



## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e nove dias do mês de agosto de 2014, no Auditório Superior do Prédio de Engenharia Química no Centro Politécnico – UFPR foi instalada, pelo Prof. Dr. Everton Fernando Zanoelo, professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, a Banca Examinadora para a sexagésima quarta defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos. Estiveram presentes no ato, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, foi constituída pelos doutores: Everton Fernando Zanoelo (PPGEQ/UFPR), Rafael Bruno Vieira (PPGEQ/UFPR) e Cristina Benincá (EQA/FURG). Às 09h00min, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **Michel Brasil da Silva** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada *“Investigação do efeito de variáveis de processo sobre o rendimento de isolado protéico de soja em uma planta industrial”*. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela aprovação do candidato, (de acordo com a determinação dos artigos 68º e 69º da Resolução 65/09 – CEPE/UFPR de 30.10.2009).

Curitiba, 29 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Everton Fernando Zanoelo

(PPGEQ/UFPR) – Orientador

Prof. Dr. Rafael Bruno Vieira

(PPGEQ/UFPR) – Membro Titular Interno

Prof.ª. Dra. Cristina Benincá

(EQA/FURG) – Membro Titular Externo

MICHEL BRASIL DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE VARIÁVEIS DE PROCESSO SOBRE O  
RENDIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA EM UMA PLANTA  
INDUSTRIAL

CURITIBA

2014

MICHEL BRASIL DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE VARIÁVEIS DE PROCESSO SOBRE O  
RENDIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA EM UMA PLANTA  
INDUSTRIAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.  
Orientador: Prof. Everton Fernando Zanoelo.

CURITIBA

2014

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas e pela força para que eu pudesse concluir mais uma etapa em minha vida.

A minha esposa Luciana e ao meu filho Micael Brasil os quais são a minha fonte de inspiração e que sempre me apoiaram e incentivaram nesta caminhada.

A minha família, meus pais e amigos.

Ao meu orientador, Professor Everton Fernando Zanoelo, pela orientação, dedicação e por todo o ensinamento transmitido.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, acreditaram e me incentivaram a correr atrás dos meus ideais.

Um agradecimento especial é dirigido ao Prof. Luiz Augusto da Cruz Meleiro por sua participação decisiva na construção do modelo de redes neuronais.

## RESUMO

O isolado protéico de soja (IPS) é produzido em escala comercial a partir do processamento de flocos de soja desengordurados (FSD), o que tradicionalmente envolve operações consecutivas de solubilização e precipitação de proteínas da soja por alteração de pH do meio aquoso onde as mesmas encontram-se. Estas etapas do processamento visam, respectivamente, a remoção de fibras insolúveis e carboidratos presentes na matéria-prima, de modo que o produto final torne-se concentrado em proteína (>90 % em base seca). Neste contexto, o principal objetivo desta dissertação foi investigar o efeito de variáveis de processo sobre o rendimento de obtenção da proteína na produção de isolado protéico ( $R$ ) em uma planta industrial de processamento de soja. Em particular, foram considerados como fatores a quantidade residual de óleo nos FSD, a temperatura na saída do dessolventizador, o tempo de residência dos FSD no dessolventizador, e o pH no primeiro e segundo tanque de solubilização de proteínas. Um conjunto de 40 dados de rendimento de IPS mensurados na planta, em função dos fatores considerados, foi utilizado para uma análise de efeitos baseada em um modelo estatístico. Os resultados indicaram que com 92,5 % de probabilidade apenas a temperatura e o pH do primeiro tanque de solubilização de proteína apresentam efeito significativo sobre  $R$ . Com base nesta evidência sugeriu-se um modelo de redes neuronais artificiais a fim de correlacionar as mencionadas variáveis ao rendimento de IPS na planta. Redes Multilayer Perceptron (MLP) com 3 a 7 neurônios na camada intermediária foram testadas, mas a melhor arquitetura envolveu 5 neurônios pois sobre-ajuste foi observado quando um número superior foi considerado. A validação dos modelos foi verificada com um conjunto de dados independente do empregado na etapa de desenvolvimento/treinamento, e em ambos os casos o desvio relativo médio entre valores de  $R$  na planta e calculados foi inferior a 4 %. Ensaio foram conduzidos em condições controladas de laboratório para simular as operações industriais de processamento dos FSD. Em especial, dados de rendimento de IPS foram obtidos variando-se a temperatura de saída do dessolventizador (de 55 a 75 °C) e o pH no primeiro tanque de solubilização de proteínas (de 6,8 a 7,6). Um efeito positivo do pH sobre  $R$  foi observado nas distintas condições de processamento dos FSD (i.e.; planta versus laboratório), porém a temperatura apresentou influência oposta sobre

a mesma resposta de interesse, sugerindo que os FSD foram exposta a diferentes rampas de aquecimento durante o estágio de remoção de hexano ocorrido na planta e em laboratório.

## ABSTRACT

Soy protein isolate (SPI) is produced in large-size commercial scale from defatted soy flakes (DSF). The classical manufacturing process is essentially based on protein solubilization at alkaline pH and precipitation by acidification to the isoelectric pH. These successive operations aim to remove insoluble fibers and carbohydrates originally found in the raw material, respectively. In such a way, the final product has a high percentage of protein (>90 % in dry basis). In this framework, the main aim of this study is to investigate the effect of process variables on the yield ( $R$ ) of soy protein isolate in a industrial plant of soybean manufacturing. In particular, the residual content of oil in the DSF, the temperature in the discharge of the desolventizer, the residence time of DSF in the desolventizer, and the pH in the first and second stage of protein solubilization were the considered factors. An analysis of effects based on a suggested statistical model was performed by involving a set of 40 data of SPI yield from the industrial plant as a function of the examined variables. The results shown with a probability of 92.5 % that only the temperature and pH of the first tank of protein solubilization have a significant influence on  $R$ . Based on this evidence an artificial neural network model was suggested in order to correlate the yield of SPI and the aforementioned variables in a industrial unit of soybean processing. MLP networks with 3 to 7 neurons in the one-hidden-layer were tested, but the best architecture involved 5 neurons since over-fitting was observed when a larger number of neurons was considered. Two independent sets of data of SPI yield against process variables were employed in the step of model training and model validation for both the examined models. The relative average deviation between measured and calculated SPI yield was lower than 4 % for both the proposed models. Experiments were carried out under controlled laboratory conditions to simulate the industrial operations of DSF manufacturing. In particular, SPI yields were obtained by changing the temperature in the exit of the desolventizer (from 55 to 75 °C) and the pH in the first tank of protein solubilization (from 6.8 to 7.6). A positive effect of pH on  $R$  was observed at the different DSF processing conditions (i.e.; plant *versus* laboratory). However, the temperature presented an opposed influence on the same response under the distinct examined situations. It suggests

that DSF was treated at different heating rates during the stage of hexane removal taken place in the industrial plant and in the laboratory.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Fluxograma típico de produção comercial de óleo, farelo (ou farinha de soja desengordurada) e lecitina de soja.....	9
Figura 2.2. Fluxograma típico de produção industrial de isolado protéico de soja. ...	11
Figura 2.3. Fluxograma da planta industrial de isolado protéico de soja investigada. .....	13
Figura 2.4. Rede perceptron multicamada do tipo feedforward com duas entradas, uma camada intermediária ou camada escondida, e uma saída. Adaptada de Gonzaga (2003). .....	20
Figura 3.1. Fluxograma de obtenção de IPS em laboratório. ....	23
Figura 4.1. Rendimento de diferentes lotes de produção de isolado protéico na planta industrial (símbolos) e estimados pela Equação (4.8) (linhas sólida). Linhas tracejadas limitam o intervalo de confiança com 95% de probabilidade. ....	32
Figura 4.2. Rendimento de diferentes lotes de produção de isolado protéico na planta industrial (símbolos) e estimados pela Equação (4.9) (linhas sólida). Linhas tracejadas limitam o intervalo de confiança com 99 % de probabilidade. ....	33
Figura 4.3. Distribuição de freqüência dos resíduos do rendimento, onde $\varepsilon$ representa a diferença absoluta entre valores de rendimento medidos na planta e estimados com a Equação (4.9). Linha tracejada representa a distribuição de probabilidade Gaussiana (Equação 4). ....	34
Figura 4.4. Comparação entre rendimentos determinados na planta (símbolos) e calculados com as Equações (4.8) e (4.9) (linhas).....	35

Figura 4.5. Rendimento de isolado protéico calculado com o modelo estatístico em função da temperatura na saída do dessolventizador e do pH do primeiro tanque de solubilização de proteína.....	36
Figura 4.6. Comparação entre todos os dados de rendimento disponíveis na planta (símbolos) e estimados com a Equação (4.9). Símbolos cheios denotam valores de $R$ para $T$ aproximadamente maior que $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ( $T > 64,8$ ou $X_2 > 0,7$ ) em $pH_2$ baixo ( $pH_2 < 7,26$ ou $X_4 < -0,38$ ).....	38
Figura 4.7. Comparação entre dados de treinamento (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 3 neurônios e 13 parâmetros (linha).....	40
Figura 4.8. Comparação entre dados de validação (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 3 neurônios e 13 parâmetros (linha).....	41
Figura 4.9. Comparação entre dados de treinamento (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 4 neurônios e 17 parâmetros (linha).....	41
Figura 4.10. Comparação entre dados de validação (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 4 neurônios e 17 parâmetros (linha).....	42
Figura 4.11. Comparação entre dados de treinamento (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 5 neurônios e 21 parâmetros (linha).....	42
Figura 4.12. Comparação entre dados de validação (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 5 neurônios e 21 parâmetros (linha).....	43
Figura 4.13. Comparação entre dados de treinamento (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 6 neurônios e 25 parâmetros (linha).....	43
Figura 4.14. Comparação entre dados de validação (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 6 neurônios e 25 parâmetros (linha).....	44

Figura 4.15. Comparação entre dados de treinamento (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 7 neurônios e 29 parâmetros (linha).....	44
Figura 4.16. Comparação entre dados de validação (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 7 neurônios e 29 parâmetros (linha).....	45
Figura 4.17. Erro quadrático médio ( <i>EQM</i> ) em função do número de neurônios na etapa de treinamento do modelo de redes neuronais. ....	45
Figura 4.18. Erro quadrático médio ( <i>EQM</i> ) em função do número de neurônios na etapa de validação do modelo de redes neuronais. ....	47
Figura 4.19. Rampa de aquecimento linear das amostras de FSD tratadas em laboratório para obtenção de isolado protéico. Símbolos: temperatura medida na estufa; linhas sólidas: equação de uma reta com coeficiente linear igual a 55 °C e angular determinado pelas temperaturas em $t=3600$ s. ....	48
Figura 4.20. Rendimento médio de isolado protéico na planta (ver Tabela 4.1) e nos ensaios de laboratório para $7,2 \leq pH_1 \leq 7,6$ e $60 \leq T \leq 65$ . Barras de erro: desvios padrão. ....	50
Figura 4.21. Resultados de análise de agrupamentos de curvas de $R \times pH_1$ pelo método <i>k</i> -Médias. Grupo 1 (símbolos vazios unidos por linha tracejada): formado por dados de <i>R</i> da Tabela 4.3 a $T=55$ e $T=60$ °C; Grupo 2: (símbolos cheios unidos por linha sólida): formado por dados de <i>R</i> da Tabela 4.3 a $T=65$ , $T=70$ e $T=75$ °C. ....	52
Figura 4.22. Comparação entre rendimentos médios experimentais (símbolos) e calculados com a Equação (4.12) (linhas) dos grupos 1 e 2 da análise de agrupamentos. Grupo 1 (símbolos vazios unidos por linha tracejada): $T \leq 60$ °C; Grupo 2: (símbolos cheios unidos por linha sólida): $T \geq 65$ °C.....	54

Figura 4.23. Rendimento de isolado protéico calculado com o modelo empírico em função da temperatura simulada na saída do dessolventizador e do pH do primeiro recipiente de solubilização de proteína. ....55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Características de algumas variedades de soja convencional (N-OGM) e soja transgênica (OGM) plantadas no Brasil.....	5
Tabela 2.2. Produção brasileira de soja OGM, N-OGM e Mix em milhões de toneladas.....	6
Tabela 2.3. Valores de produção e importação de soja no Brasil e no mundo em milhões de toneladas na safra de 2012/2013.....	7
Tabela 2.4 Composição química do concentrado protéico de soja em base úmida..	10
Tabela 2.5 Intervalos da composição analítica da proteína isolada de soja em base úmida. ....	12
Tabela 2.6 Composição dos aminoácidos presente na proteína de soja .....	15
Tabela 3.1. Condição de aquecimento durante os ensaios de dessolventização das amostras A à E.....	23
Tabela 3.2. Planejamento de experimentos para produção de IPS em laboratório...	24
Tabela 4.1. Rendimento de isolado protéico de soja em uma planta industrial em diferentes condições de processamento da farinha desengordurada. ....	28
Tabela 4.2. Parâmetros não significativos da Equação (4.6) para $\alpha=0,075$ e $v=24$ (número de experimentos - número de parâmetros do modelo). ....	31
Tabela 4.3. Rendimento de isolado protéico de FSD processada em laboratório em diferentes temperaturas finais de remoção de solvente e em diferentes pH do primeiro recipiente de solubilização de proteína. As incertezas na medida do	

rendimento a 65 °C representam desvios padrões de duas medidas independentes no mesmo pH. ....49

Tabela 4.4 Resultados de rendimento de isolado protéico médios nos grupos 1 e 2 da análise de agrupamentos em função de variáveis naturais e codificadas. ....52

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

ASA	American Soybean Association
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CPS	Concentrado Protéico de Soja
$E$	Eficiência do processo de produção de isolado proteico de soja
$EE$	Quantidade residual de óleo nos FSD, %
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EQM	Erro Quadrático Médio
$e, e_1, e_2,$ $e_3, e_4, e_5,$ $e_{2q}, e_{5q}$	Parâmetros dos modelos estatísticos definidos nas Equações (4.6) e (4.7)
$\varepsilon$	Diferença absoluta entre valores de $R$ na planta e estimados com a Equação (4.9), %
$\varepsilon_m$	Média dos valores de $\varepsilon$ , %
FSD	Flocos de Soja Desengordurados
IPS	Isolado Protéico de Soja
$m_{FSD}$	Massa de proteína total na farinha de soja desengordurada, kg
$m_{IPS}$	Massa de proteína total no isolado protéico de soja, kg
MLP	Multilayer Perceptron ou Modelo Perceptron Multicamadas
$m_{so}$	Massa de proteína no sobrenadante, kg
$m_{su}$	Massa de proteína na suspensão inicial, kg
$n$	Número de neurônios do modelo neuronal
N-OGM	Organismo Geneticamente Não Modificado
NSI	Índice de Solubilidade de Nitrogênio
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
$P(\varepsilon)$	Distribuição de frequência dos resíduos reportada na Figura 4.3
PDI	Índice de Dispersibilidade de Proteína
$pH_1$	pH no primeiro tanque de solubilização de proteína
$pH_2$	pH no segundo tanque de solubilização de proteína
$R$	Rendimento de proteína, %
$S$	Solubilidade da proteína, %

$S_{\text{KOH}}$	Solubilidade da proteína em KOH, %
$\sigma$	Desvio padrão de $P(\varepsilon)$
$T$	Temperatura média no dessolventizador dos FSD, °C
$t$	Tempo de residência dos FSD no ensaio de dessolventização em laboratório, s
$\tau$	Tempo de residência dos FSD no dessolventizador industrial, s
USDA	United States Department of Agriculture
$X_1, X_2, X_3,$ $X_4, X_5$	Variáveis codificadas definidas pelas Equações (4.1) a (4.5)

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações</b> .....	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA PLANTA E DO GRÃO DE SOJA.....	3
2.2 PLANTAS INDUSTRIAIS E TECNOLOGIAS DE PROCESSAMENTO DE SOJA.....	7
2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA.....	10
2.4 PROTEÍNAS DA SOJA.....	14
2.5 DESNATURAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	16
2.6 SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS.....	18
2.7 MODELAGEM DE PROCESSOS POR REDES NEURONAS ARTIFICIAIS..	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 MATERIAIS.....	22
3.2 EXPERIMENTOS EM LABORATÓRIO PARA OBTENÇÃO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA.....	22
3.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL E CÁLCULO DE RENDIMENTO..	26
3.4 DETERMINAÇÃO DE SOLUBILIDADE.....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>28</b>
4.1 RENDIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO NA PLANTA - MODELO ESTATÍSTICO.....	28
4.2 RENDIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO NA PLANTA - MODELO DE REDES NEURONAS.....	38
4.3 RENDIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO EM LABORATÓRIO.....	47
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>56</b>

REFERÊNCIAS.....58

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine Max*) é uma leguminosa, que devido à composição química dos grãos ( $\approx 40\%$  de proteína,  $\approx 20\%$  de óleo,  $\approx 11\%$  de carboidratos solúveis) (Kim et al., 2013a; Hagely et al., 2013) e à facilidades associadas a sua produção agrícola apresenta-se como a principal fonte mundial de proteína e óleo vegetal para consumo humano e animal (Berman et al., 2009). Os constituintes do grão também são empregados na formulação de uma variedade de produtos da indústria de alimentos (massas, embutidos de carnes, bebidas, produtos dietéticos, alimentação para bebês) e química (adesivos, nutrientes, adubos, fibras, papel, tintas, combustíveis), o que incrementa a importância comercial deste agroproduto.

O Brasil exerce papel de destaque na cadeia produtiva de soja pois é o atual segundo maior produtor e líder global em exportação do grão (USDA, 2014). No país também atuam empresas de transformação do grão, que essencialmente visam a produção de óleo, farinha desengordurada, concentrado protéico, lecitina e isolado protéico de soja (IPS), o qual apresenta um teor de proteína superior a  $90\%$  em base seca. No que se refere ao IPS, foco desta investigação, sua produção na indústria tipicamente ocorre por extração de proteínas em meio aquoso levemente alcalino (para remoção de fibras presentes nos flocos de soja desengordurados - FSD), seguida de uma operação de precipitação das proteínas em meio aquoso ácido (para remoção dos carboidratos solúveis presentes nos FSD) (Wang et al., 1998; Huang et al., 2012). Como teoricamente são inúmeras as variáveis que afetam a estabilidade e o rendimento de IPS (temperatura, pH, força iônica, tempo de residência nas etapas de solubilização e coagulação, concentração de proteína) (Wagner et al., 2000), manter o processo em condições ótimas de operação não é tarefa trivial. O impacto negativo de pequenas variações não controladas de rendimento sobre a quantidade de IPS produzida é via de regra significativo pois a carga de FSD processada em plantas industriais é da ordem de dezenas de toneladas por hora.

Neste contexto, um dos primeiros aspectos a ser investigado para evitar flutuações de rendimento na obtenção de IPS em indústrias de processamento de soja é identificar, dentre as clássicas variáveis que afetam a solubilidade de soja, àquelas cujo nível de perturbação ocasiona alterações mensuráveis de IPS. Com

este objetivo, uma análise estatística de efeitos em um processo industrial de produção de IPS foi conduzido. Nesta análise, considerou-se como resposta de interesse unicamente o rendimento de IPS, enquanto que os fatores investigados foram a quantidade residual de óleo nos FSD, a temperatura na saída do dessolventizador, o tempo de residência dos FSD no dessolventizador, e o pH no primeiro e segundo tanque de solubilização de proteínas.

Com base nos resultados do modelo envolvido na análise estatística de efeitos, duas ultteriores etapas de investigação com o propósito de melhorar e confirmar as respostas do modelo proposto foram conduzidas. Essencialmente, estas etapas envolveram: *i*) o desenvolvimento de um modelos de redes neuronais artificiais, tomando como referência para o treinamento da rede dados de processo obtidos na planta; *ii*) a realização de ensaios em condições controladas de laboratório a fim de simular as operações industriais de processamento dos FSD.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O propósito deste capítulo é dissertar sobre a origem, as características e a importância sócio econômica da soja no Brasil e no mundo, bem como sobre as principais formas de manufatura da soja para obtenção de seus diferentes derivados de interesse comercial. Especial destaque será dado as operações envolvidas na produção de óleo de soja, farinha de soja desengordurada, concentrado protéico de soja e isolado protéico de soja, sendo o estudo da obtenção deste último produto o foco desta investigação. Este capítulo também visa apresentar os principais agentes que promovem alterações nas estruturas das proteínas e que influenciam na otimização do processo de produção de isolado protéico de soja.

Uma revisão simplificada da técnica de modelagem de processos por redes neurais artificiais será finalmente reportada, visto que um modelo neuronal será proposto na tentativa de representar a variação de rendimentos de isolado protéico em função de perturbações nas condições do processo industrial deste derivado.

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DA PLANTA E DO GRÃO DE SOJA

Acredita-se que a soja, *Glycine max* (L.) Merrill, planta da subfamília Faboidease, uma das mais importantes culturas da Família das Leguminosas, provavelmente originou-se no leste da Ásia há cerca de cinco mil anos atrás (Le et al., 2011). A sua expansão iniciou-se nos séculos I e II, quando foi levada para a Coréia e o Japão, mas acentuou-se quando a planta foi introduzida na Europa e nos Estados Unidos, o que ocorreu por volta de 1735 e 1765, respectivamente (Barnes, 2010).

Devido a sua valiosa composição química, o grão de soja apresenta um papel relevante na nutrição animal e humana, o que confere a este produto o título de leguminosa mais importante em escala global. Em particular, a soja apresenta alto teor de proteínas, as quais apresentam um perfil de aminoácidos essenciais com elevado balanceamento, e de óleo, rico em ácidos graxos insaturados. Ainda que a quantidade destes componentes dependam primordialmente de fatores genéticos da planta e condições climáticas de cultivo (Balesevic-Tubic et al., 2011), o percentual de proteínas presente na soja é de aproximadamente 40 %, (Kashaninejad et al.,

2008 e Kim et al., 2013), enquanto que a quantidade de óleo é da ordem de 20 % em base seca. O grão de soja também apresenta em torno de 11 % açúcares solúveis (Hagely et al., 2013; Kim et al., 2013), e uma fração de carboidratos insolúveis de  $\approx$ 19-23 % (Berk, 1992; Guerrero Manso, 2012) em base seca. A umidade média do grão *in natura* é de 12 a 18 % (List et al., 1990).

Em comparação com outras plantas, a soja se apresenta como uma fonte acessível e barata de óleo e de proteínas, o que decorre não somente da grande quantidade destes constituintes no produto, mas também de facilidades de sua produção agrícola. Estes particulares aspectos promoveram um rápido interesse mundial pela soja, tornando-a a principal fonte de proteína e de óleo vegetal (Berman et al., 2009; Kim et al., 2013). Os inúmeros estudos realizados com o intuito de melhorar a qualidade do óleo de soja, aumentar o percentual de proteínas e o rendimento das sementes, corroboram este interesse global (ex., Miura, 1987; Piper, 1999; Balesevic-Tubic, 2011; Miladinovic, 2011). Estas investigações essencialmente visam analisar o efeito de fatores como condições climáticas e de plantio, fases de desenvolvimento do grão e alterações genéticas sobre as propriedades anteriormente referidas.

O desenvolvimento do grão de soja, de onde provém o interesse comercial pela planta, ocorre em 4 fases distintas, as quais são: a divisão celular, o alargamento celular, a maturação das sementes e a fase de liberação da umidade, também chamada de período de dormência das sementes. O ciclo de cada fase pode alterar-se em função da variedade do grão e do local de cultivo, porém o bom desenvolvimento do grão é sempre fortemente dependente das condições climáticas (Balesevic-Tubic et al., 2011).

A quantidade de sementes plantadas por unidade de área é um fator adicional de importância para o desenvolvimento das sementes e para o uso eficiente dos recursos utilizados na plantação, bem como para potencializar as interações competitivas com as plantas vizinhas. A altura das plantas e o rendimento do grão por unidade de área podem alterar-se de acordo com a variedade do grão de soja e com a região na qual o grão foi plantado (Miura et al., 1987), conforme evidenciado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Características de algumas variedades de soja convencional (N-OGM) e soja transgênica (OGM) plantadas no Brasil.

