Maximização da etapa de maceração no processo de obtenção de extrato hidrossolúvel de soja

Maximization of maceration step of obtaining water-soluble soy extract process

DOI:10.34117/bjdv7n3-507

Recebimento dos originais: 08/02/2021
Aceitação para publicação: 19/03/2021

Glaciela Cristina Rodrigues da Silva Scherer
Doutoranda em Engenharia de Alimentos pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões
Instituição: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – URI
Erechim Endereço: Avenida 7 de setembro, Bairro Fátima, Erechim – RS, Brasil
E-mail: glaciela.cristina@yahoo.com.br

Natália Ambrósio
Graduanda em Engenharia Química pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões
Instituição: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – URI
Erechim Endereço: Avenida 7 de setembro, Bairro Fátima, Erechim – RS, Brasil
E-mail: nati_ambrosio07@outlook.com

Ilizandra Aparecida Fernandes
Doutora em Engenharia de Alimentos pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões
Instituição: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – URI
Erechim Endereço: Avenida 7 de setembro, Bairro Fátima, Erechim – RS, Brasil
E-mail: ilizandrafernandes@yahoo.com.br

Clarice Steffens
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos
Instituição: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – URI Erechim
Endereço: Avenida 7 de setembro, Bairro Fátima, Erechim – RS, Brasil
E-mail: clarices@uricer.edu.br

Eunice Valduga
Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal de Santa Catarina
Instituição: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – URI Erechim
Endereço: Avenida 7 de setembro, Bairro Fátima, Erechim – RS, Brasil E-mail: veunice@uricer.edu.br

Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi
Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina
Instituição: Embrapa Trigo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Endereço: Rodovia BR-285, Passo Fundo – RS, Brasil
E-mail: mercedes.panizzi@embrapa.br

Jamile Zeni
Doutora em Engenharia de Alimentos pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões
Instituição: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – URI Erechim
Endereço: Avenida 7 de setembro, Bairro Fátima, Erechim – RS, Brasil
E-mail: jamilezeni@uricer.edu.br

Juliana Steffens
Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal Federal de São Carlos
Instituição: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – URI Erechim
Endereço: Avenida 7 de setembro, Bairro Fátima, Erechim – RS, Brasil
E-mail: julisteffens@uricer.edu.br

RESUMO
O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tempo e da temperatura a fim de reduzir o tempo de maceração no processo de obtenção EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax. Os grãos de soja e o EHS foram caracterizados quanto à umidade, pH, cinzas, lipídios, proteína, cor, índices de solubilidade proteica, índice de dispersibilidade proteica (IDP), inibidor de tripsina kunitz, atividade ureática, ácido fítico e composição mineral (Ca, Mg, K, Zn, Cu, Fe, Mn). Além destes parâmetros, o EHS também foi avaliado quanto a sólidos solúveis e acidez. A influência da temperatura (30,90 a 59,10 ºC) e do tempo de maceração (0,36 a 11,64 h) foi avaliada por meio de um planejamento de experimentos 2^2 completo tendo como resposta o teor de proteína do EHS. Os grãos e o EHS da cultivar BRS 267 apresentaram maiores teores de proteína, umidade, ácido fítico, IDP, Ca e Mn, quando comparada com a Vmax. Os resultados do planejamento tornaram possível maximizar as condições de maceração para 45 ºC e 6 h, com teores de proteína de 3,5% para a BRS 267 e 3,1 % para Vmax, sendo estes teores similares ao método de maceração tradicional (16 h, 22 °C). Desta forma, foi possível reduzir 10 h do tempo de maceração.

Palavras-chave: proteína, maceração tradicional, redução do tempo.

ABSTRACT
The objective of this work was to evaluate the influence of time and temperature in order to reduce the time of maceration in the process of obtaining EHS of soybean cultivars BRS 267 and Vmax. Soya beans and EHS were characterized for moisture, pH, ash, lipids, protein, color, protein solubility index, protein dispersibility index (IDP), kunitz trypsin inhibitor, urea activity, phytic acid and mineral composition (Ca, Mg, K, Zn, Cu, Fe, Mn). In addition to these parameters, EHS was also evaluated for soluble solids and acidity. The influence of temperature (30.90 to 59.10 ºC) and the time of maceration (0.36 to 11.64 h) were evaluated through a complete 2^2 design of experiments with the EHS protein content in response. The grains and EHS of the cultivar BRS 267 showed higher levels of protein, moisture, phytic acid, IDP, Ca and Mn, when compared to Vmax. The planning results made it possible to maximize the maceration conditions for 45 ºC and 6 h, with protein contents of 3.5% for BRS 267 and 3.1 % for Vmax, which are

similar to the traditional maceration method (16 h, 22 °C). In this way, it was possible to reduce 10 h of the maceration time.

Keywords: protein, traditional maceration, time reduction.

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é de grande interesse mundial devido a sua aplicação em produtos na alimentação humana e animal (MELLO e BRUM, 2020). O Brasil está entre os maiores produtores desta *commodity*, cuja produção foi 120,90 milhões de toneladas, na safra 2019/2020 (CONAB). A soja é utilizada como fonte de óleo e proteína, sendo matéria prima para produção de proteína texturizada (ZHANG et al. 2016), extrato hidrossolúvel de soja (EHS), *tofu* ("queijo de soja"), *shoyo* ("molho de soja"), *missô*, entre outros produtos alimentares (SCHMIDT et al., 2017). A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) tem desenvolvido cultivares com excelente potencial de produtividade, adaptadas às condições climáticas das regiões brasileiras (APROSOJA, 2018). Também é objetivo da Embrapa o desenvolvimento de cultivares que além da alta produtividade, também apresentem características especiais para utilização na alimentação humana, tais como diminuição do sabor característico da soja e fatores antinutricionais. Um exemplo a cultivar BRS 267, que apresenta grãos graúdos, coloração do hilo amarela igual ao tegumento das sementes e sabor superior, e é indicada para processamento de EHS, *tofu* e farinha de soja. A cultivar Vmax, também utilizada nesse estudo é uma cultivar convencional, que não apresenta características especiais para a alimentação humana.

