP+AW3 (Figura III.1).

Vale ressaltar que, com exceção dos períodos de extração, as variáveis de processo definidas no item III.2.3.2. foram mantidas constantes. Em adição, foram realizadas ao menos 2 extrações para compor um extrato a ser precipitado e ao menos uma repetição de cada configuração experimental estudada.

Figura III.2. Diagrama representando a configuração de extração em correntes cruzadas.



Fonte: Própria autoria.

III.2.4. Composição das OPs

Teores de proteínas, lipídios, carboidratos solúveis, umidade residual e IFs das OPs foram determinados, ao menos em duplicata, por meio das metodologias descritas nos itens III.2.2.1 e III.2.2.2.

Importante citar que os teores de proteínas das soluções proteicas neutralizadas também foram quantificados pelo método de combustão (Ba 4f-00, AOCS, 1998).

III.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As soluções proteicas neutralizadas foram empregadas na avaliação do perfil molecular, por meio de SDS-PAGE, conforme metodologia descrita por Stanojevic et al. (2012) com modificações. O SDS-PAGE foi composto por dois géis: separação 12,5 % (pH 8,8) e empilhamento 5 % (pH 6,8). As concentrações proteicas das soluções neutralizadas foram padronizadas para 2,4 mg/mL, empregando como diluente solução contendo 47,5 % de água deionizada, 12,5 % de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 20 % de SDS, 10 % de glicerol, 5 % de β -mercaptaetanol e 5 % de solução de azul de bromofenol 1 %. As misturas foram aquecidas (95 °C) por 5 minutos e alíquotas de 25 μ L foram alocadas no gel, junto a um tampão de corrida (pH 8,3). A eletroforese foi conduzida a 100 V por cerca de 240 minutos. O gel foi contactado com solução metanol:ácido acético glacial:água (50:10:40, v/v/v) por 60 minutos para fixação das bandas, prosseguindo para a solução corante, composta por 0,1 % de azul de Comassie (CBB R-250), 10 % de ácido acético glacial e 40 % de metanol, durante 60 minutos. Após o período de coloração, o excesso de corante foi removido com solução metanol:ácido acético glacial, 59:41 em volume. Padrão de amplo espectro multicolorido (10-260 KDa) foi utilizado para o SDS-PAGE.

O sistema de detecção de proteínas ChemiDocTM MP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) foi empregado para captura de imagens do gel e o programa ImageJ foi empregado para estimar quantitativamente as subunidades proteicas, por meio da estimativa da área correspondente da subunidade em relação à área total das subunidades, em porcentagem.

III.2.6. Propriedades funcionais

III.2.6.1. Higroscopicidade (HM) e capacidades de absorção de água (WHC) e óleo (OHC)

A higroscopicidade das OPs foi estimada, em duplicata, de acordo com o método de Cai e Corke (2000), com modificações em termos de quantidade amostral e expressão dos resultados. Massas conhecidas de OPs foram mantidas sob armazenamento em ambiente hermético contendo solução saturada de Na₂SO₄ com umidade relativa de 81 %, sendo pesadas após 7 dias. A higroscopicidade foi expressa como a quantidade de água absorvida por grama de OP.

As capacidades de absorção de água (WHC) dos ORs e óleo (OHCs) tanto das OPs quanto dos ORs foram determinadas, em duplicata, conforme descrito por Zhang et al. (2012), empregando razão 1:40 (sólido:água ou sólido:óleo, em massa), agitação por 30 minutos em agitador de tubos (Heildolph, model Multi Reax), repouso de 30 minutos, centrifugação (3000 x g/ 25 °C/ 30 minutos), drenagem, descarte da água ou do óleo e pesagem. As capacidades foram expressas como a massa de água ou de óleo retida por grama de sólido (OP ou OR).

III.2.6.2. Propriedades emulsificantes

O método turbidimétrico proposto por Pearce e Kinsella (1978) foi empregado para a determinação dos índices de atividade (EAI) e estabilidade (ESI) das emulsões, em triplicata, com adaptações relacionadas ao preparo das emulsões, uma vez que as soluções proteicas neutralizadas foram utilizadas para esse fim. Primeiramente, padronizou-se os teores de proteínas de cada solução para 0,10 %, empregando água deionizada como diluente. As emulsões foram preparadas por homogeneização (10000 rpm, por 1 minuto) de 3 mL das soluções proteicas (0,10 %) e 1 mL de óleo de soja refinado, sob temperatura ambiente (25 °C). O EAI foi determinado por meio de diluição de 140 µL das emulsões em 12,5 mL de solução de SDS (0,1 %) e medição da absorbância em 500 nm. A Equação III. 1 foi empregada para o cálculo do EAI, o qual foi expresso em m²/g.

$$EAI_0 = \frac{2*2,303*A_0*D}{C*\emptyset*10000} \quad (\text{III. 1})$$

Onde, A₀= absorbância (nm) nos primeiros instantes após o preparo das emulsões diluídas; D= fator de diluição (89,29); C= massa de proteína por volume de solução proteica (g/mL) e ∅= fração volumétrica de óleo contida na emulsão.

Após 10 minutos, as absorbâncias (A₁₀) das emulsões diluídas foram novamente medidas para a quantificação da ESI através das equações III. 2 e III. 3.

Capítulo III

$$EAI_{10} = \frac{2*2,303*A_{10}*D}{C*\emptyset*10000} \quad (\text{III. 2})$$

$$ESI = \frac{EAI_{10}}{EAI_0} \times 100 \quad (\text{III. 3})$$

III.2.6.2.1. Determinação do diâmetro médio das gotículas de óleo nas emulsões

Os diâmetros médios das gotículas de óleo nas emulsões foram determinados em um analisador de tamanho de partículas por difração à laser (Shimadzu, modelo SALD-201V, Japão). Para estas análises, alíquotas das emulsões foram dispersas em água deionizada e inseridas no equipamento para medição dos diâmetros médio das gotículas, por meio do *software* WingSALD-201V (versão 1.30). Destaca-se que os diâmetros foram mensurados nos primeiros instantes após o preparo das emulsões diluídas e após 10 minutos.

III.2.6.3. Propriedades espumantes

As propriedades espumantes das OPs, índices de capacidade de formação (FAI) e estabilidade (FSI) de espuma, foram determinadas, em quintuplicata, segundo os procedimentos delineados por Yadav, Yadav e Chaudhary (2011) e Zhang et al. (2012) com modificações. As espumas foram formadas por meio de agitação vigorosa, por 5 minutos, das misturas compostas por OPs e solução tampão pH 9,0, proporção 1:50 (OP:solução tampão, em massa). A Equação III. 4 foi empregada para os cálculos de FAI.

$$FAI (\%) = \frac{A_2 - A_1}{A_1} * 100 \quad (\text{III. 4})$$

Em que os termos A_1 e A_2 referem-se às alturas das misturas antes da agitação para formação da espuma (cm) e às medidas das alturas após 30 segundos da agitação (cm), respectivamente.

As medidas das alturas das (espumas + misturas) após 10, 30, 45 e 60 minutos de suas formações foram utilizadas para a determinação dos FSI, conforme metodologia proposta por Bandyopadhyay, Misra e Ghosh (2008).

III.2.7. Parâmetros de cor

O colorímetro (CR-400, KonicaMinolta, Japão) foi utilizado para determinar os parâmetros de cor das OPs. Os parâmetros mensurados, em triplicata, foram: L^* , referente a luminosidade, coordenada vermelho/verde (a^*) e coordenada amarelo/azul (b^*). A mudança de cor total (ΔE) (Equação III. 5) foi calculada como sugerido por Li et al. (2012) empregando o

okara (material de partido) liofilizado como referência (L_0 , b_0 e a_0). Além disso, a Equação III. 6. foi empregada para o cálculo do ângulo Hue (h°), de acordo com McGuire (1992).

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (b - b_0)^2 + (a - a_0)^2} \quad (\text{III. 5})$$

$$h^\circ = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad (\text{III. 6})$$

III.2.8. Análise estatística

O programa SAS® (Versão 9.4, SAS Institute Inc., EUA) foi utilizado para comparar por análise de variância (ANOVA) os dados médios experimentais, empregando o teste de amplitudes múltiplas de Duncan (DMRT) (1955), ao nível de significância de 5 %.

III.3. Resultados e Discussão

III.3.1. Caracterização da matéria-prima

III.3.1.1. Composição do okara

O teor médio de água presente no okara, empregado como material de partida, foi de $75,4 \pm 0,8$ g de água/ 100 g WO. A composição percentual média dos sólidos remanescentes no WO, em termos de proteínas, lipídios, cinzas, fibras totais, solúveis e insolúveis (TDF, SDF e IDF), em base seca, está apresentada na Tabela III.1. Adicionalmente, o okara em questão, continha teor total de carboidratos solúveis de $4,5 \pm 0,2$ g de glicose/ 100 g de okara seco.

Tabela III.1. Composição percentual média do WO, em base seca.

Componente	Composição (g/100 g) *
Proteínas	$38,9 \pm 0,8$
Lipídios	$16,1 \pm 0,2$
TDF	46 ± 2
IDF	42 ± 1
SDF	$3,3 \pm 0,6$
Cinzas	$2,6 \pm 0,1$

* Resultados em base seca estão expressos como média \pm desvio padrão de no mínimo, 2 repetições. Fonte: Própria autoria.

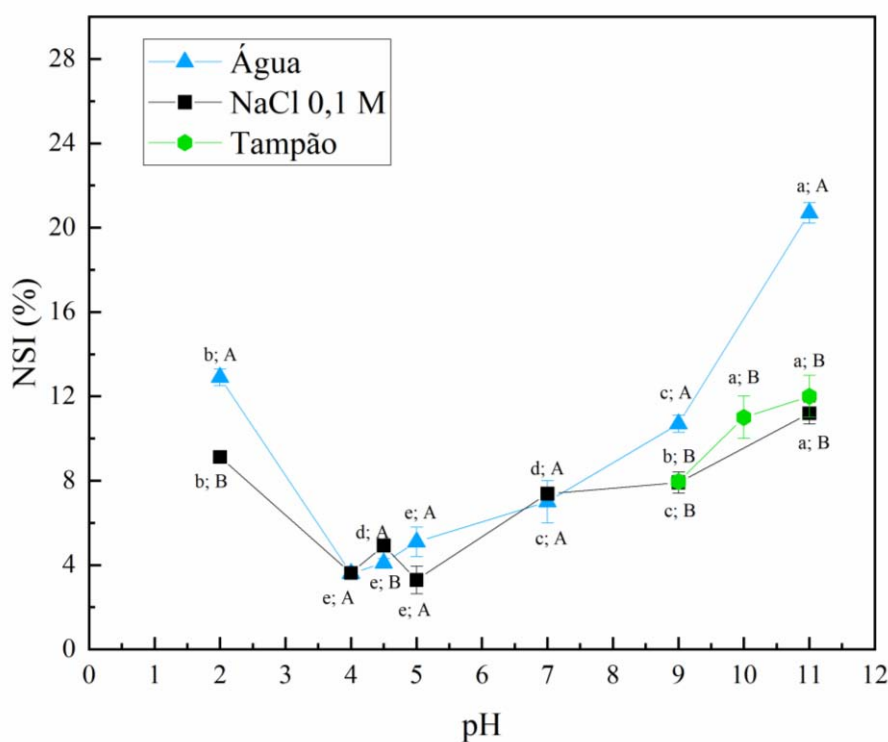
Em relação as IFs, os teores quantificados por grama de okara seco, foram: 230 ± 4 μg daidzina, 255 ± 2 μg genistina, 476 ± 10 μg daidzeína e 241 ± 8 μg genisteína.

Tanto o processo para a produção do WSSE quanto as variações relacionadas aos grãos de soja influenciam na composição desse coproduto sólido (PRIVATTI; RODRIGUES, 2021; VONG; LIU, 2016). No entanto, o okara empregado nesse estudo apresentou faixa de valores composicionais em consonância com os teores compilados da literatura por Privatti e Rodrigues (2021) (Capítulo I desta tese).

III.3.1.2. Índice de solubilidade do nitrogênio proteico (NSI)

A Figura III.3 apresenta as curvas de solubilidade das proteínas do okara, a 25 °C, em diferentes solventes (água, NaCl 0,1 M e soluções tampão de pHs 9,0; 10,0 e 11,0).

Figura III.3. Índice de solubilidade do nitrogênio (NSI, %) das proteínas do okara em função do solvente e pH, a 25 °C.



*Letras minúsculas diferentes na mesma curva indicam que houve diferenças estatisticamente significativas nos valores ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas diferentes no mesmo pH indicam que houve diferenças estatisticamente significativas nos valores ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Capítulo III

O tipo de solvente não influenciou no perfil de solubilidade das proteínas do okara, sendo este em forma de cone invertido, com valores máximos de NSI nos pHs 2,0 e 11,0. Estes resultados corroboram os perfis de solubilidade de okara observados por Chan e Ma (1999a, 1999b), Ma et al. (1996) e Vishwanathan, Singh e Subramanian (2011).

No entanto, o okara apresentou solubilidade reduzida frente aos valores de NSI encontrados por Ma et al. (1996) e Chan e Ma (1999a), os quais obtiveram NSIs máximos em pH 11,0, em torno de 30 %, utilizando NaCl 0,1 M como solvente. Os resultados também foram reduzidos frente aos dados relatados por Vishwanathan, Singh e Subramanian (2011), que alcançaram NSI de 80 % em pH 11,0 ao empregarem água como agente de solubilização. Muliterno et al. (2017) relataram temperaturas de início de desnaturação entre 65 e 75 °C e 85 e 95 °C para as globulinas 7S e 11S, respectivamente, as quais, de acordo com Stanojevic et al. (2012), são as principais frações proteicas do okara. Assim, tendo em vista que para a produção do WSSE e, conseqüentemente, do okara em questão, calor foi empregado nas etapas de cozimento e trituração (~100 °C), pode-se inferir que a fração proteica desse okara encontra-se parcialmente ou totalmente desnaturada, em consonância com o pressuposto por Ma et al. (1996). Ademais, a desnaturação proteica provavelmente acarretou a complexação das proteínas com os demais constituintes da matriz, como sugerido por Deak e Johnson (2007) e Preece et al. (2015, 2017).

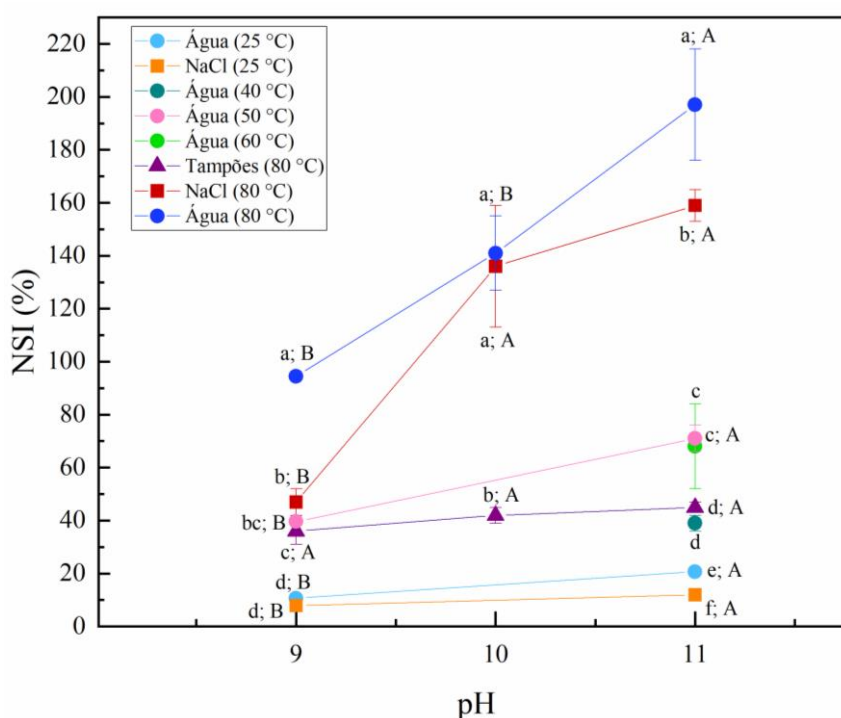
A água possibilitou a maior solubilização da fração proteica do okara, frente as soluções tampão e salina (NaCl 0,1 M). Os dados reportados na literatura disponível relacionados ao efeito da força iônica sobre a capacidade de extração de proteínas de soja divergem consideravelmente, tanto em termos de potencial de extração frente a água, quanto em relação a concentração e valência do sal. Ganhos de 10 % para 65 % nos teores de proteínas extraídas empregando NaCl 0,7 N ou CaCl₂ 0,3 N frente a água foram descritos por Anderson, Wolf e Glove (1973). Da mesma forma, Puppo e Añón (1998) verificaram aumentos progressivos no NSI adicionando NaCl até 0,5 M. Em contrapartida, Shen (1976), Wagner e Añón (1990) e Barbosa, Lajolo e Genovese (2006) reportaram diminuição na solubilidade das proteínas de soja, em comparação a água, ao empregarem soluções salinas de NaCl nas concentrações de 0,5 M, 0,2 M e 0,1 a 0,2 M, respectivamente. Um fator limitante é a força iônica exercida pelos sais. Zhou et al. (2016) encontraram redução na solubilidade proteica utilizando uma mistura de sais (NaH₂PO₄ e NaCl) com força iônica de 0,2 comparada as soluções de NaH₂PO₄ e NaCl com forças iônicas de 0,06 e 0,6. Ademais, segundo Smith e Circle (1938) e Zhao et al. (2010), sais bivalentes possuem maior potencial de extração frente aos monovalentes. Smith e Circle (1938) verificaram solubilidade proteica de 84,7 % em pH

Capítulo III

9,0 em baixíssima concentração de CaCl_2 (0,001 N), assim como Zhao et al. (2010) empregando MgCl_2 e CaCl_2 obtiveram um salto em 10 % nos teores de proteínas extraídas, em relação a sais monovalentes. Tais divergências são atribuídas aos tamanhos das partículas, composição da matriz vegetal, grau de desnaturação da fração proteica e interação dos componentes com o sal, o qual pode acarretar na formação de agregados insolúveis, por meio de ligações hidrofóbicas e/ou iônicas e/ou pontes de dissulfeto (SHEN, 1976; WOLF; BRIGGS, 1956; ZHOU et al., 2016).

Privatti e Rodrigues (2021) (Capítulo I) reportam uma ampla faixa de temperatura (20 a 80 °C) empregada para a recuperação da fração proteica de okara. Assim, foi realizado um estudo avaliando a influência de diferentes temperaturas no NSI do okara, em pHs de maior solubilidade, conforme Figura III.4, visando a determinação da temperatura e pH de trabalho.

Figura III.4. Índice de solubilidade do nitrogênio (NSI, %) das proteínas do okara em função da temperatura, tipo de solvente e pH.



* Letras minúsculas diferentes no mesmo pH indicam que houve diferenças estatisticamente significativas nos valores ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma curva indicam que houve diferenças estatisticamente significativas nos valores ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

De modo geral, maior difusão das proteínas para os solventes foi observada com a elevação da temperatura, em concordância com Ma et al. (1996) os quais reportaram solubilidade crescente das proteínas de okara com o incremento na temperatura. Os maiores

Capítulo III

valores de NSI foram observados a 80 °C, no entanto essa temperatura pode ocasionar desnaturação das proteínas, visto que as frações proteicas do okara possuem temperaturas de desnaturação entre 65 e 95 °C (MULITERNO et al., 2017).

Com base no interesse desse estudo em extrair concomitantemente proteínas e IFs, 50 °C foi a temperatura selecionada. Esta condição de temperatura favoreceu a solubilização das proteínas quando comparada a 25 °C, de $10,7 \pm 0,4$ para $39,62 \pm 0,08$ em pH 9,0 e $20,7 \pm 0,5$ para 71 ± 5 , no pH 11,0. Também, de acordo com Jankowiak et al. (2014a), 50 °C mostrou alta capacidade de extração de todas as classes de IFs. Ademais, os mesmos autores reportaram decréscimos na classe malonilglicosídeos, a partir de 65 °C. Além disso, optou-se por esta temperatura tendo em vista as interações intermoleculares entre proteínas e IFs, a susceptibilidade das IFs a altas temperaturas, principalmente em meios onde as proteínas encontram-se desnaturadas. Quando as proteínas são desnaturadas, as interações com as IFs são quebradas, acarretando na exposição dos biocompostos ao calor, reduzindo com isso sua estabilidade (HUANG; CHOU, 2008; MALAYPALLY; ISMAIL, 2010; MATHIAS et al., 2006; MULITERNO et al., 2017b; PRIVATTI et al., 2022; UNGAR; OSUNDAHUNSI; SHIMONI, 2003)

Em relação ao pH, segundo Preece, Hooshyar e Zuidam (2017), pHs altamente alcalinos podem acarretar hidrólise dos constituintes da soja. Tal fato foi observado no presente estudo, principalmente sob alta temperatura (80 °C), onde os valores de NSI foram superiores a 100 %. Chan e Ma (1999a, 1999b) e Fierens, Brijs e Delcour (2016) também observaram ganhos no NSI com o aumento do nível de hidrólise, corroborando os resultados encontrados por este estudo. Ademais, Elfalleh et al. (2016) reportaram liberação de nitrogênio não-proteico simultaneamente a hidrólise dos constituintes de soja. Rosenthal, Pyle e Niranjana (1998) relataram extração concomitante da fração lipídica e atribuíram esse fato a hidrólise das oleosinas. Adicionalmente, Ma et al. (1996) observaram coloração em tons esverdeados nas proteínas de okara recuperadas em pH 11,0. Quanto as IFs, Jankowiak et al. (2014a) verificaram altos níveis de extração das classes de IFs agliconas, β -glicosídeos e malonilglicosídeos em pH 9,0. Por outro lado, a elevação do pH para 11,0 acarretou na redução da classe malonil, a qual foi atribuída a desesterificação do grupo carboxil presente neste grupo de IFs. Assim, com base nos resultados encontrados e na literatura, o pH 9,0 foi selecionado para a recuperação de proteínas e IFs do okara. Tais valores estão em consonância com os parâmetros elencados como mais eficientes por Barbosa, Lajolo e Genovese (2006) para produção de isolados proteicos enriquecidos em IFs a partir de farinha de soja desengordurada.

III.3.2. Caracterização da proteína recuperada de okara

III.3.2.1. Efeitos dos tratamentos empregando etanol na etapa de purificação sobre a fração proteica e isoflavonas

A Tabela III.2 apresenta a composição das OPs recuperados de WO empregando 60 minutos de extração convencional, seguida por diferentes tratamentos empregando etanol na etapa de purificação.

OP60-IP apresentou em torno de 50 % de proteínas. Teores semelhantes de proteínas recuperadas a partir de WO foram reportados por Justus et al. (2019), os quais também citaram conteúdo proteico variando de 47,6 a 52,4 % em hidrolisados proteicos de okara. Em contrapartida, Ma et al. (1996) encontraram teores superiores de 58,8 % e 55,3 % ao também extraírem proteínas a partir de WO nas temperaturas de 80 °C e 25 °C, respectivamente. Os resultados encontrados estão em concordância com o estudo de solubilidade da fração proteica realizado (Figura III.4), onde pressupõe-se que a fração proteica do okara empregado como material de partida, possivelmente encontra-se complexada com os demais constituintes desse material, influenciando com isso o conteúdo de proteínas extraídas. Outro possível fator relevante, também relacionado ao WO, é a quantidade de água contida neste material (~ 75 %) e a forte interação desta com os sólidos remanescentes nesse material.

Tabela III.2. Composição percentual média das OPs, em base seca, em função do tratamento etanólico empregado.

Tratamentos	Composição (g/100 g de sólido)			
	Proteínas	Lipídios	Carboidratos solúveis*	Umidade residual**
OP60-IP	51,1 ± 0,6 ^{cd}	12,3 ± 0,3 ^a	2,3 ± 0,02 ^d	5,9 ± 0,6 ^e
OP60-IP+AW2	65 ± 2 ^a	6,3 ± 0,1 ^b	2,55 ± 0,05 ^{cd}	7,38 ± 0,05 ^d
OP60-IP+AW3	62,6 ± 0,4 ^a	4,4 ± 0,6 ^c	2,4 ± 0,3 ^d	13 ± 4 ^{bc}
OP60-IP+AW4	60 ± 2 ^{ab}	4 ± 0,5 ^c	3,02 ± 0,02 ^c	20 ± 1 ^a
OP60-AP	52,5 ± 0,6 ^c	1,1 ± 0,1 ^d	7,9 ± 0,3 ^a	11,39 ± 0,05 ^c
OP60-IAP+AW2	56 ± 1 ^b	3,9 ± 0,2 ^c	5,0 ± 0,3 ^b	14,04 ± 0,09 ^b

* Resultados expressos em equivalente de glicose.

Resultados expressos como média ± desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

Capítulo III

Ademais, verificou-se a extração concomitante de lipídios. De acordo com Preece, Hooshyar e Zuidam (2017) e Rosenthal, Pyle e Niranjana (1998), proteínas e lipídios apresentam comportamento similar em pHs básicos e ácidos. Devido as propriedades tensoativas das proteínas, estas consolidam as gotículas de lipídios no meio. Teores próximos a 70 % de proteínas foram reportados por Jiménez-Escrig et al. (2010), Tao et al. (2019) e Vishwanathan et al. (2011) empregando como material de partida okara seco desengordurado. Ma et al. (1996) obtiveram elevação superior a 40 % no teor de proteínas ao removerem os lipídios das OPs.

Com isso, o etanol foi inserido no processo, visando reduzir a fração lipídica presente em OP60-IP. Conforme mencionado, o etanol foi o solvente eleito para esse fim, devido seu potencial de extração de óleo de soja (FERREIRA et al., 2022; SAWADA et al., 2014; TODA; SAWADA; RODRIGUES, 2016; TUNTIWIWATTANAPUN; TONGCUMPOU; WIESENBORN, 2016), reconhecimento como solvente seguro (GRAS), baixo impacto ambiental e capacidade de renovação (FDA, 2017; POTRICH et al., 2020).

