



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS A PARTIR DE RESÍDUO DE MOLHO
DE SOJA COM DIÓXIDO DE CARBONO EM CONDIÇÕES SUPERCRÍTICAS**

Mayra Thomás Oliveira

Uberlândia – MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS A PARTIR DE RESÍDUO DE MOLHO DE SOJA COM DIÓXIDO DE CARBONO EM CONDIÇÕES SUPERCRÍTICAS

Mayra Thomás Oliveira

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Érika Ohta Watanabe

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carla Eponina Hori

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia – MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O48 Oliveira, Mayra Thomás, 1989-
2023 Extração de compostos bioativos a partir de resíduo de molho de soja com dióxido de carbono em condições supercríticas [recurso eletrônico] / Mayra Thomás Oliveira. – 2023.

Orientadora: Érika Ohta Watanabe.

Coorientadora: Carla Eponina Hori.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.1>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Engenharia química. I. Watanabe, Érika Ohta, 1978-, (Orient.). II. Hori, Carla Eponina, 1965-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

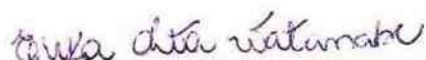
Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 27 DE FEVEREIRO DE 2023.

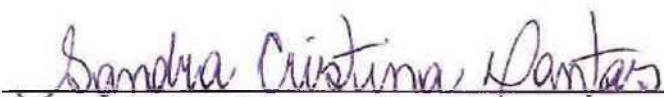
BANCA EXAMINADORA:



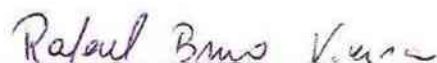
Prof.^a. Dr.^a. Érika Ohta Watanabe
Orientadora (PPGEQ/UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Carla Eponina Hori
Coorientadora (PPGEQ/UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Sandra Cristina Dantas
(ICTE/UFTM)



Prof. Dr. Rafael Bruno Vieira
(PPGEQ/UFU)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a meus pais que se dedicaram muito para que eu tivesse todo o suporte necessário para estudar e alcançar mais esta etapa.

Ao meu companheiro, Diego Sullivan, e sua família que me deram apoio físico e emocional durante todo este trabalho.

Aos meus amigos, à minha família e ao meu irmão, que de alguma forma me auxiliaram não só durante esta fase, mas também em jornadas anteriores.

Obrigada ao Grupo Vida Consciente, aos profissionais do SUS e do CRPICS, em especial Wilma Nunes e Isabela Tannús, por me darem suporte nos momentos de fragilidade.

Estendo o reconhecimento às professoras Érika Ohta e Carla Eponina, que me orientaram para este trabalho fosse concluído.

Ao professor Marcos Barrozo, que me incentivou a ingressar no Programa de Pós-Graduação.

E aos demais professores, técnicos e funcionários da Faculdade de Engenharia Química (FEQUI) e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca de Qualificação e de Defesa, por destinarem seu tempo para leitura e compartilhamento de conhecimentos.

Muito obrigada aos amigos de laboratório, sem vocês a execução deste projeto teria sido mais desafiadora.

À Ana Carolina Soldan e Priscila Bernardes por sanarem minhas dúvidas.

À Amanda Carmelo, Caroline Ortega e Lucas Mendes, por me auxiliarem com a execução de experimentos.

Agradeço, também, à Sakura Nakaya Alimentos por fornecer o material base deste trabalho e à CAPES, FAPEMIG e CPNQ por todo incentivo dado à ciência.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura (LAMEV – FEQUI/UFU), ao Laboratório GMO e ao Instituto de Química da USP de São Carlos.

O meu muito obrigada a todas e todos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE SÍMBOLOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Molho de soja fermentado.....	5
2.2 Extração.....	8
2.3 Extração de soja e resíduos de soja.....	16
2.4 Modelagem da cinética de extração supercrítica.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 MATERIAIS.....	23
3.1.1 Resíduo de molho de soja.....	23
3.1.2 Gases, reagente e padrões.....	23
3.2 MÉTODOS.....	23
3.2.1 Caracterização do resíduo.....	23
3.2.1.1 Preparo do resíduo.....	23
3.2.1.2 Teor de umidade.....	24
3.2.1.3 Teor de cinzas.....	24
3.2.1.4 Análise termogravimétrica (ATG).....	25
3.2.1.5 Análise elementar.....	25
3.2.1.6 Análise centesimal.....	26
3.2.1.7 Densidade real.....	26
3.2.1.8 Densidade “bulk”.....	27
3.2.1.9 Atividade de água.....	27
3.2.1.10 Análise granulométrica.....	27
3.2.1.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
3.2.2 Processos extrativos.....	28
3.2.2.1 Extração Soxhlet.....	28
3.2.2.2 Extração supercrítica.....	29

3.2.3 Caracterização dos extratos	32
3.2.3.1 Ácidos graxos	32
3.2.3.2 Atividade antioxidante	33
3.2.3.3 Flavonoides totais	33
3.2.3.4 Fenólicos totais	34
3.2.4 Modelagem matemática da cinética de extração	34
3.2.4.1 Logístico	34
3.2.4.2 <i>Splines</i>	35
3.2.5 Análise Estatística	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1 Caracterização do resíduo <i>in natura</i> e processado	36
4.2 Extração Soxhlet	40
4.3 Extração supercrítica	41
4.4 Caracterização dos extratos	45
4.4.1 Ácidos graxos	45
4.4.2 Atividade antioxidante	46
4.4.3 Flavonoides totais	47
4.4.4 Fenólicos totais	48
4.5 Modelagem matemática da cinética de extração	50
5 CONCLUSÕES	54
5.1 Considerações finais	54
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE A – Quadros de ANOVA	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das isoflavonas agliconas dos grãos de soja.....	7
Figura 2 - Estrutura química das isoflavonas glicosiladas dos grãos de soja.....	7
Figura 3 - Extrator Soxhlet convencional.....	9
Figura 4 - Diagrama pressão versus temperatura para um componente puro	12
Figura 5 - Curva de extração e os três períodos diferentes.....	16
Figura 6 - Representação da unidade de extração supercrítica laboratorial constituída por válvulas (V1 a V6), cilindro de CO ₂ , bomba (P), extrator (E), controlador de temperatura (C), banho termostatzado para resfriar a bomba (B1) e para aquecer o extrator (B2).....	29
Figura 7 - Organização no leito extrator em que as circunferências representam as esferas de vidros e os retângulos representam o resíduo	30
Figura 8 - A) Variação do percentual mássico do resíduo processado durante a queima de carbono por ATG, realizada em atmosfera de 15% Ar sintético/He B) Derivada da variação do percentual mássico do resíduo processado durante a queima de carbono por ATG, realizada em atmosfera de 15% Ar sintético/He	38
Figura 9 - Imagens MEV do resíduo processado utilizando magnificação de 50X A) Antes extração supercrítica B) Após extração supercrítica.....	39
Figura 10 - Imagens MEV do resíduo processado utilizando magnificação de 1.00KX A) Antes extração supercrítica B) Após extração supercrítica.....	39
Figura 11 - Extratos obtidos pelo método Soxhlet	41
Figura 12 - Reprodutibilidade da extração supercrítica.....	43
Figura 13 - Média das duplicatas das curvas globais de extração supercrítica	43
Figura 14 - Ajuste do modelo logístico às curvas globais de extração.....	50
Figura 15 - Ajuste do modelo <i>splines</i> às curvas globais de extração	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades crítica para componentes puros	13
Tabela 2 - Parâmetros dos ensaios de extração supercrítica.....	32
Tabela 3 - Composição elementar do resíduo de molho shoyo lavado e liofilizado	36
Tabela 4 - Composição centesimal do resíduo de molho shoyo lavado e liofilizado.....	37
Tabela 5 - Distribuição granulométrica do resíduo lavado e liofilizado	40
Tabela 6 - Extração por Soxhlet do resíduo de molho shoyo lavado e liofilizado	40
Tabela 7 - Rendimentos dos ensaios de extração supercrítica.....	42
Tabela 8 - Resultados da análise de ácidos graxos.....	45
Tabela 9 - Atividade antioxidante dos extratos	46
Tabela 10 - Flavonoides totais presentes nos extratos.....	48
Tabela 11 - Fenólicos totais presentes nos extratos.....	49
Tabela 12 - Equação e parâmetros do modelo logístico e coeficientes de determinação (R^2) .	51
Tabela 13 - Equação e parâmetros do modelo <i>splines</i> e coeficientes de determinação (R^2)....	52

LISTA DE SÍMBOLOS

- AL_1, AL_2 – Parâmetros de ajuste do modelo *splines*
- ANOVA – análise de variância
- ATG – Análise termogravimétrica
- aw – Atividade de água
- b_0, b_1, b_2, b_3 – Parâmetros de ajuste do modelo *splines*
- BIC – Modelo células quebradas e intactas (*Broken and Intact Cells*)
- C – Parâmetro de ajuste do modelo logístico
- CER – Período de taxa de extração constante (*Constant Extraction Rate*)
- DC – Período controlado por difusão (*Diffusion-Controlled*)
- d_i – Diâmetro da peneira i
- d_{i+1} – Diâmetro da peneira acima da peneira i
- DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- d_s – Diâmetro médio
- EC_{50} – Amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH
- FER – Período de queda da taxa de extração (*Falling Extraction Rate*)
- i – Contador do somatório
- LER – Período de baixa taxa de extração (*Low Extraction Rate*)
- m_{alim} – Massa de matriz alimentada no processo do modelo *splines*
- M_{CER} – Taxa de extração no primeiro período de extração
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- m_{ext} – Massa de extrato acumulada com o tempo no modelo *splines*
- m_i – Massa retida na peneira i
- m_0 – Possível massa de extrato a ser obtida no modelo logístico
- $m(t)$ – Massa acumulada de extrato com relação ao tempo no modelo logístico
- n – Contador do somatório
- Q_{CO_2} – Vazão de solvente no modelo *splines*
- R^2 – Coeficiente de determinação
- R_{CER} – Rendimento no primeiro período de extração
- S/F_{CER} – Relação entre solvente consumido durante o primeiro período e massa de amostra alimentada
- t – Tempo

t_{CER} – Duração do primeiro período de extração

t_{FER} – Duração do segundo período de extração

t_m – Tempo em que a taxa de extração é máxima no modelo logístico

Y_{CER} – Razão mássica de extrato na saída do reator

RESUMO

O molho de soja fermentado é o condimento líquido mais consumido em nível mundial. Dentre 10 a 20% da massa de shoyo produzido torna-se rejeito rico em óleo, fibras, proteínas, isoflavonas, celulose e aminoácidos. O aproveitamento deste resíduo para a obtenção de subprodutos é bastante atrativo, uma vez que agrega valor a um material que é descartado ou utilizado como ração animal. Neste sentido, o atual trabalho teve como objetivo o estudo da extração supercrítica de resíduo de molho shoyo. Foram analisados os efeitos da pressão (200 e 250 bar), da temperatura (40 e 60 °C) e a adição de cossolventes (etanol e hexano) no rendimento e composição dos extratos. Por meio das curvas globais de extração e de modelos reportados na literatura (logístico e *splines*) foi realizada uma análise de comportamento cinético de extração supercrítica. O método Soxhlet foi executado utilizando etanol, acetona e hexano como cossolventes para fins de comparação. As extrações supercríticas apresentaram rendimentos entre 15,93 e 20,51%. A variação de pressão foi estatisticamente significativa nestes resultados, ao contrário da adição de cossolvente e variação da temperatura. O modelo *splines* ajustou bem todas as curvas globais de extração, ao contrário do modelo logístico. No método Soxhlet, o rendimento variou de 25,16 a 31,03%, sendo o etanol o solvente que apresentou o melhor resultado. O resíduo, que foi submetido à um processo de remoção de sal, apresentou quantidades significantes de fibras (38,20 g/g resíduo processado), carboidratos (37,31 g/g resíduo processado) e proteínas (13,90 g/g resíduo processado), podendo ser utilizado para suplementação alimentar. Os extratos obtidos mostraram ácido linolênico em maior quantidade, seguido de ácido oleico, ácido palmítico e ácido linolênico. Eles apresentaram atividade antioxidante ligeiramente ativa, compostos fenólicos entre 176,43 e 60,5 mg rutina/100 g resíduo processado seco e flavonoides entre 82,42 e 7,05 mg ácido gálico equivalente/100 g resíduo processado seco. Sendo assim, otimizar o uso do resíduo de molho shoyo geraria subprodutos, reduziria custos com o tratamento do mesmo, problemas ambientais e tornaria a produção de molho shoyo mais sustentável.

Palavras-chave: resíduo de molho shoyo, compostos bioativos, cinética de extração supercrítica

ABSTRACT

Soy sauce is the most popular liquid condiment around the world. Between 10 and 20% of the shoyu mass produced becomes waste rich in oil, fibers, proteins, isoflavones, cellulose and amino acids. Use this waste to obtain by-products becomes quite attractive, because it adds value to a material usually discarded in the environment or used as animals feed. That way, this work aimed to study of supercritical extraction of shoyu mash residue. The effects of pressure (200 and 250 bar), temperature (40 and 60 °C) and addition of cosolvents (ethanol and hexane) on the yield and composition of extracts were valuated. A kinetic behavior analysis of supercritical extraction was made through the global extraction curves and models reported in the literature (logistic and spline). Soxhlet method was applied using ethanol, acetone and hexane as cosolvents for comparison purposes. The yields obtained by supercritical extractions varied between 15.93 and 20.51%. The pressures influenced in these results, as opposed to the addition of cosolvent and temperature variation. Spline model presented a good fit for all the global extraction curves, unlike the logistic model. In Soxhlet extraction, the yield ranged from 25.16 to 31.03%, and ethanol was the solvent with the best performance. The residue, which was submitted to a salt removal process, presented significant amounts of fibers (38.20 g/g processed residue), carbohydrates (37.31 g/g processed residue) and proteins (13.90 g/g processed residue), and can be used for food supplementation. The extracts obtained showed linolenic acid in major quantity, followed by oleic acid, palmitic acid and linolenic acid. The extracts also showed slightly active antioxidant activity, phenolic compounds between 176.43 and 60.5 mg rutin/100 g dry processed residue and flavonoids between 82.42 and 7.05 mg salic acid equivalent/100 g dry processed residue. Thus, optimizing the use of soy sauce residue would generate by-products, reduce costs with its treatment, environmental problems and turn the production of shoyu more sustainable.

Key words: soy sauce residue, bioactive compounds, supercritical extraction kinetics

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

De acordo com a Embrapa, a produção mundial de soja no ano de 2022 foi de aproximadamente 355.588 milhões de toneladas; somente no Brasil foram produzidas 123.829,5 milhões de toneladas. Seus grãos são utilizados para a produção de alimentos, ração, biodiesel, plásticos, lubrificantes, medicamentos e cosméticos. O consumo frequente desta leguminosa pode estar associado à redução de taxas de determinados cânceres e de doenças cardiovasculares (BARNES, 1998; YAMORI, 2006). Estudos têm demonstrado que seus fitoquímicos também protegem contra a obesidade, irritações no trato digestivo, doenças renais (FRIEDMAN; BRANDON, 2001), podem prevenir osteoporose, diabetes, doenças autoimunes e evitar sangramento de nariz em pessoas com telangiectasia hemorrágica hereditária (BARNES, 1998; LI et al., 2018).

Existe uma ampla gama de produtos alimentares feitos à base de soja, como chocolates, leites, farinhas, temperos, molhos e queijos. Dentre eles, um dos condimentos mais consumido mundialmente é o molho de soja fermentado, também conhecido como molho shoyo. Ele surgiu na China há cerca de 2.200 anos, com o intuito de preservar e melhorar o sabor dos alimentos, uma vez que sal era uma mercadoria cara (DIEZ-SIMON et al., 2020). Foi incorporado na culinária asiática e, atualmente, tem se tornado popular nos países ocidentais. Tal como a soja, ele também possui propriedades benéficas ao organismo. É anticarcinogênico, antimicrobiano, antioxidativo, antialérgico e antiplaquetário (KOBAYASHI, 2005).

As formas de produção do molho shoyo são diversas e sua característica varia com os tipos e proporções das matérias-primas e microrganismos, e das condições de fermentação (KOBAYASHI, 2005). Segundo Diez-Simon et al. (2020), para seu preparo são necessários basicamente 5 ingredientes: soja como fonte de proteína, trigo ou milho como fonte de carboidratos, sal, água e levedura. As leveduras utilizadas são as bactérias *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus sojae*, por serem tolerantes ao sal e ao ácido láctico. O processo pode se dar por meio de fermentação tradicional ou por hidrólise química. No primeiro, as proteínas e carboidratos das matérias-primas são hidrolisados vagarosamente por microrganismos em temperatura inferior a 30 °C por mais de 6 meses. No segundo, a hidrólise acontece rapidamente a 80 °C durante 8 a 10 horas com adição de ácido clorídrico (FUKUSHIMA, 1981). Apesar de ser um processo mais rápido, a hidrólise química não é reconhecida pelos

governos da China e do Japão como um método para produção de molho shoyo (DIEZ-SIMON et al., 2020; KATAOKA, 2005).

No ano de 2019, o mercado global de molho shoyo movimentou 40,63 bilhões de dólares. Estima-se que em 2027, esse valor atingirá 56,67 bilhões de dólares (FORTUNE Business Insights). O rápido desenvolvimento da indústria de molho shoyo está levando à um aumento da quantidade de rejeitos gerados durante a produção. Este resíduo comumente é descartado na natureza ou em aterros, e pode ser utilizado como fertilizante, incinerado ou adicionado à alimentação animal. Essas ações, entretanto, podem gerar sérios problemas, como a salinização da terra, doenças pecuárias, corrosão de fornos e formação de dioxina, uma substância altamente tóxica. Isso devido ao alto teor de sal da sua constituição que corresponde a cerca de 4,32% em base úmida (SHIRAI et al., 1998; XIANG et al., 2019; YAMOMOTO et al., 2006; MURASAWA; KOSEKI; IWATA, 2012).

Embora a alta salinidade seja uma limitação para o uso deste rejeito (SHIRAI et al., 1998), novas aplicabilidades começaram a ser investigadas, pois há muitos componentes que não foram degradados durante a fermentação e possuem valor agregado, como óleo, fibras, isoflavonas, celulose, proteínas, aminoácidos, dentre outros (NAGAI et al., 2012; ZHAO et al., 2014; CHEN et al., 2014). Além disso, a sociedade atual tem se preocupado cada vez mais com os impactos causados por resíduos descartados no meio ambiente (ALVAREZ et al., 2019).

A literatura retrata algumas formas de se remover estes componentes de maior valor agregado desse rejeito. As isoflavonas, comumente são extraídas a partir da mistura do substrato em solventes seguido de filtração (YAMAMOTO et al., 2006). Chen et al. (2014) e Rostagno, Araújo e Sandi (2002) relataram outros procedimentos para aumentar o rendimento da extração, como: aquecimento assistido por micro-ondas, extração líquida pressurizada, extração com água superaquecida, extração assistida ultrassônica e Soxhlet. A maior desvantagem dessas técnicas é o consumo de grandes quantidades de solventes que, na maioria das vezes, são tóxicos. Isso acarreta em possível contaminação do produto e do meio ambiente e gera gastos extras com descarte. Além disso, esses processos possuem longos tempos de extração, não podem ser automatizados, possuem seletividade restrita e requerem etapas de pré-purificação, evaporação e concentração adicional que podem resultar em perdas e degradação dos analitos (ROSTAGNO; ARAÚJO; SANDI, 2002; LÓPEZ-BASCÓN E CASTRO, 2020).

O óleo, que representa cerca de 36,21% da composição do resíduo de molho shoyo em base úmida (XIANG et al., 2019), possui um alto valor de ácidos graxos, sendo uma matéria-prima promissora para a produção de biodiesel (CHEN et al., 2014). Zhao et al. (2014) relatam a possibilidade de utilizá-lo na alimentação animal após uso de destilação com membrana. Diversas técnicas podem ser usadas para sua extração: solvente orgânico, pressão mecânica, extração supercrítica, nova extração de transição de fase contínua sob baixa temperatura e catálise com ácido sulfúrico concentrado ou uma base sólida (ZHAO et al., 2014; CHEN et al., 2014; XIANG et al., 2019). Porém, assim como as técnicas empregadas na extração de isoflavonas, estas também apresentam desvantagens, tais como: rendimento menor que o esperado, presença de solventes nos produtos, corrosão de equipamentos, dificuldades para recuperação dos catalisadores, longos tempos de reação e rígido controle das condições reacionais (ZHAO et al., 2014; XIANG et al., 2019).

Considerando as dificuldades dos métodos apresentados e a crescente produção de molho shoyo, é interessante avaliar os métodos limpos e eficazes para reaproveitamento do resíduo gerado. Neste sentido, este trabalho estudou a extração supercrítica na remoção de compostos bioativos contidos no resíduo de molho de soja. Apesar de tratar-se de um processo de alto investimento, é uma tecnologia ambientalmente responsável com vários pontos positivos tais como a possibilidade de controlar a solubilidade do fluido extrator, de quantificar compostos altamente voláteis, de evitar a degradação de componentes ou reações indesejadas, de reutilizar o fluido, ela ainda apresenta menor tempo de extração e a separação do fluido e do soluto é realizada facilmente através da despressurização (ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020; LANG, 2001; SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016; ROSTAGNO; ARAÚJO; SANDI, 2002).

Além das vantagens citadas anteriormente, no processo em condições supercríticas é possível elaborar curvas gerais de extração por meio da quantificação do produto extraído em relação ao tempo. E de posse desses dados, criar modelos matemáticos que são de extrema importância para otimização do processo, determinação de parâmetros para escalonamento e projetos, análise da eficiência da extração e estudo da sua viabilidade técnico-econômica em escala industrial (LANG, 2001; FIORI et al., 2014). Como esses modelos são escassos na literatura, alguns autores utilizam a modelagem computacional para estimá-los.

Encontrar uma aplicação para o resíduo de molho shoyo e a extração de seus componentes bioativos tornaria o processo de produção mais sustentável e favoreceria econômica e ambientalmente. Parte do rejeito poderia ser reutilizado no processo de

fermentação, reduzindo os custos com as matérias-primas. Os componentes funcionais extraídos gerariam subprodutos de valor agregado que podem atender a outras indústrias, como os compostos fenólicos e os flavonoides que podem ser aplicados em formulações farmacêuticas e usados como aditivos alimentícios (PEREIRA; MEIRELES, 2010). O reaproveitamento deste resíduo também reduziria a quantidade de lixo industrial, os custos com seu tratamento e os problemas ambientais (KUSCH-BRANDT et al., 2019; LI et al., 2012).

Diante do que foi apresentado, o atual trabalho tem como objetivo geral estudar a extração em condições supercríticas do resíduo de molho de soja (molho shoyo), mais especificamente:

- Avaliar a influência da temperatura, pressão e adição de cossolvente (etanol e hexano) no rendimento da extração.
- Investigar a composição dos extratos.
- Estudar o comportamento cinético da extração por meio de modelos encontrados na literatura.
- Determinar os parâmetros importantes para o escalonamento do processo.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Molho de soja fermentado

De acordo com a lenda, o molho de soja fermentado foi preparado pela primeira vez por um bispo budista no Japão em 1254 (MUROOKA; YAMSHITA, 2008). Nos dias atuais, ele é o condimento líquido mais utilizado em seu país de origem e em outros países orientais (KATAOKA, 2005). Apesar de terem aparência bastante semelhante, os molhos variam em sabor, consistência, fragrância e salinidade de acordo com a cultura e o modo de preparo (NAGAI et al., 2012). Essas características dependem dos tipos e proporções das matérias-primas, dos microrganismos e das condições de fermentação (KOBAYASHI, 2005).