O EHS é um produto natural derivado da soja (ESLAMI e SHIDFAR, 2019) de alto valor nutritivo, baixo custo e de fácil obtenção. Consideráveis variações são encontradas na composição do EHS, as quais podem ser atribuídas às diferenças genéticas entre as cultivares de soja, ao estágio de desenvolvimento em que os grãos foram colhidos e às condições do ambiente de produção (SILVA et al. 2009). Diferentes métodos de processamento, entre os quais o método de extração do EHS, também colaboram com as variações observadas. Sua composição química deve ser de no máximo 93,0% de umidade, mínimo de 3,0% de proteínas, mínimo de 2,8% de carboidratos, mínimo de 1,0% de lipídios e máximo de 0,6% de cinzas (BRASIL, 1978).

O método tradicional de produção do EHS envolve a imersão dos grãos para reidratá-los, etapa conhecida como maceração (4 a 22±2 ºC por 8 a 24 h), enxague, ressuspensão em água e moagem dos grãos (graõs de soja em água à 90°C), seguido de

filtração para separar o resíduo (*okara*) do extrato de soja (SILVA et al., 2018). Este método apesar de simples apresenta elevado tempo de processamento na etapa de maceração.

Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do tempo e da temperatura a fim de reduzir o tempo de maceração do processo de obtenção EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax (comercial).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SOJA

Os grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) das cultivares BRS 267 e Vmax, oriundas da região de Passo Fundo – RS, foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa Trigo, os quais foram caracterizados em relação umidade, pH, cinzas, lipídios, proteína, cor, índices de solubilidade proteica (ISN), índice de dispersibilidade proteica (IDP), inibidor de tripsina Kunitz (ITK), atividade ureática, ácido fítico, composição mineral (Ca, Mg, K, Zn, Cu, Fe, Mn), conforme Tabela 1.

2.2 EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS)

O EHS (tradicional) foi obtido pelo processamento dos grãos de soja (BRS 267 e Vmax), de acordo com metodologia adaptada de Benassi et al. (2011). Os grãos de soja (150 g) previamente selecionados, classificados, quantificados e lavados, macerados (imersos) em 500 mL de água destilada, a temperatura ambiente (22±2 ºC) por 16 h. Posteriormente, os grãos foram drenados e quantificados novamente para avaliar a água absorvida (g de água absorvida/100 g de grãos), conforme Equação 1. Em seguida, adicionou-se à soja água destilada a 90°C, considerando a água absorvida pelos grãos para que completasse 1200 mL, com proporção final de 1:8 (grãos:água) (m/v). Após, foi realizada a trituração em processador industrial (M. Vitrory, modelo HP 12), durante 3 min, em velocidade média-alta. O EHS foi separado do okara (resíduo) por filtração à vácuo (Tecnal, modelo TE-058) em frasco Kitasato de 2 L e funil de Büchner (diâmetro interno de 15 cm) forrado com tecido fino de náilon (“tunil”) para retenção das partículas moídas dos grãos de soja.

$$\text{Absorção de água} = \frac{\text{g de água absorvida}}{\text{100g de grãos}} \qquad \text{(Equação 1)}$$

Os EHS (BRS 267 e Vmax) obtidos foram caracterizados quanto à umidade, pH, cinzas, lipídios, proteína, cor, índices de solubilidade proteica (ISN), índice de dispersibilidade proteica (IDP), inibidor de tripsina kunitz (ITK), atividade ureática, ácido fítico, composição mineral (Ca, Mg, K, Zn, Cu, Fe, Mn), sólidos solúveis e acidez, conforme Tabela 1.

2.3 INFLUÊNCIA DO TEMPO E TEMPERATURA DA ETAPA DE MACERAÇÃO NA OBTENÇÃO DO EHS

Visando a redução do tempo de maceração na obtenção do EHS, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 (DCCR), variando os níveis de temperatura (30,90 a 59,10ºC) e tempo (0,36 a 11,64h), e mantendo-se fixas as variáveis de grãos de soja (150 g) e de água destilada (500 mL), Tabela 2. Os EHS (BRS 267 e Vmax) foram caracterizados quanto ao teor de proteína e da melhor condição foram caracterizadas as frações proteicas.

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DOS GRÃOS E DO EHS

Os grãos de soja *in natura* das cultivares BRS 267 e Vmax foram previamente selecionados, limpos e triturados em moinho (Cuisinart, modelo DCG-20BKN) e submetidos ao peneiramento manual em peneira de 42 mesh (Bertel) correspondendo a 355 µm, armazenados sob refrigeração (8±2 ºC) de acordo com AOAC (2007).

2.4.1 Umidade

A umidade foi determinada em estufa com recirculação de ar (Fanem, modelo 320-SE), com aproximadamente 3,0 g de amostra a 105 ºC por aproximadamente 4 h /ou até massa constante de acordo com AOAC (2007).

2.4.2 pH

A leitura do pH para os grãos (triturados em água destilada), EHS (dissolvidos em água destilada) na proporção de 1/10 (v/v) foi realizada em pHmetro (Digimed, modelo DM-22) de acordo com AOAC (2007).

2.4.3 Resíduo mineral (cinzas)

O resíduo mineral foi determinado por combustão da matéria orgânica em mufla (Lavoisier, modelo 400C), a 550 ºC por aproximadamente 6 h de acordo com IAL (2008).

Inicialmente a amostra (~5 g) foi pré-carbonizada em chapa de aquecimento (VELP, modelo RC). Os resultados foram expressos em g/100 g, em base seca.

2.4.4 Lipídios

A determinação de lipídios, para os grãos e EHS, foi realizada por extração em Soxhlet (Nova Ética®, modelo NT340), utilizando éter de petróleo (Química Moderna® 30-60 °C) como solvente extrator de acordo com IAL (2008). Os resultados foram expressos em g/100 g, em base seca.

