UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO ESCOLA DE QUÍMICA

NATALIA BARBOSA EITEL

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE SOJA DESENGORDURADO PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS: CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIHIPERTENSIVA

Rio de Janeiro

Natalia Barbosa Eitel

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE SOJA DESENGORDURADO PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS: CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIHIPERTENSIVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Tecnologias de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Suely Pereira Freitas

Dra Renata Valeriano Tonon

Rio de Janeiro

2015

CIP - Catalogação na Publicação

BE34h

Barbosa Eitel, Natalia
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE SOJA
DESENGORDURADO PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS
BIOATIVOS: CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE
ANTIHIPERTENSIVA / Natalia Barbosa Eitel. -- Rio
de Janeiro, 2015.
93 f.

Orientadora: Suely Pereira Freitas. Coorientadora: Renata Valeriano Tonon. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2015.

1. Gestão de residuos industriais. 2. Alcalase. 3. Capacidade antioxidante. 4. Atividade ECA inibitória. 5. Globulinas. I. Freitas, Suely Pereira, orient. II. Tonon, Renata Valeriano, coorient. III. Título.

Natalia Barbosa Eitel

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE SOJA DESENGORDURADO PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS: CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIHIPERTENSIVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em 14 de agosto de 2015	
Suely Pereira Freitas, Prof ^a . Dr ^a ., Escola de Química - UFRJ	(Orientadora)
Renata Valeriano Tonon , D. Sc., Embrapa Agroindústria de	- Alimentos (Co-Orientadora)
Isabelle Santana, D. Sc., Universidade do Estado do Rio de J	- Ianeiro
Maria Gabriela Bello Koblitz, D.Sc., Universidade Federal d	- lo Estado do Rio de Janeiro
Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc., Escola de Química – LIERI	_

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Nair e Richard, por todos os ensinamentos, conselhos, dedicação, incentivo e amor incondicional;

À minha irmã, Johanna, que mesmo longe fisicamente, muito amo;

Aos meus avós Rita (*in memoriam*), Hilde (*in memoriam*) e Walter (*in memoriam*), que tenho certeza estão muito orgulhosos de mim, onde estiverem;

Aos familiares queridos e amigos, de longe e de perto;

Com todo meu carinho, admiração, respeito e gratidão!

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Suely e Renata, pela confiança, todos os ensinamentos e conselhos dados ao longo dessa trajetória. Obrigada pela paciência, por nunca terem desistido de mim e pelas palavras carinhosas. Obrigada ainda, por me indicarem ao *Biotechnologies to Valorise the regional food Biodiversity in Latin America (BiValBi)*, que me apresentou a um novo mundo e fez de 2014 e 2015 dois dos melhores anos da minha vida.

Aos membros da banca examinadora por ter cedido seu tempo e pelos comentários e sugestões apresentadas com o objetivo de valorizar o trabalho.

A todos os professores e coordenadores do programa Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química (UFRJ) pela dedicação e empenho para manter a excelência do curso de pós graduação.

I would also like to thank Dr. Lorenzo Pastrana and all the others researchers involved in the BiValBi exchange programme for introducing us to new worlds, making possible the exchange of cultures, knowledge and wisdom.

To Dr. Paula Jauregi for all the support and help given during this year abroad. Muchas gracias! Thank you also for being not only a great professional, but also a friend and for being with us in so many memorable moments.

To University of Reading (UoR) for allowing the use of the facilities, which made this project feasible. Also for enrolling me as a PhD Student, which enabled me taking several training courses, which were and will be very useful throughout all my professional life.

To all the friends I made in Reading: Pornpoj 'Geng' Srisukchayakul, Carol Beres, Ignacio 'Nacho' Cabezudo, Gabriel Finten, Sam Stone, Kate Stephens, Katie Brown, Yuchen Guo, Ese Omoarukhe, Nurmahani Maidin, Jumoke Olatujoye, Khairul Pa'ee, Clara Rocherieux, Aurélie Becker, Cid Gonzalez, Salah Yahya, Hanad Adnani, Ági Fekete, Angelika Kristek, Micael Andrade, Simon Steenson, Karla Guergoletto, Adele Costabile, Gemma Walton, Afro Chatzifragkou, Clementino Ibeas, the greeks (Panos, Cristos, Petra, Nefeli), Dan Crosland, and so many others. You are now part of my life and made Reading feel like home, thank you all for everything, for supporting me, for hearing me when I needed, for making Reading look like a bigger and louder city, for sharing your cultures and accepting me as I am. Thank you for making me company in the lab, in the office, during lunch, during so many trips and night outs. You are amazing and you know I'll be always waiting for you here or wherever I'll go.

I would like to thank specially Geng and Dr. Andreas for teaching me the 2D Eletrophoresis technique; to Cid for teaching me the iACE Assay; to Nacho and Chris for helping me so many times with the HPLC.

To all the technicians in UoR, in special for Yvonne and Heather for being the best secretaries a University could wish; Diane and Chris for helping with the nastiest problems in the lab; Andy and Rob for being so patient and caring with our lab; and all the people involved in the finance office who were so kind and always were there for placing new reagent orders and helping us completing the forms for conferences.

A todos os amigos feitos durante as disciplinas teóricas, em especial, à Camilla Pires, Ari Gaspar, Verônica Leite e Juliana Leite, por todos os momentos de dificuldade e aprendizado que enfrentamos juntos sempre com um sorriso no rosto e pelas gargalhadas trocadas durante tantos almoços.

A todos os meus amigos do Rio, que sempre me faziam me sentir no Rio, mesmo estando a um oceano de distância, e sempre me apoiaram. Agradeço especialmente à Érika Frossard, que compreendeu a minha ausência em um momento tão bonito de sua vida.

Aos meus pais, Nair e Richard Eitel, e à minha irmã Johanna Barbosa Eitel, que sempre me apoiaram em todos os momentos, me aguentaram mesmo no nível insuportável de estresse e sempre acreditaram na minha capacidade e persistência.

Aos meus tios Nadir, Nazira, Nanci, Dardânia, Mauro e Tulipa e todos os primos, que nunca tiveram dúvidas de onde eu chegaria e sempre apoiaram todas as minhas escolhas, mesmo estando tão distantes fisicamente.

A muitos outros que passaram pela minha vida e que certamente contribuíram para esta conquista.

À *Caramuru Alimentos* por ter doado o farelo de soja e responder prontamente a todas as dúvidas e solicitações.

À CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

To BiValBi for the student grant, which made of this dream a great reality.



RESUMO

BARBOSA EITEL, Natalia. Hidrólise enzimática do farelo de soja desengordurado para obtenção de peptídeos bioativos: capacidade antioxidante e atividade antihipertensiva. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A principal motivação desse trabalho é contribuir para a produção de alimentos com propriedades bioativas que possam ser direcionados para minimizar os impactos na saúde do estilo de vida contemporâneo. O aumento da hipertensão no mundo, que já afeta 1/3 da população, pode desencadear doenças ainda mais graves. É conhecido que a ação oxidativa pode agir tanto como uma causa, mas também como uma consequência da hipertensão. Uma alternativa, portanto, poderia ser a inclusão de antioxidantes naturais na dieta. No campo da ciência de alimentos e bioquímica, alimentos funcionais se destacam pelas suas características, principalmente sua segurança e multifuncionalidade. Explorando esse campo, alguns peptídeos bioativos apresentam ambas as características de interesse: capacidade antioxidante e atividade antihipertensiva. Analisando outra área – a de resíduos industriais, nota-se que na produção de óleos de soja, mais de 200 milhões de toneladas de farelo de soja são produzidas anualmente. Mundialmente, esse farelo ainda é destinado para a indústria de ração animal. Com uma demanda de óleo que cresce cerca de 5% ao ano, pressionada pelo setor energético, a indústria de ração poderia saturar com consequente impacto negativo nos setores industriais, em especial a indústria de alimentos. Desse modo, é possível afirmar que esse problema envolve tanto a gestão de resíduos, como também aspectos econômicos. O objetivo desse trabalho, portanto, foi obter hidrolisados proteicos bioativos a partir do farelo de soja desengordurado por tecnologia enzimática. As globulinas foram extraídas do farelo de soja em escala de laboratório. Um planejamento fatorial completo 2³ foi realizado para avaliar a influência da temperatura ($T = 45^{\circ}C$ a $65^{\circ}C$), razão farelo de soja: tampão (5 a 15 mg.mL⁻¹), e concentração enzimática (E = 1 a 3 mU.(mg proteína (PTN))⁻¹) na capacidade antioxidante, analisada com as metodologias ABTS e FRAP, e na atividade antihipertensiva analisada com a atividade ECA inibitória in vitro. Os hidrolisados foram fracionados por ultrafiltração (massa molar de corte (MMC) = 10kDa) para recuperar os peptídeos de menor tamanho.

O melhor resultado foi obtido a $T=45^{\circ}C$, 5 mg farelo soja. (mL tampão)⁻¹ e E=1 mU.(mg proteína)⁻¹. Nestas condições, foram alcançados recuperação de proteínas de 4,90 \pm 0,15 mg PTN.mL⁻¹, grau de hidrólise (GH) = 33,48% \pm 1,01%, capacidade antioxidante de 326,26 \pm 2,58 mmol TE.mg⁻¹ PTN e 26,20 \pm 0,00 mmol AAE.mg⁻¹ PTN pelos métodos ABTS e FRAP, respectivamente, e atividade ECA inibitória de 102,15 \pm 3,04 iECA%.(mg PTN)⁻¹. Essa condição foi usada durante o processo EHSP, que tinha como objetivos a extração e hidrólise simultânea de proteínas do farelo de soja. Após 3,5 horas de processo, os peptídeos obtidos na corrente do permeado da UF (ou seja, com tamanho menor que 10 kDa) atingiram 22,42 \pm 0,98 mmol TE.mg⁻¹ PTN e 1,90 \pm 0,11 mmol AAE.mg⁻¹ PTN de capacidade antioxidante, com 19,96 \pm 0,58 mg PTN.mL⁻¹ e GH = 39,28% \pm 1,13%.

Palavras-chave: gestão de resíduos industriais; Alcalase; globulinas; capacidade antioxidante; FRAP; ABTS; atividade ECA inibitória; planejamento experimental.

ABSTRACT

The main motivation of this work is to contribute to the production of food with bioactive properties, which could be used to minimize health impacts of the contemporary lifestyles. Hypertension affects already 1/3 of the world population and can trigger more severe diseases. It is known that the oxidative action can act both as a cause and a consequence of hypertension. An alternative could involve the use of natural antioxidants. In the field of food and biosciences, functional foods stand out for its characteristics. We can highlight its security and its multifunctionality. Exploring the functional foods, bioactive peptides have both characteristics of our interest: the antioxidant capacity and the antihypertensive. Analysing another field – the industrial residues, we realized that in the soybean oil production 200 mi metric tonnes of soybean meal are produced per year. Worldwide this meal is still destined to the feed industries. With its oil demand growing about 5% a year, pressured by the energy sector, the feed industry could saturate with resulting negative impact on industrial sectors, especially the food industry. In such a way, we could say it is both a waste management and an economic problem. The aim of this work, therefore, was to obtain bioactive peptides and hydrolysates from the enzymatic hydrolysis of the defatted soy meal. Globulins were extracted from the soymeal and a full factorial design of experiments 23 was carried out to analyse the influence of the temperature (T = 45°C to 65°C); soy meal: buffer ratio (5mg.mL⁻¹ to 15mg.mL⁻¹) and enzyme concentration (E = 1 to 3 mU.mg⁻¹ protein (PTN)) in the antioxidant capacity, analysed using both ABTS and FRAP methodologies and the antihypertensive activity via the iECA in vitro activity of the obtained hydrolysates. They were fractionated using ultrafiltration (UF, MWCO = 10 kDa) for obtaining smaller peptides. The best result was obtained with $T = 45^{\circ}C$, 5 mg PTN.mL⁻¹ Buffer and $E = 1 \text{mU.mg}^{-1}$ PTN, achieving 4.90 ± 0.15 mg PTN.mL⁻¹, degree of hydrolysis (DH) = $33.48\% \pm 1.01\%$; 326.26 ± 2.58 mmol TE.mg⁻¹ PTN and 26.20 ± 0.00 mmol AAE.mg⁻¹ 1 PTN and iECA = 102.15 \pm 3.04 iECA%.mg $^{-1}$ PTN. This condition was used to do an integrative process, which aimed to extract and hydrolyse, simultaneously, the proteins of the soy meal. After 3.5h of process, the peptides in the permeate fraction of the UF achieved 22.42 ± 0.98 mmol Te.mg⁻¹ PTN and 1.90 ± 0.11 mmol AAE.mg⁻¹ PTN of antioxidant capacity, with 19.96 ± 0.58 mg PTN.mL⁻¹ and DH = $39.28\% \pm 1.13\%$.

Keywords: industrial waste management; Alcalase; globulin; antioxidant capacity; FRAP; ABTS; ACE inhibitory activity; design of experiments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Série histórica de distribuição de farelo de soja no Brasil
Figura 4.1: Consumo global de óleos alimentícios. Retirado de USDA (2015)
Figura 4.2: Gama de aplicações da soja, com destaque para o óleo de soja. Retirado de (Embrapa, 2012).
Figura 4.3: Produção de biodiesel por matéria-prima no Brasil. (Fonte/Elaboração: ABIOVE – Coordenadoria de economia e estatística, Março 2015)
Figura 4.4: Destino e usos da soja brasileira. Fonte: (Aprosoja/Mt)
Figura 4.5: Estrutura cristalina da Alcalase diluída em dioxano anidro (Schmitke, Stern e Klibanov, 1997).
Figura 5.1: Curva padrão para a análise de proteínas totais pelo método BCA, usando ASB como padrão.
Figura 5.2: Curva padrão da análise ABTS, usando Trolox como padrão27
Figura 5.3: Curva padrão para a análise FRAP, usando ácido ascórbico como padrão28
Figura 5.4: Curvas padrão para a análise iECA usando Captopril como inibidor padrão30
Figura 5.5: Gradiente binário em 5 etapas33
Figura 5.6: Fluxograma simplificado de obtenção de isolados proteicos34
Figura 5.7: Peneiras usadas na análise granulométrica (6-25#)
Figura 5.8: Amostra das diferentes frações obtidas após peneiramento. As frações 7 e 8 foram obtidas após moagem do farelo homogeneizado, sendo as frações G_IPS7 aquela retida na peneira #60 e a G_IPS8 a que passa pela mesma peneira
Figura 5.9: Fluxograma simplificado do processo EHSP, no qual ocorrem simultaneamente a extração proteica e a hidrólise enzimática. A etapa de centrifugação tem como objetivo a separação de fibras e outras matérias insolúveis, enquanto a ultrafiltração separa os peptídeos e hidrolisados de interesse.