Durante a fermentação da soja e do trigo/milho são formados compostos bioativos como aminoácidos, polióis e componentes aromáticos que, além de proporcionarem sabor aos alimentos, apresentam propriedades biológicas diversas. Por exemplo, os compostos 4-hidroxi-2(ou 5)-etil-5(ou 2)-metil-3(2H)-furanona, 4-hidroxi-2,5dimetil-3(2H)-furanona e 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona proporcionam ao molho ação antioxidante e anticancerígena. A β -Carbolina promove atividade anti-agregação plaquetária; as isoflavonas inibem a histidina descarboxilase que produz histamina, um mediador da inflamação, alergia e secreção do ácido gástrico. Os polissacarídeos são efetivos no tratamento de pacientes com rinite alérgica (KATAOKA, 2005, MUROOKA; YAMSHITA, 2008).

O condimento apresenta ainda atividade microbiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholera*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli* não patogênica e *E. coli* O157:H7 patogênica. O molho shoyo aumenta a produção de suco gástrico, inibe a enzima angiotensina I que causa hipertensão e possui efeito anticatarata em ratos com catarata espontânea (KATAOKA, 2005; MUROOKA; YAMSHITA, 2008). Todas essas propriedades associadas ao seu delicioso sabor, faz com que a sua produção cresça a cada ano.

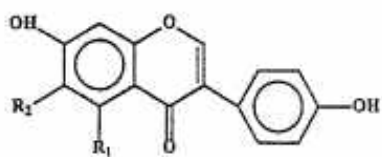
Este crescimento não se limita apenas ao produto final, mas também na quantidade de resíduo gerada, haja vista que entre 10 a 20% da massa de shoyo produzida é material de descarte (NAGAI et al., 2012). A literatura reporta diversas aplicações para este rejeito, desde fertilizante a ração animal, suplemento alimentar, fabricação de papel, biofloculantes, geração de energia térmica, reaplicação no processo de fermentação do molho de soja, produção de etanol, dentre outras (MURASAWA; KOSEKI; IWATA, 2012; LIU et al., 2017; NAGAI et

al., 2012; LI et al., 2012). Apesar de tantas opções, a maior parte do resíduo ainda é descartado como resíduo industrial, seja em aterros sanitários ou diretamente na terra causando salinização do solo (NAGAI et al., 2012; XIANG et al., 2019).

Alguns autores reportam que no resíduo é possível encontrar componentes funcionais como aminoácidos, fibras, óleo, isoflavonas e proteínas. Isso ocorre porque durante a fermentação do molho shoyo não há degradação total das matérias-primas, permanecendo nele substâncias valiosas (NAGAI et al., 2012; WANG; CHA, 2018; ZHAO et al., 2014).

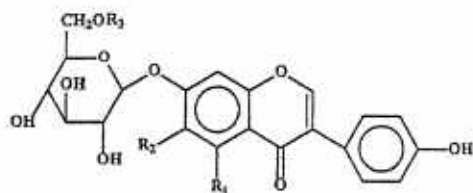
As isoflavonas, por exemplo, são antioxidantes naturais que desativam radicais livres no organismo e impedem a propagação de reações oxidantes em cadeia (FERRARI; DEMIATE, 2001; NAGAI et al., 2012). Elas apresentam-se estrutural e farmacologicamente similar a estrogênios sintéticos, podendo atuar como tais. São capazes de aliviar sintomas da menopausa, reduzir a perda óssea, sendo efetivos na prevenção ou tratamento da osteoporose (ARJMANDI, 1996; AGUIAR, 2002). Auxiliam na diminuição de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), no aumento das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e inibem a formação de lesões ateroscleróticas em primatas (ERDMAN, 2000). Acredita-se que as isoflavonas apresentam atividade anticarcinogênica para tumores de mama, de próstata, pele e colón. É possível que os efeitos citotóxicos estejam relacionados à inibição de enzimas ligadas ao ciclo, diferenciação e proliferação celular (AGUIAR, 2002; BARNES, 1998).

De acordo com Yang, Ma e Ito (2001), as isoflavonas da soja incluem três formas agliconas (daidzeína, genisteína, gliciteína) e nove glicosiladas (daidzina, genistina, glicitina, acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, malonildaidzina, malonilgenistina, malonilglicitina), apresentadas nas Figuras 1 e 2. As primeiras são as responsáveis por desempenhar funções biológicas importantes e são mais facilmente absorvidas pelo organismo (CHEN et al., 2014). As segundas, apesar de estarem presentes em maior quantidade nos alimentos naturais, não são facilmente absorvidas pelo intestino. Segundo os estudos de Zhao et al. (2014), durante a fermentação do molho shoyo, as isoflavonas glicosiladas são convertidas pela enzima β -glucosidase em agliconas, como consequência no resíduo de seu trabalho foram encontradas apenas a daidzeína e a genisteína. Este resultado também foi obtido por Yamamoto et al. (2006).



Componente	R ₁	R ₂
Daidzeína	H	H
Genisteína	OH	H
Gliciteína	H	OCH ₃

Figura 1 - Estrutura química das isoflavonas agliconas dos grãos de soja
Fonte: YANG; MA; ITO, 2001



Componente	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzina	H	H	H
Genistina	OH	H	H
Glicitina	H	OCH ₃	H
Acetildaidzina	H	H	COCH ₃
Acetilgenistina	OH	H	COCH ₃
Acetilglicitina	H	OCH ₃	COCH ₃
Malonildaizina	H	H	COCH ₂ COOH
Malonilgenistina	OH	H	COCH ₂ COOH
Malonilglicitina	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH

Figura 2 - Estrutura química das isoflavonas glicosiladas dos grãos de soja
Fonte: YANG; MA; ITO, 2001

As proteínas são elementos essenciais na alimentação. A proteína da soja quando comparada a outras apresenta valor biológico por um menor custo (CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998). Ela é o maior componente na dieta dos animais (FRIEDMAN; BRANDON, 2001) e vem sendo cada vez mais incorporada à dieta humana. Estudos sugerem que as globulinas 11S e 7S, subunidades das proteínas da soja, são capazes de regular os níveis de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no fígado promovendo redução da concentração total de colesterol no plasma (FRIEDMAN; BRANDON, 2001; ERDMAN, 2000).

As fibras dietéticas são formadas pela parede celular das plantas. Ainda que não sejam digeridas pelas nossas enzimas digestivas, elas são capazes de reduzir o risco de doenças cardiovasculares, distúrbios gastrointestinais, obesidade, determinados tipos de cânceres, hiperlipidemia, colesterol e o nível de glicose do soro pós-prandial. Elas também aumentam a laxação. O consumo diário de fibras recomendado é de 20 a 35 gramas ou de 10 a 12 gramas para cada 1000 kcal. Elas podem ser encontradas em frutas, legumes e cereais de grãos (YEH; SU; LEE, 2005; SLAVIN, 1991). Nagai et al. (2012) avaliaram o resíduo de molho shoyo e encontraram 27,2% de fibras enquanto Xiang et al. (2019) obtiveram 11,31%.

O óleo do rejeito representa cerca de 36,21% da sua composição (XIANG et al., 2019). Ele é constituído por aproximadamente $50,23 \pm 0,05\%$ de ácido linoleico, $21,44 \pm 0,11\%$ de ácido oleico, $13,07 \pm 0,26\%$ de ácido palmítico, $9,54 \pm 0,19\%$ de ácido linolênico e $5,71 \pm 0,33\%$ de ácido esteárico. Quando comparado com um óleo de soja de primeira classe, a maioria dos ácidos graxos se encontram dentro do mesmo intervalo, porém apenas isso não é suficiente para que ele possa ser consumido na alimentação. Seria necessário que ele fosse submetido a um processo de destilação molecular a fim de reduzir seu índice de acidez ($63,9 \text{ mg KOH/g}$) para ser utilizado em ração animal (ZHAO et al., 2014). O óleo proveniente do resíduo pode ser também matéria-prima para a produção de biodiesel (XIANG et al., 2019; CHEN et al., 2014).

Alguns autores estudaram formas de extração dos compostos bioativos de resíduo de molho shoyo. Chen et al. (2014) investigaram a extração simultânea de óleo e isoflavonas através de solvente bifásico intensificada por sondas ultrassônicas. Em ótimas condições, foi possível obter uma taxa de extração de 92,07% do óleo contido no resíduo e 92,53% de isoflavonas contidas no resíduo. Zhao et al. (2014) também analisaram a extração de óleo e isoflavonas pelo novo método de transição de fase contínua sob baixa temperatura. Eles obtiveram rendimento de 28,43% de óleo e 0,18% de daidzeína e genisteína. Yamamoto et al. (2006) pesquisaram o impacto de vários solventes na extração de flavonoides e sal. A acetona foi o mais eficaz para remoção de flavonoides (11 mg/10 g resíduo de molho shoyo) e a água para remoção de sal (590 mg/10 g resíduo de molho shoyo). Li et al. (2012) purificaram isoflavonas contidas no resíduo utilizando membranas de ultrafiltração. Com o processo, o teor de isoflavonas do material foi de 4,3% para 6,27%. Este trabalho avaliou a extração Soxhlet e extração supercrítica.

2.2 Extração

A remoção de substâncias presentes em amostras sólidas apresenta-se como um grande desafio de processo. Uma das técnicas mais antigas ainda utilizada nos tempos atuais é a extração sólido-líquido, também conhecida como lixiviação. Por meio dela, é possível retirar componentes de interesse e outros que poderiam interferir em etapas subsequentes do processo analítico. Para desempenhar tal função, o aparato tipo Soxhlet tem sido usado como um método padrão por mais de um século. Ele foi desenvolvido em 1879 por von Soxhlet com intuito de determinar a gordura presente no leite (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Na extração por Soxhlet, a amostra é acondicionada em um filtro lacrado e inserida no extrator, conforme apresentado na Figura 3. Gradualmente, este recipiente é preenchido pelo solvente. Quando se atinge um determinado nível no extrator, ele é aspirado por um sifão e retorna ao frasco de destilação, onde será novamente aquecido. Este processo acontece diversas vezes até que os analitos presentes no sólido sejam completamente extraídos para o líquido (LÓPEZ-BASCÓN; CASTRO, 2020). Trata-se de uma técnica híbrida contínua-descontínua, visto que a montagem é um sistema em lote e a recirculação do solvente opera de maneira contínua.

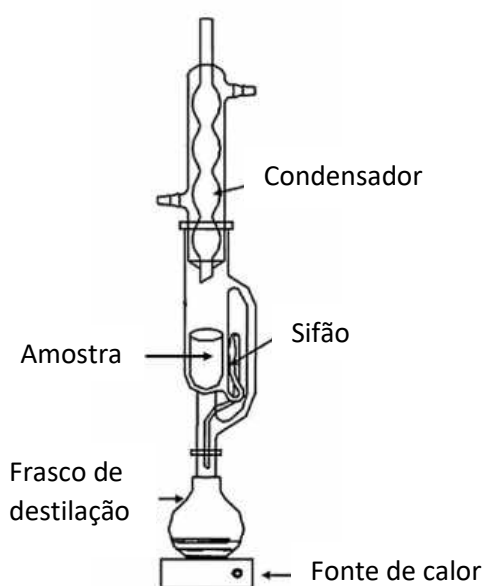


Figura 3 - Extrator Soxhlet convencional
Fonte: adaptado de LÓPEZ-BASCÓN; CASTRO, 2020

Existe uma ampla gama de solventes que podem ser utilizados neste tipo de extração. A sua natureza determina o tipo de material obtido ao final do processo. Uma vez que os solventes não são capazes de distinguir quais compostos estão extraindo, há a possibilidade de também removerem outras substâncias além dos lipídeos, como isoflavonas, flavonóides, antioxidantes, compostos fenólicos e produtos degradados. A presença de tais componentes pode influenciar o real rendimento de lipídeos (RAMLUCKAN; MOODLEY; BUX, 2014).

O hexano é comumente empregado para remoção de compostos presentes nos grãos de soja. Ele apresenta baixo calor latente de vaporização, completa solubilidade em óleo, baixa corrosão, fácil recuperação e é imiscível em água. Porém, estudos alertam que vapores de n-hexano podem ocasionar lesões no sistema nervoso, irritação nos olhos, no trato respiratório e formar uma mistura altamente explosiva quando em contato com o ar (DAGOSTIN; CARPINÉ; CORAZZA, 2015). A sua temperatura de ebulição é 69 °C e o seu índice de

polaridade é 0,1. O índice de polaridade foi medido em relação à água; quanto maior o seu valor, maior o grau de polaridade da substância (RAMLUCKAN; MOODLEY; BUX, 2014).

Considerando que traços de solventes ficam nos extratos, o interesse por solventes menos tóxicos tem sido crescente nos últimos tempos. Neste sentido, o etanol pode ser uma alternativa pra substituir o hexano. Ele apresenta menor inflamabilidade e não existem evidências de toxicidade por inalação do mesmo. Sua natureza é polar, isso faz com que ele apresente solubilidade limitada em relação aos triglicerídeos, por outro lado, possui a capacidade de solubilizar água e outros compostos polares (DAGOSTIN; CARPINÉ; CORAZZA, 2015). A temperatura de ebulição é 78 °C e o índice de polaridade é 5,2. Outra opção de solvente orgânico é a acetona. Seu ponto de ebulição é 56 °C, menor que do hexano e do etanol, isso possibilita a conservação de produtos termossensíveis. O seu índice de polaridade é de 5,1, o que indica que é um solvente polar (RAMLUCKAN; MOODLEY; BUX, 2014).

Na literatura, é possível encontrar diversos trabalhos utilizando o método Soxhlet. Ojewumi, Ruth e Daniel (2019) que removeram o óleo de grãos de soja utilizando hexano. Com o extrato removido foram produzidas velas, que se mostraram mais econômicas que as velas de parafinas e geram menos fuligem. Chung et al. (2010) também empregaram este tipo de extração para remover compostos de grãos de soja, empregando os solventes etanol e metanol. Os autores avaliaram a atividade antioxidante dos extratos, a capacidade de absorção de radicais de oxigênio e a quantidade total de fenólicos. O metanol apresentou melhor desempenho que o etanol nas duas primeiras caracterizações.

As vantagens da extração é que não é necessário etapa de filtração do extrato, o contato repetido da amostra com o solvente facilita o deslocamento do equilíbrio de transferência de massa, a temperatura do sistema permanece relativamente alta devido ao calor do frasco de destilação e a produtividade pode ser aumentada por extração paralela simultânea uma vez que o equipamento não é caro. No entanto, o processo possui longo tempo de contato entre a amostra e o solvente, não é facilmente automatizado, a seletividade é restrita, é necessário evaporar ou concentrar o extrato, a alta temperatura pode decompor componentes termossensíveis e a grande quantidade de solventes pode causar problemas ambientais (LÓPEZ-BASCÓN; CASTRO, 2020).

Algumas modificações têm sido implementadas ao método Soxhlet tradicional com o intuito de melhorar o seu desempenho. Dentre elas estão aplicação de altas pressões durante o processo, o que favorece a penetração do solvente no sólido e reduz o tempo de extração. A

automatização da técnica também reduz o tempo de processo e fornece a possibilidade de extração simultânea de várias amostras. A associação da extração com tecnologia micro-ondas e ultrassônica, que se mostrou muito eficiente para superar as deficiências da técnica (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Mesmo com a possibilidade de melhorias para esta técnica, a busca por tecnologias ambientalmente responsáveis tem crescido. Neste sentido, a extração supercrítica tem se apresentado como uma alternativa. Apesar de ser uma tecnologia de alto custo de investimento, ela possui diversas vantagens sobre as extrações convencionais. Neste tipo de extração utiliza-se solventes reconhecidos como seguros que são facilmente separados dos extratos e ainda podem ser reutilizados em futuros procedimentos, reduzindo gastos e a geração de resíduos. Geralmente não é necessário o uso de solventes orgânicos, mas podem ser utilizados em menor quantidade, o que é menos prejudicial ao meio ambiente. Existe a possibilidade de quantificar os componentes extraídos altamente voláteis através de um cromatógrafo acoplado diretamente no equipamento. O controle de temperatura nas extrações supercríticas evita a formação de reações indesejadas ou favorece reações que são difíceis ou mesmo impossíveis de se alcançar com solventes convencionais. A quantidade de amostra necessária é cerca de 40 a 65 vezes menor que outros métodos de extração líquido-sólido e a técnica apresenta boa reprodutibilidade. A extração supercrítica tem se apresentado como um método seguro, eficiente e economicamente viável (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016; LANG, 2001; SAPKALE et al., 2010; ROSTAGNO; ARAÚJO; SANDI, 2002; ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020).

O procedimento consiste em basicamente um fluido em condições supercríticas permear continuamente uma matriz e extrair os compostos solúveis ali presentes (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016). Seu emprego na indústria era limitado, usado principalmente para descafeinar chás e cafés, remover extrato de lúpulo, óleo de gergelim e certos produtos petrolíferos (JOKIĆ et al., 2012; CAPUZZO; MAFFEI; OCCHIPINTI, 2013). Atualmente, alguns setores industriais como alimentício, farmacêutico, ambiental, cosmético e de polímeros têm implementado o seu uso, pois seus extratos proporcionam resultados promissores (MAZZUTTI; PEDROSA; FERREIRA, 2021). A técnica tem sido utilizada para extrair vitaminas (E, A, n-3-ácidos graxos), produzir melhoradores de sabor, desalcoolizar vinhos e cervejas, desengordurar batatas e carnes, preparar arroz parboilizado, produzir extratos de tempero (páprica e pimenta), remover pesticidas, purificar óleo usado em frituras, produzir analgésicos, anti-inflamatórios e para buscar tratamentos de doenças como câncer,

Alzheimer e acidente vascular cerebral (BRUNNER, 2005, SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

O uso de fluidos supercríticos para solubilizar materiais sólidos de baixa pressão de vapor foi descrito pela primeira vez em 1879 por Hannay e Hogarth (MAZZUTTI; PEDROSA; FERREIRA, 2021). Pelo diagrama apresentado na Figura 4 é possível visualizar a região do fluido em condições supercríticas. Quando se percorre a linha de coexistência líquido-vapor no sentido à alta pressão e temperatura, há redução na densidade do líquido e aumento na densidade do vapor até um ponto em que se tornam iguais. Este ponto corresponde ao estado em que se tem líquido e vapor saturados e as duas fases se tornam idênticas. A temperatura em que isso ocorre é chamada de temperatura crítica e a pressão de vapor correspondente é chamada de pressão crítica. Estes valores de temperatura e pressão definem um ponto crítico o qual é único para cada substância. O estado da substância é chamado de fluido supercrítico quando a temperatura e a pressão excedem os valores do ponto crítico (SMITH; NESS; ABBOTT, 2007).

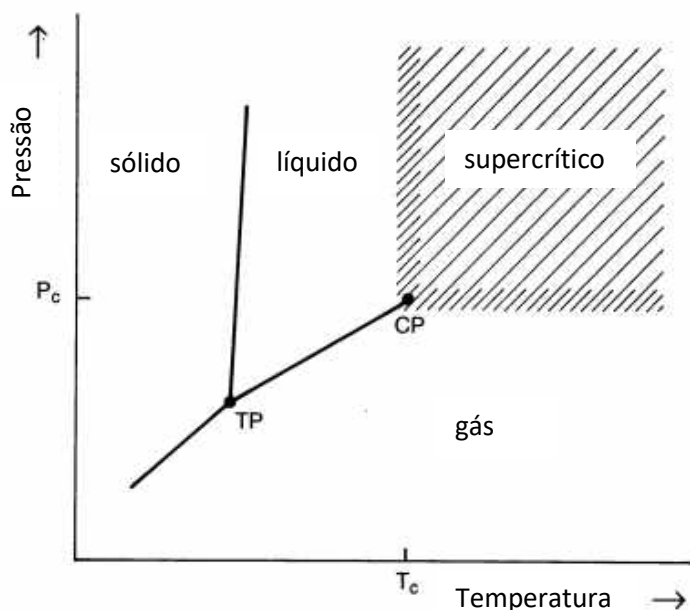


Figura 4 - Diagrama pressão versus temperatura para um componente puro
Fonte: adaptada BRUNNER, 1994

Várias substâncias podem ser utilizadas como solvente na extração supercrítica. O mais comumente empregado é o dióxido de carbono, pois ele apresenta temperatura crítica moderada (31,2 °C) o que previne a decomposição de compostos bioativos dos extratos. Os compostos extraídos não sofrem alterações químicas durante a operação, uma vez que é criada

uma camada de proteção que evita a oxidação dos mesmos. É um solvente relativamente barato, recuperável, não tóxico, não inflamável e não poluente, respeita os critérios de sustentabilidade exigidos em processos químicos. Outra vantagem do uso de CO₂ é que em temperatura ambiente e pressão atmosférica, ele é um gás, o qual pode ser totalmente separado do soluto sem deixar resíduos, o que elimina etapas de concentração e permite a produção de extratos de boa qualidade. Ele possui boa adaptabilidade para remover os componentes de baixa volatilidade, substâncias lipofílicas e ligeiramente polares. E é possível estender e modificar a sua seletividade através da adição de cossolventes, podendo assim extrair componentes polares e aumentar a eficiência da extração (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016; ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020; MAZZUTTI; PEDROSA; FERREIRA, 2021; ALVAREZ et al., 2019; LANG, 2001). Na Tabela 1 são apresentados alguns fluidos comumente utilizados na extração supercrítica e suas respectivas propriedades.

Tabela 1 - Propriedades crítica para componentes puros

Componente	Peso molecular (g/mol)	Temperatura Crítica (°C)	Pressão Crítica MPa (atm)	Densidade Crítica (g/cm³)
Dióxido de Carbono (CO ₂)	44,01	30,9	7,38 (72,8)	0,469
Água (H ₂ O)	18,01	373,8	22,06 (217,7)	0,322
Metano (CH ₄)	16,04	-82,7	4,60 (45,4)	0,162
Etano (C ₂ H ₆)	30,07	32,1	4,87 (48,1)	0,203
Propano (C ₂ H ₈)	44,09	96,6	4,25 (41,9)	0,217
Etileno (C ₂ H ₄)	28,05	9,2	5,04 (49,7)	0,215
Propileno (C ₃ H ₆)	42,08	91,7	4,60 (45,5)	0,232
Metanol (CH ₃ OH)	32,04	239,4	8,09 (79,8)	0,272
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	46,07	240,4	6,14 (60,6)	0,276
Acetona (C ₃ H ₆ O)	58,08	234,9	4,70 (46,4)	0,278

Fonte: SAPKALE et al., 2010

Uma substância em estado supercrítico combina propriedades de gases e líquidos (SAPKALE et al., 2010). Ela apresenta densidade semelhante à de líquidos, viscosidade próxima a de gases normais, baixa tensão superficial e difusividade cerca de duas ordens de magnitude maior que a de líquidos. Isso permite que o fluido em condições supercríticas penetre facilmente nos poros dos materiais sólidos, aumente a transferência de massa e reduza o tempo de extração. Comparando a duração de uma extração líquido-sólido com a de uma extração supercrítica, o tempo pode decrescer de horas ou dias para poucas dezenas de minutos (LANG, 2001; BRUNNER, 2010; BRUNNER, 2005).

Modificações na temperatura do processo alteram a pressão de vapor de soluto, modificações na pressão e na temperatura afetam a densidade, viscosidade e difusividade do fluido (BRUNNER, 2010; SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016; LANG, 2001). Variar a temperatura a uma pressão constante causa efeitos contrários na solubilidade, isto porque a densidade do CO₂ e a pressão de vapor do soluto apresentam comportamentos opostos, em que acréscimos na temperatura reduzem a solubilidade do fluido e aumentam a pressão de vapor do soluto. Aumentar a pressão a uma dada temperatura, pode resultar em acréscimo da densidade do fluido e alterações na solubilidade do soluto (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016). Gomes, Mata e Rodrigues (2007) relataram que sob altas pressões ocorre maior extração de frações voláteis e menor extração de frações não voláteis, desta forma é possível controlar as substâncias extraídas com simples modificações na pressão do processo.