Variedade	OGM/N-OGM	Altura da planta (cm)	Massa de 100 sementes (g)	Ciclo (dias)	Densidade de semeadura (planta m <sup>-2</sup> )
BRS 133	N-OGM	70 - 95	16,0	124 - 136	12 - 18
BRS 184	N-OGM	68 - 95	17,3	114 - 128	12 - 18
BRS 232	N-OGM	67 - 93	18,5	116 - 142	12 - 20
BRS 262	N-OGM	70 - 90	15,0	104 - 120	16 - 22
BRS 282	N-OGM	69 - 100	13,7	116 - 128	10 - 20
BRS 284	N-OGM	80 - 100	14,6	108 - 132	10 - 20
BRS 245RR	OGM	70 - 80	13,3	106 - 122	16 - 22
BRS 246RR	OGM	77 - 97	13,9	122 - 146	12 - 18
BRS 294RR	OGM	65 - 92	17,2	120 - 134	10 - 18
BRS 295RR	OGM	70 - 95	14,1	110 - 126	12 - 20
BRS 316RR	OGM	76 - 107	15,7	112 - 128	12 - 20
BRS 334RR	OGM	73 - 105	15,1	105 - 118	16 - 22

Fonte: EMBRAPA (2014)

Com a escalada cada vez mais intensa do consumo de soja, a modificação genética tem sido umas das técnicas mais utilizadas para aumentar a produtividade, inclusive no Brasil, o qual é o segundo maior produtor desta cultura. Desta forma a soja atualmente se apresenta como soja transgênica e não transgênica (Arruda et al., 2013). Os organismos que receberam artificialmente um ou mais genes, são chamados de organismos geneticamente modificados (OGM) ou soja transgênica. A tecnologia de modificação genética também é aplicada para melhorar as características das culturas, tais como a resistência a herbicidas, pragas e doenças e ainda melhorar o amadurecimento e o sabor. Em muitos países foram

regulamentados os níveis de limites para rotulagem devido à presença de OGM em produtos alimentares (Xiao et al., 2012).

A primeira fábrica a produzir alimentos transgênicos foi uma planta da companhia Monsanto instalada no Canadá e atualmente os principais países produtores de alimentos transgênicos são os Estados Unidos, o Brasil, a Argentina, a Índia e o Canadá (Özgen et al., 2005). A partir da década de 90 tem crescido o número de plantas modificadas geneticamente no mundo. Em 1999 a soja transgênica foi plantada em 53 % da área destinada à soja, em 2000 em 63 % e em 2001 em 68 % (Greiner et al., 2005). No Brasil a previsão para safra 2013/2014 é de que 80 % da produção de soja no país seja geneticamente modificada (CONAB, 2012). A Tabela 2.2 exibe as produções no Brasil das sojas N-OGM e OGM e também a produção do Mix de soja, definido com uma mistura de soja N-OGM com a OGM.

Tabela 2.2. Produção brasileira de soja OGM, N-OGM e Mix em milhões de toneladas.

Período	OGM	N-OGM	Mix Soja
Safra 2010/2011	52,1	13,3	9,0
Safra 2011/2012	46,2	13,5	6,7
Previsão Safra 2012/2013	65,3	13,2	4,4
Previsão Safra 2013/2014	69,8	14,2	4,0

Fonte: CONAB (2014)

O desempenho da soja por hectare pode oscilar de acordo com o clima, a variedade e a localização. Por exemplo, na safra de 2012/2013 o rendimento mundial foi de 2464 kg por hectare plantado, nos Estados Unidos da América foi de 2679 kg por hectare plantado (USDA, 2014), enquanto que no Brasil foi de 2939 kg por hectare plantado (CONAB, 2013). A Tabela 2.3 demonstra a produção de soja no mundo na safra de 2012/2013, onde podemos observar que os Estados Unidos,

Brasil e a Argentina são os maiores produtores. Em relação a quantidade de soja exportada o Brasil fica em primeiro lugar enquanto que os Estados Unidos ocupa a segunda posição.

Tabela 2.3. Valores de produção e importação de soja no Brasil e no mundo em milhões de toneladas na safra de 2012/2013.

País	Produção	Exportação
Estados Unidos	82,6	35,9
Brasil	82,0	41,9
Argentina	49,3	7,7
China	13,1	0,27
Outros	40,5	13,8
Total no Mundo	267,5	99,6

Fonte: USDA (2014)

## 2.2 PLANTAS INDUSTRIAIS E TECNOLOGIAS DE PROCESSAMENTO DE SOJA

A soja é processada comercialmente com o intuito de se obter principalmente o óleo, a farinha de soja, o concentrado protéico (CPS), e o isolado protéico de soja (IPS) (Wang et al., 1998).

O óleo de soja é produzido comercialmente a partir do grão previamente desidratado a uma umidade entre 9 e 10 %. Nestas condições, a matéria-prima passa inicialmente por uma operação de remoção da casca, e em seguida por uma etapa de aquecimento com posterior laminação, onde o grão adquire o formato de uma lâmina com espessura de aproximadamente 0,25 mm, o que favorece a posterior extração do óleo (Clark et al., 1994; Gunstone, 1983).

A extração classicamente ocorre com hexano, cujo consumo médio industrial é da ordem de 0,2 a 2 litros por tonelada de grão de soja processado. Embora este solvente apresente boa miscibilidade no óleo (Rodrigues et al., 2010), devido a sua baixa temperatura de autoignição, inúmeros acidentes catastróficos foram

registrados em plantas de extração de óleo de soja. Neste sentido, a fim de reduzir os riscos inerentes a operação de extração com hexano, estudos com solventes alternativos têm sido propostos (ex., Johnson, 1983; Hancock, 1990). De qualquer forma, a remoção do óleo essencialmente envolve a penetração do solvente na matriz sólida, solubilização do óleo no hexano e difusão da solução rica em óleo para a interface sólido-líquido, onde a miscela é transferida para o seio da fase líquida por convecção (Johnson et al., 1983).

A miscela obtida por extração é submetida à destilação sob elevadas temperaturas e baixas pressões a fim de separar o óleo do solvente. O solvente é bombeado para um sistema de condensadores onde é recuperado e retorna para o processo de extração. O óleo bruto é direcionado a uma etapa de degomagem com o intuito de reduzir o conteúdo de fosfolípidos, de 2 a 3 % para valores 80 a 95 % inferiores. Visto que os fosfolípidos apresentam elevada afinidade com água, a operação de degomagem consiste basicamente em acrescentar-se água ao óleo bruto aquecido, na proporção de 1 a 3 % de água no óleo, mantendo a suspensão sob agitação por 20 a 30 minutos. A dispersão resultante é centrifugada obtendo o óleo de soja e o precipitado composto de fosfolípidos hidratados. O óleo de soja degomado pode ser destinado ao consumo animal ou pode ser utilizado como matéria-prima para a produção do óleo de soja refinado, enquanto que os fosfolípidos hidratados são submetidos à secagem sob vácuo a uma temperatura de 70 a 80 °C gerando a lecitina de soja (List et al., 1990).

A torta resultante da extração é destinada a um dessolventizador/tostador, onde são simultaneamente conduzidas as operações de recuperação do solvente residual e remoção de fatores antinutricionais da soja. Este estágio de tratamento da torta ocorre por aquecimento do material com calor úmido a baixas pressões. Na produção de farelos para aproveitamento humano este calor é mais ameno do que o tratamento térmico para a produção de farelo para consumo animal, pois é necessário manter as propriedades funcionais das proteínas as quais são sensíveis a temperatura (Hancock et al., 1990).

Os flocos de soja desengordurados (FSD) provenientes do dessolventizador/tostador são submetidos a secagem, moagem e classificação granulométrica para obtenção da farinha de soja desengordurada. A farinha é aproximadamente composta de 54,5 % de proteína, 1,0 % de lipídeos, 6,5 % de

cinzas e 39,0 % de carboidratos (b.s.) (Lin, et al., 1990). A Figura 2.1 demonstra o fluxograma de produção comercial de óleo, farelo (ou farinha desengordurada) e lecitina de soja.

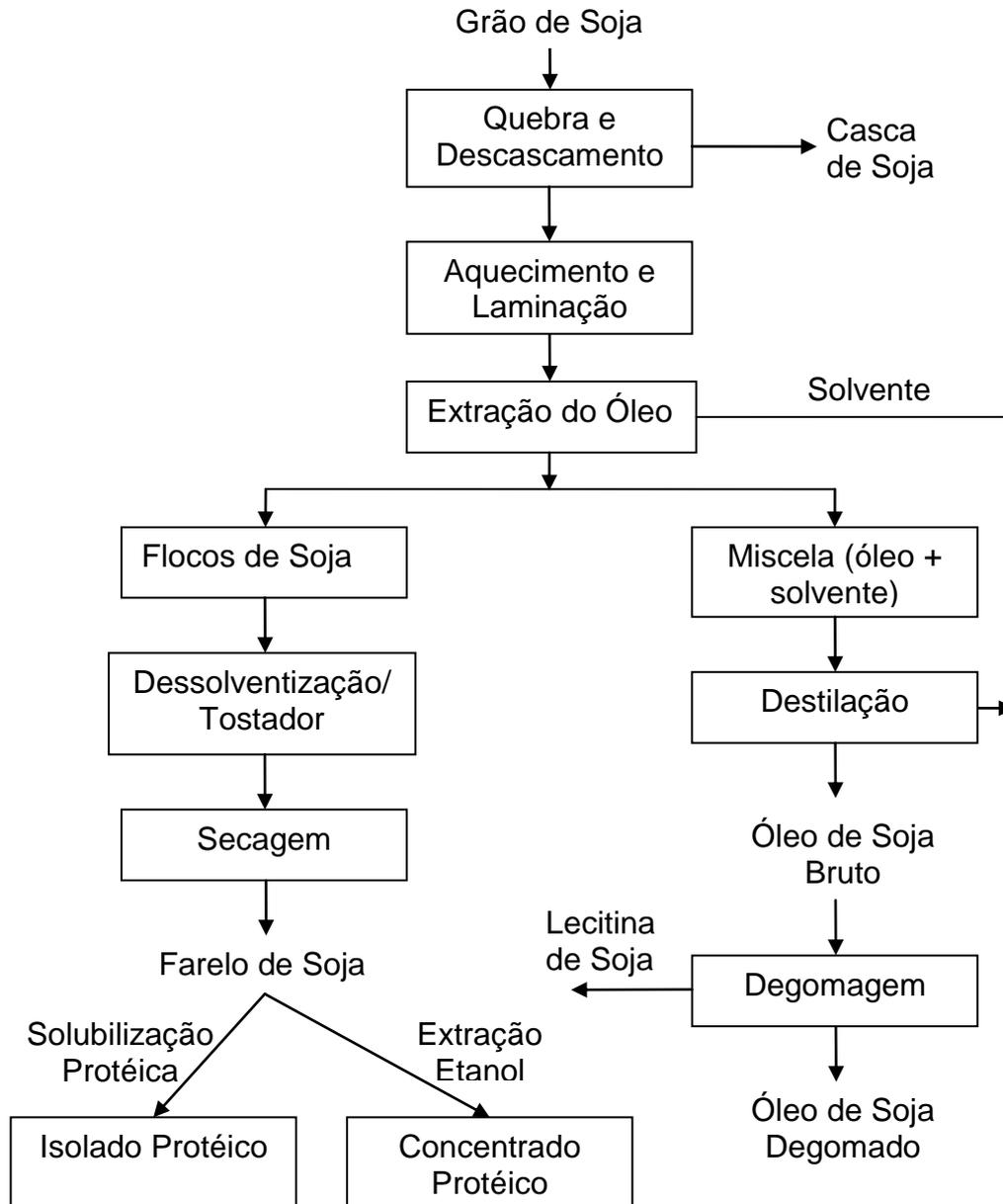


Figura 2.1. Fluxograma típico de produção comercial de óleo, farelo (ou farinha de soja desengordurada) e lecitina de soja.

O concentrado protéico de soja também é considerado um dos importantes produtos proveniente da soja. O processo de produção convencional consiste fundamentalmente em diluir a farinha de soja desengordurada em água quente ou

etanol a um pH de aproximadamente 4,5 para remoção dos carboidratos solúveis. Após este estágio a suspensão é centrifugada e o sólido obtido é o CPS com o teor de proteína entre 40 e 70% (Clark et al., 1994). A composição química média do concentrado protéico de soja é apresentada na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 Composição química do concentrado protéico de soja em base úmida.

Características	Composição (%)
proteína (N×6,25)	70 - 72,2
lipídeos	0,3 - 2,0
umidade	2,6 - 8,0
cinzas	3,0 - 5,8
fibras	2,9 – 5,0
minerais	1,0 – 5,0

Fonte: Mattil et al. (1974)

### 2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA

O IPS é a forma mais concentrada de produtos de proteínas de soja disponível atualmente no mercado, sendo que em base seca o teor de proteína é superior a 90 %. A proteína isolada de soja tem sido amplamente utilizada na indústria, principalmente devido as suas propriedades funcionais altamente nutritivas e desejáveis, tais como, a formação de espuma, formação de gel e retenção de água e de gordura (Mattil, 1974; Wang et al., 1998; Deak et al., 2007; Li et al., 2012).

As condições do processo produtivo de IPS e os equipamentos utilizados em escala industrial podem diferir de planta para planta. No entanto, o procedimento geralmente reportado na literatura e utilizado nas indústrias compreende basicamente em uma etapa de extração da proteína em meio aquoso levemente alcalino com o objetivo de separar fibras (carboidratos insolúveis), seguido de um estágio de precipitação da proteína em meio aquoso ácido para remover os carboidratos solúveis (Wang et al., 1998; Huang et al., 2012), conforme apresentado

na Figura 2.2. Finalmente é realizada a neutralização da massa protéica para posterior secagem em spray drying.

Os principais fatores que interferem no rendimento de proteína em um processo de isolado protéico são a temperatura, o pH, a força iônica, o tempo de residência nas etapas de solubilização e coagulação e a concentração de proteína (Wagner et al., 2000). Os valores típicos destas variáveis em operações industriais de produção de IPS serão explicitados na seqüência desta dissertação.

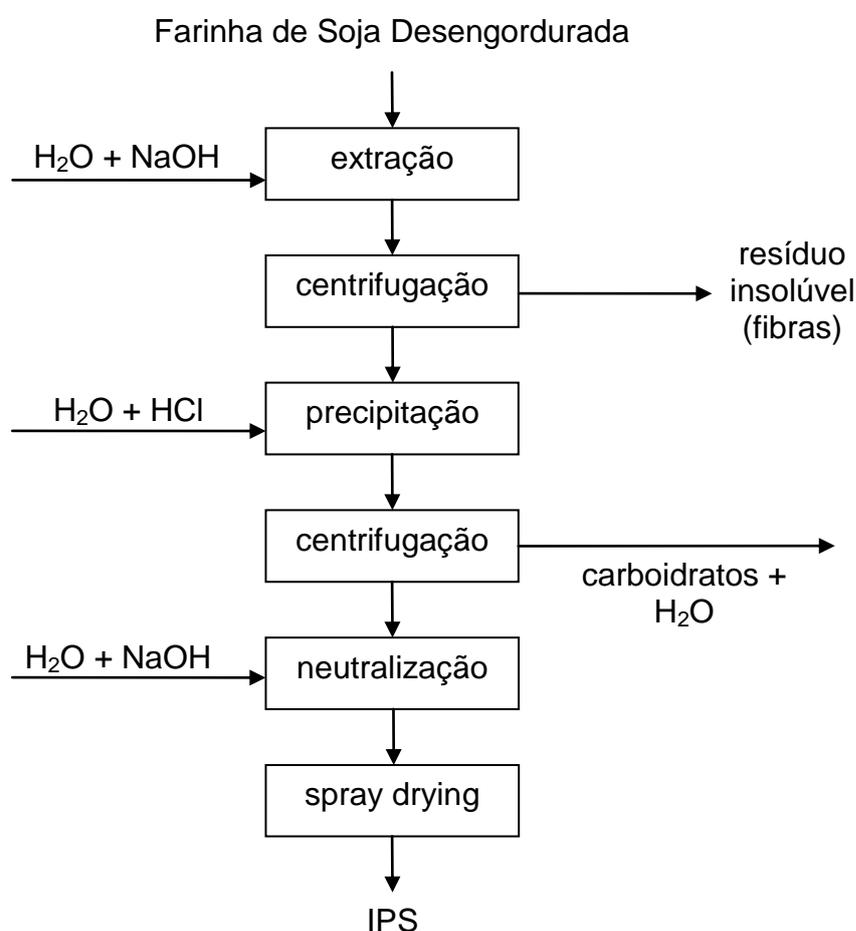


Figura 2.2. Fluxograma típico de produção industrial de isolado protéico de soja.

A produção de IPS inicia-se com a diluição da matéria-prima, freqüentemente a uma razão água para farinha desengordurada da ordem de 10:1 a 20:1, seguida de correção do pH com solução de NaOH a 2 N de modo a manter a suspensão alcalina (Wagner et al., 2000; Deak et al., 2007). Nestas circunstâncias a maioria das

proteínas e uma fração significativa dos açúcares tendem a solubilizar-se, enquanto que os demais carboidratos precipitam. Este estágio do processo, denominado de extração das proteínas, ocorre a temperaturas de 20 a 80 °C por um tempo superior a 1800 s em pH 8,5 (Deak et al., 2007). De acordo com Wagner et al. (2000) a extração deve ocorrer em pH 8 durante um intervalo de 3600 a 7200 s.

A suspensão resultante da etapa de extração de proteínas é direcionada para centrifugação. O sobrenadante resultante da centrifugação rico em proteínas e carboidratos solúveis é direcionado para a fase de precipitação, enquanto que as fibras são descartadas do processo (Deak et al., 2007). A precipitação ocorre sob agitação por 1800 s, com a suspensão próxima ao ponto isoelétrico da proteína de soja (pH≈4,5) por adição de solução de ácido clorídrico 2 N. Um ulterior estágio de centrifugação separa o sobrenadante contendo os carboidratos do resíduo sólido concentrado em proteínas (Wagner et al., 2000; Mauri et al., 2006; Deak et al., 2007; Huang et al., 2012; Yuan et al., 2012).

Com o intuito de aumentar a preservação do isolado protéico, as proteínas são novamente dissolvidas em água com posterior ajuste do pH entre 7 e 8 utilizando solução alcalina de NaOH a uma concentração aproximada de 0,5 N (Wagner et al., 2000). A solução de proteína de soja neutralizada é tipicamente submetida a secagem por atomização, que consiste na criação de gotículas colocadas em contato com uma corrente de ar quente e seco. A fim de tornar a operação de secagem mais econômica, o material é em geral tratado em uma etapa preliminar de concentração por evaporação. A massa seca de IPS com composição próxima a evidenciada na Tabela 2.5 é resfriada, embalada e destinada a comercialização.

Tabela 2.5 Intervalos da composição analítica da proteína isolada de soja em base úmida.

Características	Percentual (%)
proteína total (N x 6,25)	90,0 – 97,7
lipídeos	0,2 – 1,2
umidade	3,9 – 7,0

Continuação da Tabela 2.5.

cinzas	2,5 – 4,5
fibra	0,01 – 0,2
minerais	1,4 – 3,8
carboidratos	0,3 – 0,35

Fonte: Mattil et al. (1974)

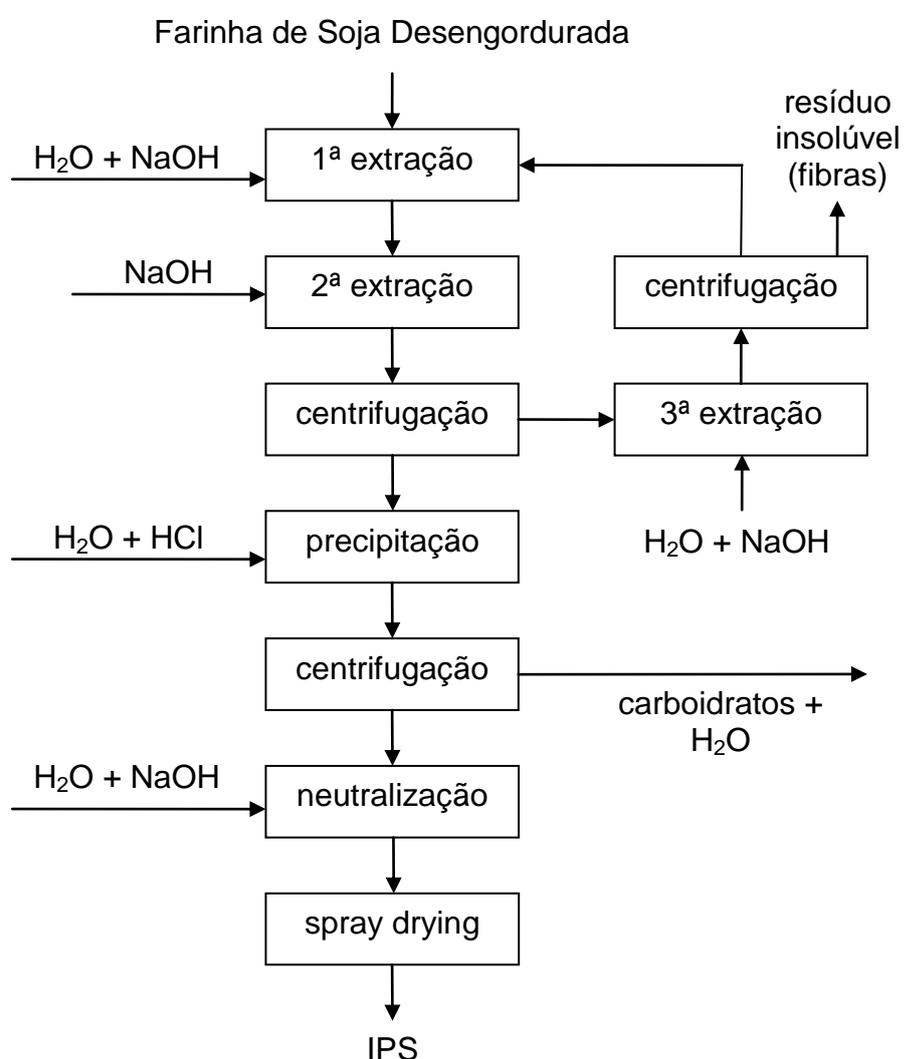


Figura 2.3. Fluxograma da planta industrial de isolado protéico de soja investigada.

A Figura 2.3 apresenta o fluxograma de produção de IPS na planta investigada neste estudo. Observa-se que o processo é semelhante ao usualmente reportado na literatura e utilizado pelas demais indústrias do gênero. De qualquer forma, algumas particularidades da operação de obtenção de IPS serão relatadas resumidamente. Por exemplo: *i*) a diluição ocorre na razão de 16,5:1 de água para FSD; *ii*) a extração acontece a 50 °C em pH alcalino corrigido com NaOH 3,5 % (w/w) e envolve três estágios (1º: pH=7,1-7,6, tempo de operação=960 s; 2º: pH=8-8,6, tempo de operação=1320 s, 3º: somente com o resíduo sólido da centrifugação da suspensão da segunda extração, pH=9-9,3, tempo de operação=2300 s); *iii*) a precipitação de carboidratos insolúveis do sobrenadante da segunda extração ocorre a 50 °C por 660 s em pH 4,55 obtido com solução de HCl 3,5 % (w/w).