Figura 6.1: (a) e (b) Primeira etapa de solubilização das proteínas totais da soja sob agitação
magnética; (c) Resíduos do isolamento de proteínas, à esquerda proteínas de menor interesse
dissolvidas no sobrenadante II e à direita fibras insolúveis
Figura 6.2: (a) Histograma de frequência; (b) Curva de distribuição de tamanho43
Figura 6.3: Sacola de Amostragem com as diferentes frações após peneiramento44
Figura 6.4: Análise gráfica para determinação dos parâmetros do modelo Gates-Gaudin-Schumann
Figura 6.5: Análise gráfica para determinação dos parâmetros do modelo Rosin-Ramler- Bennet
Figura 6.6: Análise gráfica para determinação dos parâmetros do modelo Sigmóide45
Figura 6.7: Rendimento proteico em relação ao tamanho da partícula do Farelo de soja (FS).
Figura 6.8: Gel resultante da corrida de eletroforese bidimensional do isolado proteico de soja (D \geq 250 μm)
Figura 6.9: Gel resultante da corrida de eletroforese bidimensional do isolado proteico de soja (D \geq 250 μ m) diluído 50X
Figura 6.10: Cromatograma do padrão β-conglicinina
Figura 6.11: Cromatograma do padrão glicinina50
Figura 6.12: Cromatograma do isolado proteico de soja obtido a partir da fração G_IPS551
Figura 6.13: Cromatograma do isolado proteico de soja obtido a partir da fração G_IPS651
Figura 6.14: Grau de hidrólise calculado pelo método TCA durante a cinética da hidrólise52
Figura 6.15: Curvas exponenciais obtidas nas análises de (a) grau de hidrólise (GH) e nas análises de capacidade antioxidante realizada através dos métodos (b) ABTS e (c) FRAP 54
Figura 6.16: Histogramas dos resíduos de (a) proteínas totais (BCA), (b) Grau de Hidrólise
(GH), (c) atividade antioxidante pelo método ABTS, (d) atividade antioxidante pelo método

FRAP e (e) razão da eficiência inibitória (IER). Usando o método quantitativo de Shapiro-	
Wilk, os p obtidos mostraram que nenhum dos resultados seguiu distribuição normal, com p	9 =
0,00039, p = 0,00046, p = 0,00019, p = 0,00016 e p = 0,00009	.57
Figura 6.17: Superfícies de resposta em função da razão farelo de soja: tampão e temperatura	
de (a) proteínas totais (BCA),capacidade antioxidante pelos métodos (b) ABTS e (c) FRAP	.58
Figura 6.18: Gráfico de Pareto para (a) proteínas totais e (b) grau de hidrólise	.59
Figura 6.19: Superfícies de resposta do grau de hidrólise (GH) em função de (a) temperatur	a e
concentração enzimática e de (b) concentração enzimática e razão farelo de soja: tampão	.60
Figura 6.20: Superfícies de resposta de (a) proteínas totais (ABTS), (b) atividade antioxidar	
pelo método FRAP e (c) Razão de eficiência inibitória em função de concentração enzimáti	
e temperatura.	.61
Figura 6.21: Superfície de resposta de atividade antioxidante pelo método ABTS em função)
da concentração enzimática e razão farelo de soja: tampão.	
da concentração enzimadea e razão fareto de soja, tampão	.02
Figura 6.22: Superfície de resposta de atividade antioxidante pelo método FRAP em função)
da concentração enzimática e razão farelo de soja: tampão	.64
Figura 6.23: iECA% e concentração proteica da fase permeada do planejamento fatorial	
completo 23 com triplicata no ponto central. Os resultados reportados são das amostras	
diluídas 25x.	.65
Figura 6.24: Gráfico de Pareto para a resposta iECA	65
11gara 0.2 1. Graneo de l'areto para a respossa 1201	.05
Figura 6.25: Histogramas dos resíduos de (a) BCA, (b) ABTS, (c) FRAP e (d) IER. Os p	
obtidos mostraram que nenhum dos resultados seguiu distribuição normal, com $p=0,00047$	7;
0,00027; p = 0,00009; p = 0,00008, respectivamente.	.67
Figura 6.26: Superfícies de resposta para o teor de proteínas na fração retida em função de ((a)
temperatura e concentração enzimática, (b) razão farelo de soja: tampão e temperatura, e, (c	e),
razão farelo de soja: tampão e concentração enzimática.	.69
	7 0
Figura 6.27: Gráfico de Pareto para a variável de resposta proteínas totais (ABTS)	.70

Figura 6.28: Gráfico de Pareto para a variável de resposta atividade antioxidante pelo método
FRAP70
Figura 6.29: Superfícies de resposta da atividade antioxidante pelo método FRAP em função
de (a) temperatura e concentração enzimática, (b) razão farelo de soja: tampão e temperatura,
e (c) concentração enzimática e razão farelo de soja: tampão71
Figura 6.30: Gráfico de Pareto para a variável de resposta iECA% em termos da razão da
eficiência inibitória (IER)72

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Qualidade de grãos de soja por origem em 13% base úmida9
Tabela 4.2: Série Histórica Brasileira de Área Plantada, Produtividade e Produção de Soja9
Tabela 4.3: Composição de aminoácidos em soja e trigo
Tabela 4.4: Consumo de alimentos tradicionais à base de soja no Japão12
Tabela 4.5: Sequências de peptídeos bioativos oriundos de globulinas da soja22
Tabela 5.1: Programa para focagem isoelétrica para <i>Immobiline DryStrip</i> pH 3-10NL 180mm
Tabela 5.2: Condições eletroforéticas para géis <i>ExcelGel</i>
Tabela 5.3: Matriz do planejamento experimental 2³ com triplicata no ponto central da hidrólise do isolado proteico de soja
Tabela 6.1: Resultado dos testes preliminares em rendimento de isolado proteico de soja (IPS) e em proteína total avaliada pelo método BCA42
Tabela 6.2: Resultado da análise granulométrica por peneiramento do farelo de soja43
Tabela 6.3: Parâmetros estimados dos modelos de análise granulométrica46
Tabela 6.4: Resultados da cinética enzimática dos isolados proteicos de soja ^(1,2) 52
Tabela 6.5: Análise de variância para os resultados obtidos na cinética da hidrólise enzimática
Tabela 6.6: Resultado das análises realizadas no permeado do planejamento fatorial 2 ³ com triplicata no ponto central (*)
Tabela 6.7: Correlação de Pearson entre proteínas totais e grau de hidrólise60
Tabela 6.8: Tabela ANOVA para a variável de resposta atividade antioxidante pelo método

Tabela 6.9: Tabela ANOVA para a variável de resposta atividade antioxidante pelo método	
FRAP6	54
Tabela 6.10: Resultado das análises realizadas na corrente do retido do planejamento fatorial	
2 ³ com triplicata no ponto central6	6
Tabela 6.11: Tabela ANOVA para a variável proteínas totais (BCA) da corrente do retido6	58
Tabela 6.12: Resultado do processo de extração e hidrólise simultânea de proteínas (EHSP)	
para as três replicatas do processo. Os resultados estão expressos em Média ± DP de pelo	
menos 3 replicatas de cada análise7	'2
Tabela 6.13: Correlação de Pearson entre as variáveis proteínas totais (BCA) e grau de	
hidrólise (GH) para a corrente do permeado	′3
Tabela 6.14: Correlação de Pearson entre as variáveis proteínas totais (BCA) e grau de	
hidrólise (GH) para a corrente do retido7	13

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE Ácido ascórbico equivalente

ABTS Ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) diamônio

ECA Enzima inibitória de angiotensina-I

ACN Acetonitrila

BCA Ácido bicinconínico
CV Coeficiente de variação
d_s Diâmetro médio de Sauter

DP Desvio padrão DTT Ditiotreitol

EHSP Extração e hidrólise simultânea de proteínas

FS Farelo de soja GH Grau de hidrólise

GLY Glicinina

IER Razão da eficiência inibitória IPS Isolado proteico de soja MMC Massa molar de corte

PTN Proteína

SDS Dodecil sulfato sódico
TCA Ácido tricloroacético
TE Trolox Equivalente
TFA Ácido trifluoroacético

Tris tris-hidroximetilaminometano

TROLOX Ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo2-carboxílico

β-CG β-conglicinina

SUMÁRIO

RESUMOxv
ABSTRACTxix
LISTA DE FIGURASxxi
LISTA DE TABELASxxix
LISTA DE ABREVIATURASxxxiii
1 INTRODUÇÃO1
2 JUSTIFICATIVA3
3 OBJETIVOS5
3.1 Objetivo Geral5
3.2 Objetivos Específicos
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA6
4.1 A soja e sua cadeia produtiva6
4.2 A importância econômica da soja no Brasil e no mundo
4.3 Resíduos gerados na indústria da soja e seu potencial
4.3.1 Okara
4.3.2 Farelo de soja desengordurado14
4.4 Hipertensão
4.5 Hidrólise enzimática proteica16
4.6 Peptídeos bioativos derivados de fontes alimentícias
4.7 Peptídeos bioativos da soja e seus resíduos21
5 MATERIAIS E MÉTODOS 25

5.1 M	ateriais25
5.1.1	Matéria-prima
5.1.2	Reagentes químicos
5.2 M	étodos Analíticos
5.2.1	Determinação da concentração proteica25
5.2.2	Determinação do grau de hidrólise (GH)26
5.2.3	Capacidade Antioxidante
	Determinação da capacidade inibitória da enzima conversora de
Angiotensina-	-I (iECA)
5.2.5	Caracterização por eletroforese bidimensional31
5.2.6	Caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)33
5.3 Pr	ocedimento Experimental
5.3.1	Testes preliminares
5.3.2	Seleção dos parâmetros operacionais na etapa de hidrólise
5.3.3	Cinética da hidrólise enzimática
5.3.4 obtidos	Influência das condições de hidrólise enzimática nos peptídeos bioativos 39
5.3.5	Processo integrado de extração e hidrólise simultânea de proteínas (EHSP) 40
5.4 A	nálises estatísticas41
6 RESU	LTADOS E DISCUSSÃO42
6.1 Te	estes Preliminares
6.2 A	nálise granulométrica

6.3 Caracterização por eletroforese bidimensional
6.4 Caracterização por CLAE
6.5 Cinética enzimática51
6.6 Influência das condições de hidrólise enzimática nos peptídeos bioativos obtidos 55
6.6.1 Resultados para o permeado
6.6.2 Resultados para o retido
6.7 Processo EHSP de isolamento proteico e hidrólise enzimática simultânea72
7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS75
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS76
9 BIBLIOGRAFIA77
10 ANEXOS91
10.1 ANEXO A91
10.2 ANEXO B92
10.3 ANEXO C93

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial, urbano e tecnológico transformou o mundo e sua população positivamente. O mundo se tornou mais integrado, a internet e outras tecnologias da informação promoveram a distribuição de conhecimento instantâneo e disponível a todos e, as inovações tecnológicas aumentaram a expectativa de vida da população.

Por outro lado, com um mundo cada vez mais desenvolvido e conectado, os hábitos da população também foram afetados, porém negativamente. A urbanização desencadeou a cultura de hábitos alimentares não saudáveis. Uma dieta, tradicionalmente rural, rica em frutas e hortaliças, ou seja, rica em fibras, se transformou em uma dieta rica em sal, gordura saturada e carboidratos nutricionalmente pobres, típicos de *fast-food* e alimentos processados. Observa-se também uma redução nas atividades físicas devido ao sedentarismo, *desk jobs*, violência, etc. Tais fatos contribuem para um risco alto de hipertensão.

A hipertensão, atualmente, é uma das principais causas de mortes no mundo. A hipertensão já afeta mais de um bilhão de pessoas e estima-se que cause pelo menos nove milhões de mortes (Lim, Vos e Flaxman, 2013) anualmente, sendo responsável por pelo menos 45% das mortes causadas por doenças cardiovasculares e 51% das causadas por derrame segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO).

Ademais, não se deve desconsiderar as outras desvantagens e preocupações trazidas com a intensa urbanização e industrialização, como por exemplo, a constante preocupação com os danos ao meio ambiente. A indústria de alimentos gera grande quantidade de resíduos que, em geral, contêm substâncias de elevado valor nutricional e funcional. Por outro lado, o descarte indevido desses resíduos pode apresentar agravos ambientais, de modo que há necessidade de tratamentos específicos, elevando o custo operacional do processo. Neste quesito, um dos principais objetivos das pesquisas modernas é a reclassificação desses resíduos, principalmente os de fontes naturais, em coprodutos, de modo a reduzir o custo de um oneroso tratamento (Kosseva, 2009).

A soja, por sua vez, é uma das *commodities* mais produzidas no mundo, sendo responsável por quase 60% da produção total de grãos no mundo em 2014/15 segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture*, USDA). Em torno de 85% da soja produzida são processados em óleo de soja e farelo de soja. Em torno de 98% do farelo de soja é usado como ingrediente proteico na produção de ração

animal, um destino pouco valorizado para um resíduo com potencial para gerar produtos de alto valor agregado.

Quando corretamente hidrolisados, peptídeos de soja podem ser bioativos. Eles não somente apresentam capacidade antioxidante como também atividade inibitória da enzima conversora de Angiotensina (ECA). Essa última faz parte da lista de medicamentos essenciais para baixar o risco cardiovascular de pacientes hipertensos (Chobanian *et al.*, 2003), sendo eles: diurético tiazídico, inibidor de ECA, bloqueador de canal de cálcio, betabloqueadores, metformina, insulina, estatina e aspirina.

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa, 2015b), nas últimas três décadas, a soja foi a cultura brasileira que mais cresceu, correspondendo a 49% da área plantada em grãos do país. O Brasil é o segundo maior país produtor de soja no mundo. A safra prevista para 2015/16 ultrapassa 100.000 toneladas, resultado de um crescimento de 5,7% de área e de 5,5% de produtividade (Conab, 2015).

Ainda segundo o MAPA (2015a), anualmente quase seis milhões de litros de óleo comestível são produzidos a partir de 30 milhões de toneladas de soja, gerando mais de 23,5 milhões de toneladas de farelo proteico. Por possuir um padrão de qualidade Premium, aproximadamente metade do farelo gerado é destinado à exportação, enquanto a outra metade ainda é destinada para a indústria de ração animal como matéria prima de alto teor proteico (Figura 2.1). Em seu estudo, Diebel *et al.* (2012) ressaltaram que, como o farelo é gerado em grande escala, a indústria de ração animal pode saturar, de modo a quebrar a economia de óleos alimentícios e de biocombustíveis. Dessa forma, seria de grande importância a diversificação de aplicações desse coproduto.