De modo geral, independente do tratamento alcoólico, as OPs exibiram comportamento semelhante: redução de lipídios e elevação nos teores de proteínas, carboidratos solúveis e umidade residual. A precipitação alcoólica (OP60-AP) proporcionou 91 % de redução na fração lipídica mas, em contrapartida, foram observados aumentos de 2,3 para 7,9 no teor de carboidratos solúveis e de 5,9 para 11,39 na umidade, assim o teor de proteínas não foi significativamente alterado ($p > 0,05$). Kaneko e Ishii (1980) encontraram precipitação de proteínas em torno de 90 % utilizando solução etanólica 60 % para esse fim, corroborando com Sessa, Nelsen e Snyder (1998), os quais reportaram NSI inferior (10 %) nessa concentração alcoólica. Analogamente, os carboidratos solúveis tenderam a precipitar junto a fração proteica, uma vez que a concentração de etanol empregada não favoreceu a solubilização destes no meio etanólico. De acordo com Alavi, Pazuki e Raisi (2014), Islam et al. (2020) e Montañés et al. (2007), altos índices de solubilidade de carboidratos ocorrem em concentrações etanólicas superiores a 80 %. A combinação das precipitações isoelétrica e alcoólica (OP60-IAP+AW2) propiciou redução de cerca de 68 % no teor de lipídios, em comparação ao produto obtido empregando somente IP (OP60-IP). Também foi observado menor teor de carboidratos solúveis nas OPs frente ao OP60-AP. Ademais, verificou-se um ganho de 9 % no conteúdo de proteínas. No entanto, tal tratamento é oneroso em termos de tempo de processo, na medida em que duplica a etapa de precipitação. Todavia, os tratamentos empregando lavagens com solução etanólica 60 % (etanol:água, 60:40 em massa), favoreceram tanto a elevação nos teores de proteínas, em torno de 20 %, quanto a remoção dos lipídios (~ 60 %), destacando 3 lavagens (OP60-IP+AW3). Esta condição não impactou significativamente no teor de carboidratos

Capítulo III

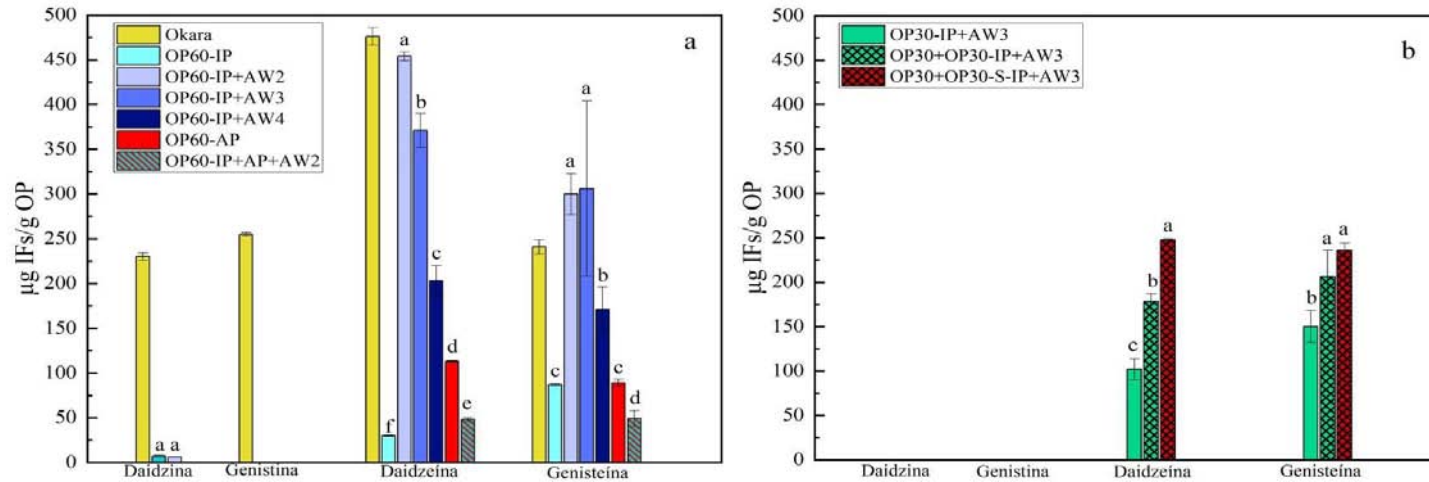
solúveis e propiciou redução significativa ($p < 0,05$) no teor de lipídios frente a 2 lavagens etanólicas (OP60-IP+AW2). Com base nesses resultados, 3 lavagens com solução etanólica 60 % (etanol:água, 60:40 em massa) (AW3) foi eleito como tratamento mais viável para a purificação das proteínas extraídas de WO.

Em relação as IFs (Figura III.5a), o método de extração empregado seguido por IP não promoveu a recuperação de IFs junto as proteínas. Novamente, este fato pode ser ligado ao material de partida, uma vez que Privatti et al. (2022) (Capítulo II desta tese) observaram maior extratibilidade de IFs em okara submetido a diferentes métodos de secagem frente ao WO. Em adição, as mesmas autoras verificaram que para a utilização do WO tem-se a necessidade de vários estágios de extração para maximizar a recuperação das IFs. Ademais, pode-se inferir que as IFs extraídas possivelmente permaneceram no sobrenadante após a etapa de precipitação isoelétrica, como sugerido por Speroni Aguirre, Milesi e Añón (2007), Wally-Vallin et al. (2014) e Wang et al. (1998), os quais verificaram níveis consideráveis de IFs nos sobrenadantes após IP.

Tais suposições corroboram os resultados, uma vez que a recuperação das IFs foi favorecida pela adição do etanol no processo, ocasionando a precipitação das IFs junto as OPs. Entretanto, o aumento do contato entre OPs e etanol, em termos de tempo (OP60-AP e OP60-IAP+AW2) e quantidade (OP60-AW3 e OP60-AW4) acarretaram na diminuição progressiva nos teores de IFs. Segundo Peng et al. (2021), mudanças na hidrofobicidade da fração proteica são induzidas pelo etanol, o que provavelmente contribuiu para o ganho no teor de IFs, uma vez que estas tendem a se associar ao interior hidrofóbico das proteínas (MALAYPALLY; ISMAIL, 2010; SPERONI AGUIRRE; MILESI; AÑÓN, 2007; SPERONI; MILESI; AÑÓN, 2010). No entanto, as IFs possuem maior afinidade pelo etanol frente a água (JANKOWIAK et al., 2014b), podendo-se inferir que estas permaneceram no meio etanólico com a adição de lavagens alcoólicas subsequentes (OP60-IP+AW3 e OP60-IP+AW4) ou do maior tempo de contato entre etanol e extrato proteico, nos tratamentos empregando precipitações alcoólicas (OP60-AP e OP60-IAP+AW2).

Capítulo III

Figura III.5. Teores de IFs nas proteínas de okara. (a) extração convencional por 60 minutos, seguida por diferentes tratamentos alcoólicos; (b) extração convencional por 30 minutos, em função do solvente e da configuração por estágios em correntes cruzadas.



Resultados expressos como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais no mesmo tipo de IF não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

III.3.2.2. Otimização da etapa de extração convencional

Em relação ao estudo da cinética de extração de proteínas foram conduzidos experimentos independentes em 30 e 60 minutos, sendo monitorados os teores de nitrogênio contidos nos extratos. Os extratos apresentaram em 30 e 60 minutos contínuos de extração 25 ± 3 e $17,7 \pm 0,1$ g de proteínas/ 100 g de mistura, respectivamente. Assim com base nesse estudo, pode-se inferir que a transferência das proteínas para o solvente ocorre em 30 minutos de extração, pois a extensão do período de agitação e aquecimento em meio alcalino provocou a redução no valor de NSI. Esta redução indica que após 30 minutos provavelmente ocorreu polimerização das proteínas, decorrente da formação de pontes dissulfeto intermoleculares, devido a grupos sulfidrila livres, indicando uma possível complexação das proteínas com os demais componentes do okara, corroborando Zayas (1997). Os protocolos de extração de proteínas de okara conduzidos por Jiménez-Escrig et al. (2010), Ma et al. (1996) e Vishwanathan, Singh e Subramanian (2011) utilizam 30 minutos de agitação. Assim, tanto para os experimentos avaliando a solução salina como solvente, quanto para a avaliação da configuração por estágios em correntes cruzadas, empregou-se 30 minutos de extração.

Os resultados das composições percentuais médias das OPs advindas do estudo de otimização da extração convencional, em função do solvente e do número de estágios de contato, 1 ou 2 estágios em configuração em correntes cruzadas, são apresentados na Tabela III.3.

Tabela III.3. Composição percentual média das OPs, em base seca, em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.

Número de estágios	Tratamentos	Composição (g/100 g de sólido)			
		Proteínas	Lipídios	Carboidratos solúveis*	Umidade residual**
1	OP30-IP+AW3	59,4 ± 0,1 ^b	4,2 ± 0,3 ^b	3,0 ± 0,8 ^b	12,9 ± 0,2 ^a
	OP30-S-IP+AW3	53,1 ± 0,6 ^c	nd	nd	nd ^b
2	OP30+OP30-IP+AW3	57,9 ± 0,9 ^b	3,6 ± 0,3 ^b	4,9 ± 0,1 ^a	8,46 ± 0,07 ^c
	OP30+OP30-S-IP+AW3	61 ± 1 ^a	5,35 ± 0,2 ^a	2,53 ± 0,02 ^b	9,2 ± 0,1 ^b

nd: não determinado.

* Resultados expressos em equivalente de glicose.

Resultados expressos como média ± desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

Capítulo III

Na configuração por estágios em correntes cruzadas, após o primeiro estágio de extração, o sólido remanescente (refinado) foi submetido a um novo processo de extração (estágio 2), conforme previamente esquematizado na Figura III.2. No entanto, empregando em ambos os estágios água+solução de NaOH, o único ganho observado foi no teor de carboidratos solúveis, uma vez que os conteúdos de proteínas não exibiram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Solução de $MgCl_2$ 0,05 M foi avaliada como solvente, visando extrair a fração proteica insolúvel do WO. Segundo Anderson, Wolf e Glove (1973), a força iônica exercida pelos sais pode solubilizar proteínas previamente insolúveis. Em adição, soluções salinas demonstram efeitos benéficos majoritariamente sobre a solubilização das globulinas 7S (FIGUEIREDO et al., 2018; JIANG; XIONG; CHEN, 2010). Jiang, Xiong e Chen (2010) empregando solução de NaCl 0,6 M reportaram NSI próximo a 100 % para a fração 7S.

Ademais, o sal $MgCl_2$ foi selecionado uma vez que, de acordo com Smith e Circle (1938) e Zhao et al. (2010), cátions bivalentes apresentam maior capacidade de solubilização de proteínas frente aos monovalentes. Zhao et al. (2010) também reportaram altos índices de IFs extraídos com esse sal. Entretanto, a extração das proteínas de okara empregando somente solução salina de $MgCl_2$ 0,05 M+solução de NaOH 2 N como solvente em 1 estágio não apresentou ganhos em relação ao tratamento sem sal (OP30-IP+AW3). De toda forma, OP30-S-IP+AW3 apresentou 53 % de proteínas, as quais foram caracterizadas em termos de SDS-PAGE e propriedades emulsificantes. Já na configuração com 2 estágios em correntes cruzadas combinando os solventes (1º estágio = água+solução de NaOH 2 N; 2º estágio = solução salina de $MgCl_2$ 0,05 M+solução de NaOH 2 N), um ganho em torno de 3 % ($p \leq 0,05$) no teor de proteínas recuperadas foi observado, sugerindo assim maior extração das globulinas 7S. Tal fato foi corroborado pela análise de SDS-PAGE (item III.3.2.3), a qual indicou maior porcentagem de globulinas 7S presentes nas OPs obtidas empregando a solução salina. Vishwanathan, Singh e Subramanian (2011) observaram ganhos, em torno de 8 %, aplicando extração em 2 estágios. A utilização da solução salina no 2º estágio (OP30+OP30-S-IP+AW3) propiciou extração simultânea de IFs agliconas ($248 \pm 1 \mu g$ de daidzeína e $236 \pm 8 \mu g$ de genisteína por g de material proteico de okara) (Figura 2b), em concordância com Zhao et al. (2010).

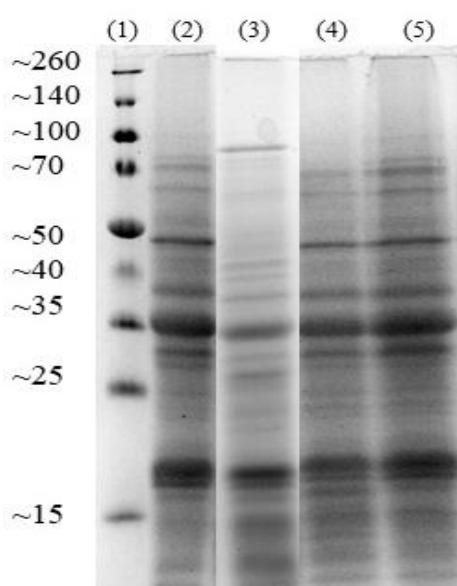
III.3.2.3. SDS-PAGE

Os perfis moleculares das OPs extraídas tanto com solução de NaOH 2 N (OP30-IP+AW3 e OP30+OP30-IP+AW3), quanto os provenientes das extrações com utilização de

Capítulo III

solução salina como solvente (OP30-S-IP+AW3 e OP30+OP30-S-IP+AW3), foram identificados por meio de SDS-PAGE, como mostrado na Figura III.6. Além disso, uma avaliação quantitativa foi realizada, baseada nas áreas de cada subunidade proteica em relação a somatória de todas as áreas, em porcentagem (Tabela III.4).

Figura III.6. SDS-PAGE das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas. (1) Padrões de massas molares (15-260 kDa); (2) OP30-IP+AW3; (3) OP30-S-IP+AW3; (4) OP30+OP30-IP+AW3; (5) OP30+OP30-S-IP+AW3.



Fonte: Própria autoria.

Tabela III.4. Estimativa da composição, em porcentagem, das subunidades proteicas das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.

Estágios	Tratamentos	β -conglícinina			γ -conglícinina	11S-ácida	Bg7S	11S-básica	<15 kDa
		α'	α	β					
1	OP30-IP+AW3	nd	2	13	4	32	0,3	33	15
	OP30-S-IP+AW3	7,5	nd	nd	nd	44	9	31	8,5
2	OP30+OP30-IP+AW3	nd	2	13	2	36	4	21	12
	OP30+OP30-S-IP+AW3	nd	15	9	6	29	2	31	8

nd= não detectado.

Fonte: Própria autoria.

Capítulo III

Altos índices de similaridade entre os perfis proteicos das OPs e os das proteínas de soja foram observados (JIANG et al., 2012; JIANG; XIONG; CHEN, 2010; KONG; CHANG, 2013; MUJOO; TRINH; NG, 2003) uma vez que as globulinas 7S e 11S foram as subunidades identificadas. As frações proteicas das OPs, independente do tratamento aplicado, consistem majoritariamente de subunidades de glicinina: 11S ácida (~ 43 a 32 e 15 kDa) e 11S básica (~18 kDa) (STANOJEVIC et al., 2012), em consonância com os perfis moleculares de concentrados proteicos de okara obtidos por Figueiredo et al. (2018; 2019) e Pereira et al. (2019).

Entretanto, as frações básicas da globulina 7S (Bg7S), massas molares em torno de 27 e 16 kDa (STANOJEVIC et al., 2012), não foram detectadas ou estavam presentes em traços, exceto quando a solução salina de $MgCl_2$ foi empregada como solvente. Observação também válida para a subunidade α' da β -conglucina (86 a 80 kDa) (STANOJEVIC et al., 2012; TAO et al., 2019), a qual só foi detectada ao empregar o solvente salino em 1 estágio (OP30-S-IP+AW3). As demais subunidades da β -conglucina, α (70 kDa) e β (50 kDa), como também a γ -conglucina (64 kDa) (STANOJEVIC et al., 2012), representaram cerca de 20 % da fração proteica total das OPs recuperados a partir de água+solução de NaOH 2 N. Todavia, um ganho de 50 % nessas subunidades foi observado ao utilizar a configuração de 2 estágios em correntes cruzadas combinando os solventes (OP30-OP30-S-IP+AW3), sugerindo assim que o sal provavelmente possibilitou a solubilização das globulinas previamente insolúveis. Este resultado está em consonância com Wolf e Briggs (1956), os quais também empregaram sal bivalente ($CaCl_2$) e encontraram todas as frações proteicas presentes em grãos de soja. Complementarmente, tal solubilização foi majoritariamente sobre as globulinas 7S, corroborando com Figueiredo et al. (2018) e Jiang, Xiong e Chen (2010).

Segundo Singh et al. (2015) e Stanojevic et al. (2012), Bg7S possui alta solubilidade em água a 50-60 °C, sendo a principal proteína presente em WSSE obtido à quente, enquanto 11S tende a se aglomerar em curtos períodos de tratamento térmico (5 minutos/ 100 °C). Também, de acordo com Stanojevic et al. (2012), as globulinas 7S, principalmente as frações básicas destas, estão fortemente ligadas às membranas plasmáticas e paredes celulares. Deste modo, pode-se inferir que Bg7S dos grãos de soja que originaram o WO em questão, foram majoritariamente solubilizadas para o WSSE, uma vez que este foi obtido via tratamento térmico. Pode-se inferir que as condições empregadas para a extração das proteínas do okara viabilizaram a dissociação dos agregados proteicos de 11S. Por outro lado, as condições foram menos efetivas na extração da Bg7S remanescente.

Adicionalmente, Ma et al. (1996) e Tao et al. (2019) encontraram subunidades com massas molares superiores a 100 kDa em OPs, as quais não foram detectadas/extraídas nesse estudos.

III.3.2.4. Propriedades funcionais

III.3.2.4.1. Higroscopicidade (HM) e capacidade de absorção de óleo (OHC)

Os valores de HMs das OPs são apresentados na Tabela III.5. A literatura disponível não apresenta dados para higroscopicidade, somente são reportados dados para WHC. Importante mencionar que não foi possível determinar neste trabalho os valores de WHC para as OPs devido provavelmente à alta capacidade de dispersão destas. Em testes preliminares aplicando a metodologia convencional para a determinação de WHC, verificou-se que as partículas da OP dispersavam no meio e eram perdidas junto a água descartada, inviabilizando assim a quantificação de WHC. Em adição, a metodologia empregada para HM é não destrutiva, o que possibilitou a utilização do mesmo material em outras análises, enriquecendo as informações sobre as características das OPs. Para fins ilustrativos, os valores de WHC reportados na literatura para as proteínas de okara estão na faixa de 0,65 a 14,69 g de água/ g OP (PRIVATTI; RODRIGUES, 2021). Os resultados de HMs determinados neste trabalho são inferiores ao resultados de WHCs da literatura, provavelmente como consequência da metodologia empregada para a determinação da afinidade destes pela água, assim como pela composição das OPs, como sugerido por Li et al. (2012). Estes autores verificaram alta correlação entre o conteúdo de frações solúveis e insolúveis e WHC. Ademais, globulinas 7S possuem maior capacidade de retenção de água frente as 11S (ZAYAS, 1997) e os perfis moleculares das OPs indicaram baixos teores dessas globulinas (Tabela III.4).

Em relação as condições experimentais foram verificadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. OPs obtidas em 2 estágios em correntes cruzadas apresentaram maiores valores de HMs, destacando a configuração empregando apenas água+solução de NaOH 2 N como solvente (OP30+OP30-IP+AW3). Esta observação sugere que a adição de um novo estágio provocou alterações nas OPs expondo provavelmente grupos polares. Todavia, ao adicionar a solução salina no segundo estágio (OP30+OP30-S-IP+AW3), provavelmente ocorreu uma competição entre os íons e água por esses grupos. Tal observação está em concordância com os valores de OHCs referentes a esses tratamentos (Tabela III.5). Os valores de OHCs apresentaram comportamento inverso aos HMs, visto que, de acordo com Zayas (1997), os lipídios tendem a se ligarem com os grupos apolares. Segundo o mesmo autor, complexos lipoproteínas são formados quando as globulinas da soja são desnaturadas,

Capítulo III

acarretando em maiores regiões hidrofóbicas, corroborando com o estado da fração proteica do okara empregado nesse estudo. Estes resultados também podem ser decorrentes da provável exposição de grupos apolares devido as lavagens alcoólicas às quais as OPs foram submetidas. Ademais, os OHCs encontrados são inferiores aos reportados na literatura (1,97 a 14,08 g óleo/ g OP). Contudo, são superiores aos descritos para okara (0,20 a 3,3 g óleo/ g okara) (PRIVATTI; RODRIGUES, 2021).

Tabela III.5. Propriedades funcionais das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.

Estágios	Tratamentos	HM	OHC	FAI (%)	FSI (%)			
		g água/g OP	g óleo/g OP		10 minutos	30 minutos	45 minutos	60 minutos
1	OP30-IP+AW3	0,0591 ± 0,0005 ^c	1,58 ± 0,07 ^a	11 ± 2 ^b	64 ± 13 ^{bcA}	47 ± 6 ^{aB}	29 ± 8 ^{aC}	29 ± 8 ^{aC}
2	OP30+OP30-IP+AW3	0,09 ± 0,01 ^a	1,09 ± 0,01 ^{bc}	20 ± 2 ^a	87 ± 12 ^{abA}	40 ± 1 ^{aB}	30 ± 14 ^{aB}	0
	OP30+OP30-S-IP+AW3	0,069 ± 0,002 ^{bc}	1,3 ± 0,2 ^b	4,3 ± 0,1 ^c	100 ± 1 ^a	0	0	0

Resultados expressos como média ± desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

Tabela III.6. Propriedades emulsificantes das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.

Estágios	Tratamentos	Emulsão		Diâmetro médio das gotículas	
		EAI (m^2/g)	ESI (% em 10 minutos)	T0 (μm)	T10 (μm)
1	OP30-IP+AW3	62 ± 1^a	83 ± 5^{ab}	$1,24 \pm 0,07^{aA}$	$1,30 \pm 0,02^{aA}$
	OP30-S-IP+AW3	60 ± 3^a	84 ± 3^{ab}	$0,80 \pm 0,03^{bB}$	$1,22 \pm 0,06^{aA}$
2	OP30+OP30-IP+AW3	45 ± 3^b	$91,4 \pm 0,5^a$	$1,31 \pm 0,04^{aA}$	$1,34 \pm 0,01^{aA}$
	OP30+OP30-S-IP+AW3	58 ± 3^a	78 ± 3^b	$1,26 \pm 0,02^{aA}$	$1,0 \pm 0,4^{aA}$

Resultados expressos como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

III.3.2.4.2. Índices de capacidade de formação (FAI) e estabilidade (FSI) de espuma

O efeito do número de estágios, único ou dois em correntes cruzadas, nas propriedades espumantes das OPs é apresentado na Tabela III.5. Os valores de FAIs das proteínas medidos neste estudo foram significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). A extração com 2 estágios em correntes cruzadas empregando água+solução de NaOH 2 N em ambos os estágios (OP30+OP30-IP+AW3) exibiu o maior FAI, indicando possivelmente que essa configuração proporcionou a melhor capacidade em formar bolhas. Tal fato pode ser associado ao maior teor de grupos polares, provavelmente presentes nestas OPs, os quais promoveram a maior adsorção das proteínas na interface ar-água. Esta observação é corroborada pelo maior valor de HM relacionado a este tratamento (Tabela III.5). Além das interações hidrofílicas e hidrofóbicas, fatores como a solubilidade e a flexibilidade molecular das proteínas também influenciam nas propriedades espumantes (DEAK; JOHNSON, 2007; ZAYAS, 1997). Os FAIs encontrados são similares aos reportados por Tao et al. (2019) e estão em concordância com a faixa relatada na literatura (PRIVATTI; RODRIGUES, 2021).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os FSI entre os tratamentos empregando água+solução de NaOH 2 N como solvente. Entretanto, a extração em estágio único (OP30-IP+AW3) demonstrou estabilidade por pelo menos 60 minutos, enquanto na extração em 2 estágios por correntes cruzadas (OP30+OP30-IP+AW3), após 45 minutos, a espuma foi perdida. Esta observação sugere que a maior hidrofobicidade atribuída a configuração por estágio único contribui para a estabilidade do filme de proteínas na interface ar/líquido. A maior hidrofobicidade relacionada a este tratamento é corroborada pelo maior valor de OHC.

A solução salina de $MgCl_2$ utilizada como solvente no segundo estágio da extração em correntes cruzadas (OP30+OP30-S-IP+AW3) promoveu diminuição do valor de FAI. Em adição, foi observada estabilidade apenas em 10 minutos, indicando que o sal perturbou o sistema, não propiciando a interação das proteínas com o ar.

III.3.2.4.3. Propriedades emulsificantes

As propriedades tensoativas e as características hidrofílicas e hidrofóbicas das proteínas são os regentes das propriedades emulsificantes atribuídas a estas. EAI expressa a capacidade da proteína em envolver os lipídios e estabilizar estes no meio, enquanto ESI indica o potencial de permanência das gotículas em emulsão, antes da coalescência e/ou floculação (PEARCE; KINSELLA, 1978; ZAYAS, 1997).

Capítulo III

Os resultados encontrados para os EAIs (Tabela III.6) estão em consonância com o comportamento exibido pelas OPs, em relação ao HM e OHC. EAI foi inferior ($p \leq 0,05$) na extração com 2 estágios em correntes cruzadas empregando somente água+solução de NaOH 2 N como solvente (OP30+OP30-IP+AW3) frente aos demais tratamentos, os quais não apresentaram diferenças significativas. Tal fato pode ser atribuído a um provável maior número de grupos polares em OP30+OP30-IP+AW3, como previamente sugerido. Os valores de EAIs determinados são similares ao reportado por Fierens, Brijs e Delcour (2016), contudo são superiores aos reportados por Chan e Ma (1999a, 1999b), Ma et al. (1996) e Vishwanathan et al. (2011). Chan e Ma (1999a, 1999b) dobraram os valores de EAI de OPs empregando pós-tratamentos ácidos e enzimáticos, respectivamente. Tais autores relacionaram esses ganhos ao aumento da superfície hidrofóbica provocado pelos pós-tratamentos. Esta observação está de acordo com os altos valores de EAI apresentados pelas OPs com menores valores de HM e maiores valores de OHC (OP30-IP+AW3 e OP30+OP30-S-IP+AW3), os quais infere-se que contenham grande superfície hidrofóbica.

De modo geral, as OPs apresentaram alta estabilidade (Tabela III.6) após 10 minutos de formação em relação a emulsão inicial, o que é de grande valia para a adição em alimentos. Inversamente ao EAI, a extração em 2 estágios em correntes cruzadas utilizando como solvente apenas água+solução de NaOH 2 N (OP30+OP30-IP+AW3) apresentou o maior ESI, indicando que as prováveis mudanças conformacionais, as quais possivelmente acarretaram maior presença de grupos polares adicionais, propiciaram ganhos na interface proteína-lipídio-água. Ademais, verificou-se que a solução salina prejudicou essa interface visto que ESI desse tratamento (OP30+OP30-S-IP+AW3) foi significativamente inferior ($p \leq 0,05$) ao tratamento na mesma configuração, sem a adição do sal. Esta observação pode ser provavelmente decorrente da competição do sal pelos grupos polares provenientes de mais uma etapa de extração. Estabilidade em torno de 35 % foi observada por Fierens, Brijs e Delcour (2016), após 30 minutos de formação em relação a emulsão inicial.

Os diâmetros médios de gotículas de lipídios das emulsões foram mensurados imediatamente após a formação e transcorridos 10 minutos desta (Tabela III.6). As extrações realizadas com água+solução de NaOH 2 N, em um ou dois estágios (OP30-IP+AW3 e OP30+OP30-IP+AW3) ou combinando os solventes (OP30+OP30-S-IP+AW3), apresentaram mesmo comportamento, não sendo verificadas alterações significativas ($p > 0,05$). Em contrapartida, gotículas de óleo com diâmetros significativamente menores ($p < 0,05$), nos primeiros instantes da formação da emulsão foram observadas em OP30-S-IP+AW3, com consequente elevação significativa ($p < 0,05$) após 10 minutos desta, indicando que o sal

Capítulo III

(MgCl₂) conturbou a consolidação das gotículas de óleo na emulsão. Contudo, os resultados estão em concordância com Tao et al. (2019), os quais reportaram diâmetros médios de emulsões variando de 0,1 a 3,3 µm.

