



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

RAVENA ODETE SILVA ARAÚJO

**EFEITO DO TEMPO NO GRAU DE HIDRÓLISE E NA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO PROTÉICO
DE OKARA**

Palmas/TO
2019

RAVENA ODETE SILVA ARAÚJO

**EFEITO DO TEMPO NO GRAU DE HIDRÓLISE E NA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO PROTÉICO
DE OKARA**

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

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

Palmas/TO
2019

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

A663e Araújo, Ravena Odete Silva.

Efeito do tempo no grau de hidrólise e na atividade antioxidante do hidrolisado proteico de okara. / Ravena Odete Silva Araújo. – Palmas, TO, 2019.

26 f.

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

Orientador: Tarso da Costa Alvim

Coorientadora : Caroline Roberta Freitas Pires

1. Soja. 2. Okara. 3. Hidrólise enzimática. 4. Proteases. I. Título

CDD 664

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

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAVENA ODETE SILVA ARAÚJO

EFEITO DO TEMPO NO GRAU DE HIDRÓLISE E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO PROTÉICO DE OKARA

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

Data de aprovação: 16 / 12 / 2019

Banca Examinadora



Tarso da Costa Alvim

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

Caroline Roberta Freitas Pires

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

Cilene Mendes Reges

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

Mestranda Viviane Ferreira dos Santos

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

Dedico este trabalho, ao meu irmão, Amaury Dias Araújo (in memoriam) que não está mais entre nós, mas nunca me esquecerei do seu rosto, do seu sorriso e do seu jeito leve de encarar a vida. Tudo o que me ensinou está guardado na mente e no coração e será levado comigo para o resto da minha vida, até o dia de nos encontrarmos novamente.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por me guardar e proteger nesta jornada, por ter me amparado e dado força para superar as dificuldades e manter firme nessa caminhada.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Agradeço a minha mãe, Maria da Penha, minha heroína que me apoiou, me incentivou nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Ao meu pai João Mendes, que encheu meu coração de amor e esperança que me proporcionou a tranquilidade que tanto precisava para vencer essa etapa. Sem a força de vocês eu não conseguiria seguir em frente.

Registro também meu agradecimento ao meu amigo Silvânio Mota por ser essa voz que me fez continuar. Obrigada, por acreditarem mim.

Obrigada meu irmão Diogo Ramon, que me fez entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação do presente!

Aos amigos que Deus colocou na minha vida, que deram palavras de coragem, que permaneceram ao meu lado nos bons e nos momentos difíceis e tive o prazer de tê-los me acompanhando e participando dessa jornada, Lorrana Carneiro, Emanuel Ferreira, Evelanne Soares, Prysley Veloso, Carlos Eduardo e Daur Dias.

Ao meu orientador Tarso da Costa Alvim, por quem eu tenho grande respeito e admiração, agradeço pela paciência e pelos ensinamentos para a vida.

Agradeço a minha Professora Caroline Roberta e a mestrandia Viviane Ferreira pela oportunidade e por acreditar em mim, por ter me ajudado a crescer pessoalmente, academicamente e profissionalmente e por fazer parte desse momento tão importante da minha vida.

RESUMO

A soja é uma leguminosa de grande importância para a saúde humana, destacando-se pelo seu baixo custo, sua vasta produção e valor nutricional, tendo como característica principal a sua origem vegetal. Do extrato hidrossolúvel da soja extrai-se uma polpa amarelada denominada okara, composta por proteínas, fibras, lipídeos e carboidratos. Na indústria alimentícia a okara ainda não é vista como um subproduto, sendo na maioria das vezes descartada, porém este produto é rico em proteínas podendo ser utilizado para enriquecer outros alimentos. Sabendo disso são realizados procedimentos como a hidrólise enzimática para quebrar as proteínas liberando peptídeos bioativos. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do tempo de hidrólise de diferentes enzimas no grau de hidrólise e atividade antioxidante da okara. No presente trabalho utilizaram-se as proteases comerciais Bromelina e Papaína para hidrolisar as proteínas presentes em diferentes tempos de hidrólise (30, 60, 150 minutos). Observou-se que o tempo foi um fator determinante para o grau de hidrólise e atividade antioxidante. Os ensaios com amostras de okara variando o tempo e as enzimas foram obtidas diferentes grau de hidrólise e em ambas as enzimas mostraram que em 60°C e 150 minutos foram suficientes para as proteases hidrolisar todas as amostras. Os hidrolisados de okara obtidos com de 150 minutos de hidrólise enzimática usando a enzima Bromelina apresentaram melhores resultados no GH em relação as outras amostras. Entretanto, a atividade antioxidante dos hidrolisados de okara não apresentaram diferenças significativas.

