



LARISSA NUNES SOUSA

**INVESTIGAÇÃO DOS FATORES QUE INFLUENCIAM NA
EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE SOJA**

LARISSA NUNES SOUSA

**INVESTIGAÇÃO DOS FATORES QUE INFLUENCIAM NA
EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado de Curso da Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Graduação em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares

São Luís
2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. ALEXANDRA MARTINS DOS S. SOARAES
Orientadora – COEQ/CCET/UFMA

Prof. Dr. PAULO HENRIQUE S. L. COELHO
COEQ/CCET/UFMA

Prof. Dr. HARVEY ALEXANDER VILLA VÉLEZ
COEQ/CCET/UFMA

09 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, pelo amor incondicional que me acolhe e me abraça a cada dia mesmo a distância. Por terem me proporcionado a melhor educação que eu poderia ter e por terem sido motivação para a conclusão desta etapa tão importante.

Ao meu parceiro de vida, Eugênio, por todo o amor, carinho e cuidado e por ter me inspirado a me tornar uma versão melhor de mim.

Às minhas amigas e colegas de curso, Ana, Girleia e Euzenir por estarem presentes nas alegrias e dificuldades da vida e por terem sido impulso nessa longa jornada chamada Engenharia Química.

À minha amiga Iracilene, porque sua amizade é um dos maiores presentes que a vida me deu. Pelas conversas que sempre me animam e dão força pra continuar.

À minha orientadora Alexandra, por ter aberto as portas do seu laboratório, pela orientação, pela paciência e compreensão.

Aos meus amigos do LBV, que foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Por não terem medido esforços quando precisei de ajuda. Por cada contribuição, pelo carinho, pelas risadas, pelas palavras de incentivo e por tornarem mais leve o dia a dia no laboratório.

Ao professor Paulo Henrique, pela imensa contribuição que foi indispensável à conclusão deste trabalho.

Ao professor Harvey, pelos conselhos, por todo o apoio e incentivo.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, meu porto seguro e minha inspiração.

SOUSA, Larissa Nunes. **Investigação dos fatores que influenciam na extração de proteínas de sementes de soja**. 2019. 37. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o intuito de analisar a influência dos parâmetros pH, temperatura, tempo e proporção massa/solvente, na extração de proteínas de *Glycine max*. Visando maximizar a quantidade de proteínas recuperadas, em termos de massa de proteína por grama de farinha delipidada (mg/g) (variável resposta), foi realizado delineamento experimental fatorial central 3^4 (DFC), com quatro variáveis independentes, cada uma em três níveis (-1, 0, +1) e uma repetição, o que levou a um total de 162 ensaios com 81 condições experimentais distintas. As sementes de *G. max* foram trituradas, delipidadas e o pó resultante foi utilizado para os experimentos de extração. Utilizou-se tampão acetato de sódio (pH 4); tampão fosfato de sódio (pH 7) e tampão glicina NaOH (pH 10) como soluções extratoras, em diferentes proporções (1:30; 1:20; 1:10 m/v). As extrações foram conduzidas a diferentes tempos (10, 35 e 60 min) e temperaturas (10; 25; 40 °C). Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante coletado foi denominado extrato bruto, fonte de proteínas solúveis. O teor de proteínas de cada amostra foi determinado. Para otimização da resposta da variável de interesse (mg de proteína/g de farinha) em função dos parâmetros analisados, empregou-se análise de regressão a partir da metodologia de superfície de resposta (MSR). Concluiu-se que os parâmetros pH e proporção foram significativos no processo de extração de proteínas. O aumento do pH e a diminuição da proporção massa/volume de reagente foi apontado como melhor condição experimental para recuperação de proteínas das sementes de soja. Por outro lado, o fator tempo apresentou menor significância estatística e a temperatura não foi estatisticamente significativa em relação à recuperação de proteínas solúveis. Desta forma, extrações usando-se temperatura ambiente, seriam mais indicadas por razões econômicas. O entendimento da significância desses parâmetros na extração de proteínas de soja pode contribuir para a otimização de processos para sua obtenção.

Palavras-chave: Soja. Proteínas. Extração. Superfície de Resposta.

SOUSA, L. N. **Investigation of factors that influence soybean seeds protein extraction.** 2019. 37 f. Graduate Work (Graduate in Chemical Engineering) – Curso de Engenharia do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

ABSTRACT

This work was conducted in order to analyze the influence of the parameters pH, temperature, time and mass/solvent ratio on *Glycine max* protein extraction. In order to maximize the amount of total proteins recovered in terms of protein mass per gram of delipidated flour (mg/g) (response variable), a 3^4 central factorial experimental design (CFD) was performed with four independent variables, each at three levels (-1, 0, +1) and one replication, with a total of 162 runs with 81 distinct experimental conditions. *G. max* seeds were ground, delipidated and the resulting powder was used for the extraction experiments. Sodium acetate buffer (pH 4); sodium phosphate buffer (pH 7) and glycine NaOH buffer (pH 10) were used as extraction solutions in different proportions (1:30; 1:20; 1:10 m / v). Extractions were conducted at different times (10, 35 and 60 min) and temperatures (10; 25; 40 °C). After extraction, the samples were centrifuged at 12000 x g for 20 minutes at 4 °C. The supernatant collected was called crude extract, source of soluble proteins. The protein content of each sample was determined. In order to optimize the response of the variable of interest (mg of protein/g of flour) as a function of the analyzed parameters, a regression analysis using the response surface methodology (RSM) was used. It was concluded that the pH and proportion parameters were significant in the protein extraction process. Increasing pH and reducing the reagent mass/volume ratio was indicated as the best experimental condition for soybean protein recovery. On the other hand, the time was less significant and the temperature were not statistically significant to soluble protein recovery. Thus, extractions using ambient temperature would be more indicated for economic reasons. Understanding the significance of these parameters in soybean protein extraction may contribute to the optimization of processes to obtain them.

Keywords: Soybean. Protein. Extraction. Response Surface.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação dos níveis de organização estrutural das proteínas.....	04
Figura 2 – Formação do complexo proteína-corante.....	07
Figura 3 – Fluxograma do Procedimento Experimental.....	10
Figura 4 – Curva Padrão do Bradford.....	12
Figura 5 – Massa de proteína por grama de farinha <i>versus</i> tempo de extração a 10 °C.....	14
Figura 6 – Massa de proteína por grama de farinha <i>versus</i> tempo de extração a 25 °C.....	15
Figura 7 – Massa de proteína por grama de farinha <i>versus</i> tempo de extração a 40 °C.....	16
Figura 8 – Gráfico de Pareto	17
Figura 9 – Superfície e resposta e Gráfico proporção <i>versus</i> pH.....	18
Figura 10 – Curvas de nível para T x pH e T x proporção	19
Figura 11 – Curvas de nível para t x pH e t x proporção.....	19

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	III
AGRADECIMENTOS	IV
DEDICATÓRIA.....	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
SUMÁRIO.....	IX
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 OBJETIVO GERAL.....	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
3.1 SOJA (GLYCINE MAX).....	2
3.2 PROTEÍNAS	3
3.2.1 ASPECTOS GERAIS.....	3
3.2.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SOJA NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA.....	5
3.2.3 COMPOSTOS DE PROTEÍNA DE SOJA: SPI, SPC E TPS.....	6
3.3 O MÉTODO DE BRADFORD.....	7
3.4 A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (RSM).....	8
4 MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1 MATERIAL	8
4.2 REAGENTES	9
4.3 INSTRUMENTOS/EQUIPAMENTOS/SOFTWARES	9
4.4 LOCAL DA PESQUISA.....	9
4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	9
4.5.1 DELIPIDAÇÃO DAS SEMENTES.....	10
4.5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	10
4.5.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	11
4.5.4 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA.....	11
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	13
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
6 CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS	20
APÊNDICE A	28

1 INTRODUÇÃO

Com origem na China, a *Glycine max* (L.) (soja) é uma das sementes com maior valor econômico agregado devido à sua ampla aplicabilidade na indústria. O Brasil ocupa o segundo lugar em produção, atrás somente dos Estados Unidos. Segundo o último levantamento da Companhia Brasileira de Abastecimento, a estimativa para a safra 2019/2020 é de uma produtividade de 3.292 kg/ha e uma produção de 120,4 milhões de toneladas em uma área plantada de 36,6 milhões de hectares, o que representa um aumento de 4,7 % na produção em relação à safra anterior (CONAB, 2019).

Historicamente, o interesse comercial em torno dessa leguminosa tem sido majoritariamente devido ao seu conteúdo de óleo (18-22%) (APARICIO et al., 2008; YAKLICH, 2001; CHEN et al., 2016; QI et al., 2011; GOETTEL et al., 2014). Entretanto, nos últimos anos, tem-se explorado cada vez mais a soja como fonte de proteínas para formulação de alimentos (CIABOTTI et al., 2007; BISLA et al., 2012; REZI; MURESANU, 2013), principalmente por ser de baixo custo em relação às fontes de origem animal, como leite e ovos, uma vez que demandam menor quantidade de energia em sua produção (PIMENTEL; PIMENTEL, 2003).

Segundo Figueiredo (2016) espera-se que a população mundial atinja 9 bilhões de pessoas em 2050, levando a um aumento sem precedentes na demanda por alimentos. Nesse contexto, a soja apresenta-se como uma das mais importantes fontes de nutrientes para alimentação humana, bem como para ração animal (KIM et al., 2003). Este grão apresenta teor de até 40% de proteínas em base seca (APARICIO et al., 2008), o que torna essa espécie vegetal a mais rica dentre todos os cultivares comerciais. Além da alta concentração de antioxidantes (CAHOON, 2003), contém todos os aminoácidos essenciais necessários ao metabolismo humano (CHEN et al., 2013).

Dada a importância da soja como fonte de proteínas, tem-se a necessidade do desenvolvimento de métodos baratos e eficientes para sua obtenção. Atualmente na indústria, a extração de proteínas de soja é realizada em diferentes condições de pH, temperatura e tempo dependendo do fabricante (WU et al. 2000; PREECE, HOOSHYARB; ZUIDAM, 2017; LUTHRIA et al., 2018), de modo que, um melhor entendimento da influência desses parâmetros nesse processo pode contribuir para um maior rendimento, visto que os subprodutos gerados ainda apresentam considerável quantidade de proteínas (SRUAMSIRI e SILMAN, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar as melhores condições operacionais para a extração de proteínas de *Glycine max* em função dos parâmetros físico-químicos pH, temperatura, tempo e proporção.