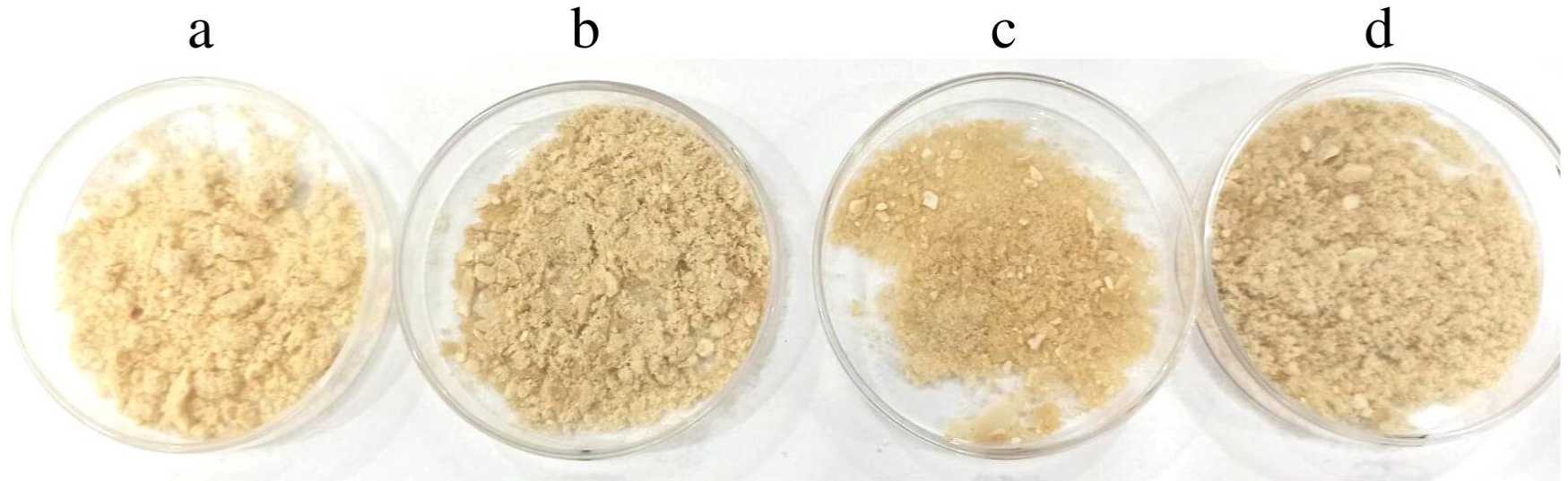
III.3.2.5. Cor

A aceitabilidade dos alimentos é altamente atrelada a cor apresentada por estes, entretanto, estudos que abordem a avaliação colorimétrica em OPs são incipientes. Os parâmetros de cor das OPs em função do número de estágios, único ou 2 em correntes cruzadas, estão apresentados na Tabela III.7, enquanto a Figura III.7 traz as imagens dessas OPs. Os resultados estão apresentados em termos de luminosidade (L*), coordenada vermelho/verde (a*), coordenada amarelo/azul (b*) e ângulo Hue (°h). O material de partida (WO) foi submetido ao mesmo processo de liofilização aplicado para a obtenção das OPs e também caracterizado em termos de cor, de forma a possibilitar o cálculo da mudança total de cor (ΔE) (Tabela III.7).

Todas as OPs avaliadas apresentaram alterações estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na cor (ΔE) frente ao okara liofilizado, principalmente quando foi empregada a extração em 2 estágios em correntes cruzadas, podendo-se inferir que o tempo de extração impacta nos parâmetros de cor. A extração em 2 estágios em correntes cruzadas empregando água+solução de NaOH 2 N como solvente exerceu a maior influência ($p \leq 0,05$) nos parâmetros, com redução de 7 % na luminosidade (L*) e ganhos nas coordenadas vermelho/verde (a*) e amarelo/azul (b*) em torno de 64 % e 13 %, respectivamente. O ângulo Hue (h°) comprovou tal ganho em tons avermelhados, uma vez que 0° indica tons vermelho-roxo e 90° representa tons amarelos (MCGUIRE, 1992), sugerindo com isso possíveis reações de escurecimento entre os componentes das OPs ao longo do processo. A solução salina de MgCl₂ propiciou a obtenção de uma OP em tom amarelo próximo ao material de partida, indicando que o sal exerceu um efeito protetor contra as reações de escurecimento, corroborando com Li et al. (2012).

Figura III.7. Imagens das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.

(a) Okara liofilizado; (b) OP30-IP+AW3; (c) OP30+OP30-IP+AW3 e (d) OP30+OP30-S-IP+AW3.



Fonte: Própria autoria.

Tabela III.7. Análise colorimétrica das OPs em função do solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.

Estágios	Tratamentos	Parâmetros				
		L*	a*	b*	ΔE	h°
1	Okara liofilizado	77,01 ± 0,02 ^a	2,42 ± 0,01 ^d	22,67 ± 0,01 ^c	---	83,91 ± 0,02 ^a
	OP30-IP+AW3	76,66 ± 0,01 ^b	2,91 ± 0,01 ^c	20,94 ± 0,01 ^d	1,82 ± 0,01 ^c	82,11 ± 0,02 ^c
2	OP30+OP30-IP+AW3	71,57 ± 0,01 ^d	3,96 ± 0,01 ^a	25,62 ± 0,1 ^a	6,37 ± 0,03 ^a	81,22 ± 0,01 ^d
	OP30+OP30-S-IP+AW3	73,79 ± 0,01 ^c	2,94 ± 0,01 ^b	23,94 ± 0,1 ^b	3,50 ± 0,02 ^c	83,01 ± 0,02 ^b

L* = luminosidade; a* = coordenada vermelho/verde; b* = coordenada amarelo/azul; ΔE = mudança de cor total (ΔE) (Equação III. 5); h° = ângulo Hue (Equação III. 6);

Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

III.3.3. WHC e OHC dos ORs

A Tabela III.8 reporta os valores de WHCs e OHCs dos sólidos residuais provenientes das etapas de extração de proteínas e IFs a partir de WO, sendo os ORs obtidos segundo esquematizado na Figura B4 (Apêndice B). Os resultados são apresentados em função do tempo de processo, solvente e número de estágios, único ou 2 estágios em correntes cruzadas.

Tabela III.8. WHC e OHC dos ORs em função do tempo de processo, solvente e do número de estágios, um ou dois em configuração de correntes cruzadas.

Estágios	Tratamentos	WHC	OHC
		g água/g OR	g óleo/g OR
1	OR30	3,7 ± 0,2 ^a	0,78 ± 0,02 ^b
	OR30-S	3,79 ± 0,01 ^a	1,1 ± 0,1 ^{ab}
	OR60	2,485 ± 0,008 ^b	0,856 ± 0,006 ^b
2	OR30+OR30	3,60 ± 0,02 ^a	1,01 ± 0,04 ^{ab}
	OR30+OR30-S	3,73 ± 0,02 ^a	1,2 ± 0,2 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão de 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

O valor de WHC diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) com o aumento do tempo de extração, de de 30 para 60 minutos em 1 estágio. As extrações por 30 minutos, em estágio único ou configurada em 2 estágios em correntes cruzadas, independente do solvente utilizado não influenciaram significativamente ($p > 0,05$) a absorção de água. Em relação aos OHCs, ambas as configurações por estágios, único ou 2 em correntes cruzadas, bem como o emprego da solução salina de $MgCl_2$ 0,05 M como solvente, impactaram positivamente nessa propriedade, frente a configuração em estágio único utilizando apenas água+solução de NaOH 2 N.

Tais resultados podem ser atribuídos a composição desses sólidos, os quais possivelmente devem ser majoritariamente constituídos por compostos hidrofílicos, como fibras, uma vez que WHC foram superiores aos OHCs, corroborando os dados encontrados na literatura para okara seco (ESPINOSA-MARTOS; RUPÉREZ, 2009; GUIMARÃES et al., 2020; LI et al., 2012; OSTERMANN-PORCEL et al., 2017). Comparando os valores de WHC e OHC obtidos para os ORs com os reportados para farinha de trigo por Soares et al. (2023), de 0,86 g água e 0,954 g de óleo/ g de farinha de trigo, pode-se sugerir a incorporação dos ORs em produtos de panificação, salsichas e carnes. Essa incorporação, além de propiciar a

Capítulo III

longevidade das características sensoriais dos produtos (ZAYAS, 1997), pode reforçar as estratégias de reaproveitamento e valorização do okara.

III.4. Conclusões

Este estudo investigou a recuperação de proteínas e isoflavonas a partir de okara úmido por meio de extração convencional, abordando diversas configurações experimentais, como o uso de solução etanólica 60 % (60:40, etanol:água ou extrato, em massa), em diferentes etapas (precipitação e lavagem) visando a remoção de componentes não-proteicos das OPs, notadamente lipídios. Também foram avaliadas a influência do número de estágios, único ou 2 em correntes cruzadas e do emprego de solução salina de $MgCl_2$ como solvente na composição, propriedades funcionais, parâmetros de cor e perfil molecular.

Três lavagens etanólicas (etanol:água, 60:40 em massa) garantiram as melhores condições de purificação das OPs, visto que reduziram o teor de lipídios em 60 %, promovendo, conseqüentemente, a elevação no teor de proteínas. A extração em 2 estágios em correntes cruzadas empregando a solução salina de $MgCl_2$ 0,05 M propiciou 3 % de aumento em termos de proteínas, visto que o perfil molecular dessas OPs indicou maior extração das frações das globulinas 7S, como também gerou um efeito protetor na coloração das OPs. Por outro lado, as propriedades espumantes e a estabilidade da emulsão foram prejudicadas pela adição da força iônica ao meio. Esse tratamento propiciou a obtenção de OPs contendo 248 μg de daidzeína e 236 μg de genisteína por g de OP.

De modo geral, as OPs foram compostas majoritariamente por globulinas 11S. O emprego de água+solução de NaOH 2 N em estágio único propiciou propriedades funcionais mais estáveis (FSI e ESI), bem como foram observados os mais altos valores de EAI e OHC. Tais achados foram atribuídos às possíveis características hidrofóbicas destes materiais. A adição de um novo estágio em correntes cruzadas empregando novamente água+solução de NaOH 2 N como solvente possibilitou a obtenção de OP com alta capacidade espumante (FAI), porém com coloração escurecida frente ao okara liofilizado e as demais OPs obtidas dos outros tratamentos.

Também se ressalta que os sólidos remanescentes das extrações possuem características tecnológicas atrativas, em termos de capacidades de absorção de água e óleo, podendo-se sugerir aplicação em produtos de panificação e/ou cárneos, por exemplo.

Portanto, os resultados deste estudo fornecem uma gama de informações sobre a composição e as propriedades das proteínas extraídas de okara, em diferentes condições de processo, viabilizando seu emprego em produtos alimentícios, de acordo com as necessidades

Capítulo III

destes e particularidades das OPs. Estudos adicionais devem ser conduzidos avaliando diferentes concentrações salinas, bem como devem ser investigadas técnicas para liberar proteínas e IFs dos aglomerados presentes no okara.

III.5. Referências bibliográficas

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC**. 18th. ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 2007.

AOAC. Official method 991.43. Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. **Cereal Foods**, cap. 32, p. 7-9, 1995.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 5th. ed. Champaign: American Oil Chemists Society, 1998.

ALAVI, T.; PAZUKI, G.; RAISI, A. Solubility of fructose in water-ethanol and water-methanol mixtures by using h-bonding models. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, 2014.

ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J.; GLOVER, D. Extraction of soybean meal proteins with salt solutions at pH 4,5. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, n. 2, 251-254, 1973.

BANDYOPADHYAY, K.; MISRA, G.; GHOSH, S. Preparation and characterisation of protein hydrolysates from indian defatted rice bran meal. **Journal of Oleo Science**, v. 57, n. 1, p. 47–52, 2008.

BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 757–766, jan. 2006.

BERK, Z. **Technology of production of edible flours and protein products from soybeans**, Ilustrada, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 1992.

BUENO-BORGES, L. B. et al. A highly stable soybean oil-rich miscella obtained by ethanolic extraction as a promising biodiesel feedstock. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 94, n. 8, p. 1101–1109, 1 ago. 2017.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, 2000.

CHAN, W.-M.; MA, C.-Y. Modification of proteins from soymilk residue (okara) by trypsin. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 5, p. 781–786, 1999a.

CHAN, W. -M.; MA, C. -Y. Acid modification of proteins from soymilk residue (okara). **Food Research International**, v. 32, n. 2, p. 119–127, mar. 1999b.

DEAK, N. A.; JOHNSON, L. A. Effects of extraction temperature and preservation method on functionality of soy protein. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 3, p. 259–268, mar. 2007.

DECAPRIO, A. P.; OLAJOS, E. J.; WEBER, P. Covalent binding of a neurotoxic n-hexane metabolite: Conversion of primary amines to substituted pyrrole adducts by 2,5-hexanedione. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 440–450, 1982.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DUNCAN, D. Multiple range and multiple F tests. **Biometrics**, v. 11, p. 1-42, 1955.

ELFALLEH, W. et al. Changes in enzymatic activities during “koji” incubation and natural fermentation of soybean paste. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 6, e13302, 2017.

ESPINOSA-MARTOS, I.; RUPÉREZ, P. Indigestible fraction of okara from soybean: Composition, physicochemical properties and *in vitro* fermentability by pure cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 685–693, 2009.

EZE, O. F.; CHATZIFRAGKOU, A.; CHARALAMPOPOULOS, D. Properties of protein isolates extracted by ultrasonication from soybean residue (okara). **Food Chemistry**, v. 368, p. 130837, 30 jan. 2022.

FDA. Q3C- Tables and List Guidance for Industry. Microsoft Word, v. 9765, n. February, p. 1–8, 2017.

FERREIRA, M. C. et al. Soybean oil extraction with ethanol from multiple-batch assays to reproduce a continuous, countercurrent, and multistage equipment. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 170, 1 jan. 2022.

FIERENS, E.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. Emulsifying and foaming properties of okara protein hydrolysates. **Cereal Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 71–76, 1 jan. 2016.

FIGUEIREDO, V. R. G. de et al. Action of multi-enzyme complex on protein extraction to obtain a protein concentrate from okara. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 4, p. 1508–1517, 5 abr. 2018.

FIGUEIREDO, V. R. G. de et al. Production of hydrolysate of okara protein concentrate with high antioxidant capacity and aglycone isoflavone content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

GIANNOCCARO, E.; WANG, Y. -J.; CHEN, P. Effects of solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size, and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. C59–C64, 31 maio 2006.

GORISSEN, S. H. M. et al. Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. **Amino Acids**, v. 50, n. 12, p. 1685–1695, 1 dez. 2018.

Capítulo III

GRIZOTTO, R. K.; AGUIRRE, J. M. de. Study of the flash drying of the residue from soymilk processing - "okara". **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 3, p. 645–653, 2011.

GRÜN, I. U. et al. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu†. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2839–2843, 2007.

GUIMARÃES, R. M. et al. Evaluating technological quality of okara flours obtained by different drying processes. **LWT- Food Science and Technology**, v. 123, n. October 2019, p. 109062, abr. 2020.

HAMMOND, E. G. et al. Soybean Oil. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. Sixth Edit ed. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2005.

HUA, Y.; HUANG, Y.; QIU, A.; LIU, X. Properties of soy protein isolate prepared from aqueous alcohol washed soy flakes. **Food Research International**, v. 38, n. 3, p. 273-273, abril 2005.

HUANG, R. Y.; CHOU, C. C. Heating affects the content and distribution profile of isoflavones in steamed black soybeans and black soybean koji. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8484–8489, 24 set. 2008.

HU, C. et al. Biochemistry and use of soybean isoflavones in functional food development. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** Bellwether Publishing, 3 jul. 2020.

ISLAM, N. et al. Enhanced separation and analysis of low abundant soy proteins by dual washing extraction process. **Analytical Biochemistry**, v. 610, 1 dez. 2020.

JACKSON, C. J. C. et al. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1117–1123, 2002.

JANKOWIAK, L. et al. Isoflavone extraction from okara using water as extractant. **Food Chemistry**, v. 160, p. 371–378, 2014a.

JANKOWIAK, L. et al. The potential of crude okara for isoflavone production. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 166–172, 2014b.

JIANG, J. et al. Structure-modifying alkaline and acidic pH-shifting processes promote film formation of soy proteins. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1944-1950, 15 jun. 2012.

JIANG, J.; XIONG, Y. L.; CHEN, J. pH-shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8035–8042, 14 jul. 2010.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A. et al. Health-promoting activities of ultra-filtered okara protein hydrolysates released by *in vitro* gastrointestinal digestion: Identification of active peptide

Capítulo III

from soybean lipoxygenase. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 4, p. 655–663, 2010.

JUSTUS, A. et al. Combined uses of an endo- and exopeptidase in okara improve the hydrolysates via formation of aglycone isoflavones and antioxidant capacity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 115, p. 108467, 2019.

KAMBLE, D. B.; RANI, S. Bioactive components, *in vitro* digestibility, microstructure and application of soybean residue (okara): a review. **Legume Science**, v. 2, n. 1, p. 2–10, 2020.

KANEKO, T.; ISHII, K. Separation of peanut protein by precipitation with acetone and ethanol and characterization of the protein isolates. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 27, n. 4, p. 199–204, 1980.

KONG, F.; CHANG, S. K. C. Changes in protein characteristics during soybean storage under adverse conditions as related to tofu making. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 2, p. 387–393, 16 jan. 2013.

L'HOCINE, L.; BOYE, J. I.; ARCAND, Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. C137–C145, 30 jun. 2006.

LI, H. et al. A novel *in-situ* enhanced blasting extrusion technique - Extrudate analysis and optimization of processing conditions with okara. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 80–88, 2012.

LIU, J. et al. Amino acid availability of a dairy and vegetable protein blend compared to single casein, whey, soy, and pea proteins: A double-blind, cross-over trial. **Nutrients**, v. 11, n. 11, 1 nov. 2019.

MA, C. -Y. et al. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). **Food Research International**, v. 29, n. 8, p. 799-805, dez. 1996.

MALAYPALLY, S. P.; ISMAIL, B. Effect of protein content and denaturation on the extractability and stability of isoflavones in different soy systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 8958–8965, 25 ago. 2010.

MATHIAS, K. et al. Heat and pH effects on the conjugated forms of genistin and daidzin isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7495–7502, 1 out. 2006.

MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1254–1255, dez. 1992.

MONTAÑÉS, F. et al. Modeling solubilities of sugars in alcohols based on original experimental data. **AIChE Journal**, v. 53, n. 9, p. 2411–2418, set. 2007.

MORR, C. V. et al. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.

Capítulo III

MUJOO, R.; TRINH, D. T.; NG, P. K. W. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. **Food Chemistry**, v. 82, n. 2, p. 265–273, 2003.

MULITERNO, M. M. et al. Conversion/degradation of isoflavones and color alterations during the drying of okara. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 512–519, 2017.

OSTERMANN-PORCEL, M. V. et al. Quality assessment of dried okara as a source of production of gluten-free flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 9, p. 2934–2941, 2017.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978.

PENG, Y. et al. Characteristics of soy protein prepared using an aqueous ethanol washing process. **Foods**, v. 10, n. 9, 1 set. 2021.

PEREIRA, D. G. et al. Enzymatic hydrolysis of okara protein concentrate by mixture of endo and exopeptidase. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 10, 1 out. 2019.

PERUSSELLO, C. A.; DO AMARANTE, Á. C. C.; MARIANI, V. C. Convective drying kinetics and darkening of okara. **Drying Technology**, v. 27, n. 10, p. 1132–1141, out. 2009.

POJIĆ, M.; MIŠAN, A.; TIWARI, B. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. **Trends in Food Science and Technology**, v. 75, n. October 2017, p. 93–104, 2018.

POTRICH, E. et al. Replacing hexane by ethanol for soybean oil extraction: Modeling, simulation, and techno-economic-environmental analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, 20 jan. 2020.

PREECE, K. E. et al. Confocal imaging to reveal the microstructure of soybean processing materials. **Journal of Food Engineering**, v. 147, p. 8–13, 2015.

PREECE, K. E. et al. Intensified soy protein extraction by ultrasound. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 113, p. 94–101, 2017.

PREECE, K. E.; HOOSHYAR, N.; ZUIDAM, N. J. Whole soybean protein extraction processes: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 43, n. March, p. 163–172, 2017.

PRIVATTI, R. T. et al. Profile and content of isoflavones on flaked and extruded soybeans and okara submitted to different drying methods. **Food Chemistry**, v. 380, 30 jun. 2022.

PRIVATTI, R. T.; RODRIGUES, C. E. C. An overview of the composition, applications, and recovery techniques of the components of okara aimed at the biovalorization of this soybean processing residue. **Food Reviews International**, 2021.

Capítulo III

PUPPO, M. C.; AÑÓN, M. C. Structural properties of heat-induced soy protein gels as affected by ionic strength and pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3583–3589, 1 set. 1998.

QIN, P.; WANG, T.; LUO, Y. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, 1 mar. 2022.

RAHMAN, M. M. et al. A review of okara (soybean curd residue) utilization as animal feed: Nutritive value and animal performance aspects. **Animal Science Journal**, v. 92, n. 1, 21 jan. 2021.

ROSENTHAL, A.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K. Simultaneous aqueous extraction of oil and protein from soybean: Mechanisms for process design. **Food and Bioproducts Processing**, v. 76, n. 4, p. 224–230, 1998.

SAWADA, M. M. et al. Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and protein solubility of defatted meal. **Food Research International**, v. 62, p. 662–670, 2014.

SBROGGIO, M. F. et al. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 375–381, 2016.

SESSA, D. J.; NELSEN, T. C.; SNYDER, J. M. Effect of salts on soy storage proteins defatted with supercritical CO₂ and alcohols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 8, p. 911–916, 1998.

SHEN, J. L. Solubility profile, intrinsic viscosity, and optical rotation studies of acid precipitated soy protein and of commercial soy isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 784–788, 1 jul. 1976.

SINGH, A. et al. Structural and functional analysis of various globulin proteins from soy seed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1491–1502, 2015.

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. Peptization of soybean proteins extraction of nitrogenous constituents from oil-bases with and without added salts. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 30, n.12, p. 1414-1418, 1938.

SOARES, I. D. et al. Production of cookies enriched with bioactive compounds through the partial replacement of wheat flour by cocoa bean shells. **Foods**, v. 12, n. 436, 2023.

SOYSTATS. International World Soybean Production. Disponível em: <<http://soystats.com/international-world-soybean-production>>. Acesso em: 15 set. 2022.

SPERONI AGUIRRE, F. J.; MILESI, V.; AÑÓN, M. C. Effect of extraction and precipitation conditions during soybean protein isolate production on the genistein series content. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 3, p. 305–314, 8 mar. 2007.

Capítulo III

SPERONI, F.; MILESI, V.; AÑÓN, M. C. Interactions between isoflavones and soybean proteins: Applications in soybean-protein-isolate production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1265–1270, out. 2010.

STANOJEVIC, S. P. et al. Composition of proteins in okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9221–9228, 2012.

TAO, X. et al. Effects of pretreatments on the structure and functional properties of okara protein. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 394–402, 2019.

TARUNA, I.; JINDAL, V. K. Drying of soy pulp (okara) in a bed of inert particles. **Drying Technology**, v. 20, n. 4–5, p. 1035–1051, 27 jun. 2002.

TODA, T. A.; SAWADA, M. M.; RODRIGUES, C. E. C. Kinetics of soybean oil extraction using ethanol as solvent: Experimental data and modeling. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 1–10, 2016.

TUNTIWIWATTANAPUN, N.; TONGCUMPOU, C.; WIESENBORN, D. Optimization of alcoholic soybean oil extraction as a step towards developing *in-situ* transesterification for fatty acid isopropyl esters. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 189–196, dez. 2016.

UNGAR, Y.; OSUNDAHUNSI, O. F.; SHIMONI, E. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4394–4399, 16 jul. 2003.

U.S. EPA. United States Environmental protection agency. **Hexane hazard summary environmental protection agency**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/hexane.pdf>>.

VISHWANATHAN, K. H. et al. Production of okara and soy protein concentrates using membrane technology. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 158–164, 2011.

VISHWANATHAN, K. H.; SINGH, V.; SUBRAMANIAN, R. Influence of particle size on protein extractability from soybean and okara. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 240–246, 2011.

VONG, W. C.; LIU, S. Q. Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 139–147, 2016.

VOSS, G. B. et al. Impact of different thermal treatments and storage conditions on the stability of soybean byproduct (okara). **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 3, p. 1981–1996, 2018.

WACHIRAPHANSAKUL, S.; DEVAHASTIN, S. Drying kinetics and quality of soy residue (Okara) dried in a jet spouted-bed dryer. **Drying Technology**, v. 23, n. 6, p. 1229–1242, 2005.

Capítulo III

WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 3, p. 765–770, maio 1990.

WALLY-VALLIM, A. P. et al. Isoflavone aglycone content and the thermal, functional, and structural properties of soy protein isolates prepared from hydrothermally treated soybeans. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, 2014.

WANG, C. et al. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 3, p. 337–341, mar. 1998.

WANG, H.; JOHNSON, L. A.; WANG, T. Preparation of soy protein concentrate and isolate from extruded-expelled soybean meals. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 7, p. 713–717, jul. 2004.

WIBOONSIRIKUL, J. et al. Properties of extract from okara by its subcritical water treatment. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 5, p. 974–982, 4 jul. 2013.

WOLF, W. J. Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 969-976, 1970.

WOLF, W. J.; BRIGGS, D. R. Ultracentrifugal investigation of the effect of neutral salts on the extraction of soybean proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 63, n. 1, p. 40–49, jul. 1956.

WU, H. et al. Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. **Food Research International**, v. 42, n. 3, p. 343–348, abr. 2009.

YADAV, R. B.; YADAV, B. S.; CHAUDHARY, D. Extraction, characterization and utilization of rice bran protein concentrate for biscuit making. **British Food Journal**, v. 113, n. 9, p. 1173–1182, 6 set. 2011.

ZAYAS, J. F. **Functionality of proteins in food**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997.

ZHANG, H. J. et al. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 359–363, jul. 2012.

ZHAO, X. et al. Effects of surfactant and salt species in reverse micellar forward extraction efficiency of isoflavones with enriched protein from soy flour. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 2087–2097, nov. 2010.

ZHOU, M. et al. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of soybean glycinin at different ionic strengths. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 205–213, 1 abr. 2016.

Capítulo IV

Extração simultânea de proteínas e isoflavonas de okara empregando ultrassom

Rafaela Torrezan Privatti, Maria Carolina Capellini, Keila Kazue Aracava, Marcelo Thomazini, Carmen Sílvia Fávaro-Trindade, Samantha Cristina de Pinho, Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

Trabalho a ser submetido na revista *Food Chemistry*

IV. Resumo

Neste estudo a extração assistida por ultrassom (UAE) foi avaliada para a extração simultânea de proteínas e isoflavonas (IFs) do okara, coproduto da agroindústria de soja. Intensidade de potência do ultrassom (165, 240 e 400 W), tempo de tratamento ultrassônico (15, 30 e 60 minutos) e número de estágios em correntes cruzadas (1 ou 2) foram as variáveis investigadas. Os maiores teores de proteínas de okara (OP) (52 %) e IFs (4208 µg daidzeína e 3156 µg genisteína por g de OP) foram obtidos com 15 minutos de UAE, a 240 W, em estágio único. Após a digestão *in vitro*, cerca de 93 % e 23 % dessas proteínas e IFs, respectivamente, estavam bioacessíveis para serem absorvidas na mucosa intestinal. Tanto a UAE como o número de estágios em correntes cruzadas influenciaram as propriedades funcionais e coloração dos produtos obtidos. Os resultados sugerem que a UAE é uma ferramenta de intensificação eficiente para a valorização do okara, uma vez que proporciona o enriquecimento das proteínas desse coproduto em IFs agliconas.