## 2.4 PROTEÍNAS DA SOJA

As proteínas são polímeros complexos compostos por 21 aminoácidos ligados entre si por meio de ligações amidas substituídas. Os polímeros protéicos apresentam elevada complexidade em termos estruturais e de acordo com sua constituição organizacional podem ser classificados em proteínas globulares ou em proteínas fibrosas (Mariani et al., 2009; Damodaran et al., 2010). As proteínas globulares são aquelas que se apresentam em forma esférica ou elipsoidal enquanto que as fibrosas tem formato de bastonete. As proteínas também podem ser classificadas de acordo com suas funções biológicas em hormônios, anticorpos, proteínas contráteis, transportadoras, de armazenamentos, protetoras e alimentares. As proteínas alimentares são aquelas que auxiliam a digestão, são atóxicas e manifestam funcionalidades nos produtos alimentícios (Lakemond et al., 2000; Damodaran et al., 2010).

As proteínas da soja são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, pois exprimem valiosas propriedades funcionais e nutricionais de extrema importância para as indústrias químicas e de alimentos. Estas características se devem primordialmente ao conteúdo e a qualidade das proteínas e ao perfil de aminoácidos presentes (Lakemond et al., 2000; Zhang et al., 2014), o qual apresenta os nove aminoácidos essenciais para o ser humano (Añón et al., 2011). A Tabela 2.6

apresenta a composição dos aminoácidos polares e não polares contidos nas proteínas de soja.

Tabela 2.6 Composição dos aminoácidos presente na proteína de soja

Aminoácidos	mg/g de proteína	Aminoácidos	mg/g de proteína
Arginina	71,0	Metionina	12,0
Aspartato	107,0	Fenilalanina	48,0
Cisteína	12,0	Prolina	47,0
Glutamato	18,0	Serina	5,0
Glicine	37,0	Treonina	32,0
Histidina	24,0	Triptofano	9,0
Isoleucina	38,0	Tirosina	36,0
Leucina	69,0	Valina	4,0
Lisina	57,0	-	-

Fonte: Mariani et al. (2009)

A  $\beta$ -conglucina (7S Globulina) e a glicina (11S Globulina) somadas representam entre 70 e 80% das proteínas contidas na soja (Sze-Tao et al., 2001; Renkema et al., 2002; Tandang et al., 2005; Lee et al., 2011; Yuan et al., 2012). A primeira corresponde a 20-35 % da massa de proteína (Renkema et al., 2000), enquanto que a segunda aproximadamente 25-35 % (Renkema et al., 2000; Lakemond et al., 2000).

A  $\beta$ -conglucina (7S globulina) é uma glicoproteína trimétrica composta pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$  e  $\beta$  com massa molecular de 68, 72 e 52 kDa, respectivamente (Añón et al., 2011; Yuan et al., 2012). A glicina (11S Globulina) é formada por um polipeptídico ácido e um básico, com massas moleculares de 38 e 20 kDa, respectivamente (Renkema et al., 2002; Añón et al., 2011; Yuan et al., 2012).

As propriedades físico-químicas das proteínas conferem atributos sensoriais como textura, cor, sabor e aparência aos alimentos (Lakemond et al., 2000; Zhang et

al., 2014), bem como funcionalidades importantes para a indústria tais como: formação de espumas e emulsões estáveis; capacidade de reduzir a tensão interfacial por adsorção de uma interface; e a capacidade de formar filmes com elevada resistência a ruptura devido à alta viscoelasticidade (Mitidieri et al., 2002; Zhang et al., 2014). Entretanto, estas propriedades superficiais das proteínas dependem de fatores intrínsecos a proteína (flexibilidade de conformação molecular, hidrofobicidade, tamanho molecular e seqüência de aminoácidos), e a solução onde as mesmas encontram-se (pH e força iônica) (Turgeon et al., 1992).

## 2.5 DESNATURAÇÃO DE PROTEÍNAS

Sabe-se que a estrutura nativa das proteínas é caracterizada por um estado termodinamicamente estável com baixa energia livre e equilíbrio entre interações atrativas e repulsivas. O fenômeno da desnaturação ocorre quando por meio de um agente desnaturante (ex.: pH, temperatura, pressão, força iônica e composição de solvente) (Harano et al., 2008; Vajpai et al., 2012) a estrutura nativa dobrada da proteína se transforma em uma configuração mal definida e desordenada sob condições não fisiológicas.

As proteínas globulares podem passar por três fases estruturais: *i*) o estado nativo com estrutura da proteína dobrada; *ii*) o estado desnaturado com configuração desdobrada; *iii*) o estado de transformação ou de adaptabilidade, no qual a proteína se encontra parcialmente dobrada (Hawley et al., 1975). As estruturas das proteínas globulares monoméricas após sofrerem desnaturação podem retornar ao seu estado nativo, ou seja, a desnaturação pode ser reversível desde que a proteína tenha condições de solução apropriada para retornar a sua estrutura original (Hawley et al., 1975).

As proteínas podem ter suas propriedades alteradas ou perdidas quando desnaturadas. Em particular, as proteínas de soja podem ter sua solubilidade alterada e podem apresentar redução da capacidade de emulsificação e de formação de espuma, o que é indesejável em uma gama de processos que necessitam destas funcionalidades (ex.; indústrias de bebidas protéicas, onde a desnaturação provoca a precipitação das proteínas). Entretanto, a desnaturação não deve ser invariavelmente associada a aspectos negativos. Por exemplo, na

produção de proteína de soja destinada ao consumo animal a desnaturação é desejável, uma vez que reduz a atividade de fatores antinutricionais, melhorando a digestibilidade das proteínas (Ortiza et al., 2002; Damodaran et al., 2010). A desnaturação por pressão na produção de alimentos é outra situação em que a desnaturação em geral ocorre de forma intencional com o propósito de aumentar a conservação dos produtos processados (Añón et al., 2011).

A desnaturação pelo calor ocorre devido à transferência de resíduos não polares a partir da água presente no interior das moléculas de proteínas (Harano et al., 2006). A temperatura aparente de desnaturação das proteínas de soja é fortemente influenciada pela força iônica e pelo pH do meio em que se encontram (Lakemond et al., 2000; Renkema et al., 2002), porém estima-se que para as duas proteínas mais importantes contidas na soja esta temperatura seja da ordem de 80 a 95 °C (glicinina - 11S) e 60 a 75 °C ( $\beta$ -conglucina - 7S) (Renkema et al., 2002; Liu et al., 2004; Jiang et al. 2010).

Como mencionado, o pH do meio onde a proteína se encontra tem efeito sobre a desnaturação da proteína. Em seu ponto isoelétrico a proteína encontra-se mais estável, o que dificulta a desnaturação protéica. Em pH neutro, devido a pequena carga líquida, as proteínas também tendem a ficar estáveis, porém em pHs extremos a alta carga líquida provoca a expansão e desdobramento de suas moléculas tornando-as mais susceptíveis a desnaturação protéica. As proteínas de soja em geral se desnaturam em pHs inferiores a 1 e superiores a 12, devido à fortes forças repulsivas altamente positivas e negativas, respectivamente (Mauri et al., 2006).

A desnaturação das proteínas também pode ocorrer devido à presença de solventes orgânicos, como álcoois e grupos peptídicos que se ligam diretamente nos resíduos hidrofóbicos das proteínas (Herberhold et al., 2004), bem como devido a pressão. A desnaturação por pressão ocorre devido à transferência de água para o núcleo hidrofóbico da proteína (Harano et al., 2006), onde a mesma ocupa as cavidades das moléculas provocando a quebra de estrutura e por conseqüência a desnaturação da proteína (Hummer et al, 1997). De acordo com a literatura, as proteínas sofrem desnaturação em pressões entre 400 e 1000 MPa (Hayakawa et al., 1996).

## 2.6 SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS

A solubilidade é uma propriedade definida pelas interações proteína-proteína e proteína-solvente. Estas interligações podem ser de naturezas hidrofóbicas e iônicas, sendo que a primeira provoca reações proteína-proteína, enquanto que a segunda provoca interações proteína-solvente (Pelegriane et al., 2005; Damodaran et al., 2010). Os parâmetros mais utilizados para avaliar a solubilidade de proteínas são o índice de solubilidade de nitrogênio (NSI) e o índice de dispersibilidade de proteína (PDI) (Lah et al., 1980).

Devido ao elevado crescimento da demanda por proteínas de soja para utilização como ingredientes de alimentos, tornou-se muito importante o estudo das propriedades destas proteínas, dentre as quais a solubilidade se destaca por ter efeito sobre as demais. De forma geral quanto maior for a solubilidade melhor serão propriedades funcionais como a formação de emulsão, espuma e geleificação (Abtahi et al., 1997; Lah et al., 1980; Lee et al., 2003; Pelegriane et al., 2005; Tandang et al., 2005).

As condições das soluções nas quais as proteínas se encontram influenciam diretamente no perfil de solubilidade. Entre os fatores de maior efeito estão a temperatura, o pH e a força iônica (Lee et al., 2003; Pelegriane et al., 2005; Jiang et al., 2010).

A solubilidade mínima ( $\approx 6\%$ ) e máxima ( $\approx 90\%$ ) de ambas as proteínas 7S e 11S ocorre em pH 4–5 e 6–8, respectivamente (Jiang et al., 2010). Em solução aquosa com pH diferente do isoeletrico (no caso da soja  $\approx 4,5$ ) as proteínas apresentam-se no estado solúvel pois ocorre repulsão eletrostática e a hidratação dos resíduos. Para a maioria das proteínas a curva de solubilidade em função do pH apresenta uma forma em U (Pelegriane et al., 2005; Damodaran et al., 2010) com solubilidade mínima no ponto isoeletrico (Mauri et al., 2006; Huang et al., 2012). Neste pH a interação proteína-proteína aumenta pois a carga líquida da proteína está nula (i.e.: as forças eletrostáticas das moléculas estão em um mínimo) e por consequência menos moléculas de água interagem com as moléculas de proteínas. Este fenômeno promove uma aproximação das moléculas de proteína com posterior precipitação das mesmas (Pelegriane et al., 2005; Damodaran et al., 2010).

O perfil de solubilidade *versus* pH sofre alterações se a proteína sofrer desnaturação pelo calor, pois com a desnaturação ocorre um desdobramento da estrutura da proteína, causado pelo aumento da hidrofobicidade da superfície protéica, o que provoca alteração do equilíbrio das interações proteína–proteína e proteína–solvente (Damodaran et al., 2010).

A temperatura é um fator que influencia significativamente a solubilidade das proteínas. Em geral a solubilidade aumenta com o incremento da temperatura para a faixa entre 40 e 50 °C, porém em temperaturas elevadas as proteínas tendem a desnaturar-se o que provoca a redução de solubilidade (Pelegri et al., 2005; Damodaran et al., 2010). De qualquer forma, a título de informação é interessante mencionar que quando comparadas com proteínas de origem animal, as proteínas de soja são consideradas estáveis ao calor (Lee et al., 2003).

Um fator adicional que influencia sobremaneira a solubilidade é a força iônica. As soluções com baixa força iônica (<0,5) têm seus íons neutralizados na superfície das proteínas, desta forma a solubilidade aumenta para as proteínas que apresentam trechos não polares e diminui para as que não apresentam. Em soluções com forças iônicas >1, a presença dos sais sulfatos e fluoretos diminuem a solubilidade, enquanto que a dos sais brometo, iodeto, tiocianatos e percloratos provocam um aumento da mesma (Lee et al., 2003; Damodaran et al., 2010).

## 2.7 MODELAGEM DE PROCESSOS POR REDES NEURONAIIS ARTIFICIAIS

O histórico do desenvolvimento deste tipo de abordagem é extensivamente reportado na literatura e não será repetido nesta dissertação. Entretanto, cabe citar algumas referências, como por exemplo Meleiro (2002), o qual apresenta um resumo da evolução do método, Anderson e Rosenfeld (1988), os quais agruparam artigos que tratam da construção de modelos neuronais em um único documento, e Haykin (1999) que é considerado uma referência clássica e básica sobre o assunto.

Ainda que muitos adeptos deste tipo de método de modelagem enfatizem que sua concepção tenha origem em uma analogia com a arquitetura do cérebro humano, em termos matemáticos a capacidade de predição do modelo aparentemente não apresenta a alegada sofisticação, pois essencialmente pode ser atribuída ao grande número de parâmetros envolvidos, como classicamente ocorre

com modelos empíricos mais simples. De qualquer forma é inegável que este tipo de modelo têm apresentado ampla e progressiva utilização para representar processos industriais altamente não lineares, os quais geralmente ocorrem em plantas com sistemas informatizados de aquisição de dados, o que gera os extensos conjuntos de informações freqüentemente requeridos para treinamento da rede (ex.; Gonzaga et al., 2009). De fato, é devido a estas particularidades que um modelo de redes neuronais será posteriormente proposto para representação dos dados de rendimento de IPS na planta industrial investigada.

Na etapa de desenvolvimento do modelo de redes neuronais que será proposto nesta dissertação, uma estrutura de redes neuronais artificiais *feedforward* do tipo *perceptron* multicamadas com uma única camada de neurônios intermediária será sempre empregada. Neste sentido, a Figura 2.4 apresenta um esquema de rede para este tipo particular de arquitetura, onde duas entradas ( $\varphi_1$  e  $\varphi_2$  são variáveis independentes) e uma saída (variável dependente ou resposta  $R$ ) são consideradas.

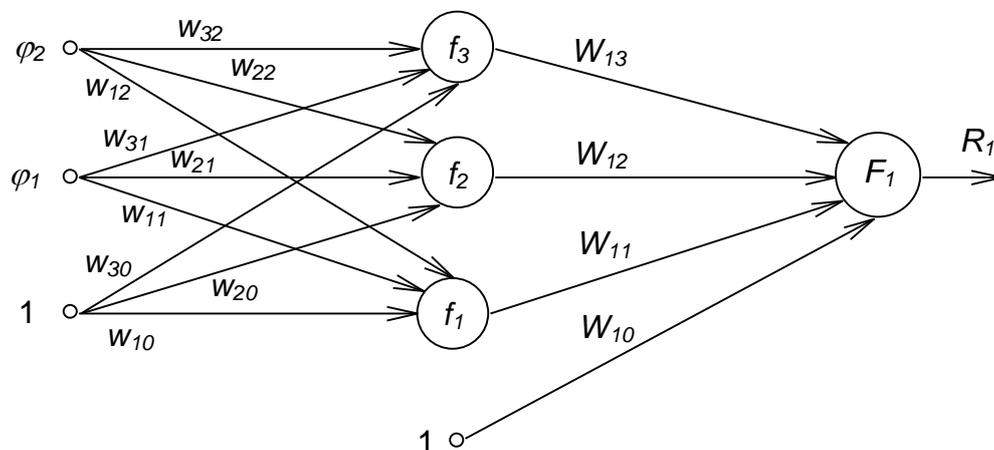


Figura 2.4. Rede perceptron multicamada do tipo feedforward com duas entradas, uma camada intermediária ou camada escondida, e uma saída. Adaptada de Gonzaga (2003).

A saída da rede, ou a expressão algébrica que representa o modelo neuronal referente a arquitetura reportada na Figura 2.4, é dada pela Equação (2.1), onde  $f_i$  são as funções de ativação para os neurônios da camada interna (geralmente uma

função do tipo tangente hiperbólica),  $F_1$  é a função de ativação para os neurônios da camada de saída (geralmente uma função linear), enquanto que  $w_{ij}$  e  $W_{1j}$  para  $j$  diferente de zero são os pesos, e para  $j$  igual a zero são os biases.

$$R_1 = F_1 \left[ \sum_{i=1}^3 W_{1i} f_i \left( \sum_{j=1}^2 w_{ij} \phi_j + w_{i0} \right) + W_{10} \right] \quad (2.1)$$

Da Figura 2.4 observa-se que o modelo em questão, com duas entradas e uma saída apresenta  $4n+1$  parâmetros ( $n$  é o número de neurônios da única camada escondida). Os parâmetros são estimados aplicando-se um procedimento de ajuste (método de otimização) que neste tipo de modelo é denominado etapa de treinamento da rede. Detalhes dos tipos de funções de ativação, algoritmo de aprendizado ou treinamento frequentemente utilizados em redes MLP podem ser obtidos na literatura (ex.: Haykin, 1999; Gonzaga, 2003).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

A matéria-prima básica para o desenvolvimento dos ensaios experimentais foram flocos de soja obtidos após a operação industrial de extração do óleo. A fim de se dispor de uma amostra representativa do processo, o procedimento de amostragem consistiu em coletar pequenas quantidades de flocos desengordurados a cada duas horas de processamento ao longo de seis semanas. As amostras foram então homogeneizadas, o que resultou em uma massa de aproximadamente 15 kg de flocos desengordurados de soja a ser processada em laboratório com o propósito de simular as etapas industriais de produção de isolado protéico.

#### 3.2 EXPERIMENTOS EM LABORATÓRIO PARA OBTENÇÃO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA

Os flocos desengordurados retirados da saída do extrator de óleo continham em média 40 % de hexano, pois assim como ocorre na maioria das indústrias de processamento de soja, a extração de óleo na planta investigada envolvia a utilização de solvente orgânico. Por tratar-se de uma substância tóxica, as indústrias invariavelmente conduzem uma etapa de remoção de hexano, que devido a alta volatilidade do solvente, consiste essencialmente em submeter os flocos a aquecimento em um equipamento chamado de dessolventizador.

Com o intuito de simular esta etapa de dessolventização, a amostra de flocos de soja desengordurada foi dividida em 5 partes iguais, cada uma com 0,8 kg, o que foi feito com auxílio de uma balança semi analítica (Filizola, modelo MF-3, São Paulo, resolução  $1 \times 10^{-4}$  kg). As amostras identificadas como *A*, *B*, *C*, *D* e *E* foram dispostas em cinco diferentes bandejas de alumínio de maneira a formar finos e uniformes leitos de material. As bandejas foram então submetidas individualmente a aquecimento em estufa com controle on/off de temperatura e sem recirculação de ar (Fabber Primar, modelo 219, São Paulo - Brasil). Assim como ocorre na planta, assumiu-se uma temperatura inicial constante de 55 °C, enquanto que a temperatura final a que cada amostra foi submetida variou de 55 a 75 °C com passo de 5 °C,

como indicado na Tabela 3.1. Uma rampa linear de aquecimento foi sempre adotada. Também em todos os casos, o material permaneceu na câmara de aquecimento por 3600 s, período que corresponde aproximadamente ao tempo de residência médio na etapa de dessolventização da indústria.

Tabela 3.1. Condição de aquecimento durante os ensaios de dessolventização das amostras A à E.

$t$ (s)	$T$ p/ amostra A (°C)	$T$ p/ amostra B (°C)	$T$ p/ amostra C (°C)	$T$ p/ amostra D (°C)	$T$ p/ amostra E (°C)
3600	55,0	60,0	65,0	70,0	75,0

Após a dessolventização os flocos de soja desengordurados apresentavam aproximadamente 10,1 % de umidade, 48,8 % de proteína total e 93,6 % de solubilidade protéica em KOH. Estes flocos foram então moídos em moinho refrigerado de bancada a 6000 rpm (Marconi, Rotor MA 090 CFT, São Paulo - Brasil) de modo a obter uma farinha de soja desengordurada com tamanho de partículas inferior a 120 mesh. Cada uma das cinco amostras de farinha de soja desengordurada submetida aos ensaios experimentais de dessolventização foi tratada de acordo com o esquema apresentado na Figura 3.1.

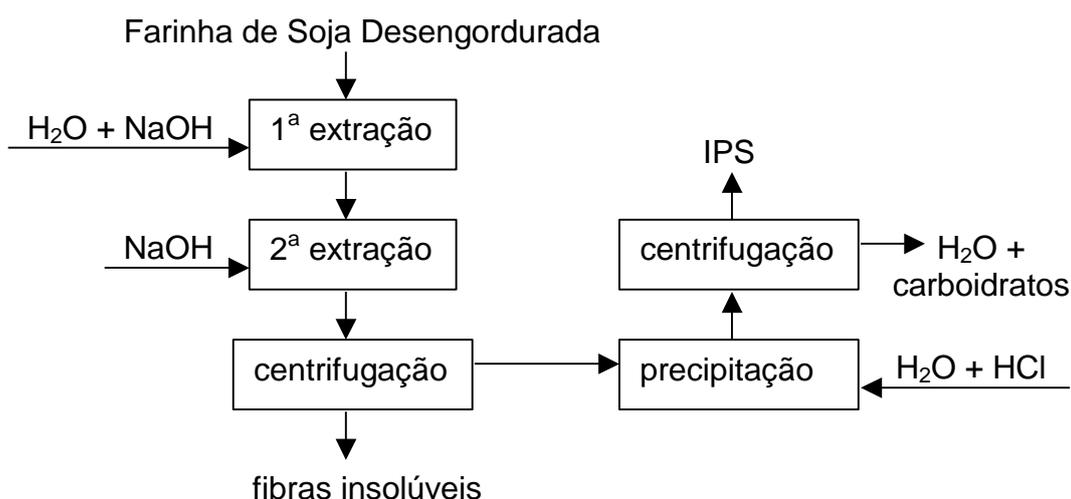


Figura 3.1. Fluxograma de obtenção de IPS em laboratório.

Este esquema foi sugerido por Wang et al. (1998) com adaptações para as condições do presente processo industrial e para as condições do planejamento de experimentos, o qual essencialmente envolvia a repetição do tratamento indicado na Figura 3.1 em diferentes pH do primeiro tanque de solubilização. A Tabela 3.2 resume as condições de processamento dos FSD em laboratório para obtenção de IPS.

Tabela 3.2. Planejamento de experimentos para produção de IPS em laboratório.

Amostra	$T$ (°C)	$pH_1$
A	55	6,8
A	55	7,0
A	55	7,2
A	55	7,4
A	55	7,6
B	60	6,8
B	60	7,0
B	60	7,2
B	60	7,4
B	60	7,6
C	65	6,8
C	65	7,0
C	65	7,2
C	65	7,4
C	65	7,6
D	70	6,8
D	70	7,0
D	70	7,2
D	70	7,4
D	70	7,6
E	75	6,8
E	75	7,0
E	75	7,2

Continuação da Tabela 3.2

Amostra	$T$ (°C)	$pH_1$
<i>E</i>	75	7,4
<i>E</i>	75	7,6

Para cada uma das condições reportadas na Tabela 3.2 foram produzidas suspensões de 0,06 kg (Bel Equipamentos, modelo Mark 210A, São Paulo, resolução  $1 \times 10^{-7}$  kg) de amostra de farinha desengordurada em 1 L de água destilada. O pH das suspensões foi ajustado com pHmetro de bancada (Quimis, modelo Q400A, São Paulo) para os valores desejados (conforme especificado na Tabela 3.2) utilizando solução de NaOH 3,5 % (w/w) (CSM Produtos Químicos, Santa Catarina) a fim de solubilizar parcialmente as proteínas. A solução foi mantida sob agitação (Agitador IKA, modelo RW 20.n, São Paulo) por 960 s a 50 °C em banho com controle de temperatura (Quimis, modelo Q226M, São Paulo). A fim de simular a 2<sup>a</sup> extração de proteínas indicada na Figura 3.1 o pH das suspensões foi novamente corrigido para 8,3 e as suspensões foram mantidas sob agitação por ulteriores 1320 s a temperatura constante de 50 °C.

As suspensões resultantes foram centrifugadas a temperatura ambiente por 600 s a 2000 rpm (Nova Técnica, modelo NT 810, São Paulo), enquanto que o resíduo sólido constituído basicamente de fibras foi descartado. Alíquotas de 200 mL de sobrenadante foram diluídas em 85 mL de água destilada a fim de manter o grau de diluição na planta. O pH destas soluções foi reajustado com HCl 3,5 % (w/w) (CSM Produtos Químicos, Santa Catarina) para 4,55 e as mesmas foram mantidas sob constante agitação por 660 s a temperatura de 50 °C envolvendo os mesmos equipamentos citados no parágrafo anterior. Esta operação tinha por propósito simular a etapa industrial de remoção de carboidratos.