2.2 Objetivos específicos

- Definir as condições para extração de proteínas de soja por meio de delineamento experimental com auxílio computacional;
- Extrair e quantificar as proteínas de soja;
- Analisar os resultados de conteúdo de proteínas obtidos por meio da interação entre as variáveis de controle experimentais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Soja (*Glycine max*)

A soja é uma espécie pertencente ao reino Plantae, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, Família Fabaceae ou Leguminosae, gênero *Glycine* e espécie *Glycine max* (SEDYNAUA, 2009). É uma das mais importantes leguminosas do mundo, com enorme valor econômico agregado e diversas aplicações nas indústrias agropecuária, química e de alimentos (FREITAS, 2011).

A planta caracteriza-se pelo seu porte ereto, podendo atingir até 2 metros de altura. Suas sementes podem ser de cor amarela, verde, marrom, preta ou bicolor, podendo conter de uma a quatro sementes por vagem (ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2016). Sua temperatura ideal de crescimento varia em torno de 30 °C, mas a planta se adapta bem na faixa de 20-30 °C (EMBRAPA, 2014) e o ciclo da cultura pode durar de 75 a 200 dias (MYASAKA; MEDINA, 1981; GASSEN; BORGES, 2004).

Um dos mais antigos cultivares da história, por muitos anos a soja teve sua produção e uso restritos a países orientais, como China (país de origem), Coreia e Japão. Sua introdução no ocidente ocorreu no século XIX nos Estados Unidos, que atualmente é o maior produtor mundial do grão. No Brasil, as primeiras plantações de soja ocorreram em 1921 no estado de São Paulo em colônias Japonesas (HYMOWITZ, 1970).

A semente de soja comercial contém 38-42% de proteínas em base seca (PATIL et al., 2017) e 18-22% de óleo (APARICIO et al., 2008), o que a torna uma valiosa fonte de alimento para milhões pessoas ao redor do mundo. Amplamente utilizada na indústria alimentícia, a soja é uma fonte barata de proteínas para formulação de diversos gêneros alimentícios como fórmulas para bebês, suplementos alimentares, produtos lácteos, tofu, molhos, entre outros (GANDHI, 2009). Além disso, contém inúmeros benefícios à saúde humana (ASIF; ACHARYA, 2013). O farelo de soja, subproduto da produção de óleo comestível, é largamente utilizado como ração animal (PETTERSSON; PONTOPPIDAN, 2013).

A constituição proteica da semente de soja consiste majoritariamente em duas proteínas de armazenamento, a β -conglucina e a glicina, as quais totalizam aproximadamente 70-80% das proteínas presentes. Dentre as proteínas de menor abundância estão a β -amilase, citocromo, lectina, lipoxigenase, urease, inibidor de tripsina de Kunitz (KTI) e inibidor de tripsina de Bowman-Birk (BBI) (NATARAJAN, 2014).

Os carboidratos são o segundo composto em maior abundância presentes na semente de soja, com um teor de aproximadamente 35% em base seca (GIANNOCCARO et al., 2006). A celulose, pectina, hemicelulose e amido são alguns dos carboidratos insolúveis da soja (LIU et al., 1997) e dentre os carboidratos solúveis estão a estaquiose, xilose, sucrose, frutose, ribose, rafinose, arabinose, fucose, manose e ramnose (ELDRIDGE et al., 1979).

Outras biomoléculas existentes em menor abundância na soja, mas que apresentam considerável valor nutricional para seres humanos e outros animais são as saponinas, caracterizadas pelo sabor amargo e adstringente (WYK, 1979) e as isoflavonas, que, dentre outros benefícios, tem sido estudadas pela sua potencial atividade anticancerígena (MEJIA; BRADFORD; HASLER, 2003), as quais representam aproximadamente 0,47% e 0,25 % do conteúdo da semente, respectivamente (IRELAND, P. A.; DZIEDZIC, S.; KEARSLEYB, 1986; NAIM, et al., 1974).

3.2 Proteínas

3.2.1 ASPECTOS GERAIS

As proteínas são biomoléculas de grande importância para os seres vivos. Essenciais a todas as células vivas, essas macromoléculas estão diretamente relacionadas desempenho de muitas funções do metabolismo celular.

Quimicamente, as proteínas são polímeros de alto peso molecular (acima de 10.000), constituídas de subunidades moleculares chamadas aminoácidos, interligados por meio de

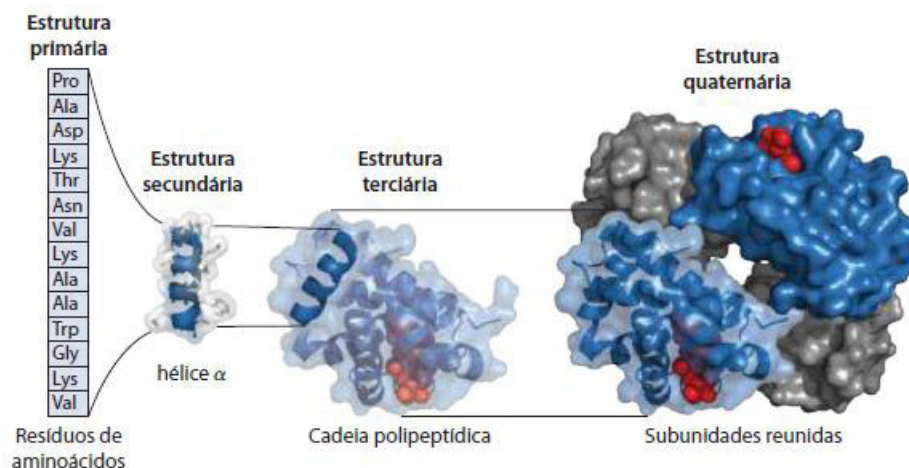
ligações peptídicas. O tipo, o número e o modo de arranjo estrutural dos resíduos de aminoácidos constituintes definem as propriedades de uma proteína. Todas as proteínas presentes nos organismos vivos, do mais simples ao mais complexo, são formadas a partir de 20 aminoácidos essenciais, que podem ser combinados em infinitas formas estruturais diferentes, possibilitando a existência de proteínas com as mais variadas propriedades físicas, químicas e biológicas (BRANDEN; TOOZE, 1999).

Os principais elementos constituintes das proteínas são carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre e raramente podem conter fósforo. Em geral as proteínas apresentam composição muito semelhante: 50% a 55% de carbono, 6% a 8% de hidrogênio, 20% a 24% de oxigênio, 15% a 18% de nitrogênio e de 0,2% a 0,3% de enxofre (TRINADE, 2014).

Para formação de uma proteína, os aminoácidos se unem por meio de ligações covalentes em sequência linear formando cadeias peptídicas, a partir das quais os organismos conseguem sintetizar produtos tão diversificados como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, fibras musculares, antibióticos, entre muitas outras substâncias com propriedades específicas (NELSON; COX, 2014).

Quanto aos aspectos estruturais, existem quatro tipos de estrutura proteica. A estrutura primária consiste em uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. A estrutura secundária é formada pela distorção ou dobramento das cadeias peptídicas podendo adquirir diferentes conformações, sendo a mais comum a estrutura α -hélice. A estrutura terciária, descreve os aspectos de enovelamento tridimensional de um polipeptídeo. A estrutura quaternária é formada por arranjos espaciais entre duas ou mais subunidades peptídicas (NELSON; COX, 2014). Os quatro tipos estruturais estão representados na figura 1.

Figura 1 – Representação dos níveis de organização estrutural das proteínas



Fonte: Nelson e Cox, 2014.

As proteínas controlam praticamente todo o metabolismo das células, sendo responsáveis por inúmeras funções diferentes nos organismos vivos, dentre as quais pode-se destacar o armazenamento, suporte estrutural, transporte de substâncias, defesa e catálise. (WANG et al., 2008).

3.2.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SOJA NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

A extração é uma etapa fundamental aos processos industriais de obtenção de compostos de proteína de soja. Geralmente, os processos empregados na extração dessas proteínas são fundamentados nos princípios de química analítica e baseados em estudos laboratoriais. Tais processos são e adaptados para larga escala e otimizados visando alcançar maiores rendimentos com custo e tempo reduzidos e com as características desejadas (SOARES, 2018).

Dentre os principais processos empregados nos dias atuais pode-se destacar o Tetra Pak Alwin (IMRAM et al., 2003), no qual a extração é realizada a 85 °C em pH 8 e a decantação é utilizada como meio de separação. Outro processo abordado na literatura é o descrito por Preece, Hooshyarb e Zuidam (2017) no qual as sementes são previamente descascadas e passam por um tratamento térmico de 114 °C, o que reduz significativamente a quantidade de proteínas obtidas, sendo, entretanto, aplicável na indústria alimentícia por conferir maior estabilidade microbológica devido à alta temperatura. Em contrapartida, o processo utilizado pela ProSoya é realizado em temperatura ambiente, tendo como vantagem a não desnaturação das proteínas e uma melhor palatabilidade, mas com a necessidade de tratamento térmico posterior (GUPTA, 2014).

De acordo com Berk (1997) as condições de extração empregadas na maioria dos processos podem variar dependendo da planta industrial, sendo realizada comumente utilizando-se soluções aquosas alcalinas como solução extratora e em condições de pH 7,5 a 9,0, temperaturas acima de 80 °C, tempo de aproximadamente 1 h e proporções de massa por volume de solvente entre 1/10 e 1/20.

Wu et al. (2000) afirmaram que tipicamente, a extração comercial das proteínas de soja é feita em pH 6,8-9,0, à temperaturas 55-65 °C e com tempo variando entre 15 min a 1 h.

Os principais processos atualmente empregados na extração de proteínas de soja são conduzidos em diferentes condições de processamento e sofreram as poucas alterações ao longo das últimas décadas. Parâmetros como pH, temperatura e tempo de extração, variam dependendo do fabricante (PREECE; HOOSHYARB; ZUIDAM, 2017; LUTHRIA et al., 2018). Além disso, foi comprovado que uma considerável quantidade de proteínas é retida no

subproduto dessa produção, o que indica a necessidade de melhoramento dos processos visando atingir maiores rendimentos (SRUAMSIRI; SILMAN, 2008).

