UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MIRIAN MEGUMI SAWADA

**Estudo da viabilidade técnica da substituição de hexano por etanol
no processo de extração de óleo de soja: cinética de extração e
índices de qualidade**

Pirassununga

2012

MIRIAN MEGUMI SAWADA

**Estudo da viabilidade técnica da substituição de hexano por etanol
no processo de extração de óleo de soja: cinética de extração e
índices de qualidade**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

Pirassununga

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

S271e	<p>Sawada, Mirian Megumi</p> <p>Estudo da viabilidade técnica da substituição de hexano por etanol no processo de extração de óleo de soja: cinética de extração e índices de qualidade / Mirian Megumi Sawada. -- Pirassununga, 2012. 128 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.</p> <p>Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues.</p> <p>1. Extração sólido-líquido 2. Proteínas 3. Solvente biorenovável 4. Solubilidade 5. Ácidos graxos livres. I. Título.</p>
-------	---

AGRADECIMENTOS

Quando comecei a escrever estes agradecimentos, meus pensamentos retornaram ao final do ano de 2009, onde esta jornada se iniciou. Descobri que são muitas as pessoas que fizeram parte da minha vida, principalmente nestes 3 anos, as quais gostaria de agradecer. Considero-me uma pessoa de sorte por estar cercada de tanta gente maravilhosa e que me ajudaram muito de forma direta ou indireta! *“É impossível ser feliz sozinho!”*

Espero não esquecer ninguém... vamos lá..!

Primeiramente, agradeço a *Deus* pela vida maravilhosa, pelas pessoas e momentos únicos, e por me guiar nos momentos de dificuldade. *“Deus só coloca obstáculos em seu caminho, pois ele sabe da sua capacidade de ultrapassá-los”.*

À minha Família: meus pais, *Mário e Hatsumi*, e meu irmão, *Hideki*, pelo apoio e pelos sacrifícios realizados para que eu chegasse até aqui. Avôs (*in memoriam*) e avós, tios e tias, primos e primas... Muito obrigada pelo apoio!

Ao meu amado noivo *João Victor*, por toda confiança em mim, pela paciência (nunca conheci alguém tão paciente...!), pelo apoio e incentivo... Pelo seu amor indispensável!

À minha querida orientadora, *Profa. Dra. Christianne E. C. Rodrigues* pela oportunidade e confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos e conselhos, pelos puxões de orelha essenciais ao meu amadurecimento e pela amizade. Gostaria de expressar aqui, não só meu agradecimento, mas também a felicidade e orgulho de ter sido uma de suas orientadas.

Ao *Prof. Dr. Rogers Ribeiro* pelo incentivo e oportunidade oferecidos no início desta etapa.

Ao *Prof. Dr. Walter F. Velloso Jr.* e à *Profa. Dra. Samantha Pinho*, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos supervisores do PAE, *Prof. Dr. César G. Lima* e *Prof. Dr. Gelson J. A. Conceição*, pela oportunidade de aprendizado e ensinamentos.

Aos professores membros da banca examinadora, pela participação e contribuição para o enriquecimento desta dissertação.

À toda equipe do LES, em especial, *Keila, Juliane, Tatiane e Larissa*, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. E à *Carol* e ao *Daniel* que se tornaram grandes amigos e fizeram do laboratório um ambiente muito agradável de trabalho.

À irmã que a vida me permitiu escolher, *Cristina*. Muito obrigada por nossas conversas, pelos conselhos e por estar sempre presente!

Às companheiras de república durante o mestrado: *Diane* e *Adja*, e mais ao final *Taíse*.
Obrigada por me aturarem, vocês são demais!!!

Aos responsáveis dos laboratórios: *Marcelo Thomazini*, do LAPROF; *Nilson Ferreira*, do LTAPPN; *Roseli Lacerda*, do Lab. Bromatologia; *Graziani Correa*, do LTSE; *Tatiana Sanches*, do LBA; *Edinelí Quintero*, do Lab. OP e FT. Obrigada pela ajuda em geral, análises e empréstimos de equipamentos. Um agradecimento especial a *Ana Monica Bittante*, do LTA, pela grande ajuda nas análises de DSC.

À todos os amigos da Pós, em especial, *Keli*, *Débora*, *Camila*, *Josi*, *Grazi*, *Eli*, *Volnei*, *Paulinha*, *Talitinha*, *Fernando*, *Mariana C.*, *Sarah*, *Naty*, *Mariana K*. Obrigada pelos momentos de alegria e descontração!

Às minhas queridíssimas amigas da graduação, *Renata* e *Mariana*, e as de muitos e muitos anos (rs)... *Lika*, *Harumi*, *Erika* e *Yumiko*. Obrigada pela amizade e por compartilharem comigo os bons momentos de nossas vidas!

À *sensei Toshie Kawazoe*, por sempre me apoiar e compreender os momentos em que tive que me ausentar no Grupo Minbu.

À toda comunidade da FZEA/USP, professores, alunos e funcionários, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

À Granol pela matéria-prima essencial para execução deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de mestrado e fomento a pesquisa concedidos.

Obrigada à você que se interessou e está lendo o meu trabalho agora...!!!

Muito Obrigada!

"Research is what I'm doing when I don't know what I'm doing!"

Wernher von Braun

"A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, sincera e honesta, transformam-se em oportunidades."

Maxwel Malts

RESUMO

SAWADA, M. M. **Estudo da viabilidade técnica da substituição de hexano por etanol no processo de extração de óleo de soja: cinética de extração e índices de qualidade.** 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O emprego de solventes no processo de obtenção de óleos de sementes oleaginosas é um processo amplamente empregado, sendo o hexano o solvente tradicionalmente adotado. O objetivo principal desta dissertação de mestrado foi avaliar a viabilidade da substituição do hexano por etanol no processo de extração de óleo de soja. A utilização de etanol apresenta vantagens bastante atrativas como: menor toxicidade, boa segurança operacional além deste ser obtido de fonte biorenovável. A produção de etanol em larga escala no Brasil torna, ainda, o processo vantajoso do ponto de vista econômico, além de ser um solvente facilmente recuperado para posterior reutilização no processo devido às suas características físico-químicas. Desta forma, neste trabalho foram realizados experimentos de cinética de extração e experimentos de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio, nos quais foram avaliadas as variáveis: temperatura (40 a 90 °C) e hidratação do solvente (0 a 12%). Através da execução destes experimentos e a avaliação estatística dos resultados foi possível determinar os rendimentos de óleo e proteína, monitorar o comportamento dos compostos minoritários (ácidos graxos livres) e da água presente na matéria-prima, avaliar a qualidade da fração proteica resultante do processo de extração, além da composição química dos óleos obtidos. Assim, os resultados mostraram que o aumento do teor de água no etanol suprimiu fortemente a extração de óleo enquanto que a elevação da temperatura favoreceu a extração. Já a proteína exibiu um comportamento contrário ao óleo, sendo que o aumento da hidratação do solvente elevou a extração destes compostos e o aumento da temperatura diminuiu o teor de proteínas na fase extrato. Quanto à hidratação da fase extrato, pôde-se notar que esta foi independente da temperatura e que existe um equilíbrio entre a umidade do sólido e o nível de hidratação do etanol. A elevação da temperatura também aumentou a extração de ácidos graxos livres e a avaliação do perfil químico e da composição em AGL dos óleos obtidos via etanol mostrou que estes apresentaram composição típica de óleo de soja, independente da condição adotada. A qualidade da fração proteica resultante da extração do óleo, avaliada na forma de solubilidade de nitrogênio e análise térmica (DSC), mostrou que a proteína também foi fortemente influenciada pela presença da água no solvente e pelo aumento da temperatura, apresentando menores valores de solubilidade conforme o aumento do teor de água no etanol e da temperatura do processo. Diante dos resultados, pode-se inferir que é viável tecnicamente a utilização de etanol no processo de extração de óleo de soja, no entanto as condições de hidratação do solvente e temperatura devem ser consideradas devido à influência destas sobre as características da fração proteica do farelo desengordurado.

Palavras-chave: Extração sólido-líquido; proteínas; solvente biorenovável; solubilidade; ácidos graxos livres.

ABSTRACT

SAWADA, M. M. **Study of technical feasibility of replacement of hexane by ethanol in soybean oil extraction process: kinetics of extraction and indexes of quality.** 2012. 128 p. M. Sc. Dissertation – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2012.

The use of solvents in the extraction of oil from oilseeds is a widely employed process and the hexane is the solvent traditionally adopted. The aim of this work was to evaluate the feasibility of replacing hexane by ethanol in the soybean oil extraction process. The use of ethanol has very attractive advantages such as: low toxicity, good operational security, as well as being obtained from a biorenewable source. The large scale production of ethanol in Brazil also makes the process advantageous from the economics point of view, besides being a solvent easily recovered for reuse in the process due to its physicochemical characteristics. Thus, in this work were performed experiments of kinetics of extraction and experiments of solid-liquid extraction in equilibrium condition in which the variables evaluated were: temperature (ranging from 40 to 90 °C) and solvent hydration (0 to 12% of water). The accomplishment of these experiments and the statistical evaluation of the results made possible to determine the yields of oil and protein, monitor the behavior of minor compounds (free fatty acids) and of the water present in raw material, evaluate the quality of the protein fraction resulting from oil extraction process, and the chemical composition of the extracted oils. Then, the results showed that increasing in water content of ethanol suppresses strongly the extraction of oil while the increase of temperature increases the extraction. About protein, it exhibits an opposite behavior to the oil, with the rise in water content of the solvent increasing the extraction of such compounds and the rise of temperature decreases in the protein content of extract phase. Regarding the hydration of the extract phase, it can be seen that this is temperature independent and that there is equilibrium between the solid matrix and the moisture level of the solvent ethanol. The increase in temperature also increases the extraction of free fatty acids and the evaluation of the chemical profile and composition in FFA of oils obtained via ethanol showed that they had typical composition of soybean oil, regardless the condition adopted. The quality of the protein fraction resulting from oil extraction evaluated as nitrogen solubility and thermal analysis (DSC) showed that the protein is also strongly influenced by the presence of water in the solvent and by increasing the temperature, with lower values of solubility with increasing water content in the ethanol and the process temperature. From the results, it can be inferred that it is technically feasible to use ethanol in the soybean oil extraction process, however hydration conditions of the solvent and temperature must be considered due to the influence of these on the protein fraction characteristics of the defatted meal.

Key-words: Solid-liquid extraction; proteins; biorenewable solvent; solubility; free fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Etapas do processamento da soja a óleo bruto e farelo (Adaptado de Anderson, 2005).....	24
Figura 3.2 - Esquema de extrator sólido-líquido configurado em contracorrente (E_i = Fase extrato proveniente do estágio i ; R_i = Fase refinado proveniente do estágio i ; F = alimentação (soja); S = solvente).	26
Figura 4.1 - Procedimento para obtenção de dados de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio (40 a 60 °C) e cinética de extração de óleo de soja.	47
Figura 4.2 - Esquema do extrator utilizado para obtenção dos dados de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio (70 a 90 °C).	48
Figura 4.3 - (a) Extrator confeccionado em aço inox. (b) Detalhe do cesto utilizado para acomodação do farelo.	48
Figura 4.4 - Esquema de extração sólido-líquido em corrente cruzada.	49
Figura 5.1 - Soja expandida Granol: (a) <i>in natura</i> ; (b) tamanhos de partículas entre <i>mesh</i> 10 e 14.....	56
Figura 5.2 - Teor de água na fase extrato como função da temperatura. □ Etanol com 0% de água; ○ Etanol com 6% de água; △ Etanol com 12% de água. Água em % mássica.	62
Figura 5.3 - Rendimento da extração de óleo de soja como função da temperatura. □ Etanol com 0% de água; ○ Etanol com 6% de água; △ Etanol com 12% de água. Água em % mássica.....	65
Figura 5.4 - Rendimento da extração de óleo em relação ao total de óleo presente na soja em função da temperatura. □ Etanol com 0% de água; ○ Etanol com 6% de água; △ Etanol com 12% de água. Água em % mássica.....	68
Figura 5.5 - Fases Refinado obtidas da extração de óleo com etanol contendo diferentes teores de água e diferentes temperaturas.	69
Figura 5.6 - Rendimento de proteína na fase extrato como função da temperatura. □ Etanol com 0% de água; ○ Etanol com 6% de água; △ Etanol com 12% de água. Água em % mássica.....	70
Figura 5.7 - Teor de proteína na fase refinado em função da temperatura, comparado ao teor de proteína do farelo de soja inicial ($42,3 \pm 1,4\%$, base seca). ..	71

Figura 5.8 - Curvas de solubilidade de nitrogênio referentes às fases refinado obtidas a diferentes temperaturas.	78
Figura 5.9 - Curvas de solubilidade de nitrogênio referentes às fases refinado obtidas em função do solvente de extração.....	79
Figura 5.10 - Curvas de solubilidade de nitrogênio para as fases refinado obtidas a 80 °C. x farelo inicial; ■ Etanol com 0% de água (Extração 1); □ Etanol com 0% de água (Extração 2); ● Etanol com 6% de água (Extração 1); ○ Etanol com 6% de água (Extração 2). Água em % mássica.	90
Figura 5.11 – Termogramas de DSC de amostras obtidas em diferentes condições. (a) Farelo inicial seco 60 °C por 24 horas; (b) Refinado Etanol com 0% de água (Extração 1); (c) Refinado Etanol com 0% de água (Extração 2); (d) Refinado Etanol com 6% de água (Extração 1); (e) Refinado Etanol com 6% de água (Extração 2). .	93
Figura 5.12 - Espectros de FTIR de amostras obtidas em diferentes condições. (A) Farelo inicial seco 60 °C por 24 horas; (B) Refinado Etanol com 0% de água (Extração 1); (C) Refinado Etanol com 0% de água (Extração 2); (D) Refinado Etanol com 6% de água (Extração 1); (E) Refinado Etanol com 6% de água (Extração 2)..	96
Figura 5.13 – Termogramas de DSC de amostras de diferentes etapas do processamento industrial. (a) Soja Laminada, (b) Soja Expandida, (c) Refinado após extração com hexano e (d) Refinado após dessolventização.	99
Figura 5.14 - Curvas de solubilidade de amostras de diferentes etapas do processamento industrial. (A) Soja Laminada, (B) Soja Expandida, (C) Refinado após extração com hexano e (D) Refinado após dessolventização.	101
Figura 5.15 - Espectros de FTIR de amostras de diferentes etapas do processamento. (A) Soja Laminada, (B) Soja Expandida, (C) Refinado após extração com hexano e (D) Refinado após dessolventização.	103
Figura 5.16 - Cinética de extração de óleo de soja em diferentes condições de processo. Etanol absoluto: □ 40,0 ± 0,1 °C; ○ 50,0 ± 0,1 °C e △ 60,0 ± 0,1 °C; Etanol azeotrópico: ■ 40,0 ± 0,1 °C; ● 50,0 ± 0,1 °C e ▲ 60,0 ± 0,1 °C; — modelo.	106
Figura 5.17 - Cinética de extração de ácidos graxos livres em diferentes condições de processo. Etanol absoluto: □ 40,0 ± 0,1 °C; ○ 50,0 ± 0,1 °C e △ 60,0 ± 0,1 °C; Etanol azeotrópico: ■ 40,0 ± 0,1 °C; ● 50,0 ± 0,1 °C e ▲ 60,0 ± 0,1 °C; — modelo.	108

Figura 5.18 - Cinética de extração de água em diferentes condições de processo. Etanol absoluto: □ 40,0 ± 0,1 °C; ○ 50,0 ± 0,1 °C e △ 60,0 ± 0,1 °C; Etanol azeotrópico: ■ 40,0 ± 0,1 °C; ● 50,0 ± 0,1 °C e ▲ 60,0 ± 0,1 °C.	109
Figura 5.19 - Teor de proteína na fase refinado para extrações com etanol absoluto em diferentes temperaturas. □ 40,0 ± 0,1 °C; ○ 50,0 ± 0,1 °C e △ 60,0 ± 0,1 °C. ...	110
Figura 5.20 - Distribuição de resíduos como função do tempo de extração de óleo de soja. Etanol absoluto: □ 40,0 ± 0,1 °C; ○ 50,0 ± 0,1 °C e △ 60,0 ± 0,1 °C; Etanol azeotrópico: ■ 40,0 ± 0,1 °C; ● 50,0 ± 0,1 °C e ▲ 60,0 ± 0,1 °C.	114
Figura 5.21 - Distribuição de resíduos como função do tempo de extração de ácidos graxos livres. Etanol absoluto: □ 40,0 ± 0,1 °C; ○ 50,0 ± 0,1 °C e △ 60,0 ± 0,1 °C; Etanol azeotrópico: ■ 40,0 ± 0,1 °C; ● 50,0 ± 0,1 °C e ▲ 60,0 ± 0,1 °C.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Quantidades aproximadas e relativas, componentes e pesos moleculares de frações proteicas obtidas de extrato de soja por ultracentrifugação (adaptado de Wolf, 1970 e Sgarbieri, 1996).....	31
Tabela 5.1 - Composição química da soja expandida.....	57
Tabela 5.2 - Composição em ácidos graxos do óleo contido na soja expandida.	58
Tabela 5.3 - Desvios obtidos para os sistemas estudados (experimentos de extração na condição de equilíbrio), calculados através da metodologia proposta por Marcilla et al. (1995).	60
Tabela 5.4 - Condições experimentais empregadas nos experimentos de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio.	61
Tabela 5.5 - Análise de Variância para teor de água na fase extrato.....	62
Tabela 5.6 - Teor de água na fase extrato (% em massa) para diferentes condições experimentais de extração.	63
Tabela 5.7 - Análise de Variância (ANOVA) para rendimento da extração de óleo de soja.....	65
Tabela 5.8 - Rendimento médio de óleo (g óleo/100 g de soja) para diferentes condições experimentais de extração.	66
Tabela 5.9 - Análise de Variância (ANOVA) para rendimento de proteína na fase extrato.	70
Tabela 5.10 - Rendimento médio de proteína na fase extrato (g proteína/100 g de farelo) para diferentes condições experimentais de extração.	70
Tabela 5.11 - Análise de Variância (ANOVA) para teor de proteína na fase refinado.	72
Tabela 5.12 - Teor de proteína na fase refinado para diferentes condições experimentais de extração.	72
Tabela 5.13 - Composição em ácidos graxos dos óleos obtidos de diferentes condições experimentais (% mássica: média $\pm$ desvio padrão).	75
Tabela 5.14 - Propriedades químicas dos óleos extraídos com etanol.	76
Tabela 5.15 - Índice de Solubilidade de Nitrogênio (ISN) na fase refinado para diferentes condições de processo no pH 2,0.....	82

Tabela 5.16 - Índice de Solubilidade de Nitrogênio (ISN) na fase refinado para diferentes condições de processo no pH 7,0.....	83
Tabela 5.17 - Índice de Solubilidade de Nitrogênio (ISN) na fase refinado para diferentes condições de processo no pH 9,0.....	84
Tabela 5.18 - Condições experimentais estudadas nos experimentos de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio em configuração corrente cruzada, a 80 °C.	86
Tabela 5.19 - Resultados das análises realizadas para cada experimento de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio em configuração corrente cruzada, a 80 °C.	87
Tabela 5.20 - Composição química e em ácidos graxos de óleos obtidos em diferentes condições experimentais.	89
Tabela 5.21 - Índice de solubilidade de nitrogênio para amostras obtidas das extrações sequenciais nos pHs 2,0, 7,0 e 9,0.	91
Tabela 5.22 – Temperaturas e entalpias de desnaturação do farelo inicial e das fases refinado provenientes das extrações com etanol.....	92
Tabela 5.23 - Frequências características de bandas observadas no espectro de FTIR de soja (adaptado de Pietrzak e Miller, 2005).	97
Tabela 5.24 - Codificação de amostras de cada etapa do processo industrial.	98
Tabela 5.25 - Efeito do processamento no conteúdo proteico e comportamento térmico.	99
Tabela 5.26 - Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) para amostras de diferentes etapas do processo industrial nos pHs 2,0, 7,0 e 9,0.....	101
Tabela 5.27 – Índices de qualidade de proteína da amostra inicial e das frações proteicas resultantes da extração de óleo pelos solventes hexano e etanol.	105
Tabela 5.28 - Coeficientes de transferência de massa e concentrações no equilíbrio calculados pelo modelo de So e MacDonald (1986) para cinética de extração de óleo de soja.....	113
Tabela 5.29 - Coeficientes de transferência de massa e concentrações no equilíbrio calculados pelo modelo de So e MacDonald (1986) para cinética de extração de ácidos graxos livres.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos graxos livres
C	Concentração de nitrogênio
calc	Calculado
C _e	Concentração de óleo no solvente na condição de equilíbrio
CG	Cromatografia gasosa
DRM	Desvio relativo médio
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
E	Extrato
EPA	Ácido eicosapentaenoico
exp	Experimental
F	Alimentação
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
ISN	Índice de solubilidade de nitrogênio
k	Coeficiente de transferência de massa
KF	Karl Fischer
M	Massa
MM	Massa molar
N	Normalidade
nd	Não detectado
R	Rafinado
R ²	Coeficiente de determinação
S	Solvente
T	Temperatura
Td	Temperatura de desnaturação
Vol	Volume gasto na titulação
w	Fração mássica
x	Número de carbonos
y	Número de duplas ligações

$(\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1}$	Matriz inversa de $(\mathbf{B}^T \mathbf{B})$
$\mathbf{B}$	Matriz transformação (composta pelos valores de w_i^{FE} e w_i^{FR})
$\mathbf{B}^T$	Matriz transposta de $\mathbf{B}$
$\mathbf{M}$	Matriz formada pelos valores de w_i^{PM}
$\mathbf{P}$	Matriz formada pela massa de cada fase (M^{FR} e M^{FE})

δ Desvio relativo

ΔH Entalpia

Subscritos

a	Amostra
d	Difusão
f	Filtrado
i	Componente do sistema
l	Lavagem

Sobrescritos

FE	Fase extrato
PM	Ponto de mistura
FR	Fase refinado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 A IMPORTÂNCIA DA SOJA	21
3.2 PROCESSAMENTO DA SOJA.....	23
3.3 EXTRAÇÃO POR SOLVENTE	26
3.4 CARACTERÍSTICAS DA FRAÇÃO PROTEICA DA SOJA.....	30
3.4.1 Solubilidade de proteínas	33
3.5 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 MATERIAIS.....	41
4.1.1 Reagentes	41
4.1.2 Equipamentos	41
4.1.3 Diversos	42
4.2 MÉTODOS	43
4.2.1 Caracterização da matéria-prima, soja expandida.....	43
4.2.1.1 Composição centesimal	43
4.2.1.2 Determinação da concentração de ácidos graxos livres na soja expandida	43
4.2.1.3 Composição em ácidos graxos	44
4.2.1.4 Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN)	44
4.2.1.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	45
4.2.1.6 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	45
4.2.2 Determinação de dados de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio e de cinética de extração (40 a 60 °C).....	46
4.2.3 Determinação de dados de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio (70 a 90 °C)	47
4.2.4 Experimentos de extração de óleo de soja em configuração corrente cruzada	49
4.2.5 Análises das fases	49
4.2.5.1 Determinação da concentração de água na fase extrato.....	49
4.2.5.2 Determinação da concentração de solvente (etanol + água) na fase extrato	50
4.2.5.3 Determinação da concentração de ácidos graxos livres na fase extrato	50
4.2.5.4 Determinação do teor de lipídeos na fase extrato através de extração com hexano	50
4.2.5.5 Composição em ácidos graxos de óleos de soja extraídos com etanol	51
4.2.5.6 Determinação do conteúdo de proteína	51

4.2.5.7	Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) da fase refinado	52
4.2.5.8	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da fase refinado	52
4.2.5.9	Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) da fase refinado	52
4.2.6	<i>Cálculos de balanço de massa para estimativa da composição</i>	53
4.2.7	<i>Análise estatística</i>	54
4.2.8	<i>Procedimento de modelagem dos dados de cinética de extração de óleo de soja</i>	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	56
5.2	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS DADOS EXPERIMENTAIS	59
5.3	ESTUDO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO NA CONDIÇÃO DE EQUILÍBRIO	60
5.3.1	<i>Composição em ácidos graxos dos óleos obtidos nas temperaturas de 70 a 90 °C</i>	73
5.3.2	<i>Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) da fase refinado</i>	77
5.4	EXPERIMENTOS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA EM CONFIGURAÇÃO CORRENTE CRUZADA	85
5.4.1	<i>Composição em ácidos graxos dos óleos</i>	88
5.4.2	<i>Índice de solubilidade de nitrogênio da fase refinado</i>	90
5.4.3	<i>Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) da fase refinado</i>	92
5.4.4	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da fase refinado</i>	95
5.5	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DA FRAÇÃO PROTEICA DE AMOSTRAS PROVENIENTES DAS ETAPAS DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO INDUSTRIAL	98
5.5.1	<i>Índice de solubilidade de nitrogênio</i>	100
5.5.2	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	103
5.6	COMPARAÇÃO DA QUALIDADE DA FRAÇÃO PROTEICA OBTIDA POR DIFERENTES SOLVENTES	104
5.7	ESTUDO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO	106
5.7.1	<i>Modelagem dos Dados de Cinética de Extração de Óleo de Soja</i>	111
6.	CONCLUSÕES	116
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	118
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

1. INTRODUÇÃO

Dentro do agronegócio mundial, a produção de soja está entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentaram crescimentos mais expressivos. Este fato pode ser atribuído a avanços em diversos aspectos, sobretudo, de naturezas tecnológica e mercadológica (Hirakuri e Lazzarotto, 2011).

Em 2011, a produção de soja representou 56% do total de sementes oleaginosas produzidas no mundo. Esta produção está baseada principalmente na obtenção de óleo e farelo. Apesar do baixo conteúdo lipídico (em torno de 20%), o óleo de soja é o óleo vegetal mais conhecido e o segundo mais consumido no mundo (SOYSTATS, 2012; Berk, 1992).

Em relação ao aspecto dietético e nutricional, uma das principais fontes lipídicas provém do consumo de óleos vegetais, os quais, além de fornecerem energia ao corpo humano, auxiliam na absorção de vitaminas e antioxidantes lipossolúveis, e apresentam-se como a principal fonte de ácidos graxos mono e poli-insaturados essenciais ao bom funcionamento do organismo humano (Institute of Medicine, 2005).

Quanto ao óleo de soja, pode-se dizer que substancialmente todos os triacilgliceróis que o compõem contém 2 ácidos graxos insaturados, sendo que o ácido linoléico pode representar 57% e o ácido linolênico 10% dos ácidos graxos totais. Pode conter, ainda, altos teores de esteróis (2000 a 4000 mg/kg) e tocoferóis (600 a 3400 mg/kg), componentes minoritários de grande importância nutricional e tecnológica (Firestone, 2006; Swern, 1964).