2.4.5 Proteínas

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando o sistema digestor-destilador (VELP – UDK 126A) de acordo com IAL (2007), com o fator de conversão de nitrogênio para o teor de proteína de 6,25 para as cultivares de soja e 6,38 para os EHS. Os resultados foram expressos em g/100 g, em base seca.

2.4.6 Cor

A cor foi determinada através de colorímetro (Minolta Chroma Meter, modelo CR-400), no sistema de cor CIELAB, com os três componentes, L* (luminosidade ou brilho) cujo valor varia entre zero (preto) e 100 (branco), e as coordenadas de cromaticidade a* e b* que variam de -a* (verde) até +a* (vermelho), e de -b* (azul) até +b* (amarelo) de acordo com Minolta (2006). A verificação do ajuste do equipamento foi conduzida previamente de acordo com as instruções do fabricante (y = 93,10, x =0,3158, y = 0,3321). As leituras foram realizadas com as amostras dispostas em placa de Petri (6 cm de diâmetro), realizando-se três medidas em três pontos da placa.

O cálculo da tonalidade cromática foi realizado através dos valores obtidos diretamente do colorímetro através da Equação 2.

$$C^* = (a^2 b^2)^{\frac{1}{2}} \qquad \text{(Equação 2)}$$

2.4.7 ISN

A determinação do ISN foi realizada conforme o método Ba 11-65 de acordo com AOCS (1980), cuja técnica preconiza a agitação lenta, usando o banho (Nova Ética, modelo 501D) e centrífuga (MPW, modelo 351R). O filtrado obtido foi utilizado para a

determinação de proteína bruta pelo método oficial 920.87 descrito por AOAC (2005) e determinação do nitrogênio total. O ISN foi calculado pela relação entre o nitrogênio solúvel em água e o nitrogênio total (Equação 3).

$$\%ISN = \frac{NsX100}{Nt} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde: Ns = Nitrogênio solúvel; Nt = Nitrogênio total (%).

2.4.8 IDP

A determinação do IDP foi realizada de acordo com o método Ba 10-65 (AOCS, 1980) técnica considerada de rápida agitação com uso do homogeneizador (Ultra-Turrax, modelo T18) e centrífuga (MPW, modelo 351R) para extração da proteína dispersível em água, dosada pelo método 960.52 de micro-Kjeldahl descrita por AOAC (2005).

O valor do IDP é o quociente entre a proteína dispersível em água e a proteína total (Equação 4).

$$\%IDP = \frac{PsX100}{Pb} \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde: Ps = Proteína dispersível; Pb = Proteína (%).

2.4.9 Inibidor de tripsina kunitz

Para quantificação do inibidor de tripsina Kunitz foi utilizada a metodologia desenvolvida por Kakade (1974). A quantificação inibitória foi realizada por meio de ensaio enzimático utilizando-se o benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) (Sigma® - Pureza ≥98 %) como substrato para a tripsina de pâncreas bovino (Sigma), efetuado em triplicata. Alíquotas de 2 mL da solução diluída do extrato das amostras foram pipetados em 4 tubos de ensaio (3 tubos para determinação da atividade no extrato da amostra e 1 tubo para o branco) e 2 mL de água destilada no tubo para determinar o padrão de tripsina. Os tubos foram acondicionados em banho-maria (Marconi®, modelo MA126) à 37 ºC, e em seguida adiciona-se 2 mL da solução de tripsina (0,02 mg/mL de HCl 0,001 N), com exceção do branco, e após 10 min foram adicionados 5 mL de BAPNA 0,4 $mg.mL^{-1}$ de tampão Trisma pH 8,2 (contendo 2,95 mg/mL de $CaCl_2$ dihidratado ($CaCl_2$. $2H_2O$, Neon pureza 99,0-105,0 %), previamente aquecidos a 37 ºC, e deixados os tubos em banho-

maria por mais 10 min. Ao final desse período adicionou-se em todos os tubos 1 mL de ácido acético (Dinâmica, pureza 99,7 %) a 30 % (v/v) para interromper a reação. E no tubo do branco adicionou-se mais 2mL da solução de tripsina. Filtrou-se em papel Whatman nº 3 (Jprolab®) e o filtrado foi utilizado para determinação do teor dos inibidores de tripsina em uma absorbância de 410 nm em espectrofotômetro (Spectro Vision®, modelo DB-1880S).

Os resultados foram expressos como mg de inibidor de tripsina Kunitz (ITK) por g de amostra desengordurada, através da Equação 5.

$$\text{Inibidor de Tripsina Kunitz}\left(\text{mg}\,\frac{\text{ITK}}{\text{g}}\right)=\frac{|\text{abs padrão}|-|\text{abs amostra}|}{38\times\text{peso da amostra}}\times 2500 \qquad \text{(Equação 5)}$$

Onde: Abs padrão: absorbância padrão; Abs amostra: absorbância da amostra; ITK: inibidor de tripsina.

2.4.10 Atividade ureática

A atividade ureática foi determinada através da quantificação de duas porções de exatamente 0,2 g de amostra (grãos de soja tratados hidrotermicamente) e transferidas quantitativamente para dois tubos de ensaio (A e B). Foi adicionado volumetricamente 10mL de solução tampão de fosfato pH 7,00 ao tubo A. Sendo agitado levemente, sem inverter, tampa-se e coloca-se em banho-maria termostatizado a 30°C. Agitou-se levemente a cada 5 min, até completar 30 min. Após transcorrido esse tempo, foi retirado o tubo do banho e mede-se o pH do líquido sobrenadante em potenciômetro previamente calibrado. Esta foi a prova em branco.