Outra possível maneira de alterar a seletividade e a solvatação do fluido supercrítico seria adicionando um cossolvente à extração (LÓPEZ-BASCÓN; CASTRO, 2020). Isto pode ocasionar interações intermoleculares entre cossolvente e determinados componentes da mistura, aprimorando a seletividade e eficiência da extração e, conseqüentemente, reduzindo o tempo de processo (TEMELLI, 2009; LANG, 2001). Quitain et al. (2006) obtiveram melhor rendimento e maiores quantidades de compostos fenólicos e isoflavonas quando adicionaram etanol na extração supercrítica de resíduo de tofu. O etanol é frequentemente utilizado como cossolvente por possuir baixa miscibilidade com CO₂, baixa toxicidade e ser facilmente eliminado em relação a outros solventes (ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020). Outro solvente largamente utilizado na extração de óleo de soja é o hexano (JOKIĆ et al., 2010). Sua natureza apolar facilita a remoção de compostos lipofílicos.

O processo de solubilização de uma matriz vegetal foi descrito por Brunner (1994). Primeiramente, a amostra absorve o solvente supercrítico, a sua estrutura aumenta de tamanho, há dilatação das membranas e dos canais intercelulares. Neste momento, ocorre a dissolução das substâncias e sua transferência do interior da matriz para a superfície. Quando as substâncias dissolvidas se encontram na superfície da matriz, elas são transportadas para o solvente para em seguida serem removidas dele. Se o solvente passa pela matriz em uma alta vazão pode haver melhora no rendimento da extração, visto que a resistência da transferência de massa externa é reduzida. Porém, se o fluxo for muito alto, o tempo de contato entre soluto e solvente pode ficar insuficiente comprometendo assim a capacidade de extração (ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020).

O tamanho das partículas também interfere no processo. Partículas menores podem aumentar a taxa de extração uma vez que aumentam a área interfacial específica e reduzem o caminho de difusão do soluto. Entretanto, se houver agrupamento de partículas ou formação de canais preferenciais, a velocidade do leito pode ser fluidizada e os filtros entupidos, reduzindo enormemente o rendimento da extração (ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020).

Xiang et al. (2009) foram pioneiros nos estudos da produção de biodiesel a partir de resíduo de molho shoyo em condições supercríticas. Eles avaliaram os efeitos da pressão e temperatura de operação, tamanho das partículas do material, tempo de extração e a relação molar entre metanol e óleo extraído. Concluíram que, em ótimas condições, a fase do extrato rica em biodiesel apresentou 96,21% de mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos. Alvarez et al. (2019) também avaliaram a extração supercrítica para valorizar resíduo de óleo de soja. Os ensaios foram realizados a 35 ou 40 °C, 40 MPa, com ou sem etanol como cossolvente. Eles analisaram a atividade antioxidante dos extratos e a quantidade de fenólicos contida neles, e concluíram que é possível recuperar fitoquímicos através de tecnologias seguras, como a extração supercrítica.

Para que haja melhor aproveitamento da extração, isto é, alta seletividade e menor remoção de compostos indesejáveis, é essencial entender os fenômenos que ocorrem devido às alterações dos parâmetros operacionais (BRUNNER, 2010; ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020). O conhecimento da cinética de extração também é imprescindível. Esta é obtida através da curva de extração que é comumente representada em um gráfico de tempo de experimento versus massa de extrato acumulada. A curva de extração é influenciada pelas condições do processo e por fenômenos que acontecem no reator durante o procedimento. Isto dificulta a comparação entre curvas para materiais e configurações experimentais distintas. Por outro lado, se utilizado o mesmo material e o mesmo equipamento sob diferentes condições é possível relacionar a constante da taxa de extração (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

Alguns autores afirmam que a curva de extração é dividida em três etapas conforme mostrado na Figura 5. Cada estágio é controlado por um mecanismo de transferência de massa. O primeiro, denominado como período de taxa de extração constante (*Constant Extraction Rate* - CER), é quando a superfície externa das partículas é coberta com soluto e o mecanismo dominante é a convecção. No segundo momento acontecem falhas de óleo na camada superficial externa e o mecanismo de difusão começa a atuar associado à convecção na transferência de massa, é o período de queda da taxa de extração (*Falling Extraction Rate* -

FER). A terceira e última etapa é quando o óleo da camada externa já quase desapareceu e a transferência de massa ocorre principalmente por difusão dentro das partículas sólidas, conhecido como período de baixa taxa de extração (*Low Extraction Rate - LER*) ou controlado por difusão (*Diffusion-Controlled - DC*) (JESUS et al., 2013; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

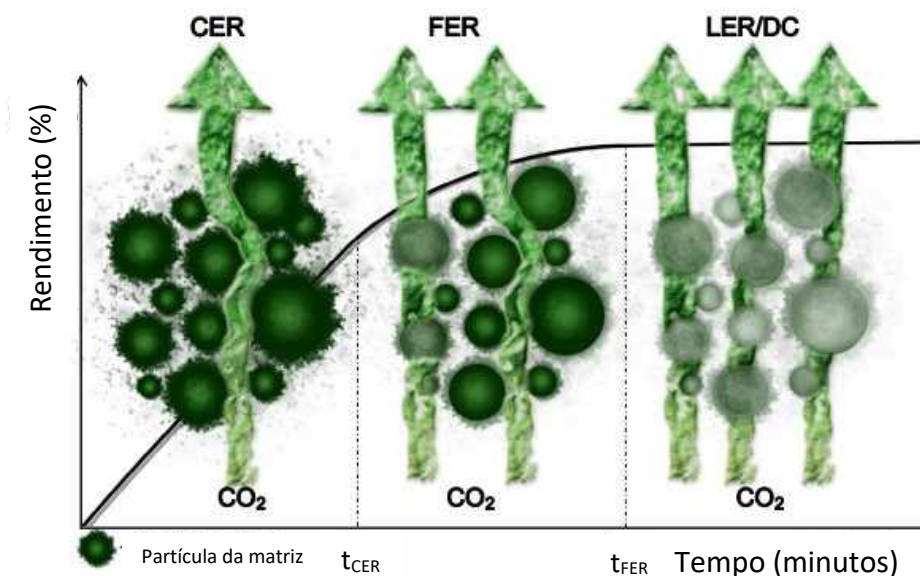


Figura 5 - Curva de extração e os três períodos diferentes
 Fonte: adaptada de SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016

As curvas globais de extração são analisadas por modelos cinéticos para determinação de parâmetros de projeto, como dimensões de equipamento, vazão de solvente e tamanho de partículas. Através delas também é possível estabelecer condições ideais de operação, determinar a taxa de transferência de massa para *scale-up* e análise da viabilidade técnico-econômica do processo a nível industrial (FIORI et al., 2014; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; ESQUÍVEL; BERNARDO-GIL; KING, 1999).

2.3 Extração de soja e resíduos de soja

É possível encontrar na literatura trabalhos que utilizaram soja e seus resíduos para obtenção de subprodutos. Reporta-se aqui alguns trabalhos que aplicaram a extração Soxhlet e extração supercrítica. Ojewumi, Ruth e Daniel (2019) fizeram a remoção de óleo de grãos de soja utilizando o método Soxhlet com hexano. Os autores variaram a massa da amostra inserida no extrator (10, 25 e 40 g), o tempo de extração (2, 6 e 10 horas) e a quantidade de solvente (100, 130 e 160 mL). Os rendimentos obtidos variaram entre 10,59 e 24,24%. O

tempo de extração foi o fator que mais influenciou nos resultados enquanto que o solvente teve pouco efeito ou nenhum. Do óleo obtido foram produzidas velas, que se mostraram mais econômicas que as velas de parafinas e geram menos fuligem.

Tiulea et al. (2011) investigaram os lipídeos totais, as proteínas, os polifenóis e as isoflavonas daidzina, genistina, daidzeína e genisteína contidas em duas variedades de grãos de soja (B e H). O total de lipídeos foi determinado por extração Soxhlet com acetona como solvente. Na soja B foram encontrados 18,8% e no tipo H 21,4%. Em relação às proteínas, foram encontradas 36,4% na soja B e 39,4% na soja H. Os valores de polifenóis apresentados pelos grãos foram bem próximos, sendo de 303 mg/100 g de soja tipo H e 313 mg/100 g soja tipo B. Ao contrário dos polifenóis, a quantidade de isoflavonas entre os grãos foi bem discrepante. Na variedade H foram detectadas 819,0 mg e 905,6 mg genistina/g de soja, enquanto que a variedade B apresentou 460,48 µg daidzina e 364,60 µg genistina/g de soja. Segundo os autores, a variação dos constituintes nos grãos de soja pode ser justificada pelas condições climáticas enfrentadas pela planta.

Chung et al. (2010) também analisaram diferentes tipos de grãos de soja. Primeiramente, foi realizada a extração Soxhlet com etanol e metanol como solventes. Em seguida, foram analisados a atividade antioxidante, a capacidade de absorção de radicais de oxigênio e os fenólicos totais dos extratos. O metanol foi o solvente que apresentou maior rendimento (1,14 g de extrato/10 g soja variedade NC Roy), maior atividade antioxidante (114,74 µg trolox equivalente/g soja seca tipo V00-3636) e maior capacidade de absorção de radicais de oxigênio (345,10 µg trolox equivalente/g soja seca variedade V00-3493), enquanto que o etanol extraiu a maior quantidade de compostos fenólicos (4,16 mg ácido gálico equivalente/g soja seca tipo V00-3493).

Outro trabalho que utilizou o método Soxhlet para remoção de óleo de soja foi o de Grasso, Maroto e Camusso (2006). Os autores investigaram os efeitos por um pré-tratamento enzimático no rendimento da extração. Foram avaliados pH (4,5 a 7,2), tempo de pré-tratamento (4 a 12 horas) e temperatura da hidrólise enzimática (30 a 70 °C). A extração se deu por 6 horas e o solvente utilizado foi hexano. A aplicação de hidrólise enzimática melhorou o rendimento das extrações, que variaram entre 21,58 e 26,68%. Um resultado próximo ao encontrado por Dagostin, Carpiné e Corazza (2015) na extração Soxhlet de soja em flocos com etanol (25,58 ± 0,25%).

Extrações supercríticas também são aplicadas à soja e seus resíduos para obtenção de subprodutos. Como no trabalho de Xiang et al. (2019) em que foi investigado a produção de

biodiesel a partir do resíduo de milho shoyo em condições supercríticas. Foram analisados o tempo de reação (1 a 4 horas), relação molar entre metanol e óleo (10:1 até 45:1), temperatura (40 a 110 °C), pressão (8 a 18 MPa) e tamanho das partículas (20 a 80 meshes). A mistura líquida extraída foi dividida em duas fases. A camada inferior, rica em glicerol, foi descartada e a superior, rica em biodiesel, foi analisada por cromatografia gasosa. O cálculo do rendimento foi feito com base na quantidade de ésteres metílicos de ácidos graxos contidos na fase superior. Os resultados mostraram que os parâmetros otimizados foram 180 minutos de extração, a relação molar metanol e óleo foi 35:1, a temperatura 100 °C, a pressão 16 MPa e o tamanho de partícula de 60 meshes. Sob condições ideais, foi detectado 96,21% de biodiesel na fase superior do extrato.

Alvarez et al. (2019) também avaliaram a aplicação da extração supercrítica para a valorização de resíduo agroindustrial. Eles analisaram dois resíduos diferentes de óleo de soja extraídos por prensagem. As condições aplicadas foram 35 ou 40 °C, 40 MPa, com ou sem etanol como cossolvente. Os ensaios com cossolvente a 35 °C e 40 MPa apresentaram maior rendimento, aproximadamente 10,5% para ambas amostras. Nos ensaios sem cossolvente, o processo de extração foi ligeiramente mais eficaz a 35 que a 40 °C, sendo o rendimento de 2% para o resíduo 1 e 3,5% para o resíduo 2. Os autores aferiram os fenólicos totais, os flavonoides e a capacidade antioxidante dos extratos. Na análise de compostos fenólicos, foram encontrados nos extratos com cossolvente 16 ± 1 e $10,6 \pm 0,9$ mg de ácido gálico equivalente por 100 g de resíduo seco. Os extratos sem cossolventes apresentaram valores entre 0,9 e 5,6 mg de ácido gálico equivalente por 100 g de matéria seca. Em relação aos flavonoides, as amostras extraídas com etanol apresentaram 65 e 31 mg de quercetina equivalente para cada 100 g de resíduo de óleo de soja seco. E as amostras sem cossolvente não apresentaram níveis de flavonoides detectáveis. Quanto aos antioxidantes, as amostras extraídas na presença de etanol apresentaram $9,7 \pm 0,4$ e $12,0 \pm 1,0$ μmol de trolox equivalente por 100 g de material seco, enquanto que as amostras sem etanol apresentaram valores entre 0,3 e 3,0 μmol trolox equivalente por 100 g de material seco. Segundo os autores, houve correlação entre os resultados dos compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Jokić et al. (2012) avaliaram o impacto da pressão (300 a 500 bar), temperatura (40 a 60 °C), vazão mássica (0,194 – 0,436 kg/h) e o tamanho das partículas (0,238 – 1,059 mm) na extração supercrítica de grãos de soja. Os rendimentos variaram entre $19,3 \pm 0,3\%$ e $13,5 \pm 1,4\%$. Foi observado que o aumento da pressão, temperatura, vazão de solvente e

redução no tamanho das partículas causaram acréscimo na quantidade de extrato obtido. Os autores também executaram a extração Soxhlet dos grãos de soja com n-hexano e o rendimento alcançado foi de $20,1 \pm 0,1\%$.

Kao, Chien e Chen (2008) compararam o rendimento de extração de isoflavonas do resíduo de óleo de soja obtidas por solvente (água e etanol, 1:1, v/v) e por extração supercrítica (50 – 80 °C e 300 – 400 bar). A extração por solvente apresentou 2411 µg malonilglicosídeo, 2184 µg glicosídeo, 256 µg acetilglicosídeo e 159 µg aglicona por g de material, totalizando 5010 µg isoflavonas/g resíduo de soja. O ensaio supercrítico que apresentou a maior quantidade de isoflavonas foi a 60 °C e 350 bar, sendo de 798 µg malonilglicosídeo, 1982 µg glicosídeo, 317 µg acetilglicosídeo e 182 µg aglicona em 1 g de material, no total foram extraídas 3279 µg isoflavonas/g resíduo de soja. Apesar de o rendimento apresentado pela extração supercrítica ter sido inferior ao da extração com solvente, esta apresentou maior quantidade de aglicona, isoflavonas que desempenham maior atividade biológica.

Quitain et al. (2006) também realizaram extrações supercríticas para obtenção de subprodutos. Foi utilizado resíduo de tofu para recuperação de compostos oléicos. As condições experimentais variaram a pressão (12 – 30 MPa), a temperatura (40 – 80 °C) e adição de etanol como cossolvente. A maior quantidade de óleo obtida foi 63,5% a 40 °C, 20 MPa e 10% de etanol. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa e apresentaram como principais constituintes os ácidos graxos (aproximadamente 95 – 85%) e fitoesteróis (aproximadamente 5 – 15%), variando a quantidade de acordo com a pressão e temperatura do experimento. Também foram aferidos os fenólicos totais e as isoflavonas genisteína e daidzeína. O extrato que apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos (35 mg ácido gálico equivalente/g extrato) foi obtido a 12 MPa, 40 °C com 10% de etanol. E o maior rendimento de isoflavonas (aproximadamente 170 µg genisteína e daidzeína/g extrato) foi obtido à 30 MPa, 40 °C com 5% de etanol. Pode-se concluir que a presença de etanol favoreceu a extração destes componentes.

2.4 Modelagem da cinética de extração supercrítica

As curvas globais de extração obtidas durante os experimentos supercríticos são analisadas por modelos cinéticos para se determinar parâmetros de *scale-up* e garantir viabilidade técnico-econômica do processo à nível industrial (FIORI et al., 2014). Diferentes

modelos podem ser encontrados na literatura e eles são classificados como modelos empíricos e modelos fenomenológicos.

Os modelos empíricos expressam a dependência do rendimento da extração em relação ao tempo. Seus parâmetros não possuem sentido físico, portanto, estes modelos não podem ser utilizados para o escalonamento de projetos. Porém, estes parâmetros podem ser úteis para estimar curvas de extração para o mesmo sistema soluto-solvente dentro da faixa de condições que foram determinados (SOVOVÁ, 2012; ESQUÍVEL; BERNARDO-GIL; KING, 1999).

Os modelos fenomenológicos são baseados na analogia de transferência de calor e na integração de equações de equilíbrio de massa diferencial. Seus parâmetros são capazes de descrever aspectos relevantes do processo como o equilíbrio das fases, a resistência à transferência de massa e o padrão de fluxo. Neles, o perfil de concentração é obtido pela integração das equações da fase sólida e fluida e o rendimento do extrato é calculado pela concentração de efluente. Caso algum aspecto do processo sobressaia, o modelo pode ser simplificado. Isto é, se o mecanismo de difusão nas partículas for mais lento que a transferência de extrato da superfície da partícula para a saída do extrator, a modelagem pode ser descrita apenas pela etapa controladora (SOVOVÁ, 2012). Para que um modelo seja usado como ferramenta de simulação é necessário que ele reproduza o comportamento físico da estrutura sólida e as observações experimentais das extrações (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009).

O modelo logístico de Martínez et al. (2003) foi proposto para descrever as curvas de extração de oleorresina de gengibre. Ele foi desenvolvido a partir da diferencial do balanço de massa aplicado no interior do leito de extração para as fases fluida e sólida. A princípio, ele foi classificado como um modelo fenomenológico. Porém, à medida que diversos trabalhos apresentaram valores negativos para t_m , parâmetro que determina o tempo em que ocorre a máxima taxa de extração, ele perde o sentido físico, tornando-se então um modelo de caráter empírico (JESUS et al., 2013).

Este modelo foi aplicado por alguns autores como Jokić et al. (2011) que analisaram as curvas globais de extração supercrítica de óleo de soja e obtiveram bom ajuste para todos os estágios das curvas. Segundo os autores, o modelo poderia descrever com sucesso as cinéticas de extração através dos parâmetros ajustáveis b e t_m . Marinho et al. (2019) também encontraram bons resultados para descrever as curvas de extração supercrítica de germén de milho utilizando o modelo de Martínez et al. (2003). Jokić, Svilovic e Vidovic (2015)

avaliaram diferentes condições supercríticas para extrair óleo de soja. Em todos os ensaios, o modelo logístico apresentou valores negativos para o parâmetro t_m . Ou seja, ainda que este modelo apresente uma boa descrição quantitativa de curvas globais de extração, a ausência de significado físico de seus parâmetros impossibilita sua aplicação para design de processos e aumento de escala (JESUS et al., 2013).

Neste sentido, os parâmetros físicos presentes em modelos fenomenológicos poderiam descrever melhor os comportamentos experimentais das extrações. O modelo de células quebradas e intactas (em inglês *broken and intact cells*, BIC) descrito por Sovová (1994) pode ser uma ideia para o desenvolvimento de modelagem fenomenológica. Nele, considera-se que o solvente flui axialmente em velocidade constante por um leito cilíndrico que condiciona o material vegetal triturado. O leito está homogêneo quanto ao tamanho das partículas da matriz e à sua distribuição em seu interior. A pressão e temperatura do processo são constantes e o solvente está isento de soluto na entrada do extrator. Como o material passa por um processo de trituração, admite-se que uma parte do soluto fica diretamente exposta ao solvente e outra parte é protegida pelas paredes celulares. Segundo Sovová (2012), as curvas de extração fornecidas pelo modelo BIC são compostas por uma seção inicial mais íngreme, que está relacionada ao soluto de fácil acesso, e uma seção final que cresce lentamente e está relacionada às células intactas. Estas seções são conectadas por uma seção de transição em que o soluto de fácil acesso das partículas já está se esgotando. É possível relacionar estas divisões às regiões CER, FER e DC descritos anteriormente.

Alguns autores associam o modelo de Sovová (1994) ao modelo de *splines* de Meireles (2008). Apesar deste último possuir natureza puramente empírica e não levar em consideração questões fenomenológicas, como interações soluto-matriz ou fracionamento do soluto durante o processo de extração (SANTANA et al., 2018), ele é capaz de delimitar os períodos CER, FER e DC. Uma vez que seu ajuste é composto por 3 retas apresentadas nas Equações 1, 2 e 3 sendo cada uma associada a um período da curva de extração.

$$\begin{aligned} \text{Quando } t \leq t_{CER} \\ m_{ext} = b_0 + b_1 t \end{aligned} \quad \text{Equação 1}$$

$$\begin{aligned} \text{Quando } t_{CER} < t \leq t_{FER} \\ m_{ext} = b_0 + b_1 t + b_2(t - t_{CER}) \end{aligned} \quad \text{Equação 2}$$

$$\begin{aligned} \text{Quando } t > t_{FER} \\ m_{ext} = b_0 + b_1 t + b_2(t - t_{CER}) + b_3(t - t_{FER}) \end{aligned} \quad \text{Equação 3}$$

Em que,

m_{ext} – Massa de extrato (g)

b_0 – Coeficiente linear (termo de ordem zero) da reta CER (g)

b_1, b_2, b_3 – Coeficientes angular (termos de primeira ordem) das retas CER, FER e DC, respectivamente (g/min)

t – Tempo de extração (min)

t_{CER} – Duração do período CER (min)

t_{FER} – Duração do período FER (min)

Aplicando as curvas *splines* é possível obter informações como a taxa de extração (M_{CER}), o rendimento (R_{CER}) e o tempo de duração (t_{CER}) do período CER, relação entre solvente consumido durante o primeiro período e massa de amostra alimentada (S/F_{CER}) e a razão mássica de extrato na saída do reator (Y_{CER}). Alguns destes parâmetros podem ser usados em estudos que avaliam o aumento de escala de processos (JESUS et al., 2013).

Jesus et al. (2013) descreveram quantitativamente as curvas de extração supercrítica de óleo de farelo de arroz por diversos modelos. Os que apresentaram melhores ajustes foram o modelo logístico de Martínez et al. (2003) e o *splines*. Marinho et al. (2019) também utilizaram *splines* para avaliar dados da extração supercrítica de óleo de germén de milho. O modelo ajustou muito bem os dados, oferecendo resultados satisfatórios para descrever a cinética de extração.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Resíduo de molho de soja

O material utilizado nesse estudo foi fornecido pela empresa Sakura Nakaya Alimentos Ltda. localizada em Boituva – São Paulo, Brasil. Esse resíduo foi gerado após o processo de fermentação e separação do molho de soja fermentado. Não houve nenhum processo de remoção de óleo ou secagem, ele já veio moído e é constituído basicamente por soja, milho, sal, leveduras e bactérias lácteas.

3.1.2 Gases, reagente e padrões

As extrações supercríticas foram realizadas com dióxido de carbono (White Martins, 99% de pureza), hexano (Qhemis, 98,5%) e etanol (Synth, 95%). As extrações Soxhlet foram feitas com etanol (Synth, 95%), acetona (Dinâmica, 99,5%) e hexano (Qhemis, 98,5%).

Para a quantificação de ácidos graxos utilizou-se hidróxido de potássio (Vetec, 85%), metanol (Vetec, 99,8%), heptano (Synth, 99%), ar comprimido (White Martins, 20% O₂ e 80% N₂), gás de hidrogênio (White Martins, 99,95%), argônio (White Martins, 99,998%) e hélio (White Martins, 99%).

Nas análises de fenólicos foi empregado etanol (Synth, 95%), Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), carbonato de sódio anidro PA (Dinâmica, 99,5%) e ácido gálico (Vetec, 99%). Na de flavonoides utilizou-se nitrito de sódio (Dinâmica, 97%), cloreto de alumínio (Vetec, 99,5%), hidróxido de sódio (Impex, 99%) e rutina (Sigma-Aldrich, ≥ 94%).

