



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE PALMAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRYSLEY VELOSO DA SILVA

**EFEITO DA TEMPERATURA NO GRAU DE HIDRÓLISE E
NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO
PROTEICO DE OKARA**

Palmas - TO
2019

PRYSLEY VELOSO DA SILVA

**EFEITO DA TEMPERATURA NO GRAU DE HIDRÓLISE E
NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO
PROTEICO DE OKARA**

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Palmas, Curso de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Engenheira de Alimentos e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr Tarso da Costa Alvim
Coorientadora: Prof. Dra Caroline Roberta Freitas Pires

Palmas - TO
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S586e Silva, Prysley veloso da.

Efeito da temperatura no grau de hidrólise e na atividade antioxidante do hidrolisado proteico de okara. / Prysley veloso da Silva. – Palmas, TO, 2019.
32 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Palmas - Curso de Engenharia de Alimentos, 2019.

Orientador: Tarso da Costa Alvim

Coorientadora : Caroline Roberta Freitas Pires

1. Okara. 2. Resíduo de soja. 3. Hidrolisado proteico . 4. Hidrólise
enzimática . I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

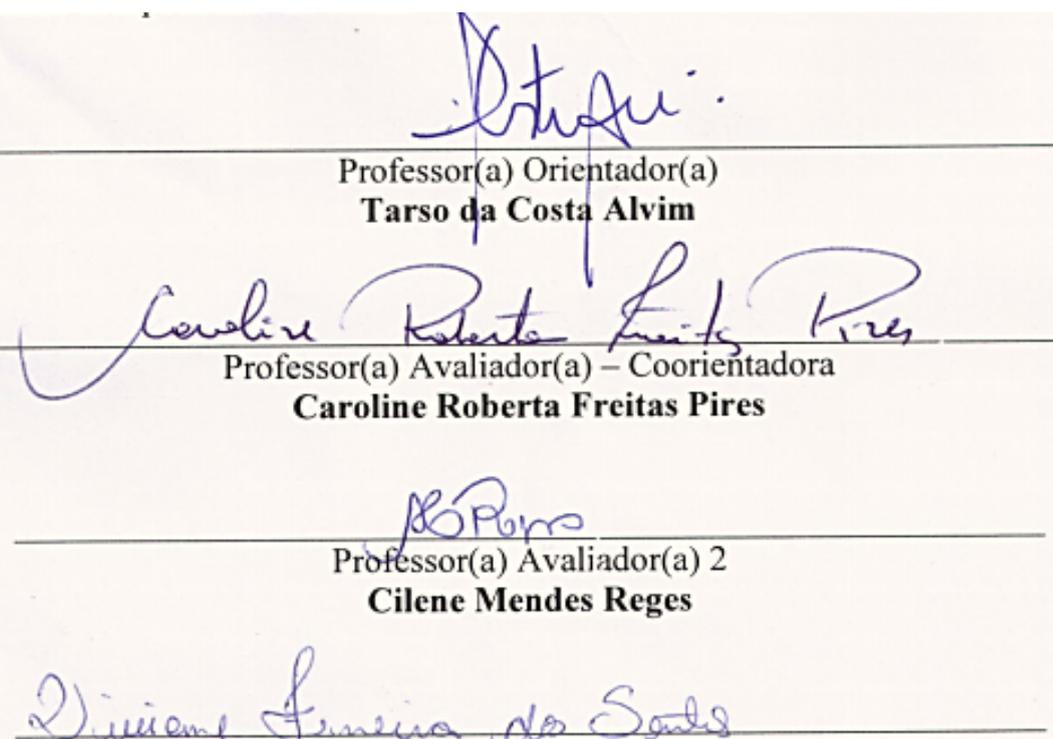
PRYSLEY VELOSO DA SILVA

**EFEITO DA TEMPERATURA NO GRAU DE HIDRÓLISE E NA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO PROTEICO DE
OKARA**

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT –
Universidade Federal do Tocantins – Campus
Universitário de Palmas, Curso de Engenharia de
Alimentos para obtenção do título de Engenheira de
Alimentos e aprovada em sua forma final pelo
Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 16 / 12 / 19

Banca Examinadora



Professor(a) Orientador(a)
Tarso da Costa Alvim

Professor(a) Avaliador(a) – Coorientadora
Caroline Roberta Freitas Pires

Professor(a) Avaliador(a) 2
Cilene Mendes Reges

Professor(a) Avaliador(a) 3
Mestranda Viviane Ferreira dos Santos

Palmas - TO, 2019

Dedico, bem como todas as outras conquistas, aos meus pais Adélcio e Rose. A minha mãe por acreditar em mim, por me incentivar e me apoiar. Ao meu pai (em memória), por ser a minha força mesmo não estando presente fisicamente, e sei que de onde ele estiver sempre estará olhando por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua infinita bondade, por me proporcionar a realização de mais um sonho e por sempre está ao meu lado durante esta caminhada, me amparando nos momentos difíceis e me ajudando a superar as dificuldades.

Agradeço a toda minha família, pelo apoio e carinho de cada um. Em especial, ao meu padrinho Antônio Marcos, que mesmo estando longe sempre me encheu de amor e palavras de ânimo. A minha vó Piedade, pelas orações e carinho. E aos meus primos Murilo, Enzo e Diego, que mesmo não entendendo muito sobre a vida, são os meus maiores presentes e motivo de alegria.