A extração de óleos vegetais utilizando solventes é um processo amplamente aplicado no processamento de oleaginosas que apresentam baixos teores de lipídeos, como no caso da soja. O solvente utilizado na extração comercial de óleos vegetais é o hexano que, apesar de ser o mais empregado, carrega consigo grande preocupação por parte de seus utilizadores devido à sua alta toxicidade, inflamabilidade, ser obtido de fonte não renovável, além de ser um grande agente poluidor do meio ambiente, quando não recuperado de forma adequada.

Ao longo dos anos, diversos solventes alternativos têm sido estudados a fim de substituir o hexano, tais como: água com ou sem adição de enzimas, aldeídos,

cetonas e alcoóis (etanol, metanol, isopropanol), dentre outros (Johnson e Lusas, 1983).

Dentre os mencionados, apresenta grande potencial de uso o etanol, pois este solvente alternativo torna o processo bastante atrativo do ponto de vista ambiental, uma vez que este é produzido por via biotecnológica, não gera resíduos tóxicos e é considerado seguro para a saúde humana. Vantagens do ponto de vista econômico também são evidentes, uma vez que o etanol é produzido em larga escala no Brasil e pode ser facilmente recuperado para posterior reutilização no processo. Além disso, suas características físico-químicas favorecem a extração devido à alta solubilidade de triacilgliceróis a elevada temperatura e baixa solubilidade a temperatura ambiente, possibilitando a separação das fases oleosa e solvente sem a necessidade de evaporação/destilação, desta forma, reduzindo a demanda energética para o processamento.

Outro aspecto de suma importância que deve ser mencionado é que para cada tonelada de óleo de soja produzido, têm-se a produção de 4,5 toneladas de farelo de soja contendo em torno de 44% de proteína. Considerando-se que o valor comercial do farelo obtido usualmente excede o valor comercial do óleo, pode-se afirmar que o farelo não pode ser considerado como um mero subproduto do processamento da soja (Berk, 1992).

Estudos reportam que, de maneira geral, a extração de óleos vegetais com etanol possibilita uma maior extração de açúcares, fosfolípidos, pigmentos, ceras, compostos que conferem amargor ao farelo, etc., possibilitando a obtenção de produtos de melhor qualidade em relação aos obtidos com hexano (Beckel et al., 1948; Fonseca e Regitano-d'Arce, 1993; Regitano-d'Arce et al., 1994; Johnson e Lusas, 1983).

Com base nas considerações enumeradas, a presente dissertação de mestrado objetivou avaliar a viabilidade técnica do emprego de solventes alcoólicos no processo de extração de óleo de soja através da avaliação de parâmetros de processo tal como a cinética de extração do óleo e de compostos minoritários de interesse, como os ácidos graxos livres, e o monitoramento de índices de qualidade da fração proteica resultante do processo de extração. De fato, objetivou-se averiguar o impacto da utilização do etanol, com ou sem hidratação, sob diferentes

temperaturas de processo, não somente no rendimento de óleo de soja e sua composição, mas também na solubilidade da proteína presente no farelo desengordurado.

2. OBJETIVOS

A presente dissertação de mestrado teve como objetivo principal o estudo da viabilidade técnica do emprego de solventes alcoólicos, etanol absoluto ou hidratado, no processo de extração de óleo de soja. Esta possibilidade de substituição do solvente tradicional, fóssil, pelo solvente alternativo, biorenovável, foi avaliada com base no rendimento de óleo e na influência das condições de processo, temperatura e hidratação do solvente, sobre a qualidade da fração proteica da soja.

Desta forma, para atingir os objetivos propostos as atividades realizadas se concentraram em duas frentes:

- Estudo da cinética de extração do óleo de soja com monitoramento do total de compostos graxos extraídos, como função do tempo, bem como o monitoramento da extração de ácidos graxos livres. Os dados experimentais de cinética de extração obtidos nesta etapa foram utilizados para ajustar os parâmetros da equação proposta por So e MacDonald (1986).
- Avaliação da influência das variáveis de processo, teor de água no solvente etanol e temperatura, na qualidade da fração proteica do farelo desengordurado de soja obtido via extração com etanol. Nesta etapa foram realizados experimentos de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio. Através destes experimentos foi possível realizar a caracterização dos extratos obtidos e do farelo desengordurado, com a determinação da solubilidade da fração proteica.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A importância da soja

Em 2011, a produção mundial total das principais oleaginosas foi de 452,5 milhões de toneladas sendo que a soja contribuiu com 56% da produção total. Atualmente, o principal produtor de soja é os Estados Unidos, detendo cerca de 33% da produção mundial, seguido pelo Brasil com 29% e Argentina com 19% (SOYSTATS, 2012). Para o cultivo de soja nacional, apesar da queda na produção em torno de 12% em relação à safra de 2010, devido principalmente às condições climáticas adversas, houve um aumento na área produzida, em torno de 3,5% (CONAB, 2012; IBGE, 2012).

As condições climáticas brasileiras favorecem o cultivo desta oleaginosa e justificam que esta responda por 41% da produção nacional de grãos. Além disso, o domínio da soja dentro do mercado de oleaginosas deve-se ao alto valor comercial de seus subprodutos, principalmente de sua proteína, que apresenta um valor nutricional e funcional bem maior que outras oleaginosas.

A soja (*Glycine max*) é um grão muito versátil que dá origem a diversos produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. A soja pode ser consumida verde como um vegetal, mas também pode ser consumida torrada, inteira ou sua farinha, quando aplicadas como ingredientes de diversos produtos. Entretanto, a maior parte da produção é processada a fim de se obter óleo e farelo. O mais conhecido de seus produtos é o óleo comestível, obtido do refino do óleo bruto (EMBRAPA, 2012).

A composição dos grãos de soja pode variar de acordo com a variedade e condições de cultivo, sendo constituídos em média de: 40% de proteínas, 35% de carboidratos, 20% de lipídeos e 5% de cinzas, em base seca (Berk, 1992; Hammond et al., 2005). O valor nutricional é devido, principalmente, ao alto teor de proteínas de fácil digestão e presença de todos os aminoácidos essenciais requeridos para alimentação humana ou animal (Vieira, 2007).

Os óleos vegetais comestíveis apresentam-se como uma das principais fontes de gordura dietária. Estes, além de suprirem energia para o corpo humano, auxiliam

na absorção de vitaminas e antioxidantes lipossolúveis, sendo, também, a principal fonte de ácidos graxos mono e poli-insaturados essenciais ao bom funcionamento do organismo humano (Institute of Medicine, 2005).

Além das funções de provisão de energia e fornecimento de vitaminas e antioxidantes lipossolúveis, os óleos vegetais constituem uma importante fonte de ácidos graxos, alguns considerados essenciais ao organismo. O balanço certo entre a quantidade de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados $\omega 3$ e $\omega 6$ auxilia na proteção do organismo contra doenças crônicas tais como doenças cardiovasculares (Deckere e Korver, 1996; FAO, 2010).

Além dos ácidos graxos essenciais, os óleos vegetais contêm componentes minoritários insaponificáveis com características antioxidantes e vitamínicas. O óleo de soja bruto apresenta baixa acidez livre, 0,3 a 0,7%, se comparado aos outros tipos de óleos vegetais, e pode conter altos índices (1,9 a 2,8%) de fosfolípidos. Substancialmente todos os triacilgliceróis que compõem o óleo de soja contém 2 ácidos graxos insaturados sendo que o ácido linoléico pode representar 57% e o ácido linolênico 10% dos ácidos graxos totais. O óleo de soja pode conter, ainda, altos teores de esteróis (2000 a 4000 mg/kg) e tocoferóis (600 a 3400 mg/kg) (Firestone, 2006; Swern, 1964; Hammond et al., 2005).

Dentre os componentes minoritários presentes no óleo de soja, destaca-se a presença de tocoferóis, mais especificamente a alta concentração δ -tocoferol. Os tocoferóis, bastante conhecidos pela atividade de Vitamina E, atuam como antioxidantes devido à sua forte atuação inibindo efeitos da oxidação lipídica tanto em alimentos como em sistemas biológicos. Estudos demonstram que o consumo de Vitamina E exibe um efeito protetivo contra a progressão de doenças cardiovasculares (Kamal-Eldin, 2005).

A recuperação do óleo contido na soja é realizada por meio de extração por solvente, normalmente utilizando-se hexano, devido ao baixo conteúdo de óleo na soja (15 a 20%) (Hammond et al., 2005).

O farelo resultante da extração do óleo de soja é amplamente utilizado na alimentação animal e humana, como fonte de proteína, não somente pelo seu valor nutricional, mas também devido às propriedades funcionais, tais como solubilidade,

retenção de água, ligação com gordura, capacidade emulsificante e gelificação, quando adicionado à produtos alimentícios (Visser e Thomas, 1987).

As diversas características que fazem da soja uma matéria-prima tão especial precisam ser conservadas, contudo, o tipo de solvente empregado na extração do óleo e consequentes adaptações requeridas podem influenciar na qualidade do óleo e farelo obtidos. Desta forma, existe a necessidade de analisar este processo sob diferentes pontos de vista, tais como, rendimento de óleo e composição química deste, além das características da fração proteica, tal como a solubilidade.

3.2 Processamento da Soja

As diferenças nas características dos materiais oleaginosos determinam se a recuperação do óleo contido no material será realizada via prensagem mecânica, por meio de emprego de solvente ou por combinação dos dois métodos. Qualquer que seja o método empregado tem-se objetivos comuns. Primeiramente, obter um óleo ou gordura de boa qualidade e isento de impurezas; em segundo lugar, obter o óleo com alta produtividade zelando pela economia e lucratividade do processo; finalmente, produzir um resíduo de boa qualidade para consumo humano ou animal (Wakelyn e Wan, 2006).

O processo combinado que utiliza uma pré-prensagem seguida da extração por solvente é geralmente utilizado para sementes com alto teor de óleo (conteúdo de óleo acima de 35%) tais como linhaça, girassol, algodão e milho. Para a soja, emprega-se somente extração com solvente devido ao baixo conteúdo de óleo (15 a 20%) (Anderson, 2011).

As etapas do processamento dos grãos de soja, a óleo bruto e farelo, são apresentadas na Figura 3.1.

Figura 3.1 - Etapas do processamento da soja a óleo bruto e farelo (Adaptado de Anderson, 2005).

As etapas de preparação dos grãos de soja são de grande importância para uma extração bem sucedida, uma vez que o óleo encontra-se fortemente ligado no interior das células que, por meio de tratamentos térmicos e mecânicos serão rompidas, tornando o óleo mais acessível ao solvente ou miscela dentro do extrator (Anderson, 2005).

Os grãos recebidos passam por uma pré-limpeza a fim de remover caules, folhas, frutos, grãos quebrados, sujidades, pedras e materiais estranhos, utilizando-se peneiras e aspiradores. É vantajoso remover grande parte das cascas, pois elas são pobres em óleo e proteína, além de ocupar espaço no extrator e serem abrasivas ao aquecedor e laminador. A secagem facilita o descascamento. Em seguida, os grãos passam por quebradores para serem reduzidos a pequenas partículas (4 a 8 pedaços) a fim de que, além de se obter completa exposição das

células na laminação, sejam obtidas lâminas (flocos) de espessura e comprimento ideais. O condicionamento consiste no aquecimento úmido (em torno de 70 °C e 10% de umidade) dos grãos quebrados, fazendo com que a soja seca, que é dura e quebradiça, se torne um material mais plástico, fácil de ser laminado, através do aumento das células do óleo que, fluidificado, lubrificará as paredes das células. A laminação dos grãos a flocos finos facilita a extração por solvente, pela ruptura das células ou pela redução das distâncias que solvente e óleo devem percorrer ao se difundirem para dentro e fora do grão. A etapa de expansão torna os flocos porosos, através da umidificação e injeção de vapor, que facilita a permeação do solvente e produz mistelas mais concentradas (Regitano-d'Arce, 2006; Johnson, 2000; Anderson, 2011).

Os flocos são colocados no extrator, juntamente com o solvente, a fim de que ocorra a extração do óleo pelo solvente, resultando em duas correntes: uma denominada refinado, que é a mistura formada pelo farelo de soja, solvente, água e óleo residual; e outra corrente, denominada extrato ou miscela, composta por óleo de soja e solvente. O solvente precisa, então, ser recuperado para tornar óleo e farelo apropriados ao consumo, bem como ser reutilizado na extração. A etapa de extração com solvente será mais bem detalhada no item 3.3.

O óleo bruto obtido após o processo de dessolventização do extrato passa por uma série de etapas denominadas de refino, que visam à remoção de substâncias indesejáveis no óleo. No processo de refino são realizadas as operações de degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização, sendo necessária a remoção dos ácidos graxos livres e fosfolipídeos, pois estes afetam a estabilidade do produto. Este processo não afeta a composição dos ácidos graxos e acilgliceróis, mas remove pigmentos e reduz o conteúdo de nutrientes que estão em menor quantidade no óleo, tais como os tocoferóis, esteróis e o esqualeno. Além destes constituintes, existem no óleo bruto, pequenas quantidades de outras substâncias, incluindo ceras, pigmentos (por exemplo, o β -caroteno que confere a cor amarela ao óleo de soja) e minerais (Hammond, et al., 2005).

3.3 Extração por solvente

A operação de extração por solvente é considerada a mais importante dentro de todo o processo de obtenção de óleo e farelo, e consiste em um processo de transporte de massa de uma fase para outra, envolvendo um conjunto de operações como lixiviação, difusão, diálise e lavagem, com o propósito de separar um ou mais componentes da mistura (Becker, 1978; Williams, 2005).

O objetivo da etapa de extração é reduzir o teor de óleo no flocos ao valor mais baixo possível com o uso mínimo de solvente. Normalmente, os flocos entram no extrator com um teor em torno de 15 a 20% de óleo. O processo de extração é dito eficiente se o refinado ao deixar o extrator apresentar um teor menor que 1,0% de óleo (Williams, 2005).

O processo de extração baseia-se no fato de que um componente (extraível ou solúvel) se distribui entre duas fases que apresentam um gradiente de concentração. A fase solvente, quando introduzida no sistema, se enriquece continuamente com o componente extraível até que um estado de equilíbrio seja atingido.

Um eficiente método, aplicado atualmente em indústrias, é a utilização de extratores contínuos de múltiplos estágios, onde solvente e matriz sólida são colocados em contato de forma contracorrente, ou seja, a miscela (solução óleo + solvente) concentrada entra em contato com o sólido com alto teor de óleo (Estágio 1), a miscela diluída entra em contato com sólido que já foi desengordurado parcialmente (Estágio $n-1$) e o solvente puro entra em contato com sólido quase exaurido (Estágio n). O contato em contracorrente pode ser representado esquematicamente como apresentado na Figura 3.2.

Figura 3.2 - Esquema de extrator sólido-líquido configurado em contracorrente (E_i = Fase extrato proveniente do estágio i ; R_i = Fase refinado proveniente do estágio i ; F = alimentação (soja); S = solvente).

No processo esquematizado, farelo e solvente caminham em contracorrente. No estágio n, primeiro contato do solvente com o farelo, inicia-se o processo de extração, o solvente passa a conter certa quantidade de óleo e a se chamar extrato ou miscela. No estágio 1 dar-se-á o contato entre a alimentação (soja) e o extrato proveniente do estágio subsequente (E_2). As correntes de saída, provenientes deste estágio são E_1 , extrato concentrado, e R_1 , fase refinado que contém, além do material insolúvel (fibras, cinzas, etc.) e óleo não extraído, parte da corrente E_2 que fica aderida ao sólido.

Em linhas gerais podem-se enumerar algumas propriedades desejáveis em solventes para extração de óleos vegetais (Johnson e Lusas, 1983):

1. Alta solubilidade a elevada temperatura e baixa solubilidade a temperatura ambiente, possibilitando a separação das fases oleosa e solvente sem a necessidade de evaporação/destilação. Os alcoóis de cadeia curta exibem esta característica;
2. Alta seletividade a triacilgliceróis deixando no farelo desengordurado fosfolipídeos, ceras e ácidos graxos livres, facilitando o refino posterior;
3. Em alguns casos é desejável que o solvente extraia outros componentes junto com os triacilgliceróis tais como aflatoxinas, no caso do amendoim, e gossipol, no caso do algodão, viabilizando o emprego do farelo desengordurado como ração animal;
4. Baixa inflamabilidade a fim de prevenir acidentes;
5. Estabilidade a fim de prevenir a contaminação do óleo e do farelo;
6. Inertes no contato com equipamentos a fim de minimizar gastos com manutenção;
7. Alta pureza para uniformizar as características operacionais;
8. Grande oferta a baixos preços.

O solvente mais largamente empregado na extração de óleos de matrizes oleaginosas é um destilado de petróleo contendo uma mistura de isômeros de hexano (faixa de ebulição de 65 a 71 °C) conhecido industrialmente como hexana. A hexana pode apresentar de 45 a 70% de n-hexano, composto que é considerado como neurotoxina nos Estados Unidos da América devido sua toxicidade comprovada em altas concentrações (Hammond et al., 2005).

Embora a hexana não apresente todas as propriedades desejáveis descritas acima esta se tornou o mais utilizado solvente para extração de óleos devido, principalmente, à alta estabilidade, baixa corrosão, baixa perda por evaporação, baixo conteúdo de óleo residual e melhor odor do farelo desengordurado (Johnson e Lusas, 1983). Entretanto, apresenta desvantagens como alta toxicidade, alta capacidade inflamável, explosividade e, além de ser obtido de uma fonte não-renovável de matéria prima que traz consigo os infortúnios atrelados ao mercado do petróleo. Tais desvantagens vêm desafiando pesquisadores a estabelecer solventes substitutos ao hexano.

Os substituintes mais citados são: água com ou sem adição de enzimas, solventes halogenados (diclorometano, tricloroetileno), cetonas (acetona, butanona, metiletilcetona), fluidos supercríticos (dióxido de carbono), alcoóis (etanol, isopropanol), entre outros (Rosenthal et al., 1996; Johnson e Lusas, 1983; Kuk e Hron, 1998).

Sem dúvida, o emprego de alcoóis tais como etanol e isopropanol, apresenta vantagens em relação à hexana e em relação aos solventes alternativos citados acima.

Estudos empregando etanol na extração de óleos vegetais são relativamente antigos (Magne e Skau, 1953; Rao et al., 1955; Rao e Arnold, 1956a; Rao e Arnold, 1956b; Rao e Arnold, 1958; Hron e Koltun, 1984; Regitano-d'Arce, 1985; Regitano-d'Arce, 1991; Silva e Turatti, 1991; Abraham et al., 1993). É reportado que os japoneses utilizaram industrialmente a extração de óleo de soja com etanol na década de 30 (Sato e Ito, 1932) descontinuando a produção devido ao alto custo do etanol em relação ao hexano.

Beckel et al. (1948) estudaram os efeitos de diferentes solventes (tetracloroeto de carbono, tricloroetileno, dicloreto de etileno, álcool isobutílico, álcool isopropílico, álcool etílico e hexano) nos produtos da extração de óleo de soja, e concluíram que o etanol apresentou os melhores resultados quanto à coloração do óleo, farelo e proteína isolada, além de extrair compostos que conferem amargor ao farelo de soja.

Segundo Hron et al. (1982) a solubilidade dos óleos vegetais em alcoóis varia com a temperatura e a concentração do álcool. A diminuição da concentração do álcool pela adição de água reduz a solubilidade do óleo no álcool. Além disso, os

óleos são completamente solúveis no álcool no seu ponto de ebulição, mas pouco solúveis à temperatura ambiente. Esta característica, como já citada nas propriedades desejáveis dos solventes, torna os alcoóis, em especial o etanol, um forte candidato a substituto do hexano, pois possibilita a separação das fases oleosa e solvente sem a necessidade de evaporação/destilação, o que reduz em cerca de 25% a necessidade energética quando comparada à extração utilizando hexano.

No Laboratório de Engenharia de Separações da FZEA/USP foram realizados, recentemente, estudos de equilíbrio de fases entre duas fases líquidas geradas a partir do resfriamento da miscela (mistura óleo + solvente) proveniente do extrator sólido-líquido. Os estudos realizados para óleo de soja (Chiyoda et al., 2010; Rodrigues et al., 2007), óleo de farelo de arroz (Oliveira et al., 2012a) e óleo de girassol (Cuevas et al., 2009, 2010) mostram que com o abaixamento da temperatura é possível a obtenção de duas fases líquidas:

- fase rica em óleo vegetal, na qual o teor de solvente remanescente dependerá da temperatura final do processo de resfriamento bem como do teor de hidratação do solvente utilizado na etapa de sólido-líquido;
- fase rica em solvente, somente dependente do grau de hidratação do solvente utilizado na etapa de extração.

Dentre outras vantagens do uso de etanol podem ser citadas: boa seguridade operacional, baixa toxicidade, fonte biorenovável, produção de um óleo de alta qualidade com baixa concentração de ácidos graxos livres, além de remover fatores antinutricionais como gossipol, aflatoxinas e ácido clorogênico (Hron et al., 1982). Além da boa qualidade do óleo extraído, estudos reportam que, de maneira geral, a extração de óleos vegetais com etanol possibilita uma maior extração de açúcares, fosfolípidos, pigmentos, ceras, compostos que conferem amargor ao farelo, etc., possibilitando a obtenção de um farelo de melhor qualidade em relação ao obtido com hexano (Beckel et al., 1948; Fonseca e Regitano-d'Arce, 1993; Regitano-d'Arce et al., 1994; Johnson e Lusas, 1983).

3.4 Características da fração proteica da soja

O cultivo da soja em larga escala está baseado na produção de óleo e proteína. De fato, para cada tonelada de óleo de soja bruto produzido, tem-se a produção de cerca de 4,5 toneladas de farelo de soja contendo em torno de 44% de proteína. Considerando-se que o valor comercial do farelo obtido usualmente excede o valor comercial do óleo, pode-se afirmar que o farelo não pode ser considerado como um mero subproduto do processamento da soja (Berk, 1992).

Diferentemente dos lipídeos, a fração e classificação das proteínas de soja é um pouco mais complexa. Além disso, muitas vezes, os estudos apresentados na literatura utilizam diferentes nomenclaturas para proteínas e suas frações. Isso é devido, em parte, à complexidade das próprias proteínas e, também, aos diferentes métodos utilizados para extração e isolamento (Liu, 1997).

Baseado nas funções biológicas nas plantas, as proteínas das sementes são classificadas em dois tipos: metabólicas ou de armazenamento. As proteínas metabólicas incluem atividade estrutural e enzimática. As proteínas de armazenamento, juntamente com as reservas de óleo, são sintetizadas durante o desenvolvimento dos grãos. Após a germinação dos grãos elas são fonte de nitrogênio e carbono para o desenvolvimento dos grãos (Kilara e Harwalkar, 1996; Liu, 1997). Aproximadamente 80 a 90% do total das proteínas são de armazenamento e podem ser divididas em albuminas (10%), solúveis em água, e as globulinas (90%) solúveis em soluções salinas (Fukushima, 1991).

As proteínas de soja constituem uma mistura de macromoléculas de tamanhos, densidade de carga e estruturas diferentes. A ultrafiltração separa as proteínas de soja em quatro principais frações: 2, 7, 11 e 15S, baseada na velocidade de sedimentação (Wolf, 1970; Sgarbieri, 1996). A quantidade aproximada e a composição de cada fração podem ser visualizadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Quantidades aproximadas e relativas, componentes e pesos moleculares de frações proteicas obtidas de extrato de soja por ultracentrifugação (adaptado de Wolf, 1970 e Sgarbieri, 1996)

Fração	% do total	Componentes	Peso Molecular (Da)
2S	22	Inibidores de tripsina	8.000; 21.500
		Citocromo C	12.000
7S	37	Beta-amilase	61.700
		Hemaglutinina (Lectina)	110.000
		Lipoxigenase	102.000
		Globulina 7S	180.000-210.000
11S	31	Globulina 11S	350.000
15S	11	-	600.000

Os componentes de baixo peso molecular, correspondentes a fração 2S, são compostos por inibidores de tripsina, citocromo C e algumas outras globulinas. Os inibidores de tripsina são importantes do ponto de vista nutricional e funcional, e devem ser inativados para facilitar a digestibilidade. Os citocromos são de grande importância devido aos componentes heme que podem catalisar a oxidação lipídica em alimentos, embora não haja evidências deste fato em proteínas de soja (Kinsella, 1979).

As globulinas estão presentes nas frações 7 e 11S, e são denominadas conglicinina e glicinina, respectivamente, sendo as principais componentes, que correspondem a cerca de 87% das proteínas de soja (Kinsella, 1979). As duas frações apresentam estruturas quaternárias complexas e alta tendência às reações de associação-dissociação. Elas possuem baixo conteúdo de estruturas α -hélice e são essencialmente constituídas de estruturas β -antiparalelas e regiões desordenadas (Kilara e Harwalkar, 1996).

A β -conglicinina é uma glicoproteína trimérica com peso molecular médio de 180 kDa que representa 91% da fração 7S (Liu, 1997). A estrutura secundária é composta por 5% de α -hélices, 35% de estruturas β e 60% espirais (Kinsella, 1979).

A glicinina é a forma purificada da fração de globulina 11S. É a maior fração simples do conteúdo total de proteínas (25–35%) e soma em torno de 40% do total de globulinas do grão. Apresenta estrutura polimérica de massa molar na faixa de 350-380 kDa e é formada por polipeptídeos básicos e ácidos, unidos por ligações

dissulfídicas (Liu, 1997). Abbott et al. (1996) determinaram através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) que a estrutura secundária da glicinina era composta por 24% de α -hélices, 30% de β -folha, 31% espirais e 12% de formas desordenadas.

Devido às diferenças na composição e estrutura, as duas maiores globulinas da soja, β -conglucina (7S) e glicinina (11S), exibem diferenças nas propriedades nutricionais e funcionais. Em geral, a fração 11S contém 3 ou 4 vezes mais metionina e cisteína por unidade de proteína do que a fração 7S (Kitamura, 1995). Sob o ponto de vista nutricional, a fração 11S é bastante valiosa visto que a soja é deficiente em aminoácidos sulfurados. Furukawa et al. (1979) e Voutsinas et al. (1983) relataram a importância dos grupos SH e SS para as propriedades funcionais das proteínas, fundamentais no processo de gelificação e coagulação das proteínas. A fração 11S tem melhor habilidade para a formação de gel quando comparada com a fração 7S, enquanto esta última mostra maior capacidade e estabilidade de emulsão (Liu, 1997).