Para a atividade antioxidante foi usado etanol (Synth, 95%), acetona (Dinâmica, 99,5%) e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Sigma-Aldrich, 95%).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Caracterização do resíduo

3.2.1.1 Preparo do resíduo

O preparo do resíduo foi adaptado a partir da metodologia de Yeh, Su e Lee (2005). Uma quantidade de 1 kg de material foi colocado em 20 L de água e armazenados sob refrigeração durante 12 horas. Posteriormente, a água foi removida e o sólido ficou retido em uma peneira de 100 mesh e 8” de diâmetro da marca Bertel. Cerca de 300 g de resíduo foi

novamente lavado em água corrente, filtrado e colocado em um béquer de 1 litro. Completou-se o béquer com água destilada e o conjunto foi colocado em banho ultrassônico (LimpSonic, 40 KHz) durante 20 minutos em temperatura ambiente. Após este tempo, a condutividade da água foi medida (Digimed, DM-20), o material filtrado e acondicionado no béquer. Adicionou-se 700 mL de água destilada e o conjunto foi levado para o banho ultrassônico durante 20 minutos. Este ciclo se repetiu por 6 vezes, quantidade necessária para que a condutividade da água se tornasse constante. Em seguida, o material foi encaminhado para o congelamento e liofilização (LIOTOP modelo L101; Bomba ICME tipo M71B4). Após a liofilização a 200 microHg e $- 51\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sólido remanescente foi empacotado à vácuo e armazenado no congelador.

3.2.1.2 Teor de umidade

A água presente nos alimentos é o que propicia o desenvolvimento de microrganismos e as atividades biológicas (GONELLI et al., 2007). Diferentes métodos podem ser aplicados para quantificá-la, dentre eles estão a dessecação, destilação, secagem em estufa, secagem por infravermelho, microondas, reações químicas ou ainda titulação Karl Fischer (MORGANO et al., 2008).

Neste trabalho, foi utilizado o método de secagem baseado em Gonelli et al. (2007) adaptado. A massa do material descongelado foi medida em balança Shimadzu AUW220 (precisão 0,0001 g) e levada para estufa (Biopar Equipamentos EletroEletrônicos, modelo S180SD) a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após atingir peso constante, o material foi transferido para um dessecador até alcançar temperatura ambiente e sua massa foi novamente aferida. O cálculo da umidade foi feito através da diferença entre a massa inicial de resíduo e a massa final.

3.2.1.3 Teor de cinzas

Segundo Cecchi (2003), as cinzas presentes em um alimento são resíduos inorgânicos que se mantiveram após a queima da matéria orgânica que se transformou em CO_2 , H_2O e NO_2 . O método para aferir este parâmetro foi adaptado da Farmacopeia Brasileira (2019). As análises foram feitas em triplicata para o resíduo *in natura* e processado.

O resíduo *in natura* seco (3 g) foi levado à mufla (Quimis, modelo Q318S21), a qual foi aquecida até $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e mantida nesta temperatura por 3 horas. Após esse período, o material foi transferido para um dessecador, e ao atingir a temperatura ambiente, ele foi novamente pesado. Por meio da razão entre a massa do resíduo final e a

massa de resíduo inicial foi determinado o teor de cinzas. O mesmo procedimento foi realizado para análise do teor de cinzas do resíduo processado.

3.2.1.4 Análise termogravimétrica (ATG)

Na análise termogravimétrica o material a ser analisado é colocado em uma microbalança e submetido a um aumento programado de temperatura. Durante a rampa, a temperatura é registrada continuamente, assim como a alteração de massa da amostra. Com as informações obtidas, pode-se compreender o comportamento do material durante a degradação térmica e saber em quais faixas de temperatura a decomposição é mais pronunciada (SANTOS et al., 2012).

Neste experimento, cerca de 10 mg de resíduo lavado e liofilizado foram colocadas no equipamento (TGA-50 Shimadzu). Aqueceu-se o aparelho da temperatura ambiente até 800 °C a uma taxa de 10 °C/min em atmosfera contendo 15% Ar sintético/He com vazão de 60 mL/min. Durante todo o processo foi feito o monitoramento da temperatura e o peso.

3.2.1.5 Análise elementar

A análise elementar determina a quantidade de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio contida nos materiais (YU et al., 2017). Para avaliar a quantidade destes elementos no resíduo de molho shoyo lavado e liofilizado foi utilizado o Analisador Elementar CHNS/O (Thermo Scientific, modelo FlashSmart) pertencente ao Instituto de Química da USP de São Carlos.

Aproximadamente 2,4 mg de amostra foram acondicionadas em uma cápsula de estanho e inseridos no equipamento. No momento da análise ocorre a oxidação do estanho (Dynamic Flash Combustion) e a liberação de uma grande quantidade de calor, aumentando a temperatura local para cerca de 1700 °C. Nestas condições, o material é submetido a uma região de oxidação e redução em um tubo contido no equipamento. O resultado é a conversão do C, H, N e S da amostra em gases específicos (CO₂, H₂O, N₂ e SO₂), que são levados a uma coluna cromatográfica para separação e posterior detecção em um detector de condutividade térmica. A calibração é feita previamente com padrões específicos para quantificar o C, H, N e S da amostra em % massa/massa.

3.2.1.6 Análise centesimal

Conforme já citado, no resíduo de molho shoyo é possível encontrar muitos constituintes funcionais. Para que ele seja consumido como alimento, ração animal ou empregado na indústria alimentícia é importante conhecer a sua composição. Sendo assim, o material foi analisado pelo Laboratório de Controle de Qualidade GMO, localizado na cidade de Belo Horizonte.

Para a amostra processada foram determinados: proteína, fibra, carboidratos, gordura, umidade relativa e material volátil; e para a amostra *in natura* foi realizada análise de proteína.

O laboratório utilizou o método Kjeldahl Titulométrico segundo ISO 1871:2009 para aferir a proteína. Para a fibra, foi feita análise enzimática gravimétrica de acordo com AOAC. Os carboidratos foram medidos pelo teste de Fehling e a umidade e o material volátil por gravimetria conforme IAL 1º ed. Digital, 2008. A gordura foi determinada por gravimetria em conformidade AOAC 920.39 20º ed. 2016.

3.2.1.7 Densidade real

A densidade real é a razão entre a massa de uma determinada substância e o volume ocupado pela mesma. Para determiná-la é necessário contabilizar o volume dos espaços internos que existem no material e subtrair do volume total. Um equipamento utilizado para tal função é o picnômetro a gás. Comumente emprega-se o gás hélio, por ser inerte e suas moléculas pequenas permitem-no adentrar nos menores espaços da amostra (LOWELL et al., 2004). É este parâmetro que possibilita contabilizar os espaços vazios contidos no leito da extração supercrítica.

Para determinar a densidade real neste trabalho utilizou-se um picnômetro a hélio da marca Micromeritics, modelo AccuPyc 1330. A medida de massa de um cadinho de metal de 3,5 cm³ foi realizada em uma balança. Preencheu-se aproximadamente $\frac{3}{4}$ de seu volume com resíduo de molho shoyo lavado e liofilizado e verificou-se a massa do mesmo. O conjunto foi colocado no picnômetro, onde foi informado o volume do cadinho e a massa da amostra. Através da variação entre a pressão de hélio na câmara da amostra e a pressão de uma câmara para o volume calibrado, é feito o cálculo da densidade real. O aparelho forneceu a densidade real e o desvio padrão após 5 leituras.

3.2.1.8 Densidade “bulk”

Densidade “bulk” é dada pela massa de uma substância em pó dividida pelo seu volume total, incluindo os poros internos e volumes vazios entre as partículas. A forma das partículas, a força de ligação partícula-partícula e a umidade do equilíbrio influenciam na coesão do pó; e o grau de empacotamento do pó no leito afetam a determinação da densidade “bulk” (LOWELL et al., 2014). De acordo com Eisenbies e colaboradores (2019), os métodos para medi-la descritos pela ISO 17828:2015 (ISO 17828), EN-15103 e ASAE S269.5 são equivalentes. Um recipiente de volume conhecido foi preenchido com o material. O recipiente foi colidido a uma superfície plana por uma quantidade de vezes pré-determinada para o empacotamento do leito e aferiu-se a massa. Com estes dados, calculou-se a densidade “bulk”. Neste trabalho, foi realizada esta metodologia com adaptações.

Uma proveta de 50 mL foi pesada e preenchida parcialmente com resíduo de molho shoyo processado. Bateu-se o conjunto em uma superfície plana até que volume ocupado pelo sólido se tornasse constante. Anotou-se a massa do resíduo e o volume ocupado pelo mesmo, através da razão entre eles, calculou-se a densidade “bulk”.

3.2.1.9 Atividade de água

A atividade hídrica (a_w) é um parâmetro que relaciona a disponibilidade de água nos alimentos com o crescimento microbiano e as reações bioquímicas. Determinada através da razão entre a pressão de vapor de equilíbrio da amostra e a pressão de vapor de equilíbrio da água pura na mesma temperatura, seu valor varia entre 0 e 1 (PRIOR, 1979).

Para aferir este parâmetro foi utilizado o equipamento Novasina LabSwift- a_w com precisão de $\pm 0,01 a_w$. Através da variação na resistência eletrolítica gerada pela umidade do material, o aparelho determinou o valor da atividade de água. Foram realizadas as análises do resíduo *in natura* e do resíduo processado, em triplicata.

3.2.1.10 Análise granulométrica

Através desta análise é possível caracterizar as partículas de material de acordo com seus tamanhos. O peneiramento é uma operação unitária muito utilizada para isto. Nele, uma quantidade de amostra é passada por um agregado de peneiras. Cada peneira possui uma abertura de diâmetro (malha) que reterá as partículas maiores que este diâmetro, as demais passarão. As peneiras são organizadas em ordem decrescente em relação aos diâmetros, sendo

a última um recipiente vedado, onde ficam os fragmentos mais finos que passaram por todas as peneiras (CREMASCO, 2014).

Foi feita a classificação granulométrica para o resíduo processado utilizando as peneiras de 8, 12, 20, 32, 48, 80 e 115 mesh da marca Bertel e um agitador AS200 Retsch. Para calcular o diâmetro média da partícula utilizou-se a Equação 4 citada por Aguiar et al. (2013).

$$d_s = \log_{10}^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (m_i (\log_{10}(d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}))}{\sum_{i=1}^n m_i} \right] \quad \text{Equação 4}$$

Em que d_s é o diâmetro médio, i é um contador, m_i é a massa retida na peneira i , d_i é o diâmetro da peneira i , d_{i+1} é o diâmetro da peneira acima da peneira i .

3.2.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas para o resíduo processado antes e após a extração supercrítica. Primeiramente, foi feita a metalização com ouro no aparelho LEICA EM SCD050 e, em seguida, analisou-se no Zeiss EVO MA10 com operação a alto vácuo (menor que $1,3 \cdot 10^{-4}$ mbar), utilizando 5,0 kV de energia (EHT) e magnificação de 50X e 1.00KX. O aparelho contém detectores de elétrons secundários (SE), elétrons retroespalhados (BSD) e um detector de espectroscopia de energia dispersiva por Raios-X (EDS) (Oxford modelo 51-ADD0048).

3.2.2 Processos extrativos

3.2.2.1 Extração Soxhlet

A metodologia utilizada foi da Farmacopeia Brasileira (2019) com adaptações. Um filtro de papel contendo 10 g de resíduo de molho shoyo processado foi colocado no aparelho extrator tipo Soxhlet. Um balão de vidro de 250 mL foi colocado em uma estufa a 105 °C. Após 1 hora, a massa do balão foi medida e este preenchido com solvente. Foram selecionados os solventes acetona, etanol e hexano em razão da diferença de polaridade entre eles.

O sistema foi preparado, garantindo a vedação completa no encaixe balão-extrator. Ajustou-se a manta de aquecimento (Fisatom) de acordo com a temperatura de ebulição de cada solvente e o banho de resfriamento do condensador foi mantido a 12 °C. A extração

ocorreu por 4 horas contabilizadas a partir da primeira sifonagem. Ao final do experimento, realizou-se a evaporação do solvente por meio do rotaevaporador (IKA, modelo RV10) a 140 rpm e 40 °C. O extrato remanescente foi colocado em estufa a 40 °C até massa constante.

O rendimento foi calculado pela Equação 5 apresentada por Danlami, Arsad e Zaini (2015).

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Massa de extrato}}{\text{Massa total de amostra}} * 100\% \quad \text{Equação 5}$$

3.2.2.2 Extração supercrítica

As extrações supercríticas foram feitas em uma unidade de escala laboratorial apresentada na Figura 6. Ela é constituída por: válvulas, um cilindro de CO₂; um banho termostático (Tecnal TE-184) para resfriar o gás na bomba e outro (Ethiktechnology, 521/D) para aquecer o extrator; uma bomba seringa (Teledyne Isco, modelo 500D), um controlador de temperatura (Novus, N1100) e um extrator com volume de 63 mL (1,98 cm de diâmetro x 20,5 cm de altura).

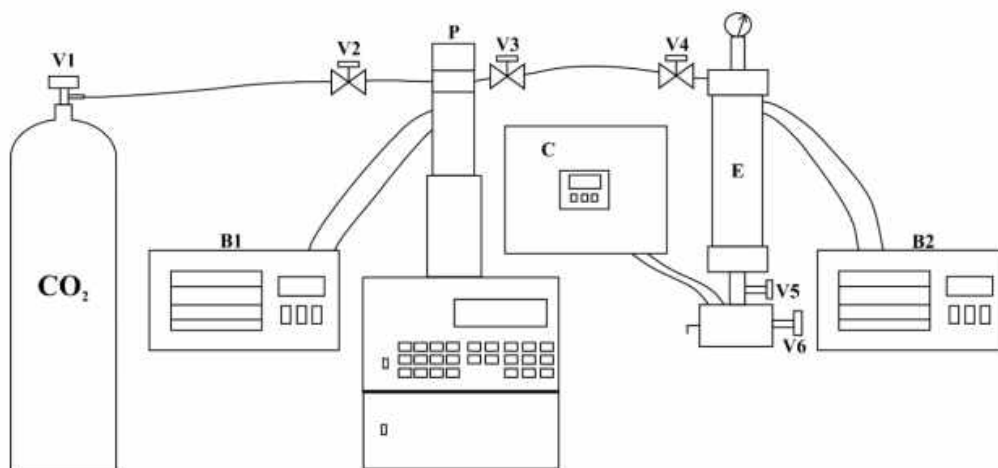


Figura 6 - Representação da unidade de extração supercrítica laboratorial constituída por válvulas (V1 a V6), cilindro de CO₂, bomba (P), extrator (E), controlador de temperatura (C), banho termostático para resfriar a bomba (B1) e para aquecer o extrator (B2)

Fonte: SOLDAN et al. (2020)

O leito do extrator foi preenchido com 5 g de resíduo de molho shoyo processado e 50 g de esferas de vidro (3 mm de diâmetro) tal como apresentado na Figura 7. A organização foi feita desta maneira a fim de se prevenir a formação de canais preferenciais ou

agrupamento no leito, uma vez que as partículas do material são pequenas (REVERCHON; MARCO, 2006; ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020).

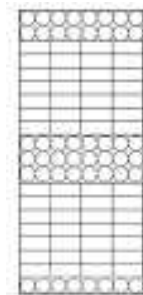


Figura 7 - Organização no leito extrator em que as circunferências representam as esferas de vidros e os retângulos representam o resíduo
Fonte: SOLDAN et al. (2020)

O procedimento experimental foi executado da seguinte maneira:

1 – Ligou-se o banho termostático acoplado a bomba para evitar que o CO₂ vaporizasse.

2 – Quando o banho atingiu 5 °C, abriram-se as válvulas V1 e V2 e a bomba foi preenchida com o solvente.

3 – Esperou-se por aproximadamente 30 minutos para que o CO₂ se arranjasse dentro da bomba.

4 – A amostra e as bolinhas de vidro foram colocadas no vaso extrator e este foi fechado.

5 – Conectou-se o controlador de temperatura ao bloco de aquecimento na saída do vaso. A temperatura foi mantida a 90 °C para evitar que o extrato congelasse devido ao abaixamento de temperatura provocado pela expansão do gás (efeito Joule-Thomson).

6 – Ligou-se o banho de aquecimento acoplado ao vaso extrator. A temperatura foi determinada de acordo com cada experimento.

7 – Decorrido os 30 minutos, as válvulas V1 e V2 foram fechadas e as válvulas V3 e V4 abertas. Assim o vaso extrator foi preenchido com o solvente.

8 – Pressurizaram-se a bomba e o extrator simultaneamente até a pressão pré-determinada e aguardou mais 30 minutos para estabilização da pressão e da temperatura dentro do extrator – tempo de extração estática ou pré-extração.

9 – O frasco âmbar de coletar a amostra foi pesado e encaixado no aparato.

10 – Passados os 30 minutos, aferiu-se o volume de gás da bomba e a extração foi iniciada.

11 – A válvula agulha V5 foi aberta por completo enquanto que a micrométrica foi aberta vagarosamente até que a vazão de solvente alcançasse 3 mL/min.

12 – A cada 10 minutos, fechava-se a válvula V5 e anotava o peso da amostra e a quantidade de CO₂ ainda contida na bomba.

13 – A extração foi feita até que a razão massa extraída/tempo se tornasse constante.

14 – O extrato coletado foi lacrado e mantido sob refrigeração longe da luz.

15 – O vaso foi despressurizado e todos os equipamentos (bomba, banhos e controlador de temperatura) foram desligados.

A temperatura, a pressão, a adição de cossolvente, o tempo de extração, o tamanho da partícula e a vazão do solvente são variáveis relevantes no processo de extração supercrítica. A determinação destes fatores neste trabalho foi feita baseada na literatura e nas limitações operacionais da unidade e do material (ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020).

De acordo com Xiang e colaboradores (2019), o aumento da pressão faz com que o rendimento da extração supercrítica de resíduo de molho shoyo cresça. Desta forma, considerando que a pressão máxima alcançada pelo equipamento utilizado é de 258,6 bar; adotou-se como condições experimentais 200 e 250 bar. Para as temperaturas estabeleceu-se 40 e 60 °C, com o intuito de evitar a degradação de compostos termossensíveis. Silva, Rocha-Santos e Duarte (2016) relataram que para se alcançar maiores rendimentos globais/específicos ou maiores propriedades bioativas, 43% dos trabalhos citados por eles foram realizados entre 40 e 50 °C e 33% entre 50 e 60 °C. Quanto à pressão, 37% dos trabalhos aplicaram de 200 a 300 bar e 28% de 300 a 400 bar.

Para avaliar a influência do cossolvente na extração em condições supercríticas, foram realizados experimentos a 250 bar e 40 °C com adição de etanol e hexano. Uma quantidade suficiente de cossolvente foi adicionada ao material, apenas para molhá-lo, sem excesso, segundo a metodologia de López-Bascón e Castro (2020) com adaptações. Em seguida, a mistura foi acondicionada no vaso extrator onde permaneceu em processo de pré-extração durante 30 minutos. Após este tempo, fez-se a coleta do extrato a uma vazão de 3 mL/min pelo mesmo tempo do ensaio a 250 bar e 40 °C sem cossolvente. Ao final do experimento, foi realizada uma única pesagem do material coletado.

A Tabela 2 apresenta dados dos parâmetros usados nos experimentos.

Tabela 2 - Parâmetros dos ensaios de extração supercrítica

Experimento	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Densidade CO ₂ ¹ (g/mL)	Cossolvente
1	40	200	0,84	-
2	40	250	0,88	-
3	60	200	0,72	-
4	60	250	0,79	-
5	40	250	0,88	Etanol
6	40	250	0,88	Hexano

O rendimento foi calculado conforme Equação 5, descrita anteriormente.

3.2.3 Caracterização dos extratos

3.2.3.1 Ácidos graxos

O procedimento de determinação dos ácidos graxos foi realizado de acordo com Marinho et al., 2019. Inicialmente, foi feita a derivatização dos extratos. A derivatização promove mudanças nos grupos funcionais das moléculas, reduz sua polaridade e aumenta sua volatilidade. Isso amplia a separação dos picos cromatográficos, melhorando a leitura do detector (FRIAS; GRAMACHO; PINEIRO, 2014).

Para cada 60 mg de amostra foram adicionados 2 mL da solução de KOH (Vetec, 85% de pureza)/Metanol (Vetec, 99,8%) (2 mol/L) preparada previamente. A mistura foi homogeneizada por 5 minutos com o auxílio de um agitador vórtex (Astral Científica, 50Hz). Em seguida, 5 mL de heptano (Synth, 99%) foram adicionadas e houve, então, a formação de duas fases. Somente a fase superior (1 µL) foi analisada no cromatógrafo gasoso (Shimadzu, modelo 2014) com detector FID e coluna RTX-Wax (Restek, 30 m x 0.32 mm i.d.; espessura do filme de 0.25 µm). O forno estava inicialmente a 120 °C e foi aquecido até 180 °C a uma taxa de 15 °C/min. Ele foi novamente aquecido até 210 °C, desta vez a uma taxa de 5 °C/min e permaneceu a 210 °C durante 2 minutos. Foi utilizado Hélio como gás de arraste a uma vazão de 2,14 mL/min. O injetor e o detector foram mantidos em 250 °C e o split foi de 1:80.

A identificação dos picos formados pelas amostras foi feita baseada no tempo de retenção dos reagentes padrões. E a quantificação foi realizada comparando a área dos picos das amostras com a área padrão heptadecanoato de metila injetado na concentração de 10,321 mg/mL.

¹Dados consultados em <https://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>

3.2.3.2 Atividade antioxidante

Para medir a capacidade oxidativa dos extratos deste trabalho, foi utilizado o procedimento de Rufino et al. (2007). Inicialmente, foi preparada uma solução com 21 mg de extrato e 0,1 mL de etanol e, a partir dela, realizou-se cinco diluições. Em um ambiente com ausência de luz, dissolveu-se 2,4 mg de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) em 100 mL de etanol, produzindo uma solução com concentração de 60 μ M. Misturou-se 0,1 mL da diluição da amostra com 3,9 mL do preparado de DPPH 60 μ M e homogeneizou-se manualmente. Após uma hora em repouso à temperatura ambiente, a absorvância foi medida em espectrofotômetro UV/VIS (Pró-análise, V-1200) à 515 nm. Para o branco, foi utilizado etanol.

Uma solução controle também foi preparada com 40 mL etanol 50%, 40 mL acetona 70% e 20 mL de água destilada. Para aferir sua absorvância, 0,1 mL da solução foi adicionada a 3,9 mL de DPPH 60 μ M, misturada manualmente e lida no espectrofotômetro.

Para construir a curva de calibração variou-se a concentração da solução inicial DPPH de 0 até 60 μ M. Uma alíquota de cada concentração foi transferida para cubetas de vidro e lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm. Etanol foi utilizado como branco. De posse dos resultados, construiu-se um gráfico de absorvância versus concentração de DPPH. Através desta curva, pode-se obter o valor equivalente à metade da absorvância inicial da solução controle.

Para calcular o consumo em μ M de DPPH nas amostras, construiu-se um gráfico de absorvância versus diluição em (mg/L) e determinou-se a equação da reta. Substituindo a absorvância equivalente a 50% da concentração do DPPH, encontrou-se o resultado do EC50.

3.2.3.3 Flavonoides totais

A caracterização de flavonoides foi adaptada da metodologia de Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999). O extrato (21 mg) foi diluído em 0,1 mL etanol, adicionou-se 0,3 mL de NaNO₂ diluído a 5% em água destilada. Após 5 minutos, colocou-se 0,6 mL da solução de AlCl₃ diluído a 10% em água destilada. No décimo primeiro minuto, acrescentou-se 2 mL de NaOH (1M). A absorvância foi medida à 450 nm em espectrofotômetro (Pró-análise, V-1200).

A curva de calibração foi construída a partir de diferentes diluições de rutina em etanol, também lidas no comprimento de onda de 450 nm. As leituras foram feitas em triplicata e os resultados são expressos em mg de rutina/100 g de resíduo processado seco e mg de rutina/g de extrato.