Palavras-chave: coproduto; sonicação; agliconas; bioacessibilidade; digestibilidade *in vitro*; funcionalidades proteicas.

IV. Abreviaturas e Siglas

EAI = índice de atividade da emulsão; ESI = índice de estabilidade da emulsão; IFs = isoflavonas; FAI = índice de atividade da espuma; FSI = índice de estabilidade da espuma; HM = higroscopicidade; OHC = capacidade de absorção de óleo; OP = proteínas de okara; OP30-0 = extração convencional (0 W) por 30 minutos; OP60-0 = extração convencional (0 W) por 60 minutos; OP60-165 = UAE (165 W) por 60 minutos; OP15-240 = UAE (240 W) por 15 minutos; OP30-240 = UAE (240 W) por 30 minutos; OP60-240 = UAE (240 W) por 60 minutos; OP60-400 = UAE (400 W) por 60 minutos; OP15-240+OP15-240 = UAE (240 W) em 2 estágios, 15 minutos cada; OP15-240+OP30-0 = 1º estágio UAE (240 W) por 15 minutos e 2º estágio extração convencional (0 W) por 30 minutos; SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio; T0 = diâmetro médio das gotículas de óleo na emulsão, imediatamente após a formação destas; T10 = diâmetro médio das gotículas de óleo na emulsão, após 10 minutos da formação destas; UAE = extração assistida por ultrassom; WO = okara úmido; WSSE = extrato hidrossolúvel soja.

IV.1. Introdução

O isolamento de metabólitos primários e/ou secundários de matérias-primas vegetais de interesse para a agroindústria de alimentos pode ser realizado por meio de processos de extração. Tais metabólitos constituem a estrutura celular vegetal e, assim, técnicas eficientes e viáveis para liberação extracelular desses compostos são necessárias. Técnicas de intensificação da extração sólido-líquido vêm ganhando espaço, uma vez que os métodos clássicos, como Soxhlet, maceração, percolação, agitação simples e hidrodestilação, dispõem longos períodos de extração, emprego de solventes em larga escala, implicando assim em alto consumo energético e elevados custos operacionais (AMPOFO; NGADI, 2022; CHEMAT et al., 2017; CHUO et al., 2022). Nesse contexto, a extração assistida por ultrassom (UAE) apresenta-se como uma alternativa potencial para a recuperação de metabólitos de fontes vegetais. O fenômeno de cavitação é o regente do processo de UAE. A implosão de bolhas de cavitação na superfície do sólido provoca múltiplos efeitos como: descamação da superfície, erosão, quebra de partículas e intensificação da turbulência no meio. Esses efeitos potencializam a penetração do solvente na matriz sólida e o contato entre as fases, maximizando a liberação do composto alvo (CHEMAT et al., 2017; WU et al., 2021).

Inúmeros trabalhos na literatura abordam o emprego da UAE visando a extração de metabólitos primários e secundários de fontes vegetais, como compilado nas revisões de Chandrapala et al. (2013), Chemat et al. (2017), Chuo et al. (2022) e Vilkhov et al. (2008). Em particular, o uso da UAE para a recuperação de proteínas vegetais revela-se como uma alternativa promissora, uma vez que as modificações conformacionais nessas matrizes, promovidas pelo tratamento ultrassônico, ocasionam maior liberação das proteínas intracelulares, gerando ganhos na capacidade de recuperação desses compostos (KARKI et al., 2010; O'SULLIVAN et al., 2016; PREECE et al., 2017a). De acordo com Bernardi et al. (2021), os ganhos em termos de rendimento são muito divergentes entre os estudos, variando de 6 a 88 %. Parâmetros operacionais do ultrassom (frequência e potência), variáveis do processo (tipo de solvente, razão sólido:solvente, tempo, pH e temperatura), bem como as particularidades das diferentes fontes proteicas vegetais (tamanho das partículas, ligações intra e inter-moleculares, desnaturação e complexação) compõem a gama de fatores que ocasionam tal divergência (AMPOFO; NGADI, 2022; CHANDRAPALA et al., 2013; KUMAR et al., 2021; RAHMAN; LAMSAL, 2021). Assim, não há um protocolo específico para a UAE de proteínas de matrizes proteicas vegetais. Todavia, estes protocolos devem possibilitar a maximização da extração das proteínas, como também preservar as propriedades funcionais relacionadas a estas.

Capítulo IV

As alterações estruturais promovidas pela UAE podem ser grandes aliadas para a recuperação das proteínas do sólido fibroso remanescente da produção de extrato hidrossolúvel soja (WSSE), popularmente conhecido como okara (PRIVATTI; RODRIGUES, 2021; VAN DER RIET et al., 1989). Neste material, a fração proteica residual (~ 13-44 g/ 100 g okara seco (PRIVATTI; RODRIGUES, 2021)) encontra-se nos cotilédones intactos dos grãos de soja e/ou ligadas com os demais constituintes dos grãos, formando complexos de alta massa molar (MA et al., 1996; PREECE et al., 2015, 2017a; PRIVATTI; RODRIGUES, 2021; TAO et al., 2019; VISHWANATHAN; SINGH; SUBRAMANIAN, 2011). Ademais, ressalta-se que essa fonte proteica é subvalorizada, na medida em que cerca de 95 % do okara produzido mundialmente é descartado (aterros sanitários ou incinerado) e/ou destinado a alimentação animal (RAHMAN et al., 2021).

Resultados positivos sobre a extração da fração proteica do okara aplicando tratamento ultrassônico foram evidenciados por Eze, Chatzifragkou e Charalampopoulos (2022). Estes autores observaram um aumento de 36 % para 80 % na extração desses compostos. De forma similar, Tao et al. (2019) obtiveram concentrados proteicos de okara contendo 77 % de proteínas. Wu et al. (2021), aplicando jatos de cavitação, constataram dissociação dos complexos presentes no okara, com consequente ganhos na solubilidade da fração proteica. Suplementarmente, Aiello et al. (2021) atribuíram os ganhos na recuperação das proteínas do okara a dois fatores: aumento da solubilidade das proteínas e liberação desses compostos contidos nas células, previamente intactas, as quais foram rompidas pelas ondas de ultrassom. Apesar disso, informações sobre os possíveis impactos da UAE nas propriedades funcionais, coloração e digestibilidade *in vitro* das proteínas extraídas de okara são escassas na literatura disponível.

Além do considerável conteúdo em proteínas, o okara desponta como fonte de uma classe de polifenóis, as isoflavonas (IFs). As IFs são metabólitos secundários ligados a inúmeros benefícios a saúde, destacando os relacionados ao sistema reprodutor, como prevenção de cânceres de mama e próstata (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; GUO et al., 2019) e mitigação dos sintomas da menopausa (BRZEZINSKI et al., 1997; TAKU et al., 2012). Tais propriedades são relacionadas às atividades estrogênio/antiestrogênio decorrentes da similaridade entre as estruturas das IFs e do estrogênio 17 β -estradiol dos mamíferos (ANDERSON et al., 1999; BIRT; HENDRICH; WANG, 2001). Além disso, esses biocompostos possuem propriedades protetivas contra oxidação, inflamação e radiação UV, atuam no ciclo celular e no sistema imunológico, bem como estão associados à prevenção de doenças cardiovasculares e osteoporose (ANDERSON et al., 1999; BIRT; HENDRICH;

Capítulo IV

WANG, 2001; BRZEZINSKI et al., 1997; ESSAWY et al., 2019; HUANG et al., 2010). Tal atividade biológica das IFs é atribuída às formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), visto que essa classe possui massas molares adequadas para serem absorvidas no intestino humano. Por outro lado, as formas glicosiladas (β -glicosídeos - daidzina, genistina e glicitina, malonilglicosídeos - malonil-genistina, malonil-daidzina e malonil-glicitina, e acetilglicosídeos - acetil-genistina, acetil-daidzina, e acetil-glicitina) precisam ser biotransformadas para serem absorvidas (ANDERSON et al., 1999; COWARD et al., 1993; GUO et al., 2019; MO et al., 2013; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013; SCHEIBER et al., 2001; SIMMONS et al., 2012; WALSH et al., 2003).

O emprego do tratamento ultrassônico mostrou-se favorável em diversos aspectos em relação as IFs, especialmente em termos de redução de período de extração e alterações no perfil destas. Quanto ao período de extração, Achouri, Boye e Belange (2005) empregando 15 minutos de UAE encontraram teores de IFs semelhantes a 10 horas de extração sob agitação. Similarmente, Rostagno, Palma e Barroso (2003) reportaram que apenas 10 minutos de tratamento ultrassônico foram suficientes para extrair aproximadamente 80 % das IFs presentes em farinha de soja, enquanto Lante et al. (2018) observaram 18 % de aumento na extração desses compostos, aplicando 2 minutos de sonicação. Comparando com amostras não-sonicadas, Pananun et al. (2012) reportaram ganhos de 71-188 % e 82-271 %, nos teores de genisteína recuperada de flocos de soja desengordurados. O tratamento ultrassônico aplicado por esses autores foi conduzido por 3 minutos, com solução etanólica 50 % (50:50 etanol:água, v/v) ou mistura composta por acetronitrila:HCl 0,1 N:água (59:11:30) como solventes, respectivamente. Em okara, Yu e Yang (2019) avaliaram 2 tempos de tratamento ultrassônico e obtiveram elevação no total de IFs extraídas, de 82 % em 10 minutos e 17 % em 30 minutos, frente a extração sob agitação nos mesmos tempos.

No que se refere a alterações no perfil desses biocompostos, o tratamento ultrassônico possibilitou a conversão de IFs glicosiladas em agliconas, ou seja, a forma bioativa destes compostos, como descrito por Falcão et al. (2018, 2019). Os autores observaram aumentos superiores a 90 % e 15 % nos teores de genisteína e daidzeína, respectivamente, com concomitantes reduções não-lineares nos teores de IFs glicosiladas. Os ganhos foram atribuídos à fragmentação do grupo éter das IFs β -glicosídeos, originando assim IFs agliconas, como também a liberação de genisteína ligada aos demais constituintes da soja (FALCÃO et al., 2018). Yang et al. (2015) descreveram aumentos acentuados nos teores de daidzeína (39,13 %) e genisteína (96,91 %), com consequentes decréscimos nos níveis de suas respectivas IFs β -glicosídeos. Comportamento análogo foi reportado por Yu e Yang (2019) para as IFs de okara.

Capítulo IV

Esses autores relataram ganhos nos teores de IFs agliconas, na ordem de 59,1 % para 81,7 % e 78,4 % para 86,7 %, empregando agitação e UAE, em 10 e 30 minutos, respectivamente.

Ademais, a literatura sugere que proteínas e IFs interagem por meio de diferentes tipos de ligações moleculares (MALAYPALLY; ISMAIL, 2010), fazendo com que estes macronutrientes desempenhem uma função protetora sobre os biocompostos (MALAYPALLY; ISMAIL, 2010; MATHIAS et al., 2006; MULITERNO et al., 2017). Em adição, proteínas e IFs apresentam o mesmo perfil de solubilidade em pHs alcalinos e ácidos (BARBOSA; LAJOLO; GENOVESE, 2006; RICKERT et al., 2004; SPERONI AGUIRRE; MILESI; AÑÓN, 2007; SPERONI; MILESI; AÑÓN, 2010).

Com base nas informações citadas, é possível verificar a disponibilidade de estudos que mostram, de forma independente, a aplicabilidade da UAE para recuperação de proteínas ou para obtenção de IFs, além do efeito do ultrassom na conversão de IFs glicosiladas em agliconas. Entretanto, pode-se sugerir que a avaliação da viabilidade da extração simultânea de proteínas e IFs a partir de okara *in natura*/ úmido (WO) utilizando UAE apresenta-se como um desafio. De fato, as possíveis conversões de IFs glicosiladas em agliconas podem vir a enriquecer as proteínas recuperadas, trazendo ganhos para as indústrias farmacêutica e alimentícia. Complementarmente, a avaliação das características dos produtos recuperados via UAE, em termos de composição, funcionalidade, coloração e digestibilidade *in vitro* mostra-se de grande valia para nortear futuras aplicações, visto a escassez de dados na literatura referentes a estas características.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o emprego da UAE na extração simultânea de proteínas e IFs para a valorização do okara, coproduto sólido remanescente da produção de WSSE. Foram investigadas as variáveis de processo intensidade de potência do ultrassom, tempo de tratamento ultrassônico e número de estágios em correntes cruzadas. Ademais, visando avaliar os possíveis impactos da UAE sobre os produtos obtidos, denominados OPs (proteínas de okara), estes foram caracterizados em termos de composição, propriedades funcionais e nutricionais.

IV.2. Materiais e métodos

IV.2.1. Materiais

Okara úmido, coproduto da produção de WSSE, foi gentilmente doado pela Unidade de Desenvolvimento e Produção de Produtos de Soja (Universoja, Araraquara, SP). Este material foi empregado para os estudos de extração de proteínas e IFs via UAE, sendo mantido sob refrigeração (- 20 °C) durante o desenvolvimento da pesquisa.

Padrões analíticos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA) e utilizados para quantificação de carboidratos solúveis (D-(+)-glicose, CAS 50-99-7, pureza \geq 99,5 %) e IFs β -glicosídeos e agliconas (daidzina, CAS 552-66-9, pureza \geq 98,0 %; genistina, CAS 529-59-9, pureza \geq 98,0 %; daidzeína, CAS 486-66-8, pureza \geq 97,0 %; genisteína, CAS 446-72-0, pureza \geq 97,0 %). Padrão de amplo espectro multicolorido (10-260 kDa, Thermo Fisher Scientific, Vihus, Lituânia) foi empregado para a identificação das massas molares da fração proteica recuperada, assim como outros padrões usados para esse fim, todos comprados da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA): acrilamida (CAS 79-06-1, pureza \geq 99 %), bis-acrilamida (CAS 17-1304-02, pureza \geq 99 %), tris-acrilamida (CAS 77-86-1, pureza \geq 99 %), persulfato de amônia (CAS 7727-54-0, pureza \geq 98 %), temed (CAS 110-18-9, pureza \geq 99 %), dodecil- sulfato de sódio (CAS 151-21-3, pureza \geq 98,5 %), azul de bromofenol (CAS 115-39-9, pureza \geq 98,5 %), glicerol (CAS 56-81-5, pureza \geq 99 %), β -mercaptaetanol (CAS 60-24-2, pureza \geq 99 %), glicina (CAS 56-40-6, pureza \geq 99 %), comassie brilliant blue R-250 (CBB R-250, CAS 6104-59-2).

Para extração das proteínas e IFs de WO foram utilizados: hidróxido de sódio (CAS 1310-73-2, pureza \geq 99 %, Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido clorídrico (CAS 7647-01-0, pureza \geq 36,5-38,0 %, Synth, São Paulo, Brasil) e água deionizada (Millipore, Mili-Q, Bedford, MA, EUA).

Demais reagentes empregados: ácido sulfúrico (CAS 7664-93-9, pureza 95-98 %, Synth, São Paulo, Brasil), n-hexano (CAS 110-54-3, pureza \geq 98,5 %, Synth, São Paulo, Brasil), ácido acético glacial (CAS 64-19-7, pureza \geq 99,7 %, Synth, São Paulo, Brasil), fenol (CAS 108-95-2, pureza \geq 99 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), acetonitrila (CAS 75-05-8, pureza \geq 99,9 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), metanol (CAS 67-56-1, pureza \geq 99,9 %, Merck, Darmstadt, Alemanha), solução tampão pH 9,0 (Merck, Darmstadt, Alemanha), EDTA (Leco, Sy. Joseph, MI, EUA) e óleo de soja (Liza®, Rio Verde, GO, Brasil).

IV.2.2. Composição do okara úmido

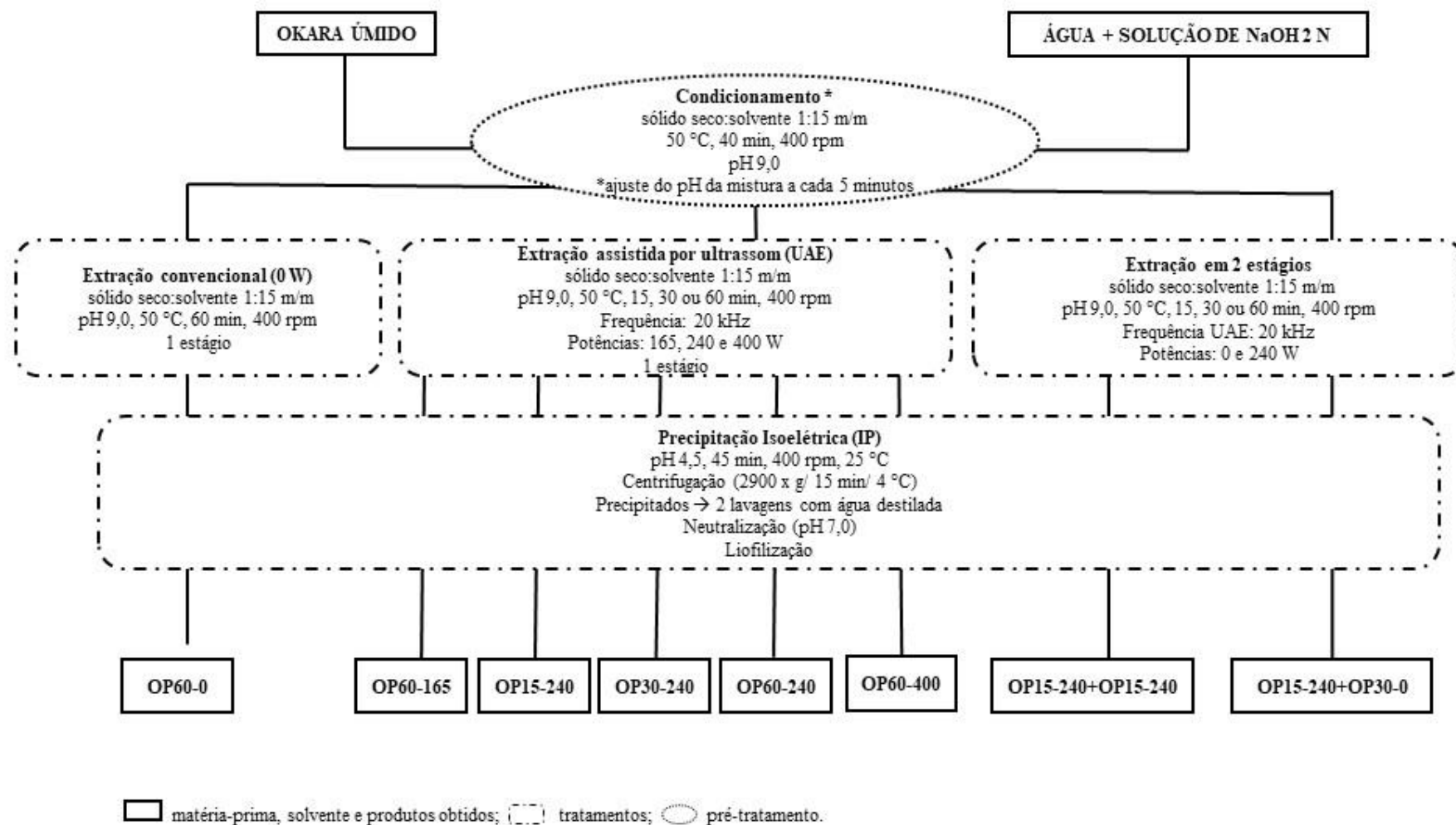
Métodos oficiais AOCS (1998) foram empregados para mensurar, ao menos em duplicata, os teores de umidade (Ac 2-41), lipídios (Am 5-04) e proteínas (Ba 4f-00), utilizando o fator 6,25 para conversão do teor de nitrogênio total em proteínas (AOAC, 2007). Os teores de cinzas e fibras dietéticas solúveis e insolúveis foram determinados segundo os métodos oficiais AOAC (2007) e AOAC 991.43 (1995), respectivamente. Teores de carboidratos solúveis foram determinados, em triplicata, com base nas metodologias propostas por Giannoccaro et al. (2006) e Dubois et al. (1956) para extração e quantificação, respectivamente. Em resumo, 0,3 g de okara previamente seco em estufa de convecção forçada de ar (60 °C/ 24 horas) foram moídos, desengordurados e misturados com 4,6 mL de água destilada. A dispersão foi agitada em agitador de tubos (600 rpm, Heildolph, modelo Multi Reax) por 30 minutos, seguida por 10 minutos de tratamento ultrassônico em banho, centrifugação (4200 x g/ 10 minutos/ 25 °C) e filtração (filtro seringa nylon 45 µm, Allcrom, São Paulo). Esses passos foram repetidos 3 vezes, totalizando 3 estágios sequenciais de extração. O método fenol-sulfúrico foi usado para a quantificação desses compostos, empregando glicose como padrão de calibração em uma faixa de concentração linear de 0 a 10 mg de glicose/g de solução aquosa (Figura B1, Apêndice B).

Também foram mensurados os teores de daidzina, genistina, daidzeína e genisteína presentes no material de partida (WO) empregando a metodologia proposta por Privatti et al. (2022), descrita em detalhes no Capítulo II desta tese. Brevemente, 1 g de okara liofilizado foi contatado com 20 mL de solução metanólica 80 % (metanol: água, 80:20 m/m). A mistura foi submetida a agitação (agitador de tubos, 1200 rpm/ 120 minutos), centrifugação (1600 x g/ 15 minutos/ 25 °C) e filtração (filtro de celulose Whatman, 11 µm, nº 1). O sólido remanescente foi submetido novamente a essas etapas, totalizando 2 estágios de extração. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi empregada para identificação, usando para este fim padrões individuais das IFs supramencionadas (Figura A2, Apêndice A), e quantificação das IFs, com expressão dos teores em µg de IFs/g okara seco. Tais quantificações foram realizadas ao menos em duplicata.

IV.2.3. Recuperação das proteínas e IFs

Os passos conduzidos visando a recuperação de proteínas e IFs a partir de WO foram sumarizados e apresentados na Figura IV.1.

Figura IV.1. Fluxograma de preparação das OPs.



Fonte: Própria autoria.

IV.2.3.1. Processos de extração das proteínas de okara: convencional e UAE

WO foi empregado como material de partida para a extração das proteínas e IFs.

O processo de extração convencional (0 W) foi conduzido utilizando os parâmetros de processo definidos no Capítulo III desta tese, sendo eles: razão mássica sólido seco:solvente 1:15, pH 9,0 (solução de NaOH 2 N), agitação de 400 rpm, 50 °C, períodos de condicionamento e extração de 40 e 60 minutos, respectivamente. Assim como no Capítulo III, o sistema de extração foi composto por uma célula encamisada de vidro *pyrex* (~ 800 mL), conectada a um banho termostático (Marconi, MA184, Piracicaba, SP, Brasil), com agitação magnética.

Para o tratamento ultrassônico, uma sonda de ultrassom VCX-750 HV (Sonics and Materials, Newtown, EUA), com um probe de titânio (diâmetro de 25 mm) (Figura C1, Apêndice C), foi acoplada ao sistema, mantendo constantes os demais parâmetros (agitação de 400 rpm, tempo de extração de 60 minutos e temperatura 50 °C). Três intensidades de potência (165, 240 e 400 W) foram avaliadas, operando em uma frequência nominal de 20 kHz. Vale ressaltar que a temperatura ao longo do tratamento ultrassônico foi monitorada e controlada para a manutenção em $50,0 \pm 0,5$ °C, por meio do banho termostático ao qual a célula encamisada estava acoplada. As temperaturas do banho durante a sonicação foram: 52 °C, 45 °C, 38 °C e 35 °C, para as potências 0 W, 165 W, 240 W e 400 W, respectivamente. Após o período de extração, tanto a agitação quanto o tratamento ultrassônico foram interrompidos. A dispersão foi removida da célula e submetida à centrifugação (5000 x g/ 15 minutos/ 25 °C) (ThermoElectron, model CR3i multifunction, EUA), originando duas fases: fase líquida denominada como extrato e sólido residual. Para gerar quantidade de OP suficiente para as análises, ao menos 3 extrações foram realizadas para cada condição experimental, sendo os extratos combinados para os passos subsequentes.

Para recuperar as proteínas e IFs contidas na fase extrato, empregou-se precipitação isoelétrica baseada na metodologia proposta por L'Hocine, Boye e Arcand (2006). Em síntese, os extratos foram filtrados (filtro de celulose Whatman, 11 µm, n° 1) e o pH foi reduzido com HCl 2 N até atingir o ponto isoelétrico (pH 4,5). A mistura acidificada foi agitada (400 rpm/ 25 °C/ 45 minutos) e centrifugada (2900 x g/ 4 °C/ 15 minutos). Os precipitados foram lavados duas vezes com água deionizada e centrifugados (2900 x g/ 4 °C/ 10 minutos) a cada lavagem, antes da ressuspensão em água deionizada para neutralização (ajuste do pH para 7,0). Alíquotas das amostras foram coletadas e armazenadas a - 20 °C para análises posteriores.

Os precipitados foram submetidos a remoção da água por liofilização (equipamento de câmara única, modelo Scientz-10ND, Ningbo Scientz Biotechnology CO LTD, Ningbo, China), seguindo os parâmetros descrito por Privatti et al. (2022) (Capítulo II desta tese). Os

Capítulo IV

sólidos secos foram denominados como OP60-0, OP60-165, OP60-240 e OP60-400, sendo originários das extrações de 60 minutos, nas intensidades de potência de 0, 165, 240 e 400 W, respectivamente. Os sólidos residuais, obtidos conforme sumarizado na Figura C2 do Apêndice C, foram lavados com água deionizada e submetidos a secagem em estufa de convecção forçada por 24 horas a 100 °C, originando os refinados de okara (OR).

Vale ressaltar que cada condição experimental avaliada foi replicada ao menos uma vez.

IV.2.3.2. Otimização da UAE

Com base nos conteúdos de proteínas e IFs presentes nas OPs obtidas como supramencionado (item IV.2.3.1), a intensidade de potência de 240 W foi selecionada para os experimentos de otimização do processo UAE, em termos de tempo de tratamento ultrassônico e número de estágios em correntes cruzadas.

Em relação ao tempo de tratamento ultrassônico (20 kHz, 240 W) foram avaliados períodos de UAE mais curtos, de 15 e 30 minutos, frente aos 60 minutos aplicados anteriormente (OP60-240), sendo que os demais parâmetros do processo foram mantidos constantes. As OPs foram designadas como OP15-240 e OP30-240, evidenciando o tempo de extração e a intensidade de potência aplicada.