De acordo com German et al. (1982) a temperatura de desnaturação da fração 7S é menor que a da fração 11S. Em outras palavras, a fração 11S requer maior aquecimento para formação de gel do que a fração 7S.

Para o desenvolvimento de novas metodologias de processamento de soja é preciso ter um controle do processo de desnaturação proteica. O processo de desnaturação das proteínas de armazenamento em um sistema heterogêneo é complexo, uma vez que, lipídeos, carboidratos e constituintes não proteicos impactam, não somente na dinâmica da água, mas também nas interações entre proteína-solvente e proteína-proteína durante a desnaturação (Sessa et al., 1998).

A aceitação de um ingrediente proteico não se deve apenas às suas qualidades nutricionais, mas também às propriedades funcionais que definem as possíveis aplicações comerciais do produto. As propriedades funcionais são definidas como propriedades físico-químicas que afetam o comportamento de compostos moleculares em alimentos, e contribuem significativamente para os atributos sensoriais e qualidade dos produtos finais. Os fatores que influenciam as propriedades funcionais de uma proteína são sua natureza bioquímica e, principalmente, como ela foi afetada pela extração e purificação até se tornar um

ingrediente alimentício. Operações de processamento como aquecimento, secagem e mistura, além das condições do meio como pH, presença de sais, força iônica, dentre outros, influenciam diretamente nas propriedades proteicas (Hui, 2006).

No caso da proteína de soja as propriedades funcionais de maior importância são solubilidade, absorção de água e/ou gordura, capacidade emulsificante e propriedades de gelificação (Visser e Thomas, 1987; Berk, 1992). A solubilidade da proteína de soja é uma propriedade funcional que pode ser relacionada com outras propriedades funcionais, e será mais bem detalhada no item 3.4.1.

De maneira geral, estes parâmetros indicam o grau de desnaturação das proteínas e podem ser, desta forma, correlacionados com as variáveis de processo na etapa de extração do óleo da matriz sólida utilizando-se o etanol como solvente.

3.4.1 Solubilidade de proteínas

A necessidade por proteínas com propriedades funcionais específicas é devido a crescente demanda na sua utilização como importante ingrediente em formulações. Muitas propriedades são governadas pelo comportamento físico-químico destas moléculas em líquidos. Dentre as propriedades funcionais, a solubilidade é de grande importância devido a sua influência sobre as demais funcionalidades das proteínas como emulsificação, gelificação e formação de espuma (Vojdani, 1996).

Termodinamicamente a solubilidade de uma proteína pode ser definida como um estado de equilíbrio da concentração da proteína no solvente em um sistema de uma ou duas fases (solução de proteína em fases líquido-líquido ou fases líquido-sólido) (Vojdani, 1996). As interações hidrofóbicas promovem ligações proteína-proteína que resultam em um decréscimo de solubilidade, enquanto interações iônicas promovem ligações proteína-água e resultam em um aumento da solubilidade (Damodaran, 1996).

A medida da solubilidade de nitrogênio em farelo de soja é importante, pois permite inferir a intensidade da desnaturação proteica, indicando a magnitude do tratamento térmico recebido pelo farelo. Tais medidas podem ser utilizadas como controle para manter uniforme processos operacionais a fim de otimizar o valor

nutritivo além de, também, serem utilizadas na caracterização da qualidade dos produtos (Smith et al., 1966).

O conhecimento do perfil de solubilidade de produtos proteicos da soja em diversas condições ambientais é importante para a indústria na avaliação de outras propriedades físico-químicas e funcionais a fim de direcioná-los para uma potencial aplicação. A solubilidade é altamente dependente do estado das moléculas proteicas que são, favorável ou desfavoravelmente, afetadas pelo processamento (Lee et al., 2003).

De maneira geral, pode-se inferir que o pH afeta a densidade e a distribuição de cargas elétricas na molécula da proteína de tal forma que no ponto isoelétrico (pI) a proteína apresentará um mínimo de solubilidade. No pI o número de cargas positivas e negativas é igual, portanto, elas se neutralizam, apresentando a menor afinidade pelo solvente (água) e atraem-se mutuamente, formando uma massa insolúvel que se precipita (Damodaran et al., 2010).

Para um grande número de proteínas o pI está entre pH 3,5 e 6,5, porém em soluções aquosas com pH entre 4,0 e 5,0, as proteínas da soja apresentam solubilidade consideravelmente baixa que corresponde à região isoelétrica. No entanto, em soluções aquosas, com pH acima ou abaixo do pI e com adição de cloreto de cálcio ou cloreto de sódio (ambos a 0,5 M) as proteínas apresentam alta solubilidade (Smith e Circle, 1938). Os íons salinos interagem com grupos de carga oposta presentes na proteína formando uma dupla camada de grupos iônicos que diminuem a interação proteína-proteína levando a maior dissolução protéica consequentemente, aumentando a solubilidade (Vojdani, 1996).

Vojdani (1996) ressalta que fatores como pH, temperatura, força iônica, presença de outros componentes, concentração da proteína no produto e parâmetros físicos afetam a solubilidade proteica. A solubilidade das proteínas se eleva com o aumento da concentração de sais e pode diminuir em temperaturas acima de 50 °C causando desnaturação da proteína.

A presença de solventes orgânicos na solução também pode afetar o comportamento das proteínas. Solventes polares possuem constantes dielétricas mais elevadas, portanto, aumentam a solubilidade das proteínas por diminuir a força de atração entre as moléculas. A constante dielétrica da água, à temperatura

ambiente, é em torno de 80, sendo uma das mais elevadas. Os solventes orgânicos como acetona, etanol e metanol, possuem constantes dielétricas mais baixas (em torno de 25) e por esse motivo, são bons precipitantes, pois levam a desnaturação de proteínas. Cadeias apolares alifáticas de lipídeos também podem interagir com regiões hidrofóbicas das proteínas e diminuir sua solubilidade em meio aquoso (Vojdani, 1996).

Diferentes procedimentos têm sido propostos na literatura para determinação da solubilidade. Basicamente, os métodos envolvem a seleção/diminuição do tamanho das partículas, pesagem da amostra, dispersão em água em agitação constante sob uma determinada condição de temperatura, pH e força iônica, e posterior centrifugação. Por fim, faz-se a determinação do nitrogênio presente no sobrenadante, o que na maioria dos casos é realizado por Kjeldahl.

O método de determinação de proteína por Kjeldahl é a técnica mais empregada nas análises de alimentos e rações, além de ser o método referência adotado por muitas organizações mundialmente. Entretanto, o uso de reagentes tóxicos e/ou corrosivos, com consequente geração de resíduos e risco à saúde humana, tem gerado certa preocupação por parte dos pesquisadores. Além disso, é um método que despende longo tempo para análise e demanda muitas etapas, que levam a maiores oportunidades de erros (Jung et al., 2003).

Diante das desvantagens do Kjeldahl, surgem métodos alternativos como o método de Dumas ou método de combustão, que é comparativamente mais rápido por despende tempos menores que 5 min por amostra, de mais simples e fácil execução, além de ser mais seguro à saúde e menos danoso ao meio ambiente.

Muitos estudos compararam a efetividade entre os métodos de Dumas e Kjeldahl, para os mais diversos tipos de amostras, incluindo leites e derivados lácteos (Wiles et al., 1998), grãos oleaginosos e cereais (Bicsak, 1993; Daun e DeClercq, 1994), carnes e produtos cárneos (King-Brink e Sebranek, 1993), folhas vegetais (Simonne et al., 1998) e produtos de soja (Jung et al., 2003). Na maioria dos casos, os teores de nitrogênio foram maiores para o método de Dumas do que pelo método de Kjeldahl, o que pode ser explicado pelo fato de que a presença de formas inorgânicas de nitrogênio, como nitratos e nitritos, podem não ser medidas pelo método de Kjeldahl se não forem devidamente reduzidas na etapa de digestão.

Em contraste, todas as fontes de nitrogênio, orgânicas ou inorgânicas, são medidas pelo método de Dumas (Jung et al., 2003).

Diante das vantagens bastante atrativas do método de Dumas, este foi o método adotado para todas as quantificações de nitrogênio nesta dissertação de mestrado, inclusive dos experimentos de determinação de solubilidade.

Diversos termos são utilizados para expressar a solubilidade, como: Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN), Índice de dispersibilidade de proteína (IDP), Proteína solúvel em água (PSA), Proteína dispersa em água (PDA), Índice de solubilidade (IS) e Porcentagem de Proteína solúvel (%PS) ou Nitrogênio solúvel (%NS). ISN e IDP são os mais comumente utilizados por se tratarem de métodos oficiais da *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 1998). Estes métodos oficiais são aplicáveis para produtos de soja e se diferem quanto à velocidade e tempo de agitação da amostra, sendo que o IDP utiliza técnica de agitação rápida em menor intervalo de tempo.

Visando o desenvolvimento de um método rápido, simples e confiável para determinação de solubilidade de diversos produtos alimentícios, e não só de soja como sugerem os métodos oficiais da AOCS, Morr et al. (1985) realizaram um estudo colaborativo para padronização dos procedimentos, baseado no método oficial de ISN (Ba 11-65) da AOCS (1998). Atualmente, este é o método mais adotado pelos pesquisadores da área, com pequenos ajustes de acordo com a amostra a ser analisada.

Em estudo recente, Bader et al. (2011) avaliaram a solubilidade da fração proteica de farelos de tremço obtidos da extração do óleo por diferentes solventes, dentre eles n-hexano e etanol, e observaram que, dentre os solventes estudados, a maior queda na solubilidade foi visualizada para o farelo obtido da extração de óleo com etanol.

Bortoletto et al. (2007) avaliaram a solubilidade da fração proteica no farelo de soja desengordurado obtido via extração com etanol 99% na temperatura de 70 °C. Os autores observaram a redução da solubilidade proteica do farelo em toda faixa de pH estudada.

Regitano d'Arce et al. (1994) determinaram as propriedades funcionais do farelo de girassol desengordurado com etanol em quatro diferentes níveis de

hidratação (98, 96, 93 e 90 °GL) na temperatura de 89 °C por 8 horas. Os autores observaram um decréscimo da solubilidade proporcional ao aumento da hidratação do solvente.

As observações dos autores (Regitano d'Arce et al., 1994) estão de acordo com estudos realizados por Pace et al. (2004). Neste trabalho os autores reportam que a tendência das proteínas à desnaturação em meio etanólico depende não só da concentração do etanol, mas também do tipo de proteína. Ademais os autores reportam que as estruturas α -hélices são estáveis em etanol.

Os perfis de solubilidade são um excelente guia da funcionalidade protéica e, consequentemente, de sua potencial aplicação. A facilidade da determinação desta propriedade e os métodos relativamente padronizados tornam esta análise obrigatória no estudo das propriedades de proteínas novas ou modificadas, e na avaliação dos efeitos de diferentes tratamentos sobre as propriedades funcionais de proteínas (Kinsella, 1976).

3.5 Cinética de extração de óleos vegetais

A extração por solvente é o principal meio de obtenção de óleo de sementes oleaginosas. Embora este processo seja muito conhecido pela indústria, há necessidade de adaptação do processo às necessidades dos consumidores, como melhorar a qualidade do óleo sem perder o custo-benefício (ou rendimento). O projeto de um processo eficiente requer o conhecimento de todos os fatores que podem influenciar o processo de extração (Fernandez et al., 2012). De fato, o estudo da cinética de extração é uma ferramenta muito importante no delineamento do processo, que possibilita o conhecimento dos efeitos das variáveis operacionais, tais como, razão entre sólido/solvente, temperatura e teor de água no solvente, sobre a velocidade de extração dos compostos de interesse.

O objetivo principal da modelagem das curvas de cinética é definir parâmetros para desenho de processos. Esses parâmetros são usados para predizer a curva total de extração e, desta forma, estimar a viabilidade do processo em escala industrial. Vários modelos matemáticos são apresentados na literatura para descrever a extração por solvente (Karnofsky, 1986; Patricelli et al., 1979; So e MacDonald, 1986). Um modelo deve ser um instrumento matemático que reflete o

comportamento físico da estrutura sólida e as observações experimentais. Dessa forma, poderá ser utilizado como uma ferramenta de simulação e, depois, para aplicações industriais deste processo.

Chorny e Krasuk (1966) desenvolveram uma metodologia para a determinação de difusividade em diferentes geometrias. Os autores mostram a aplicabilidade da técnica na descrição do processo de extração de óleos de soja e farelo de arroz utilizando tricloroetileno como solvente.

O fenômeno de difusão do óleo de amendoim em n-pentano e n-hexano foi reportado por Fan et al. (1948). Os autores concluíram que o coeficiente de difusão varia com o tipo de solvente e com a umidade da matéria-prima, porém é independente da espessura do material.

O estudo da cinética de extração de óleo e ácido clorogênico de grãos de café foi realizado por Dibert et al. (1989) utilizando hexano e metanol hidratado como solventes, a 30°C. Os autores observaram que o processo de extração é rápido, sendo que cerca de 75% do óleo e 30% do ácido são extraídos nos primeiros 10 minutos.

Estudos da cinética de extração de óleos vegetais utilizando hexano como solvente foram realizados para o óleo de jojoba (Allawzi et al., 2005) e óleo de girassol (Baümler et al., 2010, 2011). De maneira geral, os autores observaram que o aumento da temperatura de processo minimiza o tempo de extração e maximiza o rendimento.

Chien et al. (1990) avaliaram simultaneamente o processo de extração de óleo de milho com etanol e a desidratação do álcool, sob diversas condições de temperatura, tamanho de partícula e concentração do álcool. Segundo os autores, a quantidade de óleo extraída aumenta com o aumento da temperatura e as partículas menores apresentam uma maior eficiência de extração. Os dados de extração foram modelados e coeficientes de transferência de massa foram obtidos. Os autores reportam ainda que a taxa de difusão do solvente para dentro e/ou do óleo para fora da matriz sólida é o fator limitante da extração, e que esta limitação pode ser superada por um pré-tratamento de umidificação da matéria-prima.

Estudo realizado por Franco et al. (2007) reporta a possibilidade de extração, além dos dados cinéticos de extração de substâncias solúveis de Rosa rubiginosa

utilizando etanol como solvente. Segundo os autores, a transferência de água do sólido para o etanol determina as condições de tempo e temperatura de secagem do sólido antes deste ser submetido ao processo de extração. Foi reportado que o aumento da solubilidade do óleo está diretamente relacionado com a temperatura do processo. Os autores realizaram experimentos variando o tamanho da partícula e a razão sólido:solvente para dois solventes etanólicos com diferentes concentrações de água (4 e 8%, volume/massa). Com estes experimentos foi possível a determinação do valor da difusividade efetiva dos compostos solúveis.

Em estudo posterior, Franco et al. (2008) realizaram o estudo da cinética de extração de óleo de avelã, utilizando solventes mistos constituídos de etanol e diferentes teores de água (0, 4 e 8%) na temperatura de 50 °C. Neste trabalho foram determinados os valores das difusividades aparentes sendo os maiores valores obtidos para os maiores teores de água no solvente.

Pode-se inferir que, na maioria dos trabalhos publicados na literatura acerca de cinética de extração de óleo utilizando solventes, o foco principal foi a determinação da difusividade do material total extraído, sem diferenciação de classes de compostos.

Enquanto que a cinética de extração de óleos tem sido amplamente estudada, poucos são os trabalhos publicados na literatura que monitoram a cinética de extração de compostos minoritários (Dibert et al., 1989; Baümler et al., 2010, 2011; Fernandez et al., 2012). Este monitoramento é, no entanto, de suma importância para o delineamento do processo.

Em estudo recente, Fernández et al. (2012) estudaram, além da cinética de extração de óleo, a cinética de extração de compostos minoritários, tocoferóis, presentes em sementes de canola utilizando hexano como solvente com a finalidade de avaliar a influência da temperatura (de 25 a 60 °C).

Os ácidos graxos livres são compostos que impactam negativamente na qualidade do óleo extraído. Assim, pode-se inferir que o conhecimento da velocidade de extração desta classe de compostos minoritários, sob determinadas condições de temperatura e tipo de solvente, pode possibilitar a produção de óleos brutos com menores níveis de acidez. De fato, óleos brutos com menores teores de ácidos

graxos livres levam a uma desoneração das etapas posteriores de refino às quais o óleo deve ser submetido para poder ser classificado como comestível.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

- Soja expandida (Granol),
- Etanol absoluto (Merck, min. 99,8%),
- Etanol hidratado (Ecibra, min. 95%),
- n-Hexano (Merck),
- Hidróxido de Sódio (Merck),
- Solução Karl Fischer isenta de piridina (Sigma-Aldrich),
- Clorofórmio (Synth),
- Metanol (Merck),
- Éter etílico (Synth),
- Ácido Clorídrico (Qhemis),
- Hexanol (Merck),
- Cloreto de Sódio (Qhemis),
- EDTA (Leco),
- Com aid (Leco),
- Sulfato de sódio (Synth),
- Reagente de esterificação BF_3 (Merck),
- Mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma-Aldrich),
- Padrão interno metiltridecanoato (Sigma-Aldrich).

4.1.2 Equipamentos

- Células de equilíbrio em vidro pyrex (FGG),
- Extrator em aço inoxidável (Marconi, modelo MA-483/EC2),
- Banho termo estático digital (Marconi, modelo MA184),
- Estufa de vácuo (Tecnal, modelo TE395),
- Estufa de convecção forçada (Nova Orgânica, modelo N035/3),
- Bomba de vácuo (Tecnal, modelo TE058),

- Balança analítica eletrônica (0,0001 g) (Adam, modelo PW254),
- Balança semi-analítica (Adam, modelo PGW1502i),
- Agitador magnético (IKA, modelo RH basic 2),
- Cromatógrafo Gasoso com injetor automático (Shimadzu, modelo GC2010),
- Rotaevaporador (Tecnal, modelo TE211),
- Titulador Karl Fischer (Metrohm, modelo 787 KF Titrino),
- Centrífuga de bancada com sistema de refrigeração (ThermoElectron, modelo CR3i multifunction),
- Sistema completo para determinação de nitrogênio/proteína por combustão (Leco, modelo FP-528),
- Deionizador de água (Millipore, modelo Direct-Q 3),
- Titulador potenciométrico automático (Metrohm, modelo 848 Titrino),
- pHmetro (Digimed, modelo DME-CV2),
- Tacômetro digital (Icel, modelo TC-5010),
- Agitador eletro-magnético e peneiras granulométricas (Bertel),
- Calorímetro diferencial de varredura (TA Instruments, modelo DSC TA 2010),
- Espectrômetro de infravermelho FT-IR (Perkin Elmer, modelo Spectrum One).

4.1.3 Diversos

- Vidros de amostra,
- Gases especiais para cromatografia gasosa (ar sintético, hélio, hidrogênio) e para determinação de nitrogênio pelo método de combustão (ar comprimido, hélio, oxigênio),
- Solventes de alto grau de pureza para cromatografia gasosa,
- *Vials* para cromatografia gasosa,
- Vidrarias em geral (béqueres, erlenmeyers, placas de Petri, balões volumétricos calibrados, tubos de polipropileno para centrifugação, etc.),
- Termômetros calibrados,
- Seringas com agulhas para amostragem,
- Papel filtro Whatman nº 1,
- Folhas e cápsulas de estanho (Leco),

- Cápsulas de alumínio para análise de DSC (TA Instruments), etc.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização da matéria-prima, soja expandida

Os grânulos de soja foram peneirados e classificados de acordo com o tamanho de partícula, sendo que para obtenção dos dados de equilíbrio e cinética de extração foram utilizadas partículas com diâmetro entre 1,18 (*mesh* 14) e 1,70 mm (*mesh* 10).

As análises descritas a seguir foram realizadas antes da execução de cada experimento, de equilíbrio ou de cinética de extração.

4.2.1.1 Composição centesimal

A matéria-prima soja expandida foi caracterizada em termos de umidade, teor de lipídeos, proteína bruta (métodos AOCS Ac 2-41, Am 2-93, Ba 4f-00 (1998), respectivamente), cinzas (AOAC, 2007) e fibras (Van Soest et al., 1991). Para conversão de nitrogênio em proteína, o teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator 6,25, como sugerido por AOAC (2007).

4.2.1.2 Determinação da concentração de ácidos graxos livres na soja expandida

A acidez livre foi determinada utilizando-se a massa molar média dos ácidos graxos livres, calculada com base na análise cromatográfica (item 4.2.1.3). A titulação foi realizada com hidróxido de sódio (NaOH) pelo método a frio 2201 da IUPAC (1979) modificado, utilizando um titulador potenciométrico automático. No caso da análise da matéria-prima, o óleo contido na soja expandida foi extraído a frio pelo método sugerido por Bligh e Dyer (1959).

Em um béquer de 100 mL pesou-se uma massa em torno de 0,5 g de óleo. Dissolveu-se a amostra em aproximadamente 65 mL de solvente (1:1 em volume de álcool etílico 95% e éter etílico). A amostra foi titulada potenciometricamente com solução padronizada de NaOH (valor nominal 0,01 N), sendo o volume gasto de titulante anotado.

A porcentagem de acidez livre das amostras foi calculada conforme a Equação (4.1).

$$AGL (\%) = (MM \times N_{NaOH} \times Vol) / (M \times 10) \quad (4.1)$$

Onde: MM = massa molar média dos ácidos graxos livres (g/mol); N_{NaOH} = normalidade da solução de NaOH; Vol = volume de NaOH gasto na titulação (mL); M = massa de amostra (g).

4.2.1.3 Composição em ácidos graxos

A análise da composição em ácidos graxos foi realizada através de cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos, de acordo com o método oficial 1-62 da AOCS (1998), utilizando-se como padrão interno metiltridecanoato (Zenebon et al., 2008). No caso da matéria-prima, o óleo contido na soja expandida foi extraído a frio pelo método sugerido por Bligh e Dyer (1959) e, em seguida, submetido à hidrólise e esterificação.

Utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu 2010 AF (Japão), com injetor automático (Shimadzu, modelo AOC 20i, Japão) e detector de ionização de chama nas seguintes condições experimentais: coluna capilar altamente polar de bis-cianopropil polisiloxano 0,20 μ m, 100 m x 0,25 mm i.d. (SP – 2560, Supelco, Bellefonte, PA, USA), hélio como gás de arraste (velocidade linear de 19,5 cm/seg); temperatura do injetor de 250 °C, temperatura da coluna de 140 °C (5 minutos), 140/240 °C (taxa de 4 °C/min), 240 °C (15 minutos); temperatura do detector de 260 °C e volume de injeção de 1,0 μ L; split 100:1. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com padrões externos adquiridos da Supelco (Bellefonte, PA, USA). A quantificação foi realizada com base nas relações de área de cada ácido graxo com a área do padrão interno, utilizando os fatores de correção de resposta do detector de ionização de chama e de conversão de ésteres metílicos de ácidos graxos para ácido graxo.

4.2.1.4 Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN)

A solubilidade foi determinada de acordo com Morr et al. (1985), com algumas modificações, e correspondeu a relação entre a fração proteica dissolvida e o seu conteúdo na amostra inicial. Cerca de 1,0 g de farelo de soja, previamente seco a 60 °C por 24 horas e triturado, foi dissolvido em 50 g de NaCl 0,1 M. As dispersões

foram ajustadas aos pHs 2,0, 4,0, 4,5, 5,0, 7,0 e 9,0 com HCl 0,1 N e/ou NaOH 0,1 N, e mantidas sob agitação com auxílio de um agitador magnético, por 2 horas. Nestes experimentos foram utilizadas as mesmas células de equilíbrio de vidro pyrex utilizadas nos experimentos de extração, uma vez que estas possibilitam o controle da temperatura, que foi mantida em 25 °C ao longo do período de agitação. Em seguida, as dispersões foram transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas a 5.000 g por 30 min na temperatura de 4 °C. Após este procedimento, as amostras foram filtradas em papel filtro Whatman nº 1. Alíquotas do material filtrado foram tomadas para determinação do teor de nitrogênio pelo método de combustão (AOCS, 1998). O índice de solubilidade de nitrogênio foi calculado de acordo com a Equação (4.2).

$$ISN (\%) = ((C_f \times M_{NaCl})) / ((M_a \times C_a)) \times 100 \quad (4.2)$$

Onde: C_f = Concentração de nitrogênio no filtrado (%); M_{NaCl} = massa de NaCl 0,1 M (g); M_a = massa de amostra (g); C_a = concentração de nitrogênio na amostra (%).

4.2.1.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises foram realizadas utilizando o espectrômetro de infravermelho FT-IR Spectrum One (Perkin Elmer, USA), no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da FZEA-USP. A soja, previamente triturada e seca foi colocada diretamente sobre a célula de leitura. Foram realizadas 16 varreduras na faixa espectral de 600 a 4.000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de varredura foram coletados e analisados utilizando-se o software Spectrum One (Spectrum One, versão 5.3).

4.2.1.6 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As determinações das propriedades térmicas dos materiais foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da FZEA-USP. O farelo de soja previamente seco (60 °C por 24 horas) e triturado, foi pesado (10 – 15 mg) em balança de precisão (Scientech, SA210) nas cápsulas de alumínio e mantido por 48 horas em um dessecador contendo um béquer com água, o que garantiu um ambiente com elevada umidade (100%). Após este período de condicionamento, as cápsulas foram hermeticamente seladas. Procedeu-se a análise das amostras no equipamento DSC TA2010 (TA Instruments). As amostras foram aquecidas de 15 a 120 °C com rampa de temperatura de 10 °C/min. Uma cápsula vazia foi usada como

referência. A entalpia de desnaturação (ΔH) e a temperatura de desnaturação (T_d) foram calculadas utilizando-se o software do equipamento, Universal Analyse V.3.9A (TA Instruments). O equipamento foi calibrado com Índio (TA Instruments) como padrão. Após as determinações, as cápsulas foram perfuradas e colocadas em estufa a 105 °C por 48 horas (AOAC, 2007), para completa secagem e determinação da massa de proteína em base seca.