3.2.3.4 Fenólicos totais

A caracterização dos compostos fenólicos foi feita em duplicata fundamentada na metodologia de Singleton e Rossi (1965) com alterações. Para a análise, 21 mg de extrato foi diluído em 0,1 mL de etanol. Acrescentou-se 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu em água destilada na proporção de 1:10. Aqueceu-se a mistura durante 5 minutos a 50 °C. Em seguida, adicionou-se 2 mL da diluição de Na₂CO₃ em água destilada (75 g/L) e, novamente, aqueceu-se o tubo a 50 °C por 5 minutos. A mistura foi resfriada em água gelada e teve sua absorbância medida em espectrofotômetro UV/VIS (Pró-análise, V-1200) a 622 nm.

A curva de calibração foi construída a partir de diferentes diluições de ácido gálico em etanol lidas no comprimento de onda de 622 nm. As leituras foram feitas em duplicata e os resultados são expressos em mg ácido gálico equivalente/100 g de resíduo processado seco.

3.2.4 Modelagem matemática da cinética de extração

A modelagem matemática da cinética de extração foi feita utilizando o modelo logístico proposto por Martínez et al. (2003) e o modelo de *splines* de Meireles (2008) adaptado por Santana et al. (2018). O ajuste dos modelos foi feito no *software* MS Excel.

3.2.4.1 Logístico

O modelo matemático de Martínez et al. (2003) considerou o extrato supercrítico uma mistura de múltiplos componentes. Desta forma, cada soluto interage de uma maneira com o solvente e é extraído em diferentes tempos (GALVÃO et al., 2013). O modelo considerou que no leito de extração existam duas fases: a sólida, composta pelo material que contém o extrato e a fase fluida, composta pelo fluido supercrítico com extrato dissolvido. O leito foi tratado como cilíndrico, ocupado por ambas as fases e o solvente passa pelo seu eixo axial. O balanço de massa não considerou o acúmulo e dispersão da fase fluida devido a sua insignificância no processo quando comparado do efeito de convecção. Para o termo de transferência de massa interfacial foi escolhido o modelo de crescimento populacional, que foi incorporado ao balanço de massa da fase sólida. Foi realizada a integração do balanço de massa e alguns termos foram rearranjados. O extrato deste trabalho foi considerado como um único pseudocomponente, a fim de facilitar o uso deste modelo, obtendo assim a Equação 6:

$$m(t) = \frac{m_0}{\exp(Ct_m)} \left[\frac{1 + \exp(Ct_m)}{1 + \exp[C(t_m - t)]} - 1 \right] \quad \text{Equação 6}$$

Em que $m(t)$ representa a massa acumulada de extrato com relação ao tempo, m_0 é a possível massa de extrato a ser obtida, C é um parâmetro de ajuste, t_m é o tempo em que a taxa de extração é máxima e t é o tempo decorrido. Apesar de o parâmetro m_0 poder ser determinado experimentalmente, ele foi considerado parâmetro de ajuste, juntamente com os parâmetros C e t_m .

3.2.4.2 Splines

O ajuste do modelo *splines* foi realizado no *software* Excel através do algoritmo fornecido por Santana et al. (2018). Ele é demonstrado na Equação 7.

$$\frac{m_{ext}}{m_{alim}} = b_0 + \left(\frac{b_1 * Q_{CO_2}}{m_{alim}} * t \right) + \left(\frac{b_2 * Q_{CO_2}}{m_{alim}} * AL_1 \right) + \left(\frac{b_3 * Q_{CO_2}}{m_{alim}} * AL_2 \right) \quad \text{Equação 7}$$

Por meio deste algoritmo, é possível determinar o tempo em que o primeiro e o segundo período de extração finalizam. Para sua aplicação é necessário informações da vazão mássica de solvente (Q_{CO_2}), a massa de matriz alimentada no processo (m_{alim}), o tempo (t) e a massa de extrato acumulada com o tempo (m_{ext}). Os parâmetros b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , AL_1 e AL_2 são ajustáveis. b_0 representa o coeficiente linear do período de extração constante (CER) e b_1 o coeficiente angular. Fisicamente, b_1 está relacionado a taxa de extração desse período (M_{CER}). b_2 e b_3 representam os coeficientes angulares do período de queda da extração (FER) e do período controlado pela difusão (DC), respectivamente. Os parâmetros $AL_1 = \text{máximo}(t - t_{CER})$ e $AL_2 = \text{máximo}(t - t_{FER})$ são relacionados ao tempo e estão associados ao procedimento de busca do algoritmo. AL_1 está relacionado ao período de tempo da extração constante (CER) e AL_2 ao período de queda da extração (FER).

3.2.5 Análise Estatística

A análise estatística foi feita a partir dos quadros de análise de variância (ANOVA) baseados no planejamento 2K, fatorial 2x2 com 2 réplicas e *one-way* utilizando o *software* STATISTICA 12.0.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização do resíduo *in natura* e processado

O teor de umidade encontrado no resíduo *in natura* cedido pela Sakura foi de $40,07 \pm 0,13\%$. Wang e Cha (2018) reportaram um teor de umidade de 32,91% para resíduo de molho shoyo, enquanto que Shirai et al. (1998) encontraram 450 g de água/kg resíduo. A diferença dos resultados deve-se à proporção das matérias-primas e ao modo de preparo que podem diferenciar de acordo com o local.

Na Tabela 3 tem-se a análise elementar do resíduo.

Tabela 3 - Composição elementar do resíduo de molho shoyo lavado e liofilizado

Componente	Média (%)	Desvio Padrão
Nitrogênio	2,73	0,24
Carbono	51,56	1,84
Hidrogênio	6,97	0,21
Enxofre	0,58	0,14

Uzun, Pütün e Pütün (2006) avaliaram a composição elementar de grãos de soja e obtiveram 55,89% de Carbono, 6,57% de Hidrogênio, 9,29% de Nitrogênio e, pela diferença entre os componentes, 28,25% de Oxigênio. Li et al. (2020) analisaram resíduo de molho shoyo seco e encontrou 47,13% de Carbono; 6,29% de Hidrogênio; 25,46% de Oxigênio; 4,22% de Nitrogênio e 0,51% de Enxofre. Segundo os autores, o material apresentou maior quantidade de N e menor quantidade de O quando comparado a outras biomassas lignocelulósicas, sendo as proteínas as principais contribuintes para este resultado.

Em relação à análise centesimal, para o resíduo *in natura* foram encontradas 14,21 g de proteínas por 100 g de resíduo *in natura* seco. Zhao et al. (2014) encontraram $21,8 \pm 0,57$ g de proteína em base seca. Essa divergência nos resultados pode ser devido à diferença na compressão que separa a massa fermentada do molho shoyo (NAGAI et al., 2012). Outra possível razão seriam as diferenças entre as matérias-primas utilizadas na produção do molho. O molho produzido na China, por exemplo, utiliza uma proporção de 80:20 e 70:30 de soja para trigo, enquanto que o molho produzido no Japão utiliza a mesma quantidade de soja e trigo (DIEZ-SIMON et al., 2020). Considerando que a soja contém em sua composição mais de 48% de proteína (FRIEDMAN; BRANDON, 2001), o uso deste grão em maior quantidade

no processo de fabricação de molho shoyo pode resultar em maior quantidade de proteína no resíduo.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da análise centesimal para o resíduo processado.

Tabela 4 - Composição centesimal do resíduo de molho shoyo lavado e liofilizado

Análise	Resultado (g/100g)
Proteínas	13,90
Fibra Alimentar	38,20
Carboidratos	37,31
Gordura	12,39
Umidade e material volátil	2,57

Os resultados da análise centesimal indicaram que o resíduo de molho shoyo lavado e liofilizado é uma boa fonte de carboidratos, fibra alimentar e proteínas, podendo ser usado como um ingrediente na indústria alimentícia. Verifica-se que o processo de lavagem do material seguido da liofilização alterou de maneira pouco significativa a quantidade de proteínas. Yeh, Su e Lee (2005) em seu trabalho obtiveram $52,4 \pm 1,5$ g de fibra dietética total, $6,2 \pm 0,19$ g de carboidratos, $9,2 \pm 0,7$ g de gordura, $23,8 \pm 0,9$ g de proteína e $6,2 \pm 0,1$ g de umidade para cada 100 g de rejeito de molho shoyo lavado e liofilizado.

O resíduo *in natura* apresentou teor de cinzas de $14,36 \pm 0,04\%$. Comparando-se com os valores encontrados na literatura, verificou-se que Wang e Cha (2018) obtiveram 8,85% de cinzas em seu resíduo; Xiang et al. (2019) determinaram 8,02% e Nagai et al. (2012) relataram $7,8 \pm 0,3\%$. Os diferentes percentuais podem estar relacionados à quantidade de cloreto de sódio, que em geral representa de 6 a 10% da composição do resíduo (NAGAI et al., 2012). O teor de cinzas para o resíduo lavado e liofilizado foi de $0,42 \pm 0,02\%$, um valor abaixo que o relatado por Yeh, Su e Lee (2005) que encontrou $2,2 \pm 0,02$ g de cinzas por 100 g de resíduo lavado e liofilizado. Esta análise mostrou que a remoção do sal através de lavagem com água neste trabalho foi efetiva.

Pela curva termogravimétrica apresentada na Figura 8 é possível observar 4 estágios de decomposição do material. A primeira etapa está entre 0 e 105 °C. Equivale a 8% de perda de massa e possivelmente está relacionada à evaporação de água, mesmo que o resíduo tenha sido liofilizado. A segunda etapa se deu entre 260 e 380 °C, onde acontece a maior redução de massa do material (50%). De acordo com Murasawa et al. (2018), esta faixa está relacionada à decomposição de componentes orgânicos presentes no resíduo de molho shoyo. Li et al.

(2020), identificaram esses componentes como sendo hemicelulose, gordura, lignina, celulose e proteína.

A terceira e última queda aconteceu entre 468 e 480 °C e entre 500 e 545 °C. A redução foi de 3% e 14%, respectivamente. Murasawa et al. (2018) afirmaram que para esta faixa de temperatura acontece a queima do carbono sólido. Houve 100% de perda do resíduo ao final do experimento. É um resultado aceitável, haja vista que durante a lavagem toda a cinza foi retirada, conforme apresentado nas análises de teor de cinzas.

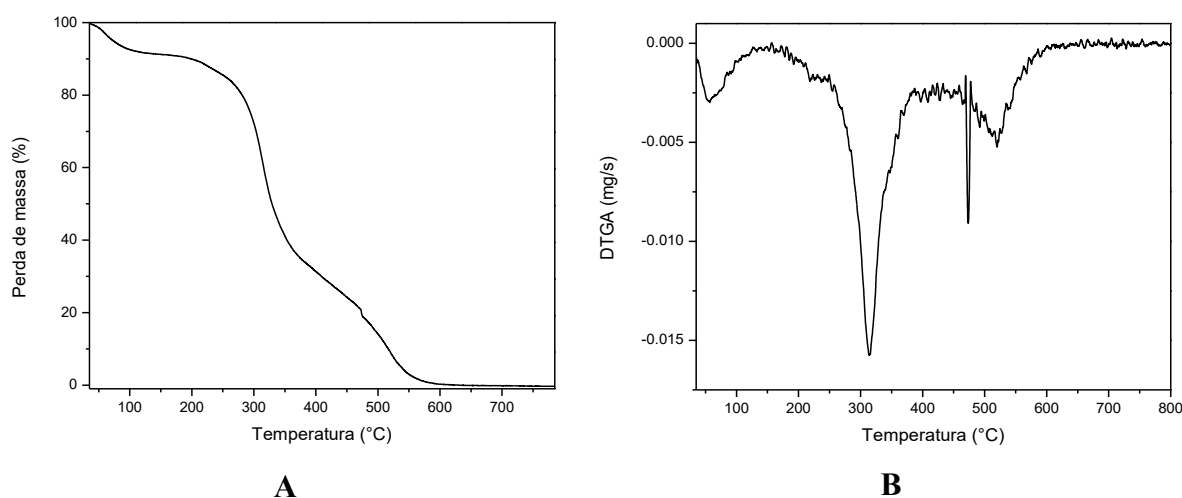


Figura 8 - A) Variação do percentual mássico do resíduo processado durante a queima de carbono por ATG, realizada em atmosfera de 15% Ar sintético/He B) Derivada da variação do percentual mássico do resíduo processado durante a queima de carbono por ATG, realizada em atmosfera de 15% Ar sintético/He

A densidade real determinada neste trabalho foi de $1,2452 \pm 0,0045 \text{ g/cm}^3$ e corrobora com os valores obtidos na literatura. Pai e Okos (2013) aferiram a densidade real para a farinha de soja desengordurada e para o concentrado de proteína de soja e encontraram respectivamente $1,417 \pm 0,00093 \text{ g/cm}^3$ e $1,325 \pm 0,00748 \text{ g/cm}^3$. Nguyen et al. (2017) avaliaram o leite de soja em pó produzido por secagem de spray e encontrou $1,2 \text{ g/cm}^3$. A maioria das partículas provenientes de alimentos possuem densidade entre $1,0$ e $1,5 \text{ g/cm}^3$ (NGUYEN et al., 2017), indicando que o resultado encontrado neste trabalho para o resíduo de molho shoyo lavado e liofilizado é satisfatório. A densidade “bulk” apresentada pelo resíduo lavado e liofilizado foi de $0,2062 \text{ g/cm}^3$ com desvio padrão de $0,0037$. Yeh, Su e Lee (2005) relataram resultado semelhante de $0,20 \text{ g/cm}^3$. Segundo esses autores, as partículas com menor densidade “bulk” em geral apresentam maior área superficial, portanto, maior capacidade de adsorver ou de se ligar aos componentes lipídicos.

As imagens captadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) são apresentadas nas Figuras 9 e 10. Na Figura 9 foi utilizado magnificação de 50X e na Figura 10 a magnificação foi de 1.00KX.

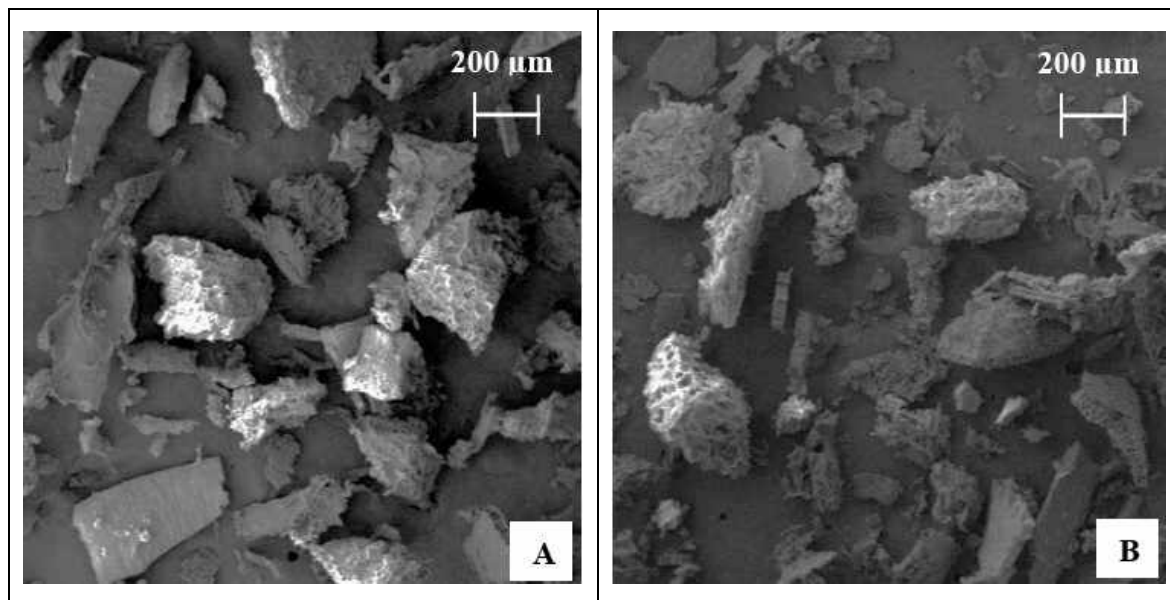


Figura 9 - Imagens MEV do resíduo processado utilizando magnificação de 50X
A) Antes extração supercrítica B) Após extração supercrítica

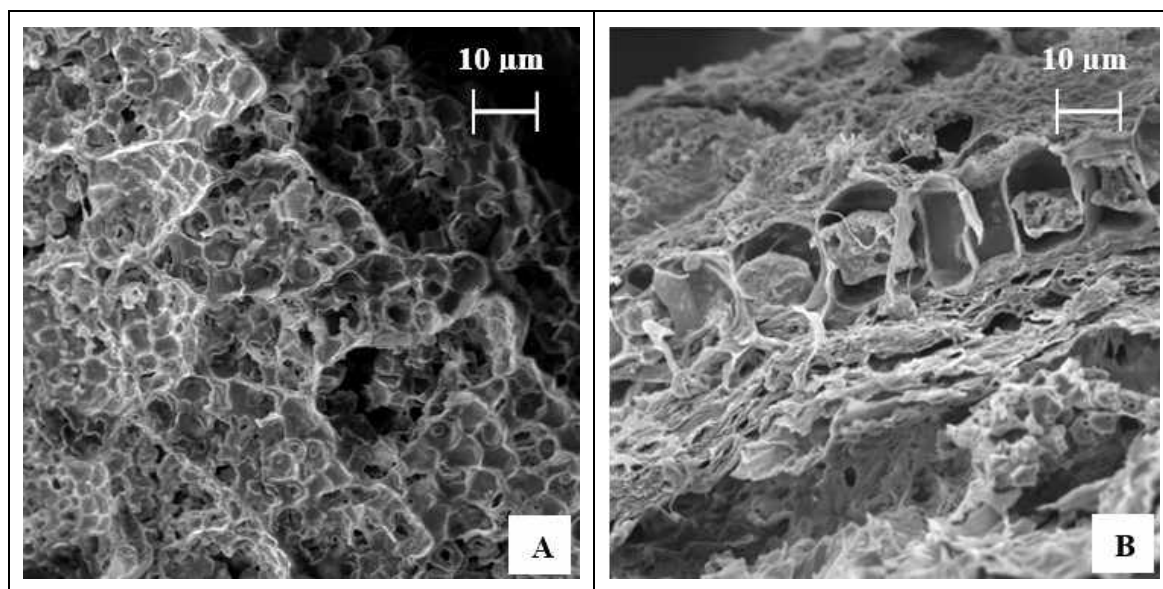


Figura 10 - Imagens MEV do resíduo processado utilizando magnificação de 1.00KX
A) Antes extração supercrítica B) Após extração supercrítica

Nota-se que o resíduo contém grande quantidade de poros. Isso influencia de forma direta na taxa de transferência de massa da extração, bem como o formato e tamanho da partícula (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016). É possível perceber também as

alterações na estrutura do material após a extração supercrítica, houve uma redução do volume das partículas.

A distribuição granulométrica do resíduo lavado e liofilizado é apresentada na Tabela 5. Através da Equação 4, foi estimado que o diâmetro médio das partículas do resíduo processado é de aproximadamente 0,5892 mm.

Tabela 5 - Distribuição granulométrica do resíduo lavado e liofilizado

Mesh (Tyler)	Abertura (mm)	Resíduo Retido (%)
8	2,38	20
12	1,41	8
20	0,841	28
32	0,500	19
48	0,297	14
80	0,177	7
115	0,125	4

Em relação à atividade de água, o resíduo *in natura* apresentou atividade de água de 0,801 e o resíduo lavado e liofilizado de 0,055. Makino, Matsushita e Takegami (2001) encontraram atividade de água de 0,77 para o resíduo de molho shoyo e valor de 0,30 para o mesmo material lavado e seco. Segundo Metta, Ayrosa e Paletta (2012), a atividade de água em que os fungos, bactérias e leveduras conseguem se desenvolver encontra-se entre 0,65 e 1,0. Abaixo de 0,6 não há proliferação de microrganismos. Portanto, o resíduo *in natura* apresenta-se como um ambiente propício ao crescimento de leveduras e bactérias, ao contrário do material lavado e liofilizado que é inóspito.

4.2 Extração Soxhlet

Os resultados das extrações Soxhlet com o uso de diferentes solventes são apresentados na Tabela 6. Pelo *software* STATISTICA 12.0, foi feito um planejamento *one-way* das duplicatas dos ensaios (Quadro de ANOVA no Apêndice A). O solvente não se mostrou estatisticamente significativo no rendimento dos ensaios ($p < 0,05$), apesar de apresentarem propriedades físicas distintas.

Tabela 6 - Extração por Soxhlet do resíduo de molho shoyo lavado e liofilizado

Solvente	Temperatura de Ebulição (°C)	Rendimento (%)	Desvio Padrão
Acetona	56	26,74	3,63
Etanol	78	31,03	1,74
Hexano	69	25,16	1,30

O etanol foi o que apresentou uma maior eficiência na extração. Uma possível justificativa seria sua natureza polar que o possibilita extrair não somente compostos polares, mas também compostos apolares (MARINHO et al., 2019). Outro fator que pode ter afetado este resultado é a temperatura de ebulição do etanol ser superior à dos demais solventes podendo contribuir para transferência de massa do soluto e aumentar o rendimento do experimento (SOLDAN et al., 2021; DANLAMI; ARSAD; ZAINI, 2015).

Resultados similares foram apresentados na literatura. Dagostin, Carpiné e Corazza (2015) obtiveram rendimento de $25,58 \pm 0,25\%$ na extração Soxhlet de soja em flocos com etanol. Tiulea et al. (2011) realizaram experimento similar com acetona e determinaram 21,4%. Grasso, Maroto e Camusso (2006) relataram 26,68% com hexano para soja pré-tratada sob diferentes condições.

Os extratos obtidos são apresentados na Figura 11.



Figura 11 - Extratos obtidos pelo método Soxhlet

4.3 Extração supercrítica

Na Tabela 7 são apresentadas as médias dos rendimentos obtidos pelas duplicatas da extração supercrítica e os desvios padrão. Pelo *software* STATISTICA 12.0 foi analisado a influência da temperatura e da pressão no rendimento das duplicatas dos ensaios sem cossolvente. Utilizando o planejamento 2^k , nenhum dos parâmetros foram estatisticamente significantes para $p < 0,05$ (Quadro de ANOVA no Apêndice A). Porém, através do

planejamento fatorial 2x2 com 2 réplicas, a pressão se mostrou significativa ($p < 0,05$) no aumento do rendimento (Apêndice A).

Tabela 7 - Rendimentos dos ensaios de extração supercrítica

Pressão	Temperatura	Cossolvente	Rendimento (%)	Desvio Padrão
200 bar	40 °C	-	16,79	0,52
200 bar	60 °C	-	15,95	0,46
250 bar	40 °C	-	17,79	0,58
250 bar	60 °C	-	18,67	0,41
250 bar	40 °C	Etanol	20,51	1,97
250 bar	40 °C	Hexano	15,93	3,22

Ainda que estatisticamente (Apêndice A) a adição de cossolvente não tenha sido significativa ($p < 0,05$), a condição que extraiu maior quantidade de extrato do resíduo de milho shoyo foi 250 bar e 40 °C com etanol. É provável que a natureza polar do etanol levou à solubilização de compostos que não foram solubilizados pelo CO₂, que é apolar. Alvarez et al. (2019) e Quitain et al. (2006) também obtiveram melhores rendimentos na presença de etanol em extrações supercríticas de resíduo de óleo de soja (10,5%) e de resíduo de tofu (4,54%), respectivamente.

A presença de hexano no experimento realizado a 250 bar e 40 °C apresentou resultado similar ao ensaio sob as mesmas condições sem cossolvente. Possivelmente, isso está relacionado à apolaridade do CO₂ e do hexano. Tal informação é importante, se considerada a dificuldade em se remover solventes do extrato, a degradação de componentes durante este processo e a possibilidade de restar contaminantes nas amostras.