Palavras-chave: Soja. Okara. Hidrólise enzimática. Proteases.

ABSTRACT

Soy is a legume of great importance for human health, standing out for its low cost, its vast production and nutritional value, having as its main characteristic its plant origin. From the water-soluble extract of soy, a yellowish pulp called okara is extracted, consisting of proteins, fibers, lipids and carbohydrates. In the food industry, okara is still not seen as a by-product, being mostly discarded, but this product is rich in proteins and can be used to enrich other foods. Knowing this, procedures such as enzymatic hydrolysis are performed to break down proteins releasing bioactive peptides. The aim of this work was to evaluate the effect of the hydrolysis time of different enzymes on the degree of hydrolysis and antioxidant activity of okara. In the present work the commercial proteases Bromelain and Papain were used to hydrolyze the proteins present in different hydrolysis times (30, 60, 150 minutes). It was observed that time was a determining factor for the degree of hydrolysis and antioxidant activity. The tests with okara samples varying the time and the enzymes were obtained with different degrees of hydrolysis and in both enzymes they showed that at 60°C and 150 minutes were enough for the proteases to hydrolyze all the samples. The okara hydrolysates obtained with 150 minutes of enzymatic hydrolysis using the Bromelain enzyme showed better results in GH compared to other samples. However, the antioxidant activity of okara hydrolysates did not show significant differences.

Keywords: Soy. Okara. Enzymatic hydrolysis. Proteases.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tempo de Hidrólise x Grau de Hidrólise.....	20
Tabela 2: Porcentagem de Grau de Hidrólise para as enzimas Bromelina e Papaína em diferentes tempos de reação	21
Tabela 3: Tempo de Hidrólise x Atividade Antioxidante	Error! Bookmark not defined.
Tabela 4: Porcentagem de Atividade Antioxidante para as enzimas Bromelina e Papaína ...	22

LISTA DE SIGLAS

GH- Grau de hidrólise

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

ORAC- Oxygen Radical Absorbance Capacity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1. Soja	13
3.2. Okara.....	14
3.3. Hidrólise Protéica.....	15
3.4. Proteases	15
3.5. Atividade antioxidante	16
4. METODOLOGIA	17
4.1. Obtenção da okara	17
4.2. Preparo das amostras.....	18
4.3. Hidrólises enzimáticas.....	18
4.4. Grau de hidrólise.....	18
4.5. Atividade antioxidante	18
4.6. Análise Estatística	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1. Resultados para Grau de Hidrólise	19
5.2. Resultados para atividade antioxidante	21
6. CONCLUSÃO.....	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

A soja é o principal grão de cultivo predominante no Brasil, uma vez que se destaca como cultura do agronegócio nacional, pelo fato de ser amplamente distribuída e comercializada tanto internamente quanto externamente. A soja tem grandes valores nutricionais nas indústrias alimentícias, não só pela composição de seus derivados, mas também pelo consumo em massa de sementes, fertilizantes e defensivos da agricultura brasileira (HIRAKURI, 2018).

A soja também é uma leguminosa de grande importância para a saúde humana, destacando-se pelo seu baixo custo, sua vasta produção e valor nutricional, tendo como característica principal a sua origem vegetal. Os grãos de soja são formados basicamente por carboidratos, isoflavonas, lipídios, minerais, vitaminas, aminoácidos, uma vez que todos estes atuam de maneira benéfica e homeostática ao organismo, além de grandes benefícios a saúde, como prevenção e auxílio no controle de diversas doenças (SILVA et al., 2019).

Pereira (2017), em seu trabalho citou que dentre os alimentos fabricados a partir da soja, tem-se o extrato hidrossolúvel, e o isolado protéico, bastante utilizado nas indústrias alimentícias como forma e fonte de obtenção de atividades biológicas e peptídeos bioativos.

O extrato hidrossolúvel é um derivado da soja, gerado a partir da trituração, maceração e prensagem dos grãos, sendo popularmente conhecido como “leite de soja”. Através desta produção com o uso de extrato aquoso, tem-se a obtenção de um resíduo chamado de okara, designada como uma polpa amarelada e rica em fibras alimentares (PAULA et al., 2019).

A okara é um subproduto que vem ganhando bastante espaço em nossa alimentação, pois permite o seu uso de forma alternativa. A okara é rica em bioativos, que auxiliam no controle e prevenção de diabetes, hiperlipidemias e obesidade. Além disso, é rica em água, ajudando no controle e funcionamento do intestino juntamente com as fibras, proteínas e lipídios (SANTOS, 2018).