Ao tubo B adicionou-se volumetricamente 10 mL de solução tamponada de ureia pH 7 e procedeu-se da mesma forma como foi feito no tubo A, anotando o pH da solução sobrenadante resultante. A diferença de pH entre as duas soluções é o índice de atividade ureática, de acordo com metodologia descrita por Brasil (1991). A atividade ureática é calculada pela expressão da Equação 6.

$$\text{Atividade ureática} = \text{pH da amostra B} - \text{pH da amostra A} \qquad \text{(Equação 6)}$$

2.4.11 Ácido fítico

A determinação de ácido fítico foi realizada por cromatografia de troca iônica, segundo metodologia descrita por Latta e Eskin (1980), com modificações. Inicialmente, quantificou-se 1 g de amostra previamente moída em erlenmeyer de 125 mL e adicionou-se 10 mL de solução HCl 0,8 M e submeteu-se a agitação em agitador magnético (Velp Scientifica®) durante 2 h. Em seguida foi centrifugado (centrífuga MPW®, modelo 351R), a 2000 rpm durante 10 min para a obtenção do sobrenadante, 2 mL deste foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água milli-Q. Em seguida, foi preparada a coluna em seringa de vidro contendo 1 cm de lã de vidro, e 0,50 g de resina (Dowex®, 1x4 chloride form) e empacotou-se a coluna, lavando-se com água milli-Q até que toda a resina ficasse uniforme no fundo da coluna, descartando a água que foi utilizada. Posteriormente, foi eluido 10 mL de NaCl 0,7 M (3 s/gota) e 10 mL de água milli-Q (3 s/gota). Após, foi eluido 2 mL da amostra diluída (5 s/gota), desprezando em béquer. Foi eluido cuidadosamente 10 mL NaCl 0,1 M (3 s/gota), desprezando em béquer. Eluiu-se cuidadosamente 10 mL NaCl 0,7 M (5 s/gota), coletando-se em béquer. Em tubos de ensaio foi subdividido o líquido coletado em 3 alíquotas de 3 mL, adicionou-se 1mL do reativo de Wade e agitou-se durante 5 s em agitador tipo "vórtex" (Phoenix®, modelo AP 56) e ejetou-se a amostra para leitura em espectrofotômetro (Spectro Vision® modelo DB-1880S) a 500 nm. Os resultados foram expressos em % (g/100 g), através da Equação 7:

$$AF(\%) = ((ABSa - ABSw) \times Fd) \div (M \times F \times 10000) \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde: AF (%)= Porcentagem de ácido fítico; ABSa = absorbância amostra; ABSw = absorbância Wade; F = fator da curva (diferença ABS/concentração em µg), Fd = fator de diluição e M = massa da amostra, em g.

2.4.12 Componentes minerais

Para a quantificação dos componentes minerais, Manganês (Mn), potássio (K), zinco (Zn), magnésio (Mg), cobre (Cu), ferro (Fe) e cálcio (Ca) presentes nos grãos de soja e no EHS, foi utilizado o método de espectrometria de absorção atômica com chama – FAAS (Varian, modelo SpectrAA 55) com digestão prévia das amostras (SILVA, 2009).

2.4.13 Sólidos solúveis

Os sólidos solúveis do EHS foram determinados por refratometria de acordo com metodologia descrita por IAL (2008) utilizando-se refratômetro de Abbé (Marca Bel® Equipamentos Ltda), corrigido para 20°C para o EHS, resultados expressos em °Brix.

2.4.14 Acidez titulável

Acidez para o EHS foi determinada em graus Dornic através da titulação com hidróxido de sódio 0,1N (acidez titulável), seguindo orientações dos métodos 016/IV e 311/IV do IAL (2008).

2.4.15 Frações proteicas da massa molecular por eletroforese (SDS-PAGE)

A SDS-PAGE foi conduzida segundo Laemmli (1970) com pequenas modificações, e foi utilizado um gel de poliacrilamida com gradiente de 5-13 g/100 g, pré-moldado em gel de eletroforese Bio-Rad Mini (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A amostra de proteína (4,0 mg) foi dissolvida em 1,0 mL de tampão, bem misturada e depois aquecida sob fervura durante 1 min. Após centrifugação a 6000 rpm por 10 min, o sobrenadante obtido (8 μL) foi carregado em cada chapa, e marcadores comerciais (Solarbio, Beijing, China) de massa molecular (11-180kDa) foram utilizados. A eletroforese foi realizada com tampão (0,025 mol/L Tris, 0,192 mol/L de glicina, 0,1 g/100 g de SDS, pH 8,3) a 80 V seguido de 110 V quando a linha azul atinge o gel de separação. Finalmente, os géis foram corados com 0,1 g/100 mL de azul Coomassie Brilliant (R-250) por 2 h e descoloridos em solução de metanol/ácido acético/água deionizada (5:10:85, por volume) por 12 h.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95% de confiança, utilizando o *software Statistica* (versão 7.0 StatSoft, Inc., Tulsa OK, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS DE SOJA *IN NATURA* E DO EHS

O teor de umidade dos grãos das duas cultivares investigadas foram 8,56g/100 g (BRS 267) e 8,1g/100 g (Vmax) (Tabela 1), os quais são considerados adequados para a

manutenção das características do grão durante o armazenamento. Os resultados para umidade do EHS não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) entre as amostras analisadas.

O valor de pH 6,09 e 6,07 obtido para as duas cultivares de soja e para EHS com valores de 6,45 e 6,56, BRS 267 e Vmax, respectivamente, não diferiram estatisticamente ($p>0,05$).

O teor médio de cinzas para os grãos das duas cultivares de soja (Tabela 1) foram de 5,09 (BRS 267) e 4,55 (Vmax) g/100 g, embora os valores diferiram ($p<0,05$) entre si para as duas cultivares, pois é comum a soja apresentar variação no teor de cinzas, já que, este pode sofrer influência de fatores climáticos e tipo da cultivar. Para a quantificação do conteúdo de cinzas do EHS (Tabela 1) foi observado um valor de 0,41 e 0,42 g/100 g para a BRS 267 e Vmax, respectivamente, sem diferença significativa ($p>0,05$) entre as amostras e com valores próximos aos resultados da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011) com 0,5 g/100 g.

O teor de lipídeos encontrado no grão foi de 16,1 g/100 g (BRS 267) e 17,63 g/100 g (Vmax) e as duas cultivares diferiram entre si ($p<0,05$), o teor de lipídios depende da cultivar. Os resultados do EHS em relação ao conteúdo médio de lipídeos mostraram valores de 2,00 e 2,30 g/100 g para a BRS 267 e Vmax, respectivamente), diferindo estatisticamente ($p<0,05$).