Pela Figura 12, que apresenta as duplicatas da extração a 200 bar e 40 °C, é possível observar que os experimentos executados na unidade supercrítica utilizada neste trabalho são reprodutíveis.

A Figura 13 mostra as curvas globais de extração (média das duplicatas) para diferentes condições de temperatura e pressão, livre de cossolvente.

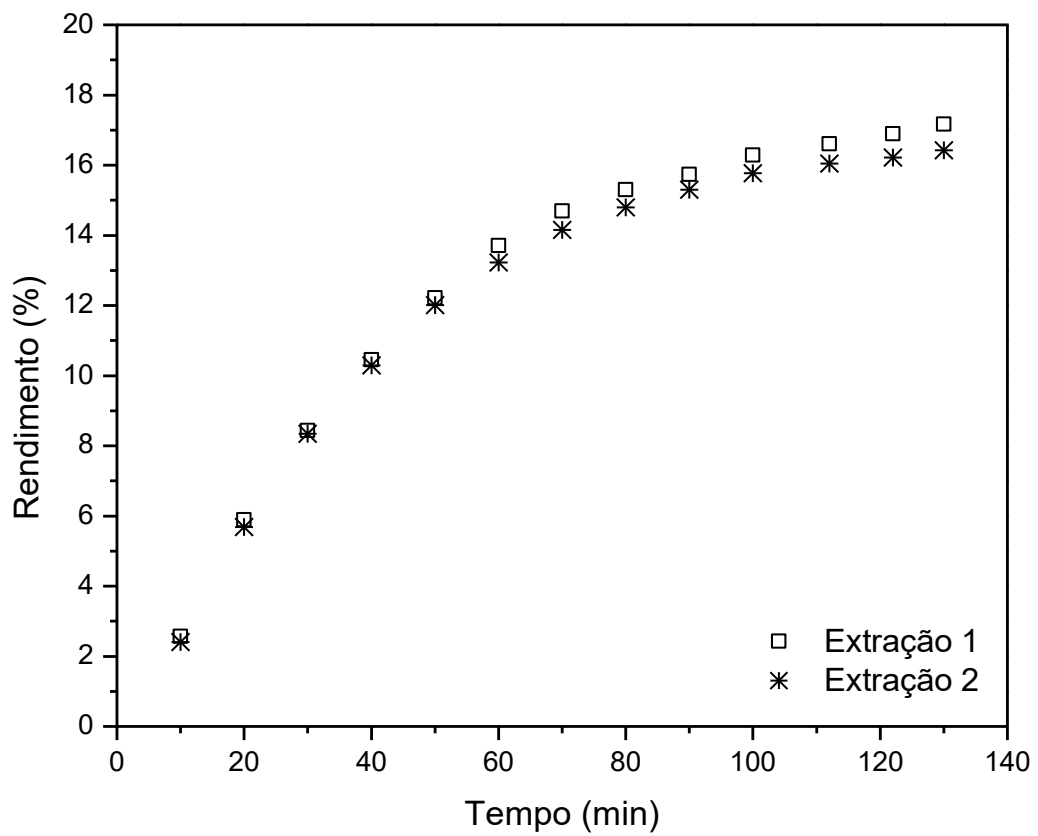


Figura 12 - Reprodutibilidade da extração supercrítica

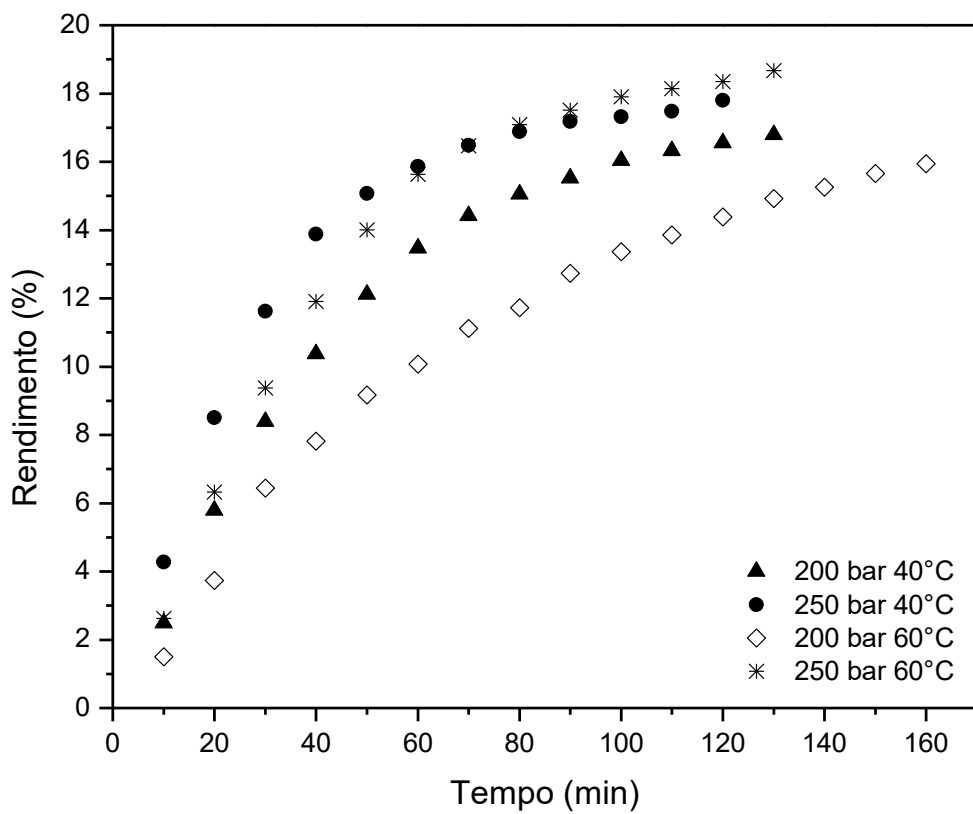


Figura 13 - Média das duplicatas das curvas globais de extração supercrítica

Comparando os ensaios realizados a 200 bar, a maior quantidade de extrato foi obtida na menor temperatura (40 °C). Comportamento similar foi observado por Nodar, Gomez e La Ossa (2002) em seus experimentos de extração supercrítica de grãos de soja a 200, 300 e 400 bar. Tal fato pode estar relacionado ao acréscimo da temperatura reduzir significativamente a densidade do CO₂ a ponto de dominar o efeito do aumento da pressão de vapor do analito (LOULI et al., 2004; GOMES; MATA; RODRIGUES, 2007).

Já nos ensaios realizados a 250 bar, ainda que a densidade do CO₂ a 60 °C seja menor que a 40 °C, a primeira condição forneceu maior quantidade de extrato. Possivelmente o acréscimo da temperatura, nesta pressão, fez com o aumento da pressão de vapor do soluto prevalecesse sobre os efeitos da densidade. Este fenômeno de cruzamento de isotermas de solubilidade é conhecido como “crossover” e geralmente acontece em extração supercrítica de óleo de sementes utilizando CO₂. A pressão em que ele ocorre varia de acordo com o material (JOKIĆ et al., 2010; CIFTCI; CALDERON; TEMELLI, 2012). Nos ensaios de Friedrich e Pryde (1984) extraíndo óleo de flocos de soja, o “crossover” aconteceu a 6000 psig. Nos experimentos com grãos de soja de Jokić et al. (2010) este fenômeno ocorreu entre 200 e 300 bar e para o material utilizado neste trabalho foi entre 200 e 250 bar.

Apesar da diferença de rendimento de extrato entre as temperaturas de 40 e 60 °C a 200 bar não ser tão discrepante (0,84%), percebe-se que a curva de extração a 60 °C é mais extensa que a 40 °C, isto é, demora-se mais tempo para se obter uma quantidade de extrato bem próxima. Isso se deve à redução da densidade do fluido supercrítico que diminui a solubilidade do soluto (LIZA et al., 2010).

Nodar, Gomez e La Ossa (2002) extraíram óleo de grãos de soja em condições supercrítica e obtiveram rendimento de 19,5% (em peso) a 300 bar e 40 °C; Friedrich e List (1982) obtiveram 19,9% a 350 bar e 50 °C e Jokić et al. (2010) extraíram 6,59 g de óleo/100 g de soja a 300 bar e 40 °C. O maior valor de rendimento obtido neste trabalho com o uso de CO₂ como solvente foi de $18,7 \pm 0,4\%$ para 60 °C e 250 bar. Comparando-se com os valores de rendimento reportados na literatura para grãos de soja, verifica-se que o resíduo do molho shoyo mantém um valor significativo de rendimento de extrato, mesmo tratando-se de um rejeito de produção industrial.

4.4 Caracterização dos extratos

4.4.1 Ácidos graxos

Por meio de comparação entre as áreas do pico do padrão heptadecanoato de metila e dos outros compostos, foi possível determinar a concentração dos ácidos graxos. Os resultados são mostrados na Tabela 8:

Tabela 8 - Resultados da análise de ácidos graxos

Extração	Pressão	Temperatura	Cossolvente	Palmítico (16:0)	Oleico (18:1)	Linoleico (18:2)	Linolênico (18:3)
SC	200 bar	40 °C	-	11,4%	26,1%	54,9%	7,6%
SC	200 bar	60 °C	-	12,6%	27,5%	53,7%	6,2%
SC	250 bar	40 °C	-	9,7%	30,3%	53,9%	6,1%
SC	250 bar	60 °C	-	10,9%	26,6%	55,1%	7,4%
SC	250 bar	40 °C	Etanol	10,5%	27,7%	54,5%	7,2%
SC	250 bar	40 °C	Hexano	10,9%	27,1%	54,9%	7,1%
Soxleht	-	-	Etanol	11,0%	26,7%	54,9%	7,4%
Soxleht	-	-	Acetona	11,9%	27,7%	54,7%	5,7%
Soxleht	-	-	Hexano	10,5%	27,7%	54,6%	7,3%

O ácido linoleico foi encontrado em maior quantidade em todos os extratos, seguido do ácido oleico, do ácido palmítico e, por último, do ácido linolênico. Do total, 88,9% representam ácidos insaturados e 11,1% são ácidos saturados. O óleo do resíduo de molho shoyo extraído por Zhao e colaboradores (2014) também apresentou maior quantidade de ácido linoleico, cerca de 50,23% do total, seguido do ácido oleico com 21,44%, 13,07% de ácido palmítico, 9,54% de ácido linolênico e 5,71% de ácido esteárico. Comparando com o óleo de soja que possui em média de 13% de ácido palmítico, 4% de ácido esteárico, 20% de ácido oleico, 55% de ácido linoleico e 8% de ácido linolênico, a composição de ácidos graxos do resíduo de molho shoyo está dentro da faixa reportada na literatura (SILVA et al., 2021). Porém, para utilizá-lo como óleo alimentício é necessário reduzir o teor de ácidos graxos livres e o valor de peróxido. A destilação molecular pode ser aplicada para tal função (ZHAO et al., 2014). O óleo extraído poderia também ser utilizado para produção de biodiesel (CHEN et al., 2014).

O emprego de cossolventes na extração supercrítica a 40 °C e 250 bar influenciou o comportamento da solubilidade dos lipídeos quando comparado à extração supercrítica nas mesmas condições usando apenas CO₂. A presença de etanol e hexano no processo causou um aumento de ácido palmítico, ácido linoleico e ácido linolênico e a redução de ácido oleico. Este acréscimo na solubilidade de alguns ácidos graxos devido à presença de etanol está

relacionado principalmente às interações da ligação de hidrogênio (TEMELLI, 2009). Temelli (1992) também observou alterações na composição final do extrato de canola quando etanol foi adicionado ao processo supercrítico. Para esse autor houve redução dos ácidos oleico ($\omega-7$) e linolênico e aumento do ácido oleico ($\omega-7$) e linoleico.

4.4.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante expressa em termos de concentração efetiva (EC_{50} $\mu\text{g/mL}$) é definida como a concentração de extrato que reduz em 50% a atividade inicial de DPPH. Apresentar os resultados através deste parâmetro facilita a comparação direta da atividade antioxidante de diferentes substâncias, independente da concentração amostral (GARMUS et al., 2015). Na Tabela 9 são apresentadas as concentrações efetivas dos extratos da extração supercrítica e da extração Soxhlet.

Tabela 9 - Atividade antioxidante dos extratos

Ensaio	EC50 médio ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão
200 bar 40 °C	104,38	0,34
200 bar 60 °C	101,72	7,09
250 bar 40 °C	103,75	3,69
250 bar 60 °C	124,79	7,85
250 bar 40 °C Etanol	136,72	8,25
250 bar 40 °C Hexano	162,87	4,11
Soxhlet Etanol	141,91	8,59
Soxhlet Acetona	98,98	3,31
Soxhlet Hexano	181,96	10,56

De acordo com Garmus et al. (2015), quanto menor o valor da EC_{50} , maior a atividade antioxidante do composto. Os extratos podem ser divididos em 4 grupos: os muito ativos com $EC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$; os moderadamente ativos com EC_{50} entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$; os extratos ligeiramente ativos com EC_{50} entre 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ e os extratos inativos com $EC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$.

Pela Tabela 9, observa-se que as amostras apresentam valores de EC_{50} entre 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, logo são consideradas ligeiramente ativas. Chen et al. (2016) em seu trabalho avaliaram a atividade antioxidante de hidrolisados de resíduo de molho shoyo lavado e desengordurado e obtiveram EC_{50} entre 3770 e 4380 $\mu\text{g/mL}$. Cheng et al. (2022) avaliaram o extrato etanólico de resíduo de molho de shoyo e este apresentou EC_{50} de 1132 $\mu\text{g/mL}$. Pelos

resultados da Tabela 9, verifica-se que os extratos analisados neste trabalho apresentaram maior poder antioxidante que os extratos citados da literatura.

O solvente utilizado na extração Soxhlet influenciou a atividade antioxidante da amostra. A acetona foi a que apresentou maior poder antioxidante, enquanto que etanol e hexano apresentaram menor capacidade. Parte disto pode ser explicado pela temperatura de ebulição da acetona ser menor que as demais, auxiliando na preservação dos componentes. Chung et al. (2010) em suas análises também identificaram que o extrato de grão de soja preparado com acetona mostrou maior atividade antioxidante do que o extrato feito com etanol.

4.4.3 Flavonoides totais

A Tabela 10 apresenta os resultados do teor de flavonoides contidos nos extratos. Os valores são a média das duplicatas expressos em mg de rutina para cada 100 g de resíduo seco com o respectivo desvio padrão. Aparentemente, a menor temperatura e a menor pressão na extração supercrítica favoreceram o rendimento de flavonoides nos extratos. Pela análise fatorial 2x2 com 2 réplicas (Apêndice A) realizada no *software* STATISTICA 12.0, a temperatura, a pressão e a interação entre elas se mostraram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). A presença de cossolventes na extração supercrítica alterou de maneira pouco significativa os resultados. Por meio da análise *one-way* (Quadro de ANOVA no Apêndice A), foi possível concluir que o cossolvente não é estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no rendimento de flavonoides. Nas extrações Soxhlet, os solventes polares retiraram mais que o dobro de flavonoides do resíduo do que o solvente apolar. E, aparentemente, o solvente com menor temperatura de ebulição apresentou o maior rendimento. Através da análise *one-way* (Apêndice A), tanto a polaridade quanto a temperatura de ebulição dos solventes Soxhlet foram fatores significantes no teor de flavonoides dos extratos ($p < 0,05$).

O extrato que apresentou a maior quantidade de flavonoides foi obtido pelo método Soxhlet com acetona. Observando a Figura 11, nota-se que é o extrato que apresenta a coloração mais escura. Essas informações possivelmente estão relacionadas, uma vez que os flavonoides exercem uma variedade de funções fisiológicas nas plantas, incluindo a pigmentação, defesa contra patógenos e proteção UV (KOVINICH et al., 2011).

Tabela 10 - Flavonoides totais presentes nos extratos

Ensaio	Flavonoides (mg rutina / 100 g resíduo processado seco)	Desvio Padrão	Flavonoides (mg rutina / g extrato)
200 bar 40 °C	146,403	0,347	344,370
200 bar 60 °C	83,293	3,986	195,930
250 bar 40 °C	90,278	0,347	212,360
250 bar 60 °C	60,500	0,173	142,310
250 bar 40 °C Etanol	91,014	0,693	214,090
250 bar 40 °C Hexano	85,254	1,906	200,540
Soxhlet Etanol	134,761	8,838	316,990
Soxhlet Acetona	176,426	1,213	415,000
Soxhlet Hexano	66,628	7,799	156,720

Analisando os impactos das condições experimentais na quantidade de flavonoides dos extratos supercríticos, nota-se que o acréscimo da pressão a uma temperatura fixa, diminuiu os flavonoides totais. Provavelmente a redução da difusividade do fluido superou o aumento da sua densidade, impactando de maneira negativa na remoção destes componentes. Também foi observado decréscimo dos flavonoides decorrente do aumento da temperatura a uma pressão fixa. Isso pode ser resultado da redução na solubilidade do fluido supercrítico ou conversão de alguns componentes (KAO; CHIEN; CHEN, 2008).

Comparando com a literatura, os resultados obtidos são próximos ou superiores de alguns trabalhos. Yamamoto et al. (2006) realizaram a extração de flavonoides do resíduo de molho shoyo utilizando diversos solventes. Foram encontrados valores entre 34 e 72 mg de daidzeína e 72 e 110 mg de genisteína para cada 100 g de resíduo. A acetona foi o solvente que apresentou melhor rendimento na extração, 54 mg de daidzeína e 110 mg de genisteína por 100 g de resíduo. São valores próximos aos deste trabalho. Ao contrário dos extratos supercríticos de resíduos de óleo de soja de Alvarez e colaboradores (2019) que obtiveram resultados inferiores a estes. As amostras extraídas com cossolvente etanol apresentaram 65 e 31 mg de quercetina equivalente para cada 100 g de resíduo de óleo de soja seco. E as amostras sem cossolvente não apresentaram níveis de flavonoides detectáveis. Possivelmente isto está relacionado diferença de polaridade entre CO₂ e os flavonoides. Com o etanol houve modificação da polaridade da mistura e foi possível extrair os componentes.

4.4.4 Fenólicos totais

Os fenólicos totais presentes nos extratos são demonstrados na Tabela 11. Os valores apresentados são a média das duplicatas expressos em mg de ácido gálico equivalente para cada 100 g de resíduo seco e o respectivo desvio padrão. Nota-se que o aumento da pressão e

da temperatura nas extrações supercríticas sem cossolvente proporcionam maior quantidade de fenólicos nos extratos. Pelo planejamento fatorial 2x2 com 2 réplicas foi possível concluir que a pressão, a temperatura e a interação entre elas são estatisticamente significantes ($p < 0,05$) nos resultados (Quadro de ANOVA no Apêndice A). A presença de cossolventes também favoreceu a quantidade de fenólicos extraídos. Realizando um planejamento *one-way* (Apêndice A), pode-se concluir que a adição de cossolvente é estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Com relação aos extratos Soxhlet, o etanol apresentou maior quantidade de compostos fenólicos. Possivelmente isto está relacionado à sua temperatura de ebulição ser maior que as dos demais componentes. Por uma análise *one-way* (Apêndice A), a temperatura de ebulição se mostrou como um fator estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no rendimento dos fenólicos, ao contrário da polaridade.

Tabela 11 - Fenólicos totais presentes nos extratos

Ensaio	Fenólicos (mg ácido gálico equivalente / 100 g resíduo processado seco)	Desvio Padrão
200 bar 40 °C	7,051	0,641
200 bar 60 °C	24,671	1,643
250 bar 40 °C	19,549	0,398
250 bar 60 °C	25,682	1,029
250 bar 40 °C Etanol	48,331	0,171
250 bar 40 °C Hexano	67,331	1,767
Soxhlet Etanol	82,422	1,776
Soxhlet Acetona	62,230	3,198
Soxhlet Hexano	60,019	0,982

O maior rendimento de fenólicos foi de 82,42 mg de ácido gálico equivalente/100 g de resíduo seco obtidos na extração Soxhlet com etanol. E o menor rendimento foi 7,05 mg de ácido gálico equivalente/100 g resíduo seco obtidos na extração supercrítica a 200 bar e 40 °C. Os valores determinados neste trabalho são superiores aos encontrados por Alvarez et al. (2019). Os autores analisaram extratos supercríticos de dois tipos de resíduos de óleo de soja obtidos sob diferentes condições. Os maiores valores encontrados foram de 16 ± 1 e $10,6 \pm 0,9$ mg de ácido gálico equivalente por 100 g de resíduo seco tipo 2 e resíduo seco tipo 1, respectivamente. Ambos foram extraídos com cossolvente etanol. Os extratos sem cossolventes apresentaram valores entre 0,9 e 5,6 mg de ácido gálico equivalente por 100 g de matéria seca.

No trabalho de Chung et al. (2010) foram apresentados diferentes tipos de extrações para três variedades de grãos de soja. Os valores de fenólicos variaram entre 211 e 780 mg de

ácido gálico por 100 g de soja, sendo superior aos valores encontrados neste trabalho. Parte disto pode ser explicado pelo fato de utilizarem soja não processada, uma vez que etapas de cozimento, extração de óleo, de água e secagem podem modificar o teor de fenólicos e flavonoides contidos nos grãos (TANGKHAWANIT; SIRIAMORNPUN, 2021). Pelos experimentos de Chung et al. (2010), pode-se concluir que a variedade da soja afeta o valor total de fenólicos, bem como o método de extração e os solventes utilizados.

4.5 Modelagem matemática da cinética de extração

Na Figura 14 é possível visualizar o ajuste do modelo logístico de Martínez et al. (2003) às curvas globais de extração em diferentes condições de pressão e temperatura. Os parâmetros considerados para ajuste foram m_0 , t_m e C .