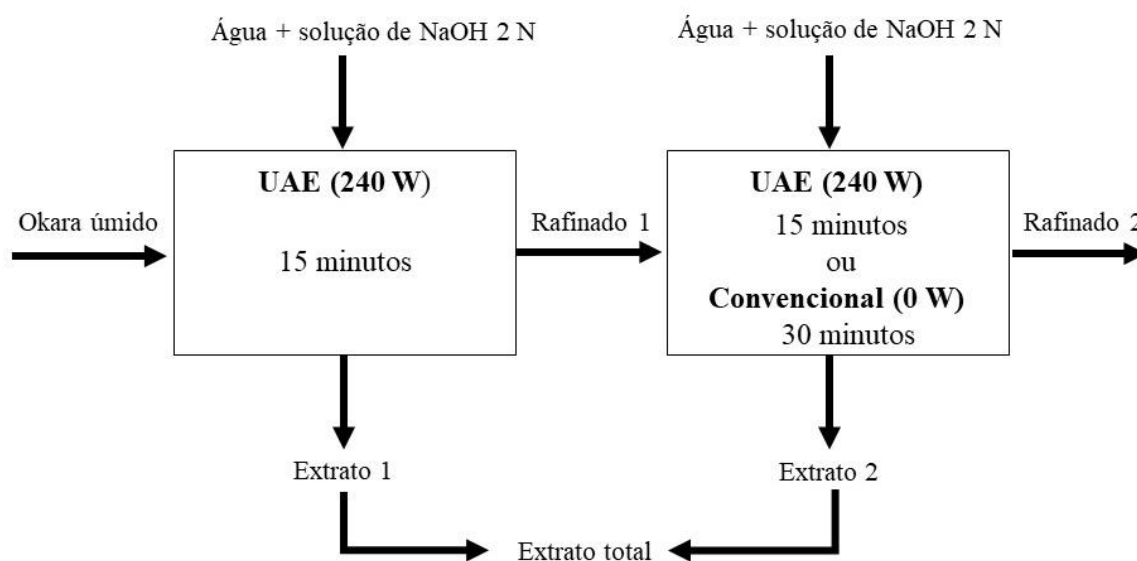
Em termos de configuração do sistema foram analisadas duas configurações por estágios em correntes cruzadas para a extração de proteínas e IFs de WO, como diagramado na Figura IV.2. A configuração por estágios em correntes cruzadas seguiu o procedimento detalhado no Capítulo III desta tese. As configurações experimentais avaliadas foram:

(I) 2 estágios de extração em correntes cruzadas aplicando UAE (20 kHz, 240 W) por 15 minutos/cada, denominado como OP15-240 + OP15-240 (Figura IV.1);

(II) 1º estágio empregando UAE (20 kHz, 240 W) por 15 minutos e 2º estágio utilizando extração convencional (0 W) por 30 minutos (período de extração baseado no Capítulo III desta tese), designado como OP15-240+OP30-0 (Figura IV.1).

Novamente, ressalta-se que para cada condição experimental pesquisada, ao menos 2 procedimentos de extração foram necessários para obtenção dos extratos, os quais foram submetidos as etapas subsequentes (precipitação isoelétrica, lavagens, neutralização e liofilização), conforme descrito no item IV.2.3.1. Cada condição experimental foi replicada ao menos uma vez.

Figura IV.2. Diagrama da configuração por estágios em correntes cruzadas aplicando UAE para a recuperação de proteínas e IFs de okara.



Fonte: Própria autoria.

IV.2.4. Caracterização das OPs

As OPs foram caracterizadas em termos composicionais determinando os teores de proteínas, lipídios, carboidratos solúveis, umidade residual e IFs, seguindo os métodos descritos nos itens IV.2.2 e IV.2.2.1.

IV.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As distribuições das massas molares das OPs, obtidas de extração convencional ou UAE, foram determinadas utilizando SDS-PAGE em condições redutoras, a partir das soluções proteicas neutralizadas (2,4 mg de proteína/ mL de solução), segundo o método com modificações sugerido por Stanojevic et al. (2012), detalhado no Capítulo III desta tese (item III.2.5). A imagem do gel e a estimativa quantitativa das subunidades proteicas foram realizadas empregando o sistema de detecção de proteínas ChemiDoc™ MP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) e o programa ImageJ, respectivamente.

IV.2.6. Propriedades funcionais

Higroscopicidade (HM) e capacidade de absorção de óleo (OHC) das OPs foram mensuradas de acordo com Cai e Corke (2000) e Zhang et al. (2012), respectivamente. Os procedimentos descritos por Pearce e Kinsella (1978) foram empregados para a quantificação dos índices de atividade (EAI) e estabilidade (ESI) das emulsões após 10 minutos da formação destas em relação a emulsão inicial, empregando as soluções neutralizadas para esse fim. As emulsões também foram caracterizadas em termos de diâmetros médios das gotículas de óleo presentes, utilizando analisador de tamanho de partículas por difração à laser (Shimadzu, modelo SALD-201V, Japão). Por fim, o índice de capacidade de formação (FAI) da espuma foi avaliado conforme metodologias propostas por Zhang et al. (2012) e Yadav, Yadav e Chaudhary (2011), enquanto a estabilidade (FSI) da espuma foi determinada segundo Bandyopadhyay, Misra e Ghosh (2008). A Tabela C1 do Apêndice C apresenta as capacidades de absorção de água (WHC) e óleo (OHCs) dos ORs, as quais foram determinadas segundo Zhang et al. (2012). As propriedades funcionais foram determinadas, no mínimo, em duplicata. Modificações, particularidades e equações empregadas em cada uma das metodologias supramencionadas estão detalhadamente descritas no Capítulo III desta tese (item III.2.6).

IV.2.7. Parâmetros de cor

Os parâmetros luminosidade (L^*), coordenada vermelho/verde (a^*) e coordenada amarelo/azul (b^*) das OPs foram determinados, em triplicata, utilizando o colorímetro (CR-400, Konica Minolta, Japão). Ademais, foram calculados o ângulo Hue (h°) (Equação IV. 1) e a mudança de cor total (ΔE) (Equação IV. 2), conforme metodologias sugeridas por McGuire (1992) e Li et al. (2012), respectivamente.

$$h^\circ = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad (\text{IV. 1})$$

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (b - b_0)^2 + (a - a_0)^2} \quad (\text{IV. 2})$$

IV.2.8. Ensaio de digestão *in vitro* estática

O processo digestivo *in vitro* foi simulado empregando o método sugerido por Brodkorb et al. (2019). O procedimento visou avaliar a digestibilidade das proteínas recuperadas do WO bem como a bioacessibilidade das IFs presentes na OP.

Foram simuladas as etapas gástrica e intestinal. Brevemente, 1 g de OP foi solubilizado em 2 mL de água deionizada e a mistura foi contatada com fluido salivar simulado (H₂O: KCl

Capítulo IV

0,5 M: KH₂PO₄ 0,5 M: NaHCO₃ 1 M: NaCl 2 M: MgCl₂(H₂O)₆ 0,15 M: (NH₄)₂CO₃ 0,5 M: HCl 6 M: CaCl₂(H₂O)₂ 0,3 M, proporções volumétricas 0,93: 0,04: 0,009: 0,02: 0,001: 0,00015: 0,0002: 0,00006) por 2 minutos. Transcorrido esse período, a digestão gástrica foi simulada adicionando à mistura fluido gástrico simulado (H₂O: KCl 0,5 M: KH₂PO₄ 0,5 M: NaHCO₃ 1 M: NaCl 2 M: MgCl₂(H₂O)₆ 0,15 M: (NH₄)₂CO₃ 0,5 M: HCl 6 M: CaCl₂(H₂O)₂ 0,3 M, proporções volumétricas 0,91: 0,02: 0,002: 0,03: 0,001: 0,0012: 0,003: 0,00001) e dispersão de pepsina (79743,8 UI/ mL ou 27,24 mg de pepsina/ mL de água) em pH 3,0 (ajuste com HCl 2 N), seguida por incubação sob agitação constante (agitador de tubos, 1600 rpm/ 2 horas/ 37 °C). Após este período prosseguiu-se para a fase intestinal, onde foram adicionados ao sistema: fluido intestinal simulado (H₂O: KCl 0,5 M: KH₂PO₄ 0,5 M: NaHCO₃ 1 M: NaCl 2 M: MgCl₂(H₂O)₆ 0,15 M: HCl 6 M: CaCl₂(H₂O)₂ 0,3 M, proporções volumétricas 0,84: 0,02: 0,002: 0,11: 0,024: 0,011: 0,002: 0,0001), dispersões de bile bovina (0,16 mmol/ L ou 113,475 mg de bile/ mL fluido intestinal) e pancreatina (800 UI/ mL ou 84,84 mg de pancreatina/ mL fluido intestinal), o pH foi ajustado para 7,0 (NaOH 2 M) e, novamente, a mistura foi incubada por 2 horas, a 37 °C, sob agitação constante em agitador de tubos (1600 rpm).

As fases aquosas (digeridas), tanto da digestão gástrica quanto da intestinal foram analisadas, em termos de proteínas e IFs, empregando as metodologias descritas no item IV.2.2. As Equações IV. 3. e IV. 4 foram empregadas para o cálculo da digestibilidade das proteínas e bioacessibilidade das IFs, respectivamente.

$$\text{Proteína digerida (\%)} = \frac{((N_1 \times 6,25) \times m_1)}{((N_0 \times 6,25) \times m_0)} \times 100 \quad (\text{IV. 3})$$

$$\text{Bioacessibilidade de IFs (\%)} = \frac{(IF_1)}{(IF_0)} \times 100 \quad (\text{IV. 4})$$

Onde N₁ = teor de nitrogênio presente nas fases aquosas gástrica e intestinal (digeridas); m₁ = massa de líquido (soluções adicionadas nas etapas de digestão gástrica e intestinal); N₀ = teor de nitrogênio presente em OP15-240; m₀ = massa de OP15-240; IF₁ = teor de daidzeína ou genisteína presente nas fases aquosas gástrica e intestinal (digeridas); IF₀ = teor de daidzeína ou genisteína presente em OP15-240.

IV.2.9. Análise estatística

O teste de amplitudes múltiplas de Duncan (DMRT) (1955) do programa SAS® (Versão 9.4, SAS Institute Inc., EUA), ao nível de confiança de 95 % (p ≤ 0,05), foi empregado para as análises estatísticas por análise de variância (ANOVA) dos dados médios experimentais.

IV.3. Resultados e Discussão

IV.3.1. Composição do material de partida, okara úmido

O WO empregado para a recuperação das proteínas e IFs via UAE era composto por $75,4 \pm 0,8$ g de água/ 100 g de material. A parte sólida era composta por: 46 ± 2 g de fibras dietéticas totais (42 ± 1 g de fibras dietéticas insolúveis e $3,3 \pm 0,6$ g de fibras dietéticas solúveis), $38,9 \pm 0,8$ g de proteínas, $16,1 \pm 0,2$ g de lipídios, $4,5 \pm 0,2$ g de carboidratos solúveis expressos como equivalente de glicose e $2,6 \pm 0,1$ g de cinzas, em 100 gramas de material seco. Os teores de IFs contidos no okara estão apresentados na Figura IV.3a. Tal composição desse coproduto, tanto em macro, quanto em micronutrientes está de acordo com os dados reportados pela revisão de literatura de Privatti e Rodrigues (2021) no Capítulo I desta tese.

IV.3.2. Composição das OPs

O impacto das diferentes intensidades de potência do tratamento ultrassônico nos componentes químicos das OPs, como proteínas, lipídios, carboidratos solúveis e água residual é mostrado na Tabela IV.1.

Tabela IV.1. Composição percentual média das OPs, em base seca, em função da intensidade de potência do tratamento ultrassônico.

Tratamentos	Composição (g/100 g de sólido)			
	Proteínas	Lipídios	Carboidratos solúveis*	Umidade residual
OP60-0	$51,1 \pm 0,6^a$	$12,3 \pm 0,3^c$	$2,26 \pm 0,02^d$	$5,9 \pm 0,6^a$
OP60-165	$45,5 \pm 0,5^b$	$22,5 \pm 0,9^a$	$2,50 \pm 0,05^c$	$6,3 \pm 0,3^a$
OP60-240	$48,7 \pm 0,7^{ab}$	17 ± 2^b	$2,69 \pm 0,02^b$	$5,6 \pm 0,3^a$
OP60-400	51 ± 2^a	$18,2 \pm 0,1^b$	$3,146 \pm 0,008^a$	$5,6 \pm 0,2^a$

* Resultados expressos em equivalente de glicose.

Resultados expressos como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

De modo geral, o tratamento ultrassônico não afetou significativamente ($p > 0,05$) a recuperação de proteínas do WO, comparando com OP via extração convencional (OP60-0). No entanto, a UAE promoveu elevações significativas ($p \leq 0,05$) nos teores de lipídios extraídos juntamente as proteínas. Semelhantemente, Preece et al. (2017b) empregando UAE (20 kHz, 400 W) por 15 minutos verificaram 43 % de aumento na extração de lipídios e ganho reduzido

Capítulo IV

(4,2 %) no rendimento de extração de proteínas. Toda et al. (2022) também não verificaram melhorias no rendimento de extração de óleo de borra de café ao empregarem UAE, comparando com o método convencional (0 W).

Os resultados encontrados indicam que as implosões de bolhas de cavitação na superfície do WO provavelmente promoveram alterações na estrutura deste, uma vez que houve maior liberação de lipídios. Estes lipídios possivelmente foram coextraídos devido a equivalência comportamental com as proteínas em meios alcalinos e ácidos (PREECE; HOOSHYAR; ZUIDAM, 2017; ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1998).

No entanto, em relação as proteínas, pode-se sugerir que os parâmetros do ultrassom empregados não foram suficientes para romper as ligações destes compostos com o material fibroso. Adicionalmente, a sonicação pode ter promovido a complexação das proteínas com os demais constituintes do WO. De acordo com Arzeni et al. (2012), Chandrapala et al. (2013) e Jiang et al. (2014), a sonicação acarreta uma série de modificações nas interações moleculares, principalmente nas interações hidrofóbicas entre proteínas globulares e água, promovendo a formação de complexos instáveis. Estes complexos podem ser rompidos pela turbulência ocasionada por UAE de alta intensidade de potência (AMPOFO; NGADI, 2022; HU et al., 2015; JIANG et al., 2014; RAHMAN; LAMSAL, 2021), bem como alta frequência (DING et al., 2021), proporcionando a solubilização das proteínas. Tal suposição pode ser observada nesse estudo, uma vez que OP60-165 apresentou teores de proteínas e lipídios significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) frente as OPs obtidas em potências superiores. OP60-400 apresentou os maiores teores de proteínas, lipídios e carboidratos solúveis das amostras tratadas com ultrassom, indicando que potências superiores poderiam romper os complexos, assim como modificar as interações hidrofóbicas/hidrofílicas impedindo a formação desses complexos. Aiello et al. (2021) reportaram em torno de 7 vezes de elevação no rendimento de extração da fração proteica do okara empregando UAE a 4000 W, a 20 °C frente as mesmas condições de extração sem o tratamento ultrassônico. Com relação ao presente trabalho, pode-se inferir que as proteínas contidas nas células intactas não foram recuperadas, corroborando com Preece et al. (2017b). Estes autores não encontraram modificações nas microestruturas desse tipo de célula em okara após o uso do ultrassom.

Adicionalmente, pode-se sugerir que o okara úmido (WO) empregado como material de partida não favoreceu a recuperação das proteínas via UAE. Eze, Chatzifragkou e Charalampopoulos (2022) e Tao et al. (2019) reportaram altos conteúdos de proteínas presentes nas OPs, 85,5 % e 77,56 %, respectivamente, utilizando como material de partida okara seco e desengordurado e tratamento ultrassônico. De fato, neste presente estudo optou-se por não

Capítulo IV

aplicar pré-tratamentos (secagem e desengorduramento) do okara visando não aumentar os custos para a reutilização desse coproduto e, especialmente, preservar tanto a fração proteica quanto as IFs contidas neste material. Conforme observado por vários autores, as etapas de remoção de água podem acarretar diversas alterações nestes componentes, como modificações nas estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas afetando, conseqüentemente, as funcionalidades destas (GRIZOTTO; AGUIRRE, 2011). Os pré-tratamentos também podem alterar o perfil das IFs e/ou decompô-las ou destruí-las (GUIMARÃES et al., 2020; MULITERNO et al., 2017; PRIVATTI et al., 2022).

Por outro lado, com base nos altos teores de IFs agliconas presentes nas OPs (Figura IV.3a), pode-se inferir que o tratamento ultrassônico exibiu um efeito benéfico sobre estes micronutrientes. Importante salientar que atividades fisiológicas são atribuídas às formas agliconas das IFs (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; BRZEZINSKI et al., 1997; COWARD et al., 1993; GUO et al., 2019; HUANG et al., 2010; SCHEIBER et al., 2001). Os resultados indicam que os choques promovidos pelo ultrassom romperam a ligação das IFs com a água e demais componentes presente no WO, na medida em que conforme discutido no Capítulo II, o emprego de extração convencional (0 W) para extração de IFs de okara úmido não proporcionou resultados satisfatórios, evidenciando a forte ligação das IFs com a matriz de WO (PRIVATTI et al., 2022).

Também é possível indicar que a sonicação tenha desencadeado clivagens dos grupos carboxila, éster e glicosil das classes de IFs 6"-O-malonilglicosídeos, 6"-O-acetilglicosídeos e β -glicosídeos, respectivamente, originando as agliconas como produto final, tendo em vista a predominância destas classes em grãos de soja (FALCÃO et al., 2019; GRIFFITH; COLLISON, 2001; KIM; KIM, 2020; LUTHRIA; NATARAJAN, 2009; NEMITZ; TEIXEIRA; POSER, 2015; NIAMNUY et al., 2012; PRIVATTI et al., 2022). Falcão et al. (2018; 2019), Pananum et al. (2012) e Yang et al. (2015) também observaram altos índices de conversão de IFs glicosídeos para agliconas em grãos de soja submetidos ao ultrassom. Da mesma forma, em okara, Yu e Yang (2019) aplicando UAE (40 kHz, 300 W) por 10 minutos reportaram elevação nos teores das agliconas (daidzeína e genisteína) em relação ao conteúdo total de IFs, de 81,7 % frente a 59,1 % de IFs recuperadas via extração convencional (0 W, 120 rpm).

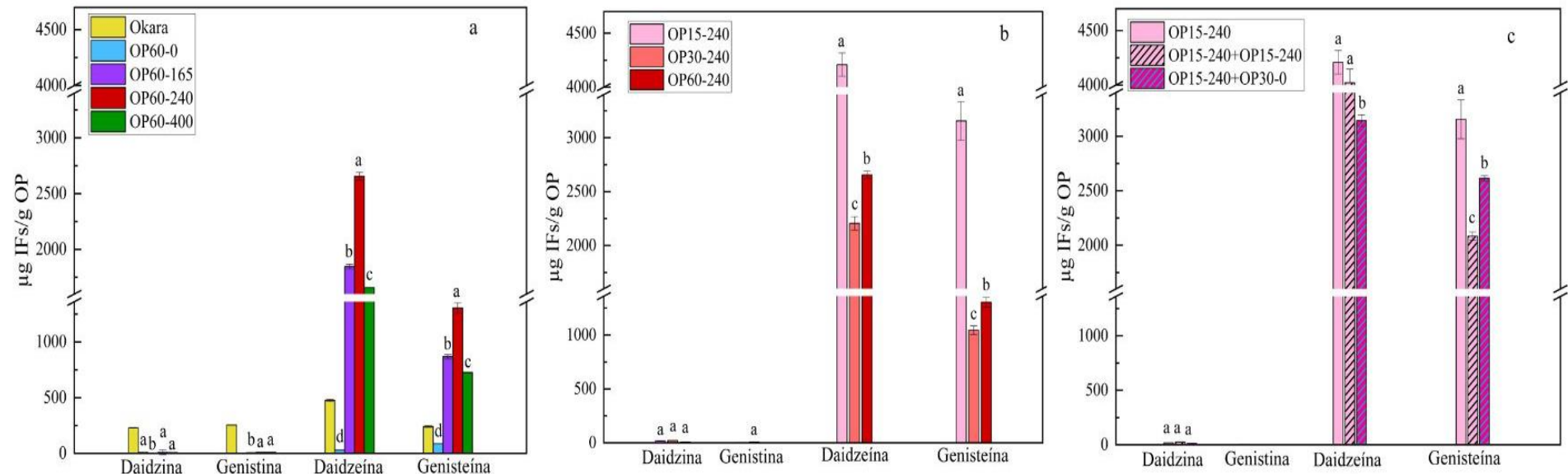
A intensidade de potência influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) o teor de IFs recuperadas nas OPs. Os maiores teores de IFs agliconas por g de OP foram $2656 \pm 35 \mu\text{g}$ de daidzeína e $1304 \pm 45 \mu\text{g}$ genisteína empregando o tratamento ultrassônico a 240 W. As IFs agliconas contidas em OP60-165 eram cerca de 70 % das presentes em OP60-240, sugerindo

Capítulo IV

que os efeitos cavitacionais promovidos por essa potência não foram suficientes para a conversão e consequente recuperação destes biocompostos junto às proteínas. Em contrapartida, ao utilizar o ultrassom a 400 W (OP60-400) foram observados decréscimos em torno de 40 % nos conteúdos de daidzeína e genisteína, inferindo que o aumento da energia transmitida pode ter acarretado na degradação e/ou decomposição das IFs, estando estas suposições em consonância com Falcão et al. (2018) e Pananum et al. (2012).

Capítulo IV

Figura IV.3. Conteúdo de IFs recuperadas simultaneamente às proteínas de okara. (a) extração por 60 minutos em função da intensidade de potência (0, 165, 240 e 400 W); (b) UAE (20 kHz, 240 W), em função do tempo de tratamento ultrassônico (15, 30 ou 60 minutos); (c) UAE (20 kHz, 240 W), em função do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.



Resultados expressos como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais no mesmo tipo de IF não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

IV.3.2.1. Composição das OPs obtidas via UAE empregando condições otimizadas

Os experimentos de otimização do processo de recuperação de proteínas e IFs de okara, via UAE, foram conduzidos na intensidade de potência de 240 W, uma vez que esta intensidade propiciou a obtenção de OPs com os maiores conteúdos de IFs (Figura IV.3a). Em adição, a condição de 240 W não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) em termos de proteínas (Tabela IV.1.). A Tabela IV.2 apresenta os teores médios de proteínas, lipídios e carboidratos solúveis recuperados do WO, em função do tempo de tratamento ultrassônico (20 kHz, 240 W) e do número de estágios de extração, 1 ou 2 em correntes cruzadas.

Tanto as reduções do tempo de tratamento ultrassônico (OP15-240 e OP30-240), em estágio único, quanto as configurações em 2 estágios em correntes cruzadas (OP15-240+OP15-240 e OP15-240+OP30-0) promoveram ganhos significativos ($p \leq 0,05$), em torno de 5 % no conteúdo de proteínas, em comparação a 60 minutos de UAE (OP60-240). Estes resultados estão em consonância com Eze, Chatzifragkou e Charalampopoulos (2022), os quais observaram ganhos na extração de proteínas de okara até 25 minutos de UAE, com diminuição após este período. Kumar et al. (2021) e Rahman e Lamsal (2021) reportaram que os efeitos cavitacionais promovidos pela UAE após 30 minutos de tratamento ultrassônico contínuo estimulam a formação de pontes dissulfetos acarretando a complexação da fração proteica com os demais constituintes do WO. Ademais, OP15-240, OP30-240 e ambas as configurações em 2 estágios em correntes cruzadas apresentaram reduções respectivas de 62 %, 56 % e 53 % na fração lipídica presente nas OPs frente ao OP60-240, indicando que as modificações estruturais geradas pelo ultrassom no WO, as quais possivelmente proporcionaram maior liberação de lipídios, ocorrem em períodos prolongados de UAE.

De forma análoga, a recuperação das IFs foi influenciada pelo período de extração, como apresentado na Figura IV.3b e 3c. Os maiores níveis de IFs agliconas presentes nas OPs foram observados na configuração em estágio único com 15 minutos de tratamento ultrassônico (OP15-240), com decréscimos significativos ($p \leq 0,05$) com o aumento do período de UAE, assim como com a adição de mais um estágio/período de extração (Figura IV. 3c). Estes resultados sugerem que o tempo de exposição, tanto ao ultrassom quanto a temperatura (50 °C), provavelmente ocasionam a degradação e/ou decomposição das IFs, corroborando com Rostagno, Palma e Barroso (2003). Estes autores observaram reduções nos teores de IFs ao prolongarem a UAE e atribuíram esse fato a oxidação desses biocompostos. As observações também concordam com Privatti et al. (2022) (Capítulo II desta tese) que reportaram relação

Capítulo IV

direta entre temperatura e degradação e/ou decomposição de IFs. Similarmente, Achouri, Boye e Belanger (2005) encontraram níveis de IFs próximos aos determinados em 5 estágios de extração sob agitação (2 horas/ cada, totalizando 10 horas de extração) quando empregaram 15 minutos de UAE em amostras de farelo desengordurado de soja e isolados proteicos de soja. Ademais, esses autores não verificaram ganhos nos teores de IFs ao prolongaram o período de sonicação em 30 e 60 minutos, em consonância com os resultados encontrados nessa pesquisa.

Tabela IV.2. Composição percentual média das OPs, em base seca, em função do tempo de tratamento ultrassônico (20 kHz, 240 W) e do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.

Número de estágios	Tratamentos	Composição (g/100 g de sólido)			
		Proteínas	Lipídios	Carboidratos solúveis*	Umidade residual**
1	OP15-240	52 ± 2 ^a	6,47 ± 0,05 ^c	2,8 ± 0,5 ^b	7 ± 1 ^{ab}
	OP30-240	51,5 ± 0,5 ^a	7,5 ± 0,6 ^b	4,0 ± 0,1 ^a	5,1 ± 0,3 ^{cd}
	OP60-240	48,7 ± 0,7 ^b	17 ± 2 ^a	2,69 ± 0,02 ^b	5,6 ± 0,3 ^{bc}
2	OP15-240+OP15-240	52 ± 1 ^a	8 ± 1 ^b	2,803 ± 0,009 ^b	5 ± 2 ^{cd}
	OP15-240+OP30-0	50 ± 2 ^a	8,1 ± 0,4 ^b	3,28 ± 0,01 ^b	8,85 ± 0,02 ^a

* Resultados expressos em equivalente de glicose.

Resultados expressos como média ± desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

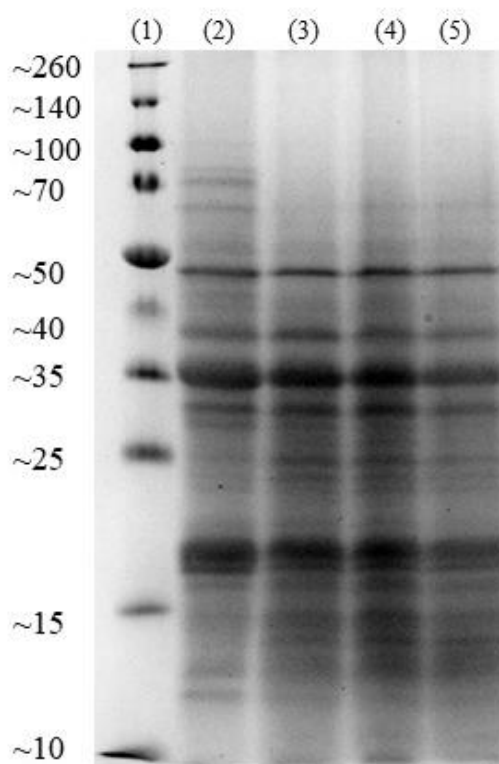
Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

IV.3.3. Perfil molecular das OPs obtidas via UAE

A Figura IV.4 apresenta os perfis moleculares das OPs recuperadas via extração convencional (OP30-0) e via UAE em estágio único (OP15-240), bem como nas configurações em 2 estágios em correntes cruzadas (OP15-240+OP15-240 e OP15-240+OP30-0). A Tabela IV.3 traz dados percentuais das quantidades estimadas (áreas) de cada subunidade presente nas OPs, em relação a área total (soma das áreas individuais).