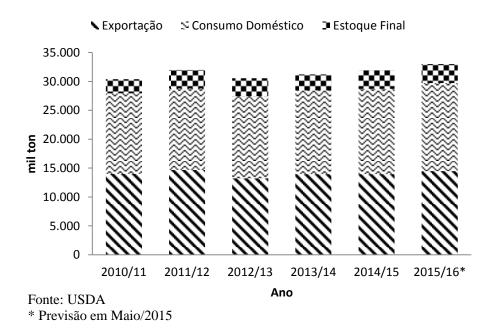


Figura 2.1: Série histórica de distribuição de farelo de soja no Brasil.

Diversos estudos demonstram que a hidrólise enzimática da proteína de soja presente no farelo desengordurado e em outros subprodutos da indústria de óleos vegetais, resulta em peptídeos e hidrolisados com capacidade antioxidante (Moure, Dominguez e Parajo, 2006;

Park *et al.*, 2010; Zhang, Li e Zhou, 2010); atividade anticancerígena (Rayaprolu *et al.*, 2013); ação anti-adipogênica (Tsou, Kao, *et al.*, 2010; Tsou, Lin, *et al.*, 2010; Kao *et al.*, 2011; Tsou *et al.*, 2012; Tsou *et al.*, 2013); assim como, podem inibir a enzima conversora de angiotensina (Gibbs *et al.*, 2004; Chiang *et al.*, 2006), uma das principais causas de hipertensão. Tais resultados são de grande interesse para a indústria de óleo de soja, já que podem agregar grande valor ao seu principal coproduto – o farelo de soja desengordurado.

Dessa forma, é de grande interesse para a economia brasileira, assim como para a indústria da soja e de seus derivados o estudo da hidrólise enzimática do farelo de soja com objetivo de obter peptídeos e hidrolisados com alto valor agregado por possuírem propriedades bioativas de importância para a saúde humana.

Ademais, a catálise enzimática é muito eficiente e plenamente aplicável a substratos alimentares e biológicos, sendo superior à catálise química por preservar os aminoácidos. Algumas propriedades funcionais, tais como o aumento da solubilidade, redução da capacidade de reter água, de geleificação e coagulação, e, redução do poder emulsificante, ainda podem ser alteradas enzimaticamente através da hidrólise (Arruda, 1998). Essas alterações podem ser benéficas em diversas etapas da cadeia de produção, de estoque e de consumo de alimentos com ingredientes proteicos (Lamsal, Jung e Johnson, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral obter peptídeos e hidrolisados proteicos a partir da hidrólise enzimática do farelo desengordurado de soja proveniente da produção de óleo de soja brasileiro.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o rendimento da extração de proteínas do farelo de soja;
- Avaliar a influência das condições de hidrólise do isolado proteico de farelo de soja obtido;
- Avaliar o processo integrado de extração e hidrólise simultânea de proteínas
 (EHSP) a partir do farelo desengordurado de soja, em escala de bancada;
- Determinar as atividades antioxidante e anti-hipertensiva dos hidrolisados proteicos obtidos.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A soja e sua cadeia produtiva

O óleo de soja é o segundo óleo vegetal mais consumido no mundo na dieta humana, segundo dados da USDA, quase se igualando ao consumo de óleo de palma (Figura 4.1). Ele pode ser consumido como gordura vegetal, óleo de cozinha, e ainda ser ingrediente na formulação de diversos alimentos processados.

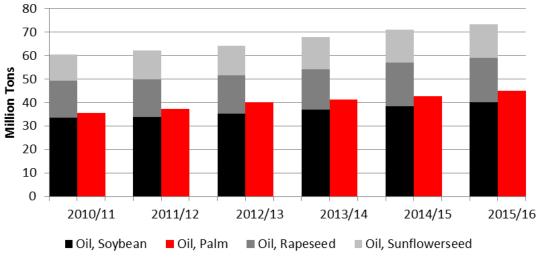


Figura 4.1: Consumo global de óleos alimentícios. Retirado de USDA (2015)

Por outro lado, o óleo de soja também se destaca pela sua gama de aplicações industriais em outros setores, como a indústria de tintas, de desinfetantes, farmacêutica, de construção, têxtil, etc. O processamento do óleo de soja dá origem à lecitina, esteróis, glicerol e ácidos graxos. Atualmente, é a matéria prima com maior disponibilidade para produção de biocombustíveis (biodiesel) (Figura 4.2).

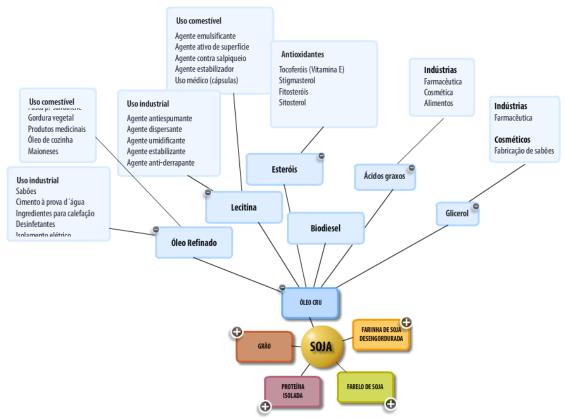
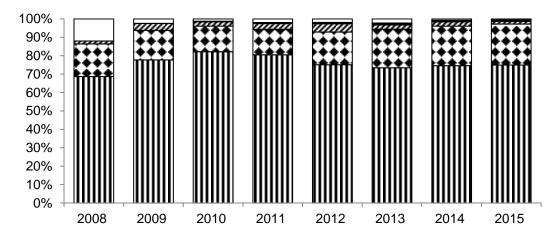


Figura 4.2: Gama de aplicações da soja, com destaque para o óleo de soja. Retirado de (Embrapa, 2012).

Em relação à produção de biodiesel, observa-se na Figura 4.3, que o óleo de soja é a matéria prima mais usada no Brasil, principalmente pelo seu perfil lipídico e sua grande produtividade e adaptação ao clima e solos brasileiros.



■ Óleo de soja Gorduras animais Óleo de algodão Óleo de fritura usado Outras

Figura 4.3: Produção de biodiesel por matéria-prima no Brasil. (Fonte/Elaboração: ABIOVE – Coordenadoria de economia e estatística, Março 2015).

No diagrama abaixo (Figura 4.4), é possível ver o destino e usos da soja produzida no Brasil. Percebe-se que quase metade da produção ainda é destinada para processamento de óleos, sendo 77% da produção destinada para uso doméstico como óleo alimentício ou destinado à indústria de biodiesel e, 23% para exportação. Do farelo gerado na indústria de óleos, 52% são exportados enquanto ainda 48% são internamente usados como matéria prima de alto teor proteico na indústria de ração animal.

DESTINO E USOS DA SOJA BRASILEIRA

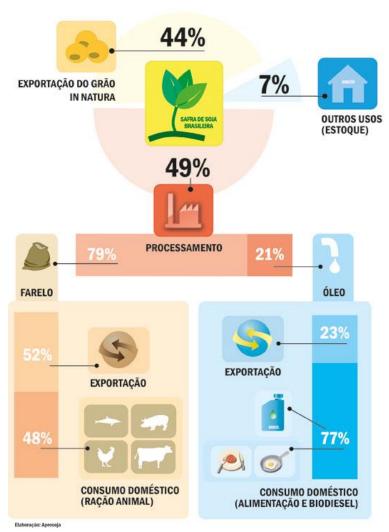


Figura 4.4: Destino e usos da soja brasileira. Fonte: (Aprosoja/Mt)

Dentre todas as oleaginosas, a soja se destaca não somente pelo perfil significativo em ácidos graxos insaturados, mas também pelo seu alto valor proteico. Thakur e Hurburgh (2007) estudaram grãos de soja de diferentes origens e os compararam entre si. O resultado desse estudo pode ser visto na Tabela 4.1, com destaque para os grãos brasileiros que são

significativamente mais ricos em proteínas do que aqueles produzidos nos EUA ou na Argentina.

Tabela 4.1: Qualidade de grãos de soja por origem em 13% base úmida

Característica	EUA	Brasil	Argentina	Outro	Variação
Número de Amostras	55	35	19	6	
Proteína (%)	$34,8^{b}$	$35,5^{a}$	33,3°	$36,0^{a}$	(27,3–39,6)
Amin	oácidos	(% de so	oja)		
Lisina	2,22	2,22	2,16	2,38	(2,05–2,53)
Metionina	0,48	0,47	0,47	0,5	(0,42-0,55)
Treonina	1,33	1,34	1,34	1,37	(1,23–1,45)
Cisteína	0,53	0,51	0,51	0,56	(0,44-0,64)
Triptofano	0,47	0,48	0,48	0,47	(0,30–0,61)
Cinco aminoácidos chaves (soma)	5,03 ^{ab}	5,01 ^b	4,95 ^b	$5,27^{a}$	(4,52-5,46)
Aminoácidos Totais (%)	33,76	34,67	34,67	35,48	(31,04–38,44)
Óleo (%)	18,2°	19,5 ^a	19,1 ^{ab}	18,5°	(15,7–20,9)
Ácidos graxos livres % de óleo	1,1 ^b	1,3 ^a	1,0 ^{bc}	0.7^{c}	(0,4-2,4)

Médias na linha com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente a p=0,05.

Fonte: (Thakur e Hurburgh, 2007).

Segundo Arruda (1998), um acre de soja provê proteína suficiente para sustentar um homem moderadamente ativo por 2224 dias, a autora também compara esse valor com outras fontes proteicas: trigo (877 dias), milho (354 dias) e carne de gado (77 dias). Esses valores já estão ultrapassados, levando em conta as melhorias de cultivo, qualidade e seleção de sementes mais resistentes e também a evolução na produtividade da cultura de soja. Essas melhorias ficam evidentes quando observamos o crescimento em área plantada, em produtividade e produção de grãos no Brasil nos últimos anos, como visto na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Série Histórica Brasileira de Área Plantada, Produtividade e Produção de Soja

					•
Safra	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15*
Área Plantada (mil hectares)	24.181	25.042	27.736	30.173	31.902
Produtividade (kg.ha ⁻¹)	3.115	2.651	2.938	2.854	3.011
Produção (mil toneladas)	75.324	66.383	81.499	86.121	96.044

Fonte: Conab

Ainda em relação ao teor proteico da soja, é importante citar que 90% das proteínas presentes na soja são globulinas do tipo glicinina e β-conglicinina (Cui *et al.*, 2013). A glicinina é uma proteína do tipo 11S composta por duas cadeias polipeptídicas – uma cadeia ácida (aproximadamente 38 kDa) e uma cadeia básica (aproximadamente 20 kDa) ligadas por

^{*} Previsão em Junho de 2015

uma ligação dissulfídica. A β-conglicinina é uma glicoproteína trimérica do tipo 7S. Ela é composta por três subunidades: uma cadeia α (aproximadamente 65 kDa), uma cadeia α (aproximadamente 62 kDa) e uma cadeia β (aproximadamente 47 kDa). Na Tabela 4.3, observa-se a composição em aminoácidos da soja e do trigo em g.(16 g N)⁻¹.

Tabela 4.3: Composição de aminoácidos em soja e trigo.

Tabela 4.3: Composição de aminoácidos em soja e trigo.			
Aminoácido	Soja	Trigo	
I- Aminoácidos Essenciais (g/16 g Nitro	gênio)	
Isoleucina	4,54	3,26	
Leucina	7,78	6,67	
Lisina	6,38	2,86	
Metionina	1,26	1,50	
Cistina	1,33	2,54	
Metionina + Cistina	2,59	4,04	
Fenilalanina	4,94	4,51	
Tirosina	3,14	2,99	
Fenilalanina + Tirosina	8,08	7,50	
Treonina	3,86	2,93	
Triptofano	1,28	1,09	
Valina	4,80	4,42	
II- Aminoácidos não essenciai	s (g/16 g Nit	rogênio)	
Arginina	7,23	4,61	
Histidina	2,53	2,29	
Alanina	4,26	3,62	
Ácido aspártico	11,70	4,93	
Ácido Glutâmico	18,70	29,86	
Glicina	4,18	3,92	
Prolina	5,49	9,94	
Serina	5,12	4,59	

4.2 A importância econômica da soja no Brasil e no mundo

A soja e seus derivados são *commodities*, ou seja, são produzidos em grande escala e vendidos a preços mais baixos. Por definição, *commodities* são produtos homogêneos, com classificação baseada na sua composição química ou bioquímica, variando pouco a sua composição independente do local em que foi produzido. A soja, junto com o gado, foram as primeiras *commodities* a serem comercializadas pela bolsa de Chicago (*Chicago Board of Trade*, CBOT), em outubro de 1984 (Back, Prokopczuk e Rudolf, 2013).

Os dados apresentados indicam a importância da cadeia produtiva da soja no Brasil. Pela primeira vez desde 2009, o complexo soja superou o minério e liderou as exportações da balança comercial, obtendo US\$ 31,3 bilhões em 2014 contra apenas US\$ 25,8 bilhões obtidos pelo minério (**Zafalon**, 2015). Segundo a Secretaria do Comércio Exterior (Secex) e a

Federação da Agricultura e Pecuária do Mato Grosso do Sul (FAMASUL), nos últimos 10 anos, a receita dos embarques internacionais de soja do centro-oeste triplicou, passando de US\$ 1,6 bilhão, entre janeiro e maio de 2005, para US\$ 5 bilhões, no mesmo período de 2015. A Confederação Nacional da Agricultura (CNA) acredita que o Brasil responderá por 16% do aumento da oferta de grãos até 2025. Dados reportados pelo USDA mostram que o Brasil e os Estados Unidos são os maiores exportadores de soja e seus derivados, sendo juntos responsáveis por 80% do *market share* do complexo soja.

No relatório mensal de mercados e comércio mundiais de oleaginosas, divulgado em maio de 2015 pela USDA (*Oilseeds: World Markets and Trade*), é esperada para o Brasil a produção de 7.388 mil toneladas de óleo de soja, correspondendo a 14,88% da produção mundial, sendo superado apenas pela Argentina (8.050 mil toneladas), pelos Estados Unidos (9.568 mil toneladas) e pela China (13.809 mil toneladas).

Além disso, cerca de 1,5 milhão de postos de trabalhos foram gerados em 17 estados do Brasil por causa da sojicultura. Também não devem ser negligenciadas as melhorias urbanas e industriais que a agroindústria oferece.

4.3 Resíduos gerados na indústria da soja e seu potencial

Os usos ocidentais tradicionais da soja mais comuns se limitam ao óleo de soja (usado principalmente com objetivo alimentício), ao farelo, à farinha de soja e ao isolado proteico. A soja também pode ser usada como algum ingrediente de outros alimentos, como hambúrgueres, salsichas, laticínios, pães, biscoitos, bolos, etc. Porém no oriente, a gama de aplicações da soja é bem mais diversificada, podendo ser dividida em dois grupos: fermentados e não fermentados.