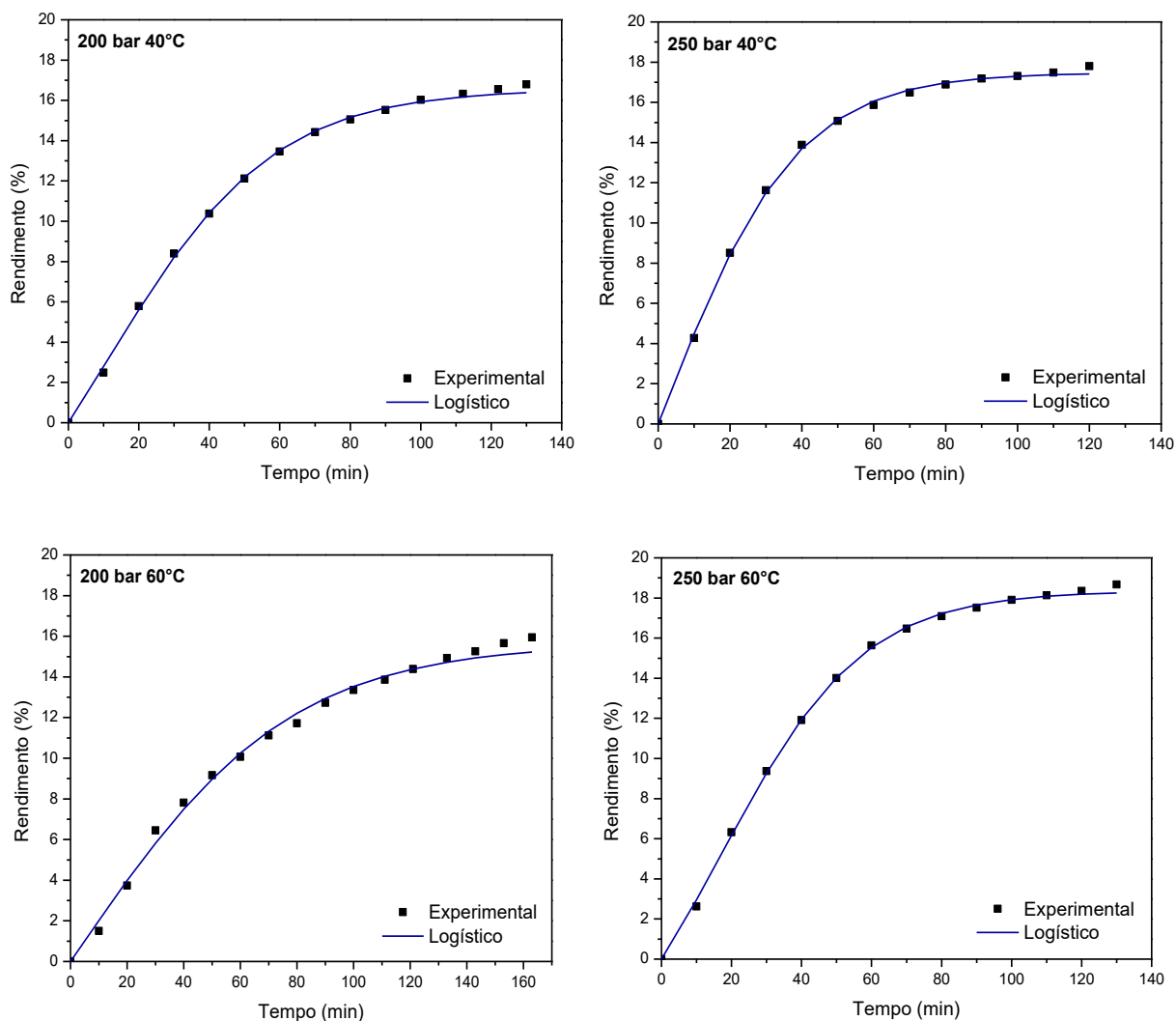


Figura 14 - Ajuste do modelo logístico às curvas globais de extração

Na Tabela 12 são apresentados a equação do modelo, os parâmetros e o coeficiente de determinação (R^2). O coeficiente de correlação de aproximadamente 0,99 demonstra que o modelo se ajustou de modo satisfatório. Avaliando a massa total de soluto a ser extraída (m_0), nota-se que seus valores não foram tão discrepantes entre si. Desta maneira, poderia se afirmar que as temperaturas e as pressões estudadas não influenciaram na quantidade máxima de extrato a ser alcançada. Porém, o tempo para se obter esta massa de extrato é afetado por estes fatores, vide as curvas globais de extração apresentadas na Figura 13. C é um parâmetro sem significado físico. E t_m representa o tempo em que ocorre a máxima taxa de extração. Em todas as condições experimentais, o parâmetro t_m se encontra no primeiro período de extração. Esta situação era prevista, uma vez que neste momento a convecção, mecanismo de transferência de massa mais rápido que a difusão, é dominante. Nas extrações realizadas a 250 bar e 40 °C e a 200 bar e 60 °C, os valores de t_m são bem próximos de zero, possivelmente o modelo não seja tão adequado para determinadas condições.

Tabela 12 - Equação e parâmetros do modelo logístico e coeficientes de determinação (R^2)

$m(t) = \frac{m_0}{\exp(Ct_m)} \left[\frac{1 + \exp(Ct_m)}{1 + \exp[C(t_m - t)]} - 1 \right]$				
	200 bar 40 °C	250 bar 40 °C	200 bar 60 °C	250 bar 60 °C
m_0 (g)	0,8303	0,8829	0,7719	0,9253
C (min^{-1})	0,042	0,053	0,026	0,049
t_m (min)	10,87	0,26	1,12	17,18
R^2	0,9989	0,9991	0,9948	0,9992

A Tabela 13 apresenta a equação e os parâmetros do modelo de *splines*. Houve o ajuste de três retas que permitiram associar o modelo gerado às regiões de transferência de massa (CER, FER e DC) das curvas de extração. Os parâmetros considerados para ajuste foram b_0, b_1, b_2, b_3, AL_1 e AL_2 .

A fim de analisar o impacto da temperatura e da pressão na cinética de extração foi realizado um planejamento fatorial 2x2 com 2 réplicas (Quadro de ANOVA no Apêndice A). Os parâmetros não se mostraram estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para os tempos t_{CER} e t_{FER} , porém, para o parâmetro b_1 , a pressão se apresentou como um fator significativo ($p < 0,05$).

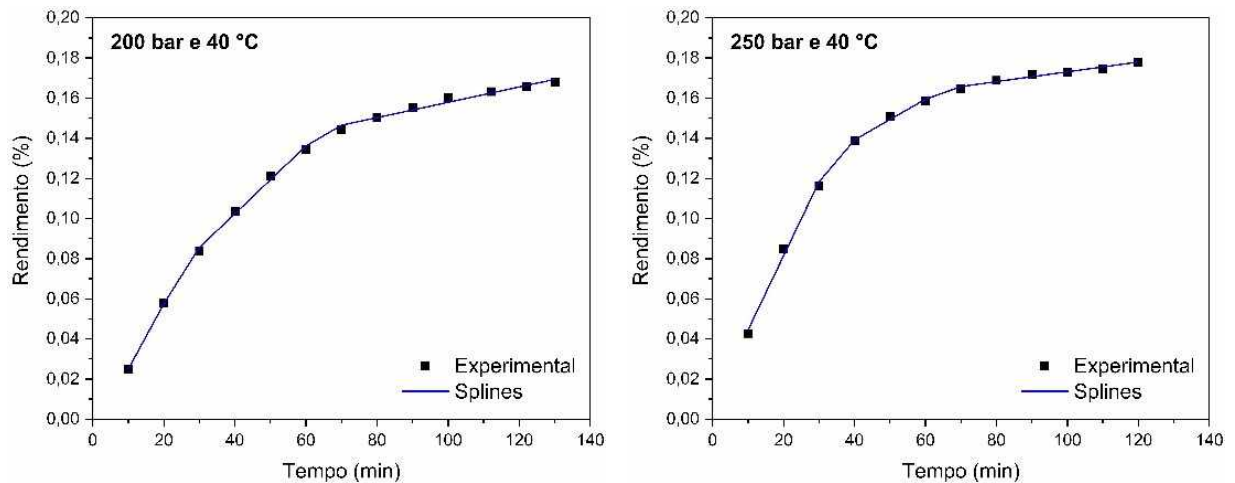
Tabela 13 - Equação e parâmetros do modelo *splines* e coeficientes de determinação (R²)

$$\frac{m_{ext}}{m_{alim}} = b_0 + \left(\frac{b_1 * Q_{CO_2}}{m_{alim}} * t \right) + \left(\frac{b_2 * Q_{CO_2}}{m_{alim}} * AL_1 \right) + \left(\frac{b_3 * Q_{CO_2}}{m_{alim}} * AL_2 \right)$$

	200 bar 40 °C	250 bar 40 °C	200 bar 60 °C	250 bar 60 °C
t_{CER} (min)	27	34	35	34
t_{FER} (min)	65	65	94	64
b₀ (10³)	-7,714	7,657	-1,041	-6,587
b₁ (10³)	6,921	7,463	5,958	7,934
b₂ (10³)	-3,349	-5,409	-3,664	-3,536
b₃ (10³)	-2,765	-1,560	-1,292	-3,580
R²	0,9989	0,9986	0,9991	0,9992

O parâmetro b_1 está relacionado fisicamente à taxa de transferência de massa (M_{CER}) (SANTANA et al., 2018). Nota-se que o aumento da pressão em uma dada temperatura, causou aumento no valor deste parâmetro, enquanto que o aumento da temperatura, ocasionou comportamentos distintos. A 200 bar, o valor de b_1 sofre redução e a 250 bar tem um aumento. Isso retrata os efeitos da pressão de vapor do soluto e a redução da densidade do CO₂ devido ao aumento da temperatura.

Na Figura 15 é apresentado o ajuste do modelo *splines* às curvas globais de extração.



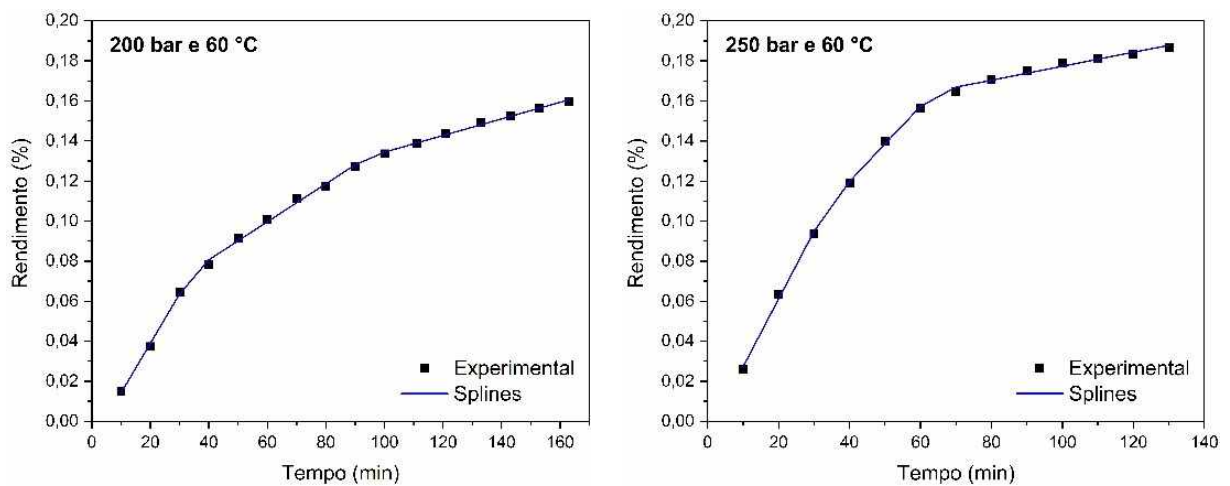


Figura 15 - Ajuste do modelo *splines* às curvas globais de extração

Comparando os valores de t_m determinados pelo modelo logístico e t_{CER} (tempo em que finaliza o primeiro período de extração) determinados pelo *splines*, nota-se que todos os valores de t_m foram menores. Isso fortalece a teoria de que o tempo em que ocorre a taxa máxima de extração se encontra no período CER. Albuquerque e Meireles (2012) afirmaram que cerca de 50 a 90% do rendimento total do processo supercrítico é alcançado neste período. Rosa e Meireles (2005) identificaram que o melhor custo-benefício do processo supercrítico se dá entre o primeiro e segundo período da extração. Isso reforça a relevância de se conhecer esses tempos para fins industriais ou para apenas se determinar o momento de finalização da extração.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5.1 Considerações finais

Pelos resultados obtidos nos experimentos deste trabalho foi possível constatar que o preparo do resíduo foi eficiente na remoção de sal, conservou as proteínas e reduziu a atividade de água ao passo de evitar o desenvolvimento de microrganismos. O alto teor de fibras, carboidratos e proteínas presentes no material possibilita sua aplicação como suplemento alimentar.

A extração Soxhlet apresentou maior rendimento que a supercrítica, variando entre 31,03 a 25,16%. O tempo de contato resíduo-solvente que este método oferece pode ter influenciado nestes resultados. O etanol foi o solvente mais eficaz, o fato da sua temperatura de ebulição ser superior à dos demais solventes pode ter contribuído para transferência de massa do soluto. O etanol foi também o solvente que extraiu a maior quantidade de compostos fenólicos, sendo 82,42 mg ácido gálico equivalente por 100 g resíduo processado seco. A natureza polar de ambos componentes viabilizou este resultado.

As extrações supercríticas apresentaram rendimento entre 20,51 e 15,93%. Por se tratar de um resíduo industrial, é considerado um rendimento satisfatório. A variação de pressão foi estatisticamente significativa nestes resultados, ao contrário da adição de cossolvente e variação da temperatura. O ensaio mais eficiente foi a 250 bar e 40 °C na presença de etanol. A natureza polar do cossolvente possivelmente possibilitou a extração de compostos que não foram solubilizados pelo CO₂.

Houve “crossover” entre 200 e 250 bar nas extrações supercríticas. Este fenômeno foi constatado na modelagem matemática através do parâmetro b_1 do modelo *splines*. Este modelo ajustou bem todas as curvas globais de extração e também forneceu valores t_{CER} e t_{FER} que podem ser usados para análise econômica. Ao contrário do modelo logístico que não se mostrou adequado para as condições de 250 bar e 40 °C e 200 bar e 60 °C.

Os extratos apresentaram composição de ácidos graxos próxima a do óleo de soja relatada na literatura. Porém, devido ao alto índice de acidez sua aplicação na alimentação se torna inviável. Ele pode ser aplicado diretamente na produção de biodiesel e sabão ou utilizado na fabricação de ração após ser tratado.

Em relação à atividade antioxidante, todos os extratos se mostraram como ligeiramente ativos (EC_{50} entre 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$). A variação na pressão, na temperatura e a interação entre elas nas extrações supercríticas favoreceram estatisticamente para a extração de compostos antioxidantes, ao contrário da adição de cossolvente. E nas extrações Soxhlet, a polaridade e a temperatura de ebulição do solvente influenciaram positivamente os resultados. Essas substâncias poderiam ser utilizadas como conservantes naturais para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos, cosméticos e fármacos.

Os extratos que apresentaram a maior quantidade de flavonoides foram o Soxhlet utilizando acetona como cossolvente e a extração supercrítica a 200 bar e 40 °C, sendo 176,426 e 146,403 mg rutina/100 g de resíduo processado seco, respectivamente. Considerando a necessidade de tratamento para remoção de solvente do extrato Soxhlet e a possibilidade de degradação de substâncias durante este processo; a extração supercrítica poderia ser mais interessante para obtenção de flavonoides, uma vez que ela oferece extratos de altíssima qualidade que podem ser aplicados em medicamentos.

Verificou-se que a quantidade de antioxidantes, fenólicos e flavonoides nos extratos foi influenciada não só pelos métodos e condições aplicados, mas também pelo solvente, pelo tipo de grão de soja utilizado na fabricação do molho shoyo e pelos processos a que os grãos são submetidos. Sendo assim, seria recomendado uma avaliação técnico-econômica para verificar qual ensaio seria viável para fornecer essas substâncias que são de grande valor para o mercado.

Por fim, o aproveitamento do rejeito de molho shoyo se torna bastante atrativo, já que é possível obter subprodutos de alto valor agregado, que poderiam gerar renda para a empresa, utilizando um material que geralmente é descartado, incinerado ou vendido como ração animal a baixo custo (aproximadamente R\$ 4,00/kg).

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Como forma de explorar ainda mais os estudos de extração supercrítica de resíduo de molho de soja sugere-se:

- Realizar análise centesimal do resíduo após extração supercrítica
- Avaliar o rendimento de flavonoides na extração supercrítica em pressões menores
- Identificar e quantificar as possíveis isoflavonas presentes nos extratos e no resíduo *in natura*, processado e após extração supercrítica

- Ajustar outros modelos matemáticos a fim de melhor descrever a cinética de extração
- Realizar análise técnica-econômica do processo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, Claudio Lima. ISOFLAVONAS DE SOJA E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 323-334, jul./dez. 2002.

AGUIAR, Ana C. de; SALES, Luiz P.; COUTINHO, Janceli P.; BARBERO, Gerardo F.; GODOY, Helena T.; MARTÍNEZ, Julian. Supercritical carbon dioxide extraction of Capsicum peppers: global yield and capsaicinoid content. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 81, p. 210-216, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2013.05.008>.

ALBUQUERQUE, Carolina L.C.; MEIRELES, M. Angela A.. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: experimental, modeling and economic evaluation of the process. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 66, p. 86-95, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.01.004>.

ALVAREZ, María V.; CABRED, Santiago; RAMIREZ, Cristina L.; FANOVICH, María A.. Valorization of an agroindustrial soybean residue by supercritical fluid extraction of phytochemical compounds. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 143, p. 90-96, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2018.07.012>.

ARJMANDI, Bahram H.; ALEKEL, Lee; HOLLIS, Bruce W.; AMIN, Daxa; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, Maria; GUO, Peilin; KUKREJA, Subhash C.. Dietary Soybean Protein Prevents Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis. **The Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 161-167, 1 jan. 1996. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/126.1.161>.

BARNES, S.. Evolution of the Health Benefits of Soy Isoflavones. **Experimental Biology And Medicine**, [S.L.], v. 217, n. 3, p. 386-396, 1 mar. 1998. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.3181/00379727-217-44249>.

BRUNNER, Gerd. **Gas extraction : an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. New York: Springer, 1994.

BRUNNER, Gerd. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 67, n. 1-2, p. 21-33, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060>.

BRUNNER, Gerd. Applications of Supercritical Fluids. **Annual Review Of Chemical And Biomolecular Engineering**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 321-342, 15 jun. 2010. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-101311>.

CAPUZZO, Andrea; MAFFEI, Massimo; OCCHIPINTI, Andrea. Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. **Molecules**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 7194-7238, 19 jun. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18067194>.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Soja: Potencial de Uso na Dieta Brasileira. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 16p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 113).

CASTRO, M.D. Luque de; PRIEGO-CAPOTE, F.. Soxhlet extraction: past and present panacea. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>.

CECCHI, Heloisa Máscia. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª ed. rev. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2003.

CHEN, Xiangrong; LUO, Yijie; QI, Benkun; WAN, Yinhua. Simultaneous extraction of oil and soy isoflavones from soy sauce residue using ultrasonic-assisted two-phase solvent extraction technology. **Separation And Purification Technology**, [S.L.], v. 128, p. 72-79, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.03.014>.

CHEN, Xiangrong; LUO, Yijie; QI, Benkun; LUO, Jianquan; WAN, Yinhua. Improving the hydrolysis efficiency of soy sauce residue using ultrasonic probe-assisted enzymolysis technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.L.], v. 35, p. 351-358, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.10.013>.

CHENG, Yunhui; LUO, Shihua; HUANG, Fuqi; YANG, Xiangyi; CHEN, Maolong; JIAO, Ye; WEN, Li; XU, Zhou. Separation of soy isoflavones from soy sauce residue by MIL-100(Fe). **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 1209, p. 123431, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123431>.

CHUNG, Hyun; JI, Xiangming; CANNING, Corene; SUN, Shi; ZHOU, Kequan. Comparison of Different Strategies for Soybean Antioxidant Extraction. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 58, n. 7, p. 4508-4512, 22 mar. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf904278r>.

CIFTCI, Ozan Nazim; CALDERON, Jaime; TEMELLI, Feral. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Corn Distiller's Dried Grains with Solubles: experiments and mathematical modeling. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 60, n. 51, p. 12482-12490, 14 dez. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf302932w>.

CREMASCO, M. A. Caracterização de partículas. In: CREMASCO, M. A. Operações Unitárias em Sistemas Particulados e Fluido Mecânicos. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2014. p. 142-52.

DAGOSTIN, João Luiz Andreotti; CARPINÉ, Danielle; CORAZZA, Marcos L.. Extraction of soybean oil using ethanol and mixtures with alkyl esters (biodiesel) as co-solvent: kinetics and thermodynamics. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 74, p. 69-75, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.054>.

DANLAMI, Jibrin Mohammed; ARSAD, Agus; ZAINI, Muhammad Abbas Ahmad. Characterization and process optimization of castor oil (*Ricinus communis* L.) extracted by the soxhlet method using polar and non-polar solvents. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, [S.L.], v. 47, p. 99-104, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2014.10.012>.

DIEZ-SIMON, Carmen; EICHELSHEIM, Charlotte; MUMM, Roland; HALL, Robert D.. Chemical and Sensory Characteristics of Soy Sauce: a review. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 42, p. 11612-11630, 3 set. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04274>.

EISENBIES, Mark H.; VOLK, Timothy A.; THERASME, Obste; HALLEN, Karl. Three bulk density measurement methods provide different results for commercial scale harvests of willow biomass chips. **Biomass And Bioenergy**, [S.L.], v. 124, p. 64-73, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.03.015>.

EMBRAPA, <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>, acessado em 30/01/2023 às 20:40.

ERDMAN, John W.. Soy Protein and Cardiovascular Disease. *Circulation*, [S.L.], v. 102, n. 20, p. 2555-2559, 14 nov. 2000. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.102.20.2555>.

ESQUÍVEL, M.M.; BERNARDO-GIL, M.G.; KING, M.B.. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 43-58, set. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-8446\(99\)00014-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-8446(99)00014-5).

ESSIEN, Sinemobong O.; YOUNG, Brent; BAROUTIAN, Saeid. Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 97, p. 156-169, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.014>.

Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019. ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>.

FERRARI, Roseli Aparecida; DEMIATE, Ivo Mottin. Isoflavonas de soja – Uma breve revisão. **Publicatio UEPG: Biological And Health Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 39-46, 2001.

FIORI, Luca; LAVELLI, Vera; DUBA, Kurabachew Simon; HARSHA, Pedapati Siva Charan Sri; MOHAMED, Hatem Bem; GUELLA, Graziano. Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 94, p. 71-80, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.021>.

FORTUNE Business Insights – Food Processing & Processed Food – Soy Sauce Market – Disponível em: <https://www.fortunebusinessinsights.com/soy-sauce-market-102857> - Acesso em: 06/02/2022 às 08:22.

FRIAS, Célia Ferreira; GRAMACHO, Sílvia Alexandre; PINEIRO, Marta. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas e derivatização assistida por micro-ondas na identificação de isômeros de glicose: uma prática para o ensino avançado em análise e caracterização de compostos orgânicos. **Química Nova**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 176-180, 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422014000100030>.

FRIEDMAN, Mendel; BRANDON, David L.. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 49, n. 3, p. 1069-1086, 17 fev. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0009246>.

FRIEDRICH, John P.; LIST, Gary R.. Characterization of soybean oil extracted by supercritical carbon dioxide and hexane. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 30, p. 192-193, 1982.

FRIEDRICH, J. P.; PRYDE, E. H.. Supercritical CO₂ extraction of lipid-bearing materials and characterization of the products. *Journal Of The American Oil Chemists' Society*, [S.L.], v. 61, n. 2, p. 223-228, fev. 1984. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02678773>.

FUKUSHIMA, D.. Soy proteins for foods centering around soy sauce and tofu. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, [S.L.], v. 58, n. 32, p. 346-354, mar. 1981. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02582376>.

GALVÃO, Elisângela Lopes; MARTÍNEZ, Julian; OLIVEIRA, Humberto Neves Maia de; SOUSA, Elisa Maria Bittencourt Dutra de. SUPERCRITICAL EXTRACTION OF LINSEED OIL: economical viability and modeling extraction curves. **Chemical Engineering Communications**, [S.L.], v. 200, n. 2, p. 205-221, jan. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00986445.2012.699482>.

GARMUS, Tábata T.; PAVIANI, Losiane C.; QUEIROGA, Carmen L.; CABRAL, Fernando A.. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 99, p. 68-75, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.01.016>.

GOMES, Paula B.; MATA, Vera G.; RODRIGUES, Alírio E.. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 50-60, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2006.08.018>.

GONELLI, André Luís Duarte; CORRÊA, Paulo Cesar; RESENDE, Osvaldo; REIS NETO, Stelito Assis dos. Estudo da difusão de umidade em grãos de trigo durante a secagem. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 135-140, mar. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612007000100024>.

GRASSO, Florencia V; MAROTO, Beatriz G; CAMUSSO, Celso C. Pretratamiento Enzimático de Expandido de Soja para la Extracción de Aceite con Solvente. **Inf. tecnol.**, La Serena, v. 17, n. 3, p. 41-46, 2006. Disponível em <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642006000300007&lng=es&nrm=iso>. acessado em 05 agosto 2022. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642006000300007>.

JANG, Hyun-Hee; SEO, Gyu-Tae; JEONG, Dae-Woon. Investigation of Oxidation Methods for Waste Soy Sauce Treatment. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 1190, 7 out. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph14101190>.

JESUS, Susana P.; CALHEIROS, Maurício N.; HENSE, Haiko; MEIRELES, M. Angela A.. A Simplified Model to Describe the Kinetic Behavior of Supercritical Fluid Extraction from a Rice Bran Oil Byproduct. **Food And Public Health**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 215-222, 1 ago. 2013. Scientific and Academic Publishing. <http://dx.doi.org/10.5923/j.fph.20130304.05>.