Figura IV.4. SDS-PAGE das OPs de okara em função do tipo de extração e da configuração (1 ou 2 estágios em correntes cruzadas). (1) Padrões de massas molares (10-260 kDa); (2) OP30-0; (3) OP15-240; (4) OP15-240+OP15-240; (5) OP15-240+OP30-0.



Fonte: Própria autoria.

Tabela IV.3. Estimativa da composição, em porcentagem, das subunidades da fração proteica das OPs em função do tipo de extração (convencional ou UAE) e do número de estágios, 1 ou 2 estágios em configuração de correntes cruzadas.

Estágios	Tratamentos	β-conglícinina			γ -conglícinina	11S-ácida	Bg7S	11S-básica	<15 kDa
		α'	α	β					
1	OP30-0	nd	2	13	4	32	0,3	33	15
	OP15-240	nd	nd	16	nd	45	1	20	18
2	OP15-240+OP15-240	nd	nd	17	nd	39	1	19	24
	OP15-240+OP30-0	nd	nd	18	nd	38	1	19	24

nd= não detectado.

Fonte: Própria autoria.

Em consonância com Aiello et al. (2021) e Tao et al. (2019), o emprego da UAE não alterou as frações proteicas predominantes nas OPs, na medida em que as proteínas prevalentes foram as subunidades das globulinas 11S ácida e básica, as quais apresentam valores de massa molar de 43 a 32 kDa e 18 kDa (STANOJEVIC et al., 2012), respectivamente.

No entanto, as subunidades da β -conglícinina: α' (86 a 80 kDa) e α (70 kDa), assim como γ -conglícinina (64 kDa) (STANOJEVIC et al., 2012; TAO et al., 2019) não foram encontradas nas OPs obtidas via UAE. Os resultados sugerem que possivelmente estas subunidades foram dissociadas pela sonicação nas subunidades de 7S de massas molares inferiores: β da β -conglícinina (50 kDa) e Bg7S (27 kDa) (STANOJEVIC et al., 2012), corroborando com Wu et al. (2021). Ademais, peptídeos de baixa massa molar < 15 kDa foram detectados em níveis superiores ao empregar o tratamento ultrassônico, sugerindo que este provavelmente promoveu a clivagem das subunidades proteicas do WO.

Os perfis moleculares de OPs disponíveis na literatura divergem consideravelmente. Aiello et al. (2021) reportaram as mesmas regiões e predominância de 11S encontradas neste trabalho, assim como Figueiredo et al. (2018; 2019) e Pereira et al. (2019). Em contrapartida, OPs compostas majoritariamente por frações das globulinas 7S foram descritas por Tao et al. (2019), Ma et al. (1996) e Stanojevic et al. (2012). Também há relatos de frações proteicas de alta massa molar (> 100 kDa), designadas como agregados (MA et al., 1996; MOSCOSO OSPINA; PORFIRI; CABEZAS, 2022; TAO et al., 2019). Pode-se inferir que tais diferenças são decorrentes tanto do processo de fabricação do WSSE, quanto do método empregado para a recuperação das proteínas remanescentes no okara. As globulinas 7S e 11S estão localizadas em regiões específicas nos grãos de soja, sendo a retenção e conformação destas no okara

diretamente ligadas a temperatura empregada durante a produção do WSSE. Adicionalmente, a técnica empregada para a extração das proteínas pode propiciar a recuperação de certas frações proteicas frente a outras (SINGH et al., 2015; STANOJEVIC et al., 2012; TAO et al., 2019).

IV.3.4. Propriedades funcionais das OPs obtidas via UAE

As Tabelas IV.4 e 5 sintetizam as funcionalidades (HM, OHC, FAI, FSI, EAI e ESI) das OPs obtidas via UAE em diferentes configurações (1 ou 2 estágios em correntes cruzadas). Em geral, os resultados demonstram que o nível de exposição ao tratamento ultrassônico impactou significativamente ($p \leq 0,05$) nas propriedades funcionais. Os resultados permitem inferir que o rearranjo estrutural decorrente das forças cavitacionais promovidas pelo ultrassom possivelmente afetou o equilíbrio hidrofílico e hidrofóbico das OPs. Entretanto, há poucos estudos disponíveis sobre os impactos da UAE nas propriedades funcionais das proteínas de okara.

O emprego do tratamento ultrassônico em estágio único (OP15-240) possibilitou os maiores valores de HM e OHC (Tabela IV.4), sugerindo que 15 minutos de UAE provavelmente promoveram a reticulação das cadeias polipeptídicas em níveis que propiciaram características anfifílicas ao OP15-240. Ganhos na absorção de água proporcionados pela UAE foram reportados por Hu et al. (2013) em isolados proteicos de soja e por Aiello et al. (2021) em proteína recuperada de okara. Em contrapartida, HM e OHC foram estatisticamente inferiores ($p \leq 0,05$) com a adição de um novo estágio de UAE (OP15-240+OP15-240), indicando que o período adicional de tratamento ultrassônico pode ter acarretado na internalização dos grupos hidrofóbicos/hidrofílicos previamente expostos, gerando um desequilíbrio na polaridade dos aminoácidos, corroborando Wu et al. (2021).

As OPs obtidas somente via UAE, tanto em estágio único (OP15-240) quanto em 2 estágios em correntes cruzadas (OP15-240+OP15-240) apresentaram propriedades espumantes (FAI e FSI) (Tabela IV.4) estatisticamente superiores ($p \leq 0,05$) perante as observadas em OP15-240+OP30-0. Os resultados sugerem que as modificações estruturais nestas OPs, geradas pela implosão das bolhas cavitacionais, facilitaram a incorporação do ar na interface ar/água. Da mesma forma, OP15-240 e OP15-240+OP15-240 exibiram alta estabilidade da espuma por 30 minutos, sendo que após este período está foi perdida na OP obtida em 2 estágios de UAE em correntes cruzadas. Tal fato pode estar associado ao maior equilíbrio entre grupos polares e apolares em OP15-240, evidenciados pelas HM e OHC. Propriedades espumantes similares em

Capítulo IV

proteínas de okara foram reportadas por Tao et al. (2019) aplicando tratamento ultrassônico no material de partida previamente a extração.

No entanto, ganhos em torno de 43 % em EAI e 57 % em ESI foram observados (Tabela IV.5) com a adição de um novo estágio empregando extração convencional (OP15-240 +OP30-0) frente aos OPs obtidas somente via UAE (OP15-240 e OP15-240+OP15-240). Tais observações sugerem que a combinação dos tratamentos expôs tanto grupos hidrofóbicos quanto hidrofílicos para interagirem com as fases lipídica e aquosa, respectivamente. Está possível maior exposição deve ter acarretado na melhor adsorção do óleo no meio, bem como na formação de uma membrana de filme pelas proteínas recuperadas do WO ao redor das gotículas de óleo (ZAYAS, 1997). Essas suposições estão em consonância com o Capítulo III desta tese, onde a extração convencional (0 W) favoreceu a exposição de grupos apolares. As observações também corroboram com as características anfifílicas (HM e OHC na Tabela IV.4) apresentadas pela OP15-240+OP30. Da mesma forma, Karki et al. (2009) reportaram propriedades emulsificantes inferiores em isolados proteicos de soja obtidos via UAE, em relação as amostras não-sonicadas.

Ademais, pode-se inferir que as alterações estruturais nas OPs, promovidas pelo tratamento ultrassônico, influenciaram significativamente ($p \leq 0,05$) no diâmetro médio das gotículas de óleo nas emulsões (Tabela IV.5). OP obtida em 2 estágios em correntes cruzadas, via combinação dos tratamentos (OP15-240+OP30-0) apresentou gotículas com diâmetros estatisticamente inferiores ($p \leq 0,05$) nos primeiros instantes após a formação da emulsão frente às OPs obtidas somente via UAE. Estes resultados estão em consonância com os maiores valores de EAI e ESI observados para esses tratamentos. De maneira geral, os resultados sugerem que a sonicação gerou uma estrutura mais desordenada dificultando a interação proteína-óleo-água. Tais resultados corroboram os resultados reportados por Chen et al. (2011) e Tao et al. (2019).

Tabela IV.4. Propriedades funcionais das OPs obtidas via UAE (20 kHz, 240 W), em função do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.

Estágios	Tratamentos	HM	OHC	FAI (%)	FSI (%)			
		g água/g OP	g óleo/g OP		10	30	45	60
		minutos						
1	OP15-240	0,0749 ± 0,0007 ^a	1,06 ± 0,04 ^a	10 ± 2 ^a	78 ± 14 ^{aA}	63 ± 5 ^{aAB}	47 ± 19 ^{aB}	0
2	OP15-240+OP15-240	0,0659 ± 0,0003 ^b	0,75 ± 0,01 ^b	12 ± 2 ^a	88 ± 14 ^{abA}	71 ± 6 ^{aA}	0	0
	OP15-240+OP30-0	0,069 ± 0,003 ^{ab}	0,93 ± 0,09 ^{ab}	7,1 ± 0,1 ^b	47 ± 6 ^{bA}	22 ± 4 ^{bB}	0	0

Resultados expressos como média ± desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan .

Fonte: Própria autoria.

Tabela IV.5. Propriedades emulsificantes das OPs obtidas via UAE (20 kHz, 240 W), em função do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.

Estágios	Tratamentos	Emulsão		Diâmetro médio das gotículas	
		EAI (m^2/g)	ESI (% em 10 minutos)	T0 (μm)	T10 (μm)
1	OP15-240	47 ± 3^b	$51,6 \pm 0,7^c$	$1,13 \pm 0,05^{aA}$	$1,3 \pm 0,2^{aA}$
	OP15-240+OP15-240	44 ± 3^b	63 ± 4^b	$1,24 \pm 0,07^{aA}$	$0,9 \pm 0,2^{aA}$
2	OP15-240+OP30-0	65 ± 3^a	90 ± 1^a	$0,72 \pm 0,08^{bA}$	$0,9 \pm 0,2^{aA}$

Resultados expressos como média \pm desvio padrão de, no mínimo, 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

IV.3.5. Parâmetros de cor das OPs obtidas via UAE

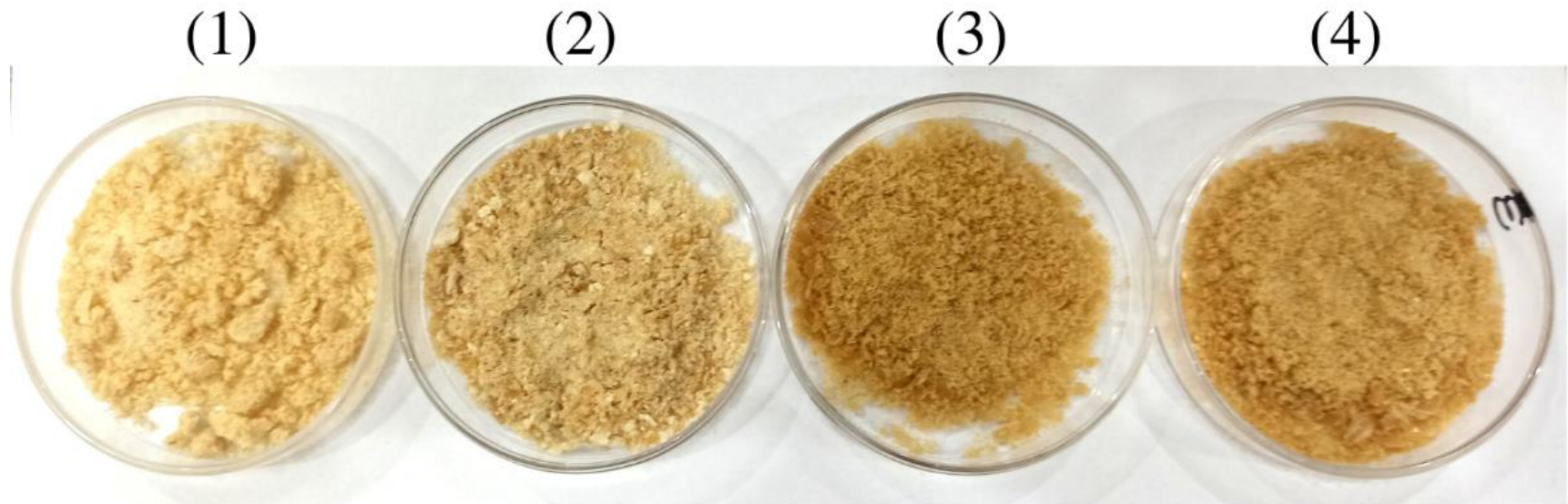
A Figura IV.5 ilustra a imagem do okara liofilizado e das OPs recuperadas via tratamento ultrassônico (20 kHz, 240W), em 1 ou 2 estágios de extração em correntes cruzadas, enquanto a Tabela IV.6 apresenta os parâmetros de cor mensurados nestas amostras. De modo geral, todas as configurações avaliadas empregando ultrassom para a recuperação das proteínas de WO influenciaram significativamente ($p \leq 0,05$) na coloração das OPs frente ao material de partida liofilizado.

As alterações mais proeminentes ($> \Delta E$) foram observadas na configuração em 2 estágios em correntes cruzadas utilizando somente UAE (OP15-240+OP15-240). Observa-se queda de 18 % na luminosidade e ascensão em tons avermelhados, demonstrados tanto pelo acréscimo de 150 % na coordenada vermelho/verde (a^*), quanto pelo maior afastamento do ângulo Hue do valor de 90° , o qual equivale aos tons amarelados (MCGUIRE, 1992). Em contrapartida, a UAE em estágio único (OP15-240) provocou alterações menos expressivas (L^* e $h^\circ = -5\%$ e $a^* = +92\%$) em relação ao okara liofilizado. Li et al. (2012) também observaram mudanças de cor marcantes empregando jatos de extrusão em WO.

Ademais, a configuração de 2 estágios em correntes cruzadas combinando os métodos de extração (OP15-240+OP30-0) gerou mudanças na cor em níveis intermediários. Assim, como no Capítulo III desta tese, pode-se inferir que o tempo atrelado a temperatura de extração impactam na coloração das OPs, uma vez que as maiores alterações foram observadas em 2 estágios de extração (> 100 minutos de exposição, a 50°C) em ambos os capítulos, em consonância com Giri e Mangaraj (2012). Entretanto, o emprego do ultrassom acentuou tais alterações, sugerindo que as modificações estruturais nos componentes do WO, causadas pela implosão das bolhas de cavitação, acentuam as possíveis reações de escurecimento, em concordância com Zhang et al. (2021). Ademais, segundo Wang et al. (2019), o ultrassom gera grupos hidroxila no meio, os quais reagem com os anéis aromáticos dos polifenóis promovendo ganhos em tons avermelhados, corroborando com os resultados observados no presente estudo.

Figura IV.5. Imagens das OPs obtidas via UAE (20 kHz, 240 W), em função do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.

(1) Okara liofilizado; (2) OP15-240; (3) OP15-240+OP15-240; (4) OP15-240+OP30-0.



Fonte: Própria autoria.

Tabela IV.6. Parâmetros de cor das OPs obtidas via UAE (20 kHz, 240 W), em função do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.

Estágios	Tratamentos	Parâmetros				
		L*	a*	b*	ΔE	h°
1	Okara liofilizado	77,01 ± 0,02 ^a	2,42 ± 0,01 ^d	22,67 ± 0,01 ^d	---	83,91 ± 0,02 ^a
	OP15-240	73,2 ± 0,2 ^b	4,6 ± 0,2 ^c	25,4 ± 0,2 ^c	5,2 ± 0,3 ^c	79,7 ± 0,2 ^b
2	OP15-240+OP15-240	63,65 ± 0,01 ^d	6,04 ± 0,01 ^a	29,42 ± 0,02 ^a	15,40 ± 0,03 ^a	78,39 ± 0,01 ^d
	OP15-240+OP30-0	68,45 ± 0,01 ^c	5,46 ± 0,01 ^b	28,75 ± 0,01 ^b	10,93 ± 0,02 ^b	79,25 ± 0,01 ^c

L*= luminosidade; a*= coordenada vermelho/verde; b*= coordenada amarelo/azul; h°= ângulo Hue (Equação IV. 1); ΔE= mudança de cor total (Equação IV. 2);

Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.

IV.3.6. Digestão *in vitro* das OPs obtidas via UAE

Os estudos de digestão *in vitro* estática simularam as fases de digestão gástrica e intestinal da OP obtida a partir de WO, via UAE, sonicação por 15 minutos, em estágio único (OP15-240). Este material foi escolhido para esta avaliação devido aos maiores teores de proteínas e IFs. Os resultados referentes à digestibilidade das proteínas (medida em termos de quantidade de proteínas presentes nas fases aquosas (digeridas) e bioacessibilidade das IFs são apresentados na Figura IV.6.

Após o estágio inicial (digestão gástrica), apenas 44 ± 1 % da fração proteica presente em OP15-240 havia sido digerida (Figura IV.6a). De acordo com Zhong e Zhao (2015), a menor digestibilidade das proteínas nessa fase pode ser decorrente da competição entre proteínas e polissacarídeos sob condições ácidas. Estes autores reportaram 30,5 % de digestibilidade *in vitro* das proteínas presentes em okara *in natura* após a simulação da fase gástrica, corroborando os resultados dessa pesquisa. No entanto, após a simulação *in vitro* da fase intestinal, a digestibilidade das proteínas de OP15-240 aumentou para 93 ± 5 % (Figura IV.6a). A alta digestibilidade proteica demonstrado por OP15-240 reforça o potencial do okara como fonte de proteínas de alta qualidade nutricional, visto que tanto a digestibilidade, quanto o teor de aminoácidos essenciais são os parâmetros que indicam o valor nutricional das proteínas (CAPUANO; JANSSEN, 2021; DEL RIO; BOOM; JANSSEN, 2022; SÁ; MORENO; CARCIOFI, 2020). Digestibilidade semelhante em proteínas isoladas de okara foi encontrada por Ma et al. (1996). Em contrapartida, Chan e Ma (1999a, 1999b) e Zhong e Zhao (2015) reportaram digestibilidade proteica *in vitro* em torno de 80 % para proteínas de okara. Tais divergências podem ser atribuídas aos protocolos de digestão empregados, as variações enzimáticas e ao método de recuperação das proteínas do okara (BRODKORB et al., 2019; GUO et al., 2020). Segundo Ding et al. (2018) e Yang et al. (2017), o tratamento ultrassônico promove maior liberação dos peptídeos, na medida em que pode alterar as estruturas secundárias e terciárias das proteínas, corroborando assim com a alta digestibilidade da fração proteica encontrada por este estudo.

A bioacessibilidade de compostos bioativos pode ser definida como a capacidade destes de se desprenderem das matrizes nas quais estão contidos durante o processo digestivo, ficando assim passíveis para serem absorvidos pela mucosa intestinal (GUO et al., 2020; NINGTYAS; HATI; PRAKASH, 2021; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013; SIMMONS et al., 2012). Uma ampla faixa, de 25 a 100 % (MO et al., 2013; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2020) de bioacessibilidade de IFs totais é encontrada na literatura. Além disso, as classes de IFs contidas inicialmente na matriz do alimento também influenciam na bioacessibilidade, uma vez

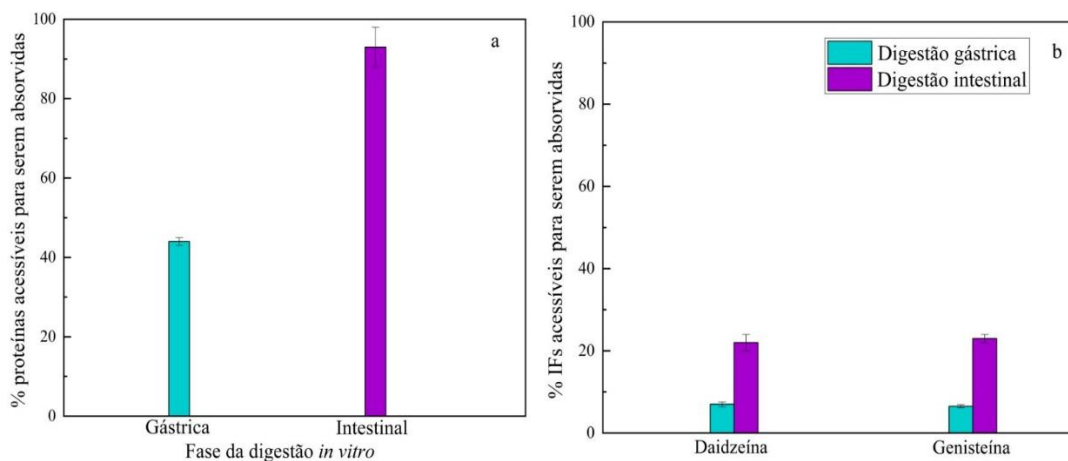
Capítulo IV

que segundo a literatura, a glicose das IFs glicosídeos exerce um efeito protetor sobre a fração aglicona durante a fase intestinal (WALSH et al., 2003). No entanto, diversos estudos reportam que a atividade fisiológica das IFs é exercida pelas agliconas e que pequenas quantidades são suficientes para os benefícios biológicos ligados a esses biocompostos (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; BRZEZINSKI et al., 1997; COWARD et al., 1993; GUO et al., 2019; HUANG et al., 2010; RODRIGUEZ-ROQUE et al., 2013; SCHEIBER et al., 2001).

Os teores de IFs contidos nas fases aquosas (digeridas) saltaram de 326 ± 30 para 1070 ± 47 μg de daidzeína e 158 ± 9 para 553 ± 29 μg de genisteína, após as digestões gástrica e intestinal, respectivamente, originando uma bioacessibilidade de aproximadamente 23 % (Figura IV.6b) para ambas as classes de agliconas contidas em OP15-240 (daidzeína e genisteína). Rodríguez-Roque et al. (2013, 2020) reportaram bioacessibilidade de IFs agliconas variando de 17 a 43,5 % em WSSEs submetidos a diferentes tratamentos (térmico, campo elétrico pulsado de alta intensidade e alta pressão). Em pão de soja, 59 % de daidzeína e 33 % de genisteína estavam acessíveis para absorção após a fase intestinal da digestão *in vitro*, segundo Walsh et al. (2003). Enquanto Simmons et al. (2012) encontraram de 40 a 60 % de bioacessibilidade de agliconas em pretzel de soja. Tipo, composição e estrutura da matriz alimentar, a classe de IFs presente, bem como o método de digestão *in vitro* simulado destacam-se como os principais fatores que influenciam a bioacessibilidade de IFs (GUO et al., 2020; MO et al., 2013; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2020; SIMMONS et al., 2012; WALSH et al., 2003), corroborando com nossos resultados. Também destaca-se que a UAE pode ter influenciado na bioacessibilidade das IFs, uma vez que pode causar rearranjos estruturais na matriz do OP15-240, possivelmente expondo os compostos bioativos. Além disso, como a OP era majoritariamente composta por IFs agliconas, essas podem ter sido biotransformadas em glicuronídeos e sulfatos conjugados (WALSH et al., 2003), os quais também são absorvidos pelo organismo. Entretanto, estas classes não podem ser quantificados pelo método empregado, o que pode ter impactado nos dados de bioacessibilidade encontrados nesta pesquisa. Em adição, os teores de IFs acessíveis para serem absorvidos pela mucosa intestinal encontrados nesse estudo (daidzeína = 1070 ± 47 $\mu\text{g/g}$ de OP15-240 e genisteína = 553 ± 29 $\mu\text{g/g}$ OP15-240) são superiores aos contidos em okara reportados por Jankowiak et al. (2014a, 2014b), Muliterno et al. (2017), Vong, Lim e Liu (2017) e Vong e Liu (2019). Também, enfatiza-se que até o momento, este estudo é o primeiro a avaliar a bioacessibilidade de IFs em proteínas recuperadas de okara.

Figura IV.6. Conteúdos de proteínas e IFs durante digestão *in vitro* estática de OP obtida via UAE (20 kHz, 240 W) por 15 minutos, em estágio único (OP15-240).

(a) Digestibilidade proteica (% de proteínas acessíveis para serem absorvidas pela mucosa intestinal digeridas); (b) bioacessibilidade das IFs (% IFs acessíveis para serem absorvidas pela mucosa intestinal).



Fonte: Própria autoria.

IV.4. Conclusões

Extração assistida por ultrassom foi avaliada para a recuperação simultânea de proteínas e isoflavonas a partir de okara úmido. Os resultados deste estudo mostram que o tratamento ultrassônico é uma ferramenta eficiente para extração de isoflavonas, especialmente a classe das agliconas. A intensidade de potência do ultrassom, assim como o tempo e número de estágios em correntes cruzadas influenciaram no conteúdo de isoflavonas recuperadas do material de partida, sendo os maiores teores alcançados ($4208 \pm 108 \mu\text{g}$ de daidzeína/g de proteína de okara e $3156 \pm 179 \mu\text{g}$ de genisteína/g de proteína de okara) empregando 15 minutos de tratamento ultrassônico a 240 W, em estágio único (OP15-240). A intensidade de potência superior (400 W), tal como a extensão do período de tratamento ultrassônico, tanto em termos de tempo (30 e 60 minutos), quanto em número de estágios (2 estágios em correntes cruzadas) provocaram a degradação e/ou decomposição das isoflavonas. Ademais, cerca de 23 % de isoflavonas agliconas de OP15-240 estavam bioacessíveis após a digestão *in vitro* para serem absorvidas e trazerem os benefícios para a saúde relacionados a esses biocompostos.

Os resultados evidenciaram que a extração assistida por ultrassom apresentou efeito limitado sobre a fração proteica contida no okara úmido. Ganhos em torno de 5 % nos teores de proteínas recuperadas foram propiciados pela redução do período de tratamento ultrassônico

Capítulo IV

para 15 minutos, em estágio único, como também em 2 estágios em correntes cruzadas, na intensidade de potência de 240 W. Ademais, os perfis moleculares das OPs obtidas via tratamento ultrassônico demonstraram possíveis clivagens das subunidades proteicas frente as proteínas recuperadas não-tratadas, na medida em que as OPs tratadas apresentaram elevação no teor de subunidades de baixa massa molar e as frações da globulina 7S (α' e α da β -conglucina e γ -conglucina) não foram detectadas.

De modo geral, o tratamento ultrassônico acarretou no escurecimento das OPs, assim como afetou as propriedades funcionais destas. As OPs obtidas somente via ultrassom, tanto em estágio único (OP15-240), quanto em 2 estágios em correntes cruzadas (OP15-240+OP15-240) apresentaram melhores propriedades espumantes. No entanto, quanto ao potencial emulsificante, a OP obtida em 2 estágios em correntes cruzadas aplicando o ultrassom somente no primeiro estágio (OP15-240+OP30-0) destacou-se frente as OPs obtidas somente via UAE. Também, 2 estágios de extração assistida por ultrassom em correntes cruzadas (OP15-240+OP15-240) influenciaram negativamente as capacidades de absorção de água e óleo.

Em geral, os resultados alcançados nesta pesquisa demonstram a viabilidade do emprego da extração assistida por ultrassom no enriquecimento, em termos de isoflavonas agliconas, de proteínas de okara, abordando inclusive a bioacessibilidade destas. Além disso, as proteínas recuperadas via UAE apresentam alta digestibilidade proteica *in vitro*. Esta pesquisa também disponibiliza uma série de informações sobre as funcionalidades dos produtos obtidos, norteados possíveis aplicações destes. Mais investigações devem ser conduzidas avaliando o emprego de ultrassom de alta intensidade, visando maximizar a recuperação de proteínas de okara, assim como estudos da biodisponibilidade e o efeito biológico *in vivo* das isoflavonas agliconas recuperadas simultaneamente às proteínas.