No grupo dos não fermentados estão os grãos frescos e secos, nozes de soja, broto de soja, farinha integral de soja, extrato hidrossolúvel de soja, tofu, formulações infantis a base de soja, okara e *yuba* (também conhecido como casca de tofu). Já nos fermentados há *tempeh*, *miso* (pasta à base de soja para preparo de sopas e molhos), molhos de soja, *natto* (soja fermentada), tofu fermentado e outros produtos a base de hidrolisado de soja (Xiao, 2011). Na Tabela 4.4, ilustra-se o consumo de alguns destes alimentos no Japão.

Tabela 4.4: Consumo de alimentos tradicionais à base de soja no Japão.

	Soja em grão	Farelo de soja	Total
Tofu e seus derivados	496.000	0	496.000
Kori-tofu	28.000	0	28.000
Natto	128.000	0	128.000
Miso	162.000	0	162.000
Molho de soja	26.300	157.600	183.900
Extrato hidrossolúvel de soja	4.200	0	4.200
Uso total alimentício	1.032.000	401.000	1.433.000

Fonte: Fukushima (2011)

Na indústria da soja, observa-se a geração de diversos resíduos e efluentes. Porém os dois principais resíduos gerados na cadeia produtiva da soja são a okara e o farelo de soja desengordurado.

4.3.1 Okara

Estima-se que em torno de 75% da população sofra algum nível de intolerância à lactose. Ou seja, cada vez mais o leite de vaca e seus derivados vêm sendo substituídos por proteínas com baixo teor de lactose, como, por exemplo, o hidrolisado e iogurte de soja, tofu e outros produtos à base de soja. Dessa forma, vem-se observando um aumento desses produtos nas prateleiras e o surgimento de novas indústrias nesse setor.

Okara é o resíduo gerado na produção de hidrolisado de soja ou de tofu, conhecida também como *douzha* ou *tofuzha* (chinês), *tofukasu* (japonês), e *bejee* (coreano). Possui cor amarelada esbranquiçada sendo constituída por partes insolúveis do grão de soja que ficam retidas durante a etapa de filtração na produção de hidrolisado de soja ou na produção de tofu. Em torno de 1,2 kg de okara são gerados na produção de 1 kg de tofu (Li, Qiao e Lu, 2012).

Segundo Jimenez-Escrig *et al.* (2010), a okara possui 24,5 a 37,5 g proteínas. (100g base seca)⁻¹; 9,3 a 22,3 g lipídios. (100g base seca)⁻¹; e, 14,5 a 55,4 g fibras alimentares. (100g base seca)⁻¹. A okara também é rica em isoflavonas (genisteína e daidzeína), lignanas, fitoesteróis, saponinas e fitatos. Esses compostos tem potencial bioativo, podendo exibir, por exemplo, capacidade antioxidante, atividade antihipertensiva e anticancerígena, etc.

Mateos-Aparicio *et al.* (2010) estudaram a capacidade antioxidante de frações de polissacarídeos obtidas a partir da extração alcalina sequencial da fração alcoólica insolúvel de okara. A análise de capacidade antioxidante foi feita pelo método ABTS e método de poder redutor, obtendo 63-78 TE. g⁻¹ e 10-26TE.g⁻¹, respectivamente.

Jimenez-Escrig *et al.* (2010) isolaram as proteínas da okara e as hidrolisaram com pepsina e pancreatina para obter peptídeos bioativos, que foram então purificados por meio de ultrafiltração com massa molar de corte (MMC) de 1, 3 e 5 kDa. Os autores analisaram os hidrolisados quanto à capacidade antioxidante (poder redutor e método do ABTS) e atividade inibitória de enzima conversora de angiotensina. Neste estudo, os autores concluíram que a maioria dos peptídeos bioativos era de baixa massa molar, contendo uma cadeia peptídica com 12 aminoácidos ou menos.

Yokomizo, Takenaka e Takenaka (2002) obtiveram peptídeos antioxidantes através da hidrólise com Protease N das proteínas isoladas da okara. Os peptídeos eram compostos por dois ou três aminoácidos: Ala-Tyr, Gly-Tyr-Tyr, Ala-Asp-Phe e Ser-Asp-Phe. A capacidade antioxidante do peptídeo Gly-Tyr-Tyr foi a mais alta observada, sendo próxima à reportada para a carnosina.

Por ser rica em fibras e proteínas, a ingestão de okara poderia auxiliar na redução de colesterol e triglicerídeos do sangue e na redução da taxa de absorção de carboidratos no intestino, ajudando no controle glicêmico. Xu, Tan e Li (2001) estudaram a influência da inclusão de fibras de soja na dieta de ratos modelos com diabetes mellitus, analisando o açúcar no sangue, o metabolismo lipídico e a histomorfologia durante cinco semanas. Os resultados sugerem que essa mudança na dieta pode ser benéfica, melhorando seu metabolismo e protegendo alguns órgãos, como fígado e rins.

Tendência similar foi observada em um estudo da adição de fibras de okara em uma dieta altamente lipídica durante três semanas em hamsters sírios do sexo masculino. Os resultados sugeriram que a composição rica em fibras alimentares e proteínas da okara poderiam estar relacionadas com a redução dos lipídeos totais e colesterol no plasma e fígado, assim como no aumento dessas moléculas nas fezes dos roedores, de modo que poderia ser usado como ingrediente natural ou suplemento na formulação de alimentos funcionais (Villanueva et al., 2011).

Ademais, a okara é utilizada na substituição de farinhas de trigo ou soja na produção de pães, panquecas, macarrão, doces, bebidas, salsichas e farinhas nutricionais, etc. Como apontado por Li, Qiao e Lu (2012), diversos estudos comprovaram que essa substituição ou a adição de okara, não altera consideravelmente a percepção sensorial desses alimentos. Além de trazer benefícios à saúde, como visto anteriormente, o seu uso ajuda na gestão de resíduos.

4.3.2 Farelo de soja desengordurado

Na produção de óleo de soja foram gerados no mundo, na safra de 2014/15, 200.920 mil toneladas de farelo de soja e são esperadas 209.795 mil toneladas para a safra 2015/16. Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, observa-se a divisão no mundo da produção, importação e exportação de farelo de soja. Observa-se ainda que o Brasil é responsável por 14% da produção e 22% das exportações, sendo a União Europeia a maior importadora de farelo de soja (32% das importações totais).

O Brasil se destaca por manter um dos maiores estoques finais, superior a 3.000 toneladas, já que a exportação e consumo doméstico são inferiores à capacidade produtiva. Neste cenário, nota-se mais uma vez a importância de dar um destino alternativo a esse farelo para não limitar a produção de óleo de soja, que tem um grande potencial de crescimento.

Assim como a okara, o farelo se destaca pela sua rica composição em proteínas, alcançado até 50% em composição, e fibras alimentares, de modo que novamente pode-se aproveitar seu potencial bioativo e funcional. Por outro lado, o farelo apresenta baixa concentração lipídica, principalmente por ser um resíduo da indústria de óleos. Portanto, ele é muitas vezes usado como fonte de baixo custo para extração de proteínas da soja, dando origem ao isolado proteico de soja. Vários estudos se dedicam atualmente à obtenção de peptídeos bioativos a partir do farelo ou do isolado proteico de soja, como por exemplo, hidrolisados proteicos com capacidade antioxidante, atividades antihipertensiva, anticancerígena, imunomodulatória, etc.

Apesar de seu potencial bioativo, o farelo ainda é muito usado como suplemento proteico na formulação de rações animais. No Brasil, 48% do farelo produzido são destinados ao consumo doméstico e utilizados apenas como uma matéria prima de baixo custo para preparação de ração animal. No oriente, o farelo é usado na preparação de outros alimentos para consumo humano para aproveitar suas qualidades nutricionais e funcionais.

4.4 Hipertensão

A hipertensão é uma doença silenciosa, que atinge mais de um bilhão de pessoas no mundo. Para ser considerado um indivíduo que sofre de hipertensão ou pressão alta, a pressão sanguínea sistólica deve ser superior a 140 mmHg ou ter a pressão sanguínea diastólica

superior a 90 mmHg. Segundo a WHO, atualmente $22.3 \pm 2.2\%$ da população com mais de 18 anos sofre de pressão alta.

Quanto mais alta a pressão nos vasos sanguíneos, maior é o esforço exigido do coração para bombear o sangue. Quando incontrolada, a hipertensão pode ocasionar ataques cardíacos, alargamento do coração e até falência cardíaca. Ademais, os vasos sanguíneos também podem sofrer consequências, desenvolvendo aneurismas, ficando entupidos e até se rompendo. Quando ocorre o rompimento dos vasos sanguíneos no cérebro, ocorre o derrame, com consequências mais graves e podendo causar a morte. A hipertensão não é somente uma das principais causas de doenças cardíacas, mas também pode provocar falência renal, cegueira, disfunção cognitiva, etc. (Sharp *et al.*, 2011).

Em um mundo cada vez mais transiente, a população mudou seus hábitos bruscamente. Com a chegada da internet, a informação e comunicação passaram a ser instantâneas, induzindo as pessoas a fundirem atividades de lazer com trabalho, aumentando o nível de estresse. Com essa falta de tempo e com o crescimento da violência urbana, observase também um aumento na inatividade física. O tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas são outros hábitos que contribuem para o aumento da pressão sanguínea. A dieta mudou, sendo consumidos cada vez mais alimentos prontos, *fast-food*, e outros com alta concentração de gordura, conservantes, sal e outros aditivos que podem contribuir direta ou indiretamente no aumento da pressão.

O sistema Renina-Angiotensina (RAS) exerce papel fundamental na regulação da pressão arterial. A renina e a enzima conversora de angiotensina (ECA) são as principais reguladoras desse caminho metabólico. A renina, produzida nos rins, transforma angiotensinogênio em angiotensina I no fígado. A angiotensina I é convertida nos pulmões em angiotensina II pela ação da ECA, essa mesma enzima também cliva a bradicinina, um vasodilatador, em peptídeos inativos. A angiotensina II causa direta e indiretamente a vasoconstrição.

A angiotensina II atua no sistema simpático, aumentando a concentração de catecolaminas, como por exemplo, adrenalina e noradrenalina, que estimulam o sistema cardíaco e causam a vasoconstrição diretamente. A angiotensina II também estimula a região hipofisária no cérebro, causando a liberação de vasopressina, um hormônio antidiurético, fazendo com que os rins conservem a água no corpo, concentrando e reduzindo o volume da

urina e aumentando a quantidade de água no sangue, causando novamente vasoconstrição. Quando atua no córtex adrenal, a angiotensina II aumenta a liberação de aldosterona, desregulando o balanceamento eletrolítico, afetando assim novamente a homeostase.

A forma mais eficiente de controlar a pressão arterial é mudando hábitos, comendo mais frutas e vegetais, diminuindo o consumo de sal, fazendo alguma atividade física, evitando o consumo de álcool, deixando de fumar, etc. Todavia, há fatores intrínsecos que contribuem para a hipertensão, como idade, sexo, etnia, etc.

Pacientes que sofrem com hipertensão de médio e alto risco devem ser medicados. A WHO aconselha o uso isolado ou combinado de oito diferentes medicamentos: diurético tiazídico (atua no rim, aumentando o volume e diminuindo a concentração de urina), inibidor de ECA (iECA), bloqueador de canal de cálcio, betabloqueadores (promove a redução da liberação da noradrenalina na terminação nervosa), Metformina, insulina, estatina, e, aspirina.

O estresse oxidativo também é uma das causas e consequência da hipertensão, podendo induzir danos cardiovasculares e renais, danos esses já associados à hipertensão. A hipertensão dependente de Angiotensina II é particularmente sensível à oxidase NAD(P)H derivada de espécies reativas de oxigênio (He *et al.*, 2013). Desse modo, associar as duas bioatividades seria de particular interesse no controle da hipertensão.

4.5 Hidrólise enzimática proteica

Enzimas são proteínas, que atuam como catalisadores de sistemas biológicos. Quando comparadas a catalisadores inorgânicos ou sintéticos, são mais vantajosas já que podem atuar em condições brandas de pH e temperatura, conseguem atuar em ambiente aquoso, além de serem altamente específicas. Características essas, importantes, ao se tratar de matérias-primas que têm como destino o consumo humano. Elas atuam aumentando a velocidade de uma reação pela redução da energia de ativação, porém não alteram o equilíbrio reacional.

Por definição, proteinases são:

Enzimas que hidrolisam proteínas pela clivagem de ligações peptídicas. As endoproteínas clivam moléculas proteicas, enquanto as exoproteinases atacam as extremidades das cadeias de proteína removendo aminoácidos, um a um. São classificadas como serina proteinases, tiol proteinases, metaloproteínas ou proteinases ácidas. Algumas proteinases mostram alto grau de especificidade em relação às ligações peptídicas que clivam (por exemplo, tripsina), enquanto outras são muito menos especificas (por exemplo, papaína). Essas

enzimas são usadas em todas as áreas da produção de alimentos, incluindo carne, fermentação de cerveja (preparação), fabricação de queijo e indústrias de panificação. Também conhecidas por muitas outras denominações, entre os quais, proteinases, proteossomos e enzimas proteolíticas. (Dicionário de ciência e tecnologia dos alimentos, 2008, p. 356)

A energia de ativação é reduzida por formação do complexo Enzima-Substrato (ES), que pode ser formado através de ligações covalentes ou interações mais fracas, como por exemplo, ligações de Hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas. O modelo atualmente utilizado para o complexo ES é aquele, no qual a enzima é complementar ao estado de transição do substrato – modelo de ajuste induzido (Koshland, 1958) e, não ao substrato – modelo chave-fechadura (Fischer, 1894).

A velocidade da reação enzimática é dependente da concentração de substrato (Equação 4.1). Outros fatores que podem afetar a velocidade são temperatura, pH do meio reacional e a presença de inibidores e ativadores.

$$\vec{v} = v_{m\acute{a}x} \times \frac{S}{k_m + S} \quad \text{[4.1]}$$

$$na \ qual: \begin{cases} \vec{v} - velocidade \ da \ reação \\ v_{m\acute{a}x} - velocidade \ m\'{a}xima \\ S - concentração \ de \ substrato \\ k_m - Constante \ de \ dissociação \ do \ complexo \ ES \ ou \ constante \ de \ Michaelis \end{cases}$$

Por ter como objetivos a obtenção de peptídeos bioativos, a escolha de uma enzima apenas de baixa especificidade propicia a quebra randômica da cadeia peptídica e assim, evita que se atinjam graus de hidrólise muito altos, ocorrendo a clivagem de ligações ativas do peptídeo (Chiang *et al.*, 2006).