Agradeço a minha mãe Rose, e as minhas irmãs Thalyta e Kamila, por viverem comigo esse sonho, por me incentivarem e por nunca desistirem de mim, sem o apoio de vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigada pelo amor incondicional e por tudo que me ensinaram na trajetória da vida. Vocês são o que tenho de mais precioso!

Aos meus professores os quais se dedicaram a nos ensinar da melhor forma possível. Em especial, ao meu orientador Tarso, pela disponibilidade e pelo aprendizado repassado ao longo desses anos. A minha coorientadora Caroline Roberta e a mestranda Viviane, que foram de suma importância na realização deste trabalho.

As minhas queridas amigas Raiani, Iolanda e Amanda por sempre me apoiarem e por acreditarem em mim mais do que eu mesma!

Aos meus amigos Hiago, Thálisson, Roseline, Marcos e Tamires por terem feito dos meus dias na UFT mais leves.

E por fim agradeço aos meus amigos Carlos Eduardo, Evelanne e Ravena, os quais eu dividi os melhores momentos na UFT.

RESUMO

A okara vem sendo estudada devido conter diversos nutrientes com elevado valor agregado, sendo eles encontrados em maior quantidade as fibras e as proteínas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura no grau de hidrólise, por duas enzimas proteolíticas, e a atividade antioxidante dos hidrolisados. A capacidade antioxidante dos hidrolisados proteicos foram determinados pelo método de poder redutor, DPPH. A hidrólise enzimática das proteínas gerou aumento da capacidade antioxidante dos hidrolisados. Através dos resultados obtidos, constatou-se que dentro dos parâmetros estudados a bromelina teve um melhor resultado tanto para o grau de hidrólise quanto para a atividade antioxidante, quando submetida a temperatura de 50°C.

Palavras-chaves: Okara, resíduo de soja, hidrolisado proteico, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Okara has been studied because it contains several nutrients with high added value, being found in greater quantity the fibers and proteins. The objective of this work was to evaluate the effect of temperature on the degree of hydrolysis by two proteolytic enzymes and the antioxidant activity of hydrolysates. The antioxidant capacity of protein hydrolysates was determined by the reducing power method, DPPH. Enzymatic hydrolysis of proteins generated increased antioxidant capacity of hydrolysates. Through the obtained results, it was found that within the studied walls Bromelain had a better result for both the degree of hydrolysis and the antioxidant activity, when subjected to a temperature of 50 ° C.

Key-words: Okara, soybean residue, protein hydrolyzate, enzymatic hydrolysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação do grau de hidrólise entre as enzimas Bromelina e Papaína	23
Tabela 2 – Média do grau de hidrólise das enzimas em função da temperatura	23
Tabela 3 – Grau de hidrólise x Temperatura	24
Tabela 4 – Atividades Antioxidantes da Okara com Bromelina x Papaína	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Atividade Antioxidante

AOAC - Official methods of the Association of the Agricultural Chemists

DPPH - 1,1-difenil-2-picril hidrazil

EHS - Extrato Hidrossolúvel da Soja

GH - Grau de Hidrólise

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

OPA - Ortoftalaldeído do inglês o-phthalaldehyde

ORAC - Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivo Específico	14
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	Composição da soja	15
3.2	Okara	15
3.3	Papaína	16
3.4	Bromelina	17
3.5	Hidrólise Proteica	17
3.6	Atividade antioxidante (AA)	18
4	METODOLOGIA	20
4.1	Obtenção da Okara	20
4.2	Preparo das Amostras	20
4.3	Hidrólise Enzimática	21
4.4	Atividade Antioxidante (AA)	21
4.5	Grau de Hidrólise (GH)	22
4.6	Análise Estatística	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1	Grau de Hidrólise	23
5.2	Atividade Antioxidante da Okara usando as enzimas Bromelina e Papaína	25
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
	REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

A soja é o produto de maior relevância econômica do Brasil. Segundo estudos realizados pelos autores Abraham *et al.* (2019), durante a safra de 2016/17 a produção mundial de grãos de soja foi de 348,1 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial com uma produção de 114,1 milhões de toneladas. Liderando o ranking, estão os Estados Unidos, com uma produção de 116,9 milhões de toneladas, juntos os dois países produzem dois terços de toda a produção mundial de soja. No Brasil, as regiões Centro-Oeste e Sul formam as maiores produtoras, tendo o estado de Mato Grosso como o maior produtor nacional, produzindo 30,5 milhões de toneladas. Dados do IBGE (2019), mostram que a soja lidera a produção na agricultura, sendo responsável por mais de um terço da produção total de vegetal no país.

Segundo Pereira (2018), a soja é uma leguminosa constituída principalmente por óleo e proteína. Os grãos de soja são importantes para a alimentação humana, pois tem todos os nutrientes necessários para o controle do metabolismo, como aminoácidos, proteínas, lipídios, carboidratos, além de benefícios a saúde, como função anticancerígena e antioxidante, diminuindo a probabilidade de desenvolver patologias cardíacas e crônicas. Tavares (2018) também revelou que a soja além de encerrar grandes valores nutricionais, também proporciona relevantes vantagens tecnológicas no auxílio do desenvolvimento de novos produtos. Um desses produtos provenientes da soja é o tofu, composto basicamente por proteína. O Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS), popularmente conhecido como “leite de soja”, também é outro derivado importante da alimentação, isto quando processado corretamente, sendo rico em gordura, proteína e vitaminas (complexo B). Para a sua obtenção alguns fatores precisam ser avaliados, como pH, composição química da soja, tempo e temperatura, que são fatores essenciais para a qualidade dos seus nutrientes.