IV.5. Referências bibliográficas

AOAC. **Official methods of analysis**. 18th ed. Washington, D. C.: AOAC, 2007. 1051 p.

AOAC. **Official method 991.43**. Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. Cereal Foods, cap. 32, p. 7-9, 1995.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, Press, 3rd ed. Champaign, v.1-2, 1998.

ACHOURI, A.; BOYE, J. I.; BELANGER, D. Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability. **Food Research International**, v. 38, n. 10, p. 1199–1204, dez. 2005.

Capítulo IV

AIELLO, G. et al. Assessment of the physicochemical and conformational changes of ultrasound-driven proteins extracted from soybean okara byproduct. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 562, 8 mar. 2021.

AMPOFO, J.; NGADI, M. Ultrasound-assisted processing: Science, technology and challenges for the plant-based protein industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 84, p. 105955, 1 mar. 2022.

ANDERSON, J. J. B. et al. Effects of phyto-oestrogens on tissues. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, p. 75–116, 1999.

ARZENI, C. et al. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 463–472, fev. 2012.

BANDYOPADHYAY, K.; MISRA, G.; GHOSH, S. Preparation and characterisation of protein hydrolysates from indian defatted rice bran meal. **Journal of Oleo Science**, v. 57, n. 1, p. 47–52, 2008.

BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 757–766, jan. 2006.

BERNARDI, S. et al. Ultrasound: a suitable technology to improve the extraction and techno-functional properties of vegetable food proteins. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 76, n. 1, p. 1–11, 27 mar. 2021.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 2–3, p. 157–177, maio 2001.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 18 abr. 2019.

BRZEZINSKI, A. et al. Short-term effects of phytoestrogen rich diet on postmenopausal women. **Menopause**, v. 4, n. 2, p. 89–94, 1997.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, 2000.

CAPUANO, E.; JANSSEN, A. E. M. Food matrix and macronutrient digestion. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 12, p. 193–212, 2021.

CHANDRAPALA, J. et al. Use of power ultrasound to improve extraction and modify phase transitions in food processing. **Food Reviews International**, v. 2, n. 1, 67-91, jan. 2013.

CHAN, W. -M.; MA, C. -Y. Modification of proteins from soymilk residue (Okara) by Trypsin. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 5, p. 781–786, 1999a.

CHAN, W. -M.; MA, C. -Y. Acid modification of proteins from soymilk residue (okara). **Food Research International**, v. 32, n. 2, p. 119–127, mar. 1999b.

Capítulo IV

- CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017.
- CHEN, L. et al. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2600–2609, 23 mar. 2011.
- CHUO, S. C. et al. A glimpse into the extraction methods of active compounds from plants. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 667–696, 2022.
- COWARD, L. et al. Genistein, daidzein, and their beta-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1961–1967, 1 nov. 1993.
- DEL RIO, A. R.; BOOM, R. M.; JANSSEN, A. E. M. Effect of fractionation and processing conditions on the digestibility of plant proteins as food ingredients. **Foods**, v. 11, n. 6, 870, 18 mar. 2022.
- DING, Q. et al. Impact of ultrasound pretreatment on hydrolysate and digestion products of grape seed protein. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 42, p. 704–713, 1 abr. 2018.
- DING, Y. et al. Ultrasound frequency effect on soybean protein: Acoustic field simulation, extraction rate and structure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 145, p. 111320, 1 jun. 2021.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350–356, 1956.
- DUNCAN, D. Multiple range and multiple F tests. **Biometrics**, v. 11, p. 1-42, 1955.
- ESSAWY, A. E. et al. Soybean isoflavone ameliorates cognitive impairment, neuroinflammation, and amyloid β -accumulation in a rat model of Alzheimer's disease. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 25, p. 26060–26070, 5 set. 2019.
- EZE, O. F.; CHATZIFRAGKOU, A.; CHARALAMPOPOULOS, D. Properties of protein isolates extracted by ultrasonication from soybean residue (okara). **Food Chemistry**, v. 368, 30 jan. 2022.
- FALCÃO, H. G. et al. Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase activity, isoflavone profile and soaking time. **Food Chemistry**, v. 269, p. 404–412, 15 dez. 2018.
- FALCÃO, H. G. et al. Optimizing the potential bioactivity of isoflavones from soybeans via ultrasound pretreatment: Antioxidant potential and NF- κ B activation. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 11, 1 nov. 2019.
- FIGUEIREDO, V. R. G. de et al. Action of multi-enzyme complex on protein extraction to obtain a protein concentrate from okara. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 4, p. 1508–1517, 5 abr. 2018.

FIGUEIREDO, V. R. G. de et al. Production of hydrolysate of okara protein concentrate with high antioxidant capacity and aglycone isoflavone content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

GIANNOCCARO, E.; WANG, Y. -J.; CHEN, P. C. Effects of solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. **Food Chemistry and Toxicology**, v.71, p.59–64, 2006.

GIRI, S. K.; MANGARAJ, S. Processing influences on composition and quality attributes of soymilk and its powder. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 3, p. 149–164, 2012.

GRIFFITH, A. P.; COLLISON, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 1–2, p. 397–413, 13 abr. 2001.

GRIZOTTO, R. K.; AGUIRRE, J. M. de. Study of the flash drying of the residue from soymilk processing - “okara”. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 3, p. 645–653, 2011.

GUIMARÃES, R. M. et al. Evaluating technological quality of okara flours obtained by different drying processes. **LWT- Food Science and Technology**, v. 123, n. October 2019, p. 109062, abr. 2020.

GUO, J. et al. Functional daidzein enhances the anticancer effect of topotecan and reverses BCRP-mediated drug resistance in breast cancer. **Pharmacological Research**, v. 147, n. 2, p. 104387, 2019.

GUO, Y. et al. Protein quality and antioxidant properties of soymilk derived from black soybean after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 720–728, 1 fev. 2020.

HUANG, C. -C. et al. Anti-photoaging effects of soy isoflavone extract (aglycone and acetylglucoside form) from soybean cake. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 4782–4795, 24 nov. 2010.

HU, H. et al. Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 187–195, 2013.

HU, H. et al. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of aggregated soybean β -conglycinin and glycinin. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 102–110, 1 jan. 2015.

JANKOWIAK, L. et al. Isoflavone extraction from okara using water as extractant. **Food Chemistry**, v. 160, p. 371–378, 2014a.

JANKOWIAK, L. et al. The potential of crude okara for isoflavone production. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 166–172, 2014b.

Capítulo IV

JIANG, L. et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. **Food Research International**, v. 62, p. 595–601, 2014.

KARKI, B. et al. Functional properties of soy protein isolates produced from ultrasonicated defatted soy flakes. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 10, p. 1021–1028, out. 2009.

KARKI, B. et al. Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 2, p. 270–278, jan. 2010.

KIM, M. A.; KIM, M. J. Isoflavone profiles and antioxidant properties in different parts of soybean sprout. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 3, p. 689–695, 2020.

KUMAR, M. et al. Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. **Food Hydrocolloids**, v. 115, p. 106595, 1 jun. 2021.

LANTE, A. et al. An ecofriendly procedure to extract isoflavones from soybean seeds. **Journal of Cleaner Production**, v. 170, p. 1102–1110, 1 jan. 2018.

L'HOCINE, L.; BOYE, J. I.; ARCAND, Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. C137–C145, 30 jun. 2006.

LI, H. et al. A novel *in-situ* enhanced blasting extrusion technique - Extrudate analysis and optimization of processing conditions with okara. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 80–88, 2012.

LUTHRIA, D. L.; NATARAJAN, S. S. Influence of sample preparation on the assay of isoflavones. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 704–710, 2009.

MA, C. -Y. et al. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). **Food Research International**, v. 29, n. 8, p. 799–805, dez. 1996.

MALAYPALLY, S. P.; ISMAIL, B. Effect of protein content and denaturation on the extractability and stability of isoflavones in different soy systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 8958–8965, 25 ago. 2010.

MATHIAS, K. et al. Heat and pH effects on the conjugated forms of genistin and daidzin isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7495–7502, 4 out. 2006.

MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1254–1255, dez. 1992.

MO, H. et al. Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2418–2425, dez. 2013.

MOSCOSO OSPINA, Y. A.; PORFIRI, M. C.; CABEZAS, D. M. Soybean okara: Effect of ultrasound on compositional and emulsifying properties. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 57, n. 7, p. 3914–3923, 24 jul. 2022.

MULITERNO, M. M. et al. Conversion/degradation of isoflavones and color alterations during the drying of okara. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 512–519, 1 jan. 2017.

NEMITZ, M. C.; TEIXEIRA, H. F.; POSER, G. L. von. A new approach for the purification of soybean acid extract: Simultaneous production of an isoflavone aglycone-rich fraction and a furfural derivative-rich by-product. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 414–421, 1 maio 2015.

NIAMNUY, C. et al. Kinetic modelling of drying and conversion/degradation of isoflavones during infrared drying of soybean. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 946–952, 1 ago. 2012.

NINGTYAS, D. W.; HATI, S.; PRAKASH, S. Bioconversion and bioaccessibility of isoflavones from *sogurt* during *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, v. 343, 1 maio 2021.

O'SULLIVAN, J. et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 141–154, 1 fev. 2016.

PANANUN, T. et al. High-power ultrasonication-assisted extraction of soybean isoflavones and effect of toasting. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 199–207, jun. 2012.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978.

PEREIRA, D. G. et al. Enzymatic hydrolysis of okara protein concentrate by mixture of endo and exopeptidase. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 10, 1 out. 2019.

PREECE, K. E. et al. Confocal imaging to reveal the microstructure of soybean processing materials. **Journal of Food Engineering**, v. 147, p. 8–13, 2015.

PREECE, K. E. et al. Intensified soy protein extraction by ultrasound. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 113, p. 94–101, 2017a.

PREECE, K. E. et al. Pilot-scale ultrasound-assisted extraction of protein from soybean processing materials shows it is not recommended for industrial usage. **Journal of Food Engineering**, v. 206, p. 1–12, 1 ago. 2017b.

PREECE, K. E.; HOOSHYAR, N.; ZUIDAM, N. J. Whole soybean protein extraction processes: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 43, n. March, p. 163–172, 2017.

PRIVATTI, R. T. et al. Profile and content of isoflavones on flaked and extruded soybeans and okara submitted to different drying methods. **Food Chemistry**, v. 380, 30 jun. 2022.

PRIVATTI, R. T.; RODRIGUES, C. E. C. An overview of the composition, applications, and recovery techniques of the components of okara aimed at the biovalorization of this soybean processing residue. **Food Reviews International**, p. 1-24, 2021.

RAHMAN, M. M.; LAMSAL, B. P. Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, 1 mar. 2021.

RICKERT, D. A. et al. Effect of extraction pH and temperature on isoflavone and saponin partitioning and profile during soy protein isolate production. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, 2004.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 206–212, 1 jan. 2013.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. *In vitro* bioaccessibility of isoflavones from a soymilk-based beverage as affected by thermal and non-thermal processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 66, 1 dez. 2020.

ROSENTHAL, A.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K. Simultaneous aqueous extraction of oil and protein from soybean: Mechanisms for process design. **Food and Bioproducts Processing**, v. 76, n. 4, p. 224–230, 1998.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, n. 2, p. 119-128, 19 set. 2003.

SÁ, A. G. A.; MORENO, Y. M. F.; CARCIOFI, B. A. M. Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 20, p. 3367–3386, 12 nov. 2020.

SCHEIBER, M. D. et al. Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women. **Menopause**, v. 8, n. 5, p. 384–392, 2001.

SIMMONS, A. L. et al. Isoflavone retention during processing, bioaccessibility, and transport by Caco-2 cells: Effects of source and amount of fat in a soy soft pretzel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 49, p. 12196–12203, 12 dez. 2012.

SINGH, A. et al. Structural and functional analysis of various globulin proteins from soy seed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1491–1502, 2015.

SPERONI AGUIRRE, F. J.; MILESI, V.; AÑÓN, M. C. Effect of extraction and precipitation conditions during soybean protein isolate production on the genistein series content. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 3, p. 305–314, 8 mar. 2007.

SPERONI, F.; MILESI, V.; AÑÓN, M. C. Interactions between isoflavones and soybean proteins: Applications in soybean-protein-isolate production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1265–1270, out. 2010.

Capítulo IV

- STANOJEVIC, S. P. et al. Composition of proteins in okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9221–9228, 2012.
- TAKU, K. et al. Extracted or synthesized soybean isoflavones reduce menopausal hot flash frequency and severity. **Menopause**, v. 19, n. 7, p. 776–790, jul. 2012.
- TAO, X. et al. Effects of pretreatments on the structure and functional properties of okara protein. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 394–402, 1 maio 2019.
- TODA, T. A. et al. Evaluation of techniques for intensifying the process of the alcoholic extraction of coffee ground oil using ultrasound and a pressurized solvent. **Foods**, v. 11, n. 4, 1 fev. 2022.
- VAN DER RIET, W. B. et al. Food chemical investigation of tofu and its byproduct okara. **Food Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 193–202, 1989.
- VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161–169, abr. 2008.
- VISHWANATHAN, K. H.; SINGH, V.; SUBRAMANIAN, R. Influence of particle size on protein extractability from soybean and okara. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 3, p. 240–246, fev. 2011.
- VONG, W. C.; LIM, X. Y.; LIU, S-Q. Biotransformation with cellulase, hemicellulase and *Yarrowia lipolytica* boosts health benefits of okara. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 19, p. 7129–7140, 11 out. 2017.
- VONG, W. C.; LIU, S-Q. The effects of carbohydrase, probiotic *Lactobacillus paracasei* and yeast *Lindnera saturnus* on the composition of a novel okara (soybean residue) functional beverage. **LWT- Food Science and Technology**, v. 100, n. October 2018, p. 196–204, fev. 2019.
- WALSH, K. R. et al. Stability and bioaccessibility of isoflavones from soy bread during *in vitro* digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4603–4609, 30 jul. 2003.
- WANG, J. et al. Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. **Food Control**, v. 96, p. 128–136, 1 fev. 2019.
- WU, C. et al. Effect of cavitation jets on the physicochemical properties and structural characteristics of the okara protein. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 10, p. 4566–4576, 24 out. 2021.
- YADAV, R. B.; YADAV, B. S.; CHAUDHARY, D. Extraction, characterization and utilization of rice bran protein concentrate for biscuit making. **British Food Journal**, v. 113, n. 9, p. 1173–1182, 6 set. 2011.

Capítulo IV

YANG, H. et al. The ultrasound-treated soybean seeds improve edibility and nutritional quality of soybean sprouts. **Food Research International**, v. 77, p. 704–710, 1 nov. 2015.

YANG, X. et al. Effects of ultrasound pretreatment with different frequencies and working modes on the enzymolysis and the structure characterization of rice protein. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 19–28, 1 set. 2017.

YU, C. A.; YANG, C. Y. Effect of ultrasound on the extraction of bioactive aglycone isoflavones for the green valorization of black soybean residue (okara). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 7, 1 jul. 2019.

ZAYAS, J. F. **Functionality of proteins in food**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997.

ZHANG, H. J. et al. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 359–363, jul. 2012.

ZHANG, L. et al. Dual-frequency multi-angle ultrasonic processing technology and its real-time monitoring on physicochemical properties of raw soymilk and soybean protein. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 80, 1 dez. 2021.

ZHONG, Y.; ZHAO, Y. Chemical composition and functional properties of three soy processing by-products (soy hull, okara and molasses). **Quality Assurance and Safety of Crops and Foods**, v. 7, n. 5, p. 651–660, 2015.

2. CONCLUSÕES GERAIS

A importância deste trabalho está relacionada à valiosa contribuição para futuros desenhos experimentais relacionados a valorização de coprodutos agroindustriais, promovendo a circularidade na economia, bem como o desenvolvimento de produtos enriquecidos em biocompostos para as indústrias alimentícia e farmacêutica.

O objetivo principal desta tese foi atingido, visto que a viabilidade técnica para a extração de proteínas e isoflavonas do coproduto sólido gerado do processamento para a obtenção de extrato hidrossolúvel de soja, okara úmido, foi apresentada. Os estudos realizados reportaram uma gama de configurações experimentais para a extração das proteínas e isoflavonas, como também as características dos materiais proteicos extraídos que contribuem para possíveis aplicações destes. Ademais, este trabalho forneceu detalhes dos processos de extração que são aplicados para o isolamento dos componentes desse coproduto e sugeriu um protocolo tanto em termos de preparo do okara, quanto em relação ao número de estágios necessários para maximizar a extração e quantificação das isoflavonas. Neste contexto, a liofilização, quando comparada aos métodos de secagem em estufa de convecção forçada e sob vácuo, despontou como método de remoção da água mais adequado. Em adição, a remoção dos lipídios não se mostrou necessária e duas etapas de extração foram suficientes para a recuperação total das isoflavonas.

Como indicado pela revisão da literatura, a extração de proteínas foi conduzida em pH alcalino e em temperatura intermediária, visando preservar as isoflavonas. Tanto a literatura abordada quanto o estudo da influência dos pré-tratamentos térmicos sobre o conteúdo e perfil de isoflavonas mostraram que o contato com altas temperaturas ocasiona a degradação e/ou decomposição desses biocompostos, majoritariamente as formas glicosiladas.

De modo geral, um fator limitante para a extração da fração proteica do okara, assim como das isoflavonas, foi empregar o okara úmido para esse fim. No entanto, os pré-tratamentos de remoção de água e lipídios poderiam acarretar uma série de modificações nos componentes do okara, além de elevarem os custos para a reutilização desse material.

Os períodos de 15 minutos de UAE e 30 minutos de extração convencional favorecem a extração das proteínas e isoflavonas comparado a 60 minutos. A configuração em 2 estágios de extração convencional de 30 minutos em correntes cruzadas, combinando os solventes (1º estágio empregando água+solução de NaOH 2 N e 2º estágio utilizando solução salina de MgCl₂ 0,05 M+solução de NaOH 2 N) propiciou a obtenção de material contendo 248 µg de daidzeína e 236 µg de genisteína por g de material proteico de okara. Também foi observado um ganho de 3 % na extração da fração proteica do okara úmido, possivelmente relacionado ao

aumento da extração de globulinas 7S. Alto nível de purificação dos materiais proteicos obtidos foi alcançado empregando três lavagens etanólicas (etanol:água, 60:40 em massa).

O emprego do ultrassom despontou como uma ferramenta promissora para o enriquecimento das proteínas de okara, uma vez que proporcionou ganhos na extração de isoflavonas, especialmente a classe das agliconas, indicando que a sonicação possivelmente acarretou conversões de classes de IFs glicosiladas (malonil, acetil e β -glicosídeos) na forma ativa destes biocompostos (agliconas). Os maiores níveis de isoflavonas agliconas (4208 ± 108 μg de daidzeína e 3156 ± 179 μg de genisteína por g de proteína de okara) foram alcançados empregando um estágio de tratamento ultrassônico (20 kHz, 240 W) por 15 minutos. Ademais, estes materiais recuperados do okara apresentaram boa qualidade em termos nutricionais, na medida em que após a digestão *in vitro*, 93 % e 23 % das proteínas e isoflavonas agliconas, respectivamente, permaneciam acessíveis para serem absorvidas pelo organismo humano.

As propriedades funcionais dos materiais proteicos extraídos foram distintamente afetadas pelas diferentes condições de extração avaliadas neste trabalho. O tratamento ultrassônico combinado com a extração convencional favoreceu as propriedades emulsificantes, tanto em relação ao potencial de formação quanto em termos de estabilidade da emulsão. Por outro lado, dois estágios de extração convencional em correntes cruzadas empregando somente água+solução de NaOH 2 N como solvente, possibilitaram as melhores propriedades de formação de espuma e higroscopicidade, enquanto a espuma mais duradoura (60 minutos) e a maior absorção de óleo foram propiciados pela extração convencional em único estágio utilizando água+solução de NaOH 2 N. A solução salina de MgCl_2 0,05 M preservou a coloração dos materiais proteicos extraídos do okara, em contrapartida, o tratamento ultrassônico acentuou o escurecimento destes. Também ressalta-se que os sólidos remanescentes das extrações possuem características tecnológicas atrativas, em termos de capacidades de absorção de água e óleo, possibilitando seu reaproveitamento em produtos de panificação e/ou cárneos, por exemplo.

Assim, os resultados alcançados por esta tese evidenciam o potencial do okara como fonte de proteínas e isoflavonas trazendo metodologias viáveis e alternativas para a extração conjunta destes compostos, indicando protocolos que permitem maior aproveitamento dos componentes do okara. Complementarmente, traz uma gama de informações, em termos de funcionalidades, qualidade e coloração que facilitam futuras aplicações, inclusive do material residual da extração de proteínas e isoflavonas.

3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Suplementarmente a este trabalho, visando o reaproveitamento dos micro e macronutrientes contidos no okara, os trabalhos futuros podem ser conduzidos nas seguintes vertentes:

- Avaliação do emprego de diferentes sais e concentrações para a recuperação das proteínas e isoflavonas;
- Outros métodos de intensificação do processo de extração das proteínas, tais como extração assistida por ultrassom de alta intensidade e extração por líquido pressurizado, afim de facilitar a liberação dos compostos da matriz do okara;
- Pesquisas abordando a biodisponibilidade e o efeito biológico *in vivo* das isoflavonas agliconas recuperadas;
- Extração da fração lipídica contida nos sólidos remanescentes do processo de recuperação das proteínas e isoflavonas.

4. MEMORIAL DA PÓS-GRADUAÇÃO

DOUTORADO

Artigos publicados em periódicos internacionais

PRIVATTI, R. T.; CAPELLINI, M. C.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; RODRIGUES, C. E.C. Profile and content of isoflavones on flaked and extruded soybeans and okara submitted to different drying methods. **Food Chemistry**, v. 380, p. 132168, 2022.

PRIVATTI, R. T.; RODRIGUES, C. E. C. An overview of the composition, applications, and recovery techniques of the components of okara aimed at the biovalorization of this soybean processing residue. **Food Reviews International**, 192648. p. 1-24, 2021.

Trabalhos completos e Resumos publicados em anais de congressos

PRIVATTI, R. T.; CAPELLINI, M. C.; THOMAZINI, M.; RODRIGUES, C. E. C. Impacto do método de secagem na quantificação de isoflavonas do resíduo da produção de extrato hidrossolúvel de soja (okara). In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Química (23º COBEQ), 2021, Gramado.

PRIVATTI, R. T.; CAPELLINI, M. C.; RODRIGUES, C. E. C. Influência do tipo de solvente e temperatura na solubilidade proteica do okara. In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Química (23º COBEQ), 2021, Gramado.

SOUZA, I. C. R.; JUNQUEIRA, I. G.; **PRIVATTI, R. T.;** RODRIGUES, C. E. C. Obtenção de óleo do resíduo da produção de extrato hidrossolúvel de soja (okara) utilizando solvente alcoólico. In: 29º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 2021, Virtual.

PRIVATTI, R. T.; CAPELLINI, M. C.; RODRIGUES, C. E. C. Recuperação de proteínas de okara empregando extração assistida por ultrassom. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2020, Virtual.

CAPELLINI, M. C.; **PRIVATTI, R. T.**; RODRIGUES, C. E. C. Extração e quantificação de isoflavonas em soja submetida a diferentes pré-tratamentos industriais. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2020, Virtual.

PRIVATTI, R. T.; CAPELLINI, M. C.; RODRIGUES, C. E. C. Characterization of the by-product of soybean water soluble extract production (okara). In: 13º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2019, Campinas.

Apresentação oral em anais de congressos

PRIVATTI, R. T.; VISIOLI, P. C. F.; RODRIGUES, C. E. C. Orquestra invertida: discentes como maestros da aprendizagem In: I Workshop do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), Pirassununga, SP, 2022.

PRIVATTI, R. T.; CAPELLINI, M. C.; RODRIGUES, C. E. C. Influência da extração assistida por ultrassom na recuperação concomitante de proteínas e isoflavonas de okara. In: V Simpósio da Pós-Graduação e III Encontro da Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), Pirassununga, SP, 2022.

Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) junto às seguintes disciplinas:

ZEA 0865 – Operações Unitárias III, sob supervisão da Profa. Dra. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues (2º semestre de 2022, participação como bolsista).

ZEA 0361 - Fundamentos de Engenharia de Alimentos, sob supervisão da Profa. Dra. Cintia Bernardo Gonçalves (*in memoriam*) (1º semestre de 2020, participação como voluntária).

ZEA 0865 – Operações Unitárias III, sob supervisão da Profa. Dra. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues (2º semestre de 2018, participação como voluntária).

MESTRADO**Artigos publicados em periódicos**

GONCALVES, A. C. S.; ROMA JUNIOR, L. C.; **PRIVATTI, R. T.**; SALLES, M. S. V.; PAZ, C. C. P.; ZADRA, L. E. F.; VIDAL, A. M. C. Somatic cell count obtained by Ekomilk Scan® and correlations with other methods of analysis. **Ciência Rural**, v. 48, p. 1-8, 2018.

Trabalhos completos e Resumos publicados em anais de congressos

PRIVATTI, R. T.; SANTOS, G. S.; CHANG, A.; VAZ, A. C. N.; BALIEIRO, J. C. C.; VIDAL, A. M. C.; SARAN NETTO, A. Influence of the total bacterial count on the raw milk composition. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu.

PRIVATTI, R. T.; SANTOS, G. S.; CHANG, A.; CANDIDO, M.; VAZ, A. C. N.; BALIEIRO, J. C. C.; VIDAL, A. M. C.; SARAN NETTO, A. Effect of the total bacterial count of the raw milk on the minas frescal cheese quality. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu.

CANDIDO, M.; GODOY, S. H. S.; **PRIVATTI, R. T.**; ALMEIDA-QUEIROZ, S. R.; BUZINARO, M. G.; LIVONESI, M. C.; FERNANDES, A. M.; SOUSA, R. L. M. Detection and molecular characterization of bovine enterovirus in Brazil: four decades of the first report. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu.

PRIVATTI, R. T.; SARAN NETTO, A. Análise de metodologias para verificação dos efeitos da CBT do leite cru refrigerado sobre a qualidade, rendimento e *shelf-life* do queijo Minas Frescal. In: III Simpósio de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), 2016, Pirassununga, SP.

PRIVATTI, R. T.; SARAN NETTO, A. Efeitos da CBT do leite cru refrigerado sobre os parâmetros físico-químicos, rendimento e vida de prateleira do queijo tipo Minas Frescal. In: II Simpósio de Pós-Graduação e 2º Encontro de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), 2015, Pirassununga, SP.