A Alcalase 2,4L é uma enzima excretada pela bactéria *Bacillus licheniformis*, da família das subtilases, ou seja, uma protease de serina semelhantes à subtilisina (Siezen e Leunissen, 1997). Ela é uma enzima tradicionalmente usada na indústria alimentícia e farmacêutica (Anwar e Saleemuddin, 1998) e seu pH ótimo é 8,5, no qual as proteínas da soja se encontram solubilizadas, facilitando a hidrólise enzimática e possibilitando o processo integrado, no qual ocorre a extração proteica simultaneamente à hidrólise enzimática. Além disso, peptídeos obtidos na hidrólise do isolado proteico de soja apresentaram maior capacidade antihipertensiva (iECA) quando comparados aos peptídeos obtidos na hidrólise com a Flavourzyme (Chiang *et al.*, 2006).

Sua estrutura alcalina (Figura 4.5) possui diversas alfa hélices e uma folha beta, distintas das proteases de serina da família das quimiotripsinas. Apesar da estrutura primaria diferir bastante entre ambas as famílias, há uma grande identidade na estrutura do sitio ativo enzimático (Philipp e Bender, 1983).

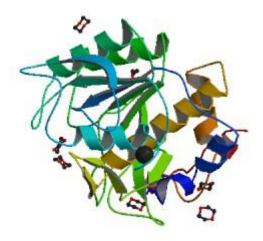


Figura 4.5: Estrutura cristalina da Alcalase diluída em dioxano anidro (Schmitke, Stern e Klibanov, 1997).

Subtilases podem ser encontradas em eubactérias, archae-bactérias, eucariontes e vírus. São 6 as superfamílias de subtilases: família das termitases, kexinas, peptidases lantibióticas, proteinases K, pirolisinas e subtilisinas (Siezen e Leunissen, 1997). A Alcalase faz parte da família das subtilisinas que inclui, em sua maioria, enzimas produzidas por *Bacillus*. Sendo subdividida em três grupos: subtilisinas verdadeiras, proteases altamente alcalinas e proteases intracelulares. Subtilases tem uma grande gama de aplicação industrial, como, por exemplo, na indústria têxtil (Vojcic *et al.*, 2015), indústria de detergentes (Li *et al.*, 2013), cosmética (Kuang), alimentícia (Tamura e Kawabata; Sung, Park e Chang, 2006), farmacológica (Celeste *et al.*; Ma e Yang), etc.

Proteínas da soja podem causar diversas reações alérgicas, como, por exemplo, dermatite, urticária, diarreia, vômitos, asma, broncoespasmo, rinite, conjuntivite, etc. (Wang, T. *et al.*, 2014). Os principais afetados são crianças e a sensibilidade à soja começa a ser desenvolvida aos sete meses de idade, quando os sintomas já se tornam perceptíveis (Savage *et al.*, 2010). Estudos empregando hidrólise enzimática demonstram uma diminuição da alergenicidade da soja.

Lee *et al.* (2007) estudaram o efeito da hidrólise com pepsina e/ou quimiotripsina sobre a glicinina. Através do teste imunoenzimático ELISA, eles comprovaram que a ação enzimática sobre a proteína reduziu significativamente a interação da proteína com o sérum de

seis pacientes alérgicos à soja, sendo os peptídeos com massa molar (MM) < 20kDa não imunorreativos. Eles afirmam que a diminuição da alergenicidade pode resultar da destruição proteolítica do sítio de ligação específico que é reconhecido por um anticorpo.

Wang, Z. *et al.*(2014) compararam os efeitos da hidrólise com Alcalase e tripsina sobre a alergenicidade das proteínas contidas no farelo de soja (FS). Os resultados mostraram que os hidrolisados foram menos imunorreativos usando o teste ELISA e que as proteínas alergênicas do FS foram mais sensíveis à ação da Alcalase.

Sung *et al* (2014) analisaram a influencia da hidrólise enzimática com pepsina e/ou quimiotripsina sobre a alergenicidade do inibidor de tripsina Kunitz da soja. Através do teste ELISA, eles testaram a proteína 2S da soja antes e após hidrólise com o sérum de seis pacientes que apresentam hipersensibilidade alimentícia à soja. Os resultados mostraram que a hidrólise apenas com pepsina foi a mais eficiente, eliminando completamente a hipersensibilidade à soja de três dos pacientes.

Por outro lado, deve-se atentar aos efeitos negativos que a hidrólise pode causar, como por exemplo, o impedimento sensorial. Proteínas, em especial, whey, caseínas e proteínas da soja podem produzir gosto amargo em processos enzimáticos. No caso da soja, o gosto amargo se deve à presença de amino ácidos hidrofóbicos de baixa massa molar resultantes da hidrólise enzimática (Matoba e Hata, 1972). Esse impedimento sensorial está diretamente relacionado ao tipo de enzima empregada e o grau de hidrólise alcançado.

Sung, Park e Chang (2006) analisaram o efeito do grau de hidrólise (GH) e o uso de diferentes enzimas sobre o gosto amargo de hidrolisados de soja. As enzimas analisadas foram Flavourzyme, Alcalase, neutrase, protamex, papaína e bromelina com razões E/S de 0,5%, 1% e 2%. Protamex foi a enzima que apresentou o maior GH, seguido por Alcalase, neutrase, bromelina, papaína e Flavourzyme. A Alcalase foi a enzima que apresentou hidrolisados com o gosto amargo mais perceptível, enquanto a Flavourzyme não apresentou gosto perceptível até GH=12%.

Cho *et al.* (2004) analisaram dois hidrolisados proteicos comerciais de soja quanto ao seu sabor, funcionalidade química e hidrofobicidade e as relacionaram à percepção do gosto amargo. Eles fracionaram os hidrolisados proteicos através de ultrafiltração e obtiveram cinco frações distintas, com MM variando entre 580 e 11300 Da. Os autores sugeriram que o sabor amargo da soja estava relacionado a peptídeos de cadeia peptídica média (1000 < MM <

4000), sendo os peptídeos com MM < 1000 Da os que apresentaram o gosto amargo mais baixo.

4.6 Peptídeos bioativos derivados de fontes alimentícias

Peptídeos bioativos são aqueles que, quando na sequência da proteína de origem, se encontram inativos, mas, quando liberados por hidrólise, podem exercer diferentes ações fisiológicas, como por exemplo, capacidade antioxidante (Sarmadi e Ismail, 2010). Os peptídeos antioxidantes possuem, em média, de 5 a 16 aminoácidos residuais e os derivados de alimentos são compostos seguros e saudáveis com baixa massa molar, baixo custo e de fácil absorção, além de ainda possuírem outras propriedades funcionais e nutricionais. Ainda, segundo os autores, os peptídeos bioativos podem ser empregados de duas formas: como hidrolisados proteicos, i.e. uma mistura de peptídeos e aminoácidos liberados na hidrólise; ou como peptídeos bioativos, ou seja, uma sequência de aminoácidos purificados do hidrolisado. Diversos autores vêm estudando os diferentes efeitos benéficos de peptídeos bioativos derivados de alimentos.

Jamdar *et al.* (2010) analisaram a influência do grau de hidrólise (GH) nas propriedades funcionais, capacidade antioxidante, usando diferentes metodologias, e atividade iECA de hidrolisado (PPH) e isolado (PPI) proteico oriundos do amendoim. Os PPH foram preparados com Alcalase até atingir 10, 20, 30 e 40% de grau de hidrólise. Os melhores resultados encontrados para a solubilidade de PPI foram a um GH = 10%, principalmente na faixa de pH de 4 a 6. Ao aumentar o GH, tanto a capacidade antioxidante quanto a atividade iECA aumentaram, enquanto o poder redutor diminuiu, comprovando que o GH exerce uma influência significativa nas propriedades funcionais e nas atividades antioxidantes e ECA inibitória.

He *et al.* (2013) avaliaram o efeito anti-hipertensivo de hidrolisados proteicos de colza obtidos utilizando diferentes proteases. Os autores ainda investigaram a ação desses peptídeos *in vitro* e *in vivo*. As proteases utilizadas foram Alcalase, proteinase K, termolisina, Flavourzyme, e o pool enzimático pepsina + pancreatina. Os resultados mostraram que tanto a atividade *in vivo* quanto a *in vitro* são dependentes do processo de obtenção do hidrolisado i.e. tanto da protease utilizada, quanto do tamanho do peptídeo obtido. Dentre as proteases analisadas, a Alcalase e a Proteinase K foram as que obtiveram, *in vitro*, as maiores atividades antioxidante pelo método ORAC, inibidoras de ECA e Renina.

Klompong *et al.* (2007) concluíram que tanto o GH quanto o tipo de enzima utilizada são fatores significativos ao analisar propriedades funcionais e capacidade antioxidantes pelos métodos de poder redutor, DPPH e atividade quelante de ferro de hidrolisados proteicos obtidos enzimaticamente a partir de carne de peixe. As proteases utilizadas foram a Alcalase e a Flavourzyme. Nos hidrolisados obtidos com Alcalase, com o aumento do GH tanto a capacidade antioxidante quanto o poder redutor dos hidrolisados diminuíram; já nos obtidos com Flavourzyme, nenhuma diferença significativa nos resultados foi observada. Em um mesmo GH, os hidrolisados da Flavourzyme possuíam maior atividade quelante. Porém os resultados de capacidade antioxidante variavam de acordo com o GH. A GH = 5%, os hidrolisados de Alcalase eram superiores em capacidade antioxidante aos de Flavourzyme, por outro lado, a GH = 25% os de Flavourzyme alcançaram melhores resultados.

Liu *et al.* (2010) também estudaram a ação de diferentes GH com Alcalase na obtenção de hidrolisados proteicos de plasma sanguíneo suíno. As reações enzimáticas foram executadas até alcançar GH de 6,2%, 12,7% e 17,6%. Os hidrolisados proteicos obtiveram resultados superiores de capacidade antioxidante, ação quelante a poder redutor quando comparados à proteína contida no plasma sanguíneo suíno não hidrolisado. O aumento do GH foi favorável à capacidade antioxidante e à solubilidade proteica, porém diminui a hidrofobicidade superficial e suprimiu a capacidade emulsificante e de formação de espuma.

4.7 Peptídeos bioativos da soja e seus resíduos

Assim como diversos estudos vêm sendo realizados com peptídeos oriundos de diferentes alimentos, há também diversas linhas de pesquisa estudando benefícios de hidrolisados e peptídeos bioativos da soja.

A literatura relata que os peptídeos com bioatividades são oriundos de ambas as globulinas presentes na soja. Na Tabela 4.5, estão algumas sequências de peptídeos bioativos encontrados na literatura.

Tabela 4.5: Sequências de peptídeos bioativos oriundos de globulinas da soja.

	Proteína de	activos offantos de groodi	
Peptídeos	Peptídeos Origem Ativida		Ref.
VLILVP	Glicinina G2	iECA	Mallikarjun Gouda <i>et al.</i> (2006)
MITLAIPVNKPG MITLAIPVN MITL	β-CG (cadeia α')	Estimulante de fagocitose	
VIPAGVP LQSGDALRVPSGTTYY	β-CG (cadeia α)	Antioxidante	Fukushima (2011)
VNPHDHQN LVNPHDHQN LLPHH LLPHHADADY	β-CG (cadeia β)	Antioxidante	

Rayaprolu *et al* (2013) analisaram a ação antitumoral de peptídeos obtidos a partir do farelo residual da extração de óleo de soja. A enzima utilizada foi a Alcalase, a reação foi realizada em pH alcalino, obtendo-se peptídeos com resistência gastrointestinal. Após seu fracionamento por processo de separação por membranas (SMM), a viabilidade de tratamento com os peptídeos foram testados *in vitro* contra linhas de células humanas tumorais de fígado, pulmão e cólon. Os resultados se mostraram promissores com inibição de crescimento celular de 70%, 68% e 73%, respectivamente.

Há inúmeros estudos acerca da capacidade antioxidante de peptídeos obtidos por proteólise enzimática. Moure, Dominguez e Parajo (2006) usaram como matéria-prima o efluente líquido de uma planta espanhola de concentrados de soja extraídos com tampão ácido acético-acetato. Após sua recuperação por membranas de ultrafiltração (membranas com MMC de 10 kDa, 30 kDa e 50 kDa), a proteína solubilizada foi submetida à proteólise com Flavourzyme. A fração com massa molar menor que 10 kDa foi a que apresentou a maior capacidade antioxidante. Por outro lado, os hidrolisados obtiveram resultados superiores às frações originais em relação ao poder redutor, potência antioxidante em emulsão e capacidade antioxidante. Além disso, sua capacidade de inibição de branqueamento de carotenoides foi similar àquela de antioxidantes sintéticos, sendo um substituto promissor. Quando comparando os hidrolisados de diferentes pesos moleculares entre si, a fração com 30 kDa < MM < 50 kDa foi a que obteve a maior capacidade de sequestro de radicais, enquanto a fração com MM > 50 kDa a maior capacidade antioxidante Trolox equivalente (TEAC).

Visando à purificação e caracterização de hidrolisados proteicos de soja (SPH) obtidos por meio de hidrólise da proteína com Alcalase, Park *et al.* (2010) ainda mediram a

capacidade antioxidante e de inibição de oxidação lipídica dos hidrolisados obtidos. Ultrafiltração (UF) e métodos cromatográficos sequenciais foram utilizados para purificação peptídica. Como resultado, os autores observaram uma maior abundância de aminoácidos hidrofóbicos, com destaque para fenilalanina. Os peptídeos ativos responsáveis pela capacidade antioxidante eram em sua maioria peptídeos de baixa massa molar, com MM< 3 kDa, e compostos por aminoácidos hidrofóbicos, como por exemplo, fenilalanina, alanina e prolina. Devido à sua origem natural e segura, os autores consideram o uso dos SPH como ingredientes na formulação de alimentos funcionais.

O uso de peptídeos de soja como antioxidantes efetivos também foram estudados por Zhang, Li e Zhou (2010). Três enzimas comerciais – uma neutrase, uma validase e uma Alcalase obtidas de cepas fúngicas, foram usadas para hidrolisar um isolado proteico de soja. Os hidrolisados foram submetidos ao fracionamento por UF, originando 12 frações. A capacidade antioxidante foi medida por capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) e todas as frações obtiveram resultados positivos de capacidade antioxidante, variando de 23,8 a 83,8 mols Trolox equivalente por grama. Frações com alta capacidade antioxidante foram incorporadas às amostras de carne moída para avaliação de inibição de oxidação lipídica. As frações oriundas de Alcalase e Neutrase reduziram a peroxidação em 20,1% e 12,9%, respectivamente.

Além da capacidade antioxidante, peptídeos e hidrolisados proteicos obtidos a partir da soja e seus derivados ainda exercem outras atividades bioativas, como atividade anti-hipertensiva e hipo-adipogênica.