3.2.3 COMPOSTOS DE PROTEÍNA DE SOJA: SPI, SPC E TPS

Geralmente, compostos de proteína de soja estão disponíveis em três variações comerciais: a proteína de soja isolada (SPI) contendo aproximadamente 90% de proteínas (YANG et al., 2014), a proteína de soja concentrada (SPC) com aproximadamente 65% de proteínas (KAITH, JINDAL e BHATIA, 2011) e a proteína texturizada de soja (TSP) que contém em média 51% de proteínas (KATAYAMA e WILSON, 2008), sendo a SPI o mais refinado produto derivado dessa leguminosa, capaz conferir propriedades funcionais específicas aos alimentos, tais como emulsificação (MATSUMIYA e MURRAY, 2016) e formação de espuma (LIU et al., 2008), responsáveis por agregar sabor e aumentar a estabilidade, prolongando o tempo de prateleira desses produtos.

A SPI e a SPC demonstram ser alternativas viáveis para compor alimentos destinados a pessoas com restrições nutricionais, como portadores de doença celíaca, que demandam uma dieta livre de glúten e alérgicos a proteínas de origem animal, como a albumina e a caseína (KOBYLAŇSKY, PÉREZ e PILOSOFF, 2004; RIBOTTA et al., 2004; MARCO e ROSELL, 2008a), contribuindo diretamente com a saúde e a qualidade de vida desses indivíduos. Marco e Rosell (2008b) concluíram que houve melhora significativa nas propriedades físicas do pão sem glúten após a adição de 13% de SPI.

Tanto a TSP, amplamente consumida por vegetarianos e veganos em substituição à carne bovina, quanto a SPI são muito utilizadas na preparação de alimentos sem ingredientes de origem animal (LIN et al., 2017). Tais produtos são voltados não somente à esses consumidores, mas também aos que, em geral, buscam hábitos alimentares mais saudáveis e sustentáveis (HOEK et al., 2009), uma vez que uma dieta baseada em produtos de origem vegetal comprovadamente reduz o risco de doenças como diabetes, obesidade, câncer e doenças cardiovasculares (LE e SABATÉ, 2014; DINU et al., 2016; HERRERA et al., 2017). A SPI é ainda uma excelente fonte proteica para suplementação alimentar de atletas e praticantes de atividades físicas que buscam uma reconstrução muscular mais eficiente (SHENOY et al., 2016).

3.3 O Método de Bradford

A metodologia desenvolvida por Bradford (1976) para quantificação proteica é amplamente utilizada devido à sua praticidade, rapidez, alta sensibilidade e linearidade. Trata-se de um método colorimétrico que baseia-se nas interações entre resíduos básicos de aminoácidos, lisina, arginina e histidina com o corante azul brilhante de Comassie (reagente de Bradford), que reagem resultando em um complexo de coloração azul, o qual apresenta alta absorção de luz a 595 nm (SHEROVSKI; STOJKOVIĆ; RISTOVSKA, 2018). A quantificação proteica é realizada por meio de leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro nesse comprimento de onda. A figura 2 contém uma representação da formação do complexo proteína-corante.

Figura 2. Formação do complexo proteína-corante.



Fonte: Sherovski, Stojković e Ristovska (2018).

Para determinação do intervalo linear do ensaio, realiza-se a construção de uma curva padrão para o reagente de Bradford utilizando como proteína padrão a albumina sérica bovina (BSA). Prepara-se uma solução de concentração conhecida dessa proteína, e dilui-se para obtenção de várias soluções na faixa de concentração adequada ao ensaio. Em seguida, adiciona-se o reagente e faz-se as leituras de absorbância para cada concentração, além de uma amostra contendo somente o solvente utilizado na solução e o reagente (branco).

Para concentrações acima de 10 µg/mL de BSA, observa-se uma diminuição na linearidade do método devido à sobreposições dos espectros das duas formas do corante em equilíbrio e em decorrência de variações na concentrações dos compostos presentes no meio, durante a formação do complexo proteína-corante (BRADFORD, 1976). Geralmente, utiliza-se a faixa de 0,05 a 1 mg/mL.

3.4 A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

A metodologia de superfície de resposta é um método amplamente utilizado no tratamento de dados experimentais, sendo eficiente na otimização de processos, sistemas ou produtos, principalmente quando o intuito da pesquisa é maximizar ou minimizar uma variável de interesse, seja ela qualitativa ou quantitativa, uma vez que possibilita fazê-lo ao mesmo tempo em que atende à critérios e especificações desejadas (BASRI et al., 2007; BEZERRA et al., 2008).

Desenvolvida por G. E. P. Box na década de 1950, essa metodologia apresenta duas etapas principais, a modelagem, que consiste em ajustar às respostas obtidas por meio de determinado planejamento fatorial, modelos simplificados (lineares ou quadráticos) e o deslocamento, isto é, a tendência de inclinação do modelo, que é a direção para a qual se observa uma maior variação da resposta. Tais etapas permitem avaliar a influência das variáveis controle na resposta de interesse (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O planejamento experimental é uma etapa preliminar de grande importância para aplicação da RSM, a qual envolve a definição do delineamento experimental, que deve ser adequado ao tipo de análise que se deseja realizar e depende, dentre outras características, da quantidade de fatores a serem analisados, dos tipos dados envolvidos no processo e do objetivo da pesquisa, sendo também parte do planejamento experimental, a escolha das variáveis de controle, bem como a especificação dos níveis para cada variável, o que geralmente é feito com base em dados da literatura (BEZERRA et al., 2008).

A metodologia de superfície de resposta possibilita a análise da influência de múltiplas variáveis a partir de gráficos de superfície ou curvas de nível com duas variáveis, a fim de maximizar ou minimizar a variável resposta. Segundo Barros, Scarminio e Bruns (2001), em um sistema com várias variáveis é comum ocorrer a interação entre elas, isto é, estas podem se influenciar mutuamente e o valor ótimo para uma delas pode depender do valor da outra, de modo que, a análise isolada de uma variável não garante a sua real otimização, uma vez que negligencia os efeitos dessas interações. Ainda segundo os autores, a partir de planejamentos fatoriais completos, é possível avaliar o efeito simultâneo de várias variáveis por meio de um número mínimo de ensaios experimentais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Sementes maduras de soja cv. BRS Pala, cultivar comercial e convencional de soja com alto teor de proteínas (38,8%), foram fornecidas pela Agência Agrícola Brasileira Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). As mesmas foram armazenadas em geladeira a aproximadamente 6°C em embalagem plástica devidamente vedada.

4.2 Reagentes

Para delipidação da farinha de soja e preparo das soluções extratoras utilizou-se os seguintes reagentes de grau analítico: *n*-hexano, acetato de sódio, ácido acético, cloreto de sódio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio, glicina e reagente Bradford.

4.3 Instrumentos/equipamentos/software

As sementes foram trituradas utilizando um moedor de café CADENCE MDR301. Utilizou-se um peagâmetro de bancada EDGE HI 2002 da HANNA para medição do pH das soluções. Para a separação das amostras foi utilizada uma micro centrífuga refrigerada de bancada NT 805 da NOVATÉCNICA.

Para a quantificação proteica, realizou-se as leituras de absorbância em espectrofotômetro SP 2000 UV da BEL PHOTONICS. Para manter as amostras nas temperaturas específicas durante o tempo de extração utilizou-se uma incubadora BOD TE-371 da TECNAL. A manutenção da temperatura durante a adição das soluções extratoras foi realizada por meio de banhos de gelo. Outros equipamentos utilizados foram a balança analítica FA2104N da BIOPRECISA e agitador vortéx de tubos AP – 56 da PHOENIX LUFERCO.

Os softwares utilizados para o tratamento dos dados experimentais foram Microsoft EXCEL (versão 1909/2016) e STATISTICA (versão 7.0/2008).

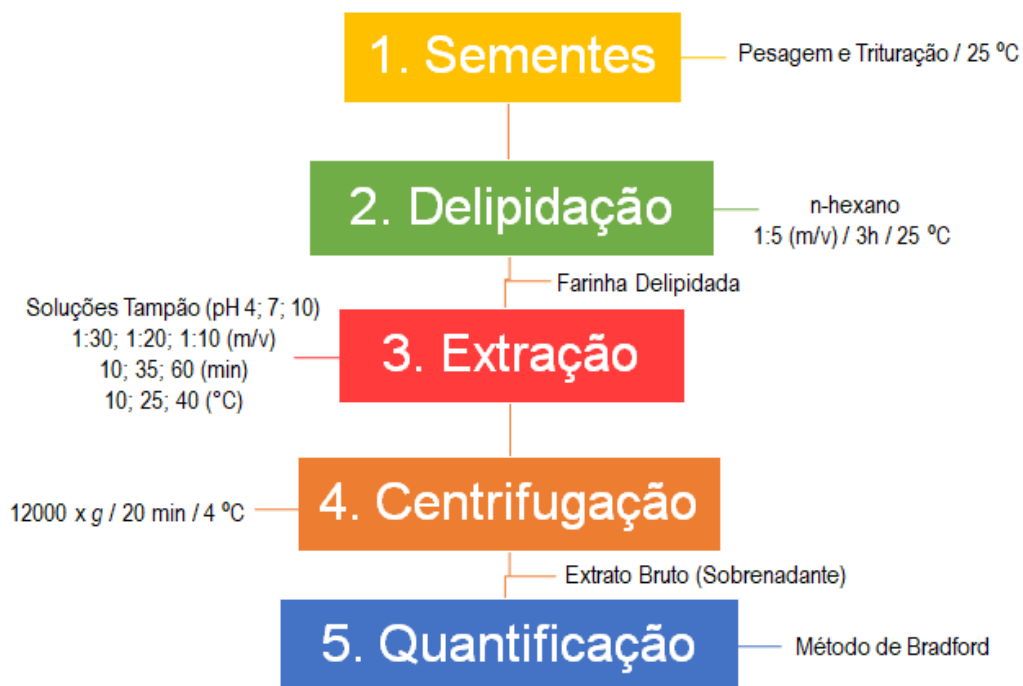
4.4 Local da pesquisa

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

4.5 Procedimento Experimental

A figura 3 contém o fluxograma com as principais etapas do procedimento experimental realizado.