As suspensões foram novamente centrifugadas com equipamentos e condições idênticas as anteriormente reportadas. O sobrenadante rico em carboidratos foi descartado, enquanto que o resíduo sólido obtido, constituído basicamente de proteínas, representa o produto de interesse. O percentual de proteína total no IPS e sua solubilidade protéica em KOH foram determinados como descrito nas secções 3.3 e 3.4 desta dissertação, respectivamente.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL E CÁLCULO DE RENDIMENTO

Para a determinação do conteúdo de proteína total na farinha de soja desengordurada e no IPS foi utilizado o método oficial 992.15 da AOAC (AOAC, 1997) e um analisador de proteínas (LECO, modelo FP-2000, Michigan, Estados Unidos). O procedimento consiste em dispor  $2 \times 10^{-3}$  kg de amostra seca em um recipiente cerâmico que deve ser inserido em um forno acoplado ao analisador. Neste forno a amostra é queimada com oxigênio puro e os gases produzidos, contendo óxidos de nitrogênio, são direcionados a um resfriador termo elétrico para eliminar água. Em seguida os gases são armazenados em um recipiente de 4,5 L, de onde uma alíquota de 10 mL é retirada e em uma coluna de absorção os óxidos de nitrogênio são reduzidos a  $N_2$ . O nitrogênio é detectado por uma célula de condutividade térmica sendo possível determinar a quantidade de proteína total na amostra a partir do teor de nitrogênio.

O rendimento de proteína total ( $R$ ) dos ensaios experimentais e da planta de isolado protéico é calculado a partir da massa de proteína obtida no isolado protéico ( $m_{IPS}$ ) dividido pela massa de proteína contida na farinha de soja desengordurada ( $m_{FSD}$ ), conforme mostrado na Equação (3.1).

$$R = \frac{m_{IPS}}{m_{FSD}} \times 100 \quad (3.1)$$

A eficiência do processo de obtenção de isolado protéico ( $E$ ) é obtida conforme mostrado na Equação (3.2), sendo a razão entre o rendimento de proteína do processo de obtenção de isolado protéico ( $R$ ) e a solubilidade protéica em KOH ( $S_{KOH}$ ). Esta última propriedade é determinada conforme procedimento descrito na próxima secção deste capítulo.

$$E = \frac{R}{S_{KOH}} \times 100 \quad (3.2)$$

### 3.4 DETERMINAÇÃO DE SOLUBILIDADE

A solubilidade da proteína total representa a razão entre a massa de proteína no sobrenadante ( $m_{so}$ ) e a massa de proteína na suspensão em análise ( $m_{su}$ ). Sendo assim, a solubilidade  $S$  pode estimada por aplicação direta da Equação (3.3) (Jiang et al., 2010).

$$S = \frac{m_{so}}{m_{su}} \times 100 \quad (3.3)$$

A análise de solubilidade protéica de soja em KOH foi realizada de acordo com metodologia padrão reportada na literatura (Sindirações, 2009). Esta análise consistiu primeiramente em analisar a quantidade de proteína total conforme descrito na secção 3.3 deste estudo. Na seqüência,  $2 \times 10^{-3}$  kg de amostra de farinha desengordurada foram diluídos em 100 mL de solução de KOH 0,036 M. A suspensão resultante foi mantida sob agitação (Agitador Marconi, modelo MA 160 tipo Wagner, São Paulo) por 1200 segundos na velocidade de 30 rotações por minuto. Posteriormente a amostra foi centrifugada por 600 segundos a 1500 rpm (Nova Técnica, modelo NT 810, São Paulo) e o sobrenadante foi cuidadosamente separado em um béquer, utilizando algodão para filtrar as partículas mais finas presentes no sobrenadante. A solubilidade protéica em KOH foi calculada com a Equação (3.4), após a determinação de proteína total no sobrenadante ( $m_{so}$ ) resultante da centrifugação, e da proteína total na amostra inicial ( $m_{FSD}$ ) de acordo com a secção 3.3 deste estudo.

$$S_{KOH} = \frac{m_{so}}{m_{FSD}} \times 100 \quad (3.4)$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente capítulo encontra-se dividido em três secções, as quais reportam os resultados de rendimento de obtenção de isolado protéico determinados na planta em diferentes condições de processamento da FSD, bem como comparações com valores da mesma variável estimados com um modelo estatístico (secção 4.1) e um modelo de redes neuronais artificiais (secção 4.2). Na secção 4.1 também são considerados os efeitos de variáveis de processo sobre o rendimento de IPS. Finalmente, a secção 4.3 apresenta resultados de rendimento de IPS em condições controladas de laboratório através de operações que simulam os estágios de transformação da FSD que ocorrem em escala industrial.

### 4.1 RENDIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO NA PLANTA - MODELO ESTATÍSTICO

A Tabela 4.1 apresenta os valores de rendimento de isolado protéico na planta industrial investigada em função da quantidade residual de óleo nos flocos desengordurados de soja ( $EE$ ), da temperatura ( $T$ ) e tempo de residência ( $\tau$ ) dos flocos no dessolventizador, e dos pH no primeiro ( $pH_1$ ) e segundo ( $pH_2$ ) tanque de solubilização de proteína. Os resultados dos lotes 1 a 30 foram empregados na etapa de desenvolvimento de um modelo estatístico para estimativa de  $R$  nas condições investigadas, enquanto que o conjunto independente de dados dos lotes 31 a 40 foi utilizado para validação do modelo.

Tabela 4.1. Rendimento de isolado protéico de soja em uma planta industrial em diferentes condições de processamento da farinha desengordurada.

Lote	$EE$ (%)	$T$ (°C)	$\tau$ (s)	$pH_1$	$pH_2$	$R$ (%)
1	0,59	64,84	3467	7,61	8,46	79
2	0,77	63,25	3215	7,58	8,50	84,8
3	0,68	64,86	3409	7,56	8,46	81,3
4	0,68	62,62	3539	7,56	8,47	85,5
5	0,62	64,91	3251	7,54	8,39	82,4

Continuação da Tabela 4.1

Lote	EE (%)	T (°C)	$\tau$ (s)	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	R (%)
6	0,6	65,34	3341	7,53	8,49	78,5
7	0,69	65,47	3269	7,46	8,37	76,3
8	0,63	63,34	3186	7,40	8,32	73,3
9	0,59	63,94	3470	7,34	8,23	74
10	0,51	63,74	3485	7,35	8,26	78,2
11	0,55	64,13	3762	7,34	8,25	79,4
12	0,59	62,14	3578	7,39	8,25	78,1
13	0,58	64,11	3488	7,30	8,24	77,7
14	0,75	62,87	3532	7,27	8,26	75,9
15	0,67	62,56	3521	7,32	8,30	74,5
16	0,65	62,89	3766	7,37	8,58	77,8
17	0,7	63,83	3524	7,35	8,34	78,5
18	0,67	63,92	3524	7,34	8,31	74
19	0,68	63,83	3539	7,34	8,26	75,8
20	0,71	63,88	3557	7,32	8,27	78,8
21	0,69	60,55	4144	7,19	8,17	74
22	0,49	61,90	3856	7,13	8,16	73,7
23	0,68	63,97	6008	7,36	8,34	78,6
24	0,87	64,58	4180	7,29	8,26	72
25	0,68	64,43	5180	7,26	8,22	70,5
26	0,79	65,56	5857	7,25	8,25	64,9
27	0,77	64,75	4136	7,24	8,21	57,7
28	0,82	65,40	3863	7,26	8,11	57,3
29	0,98	63,78	4118	7,10	8,07	66,5
30	0,77	64,27	3942	7,13	8,15	67,4
31	0,57	62,00	4255	7,18	8,21	71,5
32	0,65	61,45	4129	7,11	8,1	69,5
33	0,52	62,08	4043	7,23	8,19	74,9
34	0,79	64,36	4176	7,18	8,2	68,1
35	0,63	61,34	4064	7,14	8,15	67,3

Continuação da Tabela 4.1

Lote	EE (%)	T (°C)	$\tau$ (s)	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	R (%)
36	0,63	62,72	3406	7,26	8,26	77,3
37	0,58	60,92	4118	7,16	8,13	73,7
38	0,56	61,34	4993	7,2	8,15	76,1
39	0,67	64,40	4698	7,37	8,36	77,7
40	0,64	62,33	4018	7,15	8,17	74,6

Em geral ocorre na literatura (Barros Neto et al., 1995; Montgomery, 2001; Zanoelo et al., 2004; Zanoelo et al., 2007; Benincá et al., 2012; di Celso et al., 2014) que os modelos de regressão utilizados para análise de efeitos reportam a resposta de interesse em função das variáveis independentes codificadas em uma escala de -1 a +1. Neste sentido, também nesta dissertação o modelo estatístico proposto correlacionará o rendimento das variáveis codificadas e adimensionais definidas pelas Equações (4.1) a (4.5).

$$X_1 = \frac{EE - [(EE_{min} + EE_{max})/2]}{[(EE_{max} - EE_{min})/2]} \quad (4.1)$$

$$X_2 = \frac{T - [(T_{min} + T_{max})/2]}{[(T_{max} - T_{min})/2]} \quad (4.2)$$

$$X_3 = \frac{\tau - [(\tau_{min} + \tau_{max})/2]}{[(\tau_{max} - \tau_{min})/2]} \quad (4.3)$$

$$X_4 = \frac{pH1 - [(pH_{1min} + pH_{1max})/2]}{[(pH_{1max} - pH_{1min})/2]} \quad (4.4)$$

$$X_5 = \frac{pH2 - [(pH_{2min} + pH_{2max})/2]}{[(pH_{2max} - pH_{2min})/2]} \quad (4.5)$$

Os parâmetros do modelo estatístico foram ajustados pelo método de otimização de Levenberg-Marquadt adotando uma função objetivo dada pelo somatório do quadrado das diferenças entre os resultados de rendimento reportados na Tabela 4.1 e valores análogos calculados. Considerando inicialmente um modelo linear, somente com os efeitos principais, dado pela Equação (4.6), observou-se que com 92,5 % de probabilidade apenas a temperatura ( $X_2$ ) e o  $pH$  do primeiro tanque de solubilização de proteína ( $X_4$ ) apresentavam efeito significativo sobre o rendimento. A Tabela 4.2 evidencia que os coeficientes que multiplicam  $X_1$ ,  $X_3$  e  $X_5$  não são estatisticamente significativos com  $p < 0,075$  ( $\alpha = 0,075$ ) pois seus valores absolutos são inferiores as suas respectivas incertezas.

$$R = e + e_1X_1 + e_2X_2 + e_3X_3 + e_4X_4 + e_5X_5 \quad (4.6)$$

Tabela 4.2. Parâmetros não significativos da Equação (4.6) para  $\alpha = 0,075$  e  $v = 24$  (número de experimentos - número de parâmetros do modelo).

Parâmetro	Valor do parâmetro	$\sigma_i$ (erro padrão do parâmetro)	Incerteza = $t_{\alpha} \times \sigma_i = 1,86 \times \sigma_i$
$e_1$	-3,45	1,93	3,59
$e_3$	-0,06	1,73	3,22
$e_5$	3,12	3,14	5,84

Neste sentido, a fim de melhorar a capacidade de predição do modelo, foi proposto um modelo quadrático, mas que considerasse somente as variáveis  $X_2$  e  $X_4$ , o qual é dado pela Equação (4.7). Neste caso, mesmo com 90 % de probabilidade somente os coeficientes que multiplicam  $X_2$  e  $X_4$  continuavam a ser significativos.

$$R = e + e_2X_2 + e_4X_4 + e_{2q}(X_2)^2 + e_{4q}(X_4)^2 \quad (4.7)$$

Visto que das análises anteriores somente os parâmetros  $e$ ,  $e_2$  e  $e_4$  eram significativos, um modelo como reportado na Equação (4.8) foi finalmente sugerido. Com 95 % de probabilidade as incertezas dos parâmetros são também consideradas

no modelo estatístico. A Figura 4.1 reporta a comparação entre resultados de rendimento na planta e estimados pela Equação (4.8).

$$R = (77,5 \pm 1,9) - (7,1 \pm 3,4)X_2 + (9,8 \pm 3,0)X_4 \quad (4.8)$$

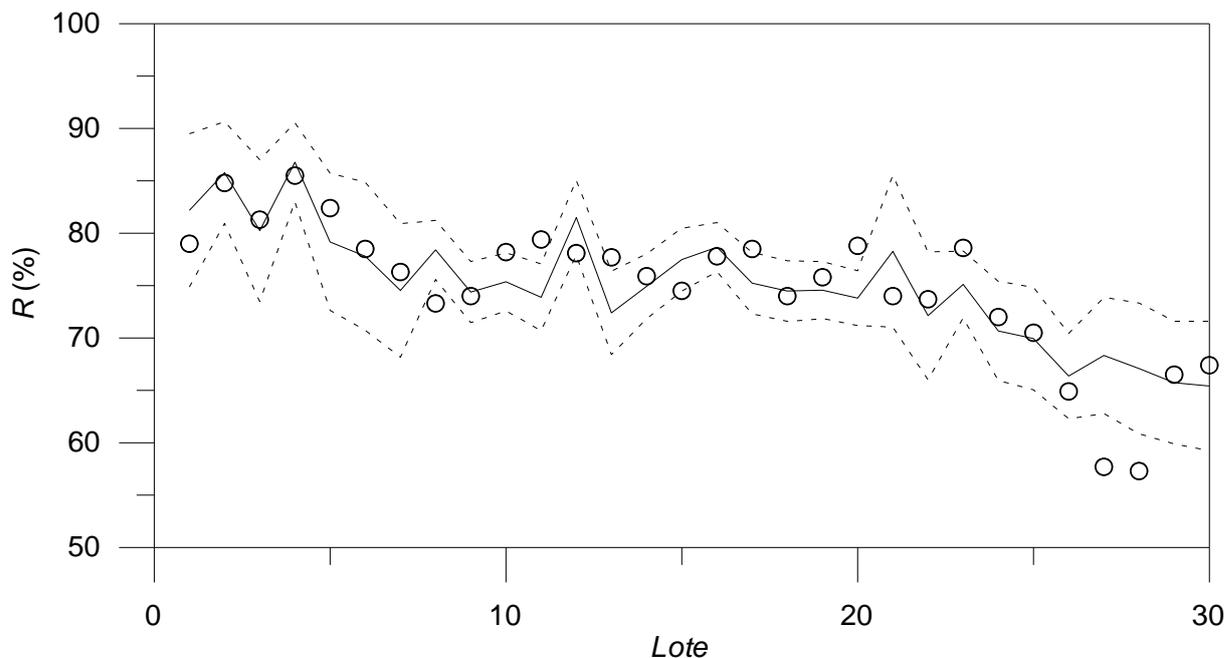


Figura 4.1. Rendimento de diferentes lotes de produção de isolado protéico na planta industrial (símbolos) e estimados pela Equação (4.8) (linhas sólida). Linhas tracejadas limitam o intervalo de confiança com 95% de probabilidade.

Sabe-se que o intervalo de confiança é naturalmente aumentado com o aumento da probabilidade no cálculo da incerteza dos parâmetros. De fato, como evidenciado na Equação (4.9), com 99 % de probabilidade as incertezas dos coeficientes do modelo estatístico são incrementadas se comparadas com os coeficientes análogos apresentados na Equação (4.8). A Figura 4.2 reporta a comparação entre resultados de rendimento na planta e estimados pela Equação (4.9).

$$R = (77,5 \pm 2,5) - (7,1 \pm 4,6)X_2 + (9,8 \pm 4,0)X_4 \quad (4.9)$$

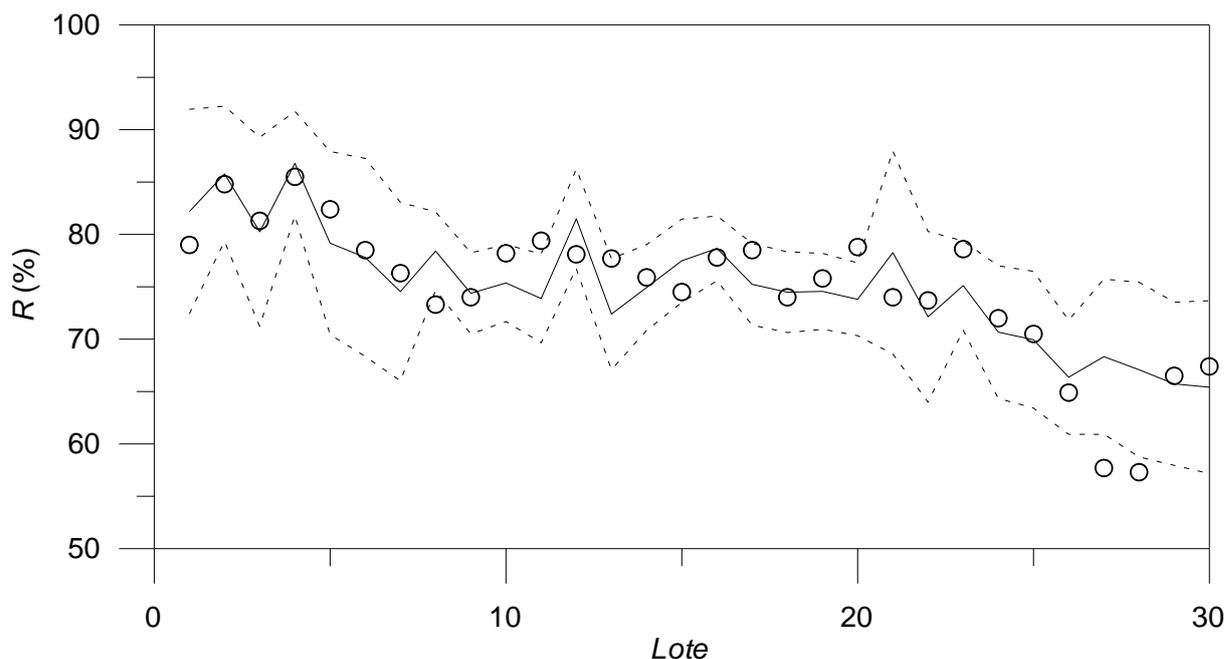


Figura 4.2. Rendimento de diferentes lotes de produção de isolado protéico na planta industrial (símbolos) e estimados pela Equação (4.9) (linhas sólidas). Linhas tracejadas limitam o intervalo de confiança com 99 % de probabilidade.

O desvio médio relativo entre resultados medidos e estimados pelo modelo estatístico é aproximadamente igual a 4 %, o que é um aspecto que corrobora a validade do procedimento de regressão. Um ulterior elemento de importância sobre a qualidade do modelo é observado na Figura 4.3, onde a distribuição de freqüência dos resíduos ou de probabilidade é reportada. Nota-se inicialmente que os maiores erros encontrados não são superiores a 11 % e que 50 % dos resíduos estão distribuídos entre -2 e +2 %. As barras também evidenciam que não existem tendências expressivas na distribuição de erros, ou seja, os mesmos estão distribuídos de forma aproximadamente simétrica entre valores positivos e negativos. De fato, um modelo do tipo normal, dado pela Equação (4.10), explica aproximadamente 90 % da distribuição de resíduos. O valor médio dos resíduos na Equação (4.10) foi considerado igual a zero ( $\varepsilon_m < -0,14$  %), enquanto que o desvio padrão ajustado pelo método de Levenberg-Marquadt é de aproximadamente 0,79.

$$P(\varepsilon) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(\varepsilon - \varepsilon_m)^2}{2\sigma^2}\right] \quad (4.10)$$

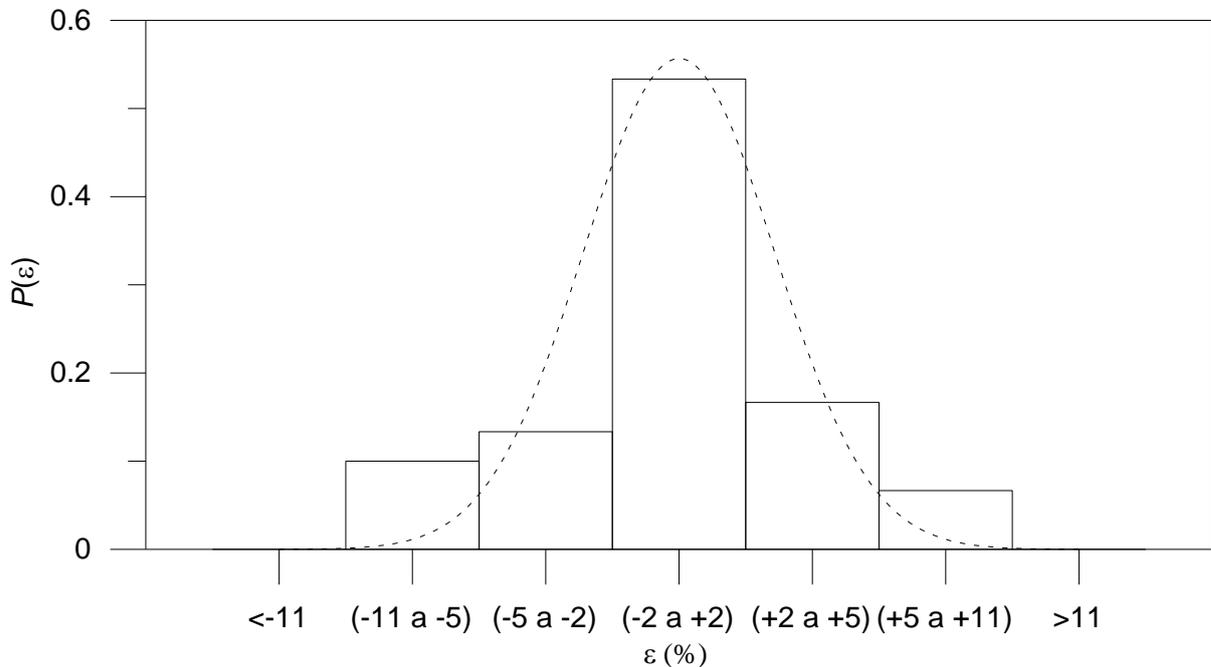


Figura 4.3. Distribuição de freqüência dos resíduos do rendimento, onde  $\varepsilon$  representa a diferença absoluta entre valores de rendimento medidos na planta e estimados com a Equação (4.9). Linha tracejada representa a distribuição de probabilidade Gaussiana (Equação 4).

A validade do modelo estatístico nas condições investigadas (i.e.:  $EE=0,51-0,98$  %;  $T=62,14-65,56$  °C;  $\tau=3215-6008$  s;  $pH_1=7,1-7,61$ ;  $pH_2=8,07-8,58$ ) foi verificada utilizando um conjunto independente e adicional de resultados de rendimento obtidos na planta. A Figura 4.4 apresenta a comparação entre os referidos dados mensurados em condições industriais e determinados com a Equação (4.8) e (4.9). Novamente, o desvio médio relativo é da ordem de apenas 3,5 %, enquanto que o resíduo máximo observado é igual a aproximadamente 7 %. Como pode ser prontamente observado, os resultados estimados distribuem-se de maneira uniforme abaixo e acima dos dados de rendimentos na planta, o que somado a evidências anteriormente comentadas, indica a existência de desvios randômicos que podem ser atribuídos à incertezas nas medidas dos fatores e/ou de

proteína no isolado protéico, bem como ao efeito residual de alguma variável de processo não considerada no equacionamento.

Deve-se ressaltar que de acordo com o modelo estatístico proposto as variáveis  $EE (X_1)$ ,  $\tau (X_3)$ ,  $pH_2 (X_5)$  não tem efeito significativo sobre o rendimento de isolado protéico nas condições investigadas ( $p < 0,075$ ). Entretanto, este fato não necessariamente indica que variações de  $EE$ ,  $\tau$  e  $pH_2$  fora do intervalo considerado não resultem em alterações na resposta de interesse.