Chiang *et al.* (2006) visavam à otimização da hidrólise enzimática utilizando diferentes proteases e à obtenção de hidrolisados com atividade inibitória de ECA, propondo um processo de obtenção desses hidrolisados utilizando reatores de membranas. Dentre as enzimas (Alcalase, Flavourzyme, quimiotripsina, pepsina e tripsina) utilizadas para a hidrólise do isolado proteico de soja, a Alcalase foi a que obteve hidrolisados com maior atividade e, portanto, a enzima escolhida para otimização da reação enzimática, resultado esse obtido em razão enzima: substrato de 0,01, temperatura reacional de 50 °C, pH = 9,0 e tempo de reação de 6 horas. Nessas condições, o IC₅₀ diminui de 66,4 para 0,67 mg proteína·mL⁻¹. Membranas de UF com MMC de 1, 10 e 30 kDa foram usadas para purificação dos hidrolisados e resultaram em um aumento significativo da atividade inibitória. Baseados nos resultados obtidos para as produtividades nos sistema de reator em batelada e no de reator de membranas

contínuo, os autores sugeriram o reuso de enzimas como recurso para aumentar a produtividade neste. Os estudos de estabilidade realizados no reator de membranas contínuos (10 kDa) comprovaram a aplicabilidade do sistema, já que os permeados obtidos foram capazes de manter sua atividade inibitória abaixo de 0,09 mg proteina·mL⁻¹ por mais de oito horas. Ademais, testes in vitro simulando o trato gastrointestinal humano causaram apenas pequenas alterações nos peptídeos.

Hidrolisados obtidos com Neutrase (Tsou, Lin, *et al.*, 2010) e com Flavourzyme (Tsou *et al.*, 2012) a partir de um isolado proteico de soja foram testados em relação a sua atividade hipo-adipogênica. Em ambos os estudos, após a hidrólise enzimática, os hidrolisados foram submetidos a um fracionamento com membranas de UF com MMC de 1, 10 e 30 kDa. A hidrólise limitada em 2 horas com Flavourzyme, alcançando GH ≈ 8% e diminuindo a atividade adipogênica da 3-glicerol-fosfate desidrogenase (GPDH) para 477U. (mg proteína)⁻¹, se mostrou mais eficiente na supressão da adipogênese do que os isolados proteicos. No caso da hidrólise com neutrase, a hidrólise foi mais efetiva após 4 horas de reação, sendo capaz de suprimir a atividade adipogênica, alcançando GPDH = 280 U. (mg proteína)⁻¹, e reduzir a acumulação de lipídios em pré-adipócitos ainda durante a etapa de diferenciação celular. O fracionamento sequencial por membranas se mostrou, nos dois casos, uma forma de reduzir ainda mais a GPDH para 197 e 100 U. (mg proteína)⁻¹, respectivamente.

Outros estudos ainda reportaram outros benefícios do uso de hidrolisados proteicos de soja como, por exemplo, a sua habilidade de redução de gordura corporal *in vivo* em ratos (Aoyama *et al.*, 2000) e, sua capacidade de ligação com íons cálcio, aumentando a sua biodisponibilidade no organismo (Bao *et al.*, 2007).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

5.1.1 Matéria-prima

O farelo de soja foi gentilmente doado pela Caramuru Alimentos (Goiás) e, foi obtido a partir da extração do óleo de soja usando hexano como solvente. De acordo com o fornecedor, antes da extração do óleo, o grão de soja foi quebrado, laminado e extrusado, apresentando pelo menos 460 g.kg⁻¹ de proteína bruta e até 60g.kg⁻¹ de fibras brutas.

5.1.2 Reagentes químicos

Alcalase 2.4 U.g⁻¹, enzima conversora de Angiotensina (ECA), Captopril, N-[3-(2-furyl)acryloyl]-Phe-Gly-Gly (FAPGG), sal de 2,2- azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), Sal de 2,4,6-Tri-(2-Piridil)-1,3,5-Triazina (TPTZ) e L-ácido ascórbico foram comprados da *Sigma Chemical Co. Ltd.* (St. Louis, MO, EUA). 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox), persulfato de potássio (K₂S₂O₈) e cloreto de ferro (III) hexahidratado foram comprados da *Sigma–Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA). Todos reagentes eram de grau analítico.

5.2 Métodos Analíticos

5.2.1 Determinação da concentração proteica

A análise de proteínas totais se baseou no ensaio do ácido bicinconínico (BCA) como descrito por Smith *et al.* (1985). Brevemente, o reagente de trabalho foi preparado a partir da mistura do ácido bicinconínico (Sigma, UK) com sulfato de cobre (II) pentaidratado (Sigma, UK) na proporção 50:1 (V: V). A 0,1 mL de amostra foram adicionados 2 mL do reagente de trabalho e a reação ocorreu a 37 °C em banho-maria durante 30 minutos. A absorbância foi então medida em espectrofotômetro a 562 nm. Uma curva de calibração foi realizada usando albumina sérica bovina (ASB; Sigma, UK) como padrão (Figura 5.1). Todos os ensaios foram realizados pelo menos em triplicata e os resultados expressos em média ± desvio padrão, em mg proteína (PTN). mL⁻¹.

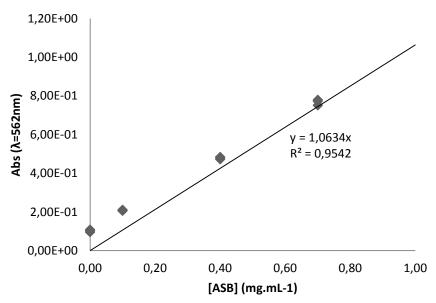


Figura 5.1: Curva padrão para a análise de proteínas totais pelo método BCA, usando ASB como padrão.

5.2.2 Determinação do grau de hidrólise (GH)

Duas metodologias foram utilizadas para o cálculo do grau de hidrólise (GH). A primeira baseada na metodologia descrita por Tsumura *et al.* (1999), na qual, primeiramente, preparou-se uma solução 0,44 M ácido tricloroacético (TCA) em água. Em seguida essa solução foi misturada numa proporção 1:1 (V: V) com as amostras a serem analisadas. Após 30 minutos em repouso em temperatura ambiente, foram centrifugadas a 8.000Xg durante 5 minutos. A centrifugação teve como objetivo separar as proteínas não hidrolisadas, que deveriam precipitar, das hidrolisadas, que permaneceram no sobrenadante. Mediu-se então proteínas totais pelo método BCA do sobrenadante. O GH então foi calculado pelo quociente do resultado de BCA do sobrenadante pelo resultado de BCA das amostras não diluídas com o TCA.

O grau de hidrólise também foi calculado comparando-se o teor de proteínas totais das diferentes fases da ultrafiltração, como exposto na Equação 5.8.

$$GH = \frac{BCA_{permeado}}{BCA_{retido} + BCA_{permeado}} \times 100\% \quad [5.8]$$

5.2.3 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante foi analisada baseada em dois métodos analíticos de transferência de elétrons: o método ABTS expresso em *Trolox Equivalent Antioxidant*

Capacity (TEAC) e o método Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) expresso em ácido ascórbico equivalente (AAE).

5.2.3.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS expresso em *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC)

O método ABTS expresso em TEAC é baseado na metodologia descrita por Re *et al.* (1999), uma reação colorimétrica de oxirredução que utiliza como reagentes o radical 2,29-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•⁺) e o tampão fosfato salino (*PBS – Phosphate Buffered Saline*, pH=7,4), com algumas modificações.

O radical ABTS⁺• é obtido pela reação de 5 mL de ABTS 7 mM com 88 μ L de persulfato 140 mM de potássio ($K_2S_2O_8$) mantida no escuro e a temperatura ambiente durante pelo menos 16 horas. O radical ABTS⁺• foi então dissolvido em PBS até que uma absorbância em espectrofotômetro de $0,700 \pm 0,020$ fosse obtida a $\lambda = 734$ nm, essa mistura foi então usada como reagente de trabalho. A reação para quantificação da capacidade antioxidante acontece da seguinte maneira: a 20 μ L da amostra foram adicionados 2 mL do reagente de trabalho, e após 6 minutos no escuro, a absorbância dessa mistura é lida em espectrofotômetro a 734 nm. A curva de calibração foi realizada usando Trolox como padrão (Figura 5.2).

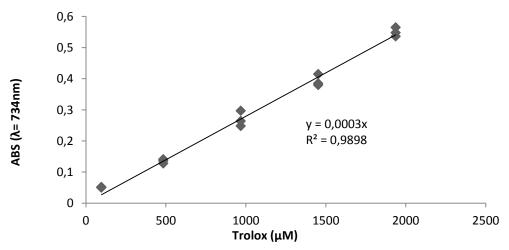


Figura 5.2: Curva padrão da análise ABTS, usando Trolox como padrão.

Para sua construção, eram elaboradas soluções com concentrações de 100; 500; 1000; 1500 e 2000 μM Trolox em tampão PBS, as quais ao reagirem com a solução de ABTS⁺ (na proporção de 1:100) durante 6 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, promoviam um decréscimo na absorbância da solução, lida a 734 nm, por restaurar parte do ABTS⁺• em ABTS. O branco era lido com tampão PBS na mesma proporção. Todos os

ensaios foram realizados pelo menos em triplicata, apresentados em média ± desvio padrão e foram expressos em mmol Trolox Equivalente (TE).(g PTN)⁻¹.

5.2.3.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método *Ferric Reducing Antioxidant*Power (FRAP) expresso em ácido ascórbico equivalente (AAE)

O FRAP foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Benzie e Strain (1996). Nessa metodologia, a substância oxidante utilizada é um sal férrico (Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃), obtido a partir da mistura de 2,5 mL TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) com 2,5 mL de cloreto férrico e 25 mL de tampão acetato, que será então denominado reagente FRAP. Para minimizar o tempo total de quantificação, a metodologia foi modificada de modo a possibilitar o uso de um leitor de microplacas. Foram adicionados 300 μL do reagente FRAP a 10 μL de amostra e a absorbância foi lida a 595 nm. Uma curva de calibração foi obtida usando ácido ascórbico, um potente redutor, como padrão (Figura 5.3).

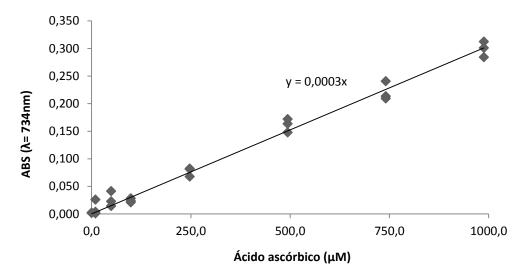


Figura 5.3: Curva padrão para a análise FRAP, usando ácido ascórbico como padrão.

Para a construção da curva de calibração foram elaboradas soluções com concentrações de 10; 50; 100; 250; 500; 750 e 1000 μ M ácido ascórbico em água, que quando em contato com o complexo Fe(III)TPTZ, o reduzia a Fe(II)TPTZ, um complexo de cor azulada, quantificado por absorbância. Todos os ensaios foram realizados pelo menos em triplicata, apresentados em média \pm desvio padrão e foram expressos em mmol ácido ascórbico equivalente (AAE).(g PTN)⁻¹.

5.2.4 Determinação da capacidade inibitória da enzima conversora de Angiotensina-I (iECA)

A atividade anti-hipertensiva se baseou na atividade inibitória de enzima conversora de angiotensina-I (ECA) *in vitro*. O ensaio foi baseado na metodologia descrita por Ben Henda *et al.*(2013), modificada para possibilitar o uso de leitor de microplacas, como descrito a seguir.

Nesse ensaio, Captopril foi usado como inibidor padrão e N-[3-(2-furyl)acryloyl]-Phe-Gly-Gly (FAPGG) como substrato para ECA. Após incubar todos os reagentes a 37 °C por 5 minutos, a 150 μ L de 0,88 mM FAPGG foram adicionados 250 mU ECA e 10 μ L da amostra ou padrão e a cinética da reação foi avaliada pela leitura de sua absorbância a 340 nm no leitor de microplacas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, os resultados foram expressos pela razão de eficiência inibitória, que foi calculada dividindo-se a atividade ECA inibitória (iECA%) pela concentração proteica da amostra. O cálculo da iECA% está apresentado na Equação 5.9 na qual ρ A_{inibidor} e ρ A_{controle} são os coeficientes angulares das retas obtidas plotando-se as absorbâncias das amostras em função do tempo com e sem proteína, respectivamente (Figura 5.4).

$$iECA\% = \left(1 - \frac{\rho A_{inibidor}}{\rho A_{controle}}\right) \times 100\%$$
 [5.9]

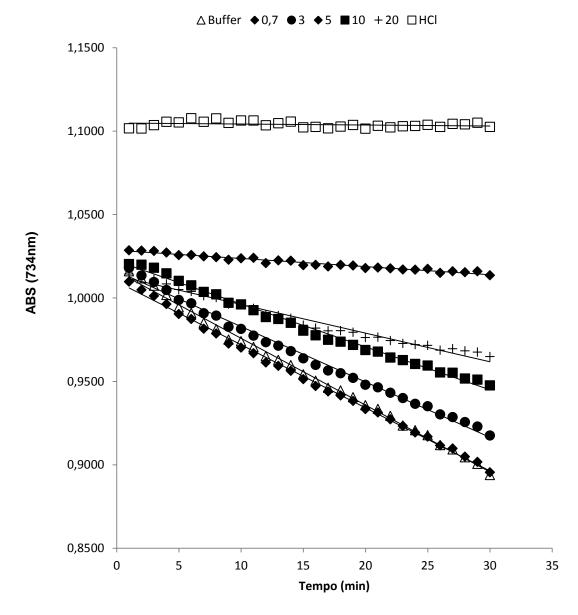


Figura 5.4: Curvas padrão para a análise iECA usando Captopril como inibidor padrão.

Os resultados de iECA% são referentes às amostras diluídas 25 vezes em tampão Trizma-HCl (pH=8,5). Portanto, utilizar os resultados reportados em termos da razão da eficiência inibitória (*efficiency inhibitory ratio*, IER) é uma melhor abordagem, já que se baseia na concentração de proteína quantificada analiticamente, como exposto na Equação 5.10, abaixo.

$$IER = \frac{iECA\%}{BCA_{amostra}} \quad [5.10]$$

Todos os ensaios foram realizados pelo menos em triplicata, apresentados em média ± desvio padrão e foram expressos em iECA%.(mg PTN)⁻¹.

Optou-se por realizar esse ensaio apenas durante o planejamento experimental 2³ e durante o processo integrado EHSP, devido ao alto custo da enzima.

5.2.5 Caracterização por eletroforese bidimensional

A eletroforese em gel foi realizada em duplicata com a fração G_IPS7. O procedimento experimental seguiu o protocolo indicado pelo Handbook do fornecedor (Berkelman *et al.*, 2002) e também pelas instruções que acompanham o *Immobiline*® *DryStrip Kit* para eletroforese bidimensional da *Pharmacia Biotech AB* (Suécia).