Pereira (2017), relata que o processo de obtenção de EHS, que se dá pela trituração dos grãos de soja em meio aquoso, elevando a temperatura em torno de 90°C, não viabiliza a extração de todos os nutrientes encontrados no grão de soja. Em decorrência disso, ao final desse processamento obtém-se um resíduo denominado okara. Estudando esse material, Machado (2017) constatou que a okara é rica em fibras, proteínas, vitaminas, minerais e nutrientes diversificados, além de ser altamente nutritiva, pois a okara não só revitaliza como pode atuar na regeneração celular.

Os hidrolisados protéicos são compostos que podem ser usados como ingredientes funcionais ou nutricionais para alimentos de baixa eficiência proteica. São ricos em peptídeos de baixo peso molecular, tem fácil digestibilidade, além de possuírem propriedades biológicas. Possuem ação de fagocitar radicais livres, dependendo da concentração enzimática, pH e temperatura (PEREIRA *et al.*, 2019). A ação da hidrólise é responsável por medir a extensão da clivagem das proteínas e representa a razão entre a quantidade de ligações peptídicas hidrolisadas e o número total de ligações ativas para a reação proteolítica (PEREIRA *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da temperatura no grau de hidrólise, por duas enzimas proteolíticas, e a atividade antioxidante dos hidrolisados.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar, por espectrofotometria, o efeito da temperatura na eficiência proteolítica da papaína;
- Avaliar, por espectrofotometria, o efeito da temperatura na eficiência proteolítica da bromelina;
- Avaliar, por espectrofotometria, a atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos com bromelina e papaína.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Composição da soja

A soja é uma semente oleaginosa e se trata de uma planta herbácea. É uma leguminosa produzida pelos chineses há cerca de cinco mil anos, expandindo-se por todo território asiático, porém foi no século XX que houve um acelerado aumento da cultura da soja nos EUA, devido ao desenvolvimento dos primeiros cultivares de soja com caráter nacional (MARTINS, 2019).

Rodrigues (2019), cita que o grão de soja é composto em média por 15 a 20% de gordura, 35 a 40% de proteína, 30% de carboidratos, 10% a 13% de umidade e cerca de 5% de minerais e cinzas podendo variar bastante, dependendo da variedade e das condições de crescimento. Já Domingues (2016), informou que a soja, também é uma importante leguminosa como fonte de minerais como cálcio, cobre, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, sódio e zinco, além de vitaminas como o ácido ascórbico. Cita ainda que esse alimento pode ser usado por pessoas que apresentam intolerância à lactose, alergias, além de atuar na prevenção de doenças, como câncer e diabetes, sendo também isento de colesterol.

O farelo de soja, resíduo resultante da extração do óleo de soja, constitui uma matéria-prima de grande qualidade nutricional, pois contém aproximadamente 50% de proteína e teores consideráveis de carboidratos, minerais e fibras, além de menores quantidades de energia e lipídeos em relação ao grão integral. Essa proteína de soja apresenta um perfil de aminoácidos adequado para suprir as necessidades proteicas de crianças e adultos (PEREIRA, 2018).

Ramos *et al.* (2017), em seu trabalho comentaram que a proteína da soja apresenta substancial qualidade nutricional, sendo o seu uso indicado na formulação de alimentos visando o aumento do valor nutricional e possível redução nos custos de produção em relação aos demais ingredientes proteicos tradicionais.

3.2 Okara

De acordo com Rodrigues *et al.* (2019), a okara é um resíduo proveniente do extrato hidrossolúvel de soja, sendo que a mesma tem sido estudada com a finalidade de transformá-la em um produto com mais valor agregado e que possa ser empregado em qualquer tipo de

alimento, já que é fonte de fibras, vitaminas e altamente protéico embora seu maior consumo, hoje, seja na fabricação de gêneros como iogurte, hambúrguer e produtos de panificação .

Além disso, segundo Yoshaida *et al.* (2014) a okara é fonte de isoflavonas, cuja ingestão em dose adequada ajuda a manter as funcionalidades dos organismos, sendo as mais conhecidas a genisteína e daidzeína, que são bastante presentes no grão da leguminosa.

3.3 Papaína

De acordo com Borella *et al.* (2015), a papaína é uma enzima proteolítica proveniente do mamão, e muito empregada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Pode ser encontrada no látex das folhas e dos frutos do mamão verde adulto. É uma hidrolase proteolítica que tem sua atividade intensificada quando na presença do aminoácido cisteína.

Os autores Mahecha *et al.* (2011), destacam o uso da enzima papaína na indústria alimentícia, sendo utilizada como amaciante de carne, agindo nas fibras musculares e nos componentes conectivo, além de também ser usada na fabricação de bebidas, como é o caso da cerveja, usada para hidrolisar as proteínas de alto peso molecular na clarificação, evitando a turbidez durante períodos prolongados de armazenamento e refrigeração.

Outras atividades dessa enzima consiste na sua ação bacteriostática e bactericida, onde comumente mata ou inibe o crescimento bacteriano com grande ação terapêutica. Entretanto, segundo Borella *et al.* (2015), em outros países proíbe-se a comercialização da papaína, com a alegação de produzirem efeitos nocivos, incluindo hipersensibilidade resultante de reações anafiláticas, devido à alergia ao látex.

3.4 Bromelina

A bromelina é uma hidrolase derivada do abacaxi. Tem diversos usos, todos, baseados em sua atividade proteolítica, sendo abundantemente encontrada no caule, folhas, raízes e no fruto do abacaxi. A bromelina tem grande importância econômica e está relacionada diretamente com a produção de fármacos e sua utilização na indústria alimentícia (como em cervejas, queijos, carnes, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, entre outros), além de ter grande eficácia no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações (ANDRADE *et al.*, 2018).