Figura 3. Fluxograma do Procedimento Experimental



4.5.1 DELIPIDAÇÃO DAS SEMENTES

As sementes à temperatura ambiente foram trituradas e o pó obtido foi delipidado pela adição de *n*-hexano na proporção 1:5 (m/v) durante 3 horas em temperatura ambiente (25 °C)(MARTINS, 2015). Em seguida, o solvente foi evaporado em capela de exaustão e a farinha delipidada foi reservada em tubos falcon fechados a temperatura ambiente para preparação dos extratos proteicos.

4.5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A extrações foram realizadas seguindo o delineamento experimental obtido por meio do software STATISTICA.

Para maximização massa de proteínas obtida por grama de farinha delipidada (mg/g) (variável resposta) foi realizado delineamento experimental fatorial central 3^4 (DFC) com quatro variáveis independentes, cada uma em três níveis (-1, 0, +1) e uma repetição, conforme mostrado na tabela 1, o que levou a um total de 162 ensaios com 81 condições experimentais distintas. As condições experimentais de extração para cada amostra estão mostradas no quadro

1 (Apêndice A), onde cada par de algarismos representa uma duplicata. Os parâmetros experimentais analisados foram: pH, temperatura, tempo e proporção farinha/solução.

Tabela 1: Matriz do Delineamento Experimental

Variáveis independentes	Unidade	Níveis		
		-1	0	+1
pH	-	4	7	10
Temperatura	(°C)	10	25	40
Tempo	(min)	10	35	60
Proporção	(m/V)	1/30	1/20	1/10

4.5.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As soluções extratoras utilizadas foram tampão acetato de sódio 50 mM/NaCl 100 mM (pH 4), tampão fosfato de sódio 50 mM/NaCl 100 mM (pH 7) e tampão glicina NaOH 50 mM/NaCl 100 mM (pH 10).

Em tubos eppendorf de 2 ml, adicionou-se a farinha de soja previamente delipidada e acrescentou-se as soluções extratoras de acordo com a proporção especificada para cada amostra, conforme mostrado na tabela 2. Homogeneizou-se utilizando uma pipeta automática. Em seguida, as amostras foram levadas à incubadora BOD à temperatura e tempo controlados. Para separação das fases, as amostras foram submetidas a centrifugação a 12000 x g por 20 minutos e a 4 °C. O sobrenadante coletado foi denominado extrato bruto e armazenado sob congelamento para posterior quantificação.

Tabela 2: Massa de farinha e volume de solução adicionados

Proporção	Massa de Farinha (g)	Volume de Solução (ml)
1/10	0,15	1,5
1/20	0,075	1,5
1/30	0,05	1,5

4.5.4 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

A quantidade de proteína obtida foi mensurada por meio do método de Bradford (1976). Para realização do ensaio de quantificação proteica, adicionou-se 100 µL de cada amostra em

tubos de ensaio devidamente identificados e acrescentou-se 2500 μL de reagente Bradford. Submeteu-se cada tubo à agitação em vortex por 10 segundos e deixou-se em repouso por 10 minutos. Em seguida, fez-se a leitura das absorvâncias das amostras em espectrofotômetro a 595 nm. Para preparação do branco, substituiu-se as amostras pelas respectivas soluções extratoras utilizadas.

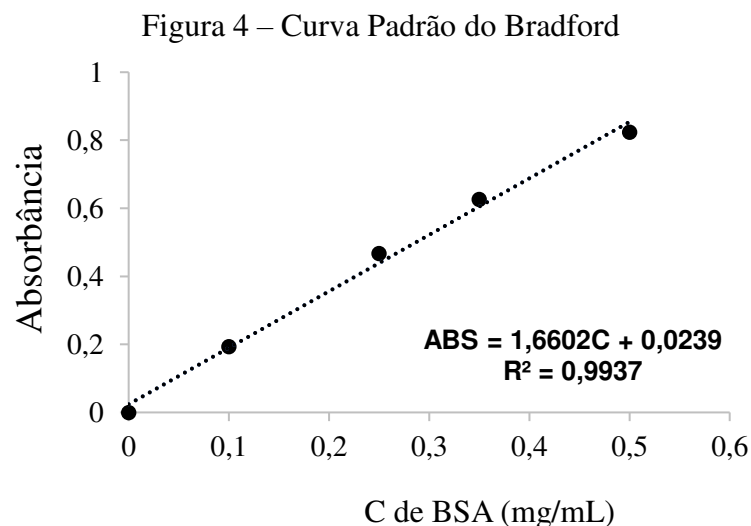
Este ensaio foi desenvolvido em duplicata e diluições foram realizadas nas amostras, de modo que as leituras de absorvância apresentadas estivessem dentro dos valores estabelecidos na curva padrão, correspondendo às concentrações de proteína adequadas. Foram realizadas diluições de 10 e 20 vezes, conforme a equação 1, na qual V é o volume de amostra adicionado e n corresponde ao fator de diluição.

$$V = \frac{100}{n} \text{ } [\mu\text{L}] \quad (1)$$

Caulou-se a concentração de cada amostra utilizando a equação 2, obtida a partir da curva padrão mostrada na figura 4, construída por meio das leituras de absorvância de soluções com concentrações de 0,1 a 0,5 mg/L de albumina sérica bovina (BSA). Para cada amostra quantidade de proteína total (mg) foi determinada multiplicando-se a concentração pelo volume de de extrato bruto. Essa massa foi, então, dividida pela massa de farinha adicionada, obtendo-se o valor da massa de proteína por grama de farinha delipidada (mg/g).

$$\text{ABS} = 1,6602 \times C + 0,0239 \quad (2)$$

Na equação 2, ABS corresponde à absorvância e C é a concentração em mg/mL.



4.9 Análise estatística

Para investigação da resposta da variável de interesse (mg de proteína/g de farinha) em função dos parâmetros analisados, empregou-se análise de regressão a partir da metodologia de superfície de resposta (RSM). Foi construído o gráfico de Pareto para análise da significância das variáveis independentes, utilizando coeficientes significativos ao nível de significância de 95 %. A análise estatística foi realizada com auxílio do software STATISTICA (versão 7.0/2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a extração das proteínas solúveis das sementes de soja em diferentes condições experimentais. Analisando a figura 5, na qual estão representados graficamente os valores obtidos de massa de proteína por grama de farinha delipidada (mg/g) para as extrações realizadas à temperatura de 10 °C, verifica-se que a maior quantidade de proteínas foi obtida pela extração em pH alcalino, sendo os maiores valores, 96,2 e 87,1 mg/g, obtidos após 10 e 60 min de extração, respectivamente. Os menores valores de proteínas foram recuperados em pH 4,0.

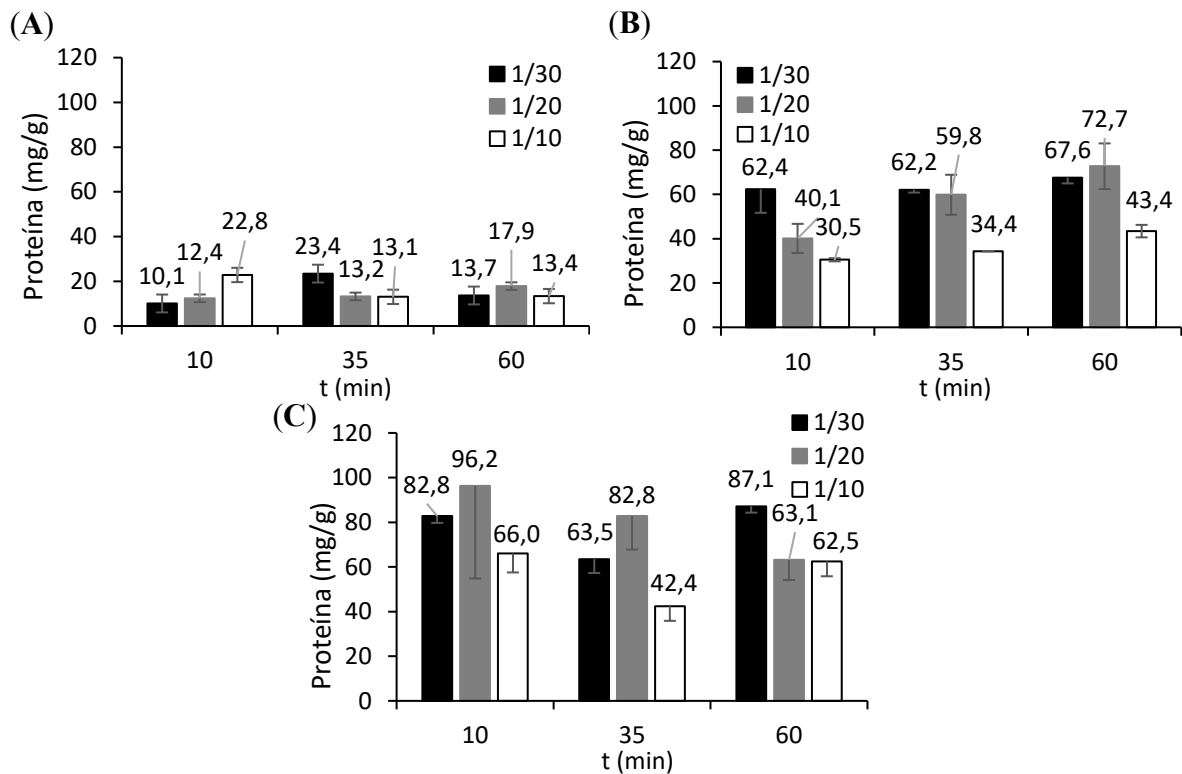
Observa-se, uma tendência de aumento da quantidade de proteínas extraída com o aumento do pH. Esse comportamento também foi observado para as temperaturas de 25 e 40 °C, conforme mostrado nas Figuras 6 e 7, onde pode-se verificar que os maiores valores foram obtidos em pH básico, ou seja, nas extrações realizadas em pH 10, sendo 86,1 e 90,5 mg/g para 25 e 40 °C, respectivamente.

Analisando a literatura, percebe-se que quanto maior o pH do meio maior a extratibilidade de proteínas (RICKERT; MEYER; HU, 2004). Entretanto, uma alcalinidade extrema pode levar à alterações na estrutura proteica, como desnaturação, ocasionando perda de rendimento, bem como modificações químicas nos aminoácidos constituintes, com consequente perda das propriedades nutricionais, o que reforça a importância do entendimento da influência desse fator para o processo de extração, sendo necessária uma otimização de acordo com a finalidade de cada processo (BERK, 1997).