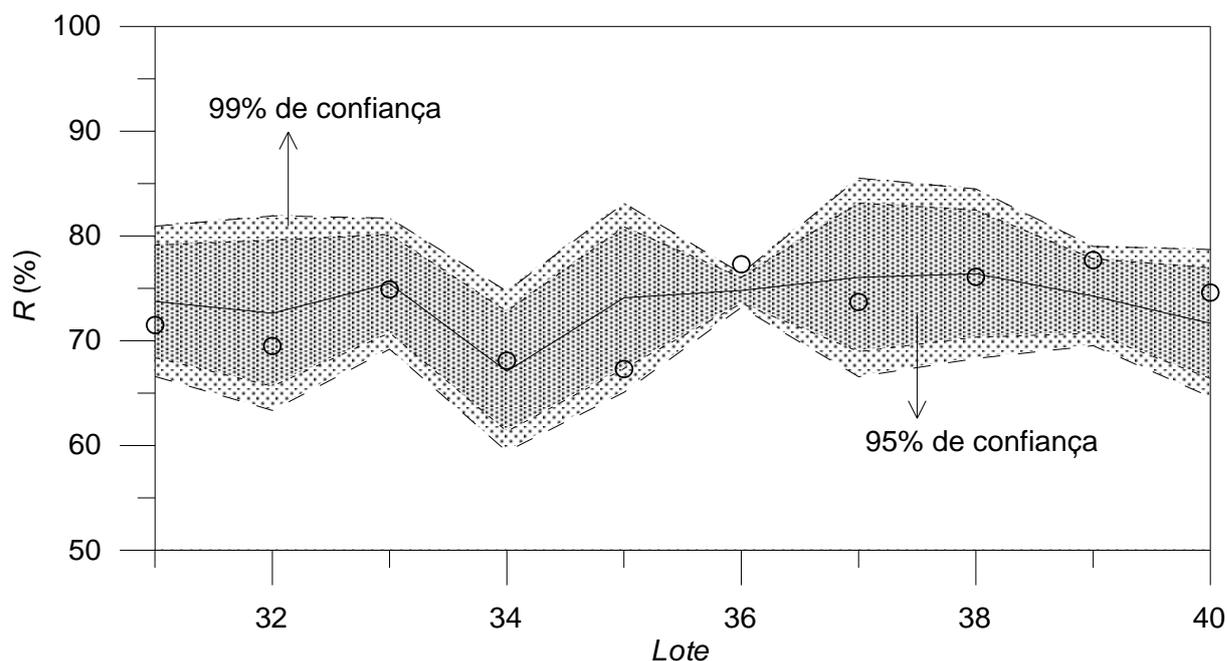


Figura 4.4. Comparação entre rendimentos determinados na planta (símbolos) e calculados com as Equações (4.8) e (4.9) (linhas).

A Figura 4.5 apresenta o rendimento calculado de isolado protéico em função das variáveis significativas codificadas. Como antecipado pelo modelo estatístico, observa-se que nas condições investigadas o rendimento varia de modo linear com a temperatura na saída do dessolventizador e com o pH do primeiro tanque de solubilização de proteína. Entretanto, o efeito da temperatura sobre  $R$  é negativo, enquanto que o efeito do pH sobre a mesma resposta é positivo, o que na realidade são fatos já evidenciados pelos sinais dos coeficientes que multiplicam  $X_2$  e  $X_4$  na Equação (4.9).

O fato da maioria das proteínas exibirem solubilidade máxima em pH alcalino de 8-9 (Damodaran et al., 2010) explica o incremento do rendimento quando o pH do primeiro tanque de solubilização é aumentado de 7,1 a aproximadamente 7,6. Em outras palavras, como a solubilização aumenta com o pH, a quantidade de proteína perdida que precipita com as fibras é reduzida. O fato de existir um segundo tanque de solubilização de proteína com pH entre 8,07 e 8,58 corrobora esta evidência, ainda que os resultados de rendimento mensurados na planta industrial demonstrem que a presença deste tanque tem influência desprezível sobre o rendimento. Teoricamente, a realimentação da suspensão no segundo tanque de solubilização de proteína deveria gerar um sobrenadante ainda mais rico em proteína. Entretanto, por alguma particularidade operacional este aspecto não é evidenciado na prática.

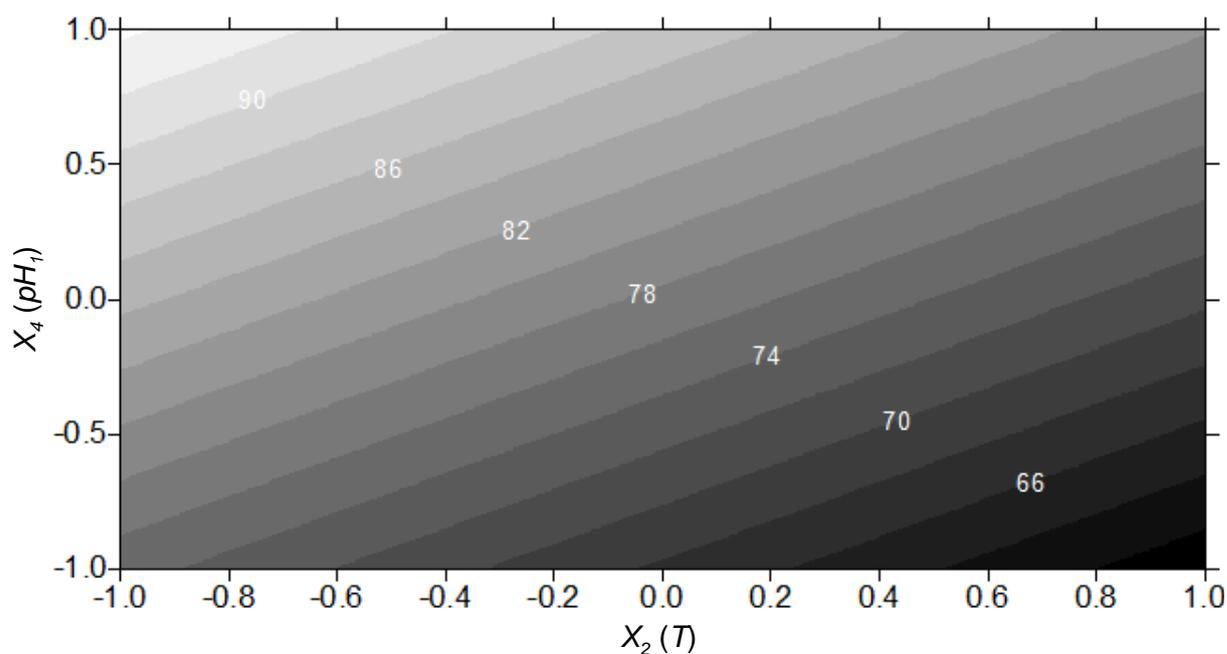


Figura 4.5. Rendimento de isolado protéico calculado com o modelo estatístico em função da temperatura na saída do dessolventizador e do pH do primeiro tanque de solubilização de proteína.

Sabe-se que a estrutura das proteínas é alterada quando as mesmas são expostas a condições térmicas diferentes (Damodaran et al., 2010). A principal consequência de interesse comercial desta variação de estrutura é a mudança no perfil de solubilidade da proteína (Damodaran et al., 2010). Neste sentido, parece bastante natural que o modelo estatístico tenha revelado um efeito significativo da

temperatura de dessolventização sobre o rendimento de isolado protéico, o qual essencialmente depende de operações de solubilização e precipitação das proteínas da soja.

De qualquer forma, a discussão acima não elucida o efeito negativo da temperatura sobre o rendimento. A razão do aumento da temperatura na saída do dessolventizador ter provocado uma redução da solubilidade da proteína nos tanques de solubilização de proteínas (para separação de fibras) e/ou um incremento da solubilidade no tanque de precipitação de proteína (para separação de carboidratos) é um aspecto que merece ulterior investigação. Neste ponto cabe ressaltar que as mudanças de estado estrutural das proteínas devido ao estresse térmico envolvem essencialmente: *i*) uma primeira etapa a baixa temperatura onde a proteína encontra-se com sua estrutura nativa preservada (termodinamicamente mais estável); *ii*) um segundo estágio a temperaturas próximas as de desnaturação onde a proteína apresenta-se em estado de adaptabilidade conformacional (mudanças sutis na estrutura da proteína são observadas); *iii*) e uma última fase a temperaturas mais elevadas que se caracteriza por alterações importantes na estrutura secundária, terciária e quaternária das proteínas (estado de desnaturação) (Damodaran et al., 2010). Como sabe-se que a temperatura a que os flocos de soja foram submetidos no dessolventizador ( $\approx 62,1-65,6$  °C) é próxima a temperatura aparente de desnaturação da  $\beta$ -conglucina (7S) (60-75 °C) (Renkema et al., 2002; Liu et al., 2004; Jiang et al. 2010), assume-se que uma fração significativa das proteínas nos tanques de solubilização/precipitação (representada pela fração de  $\beta$ -conglucina) encontrava-se no estado de adaptação conformacional ou próxima ao estado de desnaturação. Os resultados de rendimento na indústria e estimados pelo modelo estatístico revelam que neste estado estrutural, independente do  $pH_1$ , o aumento da temperatura desfavoreceu sistematicamente a recuperação de proteínas nas operações de separação envolvidas na planta.

A reedição das Figuras 4.2 e 4.4 feita no sentido de reportar o conjunto total de resultados de rendimento na planta e estimados, o que é apresentado na Figura 4.6, torna evidente que os piores rendimentos foram obtidos quando os flocos de soja foram tratados no dessolventizador a temperaturas aproximadamente iguais ou superiores ao limite inferior de temperatura de desnaturação da  $\beta$ -conglucina

definida por Liu et al. (2004) (i.e.;  $T \approx 65$  °C). Visto que 2/3 destes resultados não estão inseridos no intervalo de confiança (99 %) de  $R$  estimado com o modelo estatístico, pode-se inferir que o modelo é limitado a estimar o rendimento quando as operações industriais de solubilização e precipitação de proteína são conduzidas com a proteína  $\beta$ -conglucina em um estado de transição entre uma estrutura de adaptabilidade conformacional e desnaturação.

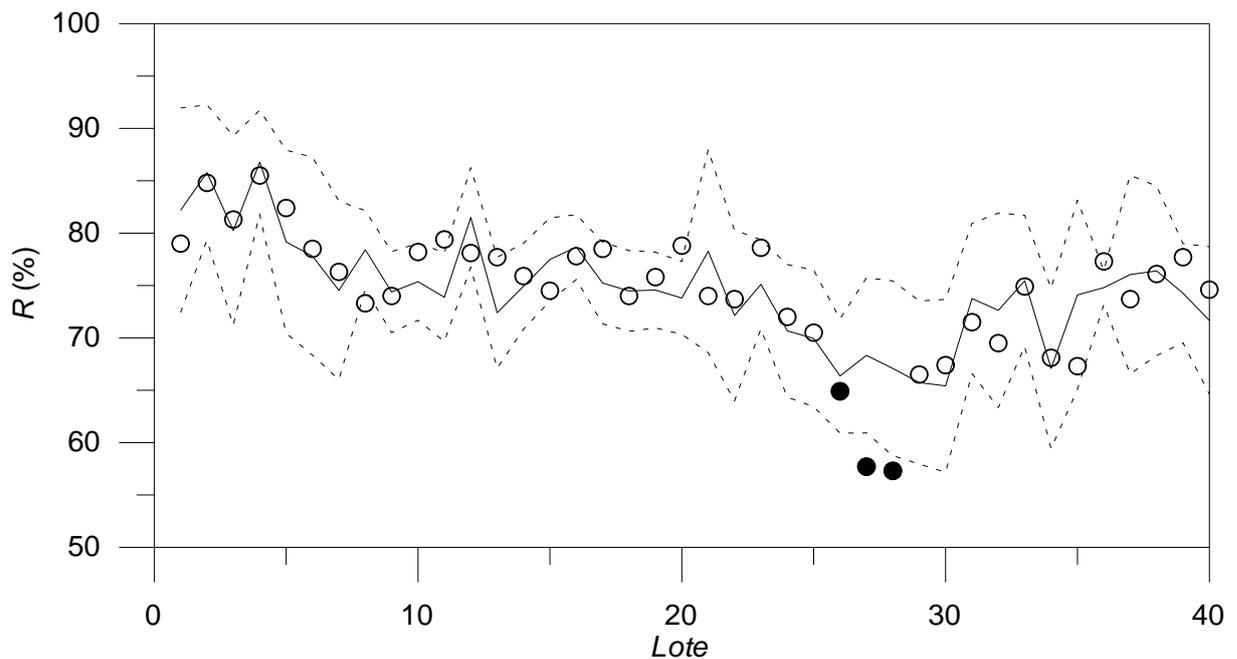


Figura 4.6. Comparação entre todos os dados de rendimento disponíveis na planta (símbolos) e estimados com a Equação (4.9). Símbolos cheios denotam valores de  $R$  para  $T$  aproximadamente maior que 65 °C ( $T > 64,8$  ou  $X_2 > 0,7$ ) em  $pH_2$  baixo ( $pH_2 < 7,26$  ou  $X_4 < -0,38$ ).

#### 4.2 RENDIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO NA PLANTA - MODELO DE REDES NEURONAIS

Modelos de redes neurais artificiais são particularmente interessantes para representar respostas de interesse em processos industriais. Essencialmente, os fatores que contribuem para este fato são: *i*) para propósitos da indústria a representação do processo é mais importante do que a descrição e compreensão dos fenômenos envolvidos; *ii*) o número de variáveis envolvidas e a não linearidade

entre fatores e respostas de interesse favorecem uma abordagem empírica de modelagem, onde o foco é o resultado; *iii*) as condições não controladas do processo industrial dificultam sua interpretação fenomenológica; *iv*) o conjunto de dados disponível é em geral suficientemente grande para treinamento da rede neuronal.

Considerando os aspectos acima da modelagem por redes neuronais e devido ao interesse maior desta investigação de representar variações de rendimento de isolado protéico em função de perturbações nas condições de operação em uma planta industrial, optou-se por também reproduzir os dados de rendimento dos diferentes lotes de FSD processados (Tabela 4.1) por um modelo neuronal. Em particular, utilizou-se um modelo clássico do tipo perceptron multicamadas ou MLP (*Multilayer Perceptron*) com uma única camada intermediária de neurônios, variando entre 3 e 7. Assim como ocorreu com o modelo estatístico, os 30 primeiros dados da Tabela 4.1 foram empregados para treinamento da rede, o que basicamente consistiu em ajustar um conjunto de 13 a 29 parâmetros, dados por  $4n+1$ , sendo  $n$  o número de neurônios. Uma função de ativação do tipo tangente hiperbólica e linear foi adotada para os neurônios da camada intermediária e de saída, respectivamente. O método do Gradiente Conjugado Escalonado Modificado, implementado em um algoritmo de otimização (Castro e Von Zuben, 1998) que considera como função objetivo a soma dos quadrados dos resíduos, foi utilizado no procedimento de ajuste dos parâmetros do modelo. Detalhes da construção de modelos análogos empregando o mesmo procedimento de modelagem são reportados na literatura (ex.; Bispo et al., 2014).

As Figuras 4.7, 4.9, 4.11, 4.13 e 4.15 reportam uma comparação entre resultados de rendimento de isolado protéico medidos na planta e estimados pelo modelo neuronal na etapa de treinamento com 3, 4, 5, 6 e 7 neurônios, respectivamente. Os valores de rendimento calculados nas condições do conjunto de validação, envolvendo os mesmos números citados de neurônios, são confrontados com os dados reais obtidos na planta nas Figuras 4.8, 4.10, 4.12, 4.14 e 4.16, respectivamente.

Nota-se que nas figuras que reportam os dados de treinamento a capacidade do modelo de descrever o comportamento observado na planta é sistematicamente melhorada com o aumento do número de neurônios considerado.

De fato, este comportamento é normal e esperado, pois o número de parâmetros ajustáveis aumenta linearmente com o número de neurônios ( $n^\circ \text{ parâmetros} = 4n + 1$ ). Este aspecto fica mais claro na Figura 4.17, onde o erro quadrático médio (EQM) é reportado em função de  $n$ .

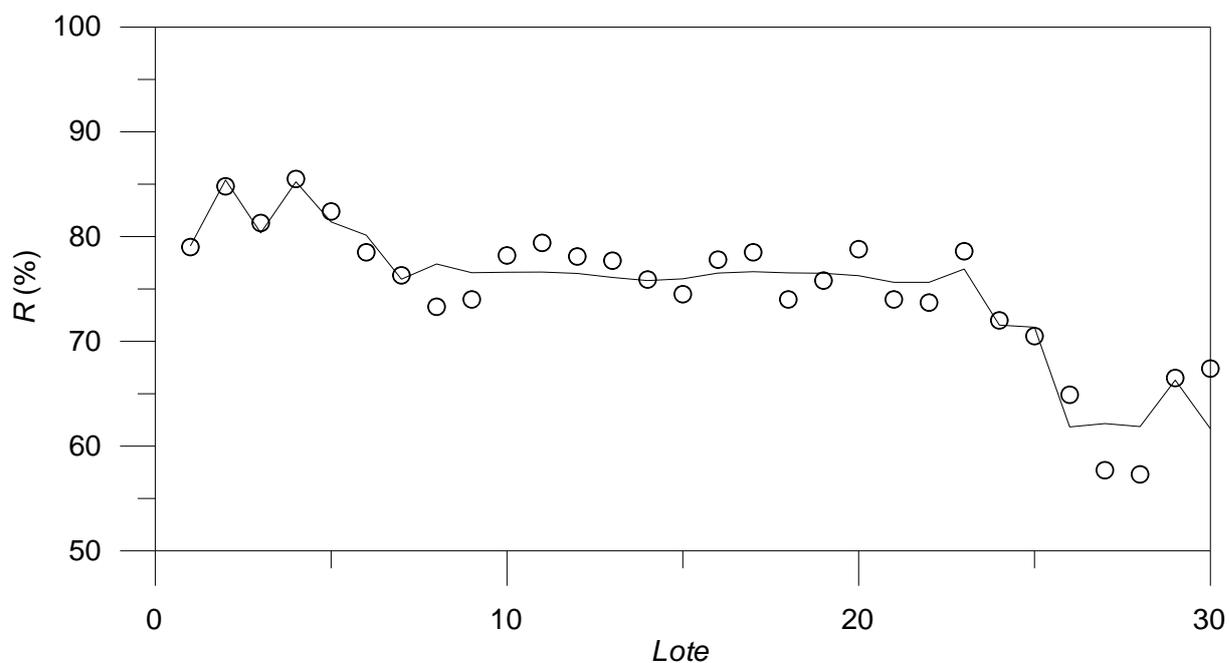


Figura 4.7. Comparação entre dados de treinamento (símbolos) e estimados com um modelo de redes neurais com 3 neurônios e 13 parâmetros (linha).

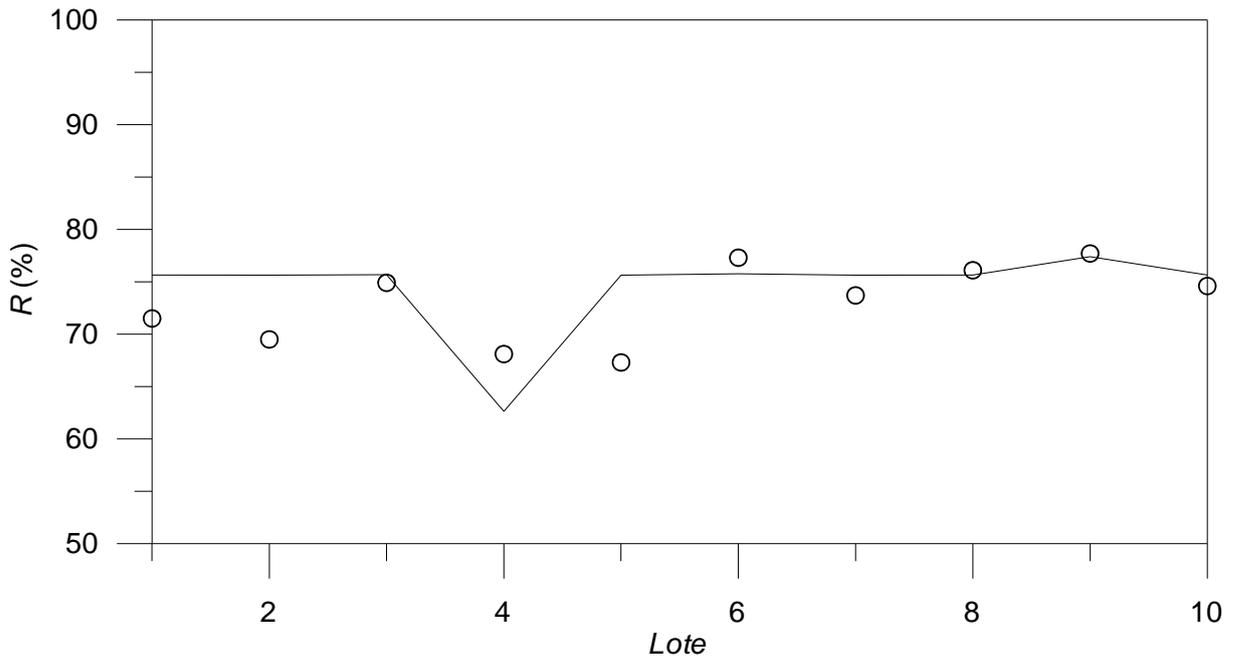


Figura 4.8. Comparação entre dados de validação (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 3 neurônios e 13 parâmetros (linha).

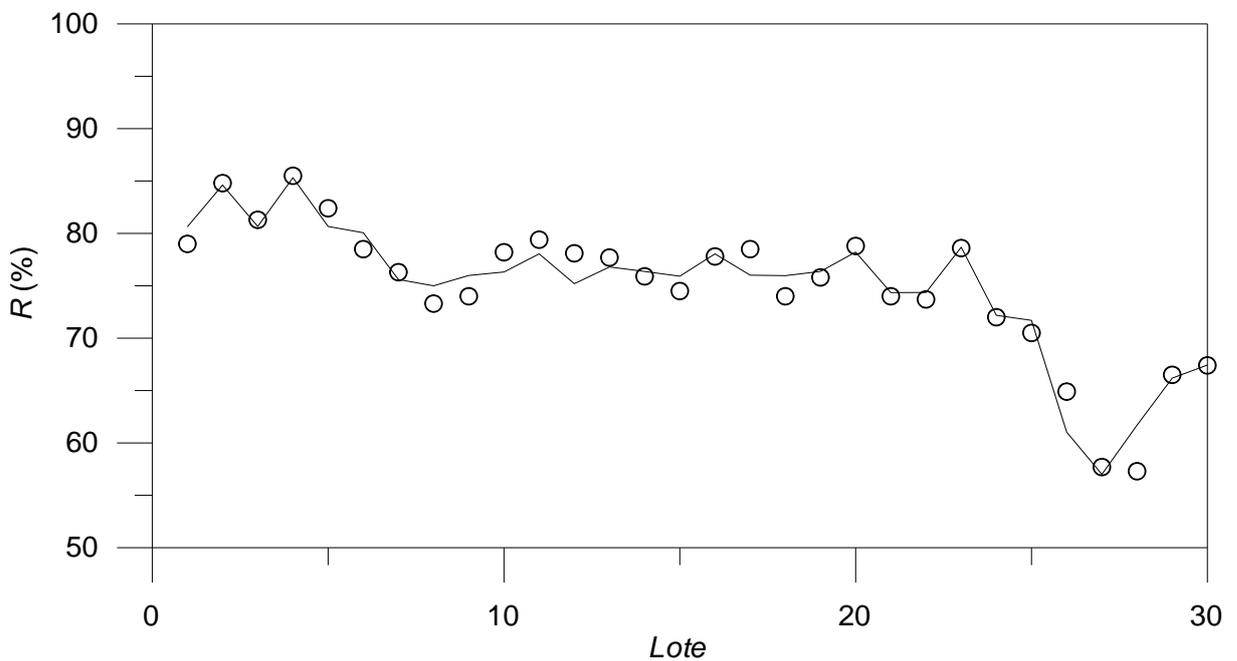


Figura 4.9. Comparação entre dados de treinamento (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 4 neurônios e 17 parâmetros (linha).