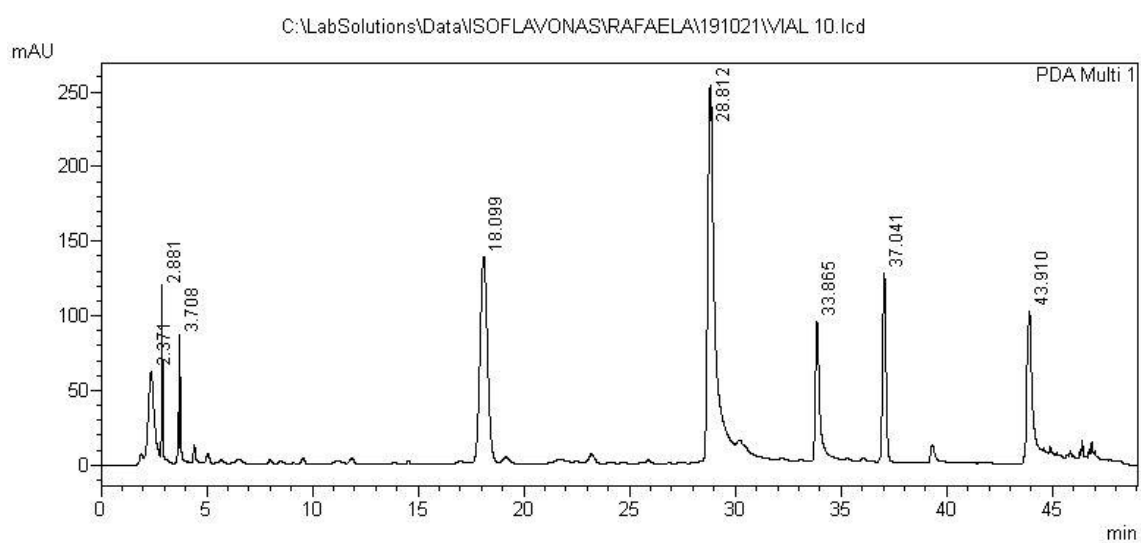
Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) junto às seguintes disciplinas:

ZMV1390 - Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados e Mel, sob supervisão da Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal (1º semestre de 2016, participação como bolsista).

APÊNDICE A

A Figura A1 ilustra o cromatograma dos padrões de daidzina, genistina, daidzeína e genisteína, nos tempos de retenção de 18,09; 28,81; 37,04 e 43,91 minutos, respectivamente.

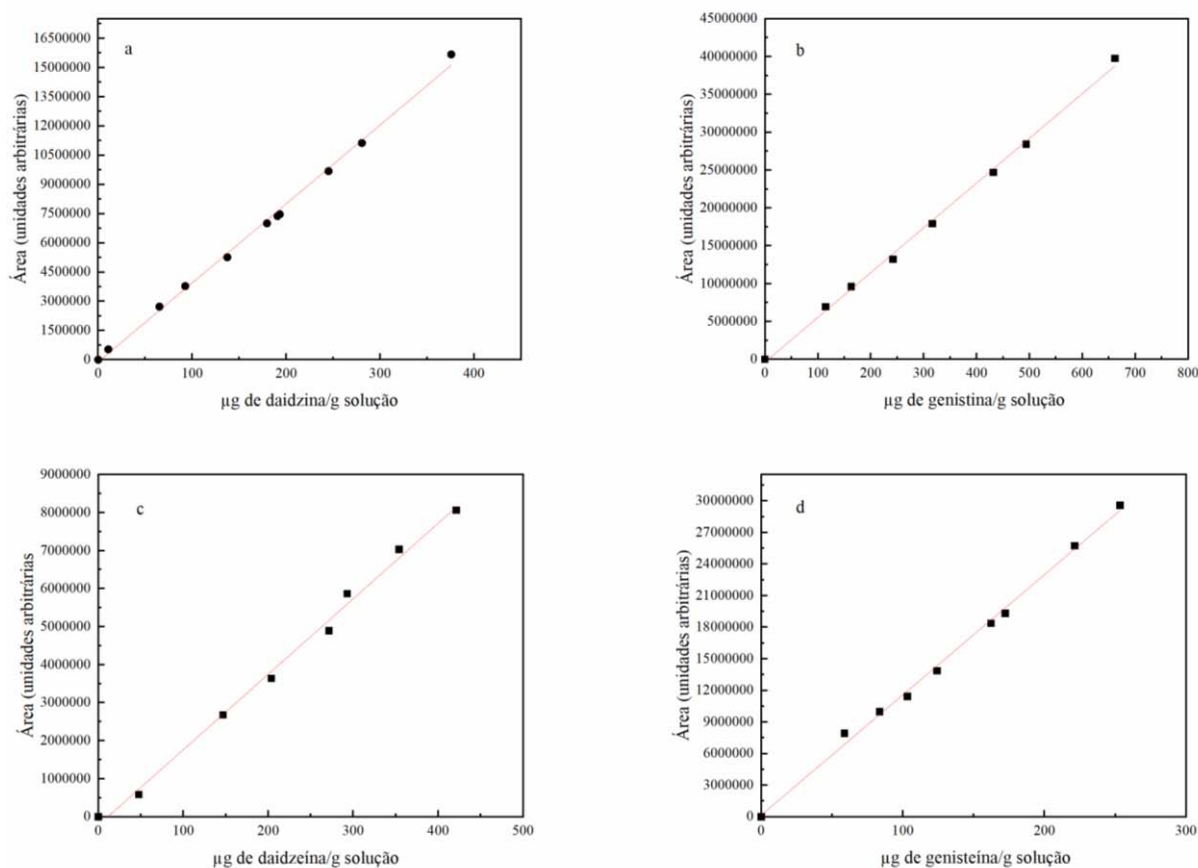
Figura A1. Cromatograma dos padrões de daidzina (376 µg/g de solução), genistina (432 µg/g de solução), daidzeína (87 µg/g de solução) e genisteína (103 µg/g de solução).



Fonte: Própria autoria.

A Figura A2 apresenta as curvas de calibração para: (a) daidzina, (b) genistina, (c) daidzeína e (d) genisteína, as quais relacionam as áreas dos picos, obtidas a partir de diluições da solução estoque contendo as seguintes concentrações: 687 μg daidzina, 1210 μg genistina, 421 μg daidzeína e 621 μg genisteína por grama de solução de estoque.

Figura A2. Curvas de calibração para determinação de IFs. (a) daidzina (coeficiente de determinação $R^2 = 0,996$); (b) genistina ($R^2 = 0,997$); (c) daidzeína ($R^2 = 0,993$) e (d) genisteína ($R^2 = 0,996$).



Fonte: Própria autoria.

As Equações A1, A2, A3 e A4 são originárias da regressão linear sem resíduos dos dados apresentados nas curvas de calibração supramencionadas para cada IF, onde a concentração de cada IF é expressa em μg de IF/ g solução.

$$\text{Área} = 40084,64306 * \text{Concentração de daidzina} \quad (\text{Equação A1})$$

$$\text{Área} = 58334,9568 * \text{Concentração de genistina} \quad (\text{Equação A2})$$

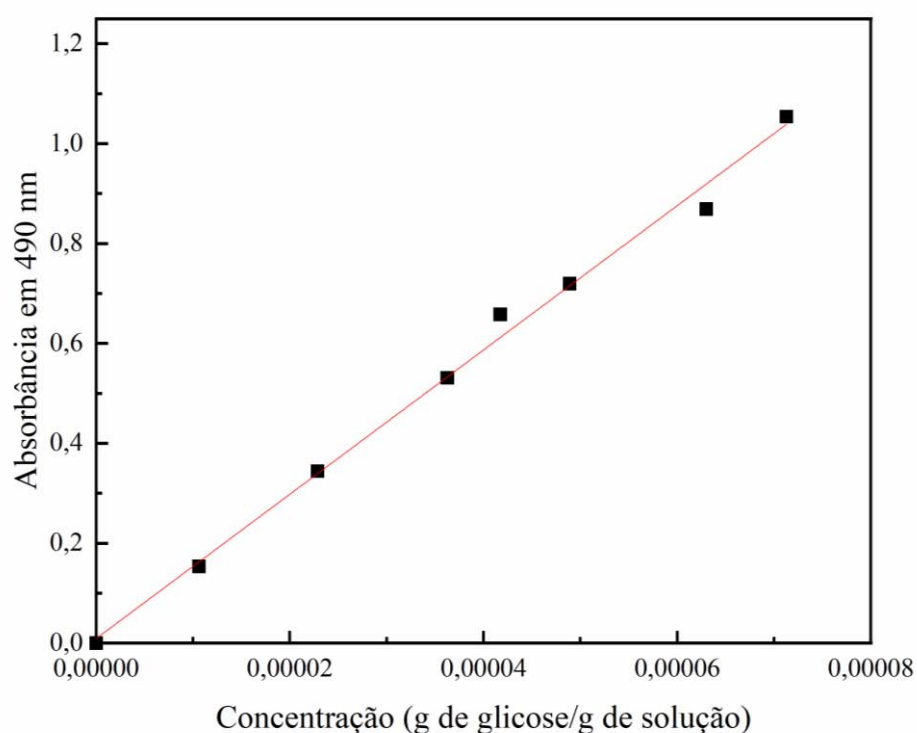
$$\text{Área} = 19131,43253 * \text{Concentração de daidzeína} \quad (\text{Equação A3})$$

$$\text{Área} = 115158,6846 * \text{Concentração de genisteína} \quad (\text{Equação A4})$$

APÊNDICE B

A Figura B1 apresenta a curva de calibração para glicose, expressa como absorvância em função da concentração de glicose. Soluções com diferentes concentrações de glicose foram obtidas a partir de diluições em água de uma solução mãe de concentração de 10,1 mg glicose/g solução.

figura B1. Curva de calibração para glicose (coeficiente de determinação $R^2= 0,994$), a 490 nm.

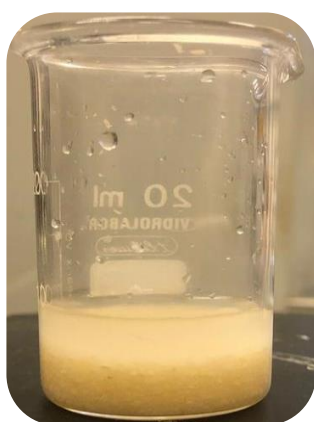


Fonte: Própria autoria.

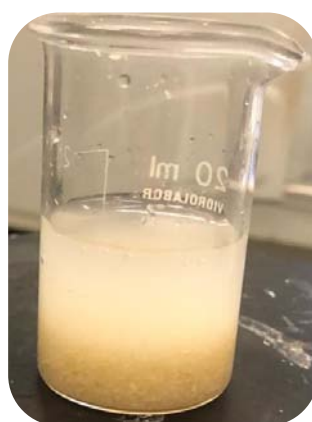
A Equação B1 é originária da regressão linear sem resíduos dos dados apresentados na curva de calibração supramencionada. Os carboidratos solúveis foram expressos em g de glicose/g de solução.

$$\text{Absorvância} = 14624,497 * \text{Concentração de glicose} \quad (\text{Equação B1})$$

Figura B2. Diferentes razões sólido: solvente para a extração de proteínas e IFs a partir de okara úmido (WO).



1:15 (m/m, sólido
seco:solvente)



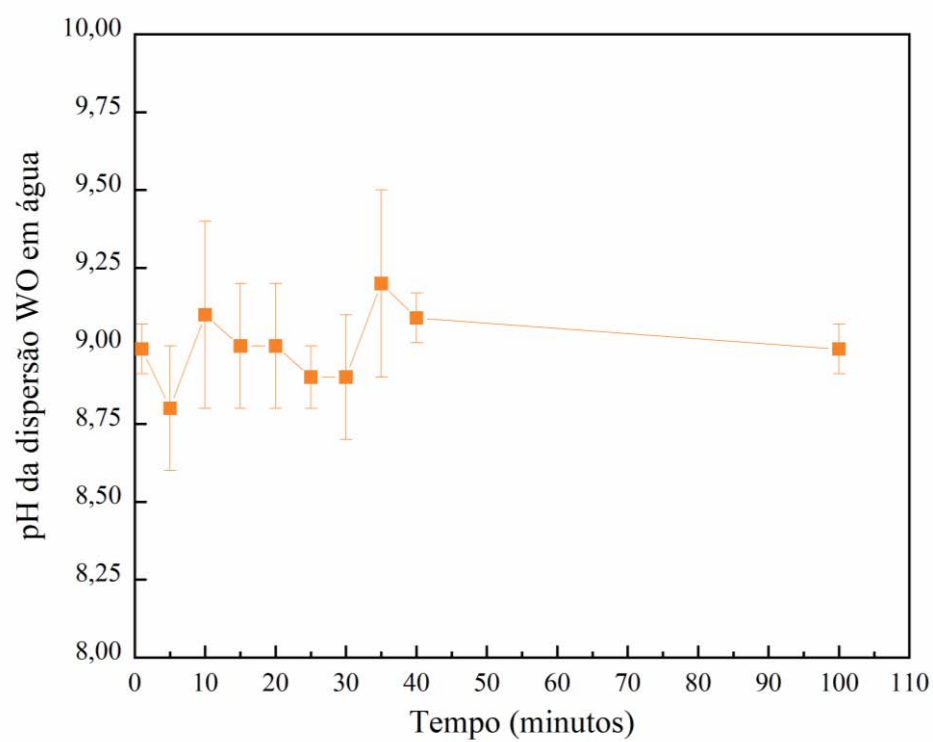
1:25 (m/m, sólido
seco:solvente)



1:35 (m/m, sólido
seco:solvente)

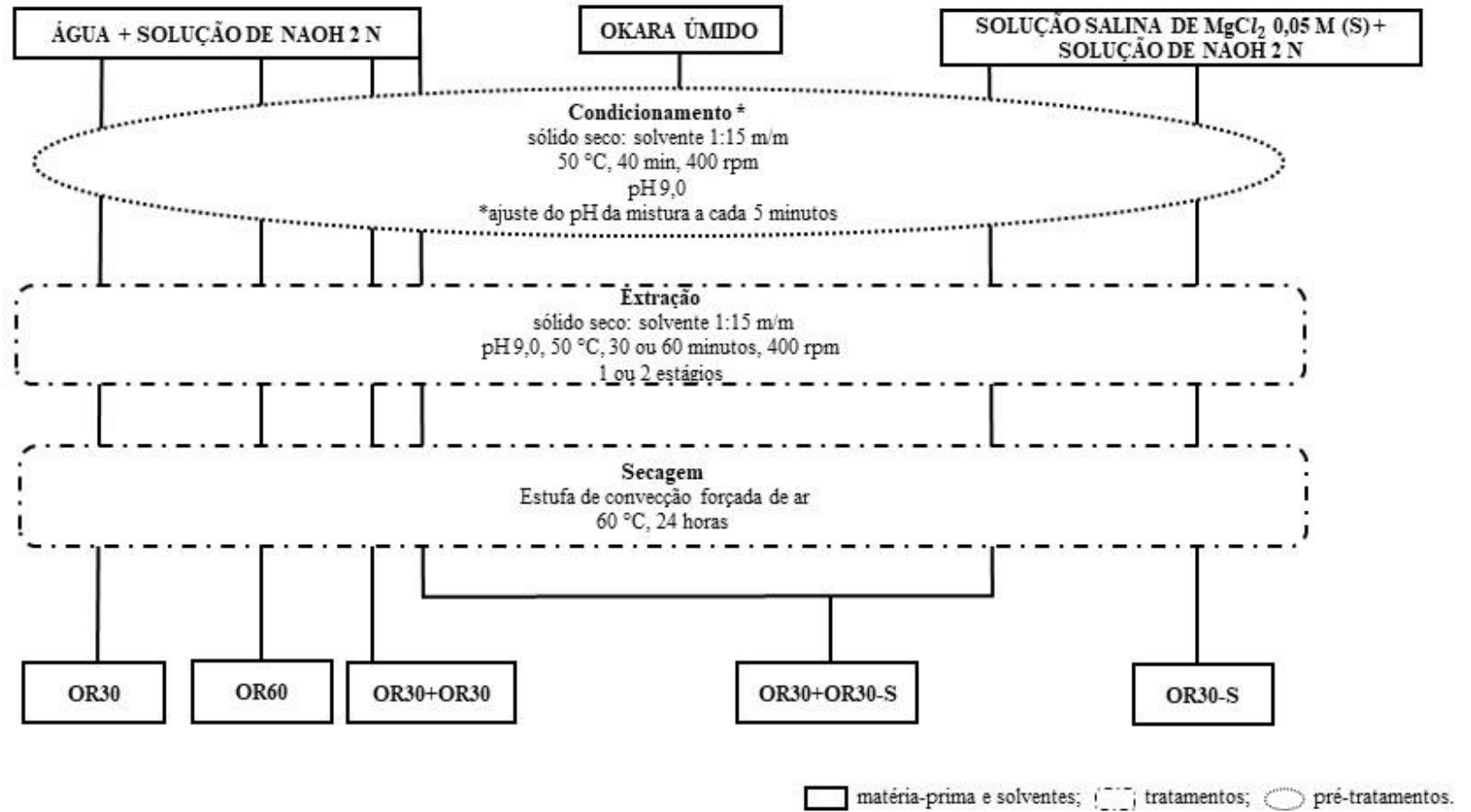
Fonte: Própria autoria.

Figura B3. Avaliação do período de condicionamento para estabilização do pH da mistura WO + solvente (1:15 sólido seco:solvente, m/m), a 50 °C, sob agitação constante (400 rpm).



Fonte: Própria autoria.

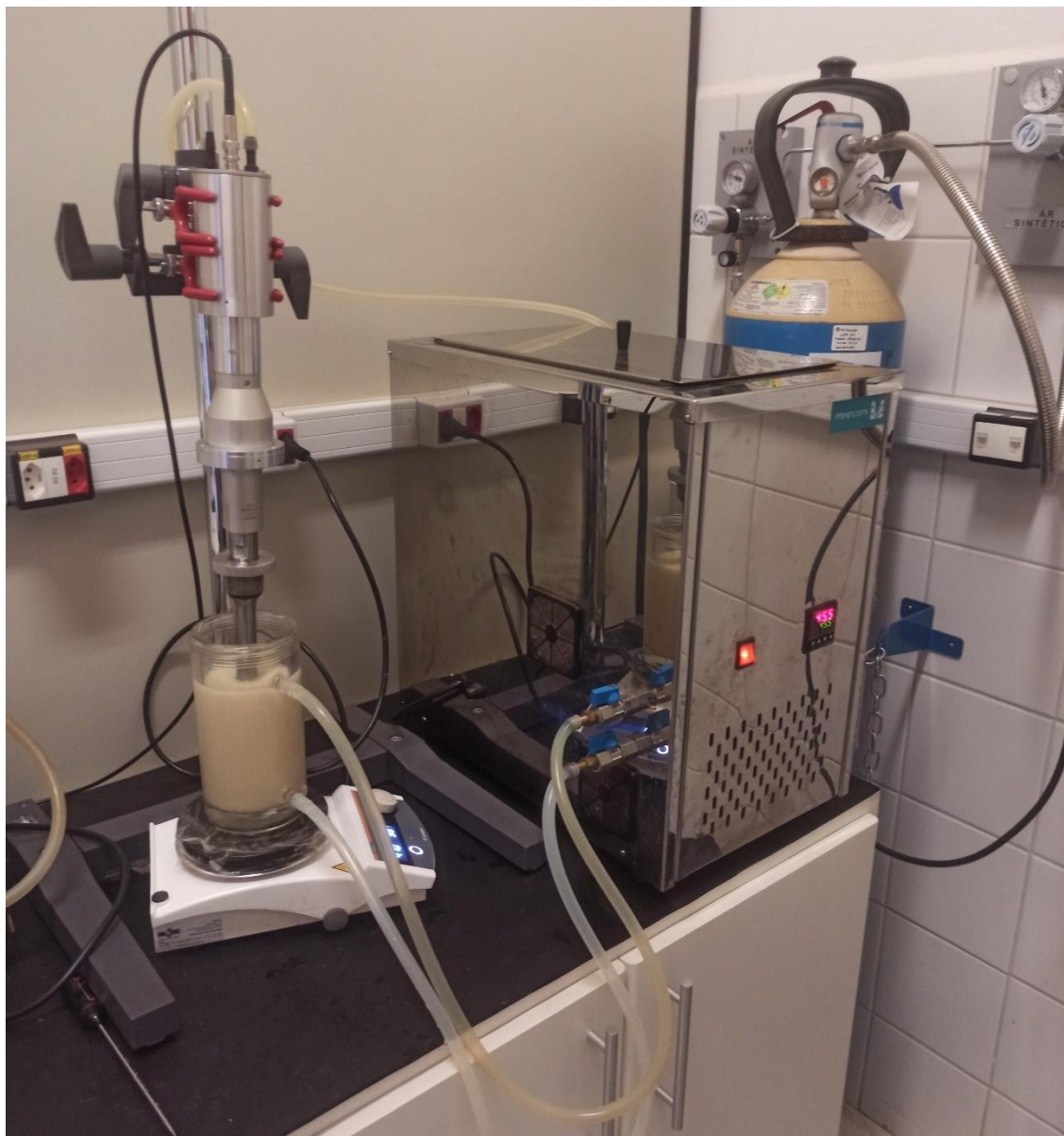
Figura B4. Configuração experimental para a obtenção dos ORs a partir de WO.



Fonte: Própria autoria.

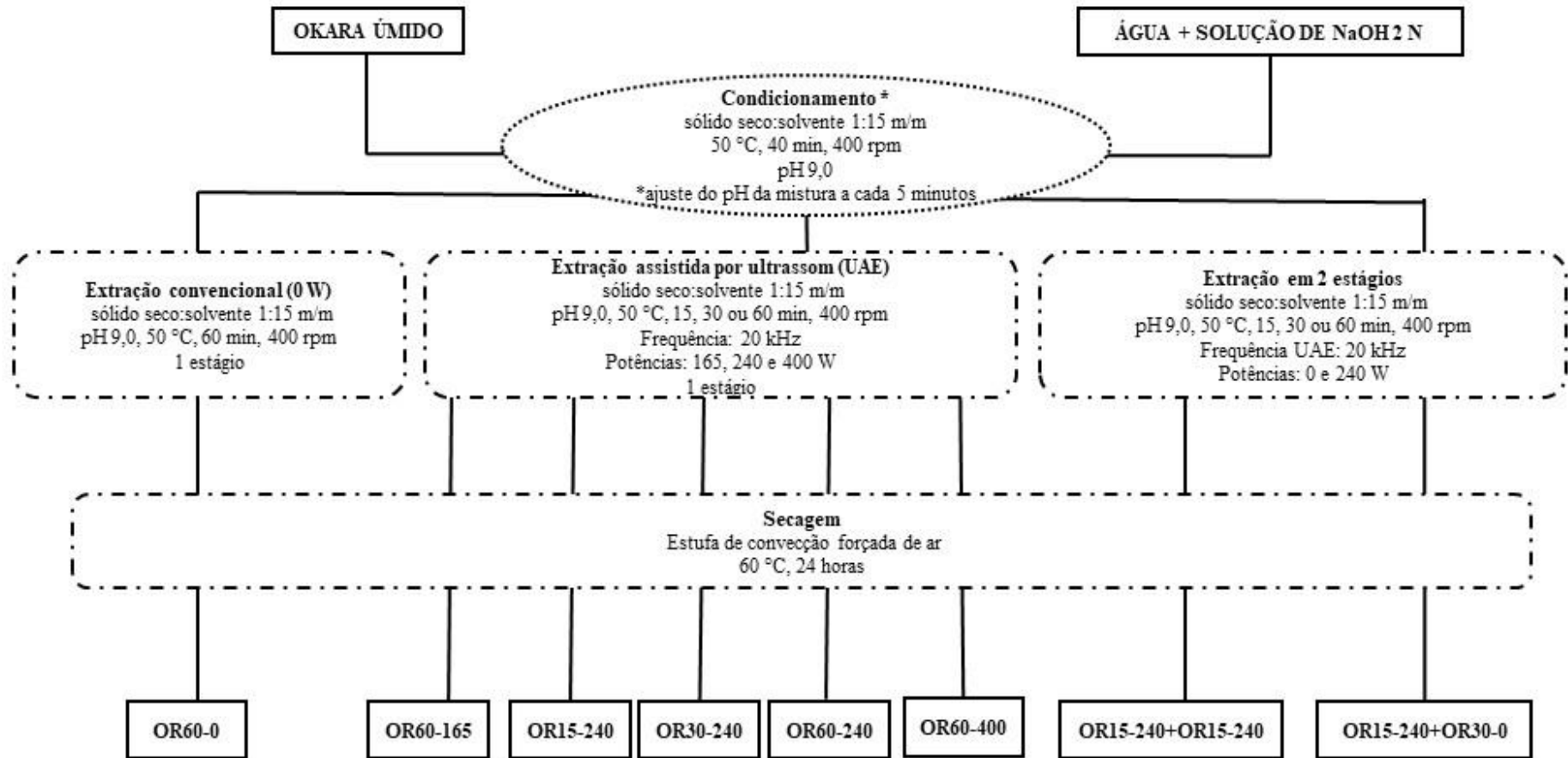
APÊNDICE C

Figura C1. Sistema UAE em célula encamisada de vidro *pyrex*, conectada a banho termostático, com agitação magnética.



Fonte: Própria autoria.

Figura C2. Configuração experimental para a obtenção dos ORs, via UAE, a partir de WO.



□ matéria-prima, solvente e produtos obtidos; [---] tratamentos; ○ pré-tratamento.

Fonte: Própria autoria.

Tabela C1. Capacidades de absorção de água (WHC) e óleo (OHC) dos refinados de okara (ORs) obtidos após extração assistida por ultrassom (UAE), em função da intensidade de potência (0, 165, 240 e 400 W); do tempo de tratamento ultrassônico (15, 30 ou 60 minutos) e do número de estágios, 1 ou 2 em configuração de correntes cruzadas.

Estágios	Tratamentos	WHC	OHC
		g água/g OR	g óleo/g OR
1	OR60-0	2,485 ± 0,008 ^c	0,856 ± 0,006 ^b
	OR60-165	2,94 ± 0,04 ^b	1,21 ± 0,05 ^a
	OR15-240	3,8 ± 0,4 ^a	0,86 ± 0,03 ^b
	OR30-240	2,7 ± 0,1 ^{bc}	0,9 ± 0,2 ^b
	OR60-240	2,69 ± 0,01 ^{bc}	1,06 ± 0,04 ^{ab}
	OR60-400	2,681 ± 0,007 ^{bc}	0,86 ± 0,02 ^b
2	OR15-240+OR15-240	3,768 ± 0,005 ^a	0,87 ± 0,02 ^b
	OR15-240+OR30-0	3,9 ± 0,2 ^a	0,96 ± 0,03 ^b

OR60-0 = refinados de okara obtidos via extração convencional (0 W) por 60 minutos, em estágio único; OR60-165 = refinados de okara obtidos via UAE (20 kHz, 165 W) por 60 minutos, em estágio único; OR15-240 = refinados de okara obtidos via UAE (20 kHz, 240 W) por 15 minutos, em estágio único; OR30-240 = refinados de okara obtidos via UAE (20 kHz, 240 W) por 30 minutos, em estágio único; OR60-240 = refinados de okara obtidos via UAE (20 kHz, 240 W) por 60 minutos, em estágio único; OR60-400 = refinados de okara obtidos via UAE (20 kHz, 400 W) por 60 minutos, em estágio único; OR15-240+OR15-240 = refinados de okara obtidos via UAE (20 kHz, 240 W) por 15 minutos, em 2 estágios em correntes cruzadas e OR15-240+OR30-0 = refinados de okara obtidos em 2 estágios em correntes cruzadas, sendo o 1º estágio por meio de UAE (20 kHz, 240 W) por 15 minutos e o 2º estágio empregando extração convencional (0 W) por 30 minutos.

Resultados expressos como média ± desvio padrão de, no mínimo 2 repetições.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança pelo Teste de Duncan.

Fonte: Própria autoria.