O conteúdo proteico das cultivares Vmax foi de 35,22 g/100 g e da BRS 267 foi de 40,09 g/100 g, diferindo entre si ($p<0,05$). Assim verifica-se que diferentes cultivares podem apresentar concentrações de proteínas variadas. E no caso da BRS 267 o conteúdo proteico mais elevado pode favorecer o seu uso como fonte de proteína.

Tabela 1: Composição dos grãos in natura e do Extrato Hidrossolúvel de Soja –EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax.

Composição		**Grãos *in natura***		**EHS**	
		BRS 267	**Vmax**	**BRS 267**	**Vmax**
Umidade (g/100 g)		$8,56^{a} \pm 0,45$	$8,10^{b} \pm 0,61$	$92,57^{a} \pm 0,06$	$91,30^{b} \pm 0,10$
pH		$6,09^{a} \pm 0,02$	$6,07^{a} \pm 0,03$	$6,45^{a} \pm 0,03$	$6,56^{a} \pm 0,12$
Cinzas (g/100 g)		$5,09^{a} \pm 0,06$	$4,55^{b} \pm 0,12$	$0,41^{a} \pm 0,06$	$0,42^{a} \pm 0,01$
Lipídios (g/100 g)		$16,10^{b} \pm 0,26$	$17,63^{a} \pm 0,51$	$2,00^{b} \pm 0,11$	$2,30^{a} \pm 0,10$
Proteína bruta (g/100 g)		$40,09^{a} \pm 0,31$	$35,22^{b} \pm 0,87$	$3,43^{a} \pm 0,03$	$3,05^{b} \pm 0,03$
***Cor**	**L***	$89,7^{b} \pm 0,25$	$90,2^{a} \pm 0,05$	$72,39^{b} \pm 0,09$	$76,72^{a} \pm 0,22$
	a*	$-0,51^{a} \pm 0,03$	$-0,49^{a} \pm 0,56$	$0,16^{a} \pm 0,06$	$0,19^{a} \pm 0,03$

	b*	21,00^{b}±0,03	23,00^{a}±0,37	10,09^{b}±0,03	11,82^{a}±0,06
ISN (g/100 g)		65,18^{a} ± 0,85	65,24^{a}± 0,28	55,19^{b}±0,06	56,19^{a}±0,09
IDP (g/100 g)		82,92^{a}±0,68	77,59^{b}±0,45	65,24^{a}±0,05	64,87^{b}±0,06
Inibidor de tripsina Kunitz (mg.IT/g)		17,96^{a}±0,87	18,46^{a}±1,31	2,10^{a}±0,25	2,13^{a}±0,22
Atividade ureática (pH)		2,23^{b}±0,02	2,36^{a}±0,01	0,25^{a} ± 0,03	0,19^{b} ± 0,15
Ácido fítico (g/100 g)		1,65^{a} ± 0,08	1,57^{a} ±0,12	1,71^{a}±0,02	1,65^{a}±0,05
Componentes minerais (mg/kg)	**Ca**	250,66^{a}±0,23	238,00^{b}±0,03	189,66^{a}±0,30	167,00^{b}±0,01
	Mg	192,50^{b}±0,53	237,00^{a}±0,61	248,25^{b}±0,23	297,00^{a}±0,51
	K	1295,00^{a}±0,07	1257,50^{a}±0,89	1487,00^{a}±0,02	1437,50^{a}±0,25
	Zn	2,90^{a}±0,57	3,00^{a}±0,78	3,36^{a}±0,05	3,45^{a}±0,26
	Cu	1,20^{a}±0,20	1,10a±0,20	1,62^{a}±0,05	1,57^{a}±0,30
	Fe	11,33^{a}±0,27	10,66^{a}±0,57	9,33^{a}±0,15	8,66^{a}±0,13
	Mn	1,75^{b}±0,57	2,50^{a}±0,63	2,03^{b}±0,23	2,75^{a}±0,05
Sólidos solúveis (ºBrix)		-	-	5,40^{a}±0,06	5,10^{b}±0,05
Acidez (% de ácido lático)		-	-	1,24^{a}±0,11	1,32^{a}±0,15
Absorção de água (g de água absorvida/100 g de grãos)		-	-	135,05^{a}±0,12	139,81^{a}±0,20

Cor determinada em colorímetro Minolta (modelo CR-400), L Luminosidade: 0=preto; 100=branco; a* coordenada de cromaticidade: + 60 = cor vermelha; - 60 = cor verde; b* coordenada de cromaticidade: + 60 = cor amarela; - 60 = cor azul. Média (três repetições) ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas nas linhas, para cada grupo de análises, indica não haver diferença significativa em nível de 5% (Teste de Tukey).

Ao analisar os valores médios dos parâmetros colorimétricos dos grãos de soja (*in natura*) observa-se que a claridade ou luminosidade (L*) das amostras (Tabela 1) diferem significativamente ($p>0,05$). A BRS 267 apresentou L* menor, o que caracteriza coloração mais escura para os grãos dessa cultivar. Os extratos apresentaram índices menores significativamente ($p<0,05$) diferentes entre as cultivares. De acordo com Zilic et al. (2006), maiores temperatura e tempo de processamento podem interferir negativamente na variável L*, indicando formação de pigmentos, possivelmente devido a ocorrência do processo de caramelização de açúcares ou da reação de Maillard, que pode ocorrer quando açúcares redutores são aquecidos na presença de proteínas, resultando no escurecimento dos produtos alimentícios. Os resultados negativos para o índice a* nos grãos *in natura*, mostram tendência para a cor verde que se modifica com o

tratamento térmico aparecendo a formação da cor vermelha, com resultados positivos para o EHS das cultivares BRS 267 (0,16) e Vmax (0,19). Para os valores de b*, tanto para os grãos (*in natura*) como para os EHS, as cultivares apresentaram diferenças estatísticas (p>0,05), sendo que a BRS 267 apresentou tendência para a cor azul. A variação da cor está diretamente relacionada ao estado de oxidação do óleo ou gordura. O azul representa a estabilidade e qualidade para óleo ou gordura contido no EHS.