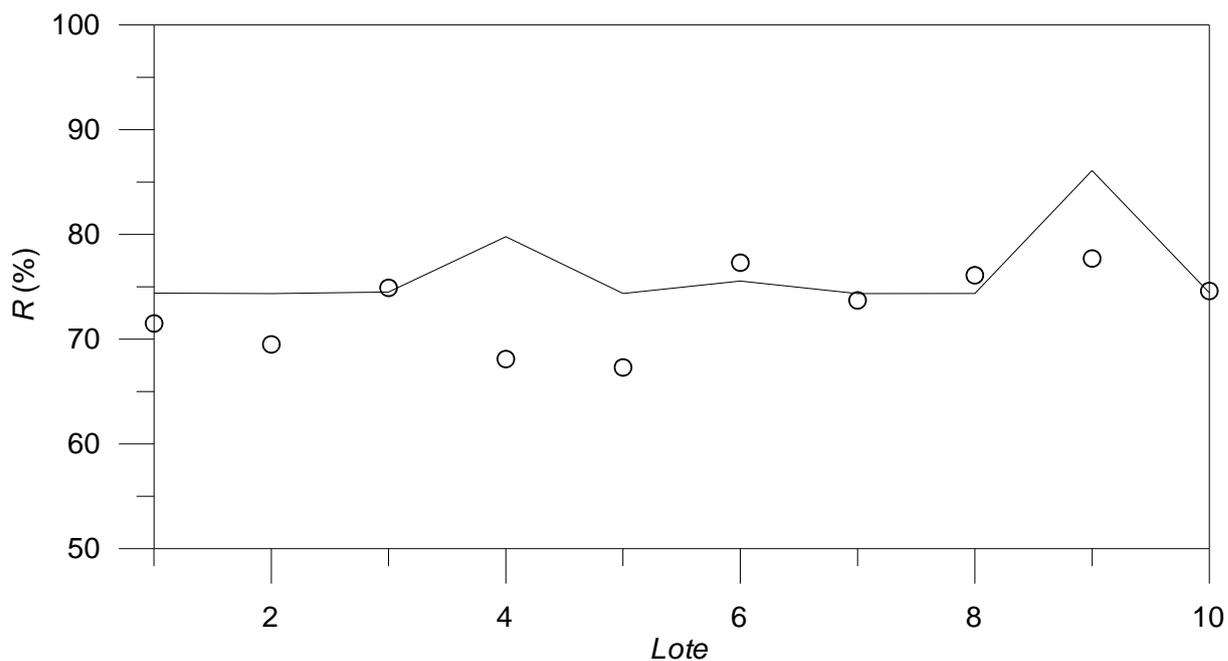


Figura 4.10. Comparação entre dados de validação (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 4 neurônios e 17 parâmetros (linha).

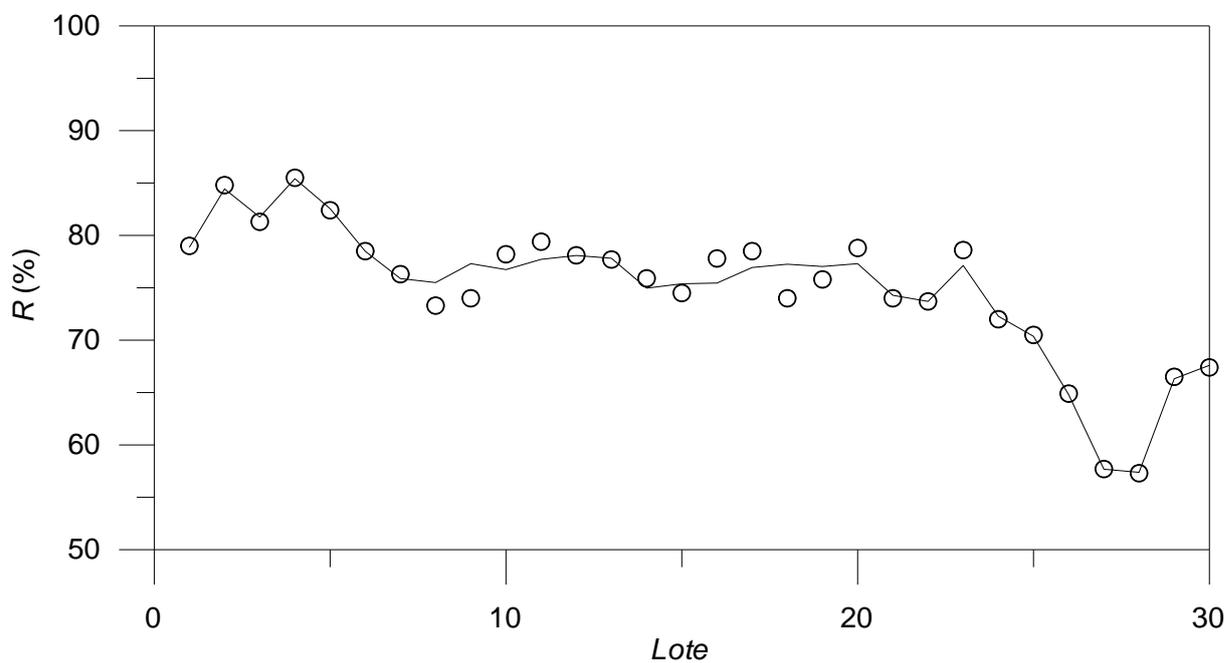


Figura 4.11. Comparação entre dados de treinamento (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 5 neurônios e 21 parâmetros (linha).

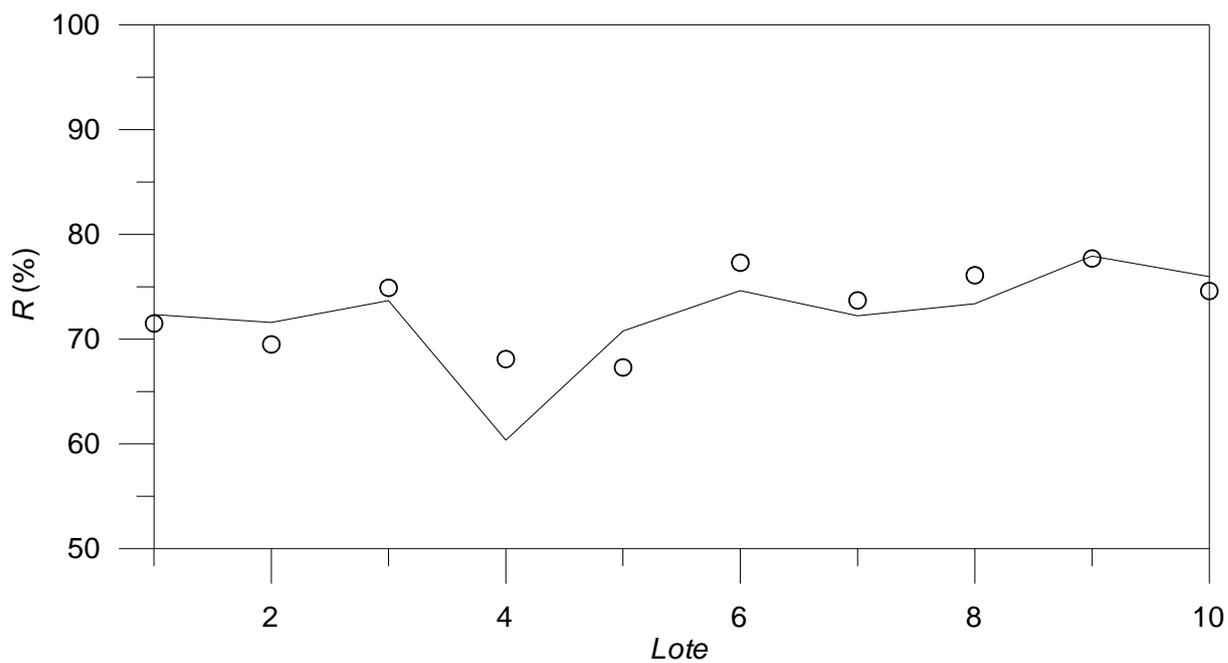


Figura 4.12. Comparação entre dados de validação (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 5 neurônios e 21 parâmetros (linha).

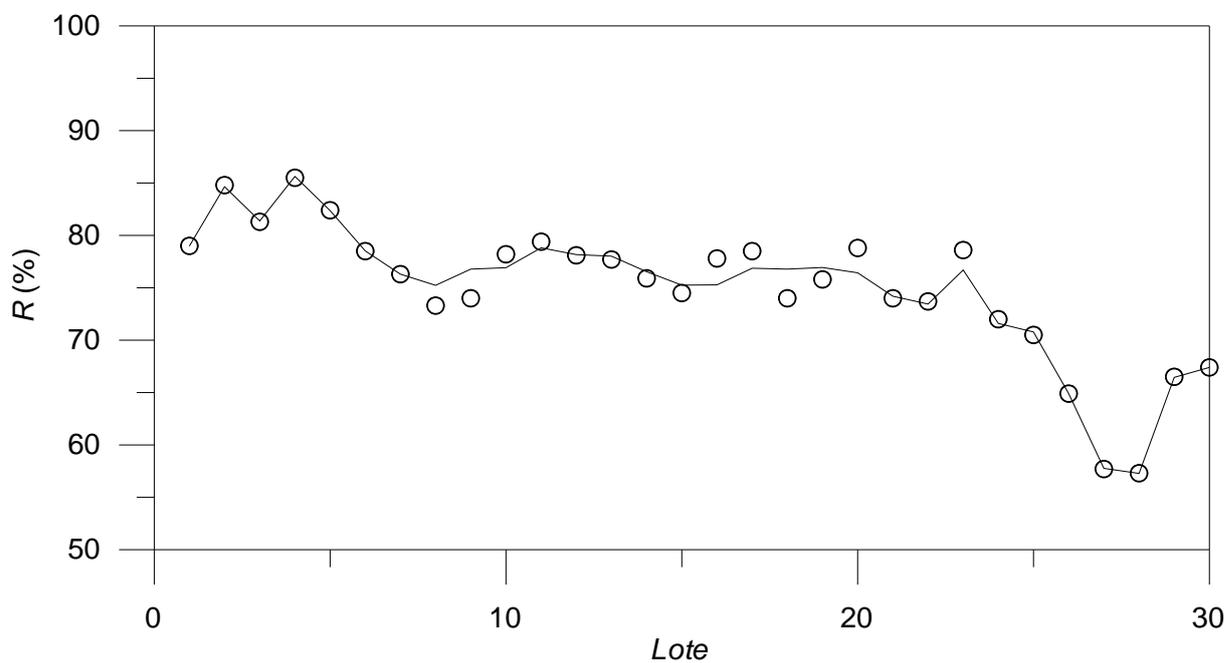


Figura 4.13. Comparação entre dados de treinamento (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 6 neurônios e 25 parâmetros (linha).

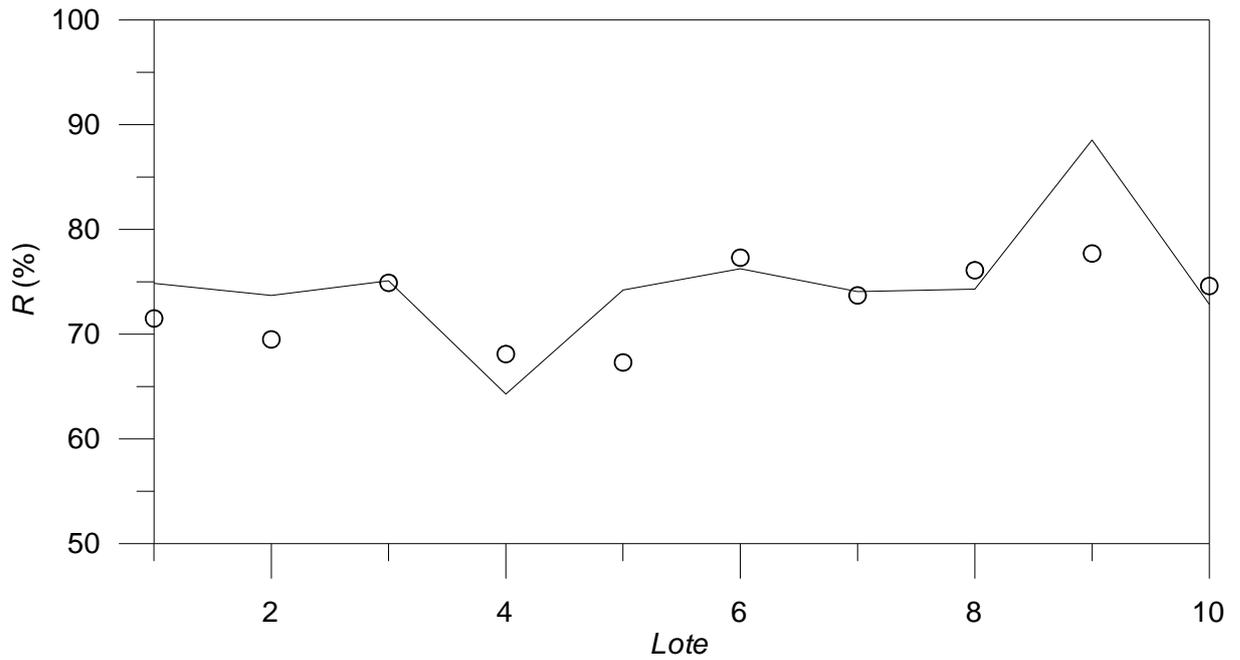


Figura 4.14. Comparação entre dados de validação (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 6 neurônios e 25 parâmetros (linha).

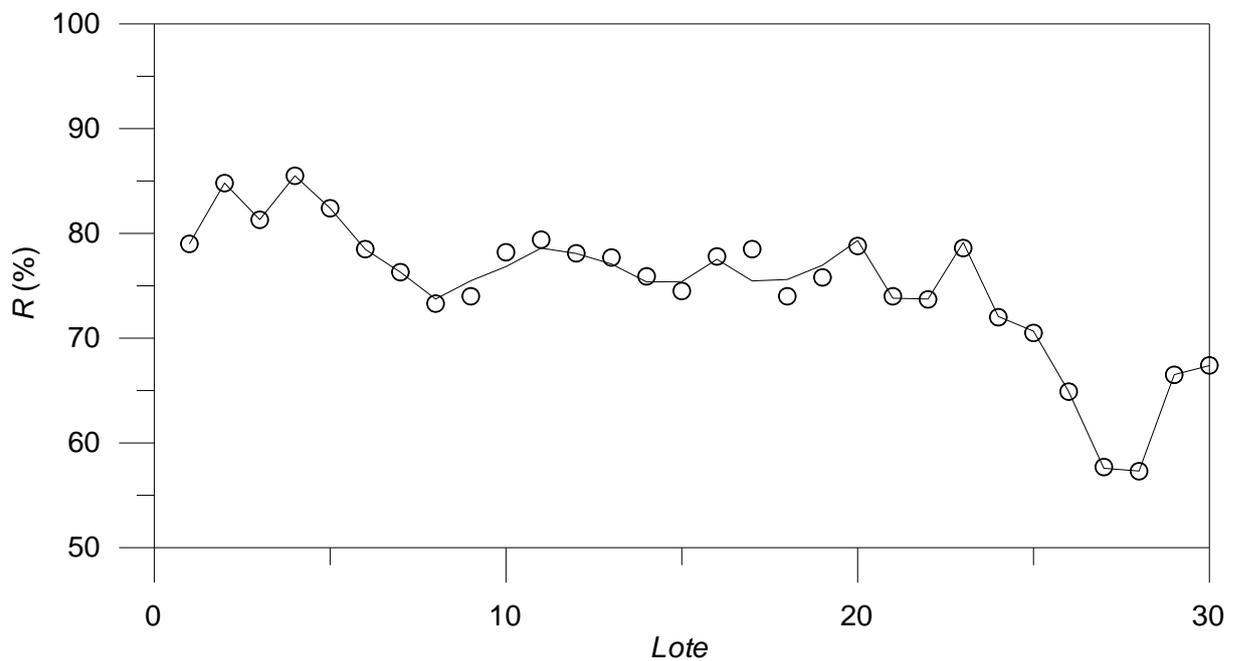


Figura 4.15. Comparação entre dados de treinamento (símbolos) e estimados com um modelo de redes neuronais com 7 neurônios e 29 parâmetros (linha).

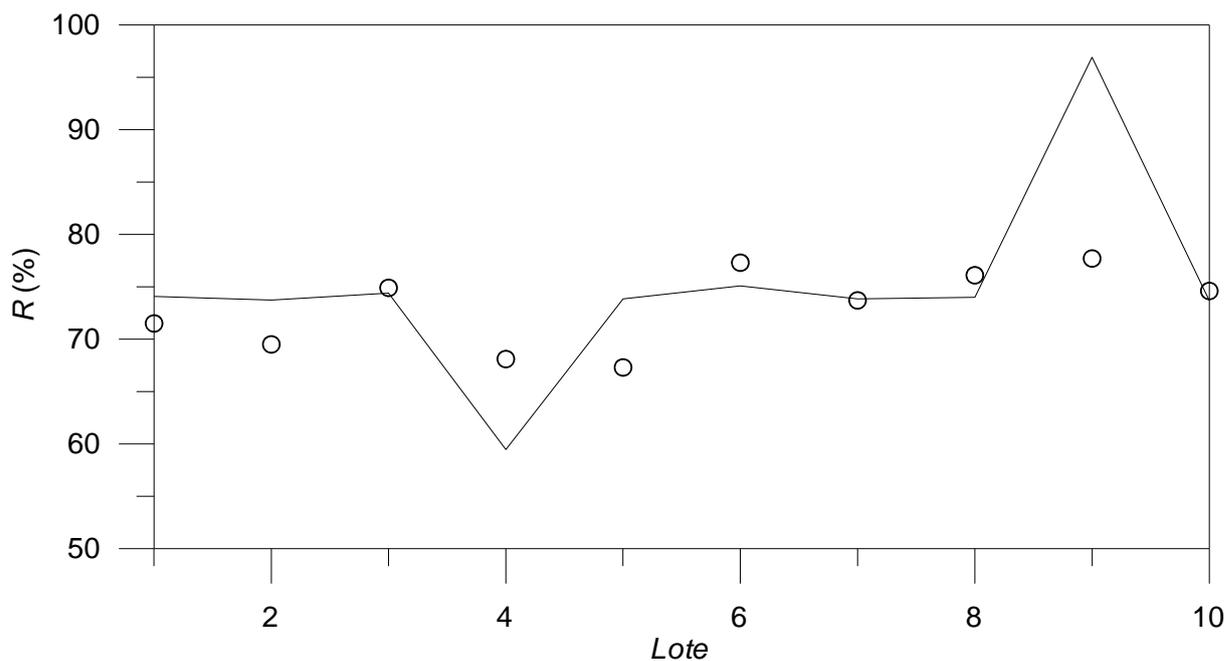


Figura 4.16. Comparação entre dados de validação (símbolos) e estimados com um modelo de redes neurais com 7 neurônios e 29 parâmetros (linha).

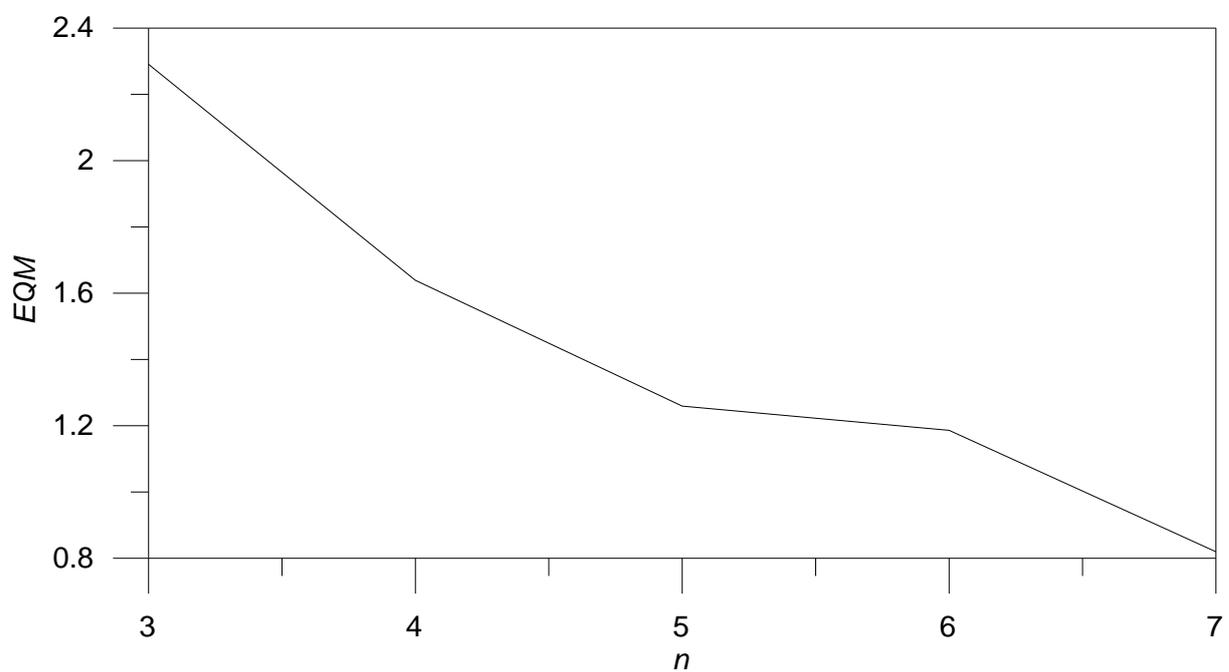


Figura 4.17. Erro quadrático médio (EQM) em função do número de neurônios na etapa de treinamento do modelo de redes neurais.

Entretanto, a Figura 4.18 evidencia que o mesmo não acontece se considerarmos o conjunto de dados de validação, isto é, os desvios entre resultados na planta e estimados pelo modelo não são reduzidos assintoticamente com o aumento de número de neurônios. Este fato também não é estranho e tem sido reportado na literatura como "*over-training*" ou sobre-ajuste (Gonzaga, 2003). A explicação para este comportamento é que a rede se especializa excessivamente nos dados de treinamento, buscando provavelmente modelar erros intrínsecos as medidas utilizadas na etapa de aprendizado. Desta forma, o modelo neuronal reduz sua capacidade de generalização e os desvios não são mais sistematicamente reduzidos com o incremento do número de parâmetros. Em função desta peculiaridade dos modelos neuronais, no presente caso evidenciada na Figura 4.18, conclui-se que a melhor configuração de rede é a que apresenta 5 neurônios. Nesta situação o erro quadrático médio é da ordem de 1,3 e 3,1 nas etapas de treinamento e validação, respectivamente.

Comparando o desvio relativo médio entre o conjunto total de valores de  $R$  na planta e estimados pelo modelo estatístico ( $\approx 3,9\%$ ), com o desvio análogo considerando o modelo de redes neuronais ( $\approx 1,7\%$ ), observa-se que o modelo neuronal melhor descreve os dados de rendimento de IPS na indústria investigada.