Com relação à temperatura, pode-se verificar por meio de uma análise comparativa entre as figuras 5, 6 e 7 que a influência desse fator foi menor que a do pH, uma vez que não foi observada uma diferença acentuada entre os valores de massa de proteína obtidos nas diferentes

temperaturas analisadas. Como exemplo, analisando-se somente o pH 10 (Figuras 5-7C), os maiores valores obtidos foram 96,2, 86,1 e 90,5 (mg/g), para 10, 25 e 40 °C, respectivamente.

Figura 5. Massa de proteína por grama de farinha delipidada *versus* tempo de extração a 10 °C em (A) pH 4; (B) pH 7 e (C) pH 10. As barras representam o valor médio de cada duplicata. As cores representam a proporção utilizada de farinha e solução extratora (m/v). As barras de erro indicam o desvio padrão referente às duplicatas.



Rosset, Acquaro e Beléia (2014) conduziram extração de proteínas das sementes de soja em pH 9,0 e recuperaram 33,04% e 56,27% de proteínas em processos sem e com pré-tratamento térmico e enzimático, respectivamente, à temperatura ambiente (25 °C).

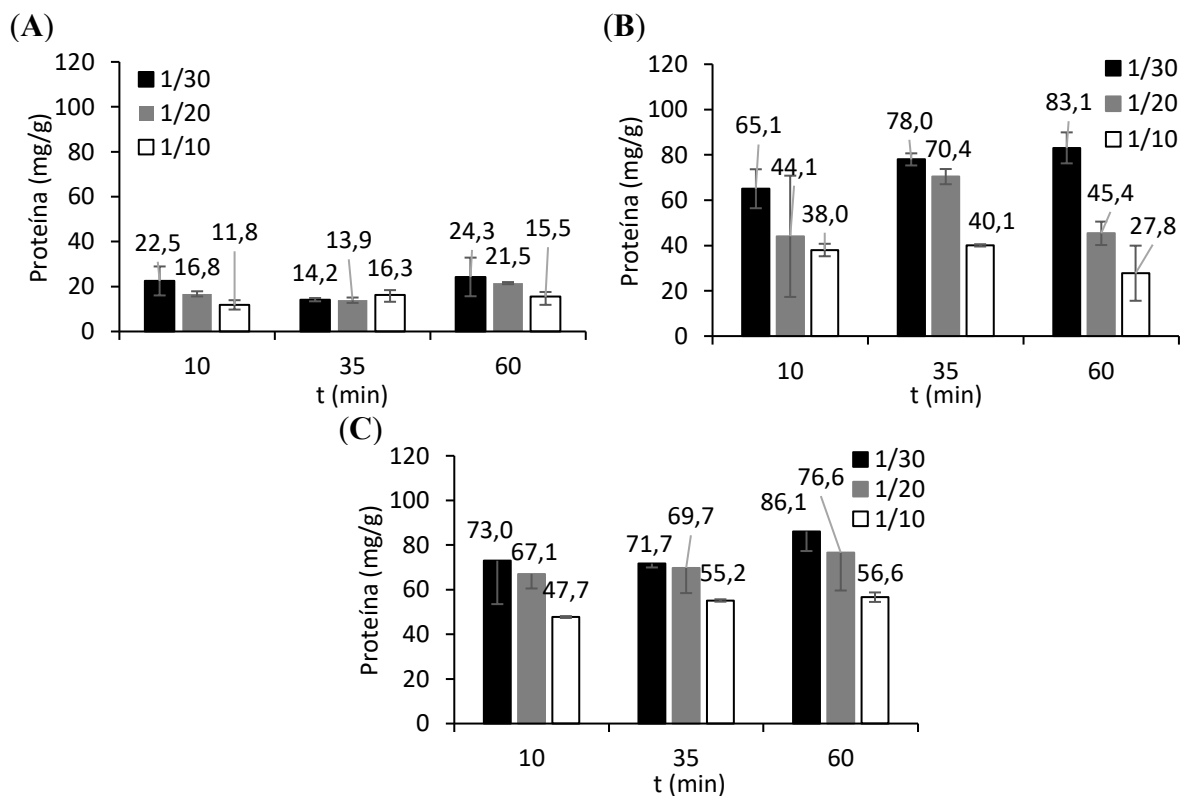
Wang e Murphy (1996) recuperaram 21% de proteínas de farinha de soja delipidada em pH básico e a 25 °C. Rickert, Meyer e Hu (2004) constataram que um aumento no pH (8,5-10,5) e na temperatura de extração (25-60°C) levou a um aumento na recuperação de proteínas no processamento de proteína de soja isolada. Contudo, a variação do pH apresentou influência mais significativa que a temperatura.

A influência do pH e da temperatura na extração de proteínas de maior abundância na semente de *G.max* foi estudada por Liu et al. (2007), que concluíram que houve maior obtenção de proteínas em meio básico (pH 8,5) e que o conteúdo proteico de uma das frações de maior interesse (11S) não aumentou significativamente entre 25 e 45 °C. Os autores reportaram ainda que um aumento na temperatura, a princípio parece ser favorável à extração dessas proteínas.

Entretanto, ocorre queda considerável no rendimento a partir de 55° C, o que pode ter ocorrido devido a desnaturação provocada pelo aquecimento. Resultados diferentes foram obtidos por Rosset, Acquaro e Beléia (2014). Os autores verificaram que as maiores temperaturas usadas no pré-tratamento do pó delipidado das sementes de soja (45-65 °C) resultaram em uma maior extração proteica.

Como proteínas desnaturam em temperaturas diversas, é necessário estabelecer protocolo sobre a influência da temperatura na extração destas macromoléculas para uma determinada fonte. De acordo com Riblett et al. (2001) a temperatura inicial de desnaturação é de 82 °C e 68 °C para glicinina e β -conglucina, respectivamente.

Figura 6. Massa de proteína por grama de farinha delipidada *versus* tempo de extração a 25 °C em (A) pH 4; (B) pH 7 e (C) pH 10. As barras representam o valor médio de cada duplicata. As cores representam a proporção utilizada de farinha e solução extratora (m/v). As barras de erro indicam o desvio padrão referente às duplicatas.



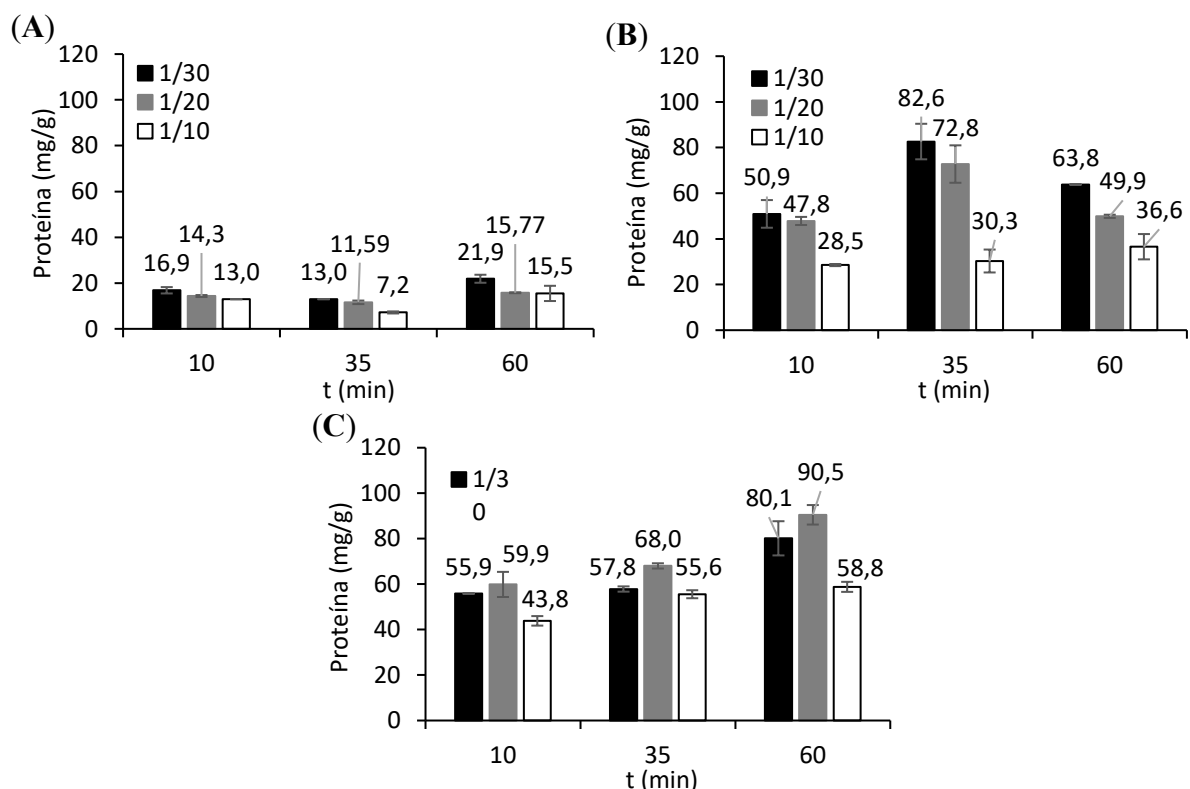
Berk (1997) estudou a influência da proporção entre sólido e líquido (m/V) em um processo extração de proteínas de soja em larga escala e chegou à conclusão que uma menor proporção, isto é, uma maior quantidade de líquido leva a um aumento na solubilização de proteínas para determinada massa de farinha. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes, o que pode ser constatado observando-se os gráficos das figuras 5, 6 e 7, uma vez

que foram obtidas maiores quantidades de proteínas na maioria dos ensaios realizados na proporção 1/30 em relação às amostras extraídas com menor quantidade de solução.

A utilização de maiores quantidades de solução extratora diminui a concentração de proteínas na fase sobrenadante, o que resulta em menor quantidade de proteínas retida na fase sólida, visto que não é possível obter uma separação completa do extrato. Entretanto, para um processo em larga escala, deve-se levar em consideração o rendimento em termos de massa de proteína produzida por unidade de volume e os custos de produção, uma vez que maiores volumes demandam tanques e centrífugas de maior capacidade volumétrica, maior gasto energético em operações unitárias, como agitação e posteriores operações de separação e purificação, além de gerar uma maior quantidade de subproduto. Deste modo, tem-se a necessidade de otimização de acordo com as características de cada processo.