4.2.2 Determinação de dados de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio e de cinética de extração (40 a 60 °C)

Foram determinados dados de equilíbrio sólido-líquido e de cinética de extração nas temperaturas de 40 a 60 °C, utilizando-se células construídas em vidro pyrex. As células, encamisadas, foram conectadas a um banho termostático, a fim de manter a temperatura do sistema constante durante todo o experimento. Em adição, as células foram seladas, com o intuito de evitar perdas de massa por evaporação. Os sistemas sólido-líquido foram obtidos adicionando-se massas conhecidas da soja (acondicionada em suporte, resistente ao ataque pelo solvente orgânico e temperatura, e permeável ao solvente e ao extrato), contactando-a com solvente em proporção mássica 1:3 (sólido:solvente). Para experimentos na condição de equilíbrio, os solventes avaliados continham 0, 6 e 12% de água, em massa, enquanto que para o estudo da cinética de extração foram utilizados somente os solventes com 0 e 6% de água. De maneira geral, os solventes hidratados foram preparados através de adição de água deionizada ao etanol absoluto. As quantidades pré-estipuladas de soja e solvente foram pesadas em béqueres, por diferença, e transferidas para a célula. Os sistemas sólido-líquido foram submetidos à agitação magnética (200 rpm) durante o tempo pré-determinado do experimento, 24 horas para os experimentos de extração na condição de equilíbrio e 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 90 e 120 minutos no caso dos experimentos de cinética de extração. Após este tratamento, amostras da fase alcoólica (extrato) foram extraídas com o auxílio de seringas e submetidas, imediatamente, às análises. A fase refinado foi submetida à pesagem em balança semi-analítica para determinação da quantidade de solução aderida às fibras e, também, submetida às análises.

Uma ilustração do procedimento experimental está representada na Figura 4.1.

Figura 4.1 - Procedimento para obtenção de dados de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio (40 a 60 °C) e cinética de extração de óleo de soja.

4.2.3 Determinação de dados de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio (70 a 90 °C)

Para a obtenção de dados de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio em temperaturas acima de 60 °C foi utilizado um extrator construído em aço inoxidável (Figura 4.2 e Figura 4.3). O tanque do equipamento é dotado de manômetro, válvula de escape (sistema de segurança) e rotor. O extrator é vedado hermeticamente, evitando perdas de massa por evaporação. Os controles da temperatura e da rotação são realizados por controladores próprios do equipamento. Os sistemas sólido-líquido foram obtidos adicionando-se massas conhecidas de soja (acondicionada em cesto de aço inox, resistente ao ataque pelo solvente orgânico e temperatura, e permeável ao solvente e ao extrato), contactando-a com massa conhecida de solvente etanólico mantendo a proporção farelo:solvente em 1:3. As quantidades pré-estipuladas de soja e solvente foram pesadas no suporte de aço inox e em béquer, respectivamente, por diferença, e transferidas para o extrator. O extrator foi submetido à agitação constante (175 rpm) até a temperatura atingir o valor desejado e mantido sob agitação constante por mais uma hora.

Após este tratamento, amostras da fase extrato foram retiradas pela válvula localizada na parte inferior do vaso e submetidas às análises. A fase refinado foi submetida à pesagem, em balança semi-analítica, e também submetida às análises.

Figura 4.2 - Esquema do extrator utilizado para obtenção dos dados de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio (70 a 90 °C).

(a)

(b)

Figura 4.3 - (a) Extrator confeccionado em aço inox. (b) Detalhe do cesto utilizado para acomodação do farelo.

4.2.4 Experimentos de extração de óleo de soja em configuração corrente cruzada

O procedimento descrito neste item foi realizado somente na temperatura de 80 °C, com solvente etanol contendo 0 e 6% de água, realizando-se duas extrações consecutivas sob as mesmas condições experimentais à partir de um mesmo farelo, conforme o esquema apresentado na Figura 4.4. Executou-se uma extração conforme o procedimento descrito no item 4.2.3. A fase extrato proveniente deste experimento de extração foi submetida às análises de teor de óleo, água, concentração de solvente e proteínas. Já a fase refinado resultante deste experimento foi pesada e mantida em descanso em temperatura ambiente até o total resfriamento do extrator. Após o extrator atingir a temperatura ambiente, a fase refinado foi pesada e colocada novamente no extrator. Procedeu-se uma nova extração repetindo-se o procedimento do item 4.2.3. As fases refinado e extrato resultantes da segunda extração foram submetidas às análises descritas a seguir.

Figura 4.4 - Esquema de extração sólido-líquido em corrente cruzada.

4.2.5 Análises das fases

4.2.5.1 Determinação da concentração de água na fase extrato

A concentração de água nos solventes etanólicos e nos extratos obtidos dos experimentos de extração foi determinada pelo método oficial de titulação Karl Fischer Ca 2e 55 (AOCS, 1998). Amostras de 0,01 a 1,0 g foram tituladas com solução de Karl Fischer (KF) utilizando-se como solvente metanol/clorofórmio na proporção 4:1, em volume. O título do reagente KF utilizado foi determinado no início

de cada titulação e a porcentagem mássica de água nas amostras, fornecida automaticamente pelo aparelho, foi calculada através da equação (4.3).

$$\text{Água (\%)} = (\text{vol. KF} \times \text{Título KF}) / \text{Mamostra} \times 100 \quad (4.3)$$

Onde: vol. KF = volume de solução de KF gasto na titulação (mL); *m* = massa de amostra (g).

4.2.5.2 Determinação da concentração de solvente (etanol + água) na fase extrato

A concentração de solvente (etanol + água) foi determinada por evaporação. Cerca de 1,0 g da fase extrato foi pesado em placa de petri, em quintuplicata, e levado a estufa de convecção forçada a 60 °C, por 24 horas. Este período foi pré-determinado através de pesagens consecutivas até obtenção de peso constante.

4.2.5.3 Determinação da concentração de ácidos graxos livres na fase extrato

A concentração de ácidos graxos livres, monitorada somente para os experimentos de cinética de extração, foi determinada por titulação com álcali pelo método a frio 2201 da IUPAC (1979) modificado utilizando um titulador potenciométrico, conforme procedimento descrito no item 4.2.1.2.

4.2.5.4 Determinação do teor de lipídeos na fase extrato através de extração com hexano

O procedimento descrito neste item foi realizado somente para a fase extrato proveniente do experimento de equilíbrio utilizando etanol com 12% de água, a 40 °C.

Foi proposta a utilização de hexano para extrair o óleo presente na fase extrato. Este procedimento foi baseado no fato de a mistura hexano-etanol-água-óleo apresentar miscibilidade parcial com a migração preferencial do óleo para a fase hexânica.

Tomou-se uma amostra de 31,01 g do extrato e adicionaram-se 107,34 g de hexano que foi particionado em 7 lavagens. Desta forma, uma parte de hexano era adicionada ao extrato, agitava-se bem e, em seguida, o tubo era centrifugado a 1500 rpm por 20 min para separação das fases. Formavam-se então duas fases, a inferior contendo basicamente o etanol do processo de extração e a fase superior contendo

hexano e óleo, que foi retirada com auxílio de seringas e transferida para um frasco de massa conhecida. Repetiu-se este procedimento até verificar ausência de coloração na fase superior, indicando total extração do óleo contido no extrato (total de 7 lavagens). Este frasco, contendo hexano e óleo, foi pesado e levado para secagem em estufa a vácuo a 60 °C por 24 horas para total evaporação do hexano, e pesado novamente ao final do período de secagem para quantificação do óleo extraído.

4.2.5.5 Composição em ácidos graxos de óleos de soja extraídos com etanol

Os óleos de soja obtidos dos experimentos de extração na condição de equilíbrio, de 70 a 90 °C, e, também, os óleos resultantes dos experimentos de extração em configuração corrente cruzada (itens 4.2.3 e 4.2.4) foram submetidos a análise de composição em ácidos graxos. Esta análise foi conduzida através de cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos de acordo com o método oficial 1-62 da AOCS (1998), utilizando-se como padrão interno metiltridecanoato (Zenebon et al., 2008), conforme procedimento descrito no item 4.2.1.3.

Para concentração do óleo, os extratos obtidos das extrações descritas nos itens 4.2.3 e 4.2.4 foram submetidos a evaporação do solvente em um rotaevaporador, sob vácuo de 600 mmHg, na temperatura de 50 °C. Foram realizadas pesagens consecutivas até obtenção de peso constante.

4.2.5.6 Determinação do conteúdo de proteína

A determinação do teor de proteína foi realizada através da quantificação do teor de nitrogênio presente nas amostras através do método oficial AOCS Ba 4e (1998), utilizando-se o determinador de proteína Leco (modelo FP-528). O equipamento foi calibrado com 150 mg de padrão EDTA (Leco).

As amostras das fases refinado e extrato, provenientes dos experimentos de extração, foram pesadas em placas de petri e levadas para secagem em estufa de convecção forçada a 60 °C por 24 horas. Este período foi previamente determinado para que o solvente fosse totalmente evaporado, o que foi garantido através de pesagens consecutivas até obtenção de peso constante.

A fase refinado seca foi triturada utilizando-se um liquidificador profissional (Skymssen, Modelo LI-Cocktail) para obtenção de um pó fino. Após este procedimento foram realizadas pesagens de aproximadamente 150 mg deste pó fino em folhas de estanho próprias para análise.

A fase extrato após a secagem, além do óleo extraído, continha uma camada sólida aderida à placa. Desta forma, raspou-se a placa com o auxílio de uma espátula e misturou-se bem as duas fases formadas, a fim de se obter amostras homogêneas. Cerca de 150 mg de amostra foram pesadas em folhas de estanho próprias para análise. Em seguida, adicionou-se um reagente sólido inerte (*Com aid*, Leco) cuja função é absorver a fase líquida, evitando que o óleo escorresse pela parede da folha.

Procedeu-se a análise das amostras no equipamento, tanto da fase extrato quanto refinado em quintuplicata, e obteve-se o teor de nitrogênio presente. A quantidade de proteína foi determinada multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,25 (AOAC, 2007).

4.2.5.7 Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) da fase refinado

As fases refinado obtidas dos experimentos de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio após a secagem, foram trituradas e caracterizadas em relação à solubilidade de nitrogênio pelo método de Morr et al. (1985) com modificações, conforme procedimento descrito no item 4.2.1.4.

4.2.5.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da fase refinado

A análise de FTIR foi realizada somente para as fases refinado obtidas dos experimentos de extração na configuração corrente cruzada (item 4.2.4). As análises foram conduzidas conforme previamente descrito no item 4.2.1.5.

4.2.5.9 Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) da fase refinado

A análise de DSC foi realizada somente para as fases refinado obtidas dos experimentos de extração na configuração corrente cruzada (item 4.2.4). As análises foram conduzidas conforme procedimento descrito no item 4.2.1.6.

4.2.6 Cálculos de balanço de massa para estimativa da composição

As estimativas das composições das fases refinado e massas das fases extrato foram realizadas conforme sugerido por Marcilla et al. (1995) e testado para sistemas de extração sólido-líquido por Rodrigues e Oliveira (2010) e Rodrigues et al. (2010).

No processo de extração sólido-líquido a soja, sólido que contém os sólidos solúveis, foi colocada em contato com o solvente (etanol) e, após o período de extração, este contato resultou duas fases distintas: uma denominada extrato e outra chamada de refinado.

O extrato caracteriza-se pela fase líquida, rica em solvente que está enriquecida dos compostos de interesse, e o refinado possui todos os sólidos que são insolúveis no etanol, mas, ainda assim, agregado de uma fração do extrato que fica retida na matéria sólida.

Para os experimentos de extração na condição de equilíbrio ou experimentos de cinética de extração, podem ser escritos i balanços independentes por componente do sistema (Marcilla et al., 1995):

$$M^{PM} w_i^{PM} = M^{FR} w_i^{FR} + M^{FE} w_i^{FE} \quad (4.4)$$

onde, M^{PM} é a massa da mistura inicial ou ponto de mistura, M^{FE} e M^{FR} são as massas das fases extrato e refinado, respectivamente; w_i^{PM} é a fração mássica do componente i na mistura inicial e w_i^{FE} e w_i^{FR} são as frações mássicas do componente i nas fases extrato e refinado, respectivamente.

Através destas i equações, torna-se possível calcular os valores de w_i^{FR} com base nos valores experimentais de w_i^{FE} e M^{FR} , pelo método dos mínimos quadrados.

Se $\mathbf{M}$ é a matriz formada pelos valores de w_i^{PM} , $\mathbf{B}$ é a matriz transformação (composta pelos valores de w_i^{FE} e w_i^{FR}) e $\mathbf{P}$ é a matriz formada pela massa de cada fase (M^{FR} e M^{FE}), o sistema pode ser escrito como:

$$\mathbf{M} = \mathbf{B} \mathbf{x} \mathbf{P} \quad (4.5)$$

Cálculos matemáticos levam à seguinte expressão:

$$\mathbf{P} = (\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1} \mathbf{B}^T \mathbf{M} \quad (4.6)$$

onde $\mathbf{B}^T$ é a matriz transposta de $\mathbf{B}$ e $(\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1}$ é a matriz inversa de $(\mathbf{B}^T \mathbf{B})$. Desta forma, os valores de M^{FE} e w_i^{FR} que minimizam os erros do sistema podem ser calculados.

Vale ressaltar que M^{FR} foi avaliada para cada sistema e pelo balanço de massa global:

$$M^{PM} = M^{FR} + M^{FE} \quad (4.7)$$

O desvio relativo global, δ , entre a soma ($M^{FE} + M^{FR}$) e M^{PM} , pode ser calculado de acordo com a expressão (4.8).

$$\delta = (|(M^{FR} + M^{FE}) - M^{PM}|/M^{PM}) \times 100 \quad (4.8)$$

O desvio relativo para cada componente i do sistema, δ_i , pode ser calculado através da Equação (4.9).

$$\delta_i = (|(M^{FR} w_i^{FR} + M^{FE} w_i^{FE}) - M^{PM} w_i^{PM}|/M^{PM} w_i^{PM}) \times 100 \quad (4.9)$$

4.2.7 Análise estatística

Os valores médios dos resultados provenientes dos experimentos de extração na condição de equilíbrio foram comparados por análise de variância utilizando o teste de Tukey ao nível de significância de 5%, com o auxílio do programa SAS® (Versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

No caso dos resultados referentes ao ISN e a composição em ácidos graxos, as médias foram comparadas por análise de variância utilizando teste de Duncan ao nível de significância de 5%, com o auxílio do programa SAS® (Versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.2.8 Procedimento de modelagem dos dados de cinética de extração de óleo de soja

A extração de óleos de sementes oleaginosas, baseada na solubilização do material lipídico, é governada principalmente pelo processo de difusão. O modelo matemático de So e MacDonald (1986) considera que essa extração ocorre de acordo com dois processos simultâneos: (a) o óleo presente na superfície dos grãos é removido por simples lavagem com o solvente, no início do processo de extração do óleo; e (b) a extração do óleo remanescente nas células é realizada pelo processo de difusão do óleo de dentro dos grãos para o solvente.

Desta forma, a concentração (C_t) de óleo no solvente em qualquer tempo (t) pode ser descrita através da Equação (4.10).

$$C_t = C_e^l(1 - \exp(-k_l x t)) + C_e^d(1 - \exp(-k_d x t)) \quad (4.10)$$

Onde C_e^l e C_e^d representam as concentrações de óleo no solvente (g óleo/100 g solvente) na condição de equilíbrio, nas etapas de lavagem e difusão, respectivamente; e k_l e k_d representam os coeficientes de transferência de massa (min^{-1}) nas etapas de lavagem e difusão.

Os valores de C_e^l , C_e^d , k_l e k_d foram calculados com o método de ajuste não linear de Marquardt utilizando o programa SAS[®] (Versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

É importante notar que a concentração final de óleo no extrato, no tempo igual a infinito será:

$$C_e = C_e^l + C_e^d \quad (4.11)$$

Onde, C_e é a concentração de óleo no extrato na condição de equilíbrio, valor este que é obtido experimentalmente.

O desvio relativo médio, DRM , entre o valor experimental e o obtido através do modelo pode ser calculado de acordo com a expressão (4.12).

$$DRM = \sum[(|exp - calc|)/exp] \times 100 / (\text{número de dados}) \quad (4.12)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como previamente comentado no item 4.2.1, a soja expandida utilizada nos experimentos foi inicialmente macerada e peneirada em peneiras granulométricas de aço inox, por apresentar alta variabilidade de tamanhos e formas (Figura 5.1a). A matéria-prima com tamanhos entre *mesh* 10 e 14 (Figura 5.1b) foi empregada nos experimentos.

Figura 5.1 - Soja expandida Granol: (a) *in natura*; (b) tamanhos de partículas entre *mesh* 10 e 14.

5.1 Caracterização da matéria-prima

A composição da matéria-prima soja expandida utilizada nos experimentos de extração pode ser visualizada nas Tabelas 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1 - Composição química da soja expandida.

Componente	Lote 1	Lote 2
	Média ± desvio padrão (%)	Média ± desvio padrão (%)
Umidade	6,76 ± 0,63	7,44 ± 0,43
Proteínas ^{a,b}	41,60 ± 0,92	43,45 ± 1,07
Lipídeos ^a	25,58 ± 0,19	23,30 ± 0,20
Fibras ^a	20,06 ± 0,09	10,87 ± 0,31
Cinzas ^a	5,17 ± 0,03	4,97 ± 0,01
Carboidrato não fibroso ^{a,c}	7,59 ± 1,86	17,41 ± 2,02
Ácidos graxos livres ^a	0,42 ± 0,11	0,82 ± 0,15

^a em base seca. ^b N x 6,25. ^c calculado por diferença.

É possível verificar a partir dos resultados apresentados na Tabela 5.1 que a soja utilizada nos experimentos apresentou a composição típica de grãos de soja (40,7% de proteínas, 21,4% de óleo, 4,56% de cinzas e 29,4% de carboidratos), de acordo com Hammond et al. (2005).

Com relação à composição em ácidos graxos, apresentada na Tabela 5.2, é possível notar que o óleo extraído da soja, matéria-prima deste trabalho, apresentou-se de acordo com os dados apresentados por Firestone (2006).

Vale enfatizar que alguns resultados mostrados nas Tabelas 5.1 e 5.2, tais como fibras e carboidratos não fibrosos, apresentaram grande variação no valor entre os lotes devido ao recebimento destes ter ocorrido em diferentes épocas. De fato, variações na composição são comuns e podem ser decorrentes de variações climáticas, tipos de solo, etc.

Tabela 5.2 - Composição em ácidos graxos do óleo contido na soja expandida.

Símbolo	Ácido graxo	Cx:y ^a	MM ^b (g·mol ⁻¹)	Mol (%)		Massa (%)		Massa (%) ^c
				Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	
P	Palmítico	C16:0	256,43	12,78	12,81	11,79 ± 0,09	11,83 ± 0,16	9,70 – 13,30
S	Esteárico	C18:0	284,49	3,24	2,70	3,32 ± 0,14	2,76 ± 0,02	3,00 – 5,40
O	Oleico	C18:1	282,47	24,52	18,01	24,92 ± 0,19	18,32 ± 0,04	17,70 – 28,50
Li	Linoleico	C18:2	280,45	52,07	57,94	52,54 ± 1,06	58,52 ± 0,25	49,80 – 57,10
Ln	Linolênico	C18:3	278,44	7,28	8,54	7,92 ± 0,21	8,56 ± 0,01	5,50 – 9,50
Be	Behênico	C22:0	340,60	0,25	nd	0,30 ± 0,02	nd	0,30 – 0,70
Massa molar média (g·mol ⁻¹)						277,9 ± 4,7	277,7 ± 1,3	260,5 – 278,5
Índice de iodo						131,5 ± 2,2	139,5 ± 0,4	118,0 – 139,0
Razão Insaturados/Saturados						5,61 ± 0,16	5,85 ± 0,06	4,61 – 5,57

nd: não detectado. ^a Cx:y, x=número de carbonos e y=número de duplas ligações. ^b Massa molar. ^c Firestone (2006).

5.2 Avaliação da Qualidade dos Dados Experimentais

Neste trabalho objetivou-se a avaliação do impacto do nível de água no solvente etanólico e da temperatura de processo na extração de compostos graxos e proteicos presentes na soja expandida. Desta forma, optou-se por expressar os resultados obtidos através de rendimento (g de composto extraído/100 g de farelo de soja).

Para o cálculo dos valores de rendimento é necessário o conhecimento da fração mássica do composto em estudo nas fases extrato e refinado.

As concentrações dos compostos na fase extrato foram determinadas diretamente através das análises descritas nos itens 4.2.5.1 a 4.2.5.3, e 4.2.5.6. No entanto, a quantificação do teor de compostos graxos na fase refinado, ou seja, teor de óleo que não foi extraído, fica prejudicada analiticamente e foi, neste trabalho, determinada por balanço de massa, segundo procedimento descrito no item 4.2.6. Por outro lado, a análise de proteínas foi realizada, também, para a fase refinado.

A qualidade dos dados experimentais pôde ser avaliada através do cálculo dos desvios pelo método de Marcilla et al. (1995). Os desvios para cada sistema estudado, calculados de acordo com a Equação (4.8) são mostrados na Tabela 5.3. Nesta tabela é apresentado, ainda, o número de repetições realizado para cada condição experimental estudada. A quantidade de repetições para cada condição não foi padronizada, mas foi definida de acordo com a qualidade dos resultados conforme foram sendo obtidos. Entretanto, é importante ressaltar que foram realizadas no mínimo três repetições de cada condição experimental referente ao estudo da extração sólido-líquido na condição de equilíbrio.

Tabela 5.3 - Desvios obtidos para os sistemas estudados (experimentos de extração na condição de equilíbrio), calculados através da metodologia proposta por Marcilla et al. (1995).

T (°C)	Solvente etanol	δ (Desvio relativo médio (%))	Número de repetições
40	Com 0% de água	1,55	6
	Com 6% de água	1,57	6
	Com 12% de água	1,72	6
50	Com 0% de água	1,47	6
	Com 6% de água	1,56	5
	Com 12% de água	1,43	5
60	Com 0% de água	1,10	5
	Com 6% de água	1,57	8
	Com 12% de água	1,61	5
65	Com 6% de água	1,56	3
70	Com 0% de água	1,15	4
	Com 6% de água	0,92	5
80	Com 0% de água	1,04	6
	Com 6% de água	0,90	5
90	Com 0% de água	0,93	5
	Com 6% de água	1,24	5

Como pode ser observado na Tabela 5.3, os valores de desvio relativo (δ), referentes aos experimentos de extração na condição de equilíbrio, variaram de 0,90 a 1,72%, com uma maior concentração em torno de 1,3%. Já para os dados de cinética de extração, os desvios relativos encontrados variaram de 0 a 2,26%, com uma maior concentração em torno de 0,25%.

Estes desvios são referentes à checagem do balanço de massa, ou seja, à comparação entre as massas da mistura inicial e massas das fases refinado e extrato. Os baixos valores de desvios obtidos, muito menores que 10%, denotam que os experimentos foram realizados de forma cautelosa, indicando precisão, repetibilidade e uma boa qualidade dos dados.

5.3 Estudo do Processo de Extração Sólido-líquido na Condição de Equilíbrio

Foram realizados 85 experimentos de extração para obtenção de dados de extração na condição de equilíbrio, conforme as combinações apresentadas na Tabela 5.4. A quantidade realizada de repetições, para cada condição experimental,

é apresentada na Tabela 5.3, sendo que foram realizadas no mínimo 3 repetições para cada condição estudada.

Tabela 5.4 - Condições experimentais empregadas nos experimentos de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio.

T (°C)	Teor de água no Solvente (% em massa)
40,0 ± 0,1	0,09 ± 0,06
	6,06 ± 0,34
	12,03 ± 0,58
50,0 ± 0,1	0,08 ± 0,06
	5,96 ± 0,13
	11,86 ± 0,35
60,0 ± 0,1	0,07 ± 0,05
	5,92 ± 0,25
	11,87 ± 0,47
65,0 ± 0,1	6,16 ± 0,17
70,0 ± 0,1	0,14 ± 0,03
	5,98 ± 0,52
80,0 ± 0,1	0,14 ± 0,02
	5,98 ± 0,17
90,0 ± 0,1	0,14 ± 0,04
	5,33 ± 0,30

Para cada experimento foram realizadas análises das fases extrato as quais compreenderam o monitoramento de água, compostos lipídicos, proteínas e composição em ácidos graxos. Para a fase refinado foi realizada análise de proteínas e sua solubilidade.

O teor de água presente na fase extrato oriunda de cada condição experimental estudada pode ser visualizado na Figura 5.2.

Figura 5.2 - Teor de água na fase extrato como função da temperatura. □ Etanol com 0% de água; ○ Etanol com 6% de água; △ Etanol com 12% de água. Água em % mássica.

Através da Figura 5.2 é possível verificar que, mesmo experimentos utilizando etanol absoluto como solvente apresentam uma fração de água na fase extrato, proveniente da matéria-prima. No caso de solventes contendo maior teor de água, a fração de água no extrato é composta basicamente pelo teor de água inicial do solvente. De fato, quanto maior o teor de água inicial do solvente menor a transferência de água da matéria-prima para a fase extrato.

A Tabela 5.5 apresenta a análise de variância dos resultados apresentados na Figura 5.2, ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.5 - Análise de Variância para teor de água na fase extrato.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado (95%, 15, 69)
Modelo	15	1.186,64	79,11	619,76	1,83
Residual	69	8,81	0,13		
Total	84	1.195,45			
R²^a	0,99				

^a coeficiente de determinação.

Como pode ser visto na Tabela 5.5 os resultados apresentam um elevado coeficiente de determinação indicando dados experimentais de boa qualidade, além do valor de F calculado ser bem maior que o F tabelado o que indica boa confiabilidade na análise estatística.

A Tabela 5.6 traz a análise estatística de comparação entre as médias dos valores de teor de água na fase extrato, pelo Teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.6 - Teor de água na fase extrato (% em massa) para diferentes condições experimentais de extração.

Temperatura (°C)	Teor de água no solvente etanol		
	0%	6%	12%
40	2,05 ± 0,16 aA	7,23 ± 0,48 aB	12,65 ± 0,58 aC
50	2,07 ± 0,25 aA	6,96 ± 0,39 aB	12,49 ± 0,43 aC
60	1,96 ± 0,14 aA	7,06 ± 0,26 aB	12,13 ± 0,40 aC
65		8,16 ± 0,56 a	
70	2,21 ± 0,15 abA	7,16 ± 0,39 aB	
80	2,44 ± 0,22 bA	7,16 ± 0,43 aB	
90	2,39 ± 0,24 bA	6,96 ± 0,26 aB	

*médias seguidas por letra minúscula diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. Médias seguidas por letra maiúscula diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

Os resultados apresentados na Tabela 5.6 mostram que o teor de água presente nas fases extrato provenientes das extrações com etanol absoluto foram superiores para temperaturas acima de 70 °C. Este resultado pode ser devido ao maior teor de água inicial no solvente (0,14%) utilizado nos experimentos de 70 a 90 °C (vide Tabela 5.4), enquanto que nos experimentos de 40 a 60 °C, este valor ficou em torno de 0,08%.