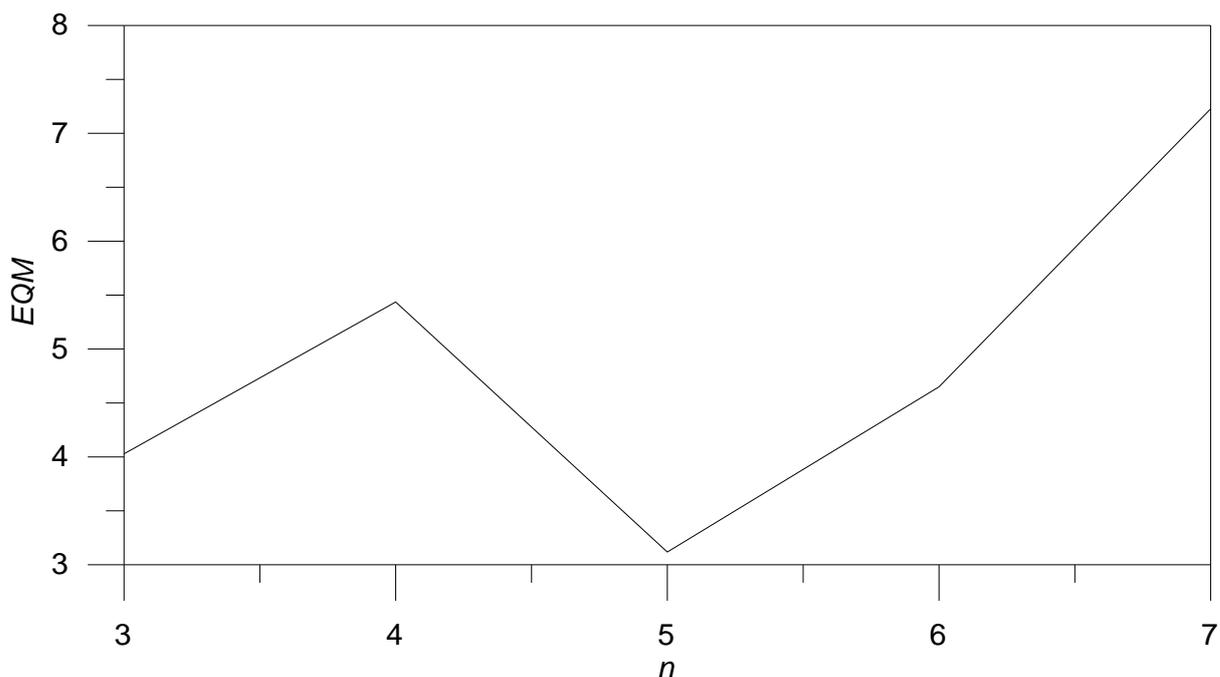


Figura 4.18. Erro quadrático médio (*EQM*) em função do número de neurônios na etapa de validação do modelo de redes neuronais.

### 4.3 RENDIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO EM LABORATÓRIO

Como já especificado no capítulo de "Materiais e Métodos", o efeito da temperatura de dessolventização e do pH do tanque de solubilização de proteína sobre o rendimento de isolado protéico foi investigado em laboratório sob condições controladas. Os experimentos foram conduzidos de forma a simular todas as operações industriais envolvendo os flocos de soja desengordurados, isto é, etapas de processamento do sólido posteriores a extração de óleo com hexano.

A Figura 4.19 reporta as diferentes rampas de aquecimento as quais foram submetidas as 5 diferentes amostras de FSD que posteriormente foram tratadas em condições análogas as industriais para obtenção de isolado protéico. Deve-se ressaltar que a temperatura medida e reportada na Figura 4.19 é a temperatura da estufa, porém assumindo-se equilíbrio térmico instantâneo pode-se dizer que a temperatura da estufa foi controlada de modo a propiciar uma variação linear da temperatura do material em função do tempo de aquecimento.

Cabe destacar que os ensaios de aquecimento em questão foram conduzidos de forma a ampliar de aproximadamente  $\pm 5$  °C o intervalo de variação simulado de

temperatura na saída do dessolventizador pois na operação industrial análoga a temperatura variava de aproximadamente 60 a 65 °C (ver Tabela 4.1). Também é importante que se mencione que não existe dúvida sobre a existência de uma rampa de aquecimento do material no dessolventizador industrial, pois a temperatura de alimentação da FSD neste equipamento é sempre igual a  $\approx 55$  °C, mas a função que caracteriza esta rampa é uma incógnita. Nesta dissertação, como já evidenciado, assumiu-se que a rampa é linear por duas razões: *i*) é a forma mais simples de tratar o problema e de conduzir o aquecimento; *ii*) de acordo com a lei de Newton do resfriamento/aquecimento uma variação linear de temperatura é esperada nos tempos que antecedem o equilíbrio térmico.

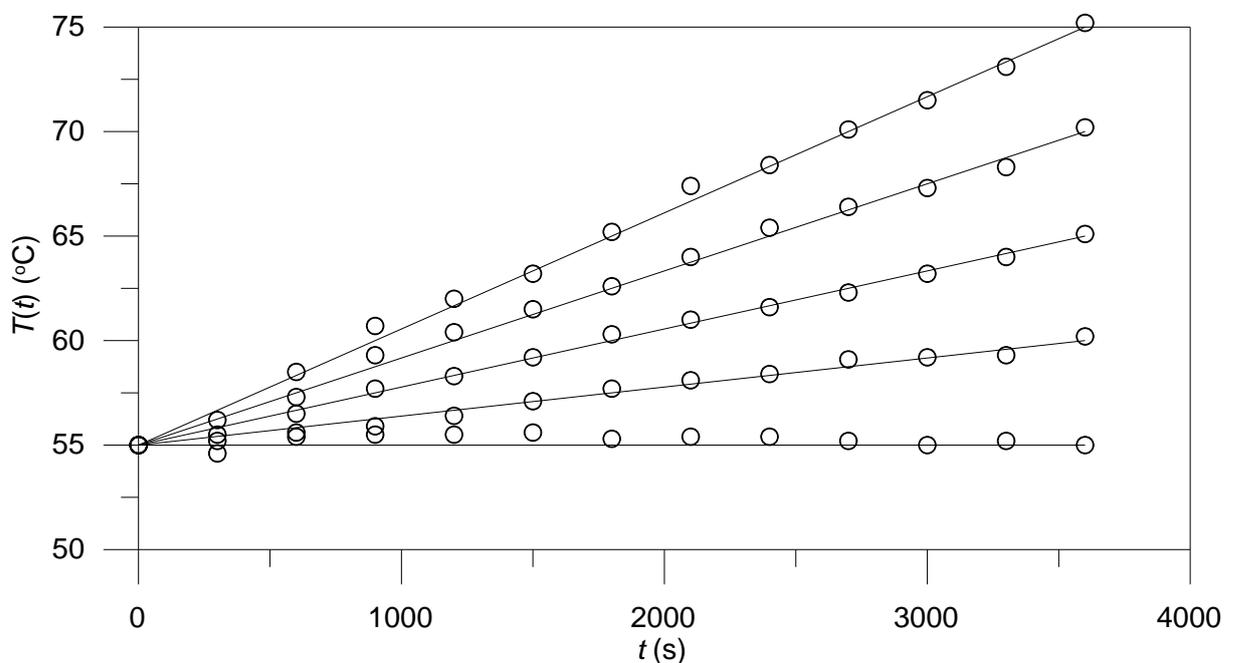


Figura 4.19. Rampa de aquecimento linear das amostras de FSD tratadas em laboratório para obtenção de isolado protéico. Símbolos: temperatura medida na estufa; linhas sólidas: equação de uma reta com coeficiente linear igual a 55 °C e angular determinado pelas temperaturas em  $t=3600$  s.

Alíquotas das amostras de FSD A, B, C, D e E (submetidas as temperaturas de dessolventização de 55, 60, 65, 70 e 75, respectivamente) foram tratadas em um primeiro recipiente de solubilização de proteína em pH de 6,8, 7,0, 7,2, 7,4 e 7,6. Salvo este aspecto do experimento que foi conduzido a fim de investigar o efeito do

pH do primeiro tanque de separação de fibras e proteínas, a FSD foi submetida as mesmas operações conduzidas na planta, em condições análogas as industriais. O resultados de rendimento de isolado protéico destas amostras são reportados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Rendimento de isolado protéico de FSD processada em laboratório em diferentes temperaturas finais de remoção de solvente e em diferentes pH do primeiro recipiente de solubilização de proteína. As incertezas na medida do rendimento a 65 °C representam desvios padrões de duas medidas independentes no mesmo pH.

$pH_1$	$R$ (%)				
	$T=55$ °C	$T=60$ °C	$T=65$ °C	$T=70$ °C	$T=75$ °C
6,8	65,6	62,7	63,2±0,1	65,8	63,0
7,0	58,7	60,7	62,3±2,6	65,6	67,4
7,2	56,7	61,5	64,5±2,5	67,0	71,1
7,4	64,5	63,4	67,5±2,9	69,9	67,0
7,6	65,4	66,3	63,8±0,7	74,6	59,4

Um primeiro aspecto a ser observado a partir dos dados da Tabela 4.3 é verificar se a ordem de grandeza dos rendimentos obtidos em laboratório são comparáveis aos valores mensurados na planta. Entretanto, é necessário estar atento ao fato de que os resultados obtidos na planta foram obtidos em  $T$  entre aproximadamente 60 e 65 °C, e  $pH_1$  maiores que 7,1 e menores que  $\approx 7,6$ . Neste sentido, a Figura 4.20 reporta uma comparação entre rendimentos médios na planta observados na Tabela 4.1 e os valores de  $R$  reportados na Tabela 4.3 em condições análogas (i.e.;  $7,2 \leq pH_1 \leq 7,6$  e  $60 \leq T \leq 65$ ).

Com uma probabilidade de até 95 % o teste  $t$  de student revela uma diferença significativa entre os valores de rendimento reportados na Figura 4.20. Isto ocorre porque com  $p > 0,05$  a diferença entre os rendimentos comparados é maior que a incerteza combinada das diferentes medidas ( $\Delta R \approx 10 \% > I$ ), calculada como definido na Equação (4.11), onde  $\sigma_P$  e  $\sigma_L$  representam os desvios padrões das médias de  $R$  na planta e no laboratório, respectivamente.

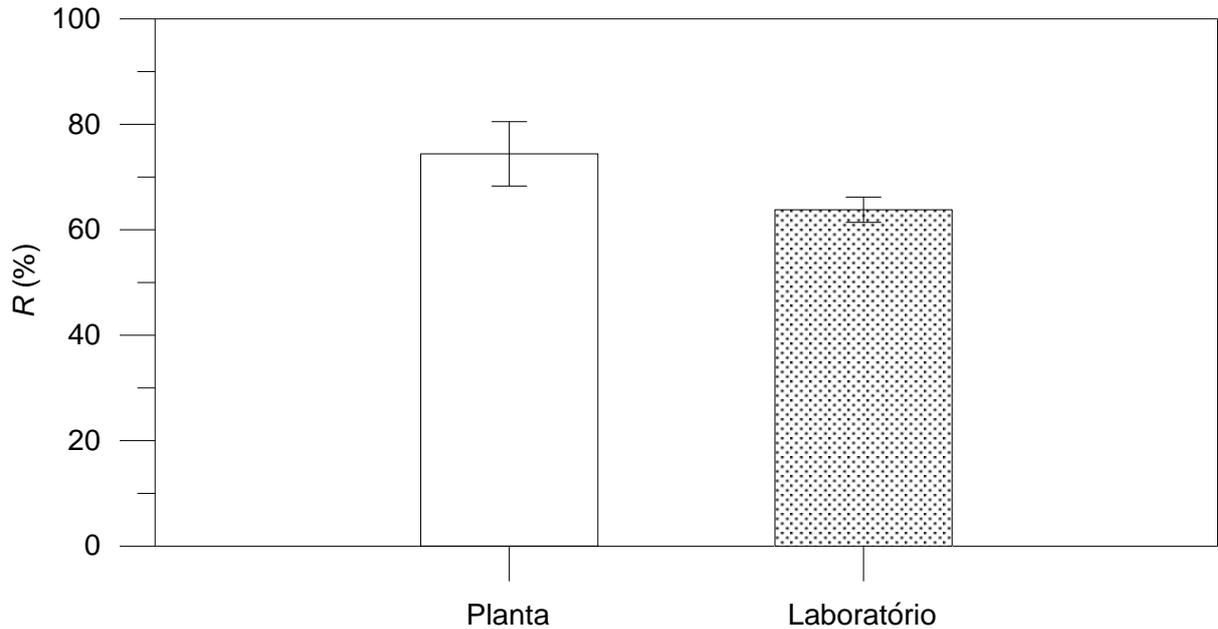


Figura 4.20. Rendimento médio de isolado protéico na planta (ver Tabela 4.1) e nos ensaios de laboratório para  $7,2 \leq pH_1 \leq 7,6$  e  $60 \leq T \leq 65$ . Barras de erro: desvios padrão.

$$I = \frac{\sigma_{Pt}(v = 39, \alpha = 0,05)40 + \sigma_{Lt}(v = 14, \alpha = 0,05)15}{55} \quad (4.11)$$

A princípio, rendimentos maiores de isolado protéico seriam esperados quando a FSD fosse tratada no laboratório, visto que nesta situação a solubilização e precipitação das proteínas ocorre em condições ideais de mistura, o que teoricamente deveria reduzir as perdas de proteína nas etapas de separação de fibras e carboidratos. Entretanto, a Figura 4.20 evidencia que valores maiores de rendimento foram obtidos na planta. Obviamente o rendimento é afetado pelas variáveis já especificadas, então alguém poderia supor que esta diferença seria simplesmente atribuída ao fato de que os valores de  $R$  envolvidos no cálculo da média na planta foram obtidos em condições mais próximas das ideais em termos de  $T$  e  $pH_1$ . Todavia, uma diferença absoluta de aproximadamente 16 % persiste mesmo se os valores ótimos de  $R$  forem comparados em ambas as situações consideradas ( $R_{Pmax}=85,5$  %,  $R_{Lmax}=69,5$  %). Na verdade, esta diferença evidenciada na Figura 20 é devida principalmente a não recuperação das proteínas

que precipitaram com as fibras no segundo recipiente de solubilização de proteínas utilizado no laboratório. Uma comparação entre as Figuras 2.3 (fluxograma de produção de IPS na planta) e 3.1 (fluxograma de obtenção de IPS no laboratório) revela que a terceira extração (para recuperação de proteínas nas fibras) que ocorre na indústria não foi realizada em laboratório.

A análise dos dados de  $R$  da Tabela 4.3 não permite visualizar qualquer tipo de tendência na resposta devido a variação dos fatores. Entretanto, uma análise gráfica de curvas de  $R$  em função do  $pH$  para diferentes temperaturas parece indicar que estas curvas apresentam comportamentos diferentes para quando  $T \leq 60$  °C e para quando  $T \geq 65$  °C. Neste contexto, a fim de averiguar de forma mais detalhada este aspecto da investigação foi conduzida uma análise estatística de agrupamentos ou de *clusters*. Utilizou-se o método de agrupamento por  $k$ -Médias implementado no aplicativo comercial STATISTICA (StatSoft Inc., 2005). No presente caso este método moverá as curvas de  $R \times pH_1$  a diferentes temperaturas para dentro e fora de grupos a fim de minimizar a variância dentro do grupo e maximizar a variância entre os grupos.

De fato, como havia sido suposto, o algoritmo de agrupamento por  $k$ -Médias identificou a existência de dois grupos, os quais envolvem os resultados de rendimento em diferentes  $pH$  abaixo de 60 °C e acima de 65 °C. Os resultados desta análise são reportados de forma resumida na Figura 4.21.

A análise de agrupamentos indica com probabilidade superior a 95 % ( $p < 0,05$ ) que os resultados de rendimento são independentes da temperatura em  $pH_1$  igual a 6,8 e 7,6. A mesma análise revela que com  $p < 0,08$  existem diferenças entre os valores de  $R$  para temperaturas inferiores a 60 e superiores a 65 nos demais  $pH$  investigados. É surpreendente notar que o intervalo de temperatura do grupo 2 coincide com a faixa de temperatura de desnaturação da  $\beta$ -conglucina reportado na literatura (65-75 °C) (Liu et al., 2004). Este fato leva a crer que a  $\beta$ -conglucina recuperada nas condições do grupo 2 encontrava-se em um estado de desnaturação, enquanto que a do grupo 1 apresentava sua estrutura nativa. Entre as temperaturas de 60 e 65 acredita-se que a  $\beta$ -conglucina encontrava-se em um estágio de adaptação conformacional, como havia sido anteriormente sugerido a partir dos resultados de rendimento reportados na Tabela 4.1.

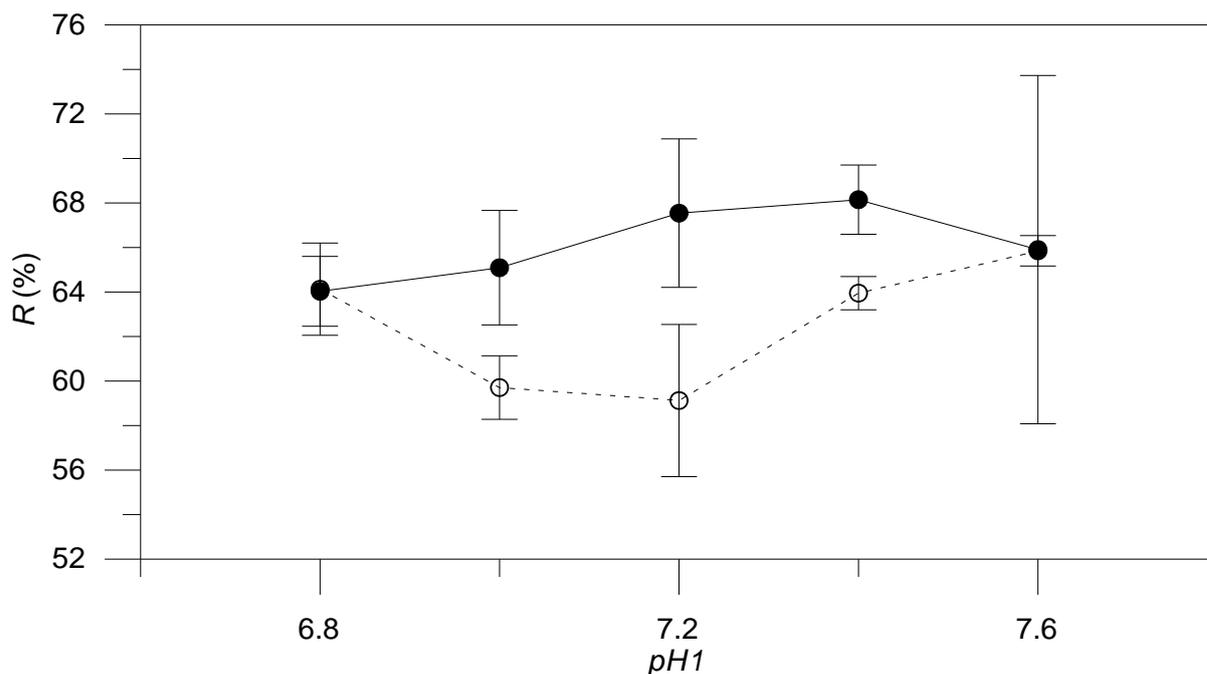


Figura 4.21. Resultados de análise de agrupamentos de curvas de  $R \times pH_1$  pelo método  $k$ -Médias. Grupo 1 (símbolos vazios unidos por linha tracejada): formado por dados de  $R$  da Tabela 4.3 a  $T=55$  e  $T=60$  °C; Grupo 2: (símbolos cheios unidos por linha sólida): formado por dados de  $R$  da Tabela 4.3 a  $T=65$ ,  $T=70$  e  $T=75$  °C.

Visto que é exatamente nesta suposta condição estrutural da  $\beta$ -conglucina que os resultados na planta foram obtidos, é natural que se deseje estimar como seria a variação de rendimento devido a variações de temperatura entre 60 e 65 em pH de 6,8 a 7,6. Com base nesta expectativa, sugeriu-se um modelo empírico considerando os valores médios de  $R$  dos grupos 1 e 2 nos diferentes pH e com variação de dois níveis de temperatura, como apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Resultados de rendimento de isolado protéico médios nos grupos 1 e 2 da análise de agrupamentos em função de variáveis naturais e codificadas.

$T$ (°C)	$pH_1$	$X_2$	$X_4$	$R$ (%)	$\sigma$ (%)	Grupo
60	6,8	-1	-1	64,1	2,1	1
60	7,0	-1	-0,5	59,7	1,4	1
60	7,2	-1	0	59,1	3,4	1
60	7,4	-1	+0,5	63,9	0,8	1

Continuação da Tabela 4.4

$T$ (°C)	$pH_1$	$X_2$	$X_4$	$R$ (%)	$\sigma$ (%)	Grupo
60	7,6	-1	+1	65,9	0,7	1
65	6,8	+1	-1	64,0	1,6	2
65	7,0	+1	-0,5	65,1	2,6	2
65	7,2	+1	0	67,5	3,3	2
65	7,4	+1	+0,5	68,1	1,6	2
65	7,6	+1	+1	65,9	7,8	2

O modelo empírico foi construído assumindo-se inicialmente que a variação de  $R$  com  $pH_1$  em ambos os grupos era descrita corretamente por um polinômio de 2º grau, cujos coeficientes foram ajustados por Levenberg-Marquadt. Cada um dos três coeficientes foi admitido variar linearmente com a temperatura simulada de dessolventização. Obviamente, como haviam somente dois pares ordenados de cada parâmetro em função da temperatura, não houve necessidade de se aplicar qualquer método de otimização para correlacionar os parâmetros a  $T$ . Substituindo-se as retas que caracterizam a dependência de cada parâmetro do modelo quadrático com  $T$ , obtém-se prontamente a Equação (4.12).

$$R = 63,5 + 3,5X_2 + 1,45X_4 - 0,05X_2X_4 - 3,8X_2(X_4)^2 + 1,4(X_4)^2 \quad (4.12)$$

A Figura 4.22 reporta uma comparação entre resultados de rendimento médios medidos nos diferentes grupos e calculados com a Equação (4.12). Como o modelo explica aproximadamente 90 % da variação de  $R$  devido a variações nos fatores investigados, o mesmo pode ser empregado para estimativas de  $R$  em diferentes pH na faixa de temperatura de 60 a 65 °C, o que é reportado na Figura 4.23.

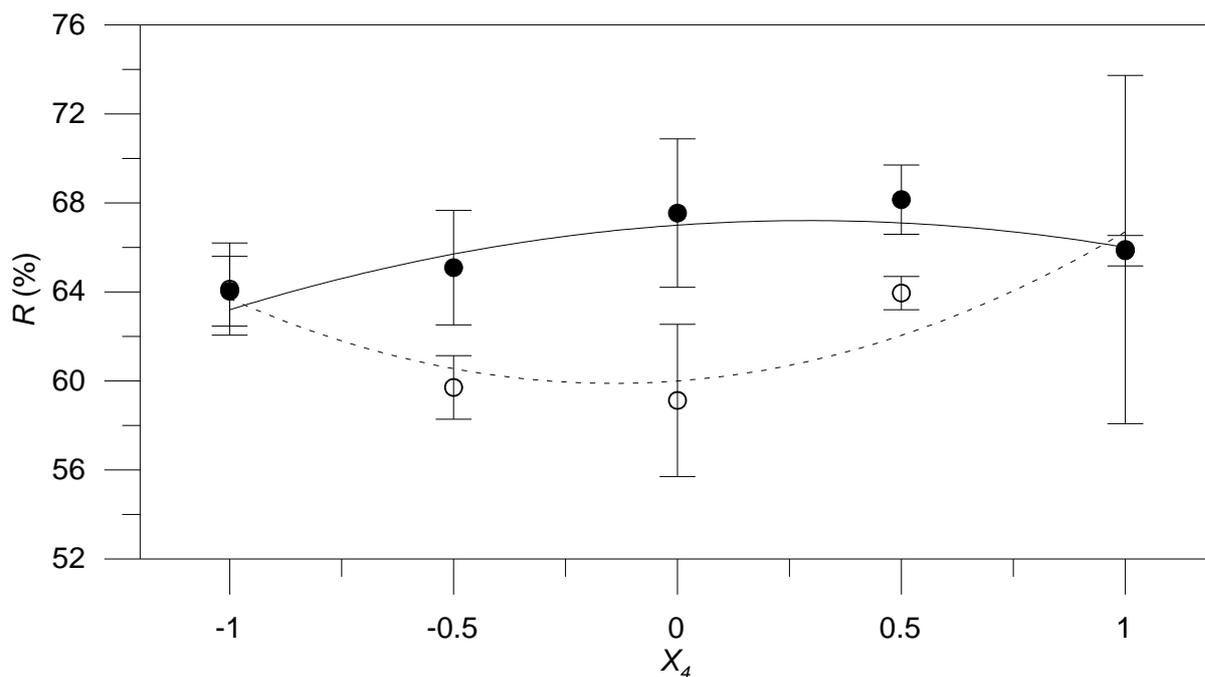


Figura 4.22. Comparação entre rendimentos médios experimentais (símbolos) e calculados com a Equação (4.12) (linhas) dos grupos 1 e 2 da análise de agrupamentos. Grupo 1 (símbolos vazios unidos por linha tracejada):  $T \leq 60$  °C; Grupo 2: (símbolos cheios unidos por linha sólida):  $T \geq 65$  °C.