Segundo Alves (2015), por ter grande teor proteolítico, a bromelina tem sido utilizada na fabricação de colágenos hidrolisados, em indústrias têxteis, e também no amaciamento de fibras e na fabricação de detergentes. Sobretudo, é uma enzima proteolítica da classe das cisteínas-protease, onde atuam rompendo a ligação peptídica das proteínas e peptídeos. Entretanto, percebe-se que a bromelina proveniente do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina proveniente dos talos, quando testadas em diversos substratos protéicos. Sua atividade é máxima em pH 8,0 e temperatura de 70°C, enquanto a do talo tem atividade máxima a 60°C e pH 7,0.

Abreu (2019) destacou que a bromelina está presente no desenvolvimento dos frutos, e que seu nível aumenta gradualmente, mantendo-se alto até o amadurecimento, sendo esta uma vantagem da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, respectivamente, somente são encontradas quando o fruto está verde.

3.5 Hidrólise Proteica

Segundo Gonçalves *et al.* (2016), os hidrolisados protéicos são bastantes utilizados desde antigamente, com finalidade médica, na elaboração de dietas para manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas.

Oliveira *et al.* (2014), destacaram que a hidrólise enzimática é um processo de considerável importância e que tem sido utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, as características de absorção das proteínas. Para satisfazer as necessidades

nutricionais, este hidrolisado proteico deve ser osmoticamente equilibrado, hipoalérgico e apresentar sabor aceitável, sendo que o valor nutritivo do hidrolisado deve permanecer tão próximo da proteína original quanto possível.

Diversas doenças de grande importância clínica exigem o uso de fórmulas contendo hidrolisados proteicos, como doença de Crohn, colite ulcerativa, fístulas, pancreatites, alergias alimentares, etc. Estudando esses casos Araújo *et al.* (2016), descobriram que nos casos de dietas alimentares, é necessário que se usem de 2 a 6 aminoácidos específicos, obtidos via hidrólise proteica, para facilitar a absorção intestinal, evitar o aparecimento de peptídeos amargos e a possibilidade de causarem efeitos alergênicos.

Gonçalves *et al.* (2016), citam que, além disso, a presença destes aminoácidos nos hidrolisados proteicos, sob a forma de di-tripeptídeos, evidenciam uma melhor utilização das proteínas, visto que os oligopeptídeos são mais fáceis e rapidamente absorvidos pelo organismo.

3.6 Atividade antioxidante (AA)

Antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra efeitos nocivos de processos ou reações que podem causar oxidações excessivas (PEREIRA, 2017). Estudos epidemiológicos feito por Casarin (2018), mostram que alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzindo ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidante.

Segundo Araújo *et al.* (2016), os antioxidantes podem ser de grande benefício para a melhoria da qualidade de vida, já que ele tem a capacidade de proteger um organismo dos danos causados pelos radicais livres.

Um das técnicas atualmente utilizadas para detectar a presença de compostos antioxidantes, é o método baseado na eliminação de radicais livres estáveis 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH). Esse método é considerado fácil, preciso, rápido e econômico, sendo adequado para determinação da capacidade antioxidante de substâncias puras e misturas. Foi desenvolvido por Blois (1959), onde o DPPH é um radical livre e estável e não apresenta semelhança com os radicais livres mais reativos e não pode ser correlacionado a sistemas biológicos, pois as proteínas podem precipitar no meio da reação em solução alcoólica.

Alguns fatores como tipo de solvente, pH, concentração das amostras e tempo de reação influenciam o método. Além disso, há a obrigatoriedade do radical estar dissolvido sempre em solventes orgânicos como, por exemplo, etanol ou metanol (PIRES *et al.*, 2017).

Alves (2015), relaciona diversos métodos para a determinação da atividade antioxidante, como DPPH, ORAC e ABTS. O ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio) é um método que consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer dano oxidativo. Usando a Fluorescência como medida de dano ocorre menor interferência dos compostos coloridos presentes na amostra, basicamente baseia-se na transferência de átomos. Entretanto, por outro lado, o método de ABTS baseia-se na transferência de elétrons.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção da Okara

O resíduo utilizado foi obtido a partir do grão de soja (*Glycine max*), adquirido em supermercado da cidade de Palmas, atentando-se para a integridade da embalagem e a data de validade. No laboratório de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Tocantins, campus Palmas, os grãos foram selecionados rigorosamente, a fim de retirar as sujidades e grãos defeituosos ou inconformidades. Após esse procedimento foi feita a sanitização dos grãos realizada com hipoclorito de sódio na concentração de 100ppm, permanecendo em contato com a solução por um período de 15 minutos.

Sequentemente, foi utilizado o método proposto por Cunha (2017), onde foram acuradamente pesados 350,25g de grãos de soja e adicionados a 4,5 litros de água, sendo deixado de molho por 60 minutos. Em seguida, a água do molho foi descartada e os grãos foram fervidos com 1,5 litros de água por cinco minutos. Os grãos foram lavados cuidadosamente em água corrente e submetidos a um novo cozimento, por mais cinco minutos, em 3 litros de água, já em ebulição. Os grãos foram resfriados até a temperatura de 40°C e triturados por um minuto em liquidificador doméstico.