JOKIĆ, Stela; ZEKOVIĆ, Zoran; VIDOVIĆ, Senka; SUDAR, Rezica; NEMET, Ivana; BILIĆ, Mate; VELIĆ, Darko. Original article: supercritical CO₂ extraction of soybean oil. **International Journal Of Food Science & Technology**, [S.L.], v. 45, n. 9, p. 1939-1946, 27 ago. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02358.x>.

JOKIĆ, Stela; SVILOVIĆ, Sandra; ZEKOVIĆ, Zoran; VIDOVIĆ, Senka; VELIĆ, Darko. Solubility and kinetics of soybean oil and fatty acids in supercritical CO₂. **European Journal Of Lipid Science And Technology**, [S.L.], v. 113, n. 5, p. 644-651, 20 jan. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201000403>.

JOKIĆ, Stela; NAGY, Bence; ZEKOVIĆ, Zoran; VIDOVIĆ, Senka; BILIĆ, Mate; VELIĆ, Darko; SIMÁNDI, Béla. Effects of supercritical CO₂ extraction parameters on soybean oil yield. **Food And Bioproducts Processing**, [S.L.], v. 90, n. 4, p. 693-699, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2012.03.003>.

JOKIĆ, Stela; SVILOVIĆ, Sandra; VIDOVIĆ, Senka. Modelling the supercritical CO₂ extraction kinetics of soybean oil. **Croatian Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 52-57, 28 dez. 2015. Faculty of Food Technology Osijek. <http://dx.doi.org/10.17508/cjfst.2015.7.2.05>.

KAO, Tsai-Hua; CHIEN, John-Tung; CHEN, Bing-Huei. Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 107, n. 4, p. 1728-1736, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.015>.

KATAOKA, Shigehiro. Functional effects of Japanese style fermented soy sauce (shoyu) and its components. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.L.], v. 100, n. 3, p. 227-234, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.227>.

KOBAYASHI, Makio. Immunological functions of soy sauce: hypoallergenicity and antiallergic activity of soy sauce. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.L.], v. 100, n. 2, p. 144-151, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.144>.

KOVINICH, Nik; SALEEM, Ammar; ARNASON, John T.; MIKI, Brian. Combined analysis of transcriptome and metabolite data reveals extensive differences between black and brown nearly-isogenic soybean (*Glycine max*) seed coats enabling the identification of pigment isogenes. **BMC Genomics**, v. 12, n. 381, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-381>

KUSCH-BRANDT, Sigrid; MUMME, Jan; NASHALIAN, Ossanna; GIROTTO, Francesca; LAVAGNOLO, Maria Cristina; UDENIGWE, Chibuiké. Valorization of Residues From Beverage Production. **Processing And Sustainability Of Beverages**, [S.L.], p. 451-494, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-815259-1.00013-6>.

LANG, Q. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies â a practical review. **Talanta**, [S.L.], v. 53, n. 4, p. 771-782, 5 jan. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0039-9140\(00\)00557-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0039-9140(00)00557-9).

LI, Bing; WU, Zhi Qiang; DONG, Ling Yan; LI, Lin. Purification of Soybean Isoflavones from Soy Sauce Residue by Ultrafiltration. **Advanced Materials Research**, [S.L.], v. 581-582, p. 1184-1188, out. 2012. Trans Tech Publications, Ltd.. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.581-582.1184>.

LI, Kai; BOLATIBIEKE, Dana; YANG, Shi-Guan; WANG, Bo; NAN, Dong-Hong; LU, Qiang. Ex situ catalytic fast pyrolysis of soy sauce residue with HZSM-5 for co-production of aromatic hydrocarbons and supercapacitor materials. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 10, n. 39, p. 23331-23340, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d0ra03993d>.

LI, Wenzhen; RUAN, Wenyu; PENG, Ying; WANG, Dongming. Soy and the risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Diabetes Research And Clinical Practice**, [S.L.], v. 137, p. 190-199, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2018.01.010>.

LIU, Jianbo; ZANG, Litao; XU, Qing; WANG, Ruifang; LI, Zhanyong. Drying of soy sauce residue in superheated steam at atmospheric pressure. **Drying Technology**, [S.L.], v. 35, n. 13, p. 1655-1662, 18 jul. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07373937.2016.1273232>.

LIZA, M.s.; RAHMAN, R. Abdul; MANDANA, B.; JINAP, S.; RAHMAT, A.; ZAIDUL, I.s.M.; HAMID, A.. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca). **Food And Bioproducts Processing**, [S.L.], v. 88, n. 2-3, p. 319-326, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2009.02.001>.

LÓPEZ-BASCÓN, M.A.; CASTRO, M.D. Luque de. Soxhlet Extraction. **Liquid-Phase Extraction**, [S.L.], p. 327-354, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-816911-7.00011-6>.

LOULI, V.; FOLAS, G.; VOULTAS, E.; MAGOULAS, K.. Extraction of parsley seed oil by supercritical CO₂. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 163-174, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2003.07.003>.

LOWELL, S.; SHIELDS, Joan E.; THOMAS, Martin A.; THOMMES, Matthias. **Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density**. Norwell, U.s.A: Springer Dordrecht, 2004.

MAKINO, Yoshio; MATSUSHITA, Shigeyoshi; TAKEGAMI, Itsuko. Quality of Dry Desalted Lees of Soy-Sauce from Whole Soy-Beans. **Journal Of The Japan Society Of Waste Management Experts**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 26-29, 2001. Japan Society of Waste Management Experts. <http://dx.doi.org/10.3985/jswme.12.26>.

MARINHO, Carolina Messias; LEMOS, Caroline Ortega Terra; ARVELOS, Sarah; BARROZO, Marcos Antonio de Souza; HORI, Carla Eponina; WATANABE, Érika Ohta. Extraction of corn germ oil with supercritical CO₂ and cosolvents. **Journal Of Food Science**

And Technology, [S.L.], v. 56, n. 10, p. 4448-4456, 23 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-019-03923-2>.

MARTÍNEZ, Julian; MONTEIRO, Alcilene R.; ROSA, Paulo T. V.; MARQUES, Márcia O. M.; MEIRELES, M. Angela A.. Multicomponent Model To Describe Extraction of Ginger Oleoresin with Supercritical Carbon Dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [S.L.], v. 42, n. 5, p. 1057-1063, 8 fev. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ie020694f>.

MAZZUTTI, Simone; PEDROSA, Rozangela Curi; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. Green processes in Foodomics. Supercritical Fluid Extraction of Bioactives. **Comprehensive Foodomics**, [S.L.], p. 725-743, 2021. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22816-3>.

MEIRELES, M.A.A., Extraction of bioactive compounds from Latin American plants. In: Martínez, J.L. (Ed.), **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds**. CRC Press - Taylor & Francis Group, Boca Raton, p. 243-274, 2008. <https://doi.org/10.1201/9781420006513.ch8>.

METTA, Francine Ilana Kovari; AYROSA, Ana Maria Irene Bartolomeu; PALETTA, Francisco Carlos. O PAPEL DA LIOFILIZAÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS PELO CONTROLE DA UMIDADE. **XII Safety, Health And Environment World Congress**, São Paulo, Brazil, p. 162-165, July 2012.

MEZZOMO, Natália; MARTÍNEZ, Julian; FERREIRA, Sandra R.s.. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: kinetics, mathematical modeling and scale-up. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 10-16, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2009.07.008>.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M. M. D. C. (2008). Determinação de umidade em café cru usando espectroscopia NIR e regressão multivariada. **Food Science and Technology**, 28, p. 12-17.

MURASAWA, Naoharu; KOSEKI, Hiroshi; IWATA, Yusaku. Causes of accidents by soy sauce squeezing residue and fish meal. **Journal Of Material Cycles And Waste Management**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 42-48, 13 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10163-012-0086-5>.

MURASAWA, Naoharu; KOSEKI, Hiroshi; IWATA, Yusaku; SAKAMOTO, Takabumi. Evaluating the Fires and Oxygen Deficiency Risks Caused by Stored Agricultural Waste. **Sustainability**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 1116, 9 abr. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/su10041116>.

MUROOKA, Yoshikatsu; YAMSHITA, Mitsuo. Traditional healthful fermented products of Japan. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [S.L.], v. 35, n. 8, p. 791-798, 7 maio 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-008-0362-5>.

NAGAI, Takeshi; TANOUE, Yasuhiro; KAI, Norihisa; SUZUKI, Nobutaka. *In Vitro* Antioxidative Activity and Antihypertensive Activity of Soy Sauce Cake Derived from the Manufacturing of Japanese Style Fermented Soy Sauce. **Food And Nutrition Sciences**,

[S.L.], v. 03, n. 08, p. 1118-1127, 2012. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2012.38147>.

NGUYEN, Duc Quang; NGUYEN, Thu Ha; MOUNIR, Sabah; ALLAF, Karim. Effect of feed concentration and inlet air temperature on the properties of soymilk powder obtained by spray drying. **Drying Technology**, [S.L.], v. 36, n. 7, p. 817-829, 27 set. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07373937.2017.1357040>.

NODAR, M Dobarganes; GOMEZ, A Molero; LAOSSA, E Martinez de. Characterisation and Process Development of Supercritical Fluid Extraction of Soybean Oil. **Food Science And Technology International**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 337-342, 1 dez. 2002. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/108201302129174900>.

OJEWUMI, Modupe; RUTH, Basil; DANIEL, Oyekunle. Candles from Soybean Seed Oil Extract. **Preprints**, [S.L.], 26 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.20944/preprints201908.0268.v1>.

PAI, Dhananjay A.; OKOS, Martin R.. Predicting the density and tensile strength of viscoelastic soy powder compacts. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 116, n. 1, p. 184-194, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.043>.

PEREIRA, Camila G.; MEIRELES, M. Angela A.. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. **Food And Bioprocess Technology**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 340-372, 3 out. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>.

PRIOR, B. A. Measurement of water activity in foods: a review. **Journal of Food protection**, v. 42, n. 8, p. 668-674, 1979.

QUITAIN, Armando T.; ORO, Kazuyuki; KATOH, Shunsaku; MORIYOSHI, Takashi. Recovery of oil components of okara by ethanol-modified supercritical carbon dioxide extraction. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 97, n. 13, p. 1509-1514, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.06.010>.

RAMLUCKAN, Krishan; MOODLEY, Kandasamy G.; BUX, Faizal. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**, [S.L.], v. 116, p. 103-108, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.07.118>.

REVERCHON, Ernesto; MARCO, Iolanda de. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 146-166, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>.

ROSA, Paulo T.V.; MEIRELES, M. Angela A.. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 67, n. 1-2, p. 235-240, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.064>.

ROSTAGNO, Maurício; ARAÚJO, Júlio M.A; SANDI, Delcio. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 111-117, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146\(02\)00106-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00106-1).

RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E., MORAIS, S.M., SAMPAIO, C.G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH•. Comunicado Técnico online, 127, pp. 1-4, 2007.

SANTANA, Ádina L.; ALBARELLI, Juliana Q.; SANTOS, Diego T.; SOUZA, Renato; MACHADO, Nélio T.; ARAÚJO, Marilena E.; MEIRELES, M. Angela A.. Kinetic behavior, mathematical modeling, and economic evaluation of extracts obtained by supercritical fluid extraction from defatted assaí waste. **Food And Bioproducts Processing**, [S.L.], v. 107, p. 25-35, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.10.006>.

SANTOS, Rosimeire Cavalcante dos; CARNEIRO, Angélica de Cássia Oliveira; TRUGILHO, Paulo Fernando; MENDES, Lourival Marin; CARVALHO, Ana Márcia Macedo Ladeira. Análise termogravimétrica em clones de eucalipto como subsídio para a produção de carvão vegetal. **Cerne**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 143-151, mar. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-77602012000100017>.

SAPKALE, G. N.; PATIL, S. M.; SURWASE, U. S.; BHATBHAGE, P. K.. Supercritical Fluid Extraction : A Review. **International Journal Of Chemical Sciences**, Osmanabad, India, v. 8, n. 2, p. 729-743, 2010.

SHIRAI, Fumio; MATSURA, Masaki; TADANO, Takamitsu; MIZUKI, Eiji; MURAO, Sawao. Desalinization of Soy Sauce Waste by an Upward Flow of Water through the Column. **Food Science And Technology International, Tokyo**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 295-299, 1998. Japanese Society for Food Science and Technology. <http://dx.doi.org/10.3136/fsti9596t9798.4.295>.

SILVA, Luiz Cláudio Costa; MATTA, Loreta Buuda da; PEREIRA, Guilherme Ramos; BUENO, Rafael Delmond; PIOVESAN, Newton Deniz; CARDINAL, Andrea J.; GOD, Pedro Ivo Vieira Good; RIBEIRO, Cleberson; DAL-BIANCO, Maximiller. Association studies and QTL mapping for soybean oil content and composition. **Euphytica**, [S.L.], v. 217, n. 2, p. 1-18, 20 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-020-02755-y>.

SILVA, Rui P.F.F. da; ROCHA-SANTOS, Teresa A.P.; DUARTE, Armando C.. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 76, p. 40-51, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-5>.

SLAVIN, Joanne. Nutritional benefits of soy protein and soy fiber. **Journal Of The American Dietetic Association**, [S.L.], v. 91, n. 7, p. 816-819, jul. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-8223\(21\)01235-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-8223(21)01235-9).

SMITH, J. M.; NESS, H. C. VAN; ABBOTT, M. M. Introdução a termodinâmica da engenharia química. 7. ed. Boston: McGraw-Hill, 2007.

SOLDAN, Ana Carolina Fornereto; ARVELOS, Sarah; WATANABE, Érika Ohta; HORI, Carla Eponina. Supercritical fluid extraction of oleoresin from Capsicum annum industrial waste. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 297, p. 126593, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126593>.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-I. Modelling of extraction curves. *Chemical Engineering Science*, v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(94\)87012-8](https://doi.org/10.1016/0009-2509(94)87012-8).

SOVOVÁ, H.. Modeling the supercritical fluid extraction of essential oils from plant materials. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1250, p. 27-33, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.014>.

TANGKHAWANIT, Ekkarat; SIRIAMORNUN, Sirithon. Bioactive compounds, biological activity, and starch digestibility of dried soy residues from the soybean oil industry and the effects of hot-air drying. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 102, n. 4, p. 1719-1728, 21 set. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.11514>.

TEMELLI, Feral. Extraction of Triglycerides and Phospholipids from Canola with Supercritical Carbon Dioxide and Ethanol. **Journal Of Food Science**, Canada, v. 57, n. 2, p. 440-442, 1992.

TEMELLI, Feral. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 583-590, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2008.10.014>.

TIULEA, Corina; PEEV, Camelia; ŞTEFANA, Feflea; VLASE, Laurian; DEHELEAN, Cristina; POP, Georgeta, A screening for the most representative classes of compounds from two varieties of soy. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 2011, VOL 17, N 1, P. 15-19.

UZUN, Basak Burcu; PÜTÜN, Ayse Eren; PÜTÜN, Ersan. Fast pyrolysis of soybean cake: product yields and compositions. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 97, n. 4, p. 569-576, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.026>.

WANG, Wenfeng; CHA, Yong-Jun. Volatile Compounds in Seasoning Sauce Produced from Soy Sauce Residue by Reaction Flavor Technology. **Preventive Nutrition And Food Science**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 356-363, 31 dez. 2018. The Korean Society of Food Science and Nutrition. <http://dx.doi.org/10.3746/pnf.2018.23.4.356>.

XIANG, Cheng; LIU, Si Yu; FU, Yan; CHANG, Jie. A quick method for producing biodiesel from soy sauce residue under supercritical carbon dioxide. **Renewable Energy**, [S.L.], v. 134, p. 739-744, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2018.11.059>.

YAMAMOTO, Hideki; TAKEUCHI, Fumiko; NAGANO, Chika; SASAKI, Ayako; SHIBATA, Junji. Separation of Flavonoids and Salt in Bean Cake Disposed from Soy Sauce

Manufacturing Process. **Journal Of Chemical Engineering Of Japan**, [S.L.], v. 39, n. 7, p. 777-782, 2006. Society of Chemical Engineers, Japan. <http://dx.doi.org/10.1252/jcej.39.777>.

YAMORI Y. Food factors for atherosclerosis prevention: Asian perspective derived from analyses of worldwide dietary biomarkers. *Exp Clin Cardiol.* 2006 Summer;11(2):94-8. PMID: 18651042; PMCID: PMC2274856.

YANG, Fuquan; MA, Ying; ITO, Yoichiro. Separation and purification of isoflavones from a crude soybean extract by high-speed counter-current chromatography. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 928, n. 2, p. 163-170, set. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)01144-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(01)01144-x).

YEH, Hsiang-Yu; SU, Nan-Wei; LEE, Min-Hsiung. Chemical Compositions and Physicochemical Properties of the Fiber-Rich Materials Prepared from Shoyu Mash Residue. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 53, n. 11, p. 4361-4366, 16 abr. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf050243g>.

YU, Kai Ling; LAU, Beng Fye; SHOW, Pau Loke; ONG, Hwai Chyuan; LING, Tau Chuan; CHEN, Wei-Hsin; NG, Eng Poh; CHANG, Jo-Shu. Recent developments on algal biochar production and characterization. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 246, p. 2-11, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.009>.

ZHAO, Lichao; ZHANG, Yong; HE, Liping; DAI, Weijie; LAI, Yingyi; YAO, Xueyi; CAO, Yong. Soy Sauce Residue Oil Extracted by a Novel Continuous Phase Transition Extraction under Low Temperature and Its Refining Process. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 62, n. 14, p. 3230-3235, 28 mar. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf405459v>.

ZHISHEN, Jia; MENGCHENG, Tang; JIANMING, Wu. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 64, n. 4, p. 555-559, mar. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146\(98\)00102-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(98)00102-2).

APÊNDICE A – Quadros de ANOVA

Nos Quadros de ANOVA:

SQ – Soma dos quadrados dos desvios da média do tratamento

GL – Graus de liberdade

QM – Quadrados médios

Tabela A.1 - Quadro de ANOVA que avalia a influência do solvente no rendimento da extração Soxhlet através do planejamento *one-way*

	SQ	GL	QM	F	p
Média	4583,762	1	4583,762	765,9496	0,000104
Solvente	37,012	2	18,506	3,0924	0,186674
Erro	17,953	3	5,984		

Tabela A.2 - Quadro de ANOVA que avalia a relevância da temperatura e da pressão no rendimento da extração supercrítica através do planejamento 2k

	SQ	GL	QM	F	p
Pressão	3,459600	1	3,459600	4,677664	0,275713
Temperatura	0,000400	1	0,000400	0,000541	0,985198
Erro	0,739600	1	0,739600		
Total SQ	4,199600	3			

Tabela A.3 - Quadro de ANOVA que avalia a relevância da temperatura e da pressão no rendimento da extração supercrítica através do planejamento fatorial 2x2 com duas réplicas

	SQ	GL	QM	F	p
Média	2394,666	1	2394,666	9538,127	0,000000
Pressão	6,938	1	6,938	27,634	0,006268
Temperatura	0,001	1	0,001	0,002	0,962974
Pressão*Temperatura	1,471	1	1,471	5,858	0,072744
Erro	1,004	4	0,251		

Tabela A.4 - Quadro de ANOVA que avalia a influência do cossolvente no rendimento da extração supercrítica a 250 bar e 40 °C através do planejamento *one-way*

	SQ	GL	QM	F	p
Média	1730,313	1	1730,313	193,7845	0,000154
Cossolvente	0,251	1	0,251	0,0281	0,874925
Erro	35,716	4	8,929		

Tabela A.5 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da temperatura e da pressão na extração supercrítica de fenólicos pelo planejamento fatorial 2x2 com duas réplicas

	SQ	GL	QM	F	p
Média	1096,747	1	1096,747	1913,721	0,000002
Pressão	173,570	1	173,570	302,863	0,000064
Temperatura	173,570	1	173,570	302,863	0,000064
Pressão*Temperatura	173,570	1	173,570	302,863	0,000064
Erro	2,929	4	0,573		

Tabela A.6 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da adição de cossolvente na extração supercrítica de fenólicos através do planejamento *one-way*

	SQ	GL	QM	F	p
Média	5612,853	1	5612,853	61,58572	0,001424
Cossolvente	3438,173	1	3438,173	37,72455	0,003563
Erro	364,555	4	91,139		

Tabela A.7 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da temperatura de ebulição do solvente na extração Soxhlet de fenólicos através do planejamento *one-way*

	SQ	GL	QM	F	p
Média	27927,05	1	27927,05	5841,344	0,000005
Temperatura Ebulição	609,68	2	304,84	63,762	0,003485
Erro	14,34	3	4,78		

Tabela A.8 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da polaridade do solvente na extração Soxhlet de fenólicos através do planejamento *one-way*

	SQ	GL	QM	F	p
Média	23745,55	1	23745,55	183,98575	0,000171
Polaridade	107,78	1	107,78	0,8351	0,412499
Erro	516,24	4	129,06		

Tabela A.9 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da temperatura e da pressão na extração supercrítica de flavonoides pelo planejamento fatorial 2x2 com duas réplicas

	SQ	GL	QM	F	p
Média	72380,68	1	72380,68	17918,2	0,000000
Pressão	3113,99	1	3113,99	770,88	0,000010
Temperatura	4314,04	1	4314,04	1067,96	0,000005
Pressão*Temperatura	555,50	1	555,50	137,52	0,000302
Erro	16,16	4	4,04		

Tabela A.10 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da adição de cossolvente na extração supercrítica de flavonoides através do planejamento *one-way*

	SQ	GL	QM	F	p
Média	56640,06	1	56640,06	60,52809	0,001472
Cossolvente	870,42	1	870,42	0,93017	0,389436
Erro	3743,06	4	935,76		

Tabela A.11 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da temperatura de ebulição do solvente na extração Soxhlet de flavonoides através do planejamento *one-way*

	SQ	GL	QM	F	p
Média	101117,6	1	101117,6	4860,674	0,000007
Temperatura Ebulição	12880,8	2	6440,4	309,587	0,000335
Erro	62,4	3	20,8		

Tabela A.12 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da polaridade do solvente na extração Soxhlet de flavonoides através do planejamento *one-way*

	SQ	GL	QM	F	p
Média	69337,57	1	69337,57	287,7705	0,000071
Polaridade	11979,41	1	11979,41	49,7179	0,002133
Erro	963,79	4	240,95		

Tabela A.13 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da temperatura e da pressão no valor de t_{CER} pelo planejamento fatorial 2x2 com duas réplicas

	SQ	GL	QM	F	p
Média	7381,125	1	7381,125	198,8182	0,000147
Pressão	28,125	1	28,125	0,7576	0,433206
Temperatura	3,125	1	3,125	0,0842	0,786136
Pressão*Temperatura	10,125	1	10,125	0,2727	0,629095
Erro	148,500	4	37,125		

Tabela A.14 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da temperatura e da pressão no valor de t_{FER} pelo planejamento fatorial 2x2 com duas réplicas

	SQ	GL	QM	F	p
Média	36586,13	1	36586,13	286,5394	0,000071
Pressão	741,12	1	741,12	5,7619	0,074324
Temperatura	231,13	1	231,13	1,7969	0,251159
Pressão*Temperatura	78,12	1	78,12	0,6074	0,479309
Erro	514,50	4	128,63		

Tabela A.15 - Quadro de ANOVA que avalia a influência da temperatura e da pressão no valor do parâmetro b_1 pelo planejamento fatorial 2x2 com duas réplicas

	SQ	GL	QM	F	p
Média	0,000424	1	0,000424	1226,422	0,000004
Pressão	0,000008	1	0,000008	22,93	0,008719
Temperatura	0,000000	1	0,000000	0,042	0,848210
Pressão*Temperatura	0,000001	1	0,000001	2,156	0,215958
Erro	0,000001	4	0,000000		