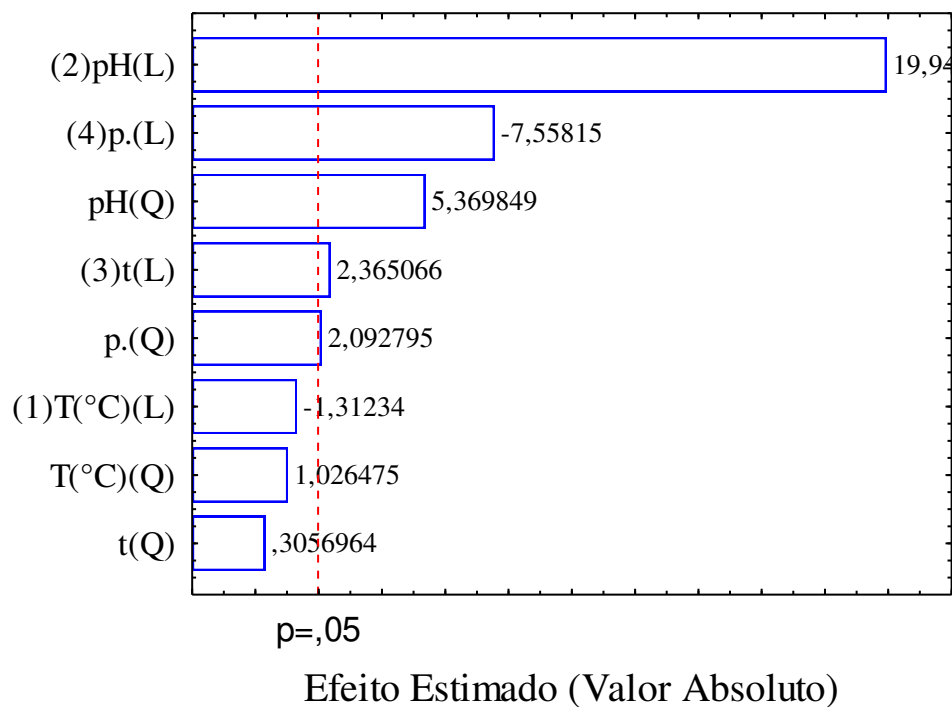
Quanto à variável tempo de extração, observou-se ligeiro aumento na quantidade de proteínas com o aumento do tempo, para as amostras extraídas a 10 e 25 °C e um aumento mais acentuado na temperatura de 40 °C, principalmente em pH 10 (Figura 7C), o que indica uma provável interação entre as variáveis, isto é, o fator tempo sofre uma variação diferente dependendo da temperatura e do pH.

Figura 7. Massa de proteína por grama de farinha delipidada *versus* tempo de extração a 40 °C em (A) pH 4; (B) pH 7 e (C) pH 10. As barras representam o valor médio de cada duplicata. As cores representam a proporção utilizada de farinha e solução extratora (m/v). As barras de erro indicam o desvio padrão referente às duplicatas.



Com o intuito de otimizar a resposta da variável de interesse (mg de proteína/g de farinha) em função dos parâmetros analisados, empregou-se análise de regressão a partir da metodologia de superfície de resposta (RSM). No gráfico de Pareto (Figura 8) estão expostas as variáveis em ordem de significância para o modelo de regressão quadrática empregado. Observa-se que houve maior significância para as variáveis lineares pH e proporção. A linha vertical mostra os coeficientes significativos ao nível de significância de 95%. Foi também significativa a variável linear tempo, porém com menor nível de significância, o que indica que essa variável exerceu influência sobre a resposta, porém não foi tão relevante quanto as de maior significância. O sinal negativo da proporção indica que um aumento nessa variável do nível -1 para +1 resulta em uma diminuição da variável resposta.

Figura 8. Gráfico de Pareto para a variável resposta quantidade de proteína por massa de farinha (mg/g). As variáveis da regressão estão dispostas em ordem de significância para o modelo. As variáveis que ultrapassam a linha vertical são significativas ao nível de significância de 5%. No gráfico: pH; proporção (m/V); temperatura ($^{\circ}\text{C}$), tempo (min).

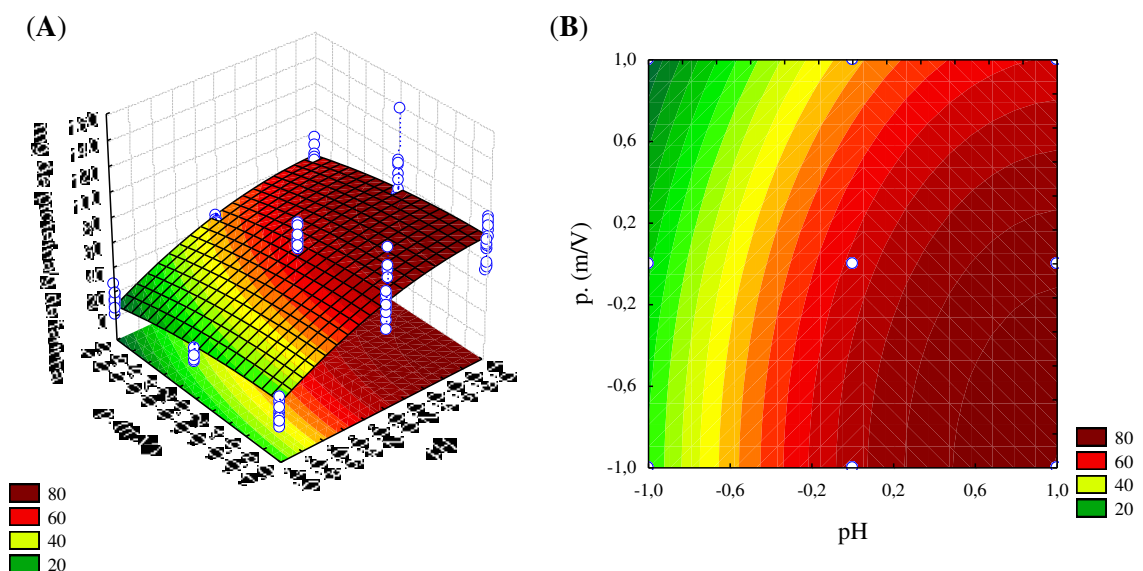


A relação entre pH e proporção de extração (variáveis independentes de maior significância) na recuperação de proteínas solúveis foi então verificada através de um gráfico de superfície de resposta (Figura 9). A maior quantidade de proteínas foi extraída nos níveis +1 e -1 que correspondem aos valores de 10 e 1:30 para pH e proporção, respectivamente, ou seja,

a quantidade de proteínas recuperadas é maior com o aumento do pH e com a diminuição da proporção de extração. Adicionalmente, o fator tempo foi estatisticamente menos significativo em relação ao pH e à proporção, no entanto, ao apresentar 95% de significância, sua variação deve ser considerada. De acordo com o modelo proposto, a temperatura não foi estatisticamente significativa com relação à recuperação de proteínas das sementes de soja.

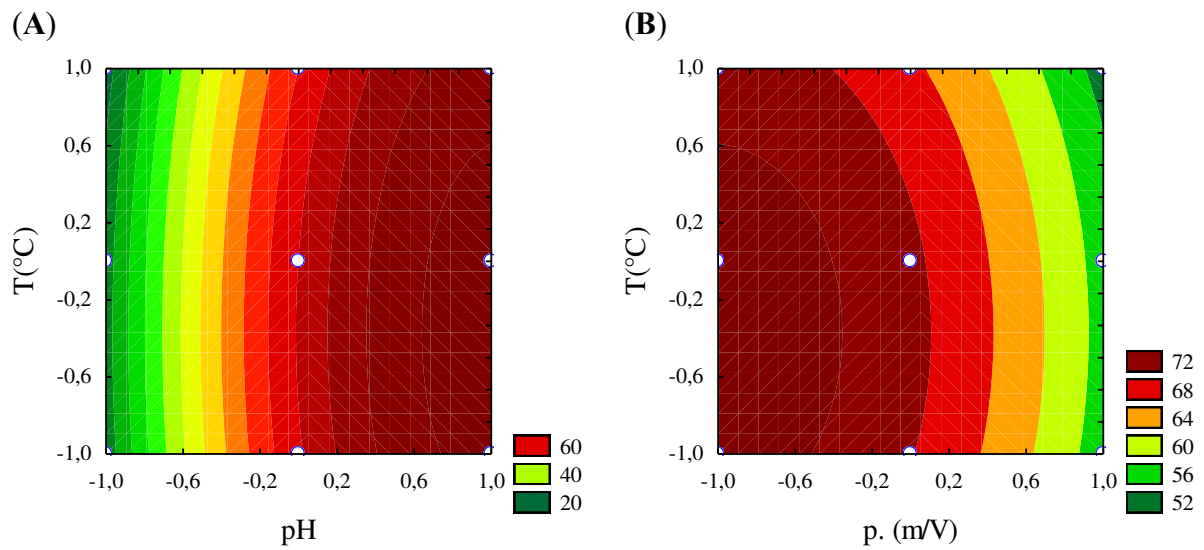
A tendência de maximizar a obtenção de proteínas com o aumento de pH já havia sido identificada neste trabalho através da análise dos gráficos das figuras 5, 6 e 7. Entretanto, a partir da análise da figura 9A, a validação deste dado, bem como informação sobre influência da proporção de extração na recuperação proteica puderam ser obtidos.

Figura 9. (A) Superfície de resposta e (B) gráfico plano de massa proteína por grama de farinha de soja (mg/g) em relação às variáveis independentes proporção e pH.