Para o preparo da okara, o líquido obtido anteriormente foi colocado para cozinhar em uma panela aberta, por 10 minutos, mexendo-se constantemente. O líquido já cozido foi passado em uma peneira doméstica e em seguida foi passado por tecido organza. Ao final do procedimento, obteve-se 853,96 g de okara. Por fim, as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno e armazenados em freezer a temperatura de -20°C até o momento das outras análises.

4.2 Preparo das Amostras

Para as análises de grau de hidrólise e atividade antioxidante, as amostras foram preparadas usando-se exatamente 5g de okara, pesadas em balança analítica e acondicionadas em tubos Falcon de 15 ml. As amostras foram solubilizadas na concentração de 1/10 (g de sólidos/ml de água).

Em seguida, foram feitos dois ensaios, um usando a enzima bromelina e o outro usando a enzima papaína, ambas nas concentrações de 1/100 (g de ptn da enzima/g de ptn do substrato).

4.3 Hidrólise Enzimática

Com as amostras já preparadas e identificadas, ajustou-se a temperatura desejada do Banho Metabólico Dubnoff – SL 157. Na hidrólise enzimática foram usadas três temperaturas diferentes tanto para a bromelina quanto para a papaína. As amostras foram submetidas às temperaturas de 35, 50, e 65°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram inativadas em temperatura superior a 90°C, por 15 minutos. Ao final destes processos as amostras foram centrifugadas na centrífuga Baby I Centrifuge modelo 206, a 1400 rpm por 5 minutos, a fim de separar o sobrenadante da parte insolúvel da amostra. Depois de centrifugadas, as amostras foram separadas, transferindo para tubos identificados a fração sobrenadante e a parte sólida foi descartada.

4.4 Atividade Antioxidante (AA)

Para a análise da atividade antioxidante foi empregada a metodologia baseada na extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH 60 µM), proposta por Rufino *et al.* (2009), com algumas adaptações em relação ao cálculo, calculando-se o percentual de sequestro do radical DPPH a partir do padrão. As amostras foram diluídas pipetando-se 50µl da amostra e 950µl de água destilada. Em seguida, adicionou-se 350µl de amostra diluída a 875µl de solução de DPPH nos tubos já cobertos com papel alumínio para que não houvesse a passagem de luz. Para o controle, foram adicionados 350µl de álcool etílico, juntamente com 875µl de solução de DPPH.

As leituras foram realizadas após 60 minutos, em espectrofotômetro do modelo SP-22, a 517 nm e os resultados foram expressos em percentual de sequestro de radical livre (%SRL), conforme equação a seguir:

$$\%SRL = (Ac - Am) \times 100 / Ac$$

Onde,

Ac = absorbância do controle;

Am = absorbância da amostra.

4.5 Grau de Hidrólise (GH)

Na determinação do grau de hidrólise, o reagente OPA (orto-ftalaldeído) foi preparado de acordo com Church *et al.* (1983). Sendo misturado 40 mg de OPA (dissolvido em 1 mL de metanol), 25 mL de tetraborato de sódio a 0,1, com 2,5 mL de solução de dodecil-sulfato de sódio a 20% e 100 µl de 2-mercaptoetanol, sendo completado com água destilada até 50 mL.

Para a leitura do grau de hidrólise, pipetou-se 10 µl da amostra, 120 µl de água destilada e 1 ml do reagente OPA em tubos de ensaio identificados. Para a leitura da absorbância, usou-se espectrofotômetro SP- 22 a 340 nm, com intervalos de 2 minutos.

4.6 Análise Estatística

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 2 x 4 sendo que o primeiro fator corresponde aos dois tipos de enzimas (bromelina e papaína) e o segundo fator relacionado à temperatura de hidrólise, sendo uma amostra controle, 35, 50 e 65°C. Foram realizadas três repetições para cada tratamento. Os resultados da avaliação do grau de hidrólise e da atividade antioxidante foram analisados estatisticamente pelo Programa Sisvar, utilizando-se análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparação dos resultados médios das amostras (FERREIRA, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Grau de Hidrólise

Segundo Paiva (2014), na hidrólise das proteínas ocorre a quebra das ligações peptídicas entre os aminoácidos, podendo ocorrer a formação de peptídeos com diferentes massas moleculares dependendo da quantidade de ligações rompidas. O grau de hidrólise é a porcentagem de ligações peptídicas clivadas, determinada pela proporção da quantidade de ligações peptídicas hidrolisadas com o número total de ligações peptídicas existentes no substrato. Quanto maior o grau de hidrólise, maior será a quantidade de peptídeos com baixo peso molecular.

Oliveira *et al.* (2014), diz que a escolha do substrato, a enzima utilizada, o pH, temperatura, proporção enzima/substrato, tempo do processo e o grau de hidrólise afetam as propriedades físico-químicas do produto final.

De acordo com os resultados na Tabela 2, o grau de hidrólise foi influenciado significativamente pelo tipo de enzima, temperatura de hidrólise e pela interação tipo de enzima e temperatura de hidrólise, podendo-se observar que a enzima bromelina teve um melhor desempenho em relação a papaína.

Tabela 1 – Comparação do grau de hidrólise entre as enzimas bromelina e papaína

Enzimas	Média
Bromelina	2,40 ^a
Papaína	0,76 ^b

Fonte: AUTOR, 2019.

Já na Tabela 3, o controle não se difere das amostras submetidas a temperatura de 35°C. O mesmo pode ser observado entre as amostras de 35, 50 e 60°C.

Tabela 2 – Média do grau de hidrólise das enzimas em função da temperatura

Temperatura	Grau de Hidrólise
Controle	1,33 ^b
35°C	1,59 ^{ab}
50°C	1,66 ^a
65°C	1,74 ^a

Fonte: AUTOR, 2019.