Evangelho (2014) citou que pesquisadores investigaram a ação de hidrolises enzimática em proteínas vegetais desejando obter uma melhor funcionalidade e propriedades das proteínas, onde esse efeito pode alterar analogias e a estrutura das proteínas podendo melhorar a sua solubilidade.

A hidrólise enzimática é formada por um grupo significativo de enzimas que tem participação ativa neste processo utilizando as proteases mais comercializadas nas indústrias,

bromelina, papaína e muitas outras. Todas essas enzimas devem ter suas performances otimizadas, respeitando seus parâmetros físico-químicos, que são pH, temperatura e meio aquoso, pois se utilizadas de maneira adequada não conseguirão alterar de forma produtiva o sítio ativo do sistema sob reação hidrolítica (FARIAS, 2017).

Os hidrolisados além de desempenharem atividade antioxidante, são essenciais para o metabolismo, uma vez que são ricos em proteínas e peptídeos bioativos. Possuem grandes cadeias de aminoácido que diminuem a atividade de radicais livres no organismo, diminuindo assim o risco de doenças como câncer e artrite (PEREIRA et al, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do tempo de hidrólise de diferentes enzimas no grau de hidrólise e atividade antioxidante da okara.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a porcentagem do grau de hidrólise da okara utilizando a enzima bromelina
- Determinar a porcentagem do grau de hidrólise da okara utilizando a enzima papaína
- Determinar a porcentagem de atividade antioxidante pelo método de DPPH dos hidrolisados obtidos pela hidrólise enzimática da bromelina e da papaína

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Soja

A soja (*Glycinemax*) pertence a classe das leguminosas, sendo utilizada há séculos nos países orientais como alimento básico em dietas. Seus grãos são ricos em proteínas, cálcio e também a maior fonte alimentar de isoflavonas. As isoflavonas são formadas por fitoestrógeno, que são substâncias que ajudam no funcionamento do trato gastrintestinal, além

de ser eficiente na prevenção do câncer, menopausa, osteoporose e doenças cardiovasculares (ANDRADE et al., 2018).

Segundo dados da EMBRAPA a safra de 2019/20 teve uma produção mundial de 362,075 milhões de toneladas. O Brasil se configura atualmente entre os maiores produtores de soja do mundo com uma produção de 114,843 milhões de toneladas, ficando atrás apenas dos EUA com 123,664 milhões de toneladas produzidas, sendo a leguminosa mais cultivada em várias regiões do país. Os estados com mais produtividade de soja são Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Paraná com 32,455 milhões de toneladas, 19,187 milhões de toneladas e 16,253 milhões de toneladas, respectivamente.

Vieira et al., (2018) apontam a soja como fonte produtora de substâncias chamadas fitoquímicos, compostos principalmente de flavonóides, onde há uma relação importante no consumo de soja e a diminuição dos riscos de doenças crônicas não infecciosas, como as patológicas, cardiovasculares, câncer e doenças ósseas.

Contudo, apesar de sua grande importância para a alimentação, ainda é pouco utilizada na dieta dos brasileiros. Os motivos são devido à presença de lipoxigenases, enzimas que tornam seu odor e sabor desagradável, e também pelo fato de conter diversas substâncias orgânicas nas sementes mais a presença de oligossacarídeos do tipo estaquiiose, rafinose e verbascose. Estes componentes contribuem para que a soja seja usada na extração de óleo e seus subprodutos na alimentação animal, atuando como fonte de energia e utilização protéica (FARIAS, 2017).

Por ser um grão multifuncional a soja dá origem a vários subprodutos e produtos como isolados protéicos, tofu (“queijo de soja”), farinhas, extrato hidrossolúvel e um subproduto oriundo do processo da extração do extrato hidrossolúvel de soja, denominado okara. (BOMDESPACHO, 2010).

3.2. Okara

A Okara é uma polpa amarelada que possuem em sua composição proteínas, fibras, lipídeos, carboidratos e é um alimento obtido através da extração do extrato hidrossolúvel de soja. Para cada 1 kg de soja utilizada no processamento de obtenção do extrato hidrossolúvel obtém 1,1kg de okara fresca, possuindo uma atividade de água alta e portanto apresenta uma rápida deterioração. (PEREIRA, 2017).

De acordo com Yoshida et al., (2014) por possuir um baixo valor de mercado a okara geralmente é descartada pela indústria alimentícia ou utilizada para alimentação animal

embora apresente um teor protéico alto. Na indústria é visto como um problema, pois as medidas sustentáveis são tomadas de forma incorreta o que gera maior poluição ao meio ambiente.