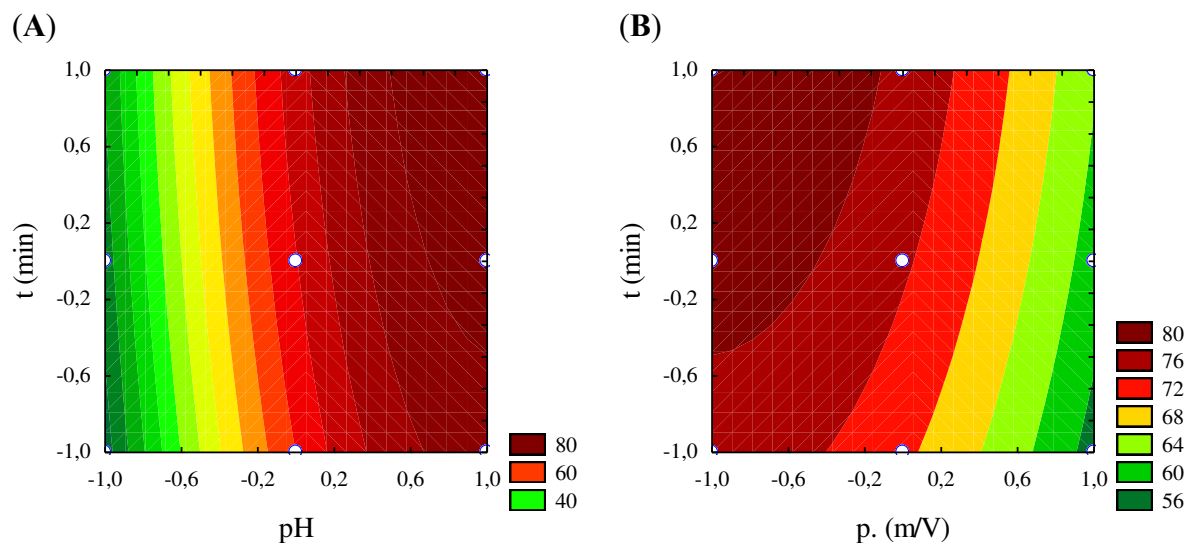
Nas figuras 10 e 11 estão dispostos os gráficos bidimensionais (curvas de nível) que relacionam as variáveis mais significativas com a temperatura e o tempo, que demonstraram menor significância estatística para resposta da variável de interesse. A partir desses gráficos, pôde-se analisar a influência dessas variáveis na extratibilidade de proteínas, bem como as interações entre elas. Na figura 10A, observa-se que, para um mesmo valor pH, uma variação na temperatura não altera significativamente a quantidade de proteínas extraída. Na figura 10B, observa-se uma influência relativamente maior em relação à variável proporção, uma vez que fixando-se um valor para esse fator e variando-se a temperatura, observa-se certa variação na resposta, com uma tendência de maximização nos níveis -1 de ambas as variáveis independentes.

Figura 10. Gráfico plano da quantidade de quantidade de proteína por massa de farinha (mg/g) em relação às variáveis (A) temperatura x pH; (B) temperatura x proporção



A figura 11 contém as curvas de nível para o fator tempo em função do pH e da proporção. No gráfico A, pode-se perceber uma influência consideravelmente menor do tempo extração em relação ao pH, pois para qualquer valor de pH dos níveis -1 a +1, uma variação do fator tempo não leva a um aumento significativo da resposta. Em contrapartida, a curva de nível para os fatores tempo e proporção (figura 11B), mostra uma tendência de aumento na resposta para os níveis +1 e -1 dessas variáveis, respectivamente.

Figura 11. Gráfico plano da quantidade de quantidade de proteína por grama de farinha (mg/g) em relação às variáveis (A) tempo x pH; (B) tempo x proporção



Como, de acordo com a metodologia proposta, a temperatura não foi significativa para a extração de proteínas solúveis das sementes de soja (Figura 9) para fins de produção em larga escala, a condução do processo em temperatura ambiente (25 °C) é viável por razões econômicas. Entretanto, é válido ressaltar que, em muitos processos, a estabilidade microbiológica é um fator determinante para o rendimento e a qualidade do produto, sendo necessária a inclusão de etapas de tratamento térmico de acordo com a demanda de cada processo.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o pH e a proporção de extração são significativos na extração de proteínas das sementes de *G. max*. C. O fator tempo apresentou menor significância em relação ao pH e a proporção, entretanto, uma vez que apresentou 95% de significância para o processo, considera-se analisar a faixa de 0 a -1, tendo como perspectiva a construção de um modelo matemático que descreva esse processo. A temperatura não foi um fator estatisticamente significativo, portanto, a temperatura ambiente é uma condição viável de extração por razões econômicas. A metodologia de superfície de resposta possibilitou analisar da influência das variáveis avaliadas na resposta de interesse levando em consideração a interação entre essas variáveis. O entendimento da significância desses parâmetros na extração de proteínas de soja pode contribuir para a otimização de processos para sua obtenção.

REFERÊNCIAS

APARICIO, M. I.; CUENCA, R. A.; SUAREZ, V. M. J.; REVILLA, Z. M. A. Soybean, a promising health source. **Nutrición Hospitalaria**, vol. 23, n. 4, p. 305-312, 2008.

ASIF, M.; ACHARYA, M. Phytochemicals and nutritional health benefits of soy plant. **International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases**, vol 3, n. 1, 2013.

BARROS-NETO, B. DE.; SACARMINO, I. S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora Unicamp. 412 p. 2001.

BASRI, M. *et al.* Comparison of estimation capabilities of response surface methodology (RSM) with artificial neural network (ANN) in lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. **BMC biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 53, 2007.

BERK, Z. Isolated Soybean Protein (ISP). In: BERK, Z. **Technology of Production of Edible Flours and Protein Products from Soybeans**. Haifa: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997.

BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BISLA, G. A.; VERMA, P.; SHARMA, S. Development of ice creams from Soybean milk & Watermelon seeds milk and Evaluation of their acceptability and Nourishing potential. **Advances in Applied Science Research**, vol. 3, n. 1, p. 371-376, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. Basic Structural Principles: The Building Blocks. In: **Introduction to Protein Structure**. Nova Irque: Garland Science, 1999. p. 1-12.

CAHOON, E. B. Genetic Enhancement of Soybean Oil for Industrial Uses: Prospects and Challenges. **AgBioForum**, vol. 6, n. 1 e 2, p. 11-13, 2003.

CHEN Q.; MAO X.; ZHANG, Z.; ZHU, R.; YIN, Z.; LENG, Y. SNP-SNP Interaction Analysis on Soybean Oil Content under Multi-Environments. **Plos One**, vol. 11, n. 9, 2016.

CHEN, N.; ZHAO, Q.; SUN, W.; ZHAO, M. Effects of Malondialdehyde Modification on the in Vitro Digestibility of Soy Protein Isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 61, p. 12139-12145, 2013.

CIABOTTI, S.; BARCELOS, M. F. P.; PINHEIRO, A. C. M.; CLEMENTE, P. R.; LIMA, M. A. C. Características sensoriais e físicas de extratos e tofus de soja comum processada termicamente e livre de lipoxigenase. **Food Science and Technology**, vol. 27, n. 3, p. 643-648, 2007.

COMPANHIA BRASILEIRA DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos - Safra 2019/2020 - Primeiro levantamento, outubro - vol. 7, n.1**, p. 39, 2019. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra-graos/boletim-da-safra-de-graos> > Acesso em: 01 de nov. 2019.

DINU, M.; ABBATE, R.; GENSINI, G. F.; CASINI, A.; SOFI, F. Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: A systematic review with meta-analysis of observational studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 57, n. 17, p. 3640-3649, 2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 1ª edição, n. 16, p. 12, 2014. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95489/1/SP-16-online.pdf>> Acesso em: 02 de nov. 2019

ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. **Soybean**. Britannica Academic, 2016. Disponível em: <academic-ebritannica.ez14.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/soybean/68954> Acesso em: 1 de nov. 2019.

ELDRIDGE, A.C.; BLACK, L.T.; WOLF, J.W. Carbohydrate composition of soybean flours, protein concentrates, and isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 27, p. 799-802, 1979.

FIGUEIREDO, P.N. New challenges for public research organisations in agricultural innovation in developing economies: Evidence from Embrapa in Brazil's soybean industry. **The Quarterly Review of Economics and Finance**, vol. 62, p. 21–32, 2016.

FREITAS, M. C. M. A cultura da Soja no Brasil: O Crescimento da Produção Brasileira e o Surgimento de uma Nova Fronteira Agrícola. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, vol. 7, n. 12, p. 1, 2011.

GANDHI, A. P. Quality of soybean and its food products. **International Food Research Journal**, vol. 16, p. 11-19, 2009.

GASSEN, F.; BORGES, L. D. 2004. Importância Econômica da Soja. In: FORCELINI, C. A.; REIS, E. M.; GASSEN, F.; YORINORI, I. T.; HOFFMAN, L.; CONSTAMILAN, L.;

GIANNOCCARO, E.; WANG, Y-J.; CHEN, P. Effects of Solvent, Temperature, Time, Solvent, Sample Ratio, Sample Size, and Defatting on the Extraction of Soluble Sugars in Soybean. **Journal of Food Science**, vol. 71, n. 1, 2006.

GOETTEL, W.; XIA, E.; UPCHURCH, R.; WANG, M.; CHEN, P.; AN, Y. C. Identification and characterization of transcript polymorphisms in soybean lines varying in oil composition and content. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p.299, 2014.

GUPTA, R. P. Taming of the golden bean. 2014. Disponível em: <<http://prosoya.com/wpcontent/uploads/2014/03/taming.pdf>> Acessado em: 26/11/2019

HERRERA, M. A.; SUBHAN, F.; CHAN, C. Dietary Patterns and Cardiovascular Disease Risk in People with Type 2 Diabetes. **Current Obesity Reports**, vol. 6, n. 4, p. 405-413, 2017.

HOEK, A. C.; LUNING, P. A.; WEIJZEN, P.; ENGELS, W.; KOK, F. J.; GRAAF, C. Replacement of meat by meat substitutes. A survey on person and product-related factors in consumer acceptance. **Appetite** vol. 56, p. 662-673, 2011.

HYMOWITZ, T. Domestication of the Soybean. **Economic Botany**, p. 1, 1970.

IMRAM, N. GOMEZ, I. SOH, V. Soya handbook. Singapore: Tetra Pak. 2003.

IRELAND, P. A.; DZIEDZIC, S.; KEARSLEYB, M. W. Saponin Content of Soya and Some Commercial Soya Products by Means of High-performance Liquid Chromatography of the Saponinins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. vol. 37, p. 694-698, 1986.

KAITH, B. S.; JINDAL, R.; BHATIA, J. K. Morphological and Thermal Evaluation of Soy Protein Concentrate on Graft Copolymerization with Ethylmethacrylate. **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 120, p. 2183–2190, 2011.

KATAYAMA, M.; WILSON, L. A. Utilization of Soybeans and their Components through the Development of Textured Soy Protein Foods. **Journal of Food Science**, vol. 73, n. 3, 2008.

KIM, S.; KIM, W.; HWANG, I. K. Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 32, p. 337-342, 2003.