Os valores de grau de hidrólise, obtidos com a enzima papaína, utilizando a okara como substrato apresentaram uma variação de 0,70 a 1,14%, onde a amostra controle e as amostras submetidas a 35 e 50°C não mostraram diferenças significativas entre si ao grau de 5% de significância, obtendo-se um melhor resultado as amostras submetidas a 65°C. Já as amostras submetidas á bromelina apresentaram uma variação de 1,96 a 2,78%, onde foi possível observar que a melhor faixa de ação de temperatura da bromelina era de 35 a 50°C, sendo que o maior percentual de hidrólise foi encontrado na temperatura de 50°C.

Contudo, conforme mostra os resultados da Tabela 4, nota-se que apesar de estarem submetidas às mesmas condições de hidrólise, aquelas que continham bromelina, quando submetidas a uma temperatura de 50°C por 60 minutos, apresentaram um melhor resultado quando comparado as outras temperaturas e quando comparado ao desempenho obtido com a papaína.

Tabela 3 – Grau de hidrólise x Temperatura

Temperatura	Enzimas	
	Bromelina	Papaína
Controle	1,96% ^{cA}	0,70 ^{bB}
35°C	2,54% ^{abA}	0,65 ^{bB}
50°C	2,78% ^{aA}	0,55 ^{bB}
65°C	2,34% ^{bcA}	1,14 ^{aB}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não se diferem estatisticamente quanto à temperatura de hidrólise. Letras maiúsculas iguais na mesma linha não se diferem estatisticamente entre as enzimas de hidrólise.

Em estudos feitos por Alves (2015), comparando as enzimas bromelina e papaína em fígado suínos, o autor encontrou uma melhor ação da bromelina se comparada a papaína em faixa de temperatura em torno de 40 °C. Já Silva et al. (2009), usando o concentrado protéico do soro do leite como substrato, relatam que papaína conduzida a 55°C e pH 7,0, em proporção 1:100 (E/S), obteve-se um grau de hidrólise de 15%. Por outro lado, Peng et al. (2010), relataram graus de hidrólise superior a 20% ao hidrolisar proteínas isoladas de soro de leite durante 60 min de reação com a enzima Alcalase, O elevado grau de hidrólise determinado por Peng et al. (2010), em comparação com os dados apresentados, pode ser justificado a diferenças na fonte de proteica, atividade da enzima, e ao pH utilizado durante a hidrólise. Alves (2015), também mostrou em seus estudos pH ótimo para ação da papaína era em torno de 5,0 - 9,0 e o da bromelina era entre 6,0 - 8,0. No entanto, a enzima papaína utilizada no presente estudo possui pH 5,0, já o substrato um pH de 7,57. Isso pode explicar um melhor resultado com a

enzima bromelina, visto que o pH da amostra pode ter favorecido a atividade da mesma.

5.2 Atividade Antioxidante da Okara usando as enzimas Bromelina e Papaína

Segundo Pereira (2017), a capacidade antioxidante de hidrolisados depende de diversos fatores como, massa molecular dos peptídeos liberados durante a hidrólise, sua composição aminoacídica e hidrofobicidade, bem como as condições empregadas na hidrólise e a enzima utilizada também podem afetar a atividade antioxidante de hidrolisados proteicos, o que pode explicar a diferença entre os resultados obtidos para cada enzima testada.

Em alguns estudos realizados por Raghavan; Kristinsson, (2008); Theodore *et al.* (2008), o aumento do GH de hidrolisados proteicos resultou no aumento da atividade antioxidante. Contudo, outros estudos relatam diminuição na atividade antioxidante com o aumento do GH (THEODORE *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2011). Isso explica-se pela liberação de aminoácidos livres, que possuem menor poder antioxidante que peptídeos.

Nascimento *et al.* (2011), diz que quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, maior é sua atividade antioxidante. Desta forma, quanto maior a concentração da amostra e menor a absorbância, maior o consumo de DPPH.

De acordo com os resultados, a atividade antioxidante foi influenciada significativamente pelo tipo de enzima, e pela interação entre enzima e temperatura. A Tabela 5 mostra que atividade antioxidante, usando a enzima bromelina não apresentou diferença significativa entre o controle e as amostras submetidas às temperaturas de 35 e 65° C. Apenas as amostras submetidas a 50°C por 60 minutos mostraram um comportamento significativamente diferente. Já na papaína foi possível observar que não houve diferença significativa entre as amostras. De forma geral, as amostras contendo a enzima bromelina, que foram submetidas a 50° C, apresentaram um melhor resultado de atividade antioxidante dentre as amostras estudadas.

Tabela 4 – Atividades Antioxidantes da Okara com Bromelina x Papaína

Temperatura	Enzimas	
	Bromelina	Papaína
Controle	5,47% ^{Ba}	2,57% ^{aB}
35°C	5,60% ^{Ba}	2,56% ^{aB}
50°C	6,71% ^{Aa}	2,66% ^{aB}
65°C	4,65% ^{Ba}	3,34% ^{aB}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não se diferem estatisticamente quanto à temperatura de hidrólise. Letras maiúsculas iguais na mesma linha não se diferem estatisticamente entre as enzimas de hidrólise.