Houve diferenças entre as cultivares, quanto a solubilidade da proteína dos EHS. Nos grãos *(in natura)* o índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) não foi diferente entre as cultivares. Embora com pequenas diferenças em termos de valores absolutos, estatisticamente (p>0,05) os EHS foram diferentes, sendo que o ISN foi maior para a Vmax e o IDP foi maior para a BRS 267, o qual sofreu processamento e tratamento térmico.

Os valores de inibidor de tripsina Kunkitz (ITK) não apresentaram diferença significativa para as duas cultivares de soja investigadas. As variações nos teores desse composto na soja podem ser devido a diferenças genéticas, período de desenvolvimento dos grãos na colheita e condições ambientais do local de cultivo. Este composto é termo-label, podendo ser reduzido por diferentes tratamentos térmicos durante o processamento da soja.

Os resultados desse trabalho mostraram uma considerável diminuição dos teores de IKT no EHS (Tabela 1). Comparado ao teor original nos grãos *(in natura)*, houve mais de 88% de redução para os dois extratos hidrossolúveis. A redução do ITK é devido ao processamento térmico durante a extração do “leite”.

Os resultados de atividade ureática (Tabela 1) nos grãos de soja da BRS 267 foi de 2,23 e Vmax de 2,36 unidades de pH. No EHS a atividade ureática foi de 0,25 e 0,19 unidades de pH e este resultado representa uma redução de 89% e 92%, respectivamente, para BRS 267 e Vmax. Os dados apresentados neste estudo confirmam que os tratamentos hidrotérmicos da soja proporcionam a eliminação de enzimas e compostos antinutricionais.

Os teores de ácido fítico nos grãos e no EHS não diferiram estatisticamente (p>0,05), para cada grupo, e os resultados foram inferiores a 2 %, o que pode caracterizar a soja como alimento funcional, pois segundo Kumar et al. (2005), uma composição alta, acima de 10%, torna esse componente uma substância antinutricional, porém em baixas concentrações tem ação funcional. De acordo com Moreira et al. (2012) a soja apresenta excelente valor nutritivo e possui compostos bioativos, como ácido fítico que pode ser

benéfico, pois apresenta ação antioxidante e deletérias ao organismo humano, devido ao efeito quelante em relação aos minerais divalentes. A estrutura química do ácido fítico é composta por seis grupos fosfatos aniônicos, nos quais há átomos de oxigênio com elétrons livres. Esta estrutura facilita a complexação do ácido fítico com cátions divalentes como cobre, zinco, ferro e cálcio (TEIXEIRA et al., 2013). Esta complexação pode resultar na menor biodisponibilidade desses minerais no organismo, o que pode provocar efeito antinutricional (KUMAR et al., 2010). Quanto a função antioxidante, possivelmente, esta seja responsável pelos efeitos anticarcinogênicos e antineoplásicos do ácido fítico no organismo humano (SHAMSUDDIN et al., 2002). Assim sendo, torna-se importante conhecer os mecanismos de ação do ácido fítico, pois é necessário conhecer os valores e os seus efeitos benéficos, para que estes possam sobrepor aos efeitos antinutricionais no organismo.

Quanto aos valores de minerais Fe, Cu, K e Zn (Tabela 1), não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para grãos de soja (*in natura*) e EHS das cultivares (BRS 267 e Vmax. Porém, Ca, Mn e Mg foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), para cada grupo analisado. Entre as cultivares, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras, o K foi o mineral que apresentou maior quantidade, 1295,00 mg/100g para a cultivar BRS 267 e 1257,50 mg/100 g na cultivar Vmax). Consequentemente, para o EHS (Tabela 1) os valores de K também foram os maiores que os demais minerais. A composição de cálcio da soja é significativa, e foram encontrados valores de 250,66 e 238,00 mg/100g para as cultivares BRS 267 e Vmax, respectivamente. Para o EHS os valores de cálcio diminuíram quando comparados a soja *in natura*, porém apresentam resultados expressivos. Assim sendo, os derivados de soja podem ser consumidos por seres humanos para suprir estes minerais.

Os valores dos sólidos solúveis foram de 5,40 e 5,10 °Brix (Tabela 1) para BRS 267 e Vmax, respectivamente. A acidez do EHS foi de 12,40 °Dornic (0,124 % ácido lático) e 13,20 °Dornic (0,132 % ácido lático) para as cultivares BRS 267 e Vmax, respectivamente. A acidez é um dos parâmetros de qualidade da soja que pode influenciar nas características de seus derivados, podendo apresentar redução do rendimento do tofu porque a acidez pode atuar como um coagulante e acelerar a coagulação de proteínas.

A capacidade de absorção de água dos grãos foi de 135,05 e 139,81 g água/100 g grãos, para a cultivar BRS 267 e Vmax, respectivamente, assim a absorção de água foi maior para a cultivar Vmax, a absorção de água pode estar ligada a característica da cultivar, que pode apresentar maior porosidade no tegumento dos grãos.

3.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA NO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EHS

A Tabela 2 apresenta o teor de proteína do EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax em função do tempo e temperatura no processo de obtenção, onde observa-se que as maiores concentrações foram acima de 3,40 g/100 g no EHS da cultivar BRS 267, e acima de 3,00 g/100 g no EHS da cultivar Vmax, empregando 45 ºC e 6 h de maceração (ensaios 9, 10 e 11).

Tabela 2: Teor de proteína do EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax em função do tempo e temperatura no processo de obtenção.