A okara além de ser rico em proteínas e lipídios, possui vitaminas, minerais como sódio, ferro, cobre, zinco, aminoácidos essenciais e fitoesteróis. A fibra é o componente mais abundante do okara, tendo grandes concentrações de fibras solúveis e fibras insolúveis em sua quantificação (FIGUEIREDO et al., 2019).

Aokara possui valores nutricionais e tecnológicos. Atua como antioxidantes na prevenção de doenças. No entanto, a okara possui por sua vez, alguns componentes com efeitos antinutricionais, que se ingeridos em grandes proporções, como no caso do ácido fítico, poderá reduzir a oferta de ferro no organismo (PEREIRA, 2017).

Os usos da okara em produções e formulações já foram mencionados em estudos como na elaboração de pão de queijo, na formulação de hambúrguer, na produção de cookies e formulação de chocolate (BARBOSA et al., 2013; PAULA et al., 2019; YOSHIDA et al., 2014; CANDIA, 2014).

3.3. Hidrólise Protéica

Os hidrolisados protéicos são bastante utilizados como fontes e armazenamento de peptídeos e aminoácidos, podendo enriquecer a alimentação humana e animal, além de ser fonte de nutrientes no cultivo de microrganismos, apresentam elevada digestibilidade, bem como propriedades físico-químicas, funcionais e nutricionais ao organismo do ser humano (ANDRADE et al., 2018).

A hidrólise enzimática utilizando as proteases é a mais usada para obter peptídeos bioativos nos hidrolisados, sendo uma técnica segura e rápida, melhorando as propriedades biológicas e funcionais e agregando valor aos subprodutos (CAVALLARO, 2019).

Levando em consideração a aplicabilidade dos hidrolisados na indústria, pode-se inseri-los em formulações de dietas enterais para alimentação infantil ou de adultos enfermos, bem como na suplementação de atletas e em dietas voltadas para controle de peso (MORAIS, 2013).

3.4. Proteases

Conforme Souza (2012), as proteases são enzimas pertencentes a classe das hidrolases, da subclasse das peptídeo-hidrolases ou peptidases. As proteases, por uma reação

de hidrólise, quebram a proteína em peptídeos e aminoácidos, adicionando uma molécula de água a ligação peptídica. Deve-se considerar sua importante aplicabilidade na biotecnologia, pois consistem em um dos mais importantes grupos de enzimas, sendo representados por mais de 60% do mercado mundial de enzimas de uso industrial. Sua utilização se dá em diversos campos do ramo industrial como por exemplo na elaboração de alimentos e bebidas, desenvolvimento de detergentes, processamento de couro e pele, amaciamento de carnes, formulação de medicamentos entre outros.

Entre as proteases utilizadas na hidrólise proteica de alimentos, estão disponíveis para a engenharia de alimentos a papaína, a pepsina, a tripsina, a quimiotripsina, a pancreatina e a alcalase e a bromelina.

A bromelina é uma enzima digestiva, da família cisteíno-proteases, que hidrolisa as ligações peptídicas das proteínas, sendo encontrada principalmente nas folhas, frutos, caule e tecidos do abacaxi (*Ananas comosus*). Por ser uma enzima flexível e fundamental em atividades proteolíticas, é bastante utilizada nas indústrias alimentícias e farmacêuticas de maneiras distintas (ANDRADE et al., 2018)

A bromelina é muito utilizada nas indústrias alimentícias para romper as fibras no processo de amaciamento da carne, para clarificação de cerveja e no processo da fabricação de pães para relaxar e uniformizar a massa (ABREU, 2019).

A papaína é uma enzima alcalóide, proveniente do látex do mamão verde (*Caricacarpaya*), facilmente encontrado no Brasil. Trata-se de uma enzima proteolítica muito empregada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Apresenta hidrólise catalítica de amplo espectro de especificidade em relação aos peptídeos, aminas, ésteres e tioésteres. Têm função anti-inflamatória, desbridante e cicatrizante, além de ser um potente digestivo de material morto, com aumento de sua eficácia quando associado a ativadores que potencializam a digestão, como a uréia, que altera a proteína por ação solvente desnaturando o material e permitindo que o mesmo fique mais susceptível a digestão enzimática (ARAÚJO et al., 2019).

3.5. Atividade antioxidante

Segundo Casarin (2018), o oxigênio causa danos ao organismo, embora seja indispensável para o corpo humano, pois o metabolismo celular proporciona a formação de radicais livres. Os RL são prejudiciais ao organismo podendo desenvolver doenças como, câncer, diabetes, artrite e aterosclerose.