Segundo estudos realizados por Pereira et al. (2015), observaram que pelos métodos de DPPH e ABTS, os hidrolisados protéicos apresentam maior atividade antioxidante em relação aos não hidrolisados. Os autores também relatam que os hidrolisados proteicos com maior grau de hidrólise obtiveram melhores resultados de atividade antioxidante para os métodos de análise estudados. Hidrolisados com elevado grau de hidrólise apresentam maior quantidade de peptídeos de baixo peso molecular, e conseqüentemente maior potencial de inibição de oxidação, em relação aos hidrolisados com baixo grau de hidrólise (MOOSMAN e BEHL, 2002).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo buscou contribuir na construção de um conhecimento mais preciso e prático acerca das condições de temperatura e enzimas que melhor atuam no hidrolisado protéico da okara.

Como explicitado neste trabalho, a okara tem sido cada vez mais estudada por se tratar de um resíduo rico em nutrientes, sendo o maior deles o teor de proteína. Suas inúmeras propriedades nutricionais têm grande potencial para a indústria alimentícia, sendo uma das indústrias que mais investe em tecnologia.

Os resultados demonstraram que a atividade antioxidante e o grau de hidrólise da okara dependem do processamento e das condições às quais as amostras são submetidas, sendo associado não apenas à temperatura de hidrólise, mas também ao tipo de enzimas utilizadas.

Portanto, concluiu-se que os resultados foram influenciados pela temperatura de hidrólise, pela enzima utilizada e pela interação entre tipo de enzima e a temperatura de hidrólise. No entanto, pode-se afirmar que as preparações contendo bromelina, quando submetidas à 50°C, por 60 minutos, obteve-se os melhores resultados tanto para o grau de hidrólise quanto para a atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. R.; REIS, J. G. M.; TOLOI, R.C.; SOUZA, A.E.; COLOSSETTI, A.P. Estimativa da produção da soja brasileira utilizando redes neurais artificiais. **Revista Agrarian**, v.12, p.11, 2019.
- ABREU, Danielly Cristina Alves. Desenvolvimento de membrana de afinidade para a separação de bromelina. 2019. 86f. Dissertação (pós-Graduação em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte: UFMG, 2019.
- ALVES, G.K. Uso de papaína e bromelina para obtenção de hidrolisados proteicos de fígado suíno. 2015. 91f. Dissertação (Mestrado em ciência de alimentos)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- ANDRADE, C. M. F. OLIVEIRA, L. N. et. al. Análise do consumo de extrato hidrossolúvel de soja na qualidade do tecido ósseo de ratos jovens adultos. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. São Paulo. V. 12. N. 73. P.688-e698. Set./Out. 2018.
- APLEVICZ K.S, DEMIATE I.M. Análises físico-químicas de pré-misturas de pães de queijo e produção de pães de queijo com adição de okara. **Ciência Agrotec.**, v. 31, n. 5, p. 1416-1422, 2007.
- APPELT, P., CUNHA, M.A., GUERRA, A.P., KALINKE, C., & LIMA, V.A. Development and characterization of cereal bars made with flour of jabuticaba peel and okara. **Acta Scientiarum**. v. 37, n. 1, p. 117-122, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**, 14. ed. vol. 2. Virginia, 2000.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; FONTANA JUNIOR, A. J.; SCHMIDT, S. J.; LABUZA, T.P. Water activity in foods: fundamentals and applications. **Blackwell Publishing**, Oxford, 423 p., 2007.
- BORELLA, J. C., Simões, R. F., Puga, R. L. A., & Stevanato, M. C. B. (2016). Avaliação da estabilidade e da atividade enzimática de soluções de papaína utilizadas no desbridamento e cicatrização de feridas. *Infarma*, 28(3), 179-184.
- BORELLA, J. C.; PÁDUA, M. de.; STEVANATO, M. C. B. **Estudo comparativo para avaliação da qualidade de amostras de papaína comercializadas por empresas fornecedoras de insumos farmacêuticos do estado de São Paulo**. *Electronic Journal of Pharmacy*, vol. XII,n. 4, p. 24-31, 2015.
- CANTUÁRIA, Claudia, M de. RIBEIRO, Suezilde, da C. A; RIBEIRO, Carmelita, F.A; PARK, Kil, Jin; ARAÚJO, Eder Augusto. F. Perfil sensorial de pães de forma enriquecidos

com okara. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campo Grande, v.10, n. 2, p, 111-120, 2008.

CAVALHEIRO S.F.L., TININIS C.R.C.S., TAVANO O.L., CUSTÓDIO M.F., ROSSI E.A.,CARDELLO H.M.A.B. Biscoito sabor chocolate do resíduo de soja “okara”: teste de afetivo com crianças em idade pré-escolar. **Alimentos E Nutrição**, São Paulo. v. 12, 1. ed, p. 51-62, 2001.

CASARIN, Anna Luisa Ferro et al. Propriedades antioxidantes e antidiabéticas de compostos bioativos de lentilha (" *Lens culinaris*") obtidos a partir dos grãos in natura, germinados e tratados enzimaticamente. 2018.

DOMINGUES, Julia Gonçalves. Desenvolvimento de leite fermentado com okara com potencial efeito simbiótico. 2016. 72f. Trabalho de Conclusão de curso-Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2016.

EMBRAPA SOJA. CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J.M.G. **Documento 113.Soja: potencial de uso na dieta brasileira**. In: Londrina: Embrapa Soja, 1998.

GUIMARÃES, R. M.; OLIVEIRA, D. E. C.; REZENDE, O. SILVA, J.; REZENDE, T. M; EGEA, M. B. Thermodynamic properties and drying kinetics of ‘okara’. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.22, n.6, p. 418-423, 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2019). Soja lidera valor de produção na agricultura com R\$ 104 bi. Agência de Notícias IBGE.