Ensaios	Tempo(h)	Temperatura (ºC)	Proteína* (%)	
			BRS 267	Vmax
1	-1(2)	-1(35)	2,90 ± 0,09	2,77 ± 0,25
2	1(10)	-1(35)	2,42 ± 0,27	2,46 ± 0,47
3	-1(2)	1(55)	3,22 ± 0,07	2,91 ± 0,06
4	1(10)	1(55)	2,80 ± 0,29	2,61 ± 0,35
5	-1,41(0,36)	0(45)	3,07 ± 0,09	2,85 ± 0,08
6	1,41(11,64)	0(45)	2,19 ± 0,01	2,16 ± 0,04
7	0(6)	-1,41(30,90)	2,73 ± 0,14	2,25 ± 0,06
8	0(6)	1,41(59,10)	3,14 ± 0,12	2,54 ± 0,34
9	0(6)	0(45)	3,46 ± 0,09	3,00 ± 0,05
10	0(6)	0(45)	3,43 ± 0,09	3,07 ± 0,11
11	0(6)	0(45)	3,40 ± 0,09	3,08 ± 0,12

* variáveis independes fixas: 150 g de grãos e 500 mL de água.

As Equações 8 e 9 apresentam os modelos codificados de segunda ordem, que descrevem os teores de proteína em função das variáveis analisadas (tempo e temperatura), dentro das faixas estudadas, para a cultivar BRS 267 e Vmax, respectivamente. O modelos foram validados pela análise de variância, pela qual obteve-se um coeficiente de correlação de 0,99 e 0,93 e o F calculado de 5,05 vezes maior que os valores tabelado para as duas cultivares BRS 267 e Vmax. Estes valores permitiram a construção das superfícies de respostas e curvas de contorno apresentadas na Figura 1.

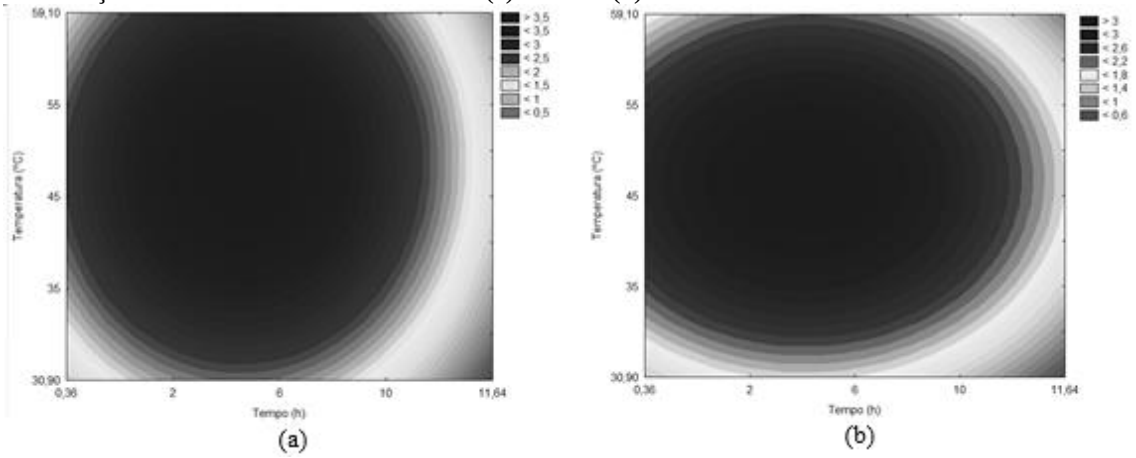
$$\text{Concentração de proteína (\%)} = 3{,}43 - 0{,}53*t - 0{,}78*t^2 + 0{,}32*T - 0{,}47*T^2 \quad \text{(Equação 8)}$$

$$\text{Concentração de proteína (\%)} = 3{,}05 - 0{,}40*t - 0{,}43*t^2 + 0{,}18*T - 0{,}54*T^2 \quad \text{(Equação 9)}$$

Onde: t = tempo (h) e T = Temperatura (ºC).

Na Figura 1 é apresentada a curva de contorno referente aos efeitos das interações entre as variáveis tempo e temperatura, na qual pode-se observar que a maximização da extração da proteína se dá com tempo na região próxima a 6 h e temperatura de próxima a 45 ºC para ambas as cultivares (BRS 267 e Vmax). De acordo com Zuo et al. (2016), a intensidade do tratamento térmico pode influenciar a solubilidade das proteínas pela desnaturação e aglomeração irreversível das mesmas.

Figura 1: Curvas de contorno do teor de proteína em função do tempo (h) e temperatura (ºC) do processo de obtenção do EHS das cultivares BRS 267 (a) e Vmax (b).

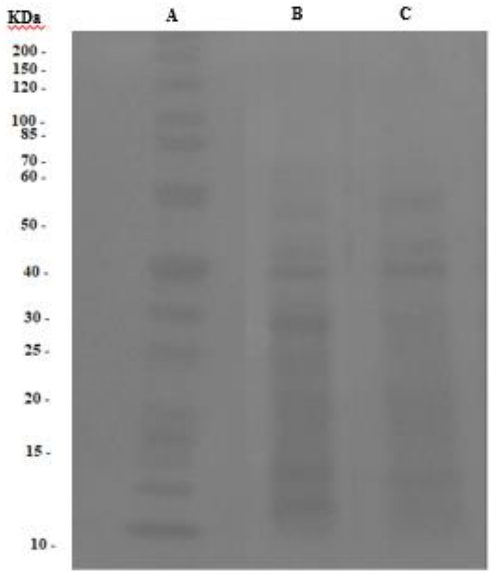


Os teores de proteína do EHS, nos ensaios 9, 10, e 11, foram iguais ou superiores a 3% e assim estão dentro dos padrões da legislação vigente (BRASIL, 2005), que estabelece para produtos proteicos de origem vegetal teor mínimo de 3 % de proteína para EHS na forma líquida A proteína da soja possui alegação de propriedade funcional aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo que o consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol (BRASIL, 2008).