KOBILAŇSKY, J. R.; PÉREZ, O. E.; PILOSOF, A. M. R. Thermal transitions of gluten-free doughs as affected by water, egg white and hydroxypropylmethylcellulose. **Thermochemica Acta**, vol. 411, p. 81-89, 2004.

LE, L. T.; SABATÉ, J. Beyond Meatless, the Health Effects of Vegan Diets: Findings from the Adventist Cohorts. **Nutrients**, vol. 6, p. 2131-2147, 2014.

LIN, M.; TAY, S.H.; YANG, H.; YANG, B.; LI, H. Replacement of eggs with soybean protein isolates and polysaccharides to prepare yellow cakes suitable for vegetarians. **Food Chemistry**, vol. 229, p. 663-673, 2017.

LIU, C.; QI, B.; LIU, Z.; ZHAN, J.; ZHAN, K.; ZHAO, G. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1310–1316, 2007.

LIU, J.; He, Z.; TANG, X.; CHEN, J. Effect of alcalase hydrolysis followed by transglutaminase treatment on the foaming properties of soybean protein isolate (SPI). **Journal of Biotechnology**, vol. 136, p. 730, 2008.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. Chapman and Hall, New York, 1997.

LUTHRIA, D. L.; KOLLAKONDAN M. M. J.; MARUPAKA, R.; NATARAJAN, S. Recent update on methodologies for extraction and analysis of soybean seed proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 98, p. 5572-5580, 2018.

MARCO, C.; ROSELL, C. M. a. Functional and rheological properties of protein enriched gluten free composite flours. **Journal of Food Engineering**, vol. 88, p. 94-103, 2008.

MARCO, C.; ROSELL, C. M. b. Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. **European Food Research and Technology**, vol. 227, n. 4, p. 1205-1213, 2008.

MATSUMIYA, K.; MURRAY, B. S. Soybean protein isolate gel particles as foaming and emulsifying agents. **Food Hydrocolloids**, vol. 60, p. 206-215, 2016.

MARTINS, T. F. **Purificação e caracterização bioquímica de um inibidor tipo Bowman – Birk de sementes de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, 2015.

MEJIA, E. G.; BRADFORD, B. S. T.; HASLER, C. The Anticarcinogenic Potential of Soybean Lectin and Lunasin. **Nutrition Reviews**, vol. 61, n. 7, 2003.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. A Soja no Brasil. Portal EMBRAPA, Campinas, ITAL, 1062 p.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; BIRK, Y.; Bondi, A. Soybean Isoflavones: Characterization, Determination, and Antifungal Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 22, n. 5, 1974.

NATARAJAN, S. S. Analysis of Soybean Seed Proteins Using Proteomics. **Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics**, vol. 5, n. 1, p. 113, 2014.

NELSON, D. E.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PATIL, G.; MIAN, R.; VUONG, T.; PANTALONE, V.; SONG, Q.; CHEN, P.; SHANNON, G. J.; CARTER, T. C.; NGUYEN, H. T. Molecular mapping and genomics of soybean seed protein: a review and perspective for the future. **Theoretical and Applied Genetics**, vol. 130, 2017.

PETTERSSON, D.; PONTOPPIDAN, K. Soybean Meal and The Potential for Upgrading Its Feeding Value by Enzyme Supplementation. **Intec Open**. Soybean - Bio-Active Compounds, 2013. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/soybean-bio-active-compounds/soybean-meal-and-the-potential-for-upgrading-its-feeding-value-by-enzyme-supplementation>> Acesso em: 02/11/2019.

PIMENTEL, D.; PIMENTEL, M. Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 78, n. 3, p. 660, 2003.

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

QI, Z.; WU, Q.; HAN, X.; S, Y.; DU, X.; LIU, C.; JIANG, H.; HU, G.; CHEN, Q. Soybean Oil Content QTL Mapping and Integrating with Meta-analysis Method for Mining Genes. **Euphytica**, vol.179, n. 3, p. 499-514, 2011.

REZI, R.; MURESANU, E. Soybean Varieties with Possible Utilization in Food Industry. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**, vol. 70, p.459-460, 2013.

RIBLETT, A. L.; HERALD, T. J.; SCHMIDT, K. A.; TILLEY, K. A.; Characterization of β -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4983–4989, 2001.

RIBBOTA, P. D.; AUSAR, S. F.; MORCILLO, M. H.; PÉREZ, G. T.; BELTRAMO, B. M.; LEO, A. E. Production of gluten-free bread using soybean flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 84, p. 1969-1974, 2004.

RICKERT, D.A.; MEYER, M.A.; HU, J.; MURPHY P. A. Effect of Extraction pH and Temperature on Isoflavone and Saponin Partitioning and. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, n. 8, p. 623–631, 2004.

ROSSET, M.; ACQUARO, V. R.; BELÉIA, A. D. P. Protein extraction from defatted soybean flour with Viscozyme L pretreatment. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 3, p. 784–790, 2014.

SEDYNAUA, T. *Tecnologias de Produção e Usos da Soja*. Londrina: Ed. Macenas, p. 314, 2009.

SHENOY, S.; MRINAL, D.; SANDHU, J. S. Four Weeks of Supplementation with Isolated Soy Protein Attenuates Exercise Induced Muscle Damage and Enhances Muscle Recovery in Well Trained Athletes: A Randomized Trial. **Asian Journal of Sports Medicine**, vol. 7, n. 3, 2016.

SHEROVSKI, P.; STOJKOVIĆ, G.; RISTOVSKA, N. Development, validation and application of first derivative spectroscopy ratio method for estimation of Bradford assay **Analytical Biochemistry**, vol. 558, p. 35-40, 2018.

SILVA, O. C.; BALARDIN, R.; CASA, R. T.; *Doenças na Cultura da Soja*. Passo Fundo: Aldeia Norte, p. 11-13.

SOARES, D. N. N. *Estudo de Processos para Obtenção de Proteínas Termoestáveis de Sementes de Acacia Mangium, Mimosa Caesalpiniaefolia e Stylosanthes Capitata*. São Luís: UFMA. 61 p. 2018.

SRUAMSIRI, S.; SILMAN, P. Nutritive composition of soybean by-products and nutrient digestibility of soybean pod husk. **Maejo International Journal of Science and Technology**, vol. 2, n. 3, p. 568-576, 2008.

TRINDADE, E. A. Dossiê Proteínas: Proteínas. **Food Ingredients Brasil**, n. 28, p. 30-40, 2014.

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Mass Balance Study of Isoflavones during Soybean Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2377–2383, 1996.

WYK, P. J. V. Discovery of some factors contributing to soybean bitterness. **South African Food Review**, vol. 5, n. 69, p.61-62, 1979.

WU, S.; MURPHY, P. A.; JOHNSON, L. A.; RUEBER, M. A.; FRATZKE, A. R. Simplified Process for Soybean Glycinin and β -Conglycinin Fractionation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 48, p. 2702-2708, 2000.

YACLINCH, R. W. Beta-Conglycinin and Glycinin in High-Protein Soybean Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 49, n. 2, p. 729-35, 2001.

YANG, J.; GUO, J.; YANG, X.; WUC, N.; ZHANG J.; HOU, J.; ZHANG, Y.; XIAO, W.; A novel soy protein isolate prepared from soy protein concentrate using jet-cooking combined with enzyme-assisted ultra-filtration. **Journal of Food Engineering**, vol. 143, p. 25-32, 2014.

**APÊNDICE A - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE EXTRAÇÃO DEFINIDAS
PELO SOFTWARE STATISTICA**

Amostra	pH	T (°C)	t (min)	p. (m/V)	Amostra	pH	T (°C)	t (min)	p. (m/V)
1;2	4	10	10	1/30	83;84	7	25	35	1/10
3;4	4	10	10	1/20	85;86	7	25	60	1/30
5;6	4	10	10	1/10	87;88	7	25	60	1/20
7;8	4	10	35	1/30	89;90	7	25	60	1/10
9;10	4	10	35	1/20	91;92	10	25	10	1/30
11;12	4	10	35	1/10	93;94	10	25	10	1/20
13;14	4	10	60	1/30	95;96	10	25	10	1/10
15;16	4	10	60	1/20	97;98	10	25	35	1/30
17;18	4	10	60	1/10	99;100	10	25	35	1/20
19;20	7	10	10	1/30	101;102	10	25	35	1/10
21;22	7	10	10	1/20	103;104	10	25	60	1/30
23;24	7	10	10	1/10	105;106	10	25	60	1/20
25;26	7	10	35	1/30	107;108	10	25	60	1/10
27;28	7	10	35	1/20	109;110	4	40	10	1/30
29;30	7	10	35	1/10	111;112	4	40	10	1/20
31;32	7	10	60	1/30	113;114	4	40	10	1/10
33;34	7	10	60	1/20	115;116	4	40	35	1/30
35;36	7	10	60	1/10	117;118	4	40	35	1/20
37;38	10	10	10	1/30	119;120	4	40	35	1/10
39;40	10	10	10	1/20	121;122	4	40	60	1/30
41;42	10	10	10	1/10	123;124	4	40	60	1/20
43;44	10	10	35	1/30	125;126	4	40	60	1/10
45;46	10	10	35	1/20	127;128	7	40	10	1/30
47;48	10	10	35	1/10	129;130	7	40	10	1/20
49;50	10	10	60	1/30	131;132	7	40	10	1/10
51;52	10	10	60	1/20	133;134	7	40	35	1/30
53;54	10	10	60	1/10	135;136	7	40	35	1/20
55;56	4	25	10	1/30	137;138	7	40	35	1/10
57;58	4	25	10	1/20	139;140	7	40	60	1/30
59;60	4	25	10	1/10	141;142	7	40	60	1/20
61;62	4	25	35	1/30	143;144	7	40	60	1/10
63;64	4	25	35	1/20	145;146	10	40	10	1/30
65;66	4	25	35	1/10	147;148	10	40	10	1/20
67;68	4	25	60	1/30	149;150	10	40	10	1/10
69;70	4	25	60	1/20	151;152	10	40	35	1/30
71;72	4	25	60	1/10	153;154	10	40	35	1/20
73;74	7	25	10	1/30	155;156	10	40	35	1/10
75;76	7	25	10	1/20	157;158	10	40	60	1/30
77;78	7	25	10	1/10	159;160	10	40	60	1/20
79;80	7	25	35	1/30	161;162	10	40	60	1/10
81;82	7	25	35	1/20					