JÚNIOR, B. Z. C. L.; OLIVEIRA, P. M.; CASTRO, R. L. E.; LAMAS, J. M. N.; MARTINS, E. M. F. Desenvolvimento e caracterização de doce de goiaba cremoso adicionado de farinha de okara. **Vértices**, Rio de Janeiro, v. 15,n. 2, p. 25-37, 2013.

KAMER, S. B. V.; GINKEL, L V.. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 239-251, 1952.

MACHADO, A. R.; ASSUMPCÃO, E. S. Elaboração e aceitabilidade de biscoito de maça enriquecido com okara. 2017. 29f. Trabalho de Conclusão de Curso- Centro Universitário Toledo, Araçatuba, 2017.

MAHAN L. K., ESCOTT-STUMP, S. K. - **Alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Editora Roca; 2002.

MAHECHAL, M.M.A, RODRÍGUEZ, O. M,CORREA H. A.M. **Estudo do processo de extração de papaína a partir do látex do fruto de mamão (*Carica papaya* L.) cv. Maradol**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2011.

MARTINS, Fabiana de Oliveira. Efeito da alta pressão dinâmica nas propriedades física, químicas e nutricionais de okara. Tese (Doutora em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2019.

MOOSMAN, B.; BEHL, C. Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure activity relationship. *Molecular Pharmacology*, v. 61, p. 260-268, 2002.

NASCIMENTO, J.C. *et al.* Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da Bauhinia variegata L. **Revista Brasileira de Farmácia**. Belo Horizonte, v. 6, p. 6, 2011.

OLIVEIRA, M.S.R.; FRANZEN, F.L.; TERRA, N.N. Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas proteolíticas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.35, n.1, p.291-302, 2014.

OSTERMANN-PORCEL, M. V.; QUIROGA-PANELO, N.; RINALDONI, A. N.; COMPDERRÓS, M. E. Incorporation of okara into Gluten-Free Cookies with High Quality and Nutritional Value. **Journal of Food Quality**, v. 2017, Article ID 4071585, 8 pages, 2017.

PAIVA, F. C. Produção de hidrolisado proteico de resíduo de pirarucu. 2014. 63f. Dissertação (pós-graduação em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas , Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

PAULETTO, F. B.; DE OLIVEIRA FOGAÇA, A. Avaliação da composição centesimal de tofu e okara. **Disciplinarum Scientia Saúde**, v. 13, n. 1, p. 85-95, 2012.

PENG, X.; KONG, B.; XIA, X.; LIU, Q. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *International Dairy Journal*, v. 20, n. 5, p. 360-365, 2010.

PEREIRA, A. M., LISBOA, C. R., & COSTA, J. A. V. (2015). Atividade antioxidante de peptídeos da biomassa microalgal. *Blucher Biochemistry Proceedings*, 1(2), 188-191.

PEREIRA, D.M. Avaliação da capacidade antioxidante e anti-inflamatório do isolado proteico de soja, do okara e seus hidrolisados. 2017. 78f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

PEREIRA, M.C.P.C *et al.* Desenvolvimento de uma formulação do “tipo hambúrguer” de okara com shitake. *Semioses*. Rio de Janeiro, v. 13, p.14, n.1, 2019.

PEREIRA, Naray dos Santos. Verificação da representatividade de amostragem da lecitina de soja por meio de análises físico-químicas. 2018. 24f. Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2018.

PINTO, D. D. J. e CASTRO, P. S. Estudo preliminar da secagem do okara (resíduo do extrato aquoso de soja) para inativação dos fatores antinutricionais e conservação **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, dez. 2008.

QUINTANA, G.; GERBINO, E; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Valorization of okara oil for the encapsulation of *Lactobacillus plantarum*. **Food Research International**, v. 106, p. 81-89, 2018.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: a comparative study of five enzymes. *J. Agr. Food Chem.*, v. 56, n. 4, p. 1434–1441, 2008.

RODRIGUES, C. D; GOMES, W.M; CANAAN, J. M. M; LUIZ A. F; PINTO, R. A.;CAVALLINI, D. C. U. Projeto UNISOJA: aproveitamento do okara na alimentação da população. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Araraquara, v. 40, set. 2019.

SCAFI, G., RENA, A. LAZARIN, LOUISE, E. KUROZAWA. Secagem em leito de jorro do okara: Influência dos parâmetros do processo sobre a qualidade do produto final. XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unicamp **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da Unicamp**. n. 26, Campinas, 2018.

Silva, M. C. D., Silva, V. D. M., LANA, Â., & Silvestre, M. P. C. (2009). Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de concentrado protéico do soro de leite. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 20(3), 395-402.

SOUZA, G.; VALLE, J. L. E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 61-69, 2000.

SUN, Q.; LUO, Y.; SHEN, H.; HU, X. Effects of pH, temperature and enzyme to substrate ration on the antioxidant activity of porcine hemoglobin hydrolysate prepared with pepsin. *J. Food Biochem.*, v. 35, n. 1, p. 44–61, 2011.

TAVARES, Livia Santos. Biscoito doce de okara com tofu e frutooligossacarídeos. 2018. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2018.

THEODORE, A. E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. *J. Agr. Food Chem.*, v. 56, n. 16, p. 7459–7466, 2008.

YOSHIDA, B. Y.; PEREIRA, D.G.; CASTILHO, S. P. G.; SEIBEL. Produção e caracterização de cookies contendo farinha de okara. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**. v. 25, n. 1, p. 49 – 54, Araraquara 2014.