3.3 FRAÇÕES PROTEICAS NOS EHS

Os dois EHS (ponto central do planejamento) obtidos foram caracterizados em relação ao seu perfil molecular (SDS-PAGE) em condições de desnaturação (Figura 2). A partir do gel de SDS-PAGE (Coluna A- padrão albumina de soro bovino com 200 kDa de massa molecular, coluna B- EHS Vmax e C- EHS BRS 267 (Figura 2) observa-se que há frações proteicas com bandas entre 10 e 60 kDa. Com proporção maior entre 10 e 25 kDa e em 30, 40 e 50 kDa para o EHS da Vmax. No EHS da BRS 267 visualiza-se maior prevalência entre as bandas 10 e 15 kDa e entre 40 e 50 kDa.

Figura 2: SDS-PAGE de proteínas solúveis presentes em sobrenadantes obtidos a partir de: A - Marcadores de massa molecular, B - EHS da Vmax, C – EHS da BRS 267.



4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados os grãos de soja (*in natura)* e o EHS da cultivar BRS 267 apresentaram maiores teores de proteína, umidade, ácido fítico, IDP e composição mineral (Ca e Mn) quando comparada com a Vmax. Através do planejamento é possível concluir que ao se aumentar a temperatura de extração de 22 ºC para 45 ºC há uma redução de 10 h no processo de maceração dos grãos de soja das cultivares BRS e Vmax para produção do EHS com teores de proteína acima de 3%, respeitando o que preconiza a legislação vigente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio grande do Sul (FAPERGS), a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).

REFERÊNCIAS

AOAC. Association Of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

AOAC. Association Of Official Analytical Chemists, Official Methods Of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. Washington: AOAC, 3000 p. 2007.

AOCS. American Oil Chemist's Society. Official and tentative methods of the American Oil Chemist's Society. 3. ed. Champaing, 1980.

Associação dos Produtores de Soja e Milho de Estado de Mato Grosso. APROSOJA. História da Soja. Disponível em < https://aprosojapi.com.br/sobre-a-soja/a-historia-da-soja/ > Acesso em: 14 abr. 2018.

BENASSI, V. T.; BENASSI, M. T.; PRUDENCIO, S. H. Cultivares brasileiras de soja: Características para a produção de tofu e aceitação pelo mercado consumidor. Semina: Ciências Agrárias, v. 32, nº 1, p. 1901-1914, 2011.

BRASIL, Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde. Extrato de soja. Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, 1978.

BRASIL, Método NE 20 Atividade Ureática. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, seção 1, p. 35, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, DF, 2008.

Companhia Nacional de Abastacimento – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v. 7 - Safra 2019/20 - Décimo levantamento, Brasília, p. 1-31. Julho 2020. ISSN 2318-6852. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos Acesso em: 12 de julho de 2020.

ESLAMI, O.; SHIDFAR, F. Soy milk: A functional beverage with hypocholesterolemic effects? A systematic review of randomized controlled trials. Complementary Therapies in Medicine, v. 42, p. 82–88, 2019.

IAL. (Instituto Adolfo Lutz). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 21-22, 2008.

KUMAR, V.; RANI, A.; RAJPAL, S.; SRIVASTAVA, G.; RAMESH, A.; JOSHI, O. P. Phytic acid in Indian soybean: genotypic variability and influence oh growing location. Journal of the Science of Food Agriculture, v. 86, nº 9, p. 1523-1526, 2005.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chemistry, v. 120, nº 4, p. 945-959, 2010.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v. 227, nº. 5259, p. 680-685, 1970.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid method for phitate determination. Journal Agriculture Food Chemistry, v. 28, p. 313-315, 1980.

MELLO, E. S.; BRUM, A. L. The soybean productive chain and some reflections in the regional development of Rio Grande Do Sul. Brazilian. Journal of Development, Curitiba, v. 6, n. 10, p. 74734-74750, oct. 2020.

MINOLTA. The Essentials of Imaging, Manual Guide. [sl]: Minolta Co. Ltd., p. 18-21, 2006.

MOREIRA, A. A.; MANDARINO, J. M. G. NEVES-SOUZA, R. D,; LEITE, R. S.; O'Toole, D. K. Soybean Soymilk, Tofu, and Okara. Encyclopedia of Food Grains (Segunda Edição), v. 3, p. 134-143, 2016.

SHAMSUDDIN, A. M. Anti-cancer function of phytic acid. International Journal Food Science and Technology, v. 37, p. 769-782, 2002.

SCHMIDT, J. T.; CANTELLI, K.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; ZENI, J. Effects of vegetable coagulants in the production and storage of tofu. Global Science and Technology, v. 10, nº 01, p. 188-198, 2017.

SILVA, F. C. Análise química do tecido vegetal. In: Manual de Análises Químicas de Solo, Plantas e Fertilizantes. 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 193- 304, 2009.

SILVA, C. F. G.; SANTOS, F. L.; SANTANA, M. V. L.; SILVA, M. V. L.; CONCEIÇÃO, T. A. Development and characterization of a soymilk Kefir-based functional beverage. Food Science and Technology, p. 1-8, 2018.

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – 4ª edição revisada e ampliada, Campinas – São Paulo, 2011.

TEIXEIRA, E. N. M; SILVA, J. H. V.; GOULART, C. C.; FILHO, J. J. E RIBEIRO, M. L. G. Suplementação da fitase em rações com diferentes níveis de fósforo disponível para frangos de corte. Revista Ciência Agronômica, v. 13, nº 44, nº 2, p. 390-397, 2013.

ZHANG, X.; LU, P.; XUE, W.; WU, D.; WEN, C.; ZHOU, Y. Digestive evaluation of soy isolate protein as affected by heat treatment and soy oil inclusion in broilers at an early age. Animal Science Journal, v. 87, p. 1291–1297, 2016.

ZILIC, S. M.; BOZÓVIC, I. N.; SAVIC, S.; SOBAJIC, S. Heat processing of soybean kernel and its effect on lysine availability and protein solubility. Central European, Journal of Biology, v. 1, nº. 4, p. 572-583, 2006.

ZUO, F.; PENG, X.; SHI, X.; GUO, S. Effects of high-temperature pressure cooking and traditional cooking on soymilk: Protein particles formation and sensory quality. Food Chemistry, v. 209, p. 50–56, 2016.