A eletroforese foi realizada em aparelho *Multiphor II Electrophoresis System* da *GE Healthcare*, composto por três equipamentos principais: a unidade propriamente dita de eletroforese *Multiphor Electrophpresis Unit*, um termostato *MultiTemp III* e a fonte de energia *EPS 2501 XL*, todos da *GE Healthcare*, em um tempo total de 3 dias.

No primeiro dia, ocorreu a reidratação das *Immobiline*® *DryStrip* com uma solução de reidratação composta por ureia 8 M, CHAPS 2%, tampão IPG 2%, solução de azul de bromofenol e água duplamente destilada. Esse processo foi feito de um dia para o outro.

No segundo dia, ocorreu o preparo das amostras. As proteínas foram solubilizadas usando-se a solução de reidratação, juntamente ao reagente *DeStreak*, em uma proporção de 100 μL amostra: 394 μL solução reidratação: 6 μL *DeStreak*. Esse último reagente foi utilizado para eliminar possíveis imperfeições decorrentes de reoxidação das proteínas, que ocorre em pHs acima de 7,0. O primeiro gel foi carregado com 0,02 g.L⁻¹ de proteína, enquanto o segundo com 4x10⁻⁴ g.L⁻¹. A primeira etapa após a solubilização proteica foi a focagem isoelétrica, na qual ocorre a separação das proteínas de acordo com seus diferentes pontos isoelétricos (pI). Essa etapa foi realizada a 20 °C, temperatura controlada pelo *MultiTemp III* do sistema de eletroforese. A *Immobiline DryStrip* foi alinhada no alinhador de tiras e as amostras foram adicionadas em seguida. A primeira corrida da eletroforese então ocorreu em quatro fases em um total de 7 horas e 50 minutos, como descritas na Tabela 5.1. Após essa corrida, as tiras de eletroforese foram congeladas a -80 °C para que a segunda etapa da eletroforese pudesse ser realizada no dia seguinte.

Tabela 5.1: Programa para focagem isoelétrica para Immobiline DryStrip pH 3-10NL 180mm

	Voltagem	mA	W	Tempo (h)	Vh
1	500	1	5	0:01	1
2	500	1	5	1:30	2500
3	3500	1	5	4:50-6:20	10000
4	3500	1	5	6:20-7:50	32400

No terceiro dia, foi realizada a eletroforese em gel de dodecil sulfato sódico (SDS)-poliacrilamida (SDS-PAGE), que tem como objetivo separar as proteínas de acordo com a sua massa molar. Primeiramente, as tiras resultantes da primeira corrida foram equilibradas usando duas soluções diferentes por 15 minutos cada. A primeira solução era composta por Tris-HCl (pH 8,8) 75 mM, ureia 6 M, glicerol 30%, ditiotreitol (DTT, um composto redutor), SDS e azul de bromofenol; a segunda tinha os mesmos componentes, porém o DTT foi substituído por iodoacetamida, que evita a reoxidação das proteínas durante a segunda corrida. A segunda corrida ocorreu a 12 °C. O gel, as tiras anódicas e catódicas de tampão SDS, a tira reidratada da primeira corrida e os marcadores de massa molar foram posicionados na placa refrigerada do *Multiphor II*. A segunda corrida ocorreu em dois passos, como descrito na Tabela 5.2. Entre os dois passos, os eletrodos foram removidos.

Tabela 5.2: Condições eletroforéticas para géis *ExcelGel*.

Fase	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Força (W)	Duração (h:min)
1	120	20	30	0:40
2	600	50	30	1:10

Uma alternativa utilizada para se obter um gel melhor definido, sem a aparição de manchas amareladas decorrente da presença de solução de reidratação após o termino da corrida, foi manter o aparelho eletroforético ligado por mais dez minutos após o término da segunda corrida. Isso garantiu que toda a solução já tivesse saído completamente do gel na hora de colori-lo.

A última etapa, realizada após o término da segunda corrida, foi a coloração com nitrato de prata com o kit *PlusOne Silver Staining* da *GE Healthcare* (UK). O procedimento foi realizado conforme instruções do manual do fabricante em sete etapas. Na primeira etapa ocorre a fixação com uma solução 40% etanol em água e ácido acético; em seguida ocorre a sensibilização do gel que é feito com uma solução de glutaraldeído, etanol, tiossulfato de sódio, acetato de sódio em água; a terceira etapa é a adição da solução de prata (0,25% nitrato de prata em água) seguida de seu desenvolvimento e interrupção. Ao final, o gel é lavado com água destilada diversas vezes e a sétima e última etapa é a preservação do gel em plástico, usando glicerol. Por fim, o gel é seco no filme plástico e está pronto para ser analisado.

5.2.6 Caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As globulinas da soja foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (CLAE-FR) de acordo com o método descrito por Garcia *et al.* (1997) com algumas modificações para otimizar a separação, como descrito a seguir. Os parâmetros analisados para otimização foram temperatura, gradiente e volume de injeção. Todas as frações obtidas por peneiramento, antes da trituração, foram analisadas (G_IPS1 a G_IPS6).

Uma coluna ACE5 C18, 250 x 4,60 mm, 5 mm, 100 Å (*Advanced Chromatography Technologies*, Aberdeen, Escócia) foi usada em um sistema de HPLC Dionex composto por um injetor de amostras automático do tipo ASI-100T, um detector de matrizes de fotodiodo, PDA-100 e um computador com o software de sistema de dados *Chromeleon v. 6.8 Sunnyvale* (todos da *Dionex Softron GmbH*, Munique, Alemanha). Uma amostra de 50 μL foi injetada no sistema e as proteínas foram detectadas por absorção em ultravioleta a 254 nm.

A fase móvel fraca A era constituída por 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) em água e a fase móvel forte B de 0,1% TFA em acetonitrila (ACN). Uma vazão de 1 mL.min⁻¹ a 50 °C e um gradiente linear de cinco etapas foi usado: 5 a 20% B; 20 a 25% B e 25 a 35% por 10 minutos cada, seguido por um aumento rápido de 35 a 46% B em 30 segundos e um gradiente linear reverso de 46 a 5% B em 30 segundos para reequilibrar a coluna nas condições iniciais (Figura 5.5).

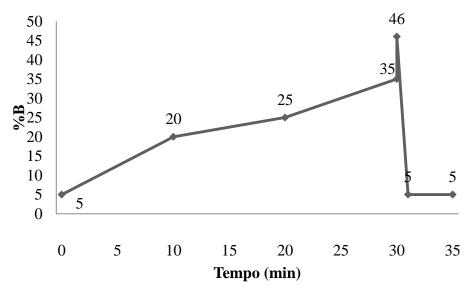


Figura 5.5: Gradiente binário em 5 etapas.

As globulinas principais da soja, a β-conglicinina e a glicinina, foram injetadas na concentração de 1 mg. mL⁻¹ como padrões cromatográficos.

5.3 Procedimento Experimental

5.3.1 Testes preliminares

O isolamento das proteínas da soja foi realizado conforme metodologia descrita por Cui *et al.* (2013) com algumas modificações. O esquema apresentado na Figura 5.6 ilustra esse processo, tendo como produto final o Isolado Proteico de Soja (IPS).

Inicialmente, o farelo de soja (FS) passou por uma etapa de solubilização de proteínas. Para tanto, sob agitação magnética, e, à temperatura ambiente, o farelo foi misturado à água durante duas horas. Os testes preliminares foram realizados nas proporções de 1:10 e 1:15 FS: água (m: V). O pH da mistura foi ajustado com NaOH 2N até atingir pH = 8,5, no qual houve uma precipitação de carboidratos da soja, em sua maioria fibras insolúveis.

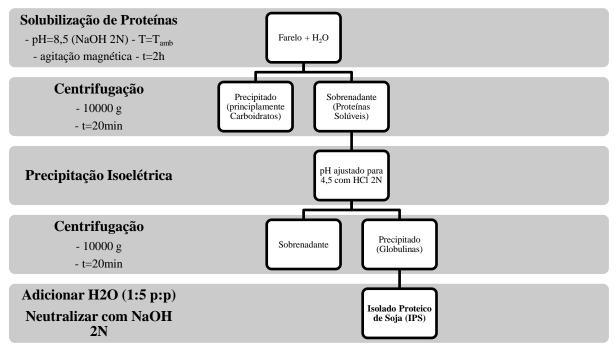


Figura 5.6: Fluxograma simplificado de obtenção de isolados proteicos

Os carboidratos foram separados por centrifugação a 10.000Xg durante 20 minutos. O sobrenadante, no qual as proteínas se encontravam solubilizadas, foi separado e seu pH ajustado a 4,5 com HCl 2N, para promover a precipitação isoelétrica das globulinas.

Uma nova etapa de centrifugação foi realizada, obtendo-se, no sobrenadante, proteínas de menor interesse e um precipitado contendo as globulinas de interesse.

O IPS foi então obtido ao ressolubilizar as globulinas precipitadas em água (1:5). Em seguida, o pH foi neutralizado com NaOH 2N para possibilitar e facilitar a solubilização

proteica. Os IPS passaram por quantificação de proteína por meio de ensaio de BCA e foram mantidos em potes, devidamente identificados, em freezer (T = -20 °C) até o dia de suas análises.

5.3.1.1 Análise de Tamanho de Partícula

O farelo de soja foi classificado granulometricamente por peneiramento manual, separando-se o sólido granular em frações uniformes usando-se peneiras 6, 10, 12, 16 e 28 Mesh da série Tyler (Figura 5.7). As frações obtidas, portanto, estavam nas faixas de tamanho maiores que 2,80 mm (G_IPS1); entre 2,80 e 1,68 mm (G_IPS2); entre 1,68 e 1,40 mm (G_IPS3); entre 1,40 e 1,00 mm (G_IPS4); entre 1,00 e 0,60 mm (G_IPS5); e, menores que 0,60 mm (G_IPS6).



Figura 5.7: Peneiras usadas na análise granulométrica (6-25#).

O diâmetro médio de Sauter (d_s) foi calculado baseado na equação 5.1, abaixo:

$$d_s = \frac{1}{\sum_i \frac{x_i}{d_i^-}} \quad [5.1]$$

Os resultados da análise granulométrica foram ajustados a diferentes modelos de distribuição de partículas. Foram testados os modelos Gates-Gaudin-Schumann (GGS), Rosin-Ramler-Bennet (RRB) e o modelo Sigmóide, que descrevem satisfatoriamente a maioria dos casos de interesse tecnológico (Stenzel *et al.*, 2009).

O modelo GGS é descrito pela equação 5.2 (Schumann, 1940), na qual y é a fração acumulada, d_i^- é o diâmetro da partícula (mm), k e m são parâmetros do modelo GGS,

correspondendo ao maior tamanho de partícula presente na amostra (mm) e sendo um parâmetro adimensional sem significado estatístico, respectivamente.

$$y = \left(\frac{d_i^-}{k}\right)^m \quad [5.2]$$

O modelo RRB é descrito de acordo a equação 5.3 (Rosin e Rammler, 1933), na qual y é a fração acumulada, d_i é o diâmetro da partícula (mm), d' e n são parâmetros do modelo RRB, correspondendo a um diâmetro de partícula tal que 63,2% da massa da amostra referem-se a partículas menores que d' (mm) e sendo um parâmetro adimensional sem significado estatístico, respectivamente.

$$y = 1 - e^{-\left(\frac{d_i^-}{d'}\right)^n}$$
 [5.3]

O modelo Sigmóide é descrito de acordo com a equação 5.4, na qual

$$y = \frac{1}{1 + \left(\frac{k}{d_i}\right)^m} \quad [5.4]$$

 $\label{eq:continuous_problem} \text{na qual:} \quad \begin{cases} y - \text{Fração acumulada;} \\ d_i^- - \text{diâmetro da partícula;} \\ m - \text{parâmetro do modelo Sigmóide;} \\ k - \text{parâmetro do modelo Sigmóide.} \end{cases}$

Os parâmetros dos diferentes modelos de distribuição de partícula foram determinados graficamente, linearizando-se as equações 5.1, 5.2 e 5.3 que resultaram nas equações 5.5 a 5.7, respectivamente:

$$\ln y = m \ln d_{i}^{-} - m \ln k$$
 [5.5]

$$\ln \left(\ln \left(\frac{1}{1 - y} \right) \right) = n \ln d_{i}^{-} - n \ln d'$$
 [5.6]

$$\ln \left(\frac{1}{y} - 1 \right) = -m \ln d_{i}^{-} + m \ln k$$
 [5.7]

Cada uma das frações foi submetida ao processo de extração proteica como descrito na seção 5.3.1 e posterior quantificação proteica pelo ensaio de BCA.

5.3.2 Seleção dos parâmetros operacionais na etapa de hidrólise

Optou-se por escolher a faixa de temperatura na qual há atividade enzimática, ou seja, entre 45 °C e 65 °C, sendo 60 °C a temperatura ótima da Alcalase.

Como dito anteriormente, o pH ótimo da Alcalase, no qual as proteínas são solúveis, é 8,5. Tanto na extração de proteínas quanto na hidrólise enzimática foi, então, utilizado tampão Trizma-HCl 0,05M (pH = 8,5) para manter o pH constante, evitando a necessidade de controle adicional e ajustes de pH durante o processo. O tampão foi obtido misturando 2,21g Trizma-HCl com 4,36g Trizma-base em 1L de água, como indicado pelo fornecedor.

Os outros fatores analisados foram concentração enzimática e razão FS: tampão. A escolha destes parâmetros foi baseada nos processos de obtenção de peptídeos bioativos reportados na literatura. A razão FS: tampão variou de 5 a 15 mg.mL⁻¹. Com objetivo de analisar a propriedade funcional e estrutural dos peptídeos obtidos, Cui *et al.* (2013) usaram 10 mg.mL⁻¹, mesma razão usada por Park *et al.* (2010) na análise da capacidade antioxidante, por XiangZhen *et al.* (2008) na da atividade imunomodulatória e por Mallikarjun Gouda *et al.* (2006) na da atividade antihipertensiva. Já Chen, Zhao e Sun (2013) usaram uma razão de 15 mg.mL⁻¹ para analisar a capacidade antioxidante e, Lo e Li-Chan (2005) 5 mg.mL⁻¹ para análise de capacidade antihipertensiva.

Para minimizar a influência da composição diferenciada das frações e aumentar o rendimento da extração, o farelo de soja foi homogeneizado e em seguida triturado e passado em peneira de 60 Mesh, de modo que as partículas tivessem $d_p \leq 250~\mu m$, obtendo assim as frações 7 (600 $\mu m \leq d_p \leq$. 250 μm) e 8 ($d_p \leq 250~\mu m$) (Figura 5.8). A escolha de abertura da peneira teve por base maximizar a área superficial das partículas, aumentando consequentemente o rendimento da extração, evitando a reclassificação do farelo de soja em farinha de soja, tendo esta a característica de que 97% de suas partículas devem passar por peneiras Tyler #100 ($d_p = 150~\mu m$), #150 ($d_p = 106~\mu m$), #200 ($d_p = 75~\mu m$) ou #325 ($d_p = 45\mu m$) (Lusas e Riaz, 1995; Garcia *et al.*, 1997).