Em geral, os resultados apresentados na Tabela 5.6 permitem inferir que a transferência de água para a fase extrato não é um fator dependente da temperatura, contudo, o teor de água inicial no solvente atua de forma significativa ($p < 0,05$) na extração da água da estrutura sólida para o solvente, assim, o etanol

absoluto extrai mais água da matéria-prima do que solventes com maior teor de água.

O teor de água presente na fase extrato foi monitorado em estudos realizados por Rodrigues e Oliveira (2010) e Rodrigues et al. (2010), nos quais também observou-se que a transferência de água do sólido para a fase extrato é independente da temperatura.

Rodrigues (2011) reporta que o processo de transferência de água, do farelo para a fase extrato, praticamente independe da temperatura sendo que este comportamento pode ser decorrente da existência de equilíbrio entre a umidade contida no sólido e o teor de água no solvente utilizado. Desta forma, o etanol absoluto, quando utilizado para a extração do óleo, extrai maior quantidade de água contida na estrutura sólida quando comparado a um solvente etanólico com alto teor de água.

Este fenômeno de hidratação do solvente etanólico foi previamente reportado por Abraham et al. (1993) e Franco et al. (2007), para as matérias-primas algodão e Rosa rubiginosa, respectivamente. No trabalho de Rodrigues (2011) bem como nesta dissertação de mestrado, as matérias-primas avaliadas, farelo de arroz em *pellets*, soja laminada e soja expandida, respectivamente, foram utilizadas sem secagem prévia o que permitiu a visualização do fenômeno de hidratação do solvente.

Na Figura 5.3 podem ser observados os rendimentos máximos de extração de óleo de soja resultantes das diferentes condições de processo estudadas.

Figura 5.3 - Rendimento da extração de óleo de soja como função da temperatura. □ Etanol com 0% de água; ○ Etanol com 6% de água; △ Etanol com 12% de água. Água em % mássica.

A análise de variância ($p < 0,05$) dos resultados apresentados na Figura 5.3 é apresentada na Tabela 5.7, onde pode ser verificado um elevado coeficiente de determinação indicando dados experimentais de boa qualidade. Além disso, o valor calculado de F é muito maior que o valor tabelado, indicando um bom nível de confiança quanto às conclusões obtidas.

Tabela 5.7 - Análise de Variância (ANOVA) para rendimento da extração de óleo de soja.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado (95%, 15, 66)
Modelo	15	5.638,22	375,88	306,64	1,83
Residual	66	80,90	1,23		
Total	81	5.719,12			
R^2^a	0,99				

^a coeficiente de determinação.

A Tabela 5.8 apresenta os rendimentos médios das extrações de óleo de soja, sendo a análise estatística realizada ao nível de significância de 5%, pelo Teste de Tukey.

Tabela 5.8 - Rendimento médio de óleo (g óleo/100 g de soja) para diferentes condições experimentais de extração.

Temperatura (°C)	Teor de água no solvente etanol					
	0%		6%		12%	
40	15,42 ± 1,61	aA	2,38 ± 0,95	aB	-0,86 ± 1,01*	aC
50	18,49 ± 1,31	bA	4,51 ± 1,12	abB	0,37 ± 1,02	abC
60	20,70 ± 0,83	cA	6,69 ± 1,20	bB	0,88 ± 1,08	bC
65			9,84 ± 1,09	c		
70	19,53 ± 1,24	bcA	13,47 ± 1,95	dB		
80	20,67 ± 0,63	cA	18,84 ± 0,47	eB		
90	20,44 ± 0,31	bcA	21,25 ± 0,33	fB		

*o valor médio negativo é decorrente da baixa concentração de óleo no extrato e alta variabilidade da análise. **médias seguidas por letra minúscula diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. Médias seguidas por letra maiúscula diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

Realizando-se um comparativo entre os solventes utilizados, verifica-se que o teor de água apresentou influência significativa nos resultados, sendo que o etanol absoluto foi o que apresentou, em média, a maior capacidade de extração de óleo, com rendimento médio de 19 g de óleo/100 g de soja.

Com relação à temperatura, para cada tipo de solvente foram obtidos resultados diferentes. Para o etanol absoluto pode-se dizer que os rendimentos de óleo nas temperaturas de 60 a 90 °C foram estatisticamente iguais e superiores ao rendimento da extração a 40 °C. Já para etanol contendo 6% de água, verifica-se uma tendência de aumento do rendimento de óleo com a elevação da temperatura, sendo, o rendimento máximo, obtido a 90 °C, superior ao obtido com etanol absoluto. No caso do solvente etanol com 12% de água, a temperatura também apresentou influência significativa na extração de óleo, entretanto, este solvente apresentou pouca capacidade de extração de compostos lipídicos. Isto foi comprovado contactando-se o extrato obtido da extração utilizando etanol com 12% de água a 40 °C, com hexano (vide procedimento no item 4.2.5.4). A pesagem após o período de secagem possibilitou quantificar o óleo extraído, que foi 0,61 g.

Sendo o hexano o solvente mais empregado na extração de óleo de soja, devido as suas características de afinidade com os lipídeos, a lavagem do extrato com este solvente possibilitou a quantificação de 1,97% de material lipídico na fase

extrato, confirmando a baixa capacidade do solvente contendo 12% de água em extrair grande quantidade do óleo da soja.

Desta forma, com base nos resultados apresentados pode-se inferir que o aumento do teor de água no solvente suprime a extração de componentes lipídicos, provavelmente, devido à diminuição da solubilidade do óleo. Em contraste, pode-se observar que a elevação da temperatura favorece a transferência de compostos lipídicos. Alguns trabalhos apresentam conclusão semelhante, como em Kwiatkowski e Cheryan (2002), Rao e Arnold (1958), Sato et al. (1934), Rodrigues e Oliveira (2010) e Beckel et al. (1948). Este último apresenta dados de um trabalho realizado por Okatomo (1937) o qual estudou a miscibilidade de óleo de soja em etanol contendo diversas proporções de água. O autor concluiu que a menor concentração do etanol, ou seja, o maior teor de água no solvente reduz consideravelmente a solubilidade e que o aumento da temperatura eleva a miscibilidade do óleo no solvente, facilitando a transferência dos compostos entre as fases.

A Figura 5.4 apresenta o rendimento de óleo com relação ao total de óleo de soja disponível na soja expandida. Estes resultados possibilitam visualizar que o etanol absoluto se destaca quanto à capacidade de extração lipídica quando comparado aos solventes contendo água, sendo que processos de extração realizados sob temperaturas acima de 60 °C possibilitaram extrair mais de 80% do total de óleo presente no farelo de soja. No caso do solvente etanol com 6% de água, esta capacidade de extração é conseguida utilizando-se temperaturas acima de 80 °C. No entanto, a 90 °C os dois solventes, contendo 0 e 6% de água, apresentam capacidade de extração estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Figura 5.4 - Rendimento da extração de óleo em relação ao total de óleo presente na soja em função da temperatura. □ Etanol com 0% de água; ○ Etanol com 6% de água; △ Etanol com 12% de água. Água em % mássica.

Na Figura 5.5 podem ser visualizadas as aparências das fases refinado obtidas dos procedimentos de extração de óleo nas diferentes condições de processo estudadas. É notável a diferença na coloração das fases refinado obtidas, principalmente comparando-se as fases refinado obtidas da extração de óleo com etanol absoluto com os demais solventes. As fases refinado provenientes das extrações com etanol absoluto apresentam uma coloração bem mais clara, fato que é justificado pela maior quantidade de óleo que foi extraído. Para os refinados obtidos das extrações com etanol contendo 6% de água é possível verificar que a coloração se torna mais clara com o aumento da temperatura, resultado da tendência do aumento da extração de óleo, conforme os resultados apresentados pela Figura 5.4.

Figura 5.5 - Fases Refinado obtidas da extração de óleo com etanol contendo diferentes teores de água e diferentes temperaturas.

Um dos objetivos desta dissertação de mestrado foi mensurar experimentalmente o nível de extração de compostos não lipídicos da soja durante o processo de obtenção de óleo, utilizando-se como solvente o etanol. Desta forma, o rendimento de proteína na fase extrato pode ser visualizado na Figura 5.6. A Tabela 5.9 apresenta a ANOVA dos resultados e a Tabela 5.10 apresenta a análise estatística das médias pelo Teste de Tukey, ambas ao nível de 5% de significância.

Em geral, observa-se uma maior concentração de proteínas na fase extrato quanto maior o teor de água no solvente, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas numa mesma temperatura para os três solventes estudados, exceto para extrações a 90 °C. Nesta temperatura, pode-se dizer que o teor de proteína que migra para a fase extrato é estatisticamente igual, tanto na presença como na ausência de água no solvente.

Figura 5.6 - Rendimento de proteína na fase extrato como função da temperatura. □ Etanol com 0% de água; ○ Etanol com 6% de água; △ Etanol com 12% de água. Água em % mássica.

Tabela 5.9 - Análise de Variância (ANOVA) para rendimento de proteína na fase extrato.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado (95%, 15, 68)
Modelo	15	351,35	23,42	44,62	1,83
Residual	68	35,70	0,52		
Total	83	387,05			
R^2 ^a	0,91				

^a coeficiente de determinação.

Tabela 5.10 - Rendimento médio de proteína na fase extrato (g proteína/100 g de farelo) para diferentes condições experimentais de extração.

Temperatura (°C)	Teor de água no solvente etanol		
	0%	6%	12%
40	1,15 ± 0,27 abA	4,90 ± 0,99 aB	6,85 ± 1,41 aC
50	1,00 ± 0,19 aA	4,56 ± 0,77 aB	6,38 ± 1,12 aC
60	0,94 ± 0,34 aA	4,20 ± 0,84 abB	6,77 ± 0,84 aC
65		4,34 ± 0,93 a	
70	1,19 ± 0,19 abA	2,82 ± 0,31 bcB	
80	1,64 ± 0,24 bcA	2,30 ± 0,25 cB	
90	1,98 ± 0,33 cA	2,62 ± 0,61 cA	

*médias seguidas por letra minúscula diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. Médias seguidas por letra maiúscula diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

De maneira geral, verifica-se um aumento da afinidade das proteínas pelo solvente quanto maior a presença de água neste. Kwiatkowski e Cheryan (2002) avaliaram o rendimento de proteína da extração de óleo de milho, a 50 °C, utilizando etanol com diferentes níveis de hidratação. Os autores observaram que o aumento do teor de água no solvente leva a uma maior concentração proteica no extrato, assim como nos resultados encontrados neste trabalho.

Nos resultados apresentados na Tabela 5.10 para o solvente contendo 6% de água, pode-se notar uma grande diminuição no rendimento de proteína nos extratos obtidos na faixa de temperatura de 70 a 90 °C, quando comparados aos resultados obtidos na faixa de 40 a 65 °C. Isto possivelmente ocorreu devido à desnaturação proteica associada à elevada temperatura, uma vez que as proteínas se desnaturam em temperaturas acima de 50 °C (Vodjani, 1996). A presença da água do solvente pode ter contribuído para a desnaturação já que esta diminuição não foi visualizada para os resultados obtidos com o etanol absoluto. Os efeitos da temperatura de extração e da presença da água no solvente na desnaturação proteica ficarão evidenciados nos itens 5.3.2 e 5.4.3.

O teor de proteína no farelo, antes e após o processo de extração do óleo, foi monitorado em cada condição experimental e os resultados são apresentados na Figura 5.7.

Figura 5.7 - Teor de proteína na fase refinado em função da temperatura, comparado ao teor de proteína do farelo de soja inicial ($42,3 \pm 1,4\%$, base seca).

Nas Tabela 5.11 e Tabela 5.12 são apresentadas as análises estatísticas dos resultados visualizados na Figura 5.7.

Tabela 5.11 - Análise de Variância (ANOVA) para teor de proteína na fase refinado.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado (95%, 16, 74)
Modelo	16	1.408,18	88,01	33,54	1,79
Residual	74	194,17	2,62		
Total	90	1.602,35			
R²^a	0,88				

^a coeficiente de determinação.

Tabela 5.12 - Teor de proteína na fase refinado para diferentes condições experimentais de extração.

Temperatura (°C)		Teor de água no solvente etanol					
		0%		6%		12%	
	Farelo inicial	42,27±1,38	a	42,27±1,38	a	42,27±1,38	a
40	42,27±1,38 A	47,57±0,84	bB	43,00±0,59	abC	42,22±1,43	aAC
50	42,27±1,38 A	48,83±1,77	bB	43,51±0,85	abA	41,69±1,21	aA
60	42,27±1,38 A	49,56±1,35	bcB	45,54±2,30	bcC	42,61±1,55	aA
65				49,10±0,74	c		
70	42,27±1,38 A	51,46±1,51	cdB	47,43±2,05	cC		
80	42,27±1,38 A	51,81±1,21	cdB	52,00±1,74	dB		
90	42,27±1,38 A	52,80±3,21	dB	52,53±1,15	dB		

*médias seguidas por letra minúscula diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. Médias seguidas por letra maiúscula diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

Em geral, pode-se dizer que os teores de proteína presentes nas fases refinado são superiores ao teor de proteína presente inicialmente na soja, exceto para as fases refinado obtidas com solvente contendo 12% de água. Este fato está relacionado com a capacidade de extração de óleo inerente as condições de processo adotadas, ou seja, quanto maior a quantidade de óleo que foi retirada da fase refinado, maior será o teor de proteína presente nesta. Desta forma, como o solvente contendo 12% de água apresentou pouca capacidade de extração de óleo, o teor de proteína neste refinado se apresenta estatisticamente igual ($p < 0,05$) a quantidade de proteína presente antes do processo de extração. Para os demais

solventes a tendência para o teor de proteína no refinado é a mesma verificada para a extração de óleo (Figura 5.4), sendo que nas temperaturas mais elevadas (80 e 90 °C) estes valores são estatisticamente iguais, independente da presença ou ausência de água no solvente.

Adicionalmente, é possível notar que o teor de proteína que migrou para a fase extrato, em cada condição, encontra-se em acordo com a fração que se manteve na fase refinado. Para solvente contendo 12% de água verifica-se maior migração de proteínas para fase extrato, conseqüentemente, esta concentração na fase refinado é menor.

5.3.1 Composição em ácidos graxos dos óleos obtidos nas temperaturas de 70 a 90 °C

A qualidade de um óleo pode ser determinada avaliando-se alguns índices, dentre eles: a composição e o conteúdo de ácidos graxos, índice de iodo e a razão entre o conteúdo de ácidos graxos insaturados e saturados. Desta maneira, com a finalidade de avaliar a influência das variáveis temperatura (70, 80 e 90 °C) e teor de água no solvente (0 e 6%, em massa) sobre a composição em ácidos graxos dos óleos extraídos, os extratos provenientes de cada tratamento foram submetidos à análise de cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos, e estes resultados podem ser visualizados na Tabela 5.13. A Tabela 5.14 apresenta os valores médios de massas molares, índice de iodo e razão entre ácidos graxos insaturados e saturados para cada condição experimental avaliada.

A composição em ácidos graxos e as propriedades químicas dos óleos obtidos com solvente etanol foram comparadas com a composição de um óleo obtido da matéria-prima deste trabalho, soja expandida, através da metodologia a frio sugerida por Bligh e Dyer (1959). Esta comparação é justificada pelo fato de que, através deste método, os lipídeos são obtidos sem a necessidade da aplicação de calor, permitindo uma quantificação mais exata do teor e da composição em ácidos graxos livres. Desta forma, o óleo obtido pelo método de Bligh e Dyer foi utilizado como uma referência para fins de avaliação dos efeitos das variáveis na composição dos extratos.

As análises estatísticas da composição em ácidos graxos dos óleos obtidos de diferentes condições experimentais, apresentadas nas Tabelas 5.13 e 5.14, permitem notar que não há grandes diferenças quanto aos teores dos ácidos graxos presentes nos óleos de soja. É possível notar, na Tabela 5.13, que alguns ácidos graxos que não foram detectados no óleo extraído a frio pelo método sugerido por Bligh e Dyer, aparecem em pequena quantidade nos extratos obtidos utilizando-se etanol como solvente. Pode-se dizer, ainda, que os óleos obtidos nas condições estudadas apresentaram composição típica de óleo de soja, estando de acordo com os dados encontrados em Firestone (2006).

Em estudo semelhante, realizado por Oliveira et al. (2012b), avaliou-se a composição do óleo de farelo de arroz obtido por extração com solvente etanol contendo diferentes níveis de hidratação, na faixa de temperatura de 60 a 90 °C. Os autores não observaram mudanças significativas nas composições dos óleos obtidos com etanol e que estes apresentaram, ainda, a composição típica de óleo de farelo de arroz.

Tabela 5.13 - Composição em ácidos graxos dos óleos obtidos de diferentes condições experimentais (% mássica: média $\pm$ desvio padrão).

Solvente Temperatura	Etanol com 0% de água			Etanol com 6% de água			Bligh Dyer ^a	Literatura ^b % massa
	70	80	90	70	80	90		
Mirístico C14:0	<i>nd</i>	0,09 $\pm$ 0,00 A	0,10 $\pm$ 0,15 ^d A	0,04 $\pm$ 0,06 ^d A	0,04 $\pm$ 0,06 ^d A	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0 - 0,2
Palmítico C16:0	11,12 $\pm$ 0,25 A	11,32 $\pm$ 0,32 A	11,22 $\pm$ 0,03 A	11,59 $\pm$ 0,76 A	11,02 $\pm$ 0,08 A	11,73 $\pm$ 0,04 A	11,80 $\pm$ 0,04 A	9,7 - 13,3
Palmitoleico C16:1	<i>nd</i>	0,09 $\pm$ 0,00 A	0,07 $\pm$ 0,10 ^d A	0,04 $\pm$ 0,06 ^d A	0,07 $\pm$ 0,02 A	0,05 $\pm$ 0,07 ^d A	<i>nd</i>	0 - 0,2
Margárico C17:0	<i>nd</i>	0,10 $\pm$ 0,01 A	0,05 $\pm$ 0,07 ^d A	0,05 $\pm$ 0,07 ^d A	0,08 $\pm$ 0,02 A	0,11 $\pm$ 0,01 A	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Esteárico C18:0	3,10 $\pm$ 0,09 BC	3,80 $\pm$ 0,14 A	2,52 $\pm$ 0,51 C	3,57 $\pm$ 0,17 AB	3,86 $\pm$ 0,02 A	3,62 $\pm$ 0,00 AB	3,04 $\pm$ 0,39 BC	3,0 - 5,4
Oleico C18:1	22,22 $\pm$ 3,43 AB	24,83 $\pm$ 5,05 AB	19,00 $\pm$ 0,04 B	24,08 $\pm$ 5,61 AB	28,60 $\pm$ 0,01 A	20,81 $\pm$ 0,01 AB	21,60 $\pm$ 4,64 AB	17,7 - 28,5
Linoleico C18:2	55,04 $\pm$ 3,13 AB	52,41 $\pm$ 4,34 AB	57,92 $\pm$ 0,07 A	53,21 $\pm$ 4,69 AB	49,39 $\pm$ 0,09 B	55,94 $\pm$ 0,14 AB	55,49 $\pm$ 4,29 AB	49,8 - 57,1
Araquídico C20:0	0,31 $\pm$ 0,10 A	0,24 $\pm$ 0,02 A	0,20 $\pm$ 0,00 A	0,20 $\pm$ 0,01 A	0,22 $\pm$ 0,01 A	0,22 $\pm$ 0,01 A	<i>nd</i>	0,1 - 0,6
Gadoleico C20:1	0,20 $\pm$ 0,03 A	0,20 $\pm$ 0,01 A	0,17 $\pm$ 0,03 A	0,18 $\pm$ 0,03 A	0,20 $\pm$ 0,00 A	0,18 $\pm$ 0,00 A	<i>nd</i>	0 - 0,3
Linolenico C18:3	7,62 $\pm$ 0,14 AB	6,27 $\pm$ 0,53 C	8,17 $\pm$ 0,12 A	6,44 $\pm$ 0,52 C	5,96 $\pm$ 0,00 C	6,74 $\pm$ 0,03 BC	7,92 $\pm$ 0,91 A	5,5 - 9,5
Behênico C22:0	0,32 $\pm$ 0,03 AB	0,41 $\pm$ 0,03 A	0,30 $\pm$ 0,01 AB	0,34 $\pm$ 0,01 AB	0,38 $\pm$ 0,01 A	0,40 $\pm$ 0,00 A	0,15 $\pm$ 0,21 ^d B	0,3 - 0,7
Lignocérico C24:0	<i>nd</i>	0,15 $\pm$ 0,00 A	0,09 $\pm$ 0,12 ^d A	0,12 $\pm$ 0,00 A	0,14 $\pm$ 0,00 A	0,14 $\pm$ 0,00 A	<i>nd</i>	0 - 0,4
EPA ^c C20:5	0,08 $\pm$ 0,11 ^d A	0,10 $\pm$ 0,11 ^d A	0,18 $\pm$ 0,02 A	0,13 $\pm$ 0,03 A	0,05 $\pm$ 0,07 ^d A	0,06 $\pm$ 0,08 ^d A	<i>nd</i>	<i>nd</i>

nd: não detectado. ^a Óleo extraído pelo método a frio sugerido por Bligh Dyer (1959). ^b Firestone (2006). ^c Ácido eicosapentaenoico. ^d Os valores médios são resultados de duplicatas genuínas. Nestes casos observou-se alta variabilidade da análise decorrente da baixa concentração do componente na amostra.

* médias seguidas por letra maiúscula diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan.

Tabela 5.14 - Propriedades químicas dos óleos extraídos com etanol.

Solvente	Etanol com 0% de água			Etanol com 6% de água			Bligh Dyer ^a	Literatura ^b % massa
	70	80	90	70	80	90		
Temperatura								
Massa Molar média (g·mol ⁻¹)	278,3 ± 0,1 AB	278,4 ± 0,2 AB	278,1 ± 0,1 BC	278,3 ± 0,3 ABC	278,5 ± 0,0 A	278,2 ± 0,2 ABC	277,8 ± 0,2 C	260,5 – 278,5
Índice de Iodo	134,5 ± 2,8 ABC	128,8 ± 4,5 BC	138,2 ± 0,5 A	129,9 ± 4,6 ABC	125,9 ± 0,1 C	132,6 ± 0,3 ABC	135,4 ± 5,8 AB	118,0 – 139,0
Razão Insaturados/Saturados	5,73 ± 0,04 A	5,21 ± 0,08 B	5,91 ± 0,10 A	5,29 ± 0,18 B	5,35 ± 0,00 B	5,16 ± 0,01 B	5,73 ± 0,17 A	4,61 – 5,57

^a Óleo extraído pelo método a frio sugerido por Bligh Dyer (1959). ^b Firestone (2006). *médias seguidas por letra maiúscula diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan.

5.3.2 Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) da fase refinado

O comportamento da solubilidade fornece informações úteis sobre aplicações potenciais das proteínas e na determinação da intensidade dos efeitos do processamento. A curva de solubilidade, em diferentes valores de pH de uma “nova proteína”, é frequentemente a primeira propriedade funcional determinada por ser a medida mais prática da extensão da desnaturação proteica (Kinsella, 1976).

Neste trabalho foram construídas curvas de solubilidade que compreenderam a faixa de pH de 2,0 a 9,0 para os refinados provenientes dos diferentes experimentos de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio. Os resultados da solubilidade de nitrogênio em solução de NaCl (0,1 M) podem ser observados nas Figuras 5.8 e 5.9. Na Figura 5.8 são apresentadas as curvas para refinados obtidos das diferentes hidratações dos solventes nas temperaturas de 40 a 90 °C. Na Figura 5.9, por outro lado, são mostradas as curvas de solubilidade para as fases refinado de cada solvente, etanol com 0, 6 ou 12% de água, nas diferentes temperaturas.

Em geral, pode-se verificar que todas as curvas apresentaram comportamento típico de baixa solubilidade em torno do ponto isoelétrico (em torno do pH 5,0) e maior solubilidade nos pHs extremos (2,0 e 9,0).

De maneira geral, o perfil das curvas de solubilidade obtidas está de acordo com trabalho de Smith e Circle (1938) no qual os autores mostraram que proteínas em soluções aquosas, com pH acima ou abaixo do ponto isoelétrico e com adição de cloreto de cálcio ou cloreto de sódio (ambos a 0,5 M), apresentam alta solubilidade.

Figura 5.8 - Curvas de solubilidade de nitrogênio referentes às fases refinado obtidas a diferentes temperaturas.

Figura 5.9 - Curvas de solubilidade de nitrogênio referentes às fases refinado obtidas em função do solvente de extração.

Bortoletto et al. (2007) apresentaram em seu trabalho curvas de solubilidade para dois tipos de materiais: farinha de soja integral, obtida da trituração de grãos de soja em moinho de facas e peneirada para obtenção de granulometria 60 *mesh*; e farelo de soja, proveniente do processo de extração do óleo da farinha, utilizando como solvente etanol 99% (v/v). Com relação à farinha de soja, os autores obtiveram valores de solubilidade máximos em torno de 90% no pH 2,0, e valores mínimos (menor que 5%) em pH 4,5. Já o farelo, obtido após a extração do óleo na temperatura de 70 °C, apresentou redução da solubilidade por toda faixa de pH estudada, com solubilidade máxima nos pHs 2,0 e 9,0, com valores próximo de 60%, e solubilidade mínima (próxima de 0%) em pH 4,5.

A grande diferença na solubilidade máxima encontrada para o farelo de soja, tanto integral como desengordurado, entre este trabalho e o resultado apresentado por Bortoletto et al. (2007), pode ser explicada pelos diferentes tratamentos aplicados na matéria-prima, uma vez que a soja expandida, matéria-prima utilizada nesta dissertação de mestrado, previamente já havia passado por diversos processos físicos e térmicos.

O processamento da soja para obtenção da matéria-prima expandida consiste na quebra dos grãos, condicionamento (aplicação de aquecimento úmido), laminação dos grãos a flocos finos e, por fim, a etapa de expansão que torna os flocos porosos, através da umidificação e injeção de vapor (Anderson, 2005). Estas etapas de preparo da matéria-prima podem promover parcial modificação nas proteínas da soja, levando à obtenção de menores valores de solubilidade.

Para avaliar a solubilidade de diversos produtos de soja comercializados nos Estados Unidos, Lee et al. (2003) realizaram um estudo com farelos, concentrados e isolados proteicos, em diferentes condições de pH, força iônica e temperatura. As curvas de solubilidade para três farelos de soja desengordurados, avaliados entre os pHs 3,0 e 11,0, apresentaram resultados similares às amostras de fase refinado do presente trabalho, com solubilidade mínima em pH 4,0 e maiores valores de solubilidade em pHs mais elevados.