Os antioxidantes são substâncias que desempenham importante papel no retardo das reações de degradação oxidativa no organismo, atuando diretamente na inibição dos radicais livres e complexação de metais. Eles podem apresentar em suas propriedades diferentes mecanismos protetivos, sendo classificados em duas categorias: antioxidantes primários e antioxidantes secundários. Os antioxidantes primários são compostos que retardam ou inibem a oxidação inativando os radicais livres por meio da doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, transformando os mesmos em substâncias estáveis. Já os antioxidantes secundários apresentam em sua composição uma grande variedade em seu mecanismo de ação como: ligação de íons metálicos (alteração da valência); conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicais ou absorção de radiação ultravioleta (PEREIRA, 2017)

Os métodos mais utilizados geralmente para medir a atividade antioxidante são ABTS, ORAC E DPPH por possuírem mecanismos diferentes. ABTS baseia-se na transferência de elétrons e o método de ORAC baseia-se na transferência de átomos (SOUZA, 2013).

O método de DPPH fundamenta-se na diminuição do radical DPPH na presença de um antioxidante doador de elétron ou hidrogênio, de coloração púrpura e com absorção máxima em etanol na faixa de 515 a 528nm, por um composto antioxidante, com formação de hidrazina de coloração amarelada, onde a capacidade antioxidante é correspondente a diminuição do radical DPPH presentes nas amostras analisadas (FARIAS,2017).

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção da okara

Os grãos de soja foram obtidos no mercado da cidade de Palmas, atentando-se a integridade da embalagem e a data de validade. As análises foram feitas no laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, campus Palmas. Os grãos de soja foram selecionados quanto á ausência de injúrias e sujidades. A sanitização dos grãos foi realizada com hipoclorito na concentração de 100ppm, permanecendo em contato com a solução por um período de 15 minutos.

.Para a obtenção da okara foi utilizado o método proposto por Cunha (2007). Coletou-se 350g de grãos de soja e adicionou-se,5 litros de água deixando de molho por 60 minutos, em seguida, foram fervidos com 1,5 litros de água por 5 minutos, descartando logo após a água do cozimento. Os grãos foram lavados cuidadosamente em água corrente e

submetidos ao um novo cozimento por 5 minutos em 3 litros de água, já em ebulição. Os grãos foram resfriados até 40°C e triturados por 1 minuto em um liquidificador doméstico.

Os grãos triturados foram colocados em uma panela para cozinhar por 10 minutos mexendo constantemente. A massa foi filtrada em peneira doméstica e em seguida passada na organza. As amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas em freezer -20°C até o momento das análises

4.2. Preparo das amostras

Foram pesados em balança analítica 5g de okara em tubos Falcon de 15 ml. As amostras foram solubilizadas nas concentrações de 1/10 (g de sólidos para ml de água) e em seguida adicionou-se as enzimas bromelina e papaina nas concentrações de 1/100 (g de proteína da enzima para g de proteína substrato).

4.3. Hidrólises enzimáticas

Com as amostras já preparadas, o banho-maria (TE-054 mag) foi ajustado a uma temperatura de 60°C e as amostras foram submetidas em tempo de 30, 60 e 150 minutos de hidrólises. Logo após o término das hidrólises as enzimas foram inativadas em água fervente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos em uma centrífuga (Centrifuge Baby® I, model 206), afim de separar o sobrenadante da parte insolúvel da amostra. Depois de centrifugadas e separadas as frações, a parte sobrenadante foi transferida para tubos identificados e a parte sólida da amostra foi descartada.

4.4. Grau de hidrólise

A determinação do grau de hidrólise foi realizada com o reagente OPA de acordo com Church et al.,(1983) Misturou-se 25ml de tetraborato de sódio, 2,5ml de dodecil sulfato de sódio a 20% (p/v) para 25ml de água destilada, 40mg de OPA dissolvido em 1ml de metanol e 100µl de 2-mercaptoetanol, completando o volume para 50ml com água destilada.

Para o preparo das amostras para a leitura do grau de hidrólise foram pipetados 10µl da amostra, 120µl de água destilada e 1ml do reagente OPA em tubos de ensaio. As leituras das absorbâncias foram feitas com intervalos de 2 minutos em espectrofotômetro a 340nm.

4.5. Atividade antioxidante

A metodologia empregada na determinação da atividade antioxidante foi baseada na

extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH 60 μM), proposta por Rufino *et al.* (2009), com algumas adaptações em relação ao cálculo, calculando-se o percentual de sequestro do radical DPPH a partir do padrão. As amostras foram diluídas pipetando-se 50 μl da amostra e 950 μl de água destilada. Em seguida adicionou-se 350 μl de amostra diluída a 875 μl de solução de DPPH. Para o controle, foram adicionados 350 μl de álcool etílico, juntamente com 875 μl de solução de DPPH. As leituras foram realizadas após 60 minutos, em espectrofotômetro, a 517nm e os resultados foram expressos em percentual de sequestro de radical livre (%SRL), conforme equação a seguir: $\%SRL = (Ac - Am) \times 100 / Ac$ em que Ac = absorbância do controle; Am = absorbância da amostra.