O aspecto positivo na Figura 4.23 é que o efeito do pH de solubilização de proteína do primeiro recipiente sobre o rendimento é positivo, o que está em acordo com o que havia sido evidenciado pelo modelo estatístico (ver Figura 4.5) com base nos dados de  $R$  mensurados na planta industrial. Entretanto, o aumento da temperatura na saída da estufa de remoção de hexano nos ensaios de laboratório ocasionou um incremento do rendimento de isolado protéico, o que destoa do que havia sido observado na indústria.

A provável causa desta diferença é a forma da rampa de aquecimento da FSD empregada para remoção do hexano. Os resultados indicam que em laboratório a FSD foi exposta a uma condição mais branda de aquecimento, pois em baixas temperaturas a literatura indica que o aumento da temperatura favorece a solubilidade das proteínas (Pelegri e Gasparetto, 2005) (i.e.; menor perda de proteína com as fibras e maior rendimento). Se de fato esta hipótese estiver correta, então a diferença de rendimento entre os grupos 1 e 2 na Figura 4.22 deve ser

atribuída a uma transição da estrutura nativa da  $\beta$ -conglucina para um estado de adaptabilidade conformacional, e não a uma transição da estrutura nativa para um estado de desnaturação, como havia sido anteriormente suposto. Em outras palavras, as rampas de aquecimento com temperaturas superiores a 65 °C não foram suficientes para desnaturar a  $\beta$ -conglucina.

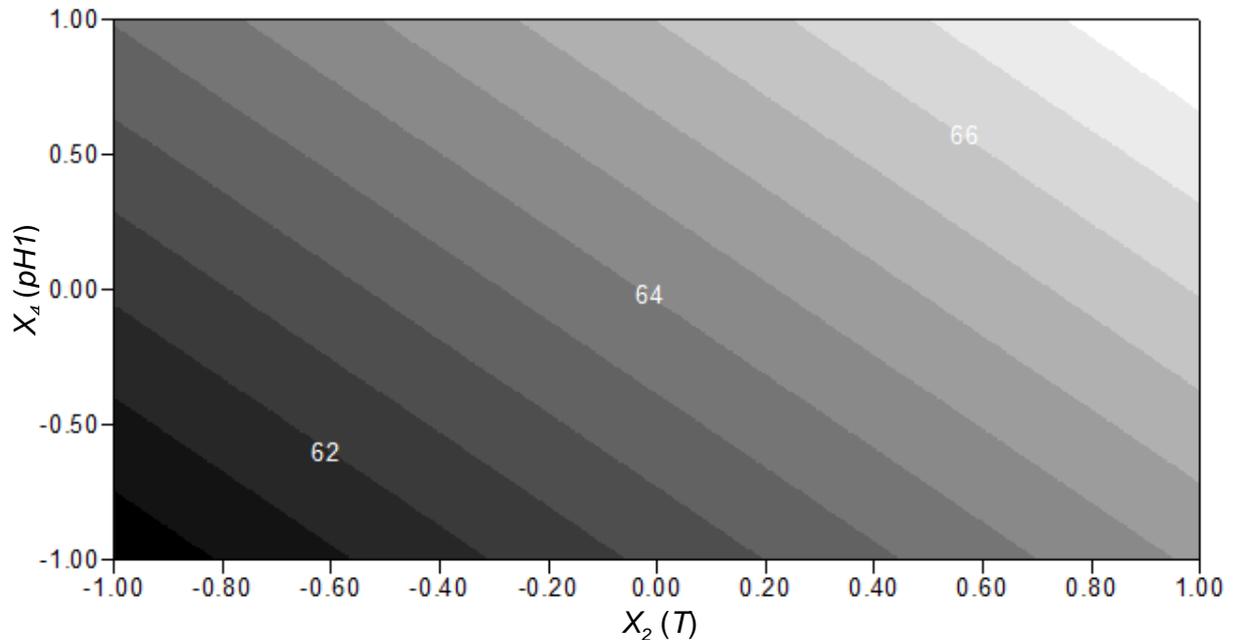


Figura 4.23. Rendimento de isolado protéico calculado com o modelo empírico em função da temperatura simulada na saída do dessolventizador e do pH do primeiro recipiente de solubilização de proteína.

No caso da planta industrial, a FSD parece ter sido tratada no dessolventizador em uma condição mais severa de aquecimento, isto é, permaneceu por um tempo superior a temperaturas mais próximas a de descarga. Sendo assim, o aumento da temperatura até aproximadamente 65 °C favoreceu a desnaturação da  $\beta$ -conglucina e por conseqüência reduziu sua solubilidade (Pelegri e Gasparetto, 2005; Damodaran et al., 2010), ocasionando maiores perdas no tanque de separação de fibras. Em resumo, como inferido na secção 4.1, nas condições de operação na planta, devido ao efeito da temperatura a  $\beta$ -conglucina transitava de um estágio de adaptação conformacional para um estado de desnaturação.

## 5. CONCLUSÕES

A análise de efeitos envolvendo o modelo estatístico sugere que com 92,5 % de probabilidade apenas a temperatura no dessolventizador e o pH do primeiro tanque de solubilização de proteínas de soja tem influência significativa sobre o rendimento de IPS. Nas condições investigadas, com o mesmo grau de confiança mencionado, as oscilações de rendimento de IPS não podem ser atribuídas a variações na quantidade residual de óleo na FSD, no tempo de residência da FSD no dessolventizador, e no pH do segundo tanque de solubilização de proteínas.

O modelo estatístico proposto, o qual representou os dados de processo sem tendências (o que foi indicado pela distribuição Gaussiana de resíduos) e com um desvio relativo médio de apenas 3,9 % entre o conjunto total de valores de  $R$  na planta e estimados, revelou um efeito negativo de  $T$  e positivo de  $pH_1$  sobre  $R$ , respectivamente. O efeito significativo da primeira variável indica que o perfil de solubilidade das proteínas da soja (em particular da  $\beta$ -conglucina) é influenciado pela temperatura, o que é perfeitamente consistente com observações reportadas na literatura. A faixa de operação da planta em termos de temperatura de dessolventização, quando somada a conhecida temperatura de desnaturação da  $\beta$ -conglucina, sugere que as oscilações de  $R$  na planta possam ser atribuídas a variações na recuperação de  $\beta$ -conglucina, a qual provavelmente encontrava-se em transição de um estado de adaptabilidade conformacional para desnaturação. O efeito importante e positivo do pH do primeiro tanque de solubilização sobre  $R$  está em acordo com o esperado pois a maioria das proteínas exibe solubilidade máxima em pH alcalino de 8-9, assim o incremento do pH de 7,1 a aproximadamente 7,6 aumentou a solubilidade e reduziu a quantidade de proteína perdida precipitada com as fibras.

Um modelo de redes neurais artificiais do tipo *perceptron* multicamadas foi desenvolvido para melhorar a predição de  $R$  em função de  $T$  e  $pH_1$ . Uma arquitetura de rede com 3 a 7 neurônios indicou que a melhor configuração foi àquela que envolvia 5 neurônios pois para números superiores a este foi observado sobreajuste, um fenômeno tipicamente reportado na literatura neste tipo de procedimento de modelagem. O modelo MLP sugerido foi capaz de atender as expectativas pois

reduziu o desvio relativo médio de 3,9 % para 1,7 %, considerando todos os valores de  $R$  na planta e estimados, quando comparado ao modelo estatístico.

Ensaio experimentais para simular as operações industriais de obtenção de IPS em condições controladas de laboratório foram conduzidos em diferentes rampas lineares simuladas de temperatura de dessolventização, e em diferentes pH do primeiro tanque de solubilização. A dificuldade de identificar os efeitos das variáveis investigadas foi contornada por aplicação do método de agrupamentos por  $k$ -Médias. Esta análise de *clusters* identificou a existência de dois grupos de dados, os quais envolvem os resultados de rendimento em diferentes pH abaixo de 60 °C e acima de 65 °C. Com base nesta evidência, um ulterior modelo empírico simplificado foi sugerido para correlacionar  $R$  com  $T$  e  $pH_1$  em condições análogas as observadas na planta. Um efeito positivo do pH sobre o rendimento de IPS foi novamente observado, porém o efeito da temperatura foi contrário ao que havia sido revelado pelo modelo estatístico empregado na análise dos dados da planta. Esta discrepância quanto a influência da temperatura é atribuída a diferenças nas rampas de aquecimento da FSD na etapa de dessolventização ocorrida na planta e em laboratório.

## REFERÊNCIAS

Abtahi, S., Aminlari, M. Effect of Sodium Sulfite, Sodium Bisulfite, Cysteine, and pH on Protein Solubility and Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of soybean Milk Base. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 768-4772, 1997.

Anderson, J. A., Rosenfeld, E. *Neurocomputing: Foundation of Research*. MIT press, 1988.

Añón, M. C., Lamballerie, M., Speroni, F. Influence of NaCl concentration and high pressure treatment on thermal denaturation of soybean proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 443-450, 2011.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 16<sup>th</sup> edition, Washington D. C., Horwtis, W. (ed), 1997.

Arruda, S. C. C., Herbert, S. B., Azevedo, A. A., Arruda, M. A. Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-transgenic soybean plants: an analysis of protein species and enzymes. *Journal of Proteomics*, 93, 107-16, 2013.

Balesevic-Tubic, S., Dordevic, V., Miladinovic, J. Stability of Soybean Seed Composition. *GENETIKA*, 43, 2217-2227, 2011.

Barnes, S. The Biochemistry, Chemistry and Physiology of the Isoflavones in Soybeans and their Food Products. *Lymphatic Research and Biology*, 8, 89-98, 2010.

Barros Neto, B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. 2<sup>a</sup> edição, Editora da Unicamp, 1995.

Benincá, C., Peralta-Zamora, P., Camargo, R. C., Tavares, C. R. G., Zanoelo, E. F., Igarashi-Mafra, L. Kinetics of oxidation of ponceau 4R in aqueous solutions by Fenton and photo-Fenton processes. *Reaction Kinetics Mechanisms and Catalysis*, 105, 293-306, 2012.

Berk, Z. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. *FAO Bulletin No. 97*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1992.

Berman, K. H., Harrigan, G. G., Riordan, S. G., Nemeth, M. A., Hanson, C., Smith, M., Sorbet, R., Zhu, E., Ridley, W. P. Compositions of Seed, Forage, and Processed Fractions from Insect-Protected Soybean MON 87701 Are Equivalent to those of Conventional Soybean. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 57, 11360-11369, 2009.

Bispo, V. D. S., Silva, E. S. R. L., Meleiro, L. A. C. Modeling, optimization and control of a FCC unit using neural networks and evolutionary methods. *Engevista*, 16, 70-90, 2014.

Clark, P. K., Proctor, A. Effect of Equilibrium Oil Extraction on the Chemical Composition and Sensory Quality of Soy Flour and Concentrates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 823-826, 1994.

Castro, L. N., Von Zuben, F. J. Optimised Training Techniques for Feedforward Neural Networks. Technical Report DCA-RT 03/98, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Campinas, SP, Brasil, 1998.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Abiove, Cert-ID. Nov./2012. <http://www.conab.gov.br>. Último acesso em 01/02/2013.

Cultivares de soja da EMBRAPA. <http://www.ruralpecuaria.com.br/2013/01/embrapa-novas-cultivares-de-soja-para.html>. Último acesso em 27/04/2014.

Cultivares de soja da EMBRAPA. <http://tecnicodeagronegocio.blogspot.blogspot.com.br/2013/01/cultivares-de-soja-da-embrapa-sinonimos.html>. Último acesso em 27/04/2014.

Damodaran, S., Parkin, K. L., Owen, R. F. Fennema's Food Chemistry. 4th edition, Editora CRC-2007, 2010.

Deak, N. A., Johnson, A. L. Effects of extraction temperature and preservation method on functionality of soy protein. Journal of the American Oil Chemists' Society, 84, 259-268, 2007.

Di Celso, G. M., Rapagnà, S., Prisciandaro, M., Zanoelo, E. F. Kinetics of pyrolysis and combustion of spherical wood particles in a fluidized bed. Energy Conversion and Management, 82, 27-36, 2014.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Cultivares de Soja 2011/2012 Região Centro - Sul do Brasil. <http://www.cpafr.embrapa.br>. Último acesso em 18/03/2014.

Gonzaga, J. C. B. Integração de Processos em Tempo Real para Monitoramento e Controle: Aplicação para Planta de PET. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, SP, 2003.

Greiner, R., Konietzny, U., Villavicencio, A. Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. Food Control, 16, 753-759, 2005.

Guerrero Manso, P. Processing and characterization of soy protein-based materials. Ph.D. Thesis. Universidad del País Vasco, 2012.

Gunstone, F. D., Norris, F. A. in Lipids in Foods, Chemistry, Biochemistry, and Technology, Chapter 11, Pergamon Press, London 1983.

Hagely, K. B., Palmquist, D., Bilyeu, K. D. Classification of Distinct Seed Carbohydrate Profiles in Soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1105-1111, 2013.

Hancock, J. D., Peo, E. R., Lewis A. J. and Crenshaw, J. D. Effects of ethanol extraction and duration of heat treatment of soybean flakes on the utilization of soybean protein by growing rats and pigs. *Journal of Animal Science*, 68, 3233-3243, 1990.

Harano, Y., Yoshidome, T., Kinoshita, M. Molecular mechanism of pressure denaturation of proteins. *The Journal of Chemical Physics*, 129, 145103-1-145103-9, 2008.

Harano, Y., Kinoshita, M. On the physics of pressure denaturation of proteins. *Journal of Physics*, 18, 107-113, 2006.

Hayakawa, I., Linko, Y. Y., Linko, P. Mechanism of high pressure denaturation of proteins. *Food Science & Technology*, 29, 756-762, 1996.

Haykin, S. *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*. 2nd edition, Prentice-Hall, 1999.

Hawley, S. A., Mitchel, R. M. An electrophoretic study of reversible protein denaturation: chymotrypsinogen at high pressures. *Biochemistry*, 14, 3257-3264, 1975.

Herberhold, H., Royer, C. A., Winter, R. Effects of chaotropic and kosmotropic cosolvents on the pressure-induced unfolding and denaturation of proteins: an FT-IR study on staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 43, 3336-3345, 2004.

Huang, G. Q. Sun, Y. T., Xiao, J., Yang, J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*, 135, 534-539, 2012.

Hummer, G., Garde, S., Garcia, A. E., Paulaitiss, M. E., Pratt, L. R. The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 1552-1555, 1997.

Jiang, J., Xiong, XIONG Y. L., Chen, J. pH Shifting Alters Solubility Characteristics and Thermal Stability of Soy Protein Isolate and Its Globulin Fractions in Different pH, Salt Concentration, and Temperature Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8035-8042, 2010.

Johnson, L. A., Lusas, E. W. Comparison of alternative solvents for oils extraction. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 60, 229-242, 1983.

Kashaninejad, M. Ahmadi, M. Daraei, A. Chabra, D. Handling and frictional characteristics of soybean as a function of moisture content and variety. *Powder Technology*, 188, 1-8, 2008.

Kim, E., Kim, S., Kim, S. H., Chung, M. Comparison of Isoflavones and Anthocyanins in Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Seeds of Different Planting Dates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10196-10202, 2012.

Kim, W. W., Rho, H. S., Hong, Y. D., Yeom, M. H., Shin, S. S., Yi, J. G., Lee, M. Determination and Comparison of Seed Oil Triacylglycerol Composition of Various Soybeans (*Glycine max* (L.)) Using H-NMR Spectroscopy. *Molecules*, 18, 14448-14454, 2013a.

Kim, W. S., Gillman, J. D., Krishnan, H. B. Identification of a plant introduction soybean line with genetic lesions affecting two distinct glycinin subunits and evaluation of impacts on protein content and composition. *Mol Breeding*, 32, 291-298, 2013b.

Lah, C. L., Cheryan, M. Protein Solubility Characteristics of an Ultrafiltered Full-Fat Soybean Product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 911-916, 1980.

Lakemond, C. M. M., Jongh, H. H. J., Hessing, M., Gruppen, H., Voragen, A. G. J. Heat denaturation of soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on molecular structure. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 1991-1995, 2000.

Le, D. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Shinozaki, K. Y., Lam-Son, P. T. Genome-Wide Survey and Expression Analysis of the Plant-Specific NAC Transcription Factor Family in Soybean During Development and Dehydration Stress. *DNA Research* 18, 263-276, 2011.

Lee, K. H., Ryub, H. S., Rhee, K. C. Protein Solubility Characteristics of Commercial. Soy Protein Products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 85-90, 2003.

Lee, K. J., Kim, J., Kim, S. H., Ha, B., Lee, B., Kang, S., Kim, D. Alteration of Seed Storage Protein Composition in Soybean *Glycine max* (L.) Merrill] Mutant Lines Induced by  $\gamma$ -Irradiation Mutagenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12405-12410, 2011.

Li, H., Zhua, K., Zhoua, H., Penga, W. Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula. *Food Chemistry*, 132, 808-814, 2012.

Lin, S., Lakin, A. L. Thermal Denaturation of Soy Proteins as Related to Their Dye-Binding Characteristics and Functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 872-878, 1990.

List, G. R., Mounts, T. L., Lanser, A. C., Holloway, R. K. Effect of Moisture, Microwave Heating, and Live Steam Treatment on Phospholipase D Activity in Soybeans and Soy Flakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 867-871, 1990.

Liu, Z. S., Chang, S. K. C., Li, L. T., Tatsumi, E. Effect of selective thermal denaturation of soybean proteins on soymilk viscosity and tofu's physical properties. *Food Research International*, 37, 815-822, 2004.

Mariani, P. D. S., Allganer, K., Oliveira, F.B., Cardoso, E. J. B. N., Innocentini-Mei, L. H. Effect of soy protein isolate on the thermal, mechanical and orphological properties of poly (3-caprolactone) and corn starch blends. *Polymer Testing*, 28, 824-829, 2009.

Mattil, K. F. Composition, Nutritional, and Functional Properties, and Quality Criteria of Soy Protein Concentrates and Soy Protein Isolates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51, A81-A84, 1974.

Mauri, A. N. and Añón, M. C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1064-1072, 2006.

Meleiro, L. A. C. Projeto e aplicação de controladores baseados em modelos lineares, neurais e nebulosos. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, SP, 2002.

Miladinovic, J., Burton, J. W., Balesevic-Tubic, S., Miladinovic, D., Djordjevic, V., Djukic, V. Soybean breeding: comparison of the efficiency of different selection methods. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*, 35, 469-480, 2011.

Mitidieri, F. E., Joge R. Wagner, J. R. Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. *Food Research International*, 35, 547-557, 2002.

Miura, H., Wijeyathungam, K., Gemma, T. Variation in seed yield of soybean as affected by parterns. *Japan Journal of Crop Science*, 56, 652-656, 1987.

Montgomery, D. C. Design and Analysis of Experiments. 5th edition, John Wiley & Sons, New York, 2001.

Ortiza, S. E. M., Wagner, J. R. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. Food Research International, 35, 511-518, 2002.

Özgen, Ö. A., Yılmaz, F., Murato, K. PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. Food Control, 32, 525-531, 2013.

Pelegrine, D. H. G., Gasparetto, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. Food Science & Technology, 38, 77-80, 2005.

Piper, E. L., Boote, K. J. Temperature and cultivar effects on soybean seed oil and protein concentrations. Journal of the American Oil Chemists' Society, 76, 1233-1241, 1999.

Renkema, J. M. S., Lakemond, C. M.M., Jongh, H. J., Gruppen H., Vliet, T. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. Journal of Biotechnology, 79, 223-230, 2000.

Renkema, J. M. S., Gruppen, H., Vliet, T. V. Influence of pH and Ionic Strength on Heat-Induced Formation and Rheological Properties of Soy Protein Gels in Relation to Denaturation and Their Protein compositions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 6064-6071, 2002.

Rodrigues, C. E. C., Aracava, K., Abreu, F. N. Thermodynamic and statistical analysis of soybean oil extraction process using renewable solvent. International Journal of Food Science and Technology, 45, 2407-2414, 2010.

Sindirações. Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. Guia de Métodos Analíticos, método n° 51, 2009.

StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system). Version 7.1, 2005.

Sze-Tao, K. W. C., Sathe S. K. Effects of sodium dodecyl sulfate, guanidine hydrochloride, urea, and heat on denaturation of sulfur rich protein in soybeans (*Glycine max* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 25, 483-492, 2001.

Tandang, M. R. G., Atsuta, N., Maruyama, N., Adachi, M., Utsumi, S. Evaluation of the Solubility and Emulsifying Property of Soybean Proglycinin and Rapeseed Procruciferin in Relation to Structure Modified by Protein Engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8736-8744, 2005.

Turgeon, S. L., Gauthier, S. F., Molle, D., Léonil, J. Interfacial properties of tryptic peptides of b-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 669-675, 1992.

United States Department of Agriculture (USDA). World Agricultural Supply and Demand Estimates. <http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/wasde/wasde-03-10-2014.pdf>. Último acesso em 30/03/2014.

Vajpai, N., Nisius, L., Wiktor, M., Grzesiek, S. High-pressure NMR reveals close similarity between cold and alcohol protein denaturation in ubiquitin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 368-376, 2012.

Wagner, J. R., Sorgentini, D. A., Anón, C. M. Relation between Solubility and Surface Hydrophobicity as an Indicator of Modifications during Preparation Processes of Commercial and Laboratory-Prepared Soy Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3159-3165, 2000.

Wang, C., Ma, Q., Pagadala, S., Sherrard, M. S., Krishnan, P. G. Changes of Isoflavones During Processing of Soy Protein Isolates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 337-341, 1998.

Xiao, X., Honghong, W., Zhou, X., Sheng, X., He, J., Shen, W., Zhou, G., Huang, M. The combination of quantitative PCR and western blot detecting CP4-EPSPS component in Roundup Ready soy plant tissues and commercial soy-related foodstuffs. *Journal of Food Science*, 77, C603-8, 2012.

Yamabe, S., Kobayashi-Hattori, K. Kaneko, K. Effect of soybean varieties on the content and composition of isoflavone in rice-koji miso. *Food Chemistry*, 100, 369-374, 2007.

Yuan, B., Ren, J., Zhao, M., Luo, D., Gu, L. Effects of limited enzymatic hydrolysis with pepsin and high-pressure homogenization on the functional properties of soybean protein isolate. *Food Science and Technology*, 46, 453-459, 2012.

Zanoelo, E. F., Di Celso G. M., Kaskantzis, G. Drying kinetics of mate leaves in a packed bed dryer. *Biosystems Engineering*, 96, 4, 487-494, 2007.

Zanoelo, E. F., Rocha, S. C. S., Rezende, D. F. Influence of operating parameters on the average spout width in two-dimensional spouted beds. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 82, 1, 89-93, 2004.

Zhang, J., Wu, N., Lan, T., Yang, X. Improvement in emulsifying properties of soy protein isolate by conjugation with maltodextrin using high-temperature, short-time dry-heating Maillard reaction. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 460-467, 2014.