Nas Tabelas 5.15, 5.16 e 5.17, são apresentadas as análises estatísticas do ISN nas diversas condições de processo estudadas, porém as análises estatísticas foram realizadas para os valores de ISN relativos apenas aos pHs 2,0, 7,0 e 9,0, nos quais, a partir das considerações de resultados deste trabalho e das referências utilizadas, é possível a obtenção de maiores valores de solubilização da proteína e, por conseguinte, menor incerteza experimental.

Com base nos dados experimentais e na análise estatística apresentada nas Tabelas 5.15, 5.16 e 5.17, pode-se realizar uma comparação entre os solventes utilizados. Pode-se inferir que o aumento do teor de água no solvente apresenta influência estatisticamente significativa nos resultados de índice de solubilidade de nitrogênio, sendo que, de maneira geral, o etanol absoluto foi o solvente que apresentou os maiores valores de solubilidade de proteína.

Com relação à temperatura de extração, pode-se dizer que esta variável apresenta efeito estatisticamente significativo sobre a solubilidade da proteína presente na fase refinado, sendo que maiores temperaturas no processo de extração do óleo levam a menores índices de solubilidade de proteína.

Adicionalmente, é possível observar que ambas as amostras de fase refinado oriundas de extrações com etanol com 6 e 12% de água, em massa, apresentaram queda dos valores de solubilidade de nitrogênio.

Sessa et al. (1998) avaliaram o efeito da extração de óleo de soja com etanol, na concentração de 70 a 100%, sobre a solubilidade das proteínas. Os resultados mostraram que o etanol levou a diminuição da solubilidade, sendo que, quanto maior o teor de água no etanol maior a queda na solubilidade. Os autores explicam que as misturas de etanol-água possuem tanto características hidrofóbicas como hidrofílicas, e que, os alcoóis desestabilizam as proteínas por enfraquecerem as interações hidrofóbicas entre os resíduos não polares, assim como perturbando a água característica em torno da molécula de proteína.

Tabela 5.15 - Índice de Solubilidade de Nitrogênio (ISN) na fase refinado para diferentes condições de processo no pH 2,0.

Temperatura (°C)		Fase refinado			
		Solvente			
		Etanol com 0% de água	Etanol com 6% de água	Etanol com 12% de água	
	Farelo inicial ¹	36,46 ± 2,02 ab	36,46 ± 2,02 a	36,46 ± 2,02 a	
40	36,46 ± 2,02 A	38,75 ± 0,62 aA	36,45 ± 0,88 aA	37,55 ± 1,12 aA	
50	36,46 ± 2,02 A	28,36 ± 0,89 cdBC	31,47 ± 1,99 bB	24,70 ± 0,26 bC	
60	36,46 ± 2,02 A	34,67 ± 4,86 abcA	22,33 ± 2,46 cB	16,57 ± 2,04 cB	
70	36,46 ± 2,02 A	31,26 ± 5,37 bcA	14,35 ± 1,79 dB	–	
80	36,46 ± 2,02 A	22,25 ± 1,77 dB	10,95 ± 0,99 dC	–	
90	36,46 ± 2,02 A	21,39 ± 0,55 dB	6,99 ± 0,67 eC	–	

*médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan. ¹ As amostras das fases refinado foram comparadas com a amostra de farelo original, a qual não foi submetida ao processo de extração, porém foi submetida a secagem (60 °C, 24 horas).

Tabela 5.16 - Índice de Solubilidade de Nitrogênio (ISN) na fase refinado para diferentes condições de processo no pH 7,0.

		Fase refinado		
		Solvente		
Temperatura (°C)		Etanol com 0% de água	Etanol com 6% de água	Etanol com 12% de água
	Farelo inicial ¹	27,24 ± 2,03 abc	27,24 ± 2,03 b	27,24 ± 2,03 a
40	27,24 ± 2,03 A	31,25 ± 1,35 aA	31,73 ± 4,38 aA	28,71 ± 2,71 aA
50	27,24 ± 2,03 A	21,57 ± 2,02 cB	22,99 ± 0,78 bB	16,25 ± 0,09 bC
60	27,24 ± 2,03 A	29,39 ± 4,39 abA	14,96 ± 0,66 cB	6,10 ± 0,29 cC
70	27,24 ± 2,03 B	32,30 ± 0,46 aA	6,42 ± 0,30 dC	–
80	27,24 ± 2,03 A	23,73 ± 4,12 bcA	8,15 ± 0,06 dB	–
90	27,24 ± 2,03 A	12,41 ± 1,76 dB	7,19 ± 0,63 dC	–

*médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan. ¹ As amostras das fases refinado foram comparadas com a amostra de farelo original, a qual não foi submetida ao processo de extração, porém foi submetida a secagem (60 °C, 24 horas).

Tabela 5.17 - Índice de Solubilidade de Nitrogênio (ISN) na fase refinado para diferentes condições de processo no pH 9,0.

		Fase refinado		
		Solvente		
Temperatura (°C)		Etanol com 0% de água	Etanol com 6% de água	Etanol com 12% de água
	Farelo inicial ¹	48,25 ± 3,78 ab	48,25 ± 3,78 a	48,25 ± 3,78 a
40	48,25 ± 3,78 A	54,76 ± 2,77 aA	51,95 ± 1,76 aA	48,55 ± 1,10 aA
50	48,25 ± 3,78 A	43,00 ± 4,58 bAB	40,29 ± 3,39 bAB	36,05 ± 4,32 bB
60	48,25 ± 3,78 A	44,89 ± 5,48 abA	28,65 ± 0,12 cB	18,55 ± 1,10 cC
70	48,25 ± 3,78 A	54,55 ± 6,39 aA	13,61 ± 1,66 dB	–
80	48,25 ± 3,78 A	41,20 ± 4,27 bA	13,08 ± 0,37 dB	–
90	48,25 ± 3,78 A	22,69 ± 0,69 cB	13,15 ± 1,18 dC	–

*médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan. ¹ As amostras das fases refinado foram comparadas com a amostra de farelo original, a qual não foi submetida ao processo de extração, porém foi submetida a secagem (60 °C, 24 horas).

Os resultados obtidos para rendimento de proteína na fase extrato com solvente contendo 6% de água, apresentados na Tabela 5.10, mostraram que na faixa de temperatura de 70 a 90 °C houve uma diminuição quando comparados aos resultados obtidos na faixa de 40 a 65 °C. Estes resultados sugerem que pode ter ocorrido a desnaturação proteica, tanto devido a elevada temperatura quanto a presença de água no solvente, e encontram-se em acordo com os resultados de solubilidade para as fases refinado obtidos nestas condições.

Os resultados para o rendimento de óleo apresentados no item 5.3 mostraram que o etanol absoluto apresentou a maior capacidade de extração, com rendimento médio de 19 g de óleo/100 g de soja, ou seja, extração de mais de 80% do óleo presente na soja. Já o etanol contendo 6% de água apresentou capacidade de extração diretamente proporcional ao aumento da temperatura, ou seja, com o aumento da temperatura há um decréscimo teor de óleo residual. Já o solvente contendo 12% de água extraiu em torno de 0,5% do óleo da soja, ou seja, praticamente todo óleo se manteve no refinado.

Desta forma, verifica-se que pode haver uma relação entre a solubilidade do nitrogênio e o teor de óleo residual na fase refinado, o qual pode dificultar a solubilização da proteína (Vojdani, 1996). Com a finalidade de elucidar esta questão, foram realizados os experimentos descritos no item 4.2.4, extração em configuração corrente cruzada, cujos resultados são apresentados no item 5.4, para total extração dos compostos lipídicos. Estes experimentos permitiram avaliar se os resultados de solubilidade proteica obtidos foram devidos à presença do óleo residual na fase refinado ou decorrentes da influência da água no solvente.

5.4 Experimentos de extração de óleo de soja em configuração corrente cruzada

Foram executados 4 experimentos de extração para obtenção de dados adicionais de equilíbrio. Nestes experimentos foram realizadas duas extrações consecutivas sob as mesmas condições experimentais a partir de um mesmo farelo, na temperatura de 80 °C, utilizando-se como solventes etanol absoluto e

com 6% de água, conforme as combinações apresentadas na Tabela 5.18. Estes experimentos foram conduzidos com o objetivo de verificar se os resultados encontrados nos experimentos de extração da condição de equilíbrio, principalmente quanto à solubilidade de proteínas, foram devidos à presença de óleo residual ou decorrentes da influência das variáveis teor de água no solvente e temperatura de extração. De fato, a configuração de extração em corrente cruzada foi utilizada com o objetivo de obter fases refinado completamente desengorduradas.

Tabela 5.18 - Condições experimentais estudadas nos experimentos de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio em configuração corrente cruzada, a 80 °C.

T (°C)	Solvente	Extração	Teor de água no Solvente (% em massa)
80 °C	Etanol com	Extração 01	0,14 ± 0,00
	0% de água	Extração 02	0,14 ± 0,00
	Etanol com	Extração 01	6,23 ± 0,02
	6% de água	Extração 02	6,23 ± 0,02

Para cada experimento foram realizadas análises das fases extrato as quais compreenderam o monitoramento de água, compostos lipídicos, proteínas e composição em ácidos graxos do óleo extraído. Para a fase refinado foi realizada análise de proteínas e sua solubilidade, cinzas, fibras, calorimetria diferencial de varredura e espectroscopia de infravermelho.

Os resultados das análises realizadas para cada experimento podem ser visualizados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19 - Resultados das análises realizadas para cada experimento de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio em configuração corrente cruzada, a 80 °C.

Solvente Extração	Etanol com 0% de água		Etanol com 6% de água	
	Extração 01	Extração 02	Extração 01	Extração 02
Rendimento de óleo (g/100 g soja)	20,02 ± 0,61 A	-1,54 ± 0,07* C	19,68 ± 1,81 A	1,26 ± 0,07 B
Rendimento de proteína (g/100 g soja)	1,93 ± 0,04 C	5,06 ± 0,01 A	2,68 ± 0,01 BC	4,41 ± 0,01 AB
Água no extrato (%)	2,63 ± 0,00 C	0,85 ± 0,01 D	7,82 ± 0,01 A	6,69 ± 0,01 B
Proteína no refinado (% base seca)	53,13 ± 0,67 BC	54,82 ± 0,09 AB	51,65 ± 0,45 C	56,24 ± 1,22 A
Cinzas no refinado (% base úmida)	5,44 ± 0,00 A	5,34 ± 0,03 AB	5,16 ± 0,08 B	5,21 ± 0,14 B
Fibras no refinado (% base úmida)	12,44 ± 0,07 A	12,40 ± 0,49 A	12,27 ± 0,24 A	12,21 ± 0,23 A

*o valor médio negativo é decorrente da baixa concentração de óleo no extrato e alta variabilidade da análise. ** Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan.

Nos resultados apresentados na Tabela 5.19 é possível notar que o etanol absoluto extraiu praticamente todo conteúdo lipídico na primeira extração, uma vez que na segunda extração não houve extração de compostos lipídicos, fato que é justificado pelo valor negativo. No caso do etanol com 6% de água, a extração total de compostos lipídicos é alcançada com as duas extrações.

Com relação à proteína, em geral, pode-se dizer que na segunda extração há maior concentração de proteínas no extrato. Isto pode ter ocorrido devido ao menor teor de óleo presente, já que a maior parte deste foi extraída na primeira extração e, desta forma, a proteína se torna mais disponível para ser arrastada pelo solvente. Para a fase refinado pode-se dizer que as fases decorrentes das segundas extrações exibem maior conteúdo proteico. Apesar de haver maior transferência de proteína para o extrato há, também, a remoção dos compostos lipídicos.

Quanto ao teor de água no extrato, assim como nos demais experimentos de extração sólido-líquido na condição de equilíbrio, o teor de água inicial no solvente é determinante na extração da água da estrutura sólida para o solvente, assim, o etanol absoluto extrai mais água da matéria-prima do que o solvente com maior teor de água. É possível notar, também, que a maior parte da água presente na soja é extraída na primeira extração, tanto para etanol absoluto como para o azeotrópico.

Ainda para a fase refinado, o conteúdo de cinzas mostrou-se estatisticamente diferente ($p < 0,05$) entre os solventes, sendo que este valor foi menor para os refinados obtidos da extração com etanol contendo 6% de água.

Já para as fibras no refinado não houve diferença estatística entre as condições experimentais estudadas.

5.4.1 Composição em ácidos graxos dos óleos

Com a finalidade de avaliar a influência do teor de água no solvente sobre a composição em ácidos graxos dos óleos extraídos, os extratos provenientes de cada extração em corrente cruzada foram submetidos à análise de cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos, e estes resultados podem ser visualizados na Tabela 5.20. Nesta tabela podem ser visualizados ainda os valores médios de massas molares, índice de iodo e razão entre ácidos graxos insaturados e saturados para cada condição experimental avaliada.

Tabela 5.20 - Composição química e em ácidos graxos de óleos obtidos em diferentes condições experimentais.

Solvente		Etanol com 0% de água		Etanol com 6% de água		Bligh Dyer ^a	Literatura ^b % massa
		Extração 1	Extração 2	Extração 1	Extração 2		
Mirístico	C14:0	0,09 ± 0,00 A	nd	0,04 ± 0,06 ^d A	0,06 ± 0,08 ^d A	nd	0 – 0,2
Palmitico	C16:0	11,32 ± 0,32 A	12,42 ± 0,12 B	11,02 ± 0,08 A	11,75 ± 1,52 B	11,80 ± 0,04 B	9,7 – 13,3
Palmitoleico	C16:1	0,09 ± 0,00 A	nd	0,07 ± 0,02 A	nd	nd	0 – 0,2
Margárico	C17:0	0,10 ± 0,01 A	0,11 ± 0,00 A	0,08 ± 0,02 A	0,06 ± 0,08 ^d A	nd	nd
Esteárico	C18:0	3,80 ± 0,14 A	3,72 ± 0,22 A	3,86 ± 0,02 A	3,79 ± 0,45 A	3,04 ± 0,39 B	3,0 – 5,4
Oleico	C18:1	24,83 ± 5,05 A	20,53 ± 0,52 A	28,60 ± 0,01 A	21,17 ± 2,70 A	21,60 ± 4,64 A	17,7 – 28,5
Linoleico	C18:2	52,41 ± 4,34 A	55,52 ± 0,00 A	49,39 ± 0,09 A	55,35 ± 7,02 A	55,49 ± 4,29 A	49,8 – 57,1
Araquídico	C20:0	0,24 ± 0,02 A	0,23 ± 0,02 A	0,22 ± 0,01 A	0,24 ± 0,02 A	nd	0,1 – 0,6
Gadoleico	C20:1	0,20 ± 0,01 A	0,18 ± 0,01 A	0,20 ± 0,00 A	0,19 ± 0,02 A	nd	0 – 0,3
Linolenico	C18:3	6,27 ± 0,53 A	6,56 ± 0,06 A	5,96 ± 0,00 A	6,55 ± 0,80 A	7,92 ± 0,91 A	5,5 – 9,5
Behênico	C22:0	0,41 ± 0,03 A	0,43 ± 0,05 A	0,38 ± 0,01 A	0,46 ± 0,05 A	0,15 ± 0,21 ^d B	0,3 – 0,7
Lignocérico	C24:0	0,15 ± 0,00 A	0,17 ± 0,03 A	0,14 ± 0,00 A	0,17 ± 0,02 A	nd	0 – 0,4
EPA ^c	C20:5	0,10 ± 0,00 A	0,06 ± 0,09 ^d A	0,05 ± 0,07 ^d A	0,05 ± 0,07 ^d A	nd	nd
MM média (g·mol ⁻¹)		278,4 ± 0,2 A	278,2 ± 2,3 A	278,5 ± 0,0 A	278,2 ± 35,2 A	277,8 ± 0,2 A	260,5 – 278,5
Índice de iodo		128,8 ± 4,5 A	131,1 ± 0,3 A	125,9 ± 0,1 A	131,4 ± 16,6 A	135,4 ± 5,8 A	118,0 – 139,0
Insat/sat		5,21 ± 0,08 BC	4,85 ± 0,10 D	5,35 ± 0,00 B	5,04 ± 0,04 CD	5,73 ± 0,17 A	4,61 – 5,57

nd: não detectado. ^a Óleo extraído pelo método a frio sugerido por Bligh e Dyer (1959). ^b Firestone (2006). ^c Ácido eicosapentaenoico. ^d Os valores médios são resultados de duplicatas genuínas. Nestes casos observou-se alta variabilidade da análise decorrente da baixa concentração do componente na amostra. *médias seguidas por letra maiúscula diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan.

As análises estatísticas apresentadas na Tabela 5.20 permitem notar que, em geral, não há diferenças quanto à composição dos ácidos graxos presentes no óleo de soja extraído com etanol e o óleo tido como referência neste trabalho (extraído através do método de Bligh e Dyer), e que estes resultados estão de acordo, ainda, com a composição típica de óleo de soja obtida por extração com hexano (Firestone, 2006), assim como nos resultados encontrados no item 5.3.1.

5.4.2 Índice de solubilidade de nitrogênio da fase refinado

Na Figura 5.10 são apresentadas as curvas de solubilidade de nitrogênio para amostras da fase refinado obtidas a 80 °C, com solventes etanólicos contendo 0 e 6% de água, em diferentes extrações. Na Tabela 5.21 são apresentadas as análises estatísticas para os índices de solubilidade nos pHs 2,0, 7,0 e 9,0.

Figura 5.10 - Curvas de solubilidade de nitrogênio para as fases refinado obtidas a 80 °C. x farelo inicial; ■ Etanol com 0% de água (Extração 1); □ Etanol com 0% de água (Extração 2); ● Etanol com 6% de água (Extração 1); ○ Etanol com 6% de água (Extração 2). Água em % mássica.

Tabela 5.21 - Índice de solubilidade de nitrogênio para amostras obtidas das extrações sequenciais nos pHs 2,0, 7,0 e 9,0.

Amostra	% ISN		
	pH 2,0	pH 7,0	pH 9,0
Farelo inicial ¹	36,46±2,02 a	27,24±2,03 a	48,25±3,78 a
Etanol com Extração 1	22,25±1,77 b	23,73±4,12 a	41,20±4,27 b
0% de água Extração 2	25,38±2,58 b	22,18±1,17 a	36,54±0,43 b
Etanol com Extração 1	10,95±0,99 c	8,15±0,06 b	13,08±0,37 c
6% de água Extração 2	13,43±0,64 c	8,65±0,46 b	13,06±0,96 c

*médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan.¹ As amostras das fases refinado foram comparadas com a amostra de farelo inicial, a qual não foi submetida ao processo de extração, porém foi submetida a secagem (60 °C, 24 horas).

A análise estatística apresentada na Tabela 5.21 mostra que os valores de solubilidade das amostras que passaram pelo processo de extração com etanol são estatisticamente menores ($p < 0,05$) que o valor de solubilidade da amostra inicial. É possível notar também que esta solubilidade é menor ainda quando se utiliza etanol contendo maior teor de água. Dentre as extrações consecutivas não há diferença estatística entre os valores, o que permite inferir que a solubilidade das fases refinado obtidas é fortemente afetada pela presença de água no solvente, independente da presença de óleo residual no refinado.

Fukushima (1969) realizou um estudo sistematizado a fim de avaliar a habilidade de desnaturação de proteínas da soja por 30 tipos de solventes orgânicos, dentre eles, o etanol. Sobre este solvente o autor mostrou que a capacidade de desnaturação depende da concentração, assim, na presença de água em concentração na faixa de 40 a 60%, observou-se o maior efeito sobre a desnaturação proteica. Na temperatura de 80 °C e etanol na concentração de 85%, a total desnaturação proteica da soja foi visualizada em apenas 10 minutos de contato.

5.4.3 Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) da fase refinado

O uso da análise de DSC na pesquisa em alimentos permite o acesso a propriedades termodinâmicas associadas à desnaturação proteica. Esta técnica permite determinar dados cinéticos e termodinâmicos, incluindo a temperatura de desnaturação (T_d) e a entalpia associada a esta transição (ΔH). O valor de ΔH representa a combinação de reações exotérmicas, tais como, as associadas ao rompimento de interações hidrofóbicas e a contribuição endotérmica devido ao rompimento de ligações de hidrogênio. Em alimentos a desnaturação proteica normalmente não é um processo reversível devido a agregação de moléculas de proteínas desdobradas. Esta agregação representa outro fator que contribui para porção exotérmica do valor de ΔH . Utilizar o ΔH como um indicador da desnaturação proteica permite avaliar o efeito das condições de processamento tais como temperatura, pH e força iônica, sobre as proteínas (Murray et al., 1985).

Com a finalidade de complementar e melhor avaliar o efeito do processo de extração com etanol sobre a desnaturação proteica, fez-se a análise de DSC das fases refinado obtidas a 80 °C, com os solventes etanol absoluto e azeotrópico, nos procedimentos de extrações sequenciais. Em adição, o farelo inicial, o qual não passou pelo processo de extração de óleo, mas foi submetido a secagem prévia a 60 °C por 24 horas, também foi submetido a análise térmica.

Na Tabela 5.22 são apresentados dados de comportamento térmico das amostras e na Figura 5.11 podem ser visualizados os termogramas obtidos.

Tabela 5.22 – Temperaturas e entalpias de desnaturação do farelo inicial e das fases refinado provenientes das extrações com etanol.

Solvente Extração	Etanol com 0% de água		Etanol com 6% de água		Farelo inicial
	Extração 01	Extração 02	Extração 01	Extração 02	
Td (°C)	100,0;	101,0±0,1;	<i>nd</i>	<i>nd</i>	103,3;
	121,5	119,2±0,9			122,4
ΔH (cal/g proteína)	3,32	4,59±1,03	<i>nd</i>	<i>nd</i>	4,35

nd: não detectado.

Figura 5.11 – Termogramas de DSC de amostras obtidas em diferentes condições. (a) Farelo inicial seco 60 °C por 24 horas; (b) Refinado Etanol com 0% de água (Extração 1); (c) Refinado Etanol com 0% de água (Extração 2); (d) Refinado Etanol com 6% de água (Extração 1); (e) Refinado Etanol com 6% de água (Extração 2).

A execução desta análise apresentou grande dificuldade operacional originada, principalmente, da heterogeneidade das amostras, tanto pela composição química como fisicamente, devido à variedade de tamanho das partículas. Devido a estas dificuldades não foi possível a obtenção de resultados em duplicata de algumas amostras, consequentemente, não foi possível a realização da análise estatística. Contudo, com os resultados obtidos é possível ter uma estimativa do comportamento térmico das amostras oriundas dos diferentes tratamentos.

Primeiramente, é importante notar que não foram observados eventos térmicos nos termogramas referentes aos refinados obtidos da extração do óleo com etanol contendo 6% de água. Desta forma, supõe-se que o processo de extração nestas condições atuou de forma drástica sobre as proteínas. Esta suposição é

reforçada pelos resultados encontrados nas análises de solubilidade (item 5.4.2) onde foi visualizada uma grande queda nos valores de ISN destes refinados quando comparados aos refinados obtidos com etanol absoluto. Em adição, estes resultados também estão de acordo com a discussão prévia em relação à diminuição do rendimento de proteína nos extratos obtidos com etanol com 6% de água, na faixa de temperatura de 70 a 90 °C, quando comparados aos resultados obtidos na faixa de 40 a 65 °C (Tabela 5.10).

Os picos endotérmicos visualizados nos termogramas, tanto do farelo inicial quanto dos refinados obtidos com etanol absoluto, se originam das duas principais frações proteicas (7S e 11S) presentes na soja, sendo o primeiro pico visualizado em torno de 100 °C referente à fração 7S, composta principalmente de β -conglucina, e o pico em torno de 120 °C referente à fração 11S, de glicina.

As temperaturas de desnaturação (T_d) encontradas neste trabalho foram superiores as temperaturas normalmente encontradas na literatura para soja, sendo para fração 7S em torno de 77 °C, e para fração 11S, em torno de 97 °C (Tang et al., 2007; Sobral et al., 2010; Lee et al., 2003; Murray et al., 1985). Sessa et al. (1998) explicam que a T_d reflete o conteúdo de água presente na amostra, sendo que quanto maior o conteúdo de água, mais baixas serão as temperaturas.

As amostras desta dissertação foram previamente condicionadas em ambiente com elevada umidade, sendo que na execução das análises no equipamento as amostras apresentaram umidade em torno de 30%. Nos trabalhos citados anteriormente (Tang et al., 2007; Sobral et al., 2010; Lee et al., 2003; Murray et al., 1985), as análises de DSC foram conduzidas em soluções aquosas de concentrações variando de 10 a 20% de sólidos, ou seja, apresentavam maior conteúdo de água, o que justifica as temperaturas de desnaturação superiores encontradas nesta dissertação.

Fazendo-se um comparativo qualitativo entre os resultados do farelo inicial e dos refinados obtidos com etanol absoluto, pode-se dizer que o processo de extração não provocou grandes modificações na fração proteica. Nota-se um leve decréscimo nas temperaturas de desnaturação e na entalpia das fases refinado. Contudo, no caso da entalpia, tomando-se como base o valor do desvio padrão

apresentado pela amostra que apresenta duplicata, pode-se dizer que não há diferença entre os valores.

Os resultados encontrados nesta dissertação de mestrado são semelhantes aos resultados reportados por Bader et al. (2011) em seu estudo sobre a influência de diferentes solventes sobre proteínas de tremçoço. Neste trabalho, os autores mostraram que a temperatura de desnaturação do farelo de tremçoço, do qual foi extraído o óleo com etanol, foi estatisticamente menor do que do farelo integral. Quanto à entalpia, esta não apresentou diferença estatisticamente significativa entre estas amostras.

5.4.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da fase refinado

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica vibracional que explora o princípio de que as moléculas apresentam níveis de energia específicos correspondendo a frequências nas quais elas vibram ou rotacionam. O espectro de infravermelho resulta da absorção da energia pelas ligações químicas provocando movimentos, principalmente de estiramento e vibracional. Grupos característicos de átomos levam a bandas vibracionais centralizadas em frequências típicas, independente da molécula em que são encontrados. Como essas frequências são determinadas pela energia superficial molecular, pela massa de átomos e vibração associada, esta técnica pode ser utilizada na caracterização estrutural e química de misturas muito complexas (Carbonaro e Nucara, 2010).

Usualmente, as análises de FTIR são realizadas com a finalidade de determinar e quantificar principalmente as estruturas secundárias de proteínas. Isto é conseguido pela análise minuciosa da região correspondente a Amida I, na faixa de 1600 a 1700 cm^{-1} , através de ferramentas como deconvolução ou derivatização que, através do ajuste da curva ou aumento da resolução, respectivamente, nesta faixa espectral, permite estimar a área de cada componente da estrutura secundária (JenaLib, 2012).