Os resultados foram expressos em percentual de sequestro de radical livre (%SRL), conforme equação a seguir:

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

em que

Ac = absorbância do controle
Am = absorbância da amostra

4.6. Análise Estatística

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 2 x 4 sendo que o primeiro fator corresponde aos dois tipos de enzimas (bromelina e papaína) e o segundo fator aos quatro tempos de hidrólise (0,30, 90 e 150 minutos de hidrólise). Foram realizadas três repetições para cada tratamento. Os resultados da avaliação do grau de hidrólise e da atividade antioxidante foram analisados estatisticamente pelo Programa Sisvar, utilizando-se análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparação dos resultados médios das amostras (FERREIRA, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados para Grau de Hidrólise

De acordo com os resultados obtidos o grau de hidrólise foi influenciado significativamente pelo tipo de enzima, pela interação da tipologia enzimática e tempo de

hidrólise.

De acordo com a Tabela 1, observou-se que houve diferença estatística do grau das amostras de acordo com o tempo de hidrólise. Foi possível observar que o aumento do tempo ocasionou um acréscimo significativo no grau das amostras que foram submetidas a 150 minutos de hidrólise. Estudo de Paiva(2014) observou-se que hidrolisados protéicos de pirarucu utilizando enzimas comerciais, apresentaram uma alta porcentagem no GH. Exames realizados por Pereira (2017) onde utilizou a enzima alcalase e submetido os hidrolisados protéicos de okara em três tempos diferentes, obteve-se resultados baixos, médios e alto conforme o tempo que a hidrólise aumentava.

Tabela 1: Tempo de Hidrólise x Grau de Hidrólise

Tempo de hidrólise	Grau de Hidrólise
Tempo 0	1,33 ^d
30 min	1,83 ^c
90 min	2,60 ^b
150min	3,29 ^a

Na Tabela 2, observou-se que nessas condições de hidrólise a Bromelina apresentou melhores resultados comparada com a Papaína. De acordo com estudos de Alves (2015) a Papaína e a Bromelina apresenta atividade proteolítica em valores de pH entre 5,0 e 9,0 e 6,0 e 8,0, respectivamente. Sendo que a enzima Papaína utilizada na pesquisa possui um valor de pH 5,0 e o substrato analisado okara, possui um pH de 7,57. Provavelmente esse fator pode justificar o baixo desempenho da enzima Papaína se comparada com a enzima Bromelina. Alves (2015) também comparou as enzimas proteolíticas Papaína e Bromelina com variações de tempo, temperatura, enzima/substrato em amostras de fígado suíno, mostrou que o tempo de 4 horas é o suficiente para as duas enzimas atingir o grau de hidrolise desejado, onde nessas condições a enzima Bromelina teve uma ação melhor quando comparada com a enzima Papaína.

Tabela 2: Porcentagem de Grau de Hidrólise para as enzimas Bromelina e Papaína em diferentes tempos de reação

Tempo	Enzimas	
	Bromelina	Papaína
Tempo 0	1,96% ^{Ca}	0,70% ^{Cb}
30 min	2,57% ^{Ba}	1,08% ^{Cb}
90 min	2,92% ^{abA}	2,27% ^{Bb}
150 min	3,40% ^{Aa}	3,18% ^{Aa}

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

Em consequência a alta taxa reacional com a grande quebra de ligações peptídicas em um aumento considerável do GH observa-se que entre os tempos de 90 e 150 minutos da presente tabela, a taxa de reação se apresenta diminuída até ficar constante. Conforme Pereira (2016), explica essa ocorrência como uma alta disponibilidade de substrato no início da reação, que então sendo clivados rapidamente ocorre uma redução da velocidade de reação. Tal fato pode ser devido a uma possível inibição das enzimas pelos produtos da própria hidrólise.

5.2. Resultados para atividade antioxidante

De acordo com a tabela 3, o tempo de hidrólise das amostras influenciou diretamente na atividade antioxidante dos hidrolisados, aumentando de modo considerável os resultados entre os tempos 0 e 90 minutos, respectivamente.