As fases refinado obtidas das extrações sequenciais em configuração corrente cruzada foram submetidas à análise de FTIR. Os espectros de absorção

referentes a estas análises são apresentados na Figura 5.12, e as bandas representativas são descritas na Tabela 5.23.

Figura 5.12 - Espectros de FTIR de amostras obtidas em diferentes condições. (A) Farelo inicial seco 60 °C por 24 horas; (B) Refinado Etanol com 0% de água (Extração 1); (C) Refinado Etanol com 0% de água (Extração 2); (D) Refinado Etanol com 6% de água (Extração 1); (E) Refinado Etanol com 6% de água (Extração 2).

Tabela 5.23 - Frequências características de bandas observadas no espectro de FTIR de soja (adaptado de Pietrzak e Miller, 2005).

3290 cm ⁻¹	O-H estiramento (principalmente proteínas e carboidratos)
3050 cm ⁻¹	Amida B, N-H vibracional (proteínas)
3010 cm ⁻¹	H ligado a C=C; C-H estiramento (lipídeos insaturados)
2925 e 2854 cm ⁻¹	C-H estiramento (lipídeos neutros, proteínas e carboidratos)
1740 cm ⁻¹	C=O estiramento (éster lipídico)
1650 cm ⁻¹	C=O estiramento (Amida I, proteínas)
1545 cm ⁻¹	N-H vibracional (Amida II, proteínas)
1370 e 1320 cm ⁻¹	Grupos característicos de Hemicelulose
1400 e 1246 cm ⁻¹	Grupos característicos de Celulose
1200 – 1000 cm ⁻¹	C-H estiramento (principalmente carboidratos)

Os espectros apresentados na Figura 5.12 apresentaram bandas típicas de soja. A larga banda observada em 3290 cm⁻¹ corresponde ao estiramento da ligação O-H devido, principalmente, a proteínas (Amida A) e carboidratos. A pequena banda observada em 3050 cm⁻¹ é associada às proteínas, Amida B (N-H vibracional). A presença de lipídeos insaturados é indicada pela banda estreita em 3010 cm⁻¹. As bandas em 2925 e 2854 cm⁻¹ representam o estiramento C-H que correspondem principalmente aos lipídeos neutros, proteínas e carboidratos. A banda em 1740 cm⁻¹ é característica de ligações éster (estiramento C=O) associada aos lipídeos. Os principais picos de proteína estão localizados em 1650 cm⁻¹ (Amida I, estiramento C=O) e 1545 cm⁻¹ (Amida II, vibracional N-H). Apesar de pequenos e difíceis de distinguir, as hemiceluloses são caracteristicamente visualizadas nos picos em torno de 1370 e 1320 cm⁻¹. As bandas em 1400 e 1246 cm⁻¹ podem ser atribuídas à celulose. As bandas entre 1200 e 1000 cm⁻¹ representam o estiramento C-H, atribuídas principalmente aos carboidratos (Pietrzak e Miller, 2005; Withana-Gamage et al., 2011; Carbonaro e Nucara, 2010; Kong e Yu, 2007).

Em geral, é possível observar que os picos correspondentes aos compostos lipídicos (3010 e 1740 cm⁻¹) não aparecem para as amostras que passaram pelo processo de extração. Observa-se também uma diminuição no tamanho dos picos em 2925 e 2854 cm⁻¹, que são relacionados a proteínas, carboidratos e lipídeos

neutros. Com relação aos demais compostos, proteínas e carboidratos, não são evidentes grandes modificações.

Infelizmente não foi possível a análise meticulosa da fração proteica através da determinação da estrutura secundária devido às dificuldades operacionais encontradas na execução dos procedimentos de deconvolução e derivatização. Contudo, os resultados obtidos permitiram reforçar as modificações ocorridas aos compostos lipídicos.

5.5 Avaliação das características da fração proteica de amostras provenientes das etapas do processo de extração industrial

Com a finalidade de avaliar e comparar a qualidade proteica de amostras provenientes do processo de extração de óleo com etanol e do processo convencional, com hexano, amostras de cada etapa do processo industrial de extração de óleo de soja foram gentilmente cedidas pela Granol. A Tabela 5.24 apresenta a descrição das amostras e a codificação utilizada na apresentação dos resultados.

Tabela 5.24 - Codificação de amostras de cada etapa do processo industrial.

Amostra	Descrição
A	Soja Laminada
B	Soja Expandida
C	Rafinado após extração com hexano
D	Rafinado após etapa de dessolventização

Para as amostras apresentadas na Tabela 5.24 foram realizadas as análises de proteína e sua solubilidade, espectroscopia na região do infravermelho e calorimetria diferencial de varredura.

O teor de proteínas e seu comportamento térmico, referente a cada amostra discriminada na Tabela 5.24, são apresentados na Tabela 5.25. Na Figura 5.13 podem ser visualizados os termogramas da análise de DSC de cada amostra.

Tabela 5.25 - Efeito do processamento no conteúdo proteico e comportamento térmico.

Amostra	Proteína (%, base seca)	Td (°C)	ΔH (cal/g proteína)
A Soja Laminada	39,26±0,68	96,3 ± 0,2; 116,5 ± 2,4	6,82±1,12
B Soja Expandida	41,54±1,38	103,3; 122,4	4,35
C Refinado após extração com hexano	52,19±1,59	98,9; 117,0	5,99
D Refinado após dessolventização	50,38±0,13	nd; 117,78	nd

nd: não detectado.

Figura 5.13 – Termogramas de DSC de amostras de diferentes etapas do processamento industrial. (a) Soja Laminada, (b) Soja Expandida, (c) Refinado após extração com hexano e (d) Refinado após dessolventização.

A elevação do conteúdo proteico, principalmente entre as amostras antes e após a extração do óleo com solvente, como apresentado na Tabela 5.25, já era um resultado esperado devido à retirada do óleo. Este fato também foi visualizado nos resultados de teor de proteína dos refinados da extração com etanol na condição de equilíbrio apresentados na Figura 5.7 e, também, na extração de óleo com hexano de acordo com os resultados apresentados por Murray et al. (1985).

Assim como comentado no item 5.4.3, a análise de DSC foi de difícil execução e não foi possível obter resultados em duplicata para algumas amostras. Além disso, as temperaturas de desnaturação encontradas para estas amostras também são superiores às encontradas na literatura, consequência do diferente método de preparação da amostra adotado, que resultou em amostras com menor conteúdo de água.

A modificação da matéria-prima soja laminada pelo processo de expansão levou a um sutil aumento nas temperaturas de desnaturação e diminuição na entalpia, indicando que este processo promoveu uma leve desnaturação proteica.

O processo de extração de óleo com hexano apresentou elevação no valor da entalpia, quando comparada à soja expandida. Isto pode ter ocorrido devido à retirada do óleo favorecendo a expressão da proteína.

A amostra referente à fase refinado após ser submetida à dessolventização apresentou apenas o segundo pico, sugerindo que a fração proteica referente à β -conglucina (7S) apresentava-se desnaturada.

5.5.1 Índice de solubilidade de nitrogênio

As curvas de solubilidade de proteínas das quatro amostras discriminadas na Tabela 5.24, são apresentadas na Figura 5.14.

Figura 5.14 - Curvas de solubilidade de amostras de diferentes etapas do processamento industrial. (A) Soja Laminada, (B) Soja Expandida, (C) Refinado após extração com hexano e (D) Refinado após dessolventização.

Em geral, as curvas apresentadas na Figura 5.14 apresentam a configuração típica para amostras de soja, com maior solubilidade nos valores extremos de pH (2,0 e 9,0), e grande diminuição na região em torno do ponto isoelétrico (entre pHs 4,0 e 5,0).

A Tabela 5.21 apresenta a análise estatística dos valores de ISN referentes às amostras provenientes de diferentes etapas do processo industrial. Vale enfatizar que a análise estatística foi realizada apenas para os dados obtidos nos pHs 2,0, 7,0 e 9,0.

Tabela 5.26 - Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) para amostras de diferentes etapas do processo industrial nos pHs 2,0, 7,0 e 9,0.

Amostra	% ISN		
	pH 2,0	pH 7,0	pH 9,0
A Soja Laminada	47,77±0,48 a	38,26±0,29 a	47,98±0,58 a
B Soja Expandida	36,46±2,02 b	27,24±2,03 b	48,25±3,78 a
C Refinado após extração com hexano	40,97±6,61 ab	34,57±2,21 a	50,27±0,58 a
D Refinado após dessolventização	19,48±1,50 c	8,70±0,04 c	15,41±1,74 b

*médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.14 e na Tabela 5.26, pode-se notar a diminuição na solubilidade por toda curva na etapa de modificação da matéria-prima laminada pelo processo de expansão, exceto no pH 9,0. Contudo, o processo de extração do óleo com hexano eleva a solubilidade das proteínas, sendo esta estatisticamente igual à solubilidade das proteínas da soja laminada. Estes resultados estão em acordo com os resultados encontrados nas análises de DSC.

A etapa de processamento mais expressiva quanto à solubilidade proteica é a etapa de dessolventização, sendo a solubilidade de proteínas desta amostra estatisticamente menor ($p < 0,05$) que as demais amostras. Em adição, a análise de DSC desta amostra não apresentou evento térmico referente à fração 7S (β -conglucina), sugerindo a total desnaturação desta fração proteica.

Dentro do processo tradicional de extração de óleos vegetais, a etapa de dessolventização é a que atua de forma mais drástica quanto à desnaturação proteica. Nesta etapa se aplica o aquecimento úmido com temperaturas elevadas, em torno de 105 °C, para que, além da remoção do solvente, ocorra inativação de enzimas não desejáveis e fatores antinutricionais, e melhore a palatabilidade, especialmente quando o refinado se destina a alimentação animal (Berk, 1992).

Comparando-se os resultados de solubilidade das fases refinado, provenientes das extrações em corrente cruzada, apresentados na Tabela 5.21 e os resultados de solubilidade das amostras do processo industrial, nota-se que a solubilidade dos refinados obtidos com etanol azeotrópico são semelhantes a do refinado após a dessolventização, nas condições de pHs 7,0 e 9,0. Além disso, os resultados do DSC mostraram que, para os refinados obtidos com etanol azeotrópico, não foram observados eventos térmicos indicando a total desnaturação proteica, enquanto que o refinado após a dessolventização apresentou somente um pico referente a fração 11S, indicando a desnaturação da fração 7S. Desta forma, pode-se inferir que a extração com etanol azeotrópico afeta a fração proteica de forma similar ao processo de dessolventização.

5.5.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras discriminadas na Tabela 5.24 foram submetidas à análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de absorção referentes a estas análises são apresentados na Figura 5.15, e as bandas representativas são descritas na Tabela 5.23.

Figura 5.15 - Espectros de FTIR de amostras de diferentes etapas do processamento. (A) Soja Laminada, (B) Soja Expandida, (C) Refinado após extração com hexano e (D) Refinado após dessolventização.

Os espectros apresentados na Figura 5.15 apresentaram bandas típicas de soja. Em geral, é possível observar que as bandas correspondentes aos compostos lipídicos (3010 e 1740 cm^{-1}) não aparecem para a amostra que passou pelo processo de extração (C), e que nesta mesma amostra há uma grande redução nos picos relacionados não só aos lipídeos, mas também proteínas e carboidratos, em 2925 e 2854 cm^{-1} , que deve ser decorrente majoritariamente da redução dos compostos lipídicos. Com relação às demais bandas, não são evidentes grandes modificações.

5.6 Comparação da qualidade da fração proteica obtida por diferentes solventes

Com a finalidade de comparar a qualidade da fração proteica do refinado resultante da extração de óleo pelo solvente tradicionalmente adotado industrialmente, hexano, com o solvente sugerido por esta dissertação de mestrado, etanol, os resultados referentes à solubilidade e DSC foram compilados e são apresentados na Tabela 5.27.

Com relação ao conteúdo proteico das amostras, pode-se dizer que os refinados obtidos tanto pela extração de óleo com hexano como pelo etanol apresentaram quantidade de proteína estatisticamente igual e superior ao teor presente no farelo inicial, conforme já era esperado, sendo este comportamento decorrente da retirada de óleo.

Para as análises térmicas não foi possível a obtenção de resultados em duplicata devido à dificuldade operacional comentada anteriormente no item 5.4.3 e, por isso, não foi possível a realização da análise estatística destes resultados. Contudo, fazendo-se uma análise qualitativa destes resultados, pode-se notar a queda nos valores das temperaturas de desnaturação das fases refinado em relação ao farelo inicial. Pode-se dizer ainda, que esta queda foi maior para o refinado da extração com hexano. Quanto à entalpia, o refinado obtido via etanol apresentou um valor menor que o farelo inicial e o refinado obtido via hexano apresentou um valor maior. Esta diferença pode ter ocorrido, pois, além da remoção do óleo, o etanol provoca uma maior desestabilização nas proteínas, comparado ao hexano (Fukushima, 1969).

Em geral, é possível notar que a solubilidade da fase refinado obtida da extração de óleo com etanol azeotrópico é estatisticamente menor nos três pHs avaliados, devido a desnaturação proteica confirmada pelo resultado da análise de DSC. Comparando-se os refinados obtidos com hexano e etanol absoluto, pode-se verificar que o comportamento visualizado na entalpia encontra-se em acordo com os resultados da solubilidade proteica em pHs 2,0 e 7,0, com o refinado obtido via etanol apresentando os menores índices de solubilidade e o refinado obtido via hexano exibindo valores maiores. Já em pH 9,0, as solubilidades são consideradas estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Tabela 5.27 – Índices de qualidade de proteína da amostra inicial e das frações proteicas resultantes da extração de óleo pelos solventes hexano e etanol.

	Solvente de extração do óleo			Farelo inicial
	Hexano	Etanol (0% de água; 80 °C)	Etanol (6% de água; 80 °C)	
Proteína (%, base seca)	52,19 ± 1,59 A	53,13 ± 0,67 A	51,44 ± 1,31 A	41,54 ± 1,38 B
Td (°C)	98,9; 117,0	100,0; 121,5	<i>nd</i>	103,3; 122,4
ΔH (cal/g proteína)	5,99	3,32	<i>nd</i>	4,35
ISN pH 2,0	40,97 ± 6,61 A	22,25 ± 1,77 B	10,95 ± 0,99 C	36,46 ± 2,02 A
ISN pH 7,0	34,57 ± 2,21 A	23,73 ± 4,12 B	8,15 ± 0,06 C	27,24 ± 2,03 B
ISN pH 9,0	50,27 ± 0,58 A	41,20 ± 4,27 A	13,08 ± 0,37 B	48,25 ± 3,78 A

nd: não detectado. *médias seguidas por letra maiúscula diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan.

5.7 Estudo da Cinética de Extração

Em relação ao estudo da cinética de extração foram realizados 168 experimentos para obtenção dos dados experimentais utilizando como solventes etanol absoluto e etanol em grau azeotrópico, nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C. Foram realizadas 2 repetições de cada condição experimental, sendo que os dados foram obtidos nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 90 e 120 minutos de experimento.

Os compostos monitorados nos extratos obtidos dos experimentos de cinética foram óleo de soja, ácidos graxos livres e água. Para a fase refinado foi monitorada somente a proteína das extrações com etanol absoluto.

A Figura 5.16 apresenta a cinética de extração de óleo de soja para todas as condições experimentais avaliadas.

Figura 5.16 - Cinética de extração de óleo de soja em diferentes condições de processo. Etanol absoluto: □ 40,0 ± 0,1 °C; ○ 50,0 ± 0,1 °C e △ 60,0 ± 0,1 °C; Etanol azeotrópico: ■ 40,0 ± 0,1 °C; ● 50,0 ± 0,1 °C e ▲ 60,0 ± 0,1 °C; — modelo.

Através dos dados experimentais apresentados na Figura 5.16 é possível verificar que o óleo presente na soja migra rapidamente para a fase extrato no início do processo de extração e, então, a velocidade de extração diminui, sendo que a condição

de equilíbrio é atingida em torno de 60 minutos para o solvente etanol absoluto e em torno de 40 minutos para o solvente etanol azeotrópico.

O efeito da temperatura na extração pode ser observado no teor de óleo de soja extraído em cada intervalo de tempo, sendo que, temperaturas maiores favorecem a extração de maiores quantidades de óleo. Isto está de acordo com os resultados encontrados nos experimentos de extração na condição de equilíbrio (vide item 5.3) e é justificado pelo fato de que maiores temperaturas aumentam a solubilidade do óleo no solvente, além de diminuírem a viscosidade, tanto do óleo e do solvente, como da solução extrato, favorecendo a difusão do soluto (Johnson e Lusas, 1983).

Com relação aos diferentes solventes estudados, observa-se que a presença de água no solvente suprime fortemente a extração do óleo, sendo que o etanol azeotrópico extraiu cerca de 50% da capacidade de extração do solvente etanol absoluto na condição de equilíbrio. Este fato também foi verificado em estudos realizados por Rodrigues e Oliveira (2010) e Oliveira et al. (2012) que avaliaram o processo de extração de óleo de farelo de arroz utilizando como solvente etanol contendo diferentes teores de água, e em Rodrigues et al. (2010) no estudo do processo de extração de óleo de soja laminada com etanol.

Na Figura 5.16 também é possível visualizar que os resultados de extração de óleo de soja nos experimentos realizados com etanol absoluto apresentaram maior variabilidade que os realizados com etanol azeotrópico. Isto pode ser explicado pela maior dificuldade operacional encontrada ao se trabalhar com etanol absoluto, uma vez que a volatilidade deste solvente é maior que a volatilidade do solvente contendo maior teor de água.

Resultados semelhantes de cinética de extração de compostos solúveis foram reportados por trabalhos utilizando hexano como solvente para extração de óleo de jojoba (Allawzi et al., 2005), óleo de girassol (Baümler et al., 2010; Perez et al., 2011) e óleo de canola (Férrandez et al., 2012), e sistemas utilizando etanol como solvente para extração de substâncias solúveis da rosa rubiginosa (Franco et al., 2007) e na extração de óleo de torta de oliva (Meziane e Kadi, 2008). Em geral, os autores observaram a rápida transferência dos componentes solúveis para o solvente no início do processo, seguida da diminuição desta velocidade de transferência até se tornar constante, correspondendo ao rendimento máximo da extração. Foi observada ainda a

forte influência da temperatura na velocidade de extração, sendo que maiores temperaturas de processo resultaram em uma extração inicial mais rápida.

A cinética de extração de ácidos graxos livres (AGL) pode ser visualizada na Figura 5.17.

Figura 5.17 - Cinética de extração de ácidos graxos livres em diferentes condições de processo.
Etanol absoluto: □ 40,0 ± 0,1 °C; ○ 50,0 ± 0,1 °C e △ 60,0 ± 0,1 °C; Etanol azeotrópico: ■ 40,0 ± 0,1 °C; ● 50,0 ± 0,1 °C e ▲ 60,0 ± 0,1 °C; — modelo.

O comportamento da cinética de extração de ácidos graxos livres é o mesmo verificado para o óleo, com rápida transferência dos solutos para a fase extrato no início do processo, atingindo o equilíbrio em torno de 60 min.

Através da Figura 5.17 observa-se que o aumento da temperatura também favoreceu a extração dos compostos minoritários, AGL. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios de extração com monitoramento do comportamento dos ácidos graxos livres em sistemas compostos por *pellets* de farelo de arroz e solvente alcoólico (Rodrigues e Oliveira, 2010). Com relação à presença de água no solvente, observam-se dois comportamentos diferentes: para temperaturas inferiores (40 e 50 °C) há maior extração de AGL na presença de água no solvente, entretanto, ao se adotar temperatura superior (60 °C), o solvente etanol absoluto apresentou extração levemente superior.

Na Figura 5.18 pode ser visualizado o comportamento do componente água em função do tempo de extração. Verifica-se que a água presente inicialmente na soja se transfere gradativamente para o extrato, porém esta transferência é percebida com maior intensidade quando se utiliza etanol absoluto como solvente, uma vez que o teor de água presente neste é pequeno ($0,03 \pm 0,03\%$), e os extratos provenientes da extração com este solvente apresentam cerca de 2% de água.

Figura 5.18 - Cinética de extração de água em diferentes condições de processo.
Etanol absoluto: □ $40,0 \pm 0,1$ °C; ○ $50,0 \pm 0,1$ °C e △ $60,0 \pm 0,1$ °C; Etanol azeotrópico: ■ $40,0 \pm 0,1$ °C; ● $50,0 \pm 0,1$ °C e ▲ $60,0 \pm 0,1$ °C.

No caso da água, pode-se observar através da Figura 5.18, que o equilíbrio foi atingido em torno de 30 minutos de extração. As diferentes temperaturas de trabalho não influenciaram o conteúdo de água transferido para a fase extrato.

Este resultados estão de acordo com os encontrados no estudo de extração na condição de equilíbrio (item 5.3) e também são semelhantes aos encontrados por Rodrigues e Oliveira (2010) e em Rodrigues et al. (2010).

A Figura 5.19 apresenta o comportamento do conteúdo proteico na fase refinado como função do tempo de extração, para sistemas onde o etanol absoluto foi utilizado como solvente.

Figura 5.19 - Teor de proteína na fase refinado para extracções com etanol absoluto em diferentes temperaturas. □ 40,0 ± 0,1 °C; ○ 50,0 ± 0,1 °C e △ 60,0 ± 0,1 °C.

É possível verificar através da Figura 5.19 que o teor de proteína na fase refinado se eleva sutilmente quando comparado ao teor de proteína presente inicialmente na soja expandida (apresentado como o início do processo de extração, tempo 0).

Pode-se observar, ainda, que o teor de proteína na fase refinado se mantém praticamente constante ao longo do processo de extração, e que nos tempos finais (90 e 120 minutos) a influência da temperatura se torna mais evidente. De fato, o teor de proteína na fase refinado é função do teor de óleo de soja presente nesta fase e, também, do teor de material proteico que migra para a fase extrato.

De acordo com a Figura 5.16, nos primeiros minutos de processo tem-se uma rápida migração de óleo de soja para a fase extrato, o que contribui para a elevação do teor de proteína na fase refinado. Outra observação importante é a da migração da proteína para a fase extrato. De acordo com o estudo do equilíbrio (vide item 5.3), pode-se observar que a extração de proteínas em sistemas com etanol absoluto como solvente é independente da temperatura de processo na faixa de 40 a 60 °C.

Desta forma, pode-se inferir que maiores teores de proteína nas fases refinado obtidas a maiores temperaturas são decorrentes da maior capacidade de extração de óleo de soja pelo solvente nestas condições de processo.

5.7.1 Modelagem dos Dados de Cinética de Extração de Óleo de Soja

Os dados experimentais apresentados nas Figuras 5.16 e 5.17 foram utilizados para ajustar os parâmetros do modelo matemático proposto por So e MacDonald (1986). Este modelo envolve dois mecanismos principais no processo de extração de óleo, os quais, segundo os autores proponentes, ocorrem simultaneamente: os processos de lavagem e difusão.

Elevados coeficientes de determinação ($0,9969 < R^2 < 0,9999$) e baixos desvios relativos ($0,88 < DMR < 4,66$) foram obtidos (Tabelas 5.28 e 5.29), indicando o bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

A Tabela 5.28 apresenta os coeficientes de transferência de massa e as concentrações no equilíbrio, calculados para cinética de extração de óleo de soja, através do modelo proposto por So e MacDonald (1986).

Para a cinética de extração de óleo verifica-se a predominância do processo de lavagem em relação à etapa de difusão, uma vez que os coeficientes de lavagem são, em média, 13 vezes maiores que os de difusão. Com relação ao efeito da temperatura, não se observa diferença entre os coeficientes de transferência de massa nas três temperaturas estudadas para o solvente etanol absoluto. Já para o etanol azeotrópico podem ser observados maiores coeficientes para temperaturas mais elevadas (50 e 60 °C). De fato, como já esperado e verificado nos experimentos de equilíbrio, quanto maior a temperatura de processo maior o teor de óleo de soja extraído, desta forma, maior a concentração no equilíbrio.

Resultados similares foram encontrados por Meziane e Kadi (2008) no estudo da cinética de extração de óleo de torta de oliva utilizando como solvente etanol azeotrópico. Neste trabalho, o efeito da temperatura na cinética de extração do óleo foi avaliado de 20 a 50 °C e os autores concluíram que o aumento da temperatura resulta em aumento do rendimento de óleo no extrato. Além disso, os parâmetros do modelo de So e MacDonald também foram ajustados aos dados experimentais, sendo que os coeficientes de transferência de massa calculados para o processo de lavagem também foram maiores que os coeficientes relativos ao processo de difusão.

Os coeficientes de transferência de massa e as concentrações no equilíbrio, calculados para cinética de extração de ácidos graxos livres através do modelo de So e MacDonald (1986), podem ser visualizados na Tabela 5.29.

De maneira similar ao previamente exposto para a cinética de extração de óleo de soja, na cinética de extração de ácidos graxos livres têm-se coeficientes de transferência de massa mais elevados na etapa de lavagem, em média 13 vezes maiores que os relativos ao processo de difusão, indicando a predominância deste fenômeno no processo de extração destes compostos minoritários. De fato, em relação à extração destes compostos minoritários com etanol absoluto, a análise fica prejudicada devido aos elevados valores de desvios resultantes da dificuldade experimental associada à execução de experimentos com este solvente, resultando em altíssimos valores de covariância relacionados aos coeficientes das etapas de lavagem e difusão (57 e 29%, em média, respectivamente).

As concentrações no equilíbrio calculadas estão de acordo com o esperado, com maiores concentrações obtidas a maiores temperaturas. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios realizados por Rodrigues e Oliveira (2010) e Rodrigues et al. (2011) nos quais é observado que a transferência de ácidos graxos livres, da matriz sólida para a fase extrato, é promovida pelo aumento da temperatura quando solventes com baixo teor de água são utilizados.

Os ácidos graxos livres são compostos que impactam negativamente na qualidade do óleo extraído. Assim, o conhecimento da velocidade de extração pode possibilitar a produção de óleos com menores níveis de acidez, aumentando sua estabilidade oxidativa e desonerando as etapas posteriores de refino.

Nas Figuras 5.20 e 5.21 são apresentados os gráficos de distribuição de resíduos, que consistem na diferença entre os dados experimentais e os valores obtidos pelo modelo, para as cinéticas de extração de óleo e de ácidos graxos livres, respectivamente. Pode-se notar que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno da média zero. De fato, não se verifica tendência nesta distribuição e pode-se dizer que os dados estão distribuídos de forma independente, ou seja, não há correlação entre observações consecutivas para todas as condições de processo estudadas. Desta forma, pode-se inferir que os dados experimentais foram bem ajustados pelo modelo de So e MacDonald (1986).