Tabela 3: Tempo de Hidrólise x Atividade Antioxidante

Tempo de hidrólise	Atividade antioxidante
Tempo 0	6,02% ^c
30 min	8,46% ^b
90 min	12,81% ^a
150min	12,56% ^a

FONTE: AUTOR (2019)

A atividade antioxidante dos hidrolisados necessitam de algumas condições como tempo estimado, massa molecular dos peptídeos liberados durante o processo e condições aplicadas

durante a hidrólise das enzimas utilizadas. Alguns estudos afirmam que o aumento do GH resultou no aumento da atividade antioxidante dos hidrolisados. Contudo, outros estudos apresentam redução na atividade antioxidante com o aumento do GH dos hidrolisados. As propriedades das proteases agem nos resultados das características dos hidrolisados, podendo afetar diretamente no tamanho, na composição e nas seqüências dos aminoácidos, influenciando assim, sua atividade antioxidante dos hidrolisados protéicos. A aplicação de diferentes enzimas na formação dos hidrolisados de proteína de soja resulta na produção de peptídeos de diferente tamanhos, o que influencia na atividade antioxidante dos hidrolisados (PEREIRA, 2017). Madruga (2018) demonstrou que pães enriquecidos com hidrolisados de chia apresentaram maior capacidade antioxidante pelo método de DPPH em relação às amostras de pães, sem adição do hidrolisado.

Na tabela 4 é possível observar que, as enzimas Bromelina e Papaína tiveram atividade antioxidante semelhante os dados obtidos, sendo influenciada apenas pelo tempo da hidrólise. Os tempos entre 0 e 90 minutos se diferenciaram entre si considerando a comparação dos dados das duas enzimas, tendo um aumento relevante na determinação da atividade antioxidante das amostras. Os tempos de 150 minutos não foram estatisticamente relevantes para a determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados protéicos do okara. Estudos de Pereira (2017) mostraram que a atividade antioxidante aumentou em 20% conforme o aumento do tempo de hidrólise de 15 para 180 minutos. O aumento do GH das amostras de 5,7% para 18,3% mostrou um aumento significativo da atividade antioxidante dos hidrolisados de okara.

Tabela 4: Porcentagem de Atividade Antioxidante para as enzimas Bromelina e Papaína

Tempo	Enzimas	
	Bromelina	Papaína
Tempo 0	5,47% ^{Ca}	6,57% ^{bA}
30min	8,38% ^{Ba}	8,54% ^{bA}
90min	12,31% ^{aA}	13,32% ^{aA}
150min	12,31% ^{aA}	12,81% ^{Aa}

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

6. CONCLUSÃO

Por fim, os resultados obtidos por meio desse trabalho de pesquisa contemplaram os objetivos propostos inicialmente a esse estudo. Por conhecimento desses dados é relevante dizer que o tempo influencia tanto no grau de hidrólise, quanto na atividade antioxidante dos hidrolisados protéicos de okara. Os ensaios com amostras de okara variando o tempo e as enzimas foram obtidas diferentes GH e em ambas as enzimas mostraram que em 60°C e 150 minutos é o suficiente para as proteases hidrolisar todas as amostras.

Os hidrolisados de okara obtidos com um tempo de 150 minutos de hidrólise enzimática usando a enzima Bromelina apresentaram melhores resultados no GH em relação às outras amostras. Entretanto, a atividade antioxidante dos hidrolisados de okara não tiveram diferença significativa entre as enzimas, porém, o tempo de hidrólise influenciou diretamente em cada uma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Danielly Cristina Alves. Desenvolvimento de membrana de afinidade para a separação de bromelina. 2019. 86f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química). - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte: UFMG, 2019.

ANDRADE, C. M. F. OLIVEIRA, L. N. et. al. Análise do consumo de extrato hidrossolúvel de soja na qualidade do tecido ósseo de ratos jovens adultos. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. São Paulo. v. 12. n. 73. p.688-698. Set./Out. 2018.

ARAÚJO, L. J. S. NAVA, J. R. B. et. al. Análise macro e microscópica da cicatrização de feridas agudas em ratos utilizando a papaína 2%. **Revista Brasileira de Saúde Funcional**, Cachoeira, v.7, n 1, p. 42-52, abril 2019.

BARBOSA, Maria Ivone MJ et al. Desenvolvimento e avaliação sensorial de pão de queijo elaborado com o resíduo agroindustrial da soja. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 124-129, 2013.

BOMDESPACHO, Laura Q. de et al. O EMPREGO DE OKARA NO PROCESSAMENTO DE "HAMBÚRGUER" DE FRANGO FERMENTADO COM LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS CRL 1014 The use of soy residue (Okara) in the processing of chicken hamburger, fermented with Lactobacillus acidophilus CRL 1014. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, n. 2, p. 315-322, 2011.