Tabela 5.28 - Coeficientes de transferência de massa e concentrações no equilíbrio calculados pelo modelo de So e MacDonald (1986) para cinética de extração de óleo de soja.

Solvente	T (°C)	Coeficientes de transferência de massa (min ⁻¹)		Concentração no equilíbrio (%)			R ² ^a	DMR ^b
		k _f	k _d	C _e ^f	C _e ^d	C _e		
Etanol com 0% de água	40,0±0,1	0,30±0,06	0,02±0,01	3,77±0,30	1,60±0,25	5,28±0,35	0,9992	2,02
	50,0±0,1	0,35±0,08	0,03±0,01	3,81±0,34	2,68±0,30	6,51±0,50	0,9995	1,71
	60,0±0,1	0,29±0,05	0,03±0,01	4,56±0,37	2,60±0,29	6,98±0,27	0,9996	1,53
Etanol com 6% de água	40,0±0,1	0,28±0,02	0,02±0,01	1,94±0,06	0,20±0,05	2,14±0,09	0,9999	1,06
	50,0±0,1	0,60±0,15	0,04±0,01	2,39±0,12	0,71±0,10	3,10±0,04	0,9998	0,88
	60,0±0,1	0,62±0,23	0,04±0,01	2,89±0,19	1,47±0,17	4,35±0,01	0,9997	1,24

^a coeficiente de determinação. ^b desvio médio relativo calculado de acordo com a Equação (4.12).

Tabela 5.29 - Coeficientes de transferência de massa e concentrações no equilíbrio calculados pelo modelo de So e MacDonald (1986) para cinética de extração de ácidos graxos livres.

Solvente	T (°C)	Coeficientes de transferência de massa (min ⁻¹)		Concentração no equilíbrio (%)			R ² ^a	DMR ^b
		k _f	k _d	C _e ^f	C _e ^d	C _e		
Etanol com 0% de água	40,0±0,1	0,34±0,20	0,04±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,10±0,00	0,9969	4,01
	50,0±0,1	0,66±0,58	0,03±0,01	0,07±0,01	0,10±0,01	0,17±0,01	0,9990	2,21
	60,0±0,1	0,41±0,10	0,03±0,00	0,11±0,01	0,13±0,01	0,25±0,01	0,9997	1,43
Etanol com 6% de água	40,0±0,1	0,14±0,05	0,01±0,01	0,08±0,02	0,13±0,12	0,15±0,01	0,9970	4,66
	50,0±0,1	0,19±0,04	0,02±0,01	0,10±0,01	0,12±0,01	0,20±0,01	0,9994	1,95
	60,0±0,1	0,11±0,03	0,01±0,02	0,18±0,04	0,08±0,06	0,23±0,01	0,9974	3,95

^a coeficiente de determinação. ^b desvio médio relativo calculado de acordo com a Equação (4.12).

Figura 5.20 - Distribuição de resíduos como função do tempo de extração de óleo de soja. Etanol absoluto: $\square$ $40,0 \pm 0,1$ °C; $\circ$ $50,0 \pm 0,1$ °C e $\triangle$ $60,0 \pm 0,1$ °C; Etanol azeotrópico: $\blacksquare$ $40,0 \pm 0,1$ °C; $\bullet$ $50,0 \pm 0,1$ °C e $\blacktriangle$ $60,0 \pm 0,1$ °C.

Figura 5.21 - Distribuição de resíduos como função do tempo de extração de ácidos graxos livres. Etanol absoluto: $\square$ $40,0 \pm 0,1$ °C; $\circ$ $50,0 \pm 0,1$ °C e Δ $60,0 \pm 0,1$ °C; Etanol azeotrópico: $\blacksquare$ $40,0 \pm 0,1$ °C; $\bullet$ $50,0 \pm 0,1$ °C e $\blacktriangle$ $60,0 \pm 0,1$ °C.

6. CONCLUSÕES

Em geral, os resultados do estudo do processo de extração de óleo de soja utilizando como solvente etanol, tanto na forma de cinética como na condição de equilíbrio, mostram que a extração de compostos lipídicos é fortemente influenciada pela presença da água no solvente. O aumento do teor de água no etanol suprime fortemente a extração de óleo enquanto que a elevação da temperatura favorece a extração.

O estudo realizado na condição de equilíbrio permitiu a visualização da capacidade máxima de extração do etanol em diferentes níveis de hidratação (0 a 12%) na faixa de temperatura de 40 a 90 °C. Os experimentos realizados com etanol contendo 12% de água nas temperaturas de 40 a 60 °C mostraram a inviabilidade da utilização de solvente com tal montante de água devido aos baixos rendimentos de óleo e elevada transferência de proteína obtidos, desta forma optou-se por não continuar o estudo com este solvente. Os resultados das extrações realizadas nas temperaturas de 80 e 90 °C com etanol absoluto e etanol com 6% de água apresentaram rendimento de óleo e de proteína bastante semelhantes, tanto na presença como na ausência de água no solvente.

A solubilidade de nitrogênio da fração proteica resultante das extrações do óleo também é fortemente influenciada pela presença da água no solvente de extração e pela temperatura, apresentando valores menores conforme o aumento do teor de água no etanol e da temperatura do processo. Inicialmente, supôs-se que este fato poderia ser resultado de uma possível interferência do óleo residual, impedindo a devida solubilização da proteína. Neste caso, realizou-se o estudo das extrações em corrente cruzada, com a total extração de óleo do farelo e posterior avaliação da solubilidade, o que permitiu concluir que a diminuição da solubilidade foi decorrente da presença da água no solvente do processo de extração do óleo. Em complemento, foram realizadas as análises de DSC que reforçaram os resultados obtidos na solubilidade, mostrando que a água presente no solvente atuou de forma expressiva sobre a desnaturação proteica.

A avaliação do perfil químico e da composição em ácidos graxos dos óleos obtidos com etanol mostrou que estes apresentaram a composição típica de óleo de soja, independente da condição de extração adotada.

Em relação ao estudo de cinética, foi possível verificar o comportamento dos ácidos graxos livres, sendo que o aumento da temperatura favoreceu a extração destes compostos assim como para o óleo. Além disso, a modelagem dos dados cinéticos apresentou elevados coeficientes de determinação (superiores a 0,99) mostrando que o modelo proposto por So e MacDonald (1986) é adequado para ser utilizado na descrição de dados de cinética de extração de óleo de soja e de compostos minoritários como ácidos graxos livres presentes na soja.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que é tecnicamente viável a utilização de etanol no processo de extração de óleo de soja. Pode-se inferir ainda, que dentre as condições estudadas, o nível ótimo de hidratação do solvente é cerca de 6% em massa, e a temperatura em torno de 80 °C, uma vez que nesta condição pode-se obter um bom rendimento de óleo, extração de proteínas relativamente baixa e menor migração da água da matéria-prima para a fase extrato. Contudo, a presença da água no solvente leva a desnaturação proteica, limitando o uso posterior do farelo desengordurado.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para melhor avaliação da influência da utilização do etanol no processo de extração do óleo da soja sobre a fração proteica, sugere-se realizar a extração de proteínas do farelo resultante da extração e, na forma de concentrados e/ou isolados proteicos proceder às análises de qualidade.

Realização de estudo experimental em equipamento contínuo de múltiplos estágios.

Monitoramento de demais compostos minoritários presentes na soja como os tocoferóis, por exemplo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C **Official methods of analysis**. 18th ed. Washington, D. C.: A.O.A.C., 2007. 1051 p.
- A.O.C.S. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, Press, 3rd ed. Champaign, v.1-2, 1998.
- ABBOTT, T. P.; NABETANI, H.; SESSA, D. J.; WOLD, W. J. effects of bound water on FTIR spectra of glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.44, p.2220-2224, 1996.
- ABRAHAM, G.; HRON, R. J.; KUK, M. S.; WAN, P. J. Water accumulation in the alcohol extraction of cottonseed. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.70, n.2, p.207-210, 1993.
- ALLAWZI, M. A.; ABU-ARABI, M. K.; AL-TAHER, F. A. Parametric study on the batch leaching process of Jojoba oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.107, n.7-8, p.469-475, 2005.
- ANDERSON, D. A primer on oils processing technology. In: SHAHIDI, F. (Ed.) **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v.05 (six volume set). 6th ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2005. Cap. 1, p.1-56.
- ANDERSON, G. E. **Edible Oil Processing: Solvent extraction**. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/processing/solventextract/index.htm>> The AOCS Lipid Library, 2011. Acesso em: 13 ago. 2012.
- BADER, S.; OVIEDO, J. P.; PICKARDT, C.; EISNER, P. Influence of different organic solvents on the functional and sensory properties of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) proteins. **Food Science and Technology**, London, v.44, p.1396-1404, 2011.
- BAÜMLER, E. R.; CARELLI, A. A.; CRAPISTE, G. H.; CARRÍN, M. A. Solvent Solvent extraction modeling of vegetable oil and its minor compounds. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.107, p.186-194, 2011.
- BAÜMLER, E. R.; CRAPISTE, G. H.; CARELLI, A. A. Solvent Extraction: Kinetic Study of Major and Minor Compounds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.87, p.1489-1495, 2010.
- BECKEL A. C.; BELTER P. A.; SMITH A. K. Solvent effects on the products of soybean oil extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.25, n.1, p.7-9, 1948.
- BECKER, W. Solvent extraction of soybeans. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.55, p.754-761, 1978.
- BERK, Z. Technology of products of edible flours and protein products from soybeans. **FAO Agricultural Services Bulletin**, Rome, n.97, 1992.

BICSAK, R. C. Comparison of Kjeldahl method for determination of crude protein in cereal grains and oilseeds with generic combustion method: Collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists' International**, Arlington, v.76, p.780–786, 1993.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.

BORTOLETTO, A. M.; VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Extração de óleo de soja com etanol e avaliação da solubilidade da fração protéica. In: XII Congresso Latinoamericano de Óleos e Gorduras, 2007, Florianópolis. **Anais do XII Congresso Latinoamericano de Óleos e Gorduras**. Florianópolis: SBOG, 2007.

CARBONARO, M.; NUCARA, A. Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. **Amino Acids**, Wien, v.38, p.679–690, 2010.

CHIEN, J. T.; HOFF, J. E.; LEE, M. J.; LIN, H. M.; CHEN, Y. J.; CHEN, L. F. Oil extraction of dried ground corn with ethanol. **The Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v.43, p.B103-B113, 1990.

CHIYODA, C.; PEIXOTO, E. C. D.; MEIRELLES, A. J. A.; RODRIGUES, C. E. C. Liquid–liquid equilibria for systems composed of refined soybean oil, free fatty acids, ethanol, and water at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, Amsterdam, v.299, p.141-147, 2010.

CHORNY, R. C.; KRASUK, J. H. Extraction for different geometries - constant diffusivity. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, Washington, v.5, p.206-208, 1966.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto 2012**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_08_09_10_58_55_boletim_portugues_agosto_2012.pdf> Brasília: CONAB, 2012. Acesso em: 13 ago. 2012.

CUEVAS, M. S.; RODRIGUES, C. E. C.; GOMES, G. B.; MEIRELLES, A. J. A. Vegetable oils deacidification by solvent extraction: liquid–liquid equilibrium data for systems containing sunflower seed oil at 298.2 K. **Journal of Chemical and Engineering Data**, Washington, v.55, n.9, p.3859–3862, 2010.

CUEVAS, M. S.; RODRIGUES, C. E. C.; MEIRELLES, A. J. A. Effect of solvent hydration and temperature in the deacidification process of sunflower oil using ethanol. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.95, p.291-297, 2009.

DAMODARAN, S. Functional Properties. In: NAKAI, S.; MODLER, H. W. (Ed.) **Food Proteins properties and characterization**. New York: Marcel Dekker, 1996.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAUN, J. K.; DECLERCQ, D. R. Comparison of combustion and Kjeldahl methods for determination of nitrogen in oilseeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.71, p.1069–1072, 1994.

DECKERE, E. A. M.; KORVER, O. Minor constituents of Rice bran oil as functional foods. **Nutrition Reviews**, New York, v.54, n.11, p.120S-126S, 1996.

DIBERT, K.; CROS, E.; ANDRIEU, J. Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic Data. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v.10, p.199-214, 1989.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29> Acesso em: 13 ago. 2012.

FAN, H. P.; MORRIS, J. C.; WAKEHAM, H. Diffusion phenomena in solvent extraction of peanut oil - effect of cellular structure. **Industrial and Engineering Chemistry**, Washington v.40, n.2, p.195-199, 1948.

FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) **Food and Nutrition Paper 91 Fats and fatty acids in human nutrition** – Report of an expert consultation, Rome, 2010 (E).

FÉRNANDEZ, M, B.; PEREZ, E. E.; CRAPISTE, G. H.; NOLASCO, S. M. Kinetic study of canola oil and tocopherol extraction: Parameter comparison of nonlinear models. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.111, p.682-689, 2012.

FIRESTONE, D. (Ed.) **Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes**. 2nd ed. Washington, D.C: AOCS Press, 2006.

FONSECA, H.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Aflatoxin removal of peanut meals with aqueous ethanol. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.50, p.154-156, 1993.

FRANCO, D.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. J. Analysis of variables and modeling of *Gevuina Avellana* oil extraction with ethanol near azeotrope conditions. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v.32, p.664-681, 2008.

FRANCO, D.; SINEIRO, J.; PINELO, M.; NUNEZ M. J. Ethanol extraction of *Rosa rubiginosa* soluble substances: Oil solubility equilibria and kinetic studies. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.79, n.1, p.150-157, 2007.

FUKUSHIMA, D. Denaturation of soybean proteins by organic solvents. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.46, p.156-163, 1969.

FUKUSHIMA, D. Recent progress on biotechnology of soybean proteins and soybean protein food products. **Journal Food Biotechnology**, Connecticut, v.8, n.2-3, p.83-135, 1991.

FURUKAWA, T.; OHTA, S.; YAMAMOTO, A. Texture-structure relationships in heatinduced soy protein gels. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v.10, n.1, p.333-346, 1979.

GERMAN, B.; DAMODARAN, S.; KINSELLA, J. E. Thermal dissociation behavior of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.30, p.807-811, 1982.

HAMMOND, E. G.; JOHNSON, L. A.; SU, C.; WANG, T.; WHITE, P. J. Soybean Oil. In: SHAHIDI, F. (Ed.) **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v.02 (six volume set), 6th ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2005. Cap. 13, p.577-650.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **Evolução e Perspectivas de Desempenho Econômico Associadas com a Produção de Soja nos Contextos Mundial e Brasileiro**. 3 ed. Londrina: Embrapa Soja, 2011. Documentos n.319. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/Doc319_3ED.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2012.

HRON, R. J.; KOLTUN S. P.; GRACI Jr., A. V. Biorenewable solvents for vegetable oil extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.59, n.9, p.674-684, 1982.

HRON, R. J.; KOLTUN, S. P. An aqueous ethanol extraction process for cottonseed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.61, n.9, p.1457-1460, 1984.

HUI, Y. H. (Ed.) **Handbook of food science, technology, and engineering**. v.01. Melbourne: CRC Press, 2006.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Levantamento sistemático da produção agrícola**. v.25, n.06, p.1-88. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201206.pdf> Rio de Janeiro: IBGE, 2012. Acesso em: 13 ago. 2012.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Research Council. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fats, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (Macronutrients)**. Washington, DC: The National Academies Press, 2005.

IUPAC. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 6th ed., part 1 (sections I and II). PAQUOT, C. (Ed.), Pergamon Press, 1979.

JENALIB. **Determination of secondary structure in proteins by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)**. Disponível em: <http://www.imb-jena.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html.html> Acesso em: 13 jun. 2012.

JOHNSON, L. A. Recovery of fats and oils from plant and animal sources. In: O'BRIEN, R. D.; FARR, W. E.; WAN, P. J. (Ed.) **Introduction to fats and oils technology**. 6th ed. Illinois: AOCS Press, 2000.

JOHNSON, L. A.; LUSAS, E. W. Comparison of alternative solvents for oils extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.60, n.2, p.229-242, 1983.

JUNG, S.; RICKERT, D. A.; DEAK, N. A.; ALDIN, E. D.; RECKNOR, J.; JOHNSON, L. A.; MURPHY, P. A. Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.80, n.2, p.1169–1173, 2003.

KAMAL-ELDIN, A. Minor components of fats and oils. In: SHAHIDI, F. (Ed.) **Bailey's industrial oil and fat products**. v.03 (six volume set). 6th ed., New Jersey: John Wiley and Sons, 2005. Cap. 12, p.319-359.

KARNOFSKY, G. Design of oilseed extractors. I. Oil extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.63, p.1011-1014, 1986.

KILARA, A.; HARWALKAR, V. R. Denaturation. In: NAKAI, S.; MODLER, H. W. (Ed.) **Food Proteins: Properties and Characterization**. New York: John Wiley & Sons, 1996, p.71-165.

KING-BRINK, M.; SEBRANEK, J. G. Combustion method for determination of crude protein in meat and meat products: Collaborative study, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists' International**, Arlington, v.76, p.787–793, 1993.

KINSELLA, J. E. Functional properties of proteins in foods: a survey. **Critical reviews in food science and nutrition**, Boca Raton, v.7, n.3, p.219–280, 1976.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.56, p.243-258, 1979.

KITAMURA, K. Genetic improvement of nutritional and food processing quality in soybean. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Tokyo, v.29, p.1-8, 1995.

KONG, J.; YU, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v.39, n.8, p.549–559, 2007.

KUK, M. S.; HRON, R. J. Cottonseed extraction with new solvent system: Isohexane and alcohol mixtures. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.75, p.927-930, 1998.

KWIATKOWSKI, J. R.; CHERYAN, M. Extraction of oil from ground corn using ethanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.79, n.8, p.825–830, 2002.

LEE, K. H.; RYU, H. S.; RHEE, K. C. Protein solubility characteristics of commercial soy protein products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.80, n.1, p.85–90, 2003.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. 532p.

MAGNE, F. C.; SKAU, E. L. Phase equilibrium data pertaining to the extraction of cottonseed oil with ethanol and 2-propanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.30, p.288-291, 1953.

MARCILLA, A.; RUIZ, F.; GARCÍA, A. N. Liquid-liquid-solid equilibria of the quaternary system water-ethanol-acetone-sodium chloride at 25 °C. **Fluid Phase Equilibria**, Amsterdam, v.112, p.273-289, 1995.

MEZIANE, S.; KADI, H. Kinetics and thermodynamics of oil extraction from olive cake. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.85, p.391-396, 2008.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEINS, J. M.; VAN BUREN, J. M.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.

MURRAY, E. D.; ARNTFIELD, S. D.; ISMOND, M. A. H. The influence of processing parameters on food protein functionality II. Factors affecting thermal properties as analyzed by differential scanning calorimetry. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v.18, n.2, p.158-162, 1985.

OKATOMO, S. Studies on the alcoholic extraction of soybean oil. **Contemporary Manchuria**, Manchuria, v.1, n.3, p.83–101, 1937.

OLIVEIRA, C. M.; GARAVAZO, B. R.; RODRIGUES, C. E. C. Liquid–liquid equilibria for systems composed of rice bran oil and alcohol-rich solvents: Application to extraction and deacidification of oil. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.110, n.3, p.418-427, 2012a.

OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, V.; ARACAVA, K. K.; RODRIGUES, C. E. C. Effects of the Extraction conditions on the yield and composition of rice bran oil extracted with ethanol - A response surface approach. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v.90, p.22-31, 2012b.

PACE, C. N.; TREVIÑO, S.; PRABHAKARAN, E.; SCHOLTZ, J. M. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B – Biological Sciences**, London, v.359, p.1225-1235, 2004.

PATRICELLI, A.; ASSOGNA, A.; CASALAINA, A.; EMMI, E.; SODINI, G. Fattori che influenzano l'estrazione dei lipidi da semi decorticati di girasole. **La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**, Milano, v.56, p.136-142, 1979.

PEREZ, E. E.; CARELLI, A. A.; CRAPISTE, G. H. Temperature-dependent diffusion coefficient of oil from different sunflower seeds during extraction with hexane. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.105, p.180-185, 2011.

PIETRZAK, L. N.; MILLER, S. S. Microchemical structure of soybean seeds revealed in situ by ultraspatially resolved synchrotron Fourier Transformed Infrared Microspectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, p.9304-9311, 2005.

RAO, R. K.; ARNOLD, L. K. Alcoholic extraction of vegetable oils. II. Solubilities of corn, linseed, and tung oils in aqueous ethanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.33, p.82-84, 1956a.

RAO, R. K.; ARNOLD, L. K. Alcoholic extraction of vegetable oils. III. Solubilities of babassu, coconut, olive, palm, rapessed, and sunflower seed oils in aqueous ethanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.33, p.389-391, 1956b.

RAO, R. K.; ARNOLD, L. K. Alcoholic extraction of vegetable oils. V. Pilot plant extraction of cottonseed by aqueous ethanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.35, p.277-281, 1958.

RAO, R. K.; KRISHNA, M. G.; ZAHEER, S. H.; ARNOLD, L. K. Alcoholic extraction of vegetable oils. I. Solubilities of cottonseed, peanut, sesame, and soybean oils in aqueous ethanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.32, p.420-423, 1955.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B. **Ensaio de Extração de Óleo de Girassol (*Helianthus annus L.*) com Álcool Etílico**. 1985. 133 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luís de Queirós, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B. **Extração de Óleo de Girassol com Etanol: Cinética, ácido clorogênico, Fração insaponificável**. 1991. 145 p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Extração e refino de óleos vegetais. In: **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2006. p.300–354.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; ASSIS, R. P.; LIMA, U. A. Functional Properties of Sunflower seed meal obtained by ethanol extraction. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v.44, p. 29-32, 1994.

RODRIGUES, C. E. C. **Utilização de solvente biorenovável nos processos de extração e desacidificação de óleos vegetais**. 2011. Tese (Livre Docência em Equilíbrio de Fases e Processos de Separação na Indústria de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

RODRIGUES, C. E. C.; ARACAVA, K. K.; ABREU, F. N. Thermodynamic and statistical analysis of soybean oil extraction process using renewable solvent. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.45, p.2407–2414, 2010.

RODRIGUES, C. E. C.; LONGO, N. M.; SILVA, C. C.; ARACAVA, K. K.; GARAVAZO, B. R. Ethanolic extraction of soybean oil: oil solubility equilibria and kinetics studies. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v.24, p.811-816, 2011.

RODRIGUES, C. E. C.; OLIVEIRA, R. Response surface methodology applied to the analysis of rice bran oil extraction process with ethanol. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.45, p.813–820, 2010.

RODRIGUES, C. E. C.; PEIXOTO, E. C. D.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibrium for systems composed by refined soybean oil + commercial linoleic acid + ethanol + water, at 323.2K. **Fluid Phase Equilibria**, Amsterdam, v.261, p.122-128, 2007.

ROSENTHAL, A.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.19, p.402-420, 1996.

SATO, M.; INABA, T.; KITAGAWA, K. On the alcohol extraction process of fatty oils. I. Mutual solubilities of some vegetable oils. **Journal of the Society of Chemical Industry Japan**, Tokyo, v.37, p.718–721, 1934.

SATO, M.; ITO, C. **Method of Extracting Fatty Oil**. Patente americana 1892366, 1932.

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**, Chicago, v.75, p.911-916, 1998.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996.

SILVA, M. T. C.; TURATTI, J. M. Extração de óleo de soja com etanol. **Coletânea Ital**, Campinas, v.21, n.1, p.73-89, 1991.

SIMONNE, E. H.; HARRIS, C. E.; MILLS, H. A. Does the nitrate fraction account for differences between Dumas-N and Kjeldahl-N values in vegetables leaves? **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.21, p.2527–2534, 1998.

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

SMITH, A. K.; RACKIS, J. J.; ISNARDI, P.; CARTTER, J. L.; KROBER, O. A. Nitrogen solubility index, isolated protein yield, and whey nitrogen content of several soybean strains. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.43, p.261–269, 1966.

SO, G. C.; MACDONALD, D. G. Kinetics of oil extraction from Canola (Rapeseed). **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, Ontario, v.64, p.80–86, 1986.

SOBRAL, P. A.; PALAZOLO, G. G.; WAGNER, J. R. Thermal behavior of soy protein fractions depending on their preparation methods, individual interactions, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.58, p.10092-10100, 2010.

SOYSTATS. Disponível em: <<http://www.soystats.com/2012/Default-frames.htm>> Acesso em: 13 ago. 2012.

SWERN, D. (Ed.) **Bailey's Industrial Oil and Fat products**. 3rd ed. New York: Wiley and Sons. 1964.

TANG, C.; CHOI, S.; MA, C. Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v.40, p.96-104, 2007.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, p.3583-3597, 1991.

VIEIRA, T. M. F. de S. Estrutura, funcionalidade e aplicações de proteínas de soja. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ÓLEOS E GORDURAS, 12., 2007, Florianópolis. **Anais do XII Congresso Latinoamericano de Óleos e Gorduras**. Florianópolis: SBOG, 2007.

VISSER, A.; THOMAS, A. Review: Soya protein products – their processing, functionality, and application aspects. **Food Reviews International**, New York, v.3, n.1, p.1-32, 1987.

VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G. M. (Ed.). **Methods of testing protein functionality**. London: Chapman & Hall, 1996, p.11-61.

VOUTSINAS, L. P.; NAKAI, S.; HARWALKAR, V. R. Relationships between protein hydrophobicity and thermal functional properties of food proteins. **Canadian Institute Food Science and Technology**, Ottawa, v.16, n.3, p.185-190, 1983.

WAKELYN, P. J.; WAN, P. J. Solvent extraction to obtain edible oil products. In: AKOH, C. C. (Ed.) **Handbook of functional lipids**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

WILES, P. G.; GRAY, I. K.; KISSLING, R. C. Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: Review and interlaboratory study using dairy products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists' International**, Arlington, v.81, p.620–632, 1998.

WILLIAMS, M. A. Recovery of oils and fats from oilseeds and fatty materials. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v.05 (six volume set), 6th ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2005. Cap. 3, p.99-189.

SAWADA, M. M. *Estudo da viabilidade técnica da substituição de hexano por etanol no processo de extração de óleo de soja: cinética de extração e índices de qualidade*

WITHANA-GAMAGE, T. S.; WANASUNDARA, J. P. D.; PIETRASIKA, Z.; SHAND, P. J. Physicochemical, thermal and functional characterisation of protein isolates from Kabuli and Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.): a comparative study with soy (*Glycine max*) and pea (*Pisum sativum* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.91, p.1022–1031, 2011.

WOLF, W. J. Soybeans proteins: their functional, chemical, and physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.18, p.969-976, 1970.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P.- Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p.148-154. – 1ª Edição Digital.