CANDIA, Amanda de Souza; DIAS, Isabela Pereira. **Formulação, caracterização e análise sensorial de chocolate com adição de okara**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

CASARIN, Anna Luisa Ferro et al. Propriedades antioxidantes e antidiabéticas de compostos bioativos de lentilha (" Lens culinaris") obtidos a partir dos grãos in natura, germinados e tratados enzimaticamente. 2018. Dissertação (Mestrado em ciências de alimentos). – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2018.

CAVALLARO, Gabriela. Estudo da hidrólise enzimática da proteína concentrada de feijão (phaseolusvulgaris) para obtenção de peptídeos bioativos. 2019. 96f. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos). - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas: UNICAMP, 2019.

DO EVANGELHO, Jarine Amaral. Propriedades funcionais e atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de feijão preto. 2014. Dissertação (Mestrado em ciências e tecnologia de alimentos). –Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2014.

FARIAS, Ticiane Carvalho. Obtenção enzimática de hidrolisado protéico de soja com atividade antioxidante para uso em alimentos. 2017. Dissertação (Mestrado). -Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2017.

FIGUEIREDO, V. R. G. JUSTUS, A. et. al. Production of hydrolysate of okara protein concentrate with high antioxidant capacity and aglyconeisoflavone content. **Brazilian**

Archives of Biology and Technology, Londrina, v.62, p 01-13, jun. 2019.

HIRAKURI, M. LORINI, I. et. al. Análise de aspectos econômicos sobre a qualidade de grãos de soja no Brasil. In :**EMBRAPA. Circular Técnica 142**. Londrina: 2018.

MADRUGA, Karina Medeiros. Enriquecimento de pão de trigo e de arroz com peptídeos bioativos da proteína de chia. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia e ciências de alimentos). –Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul: UFRS, 2018.

MORAIS, Harriman Aley et al. Proteínas hidrolisadas de soro de leite com propriedades bioativas associadas à redução de fatores de risco de doenças na infância. 2013. Tese (Doutorado em Ciências da saúde). –Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

NASCIMENTO, Edilza Silva do et al. Obtenção de hidrolisado proteico de sementes de quiabo *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench e sua capacidade antioxidante. 2015. Dissertação (Mestrado em ciências e tecnologia de alimentos). –Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB. 2015.

NEPUCENO, Elizângela Falcão do Vale. Obtenção de hidrolisados protéicos de tilapia vermelha (*Oreochromis niloticus* var.), atividade antioxidante e eficiência como fonte suplementar de nitrogênio para bioprocessos. 2018. 63f. Dissertação (Mestrado em ciências). –Universidade de São Paulo, Piracicaba: USP, 2018.

PAIVA, Flávia de Carvalho et al. Produção de hidrolisado proteico de resíduo de pirarucu (*Arapaima gigas*). 2014.

PAULA, G. T. FARIAS, H. P. S. et. al. Desenvolvimento de uma formulação do “tipo hambúrguer” de okara com shitake. **SEMIOSES: Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 36-46, jan/mar. 2019.

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

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

PEREIRA, Dafne Garcia. Otimização da hidrólise enzimática da proteína do okara e avaliação dos hidrolisados obtidos em diferentes graus de hidrólise. Dissertação (Mestrado em ciências de alimentos). –Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

SANTOS, WELLINGTON LEAL. PROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA PROTEÓLISE DO CASEINATO DE RUMINANTES. 2018. Dissertação (Mestrado em biociência animal). – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2018.

SOBOTKA, L. Bases da nutrição clínica. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2008.

SOUZA, Erika Fraga. Aplicação de proteases e amilases produzidas por *bacillus* sp. SMIA-2 na remoção de manchas de tecidos. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal).- Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes: UENF, 2012.

SOUZA, Renata Silva Cabral de et al. Avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano de proteínas do soro de leite concentradas por membranas e hidrolisadas por diferentes enzimas comerciais. 2013. Dissertação (Mestrado em ciências). –Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2013.

TAVARES, Lívia Santos. Biscoito doce de okara com tofu e frutooligossacarídeos. 2018. 45f. Monografia (Tecnólogo em Alimentos). – Curso Superior de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina: UTFPR, 2018.

VIEIRA, Agdylannah Felix et al. Aceitabilidade e caracterização física e físico-química de doce tipo doce de leite produzido com extrato hidrossolúvel de soja. **Revista Principia**, n. 42, p. 120-127, 2018.

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; DE PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília , v. 34, n. 7, p. 1277-1283, 1999.

YOSHIDA, Bruna Yumi et al. Produção e caracterização de cookies contendo farinha de okara. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 25, n. 1, p. 49-54, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**, 14. ed. vol. 2. Virginia, 2000.

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