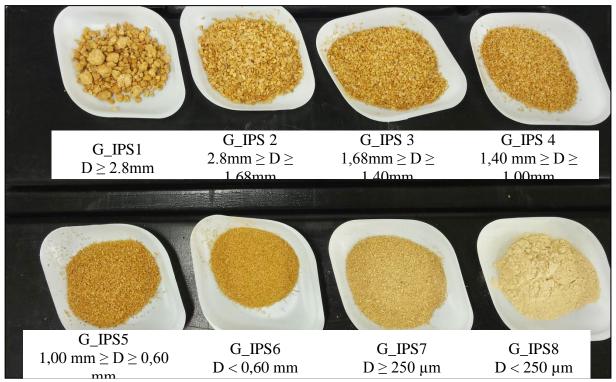


Figura 5.8: Amostra das diferentes frações obtidas após peneiramento. As frações 7 e 8 foram obtidas após moagem do farelo homogeneizado, sendo as frações G_IPS7 aquela retida na peneira #60 e a G_IPS8 a que passa pela mesma peneira.

5.3.3 Cinética da hidrólise enzimática

A análise da cinética da hidrólise enzimática foi baseada na resposta da capacidade antioxidante dos hidrolisados obtidos após 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de hidrólise com Alcalase. O teste foi realizado usando a amostra G_IPS5 (12,61 mg PTN.mL⁻¹), filtrado previamente com uma seringa acoplada a um filtro com 0,20 μm de tamanho de poro. A amostra também foi diluída dez vezes em tampão Trizma-HCl (pH = 8,5), obtendo-se então uma concentração proteica final de 1,261 mg PTN.mL⁻¹.

A hidrólise foi realizada em triplicata. Foram usados 18 potes de amostra com capacidade de 7 mL, de modo que fosse possível retirar a cada ponto temporal os 3 vidros correspondentes às triplicatas. Com isso foi possível garantir a homogeneidade das condições de hidrólise em todos os diferentes potes reacionais, já que a retirada de potes de amostra não altera o ambiente reacional nos outros potes. Cada um dos potes reacionais possuía a mistura de 4,7 mL de amostra diluída com 0,05 mL da Alcalase, atingindo assim 0,02 mU.(mg PTN)¹. A hidrólise ocorreu em banho aquecido a 60 °C com 200 oscilações lineares por minuto. Após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de hidrólise, os tubos correspondentes à triplicata da reação foram separados e imersos durante 5 minutos em banho fervente a 100 °C para interromper a hidrólise enzimática.

Para separar os hidrolisados proteicos de menor massa molar, um dispositivo centrífugo dotado de uma membrana de ultrafiltração de polietersulfona com MMC = 10 kDa, *Vivaspin 20 (Sartorius Stedim UK Limited*, Inglaterra) foi utilizado. A massa molar de corte de 10 kDa foi escolhida, já que os peptídeos bioativos da soja tem massa molar inferior a 10 kDa, como visto na seção 4.7. A mistura reacional foi centrifugada por 16 minutos a 3.000 RMM. O permeado e o retido foram adequadamente armazenados em potes de amostra devidamente identificados em congelador a -20 °C até o dia da análise. As amostras da cinética foram analisadas quanto a proteínas totais (BCA), grau de hidrólise (GH) e capacidade antioxidante (FRAP e ABTS).

5.3.4 Influência das condições de hidrólise enzimática nos peptídeos bioativos obtidos

Um planejamento experimental com dois níveis, três fatores e com triplicata no ponto central foi executado para analisar a influência dos diferentes fatores na hidrólise enzimática do isolado proteico de soja, usando a enzima Alcalase. Os fatores analisados foram a razão FS: tampão (5,0 a 15,0 g.L⁻¹), a concentração enzimática (1 a 3 mU. (100 mg PTN)⁻¹) e a temperatura (45 a 65 °C). A matriz experimental descrevendo as diferentes condições reacionais dos pontos fatoriais está ilustrada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Matriz do planejamento experimental 2³ com triplicata no ponto central da hidrólise do isolado proteico de soja.

Ensaio	FS: Tam (mg.mL		E (mU.mg ⁻¹]	PTN)	Temperatura (°C)	
	Codificado	Real	Codificado	Real	Codificado	Real
1	-1	5	-1	0,01	-1	45
2	-1	5	-1	0,01	+1	65
3	-1	5	+1	0,03	-1	45
4	-1	5	+1	0,03	+1	65
5	+1	15	-1	0,01	-1	45
6	+1	15	-1	0,01	+1	65
7	+1	15	+1	0,03	-1	45
8	+1	15	+1	0,03	+1	65
9 (C)	0	10	0	0,02	0	55
10 (C)	0	10	0	0,02	0	55
11 (C)	0	10	0	0,02	0	55

(C) – Ponto central, FS – Farelo de Soja; Tampão Tris; E – Concentração Enzimática

A hidrólise foi realizada em Erlenmeyers imersos em um banho com agitação orbital com 61 oscilações por minuto, obedecendo às temperaturas dos diferentes ensaios, durante duas horas. Para inativar a enzima, após as duas horas de hidrólise, os Erlenmeyers foram retirados do banho e imediatamente submersos em um banho fervente a 100 °C por 5 minutos.

Novamente, para separar os hidrolisados proteicos de menor massa molar, os dispositivos *Vivaspin 20* (MMC = 10k Da) foram usados. A mistura reacional foi transferida para os dispositivos e então centrifugada por 16 minutos a 3.000 RMM. O permeado e retido foram adequadamente armazenados em potes de amostra devidamente nomeados em congelador a -20°C até o dia da análise. As amostras tanto do retido, na qual se encontravam as proteínas e hidrolisados de maior massa molar; assim como do permeado, na qual foram separados os peptídeos com potencial bioativo, foram então analisadas quanto ao teor de proteínas totais (BCA), GH e, capacidade antioxidante (FRAP e ABTS) e atividade antihipertensiva (iECA).

5.3.5 Processo integrado de extração e hidrólise simultânea de proteínas (EHSP)

As condições empregadas na hidrólise do processo EHSP foram baseadas na tendência observada nos resultados do planejamento experimental. Nesse processo, a extração proteica do farelo de soja ocorreu simultaneamente à hidrólise enzimática. O fluxograma simplificado do processo está ilustrado na Figura 5.9.

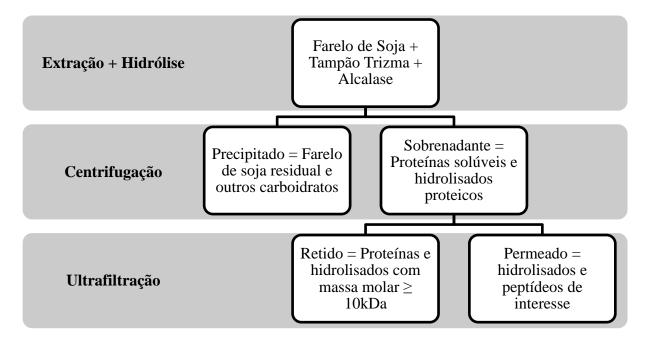


Figura 5.9: Fluxograma simplificado do processo EHSP, no qual ocorrem simultaneamente a extração proteica e a hidrólise enzimática. A etapa de centrifugação tem como objetivo a separação de fibras e outras matérias insolúveis, enquanto a ultrafiltração separa os peptídeos e hidrolisados de interesse.

Ao farelo de soja foi adicionado tampão Tris-HCl em uma razão 5mg FS.(mL tampão Trizma)⁻¹. A Alcalase foi adicionada à mistura até que se alcançasse 0,01 mU. mg PTN⁻¹. O teor proteico foi baseado no resultado de BCA do ponto fatorial do planejamento

experimental correspondente à condição aplicada. O processo EHSP foi realizado a 45 °C durante 3,5 horas. Para inativar a Alcalase, a mistura foi imediatamente submersa em banho fervente a 100 °C durante 5 minutos. Em sequencia, para separar as fibras e outras matérias insolúveis, a mistura reacional foi transferida para tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 10.000Xg durante 20 minutos. O sobrenadante foi então transferido para os dispositivos *Vivaspin 20* (MMC = 10 kDa) para separar na corrente do permeado os peptídeos e hidrolisados com potencial bioativo. Todas as frações foram armazenadas em potes de amostra devidamente identificados em freezer a -20 °C até o dia da sua análise. Ambas as frações foram analisadas quanto a proteínas totais (BCA), GH e capacidade antioxidante (FRAP e ABTS). Para análise da reprodutibilidade, o processo EHSP foi realizado em triplicata.

5.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SPSS 21.0 da IBM (EUA). Todos os ensaios foram conduzidos no mínimo em triplicata e analisados por análise de variância unilateral (ANOVA). As médias foram comparadas entre si usando teste de Tukey e diferenças significativas foram aceitas a p < 0.05, sendo os resultados apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

O planejamento experimental foi analisado usando o software *portable Statistica 8.0* (*Statsoft*, EUA) pela metodologia de superfície de resposta.

O coeficiente de variação (CV), definido como o desvio-padrão em porcentagem da média, é uma das medidas estatísticas mais utilizadas em análises laboratoriais para avaliar a precisão dos experimentos realizados. Neste trabalho foi utilizado CV abaixo de 10% para confirmar esta precisão.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Testes Preliminares

Na Figura 6.1 está ilustrada a primeira etapa de solubilização das proteínas totais da soja. Os Erlenmeyers à esquerda e à direita na Figura 6.1(a) ilustram os testes realizados com 10 mg FS.mL⁻¹ água e com 15 mg FS.mL⁻¹ água, respectivamente. Na Figura 6.1(b), é possível visualizar a agitação magnética da mistura e na Figura 6.1(c), os resíduos dessa extração, contendo no sobrenadante II as proteínas de menor interesse e no precipitado I as fibras insolúveis da primeira etapa de extração.

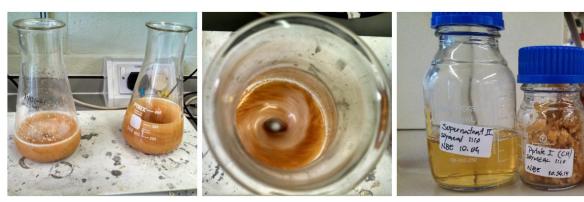


Figura 6.1: (a) e (b) Primeira etapa de solubilização das proteínas totais da soja sob agitação magnética; (c) Resíduos do isolamento de proteínas, à esquerda proteínas de menor interesse dissolvidas no sobrenadante II e à direita fibras insolúveis.

Na Tabela 6.1 apresentam-se os resultados dos testes preliminares em rendimento de IPS e em concentração de proteína total. Apesar do rendimento em proteínas do ensaio com 10 mg FS. mL⁻¹ de água ser maior, a quantificação pelo método BCA indicou que o ensaio com 15 mg FS.mL⁻¹ água obteve a melhor resposta em teor de proteína.

Tabela 6.1: Resultado dos testes preliminares em rendimento de isolado proteico de soja (IPS) e em proteína total avaliada pelo método BCA.

Razão FS: água (mg.mL ⁻¹)	Rendimento (mg IPS: g ⁻¹ FS)	Volume (mL)	[PTN] no extrato (mg.mL ⁻¹)*
10	149,70	11,2	$23,81 \pm 0,33^{b}$
15	87,17	6,52	$29,63 \pm 0,72^{a}$

^{*} Letras diferentes apresentam valores estatisticamente diferentes (p < 0.05).

FS – Farelo de Soja; IPS – Isolado Proteico de Soja; [PTN] – concentração de proteína

Baseado nesses resultados foi possível constatar que o processo de extração de proteína a partir do farelo de soja desengordurado é tecnicamente viável. O melhor rendimento encontrado foi aproximadamente 22% inferior ao encontrado por Zhao *et al.* (2007) apud Wang *et al.* (2014) de 183,16 mg IPS.(g FS)⁻¹.

6.2 Análise granulométrica

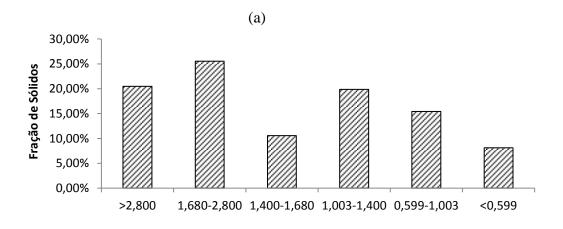
Os resultados da análise granulométrica estão expostos na Tabela 6.2.

Tabela 6.2: Resultado da análise granulométrica por peneiramento do farelo de	soja	l
---	------	---

Mesh	d _i ⁺ (mm)	d _i (mm)	<d>(mm)</d>	Massa (g)	$\mathbf{X_{i}}$	Y
-6 +10	1,680	2,800	2,240	1854,040	27,420%	79,970%
-10+12	1,400	1,680	1,540	677,340	10,020%	52,550%
-12+16	1,003	1,400	1,202	1304,870	19,300%	42,540%
-16+25	0,599	1,003	0,801	1049,270	15,520%	23,240%
-25	0,000	0,599	0,300	522,340	7,720%	7,720%

 $d_i^+ \text{- diâmetro mínimo; } d_i^- \text{-diâmetro máximo, } < d > \text{- diâmetro médio, } X_i - \text{fração acumulada de partículas com } D < d_i^-, y - \text{fração acumulada.}$

Os dados obtidos foram plotados em histograma de frequência e uma curva de distribuição de tamanho foi obtida, na qual a fração acumulada é plotada em função do tamanho da abertura da peneira (Figura 6.2).



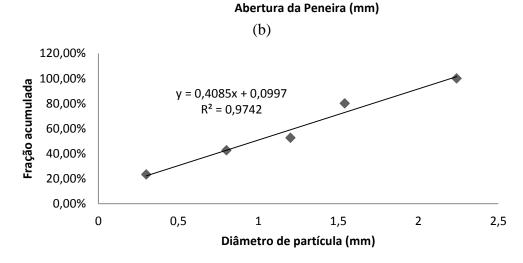


Figura 6.2: (a) Histograma de frequência; (b) Curva de distribuição de tamanho.

Tanto o histograma de frequência quanto a curva de distribuição de tamanho indicam que partículas com diâmetro maior do que 1,40 mm correspondem a aproximadamente 50% da amostra. Esse fato pode ser justificado pela quebra e laminação dos grãos de soja, antes da extração do óleo, para aumentar a superfície de contato com o solvente e por consequência a eficiência da extração do óleo de soja. Desse modo, por mais fina que seja a partícula, ela ficará impossibilitada de atravessar a peneira de menor abertura.

Resultado similar foi observado por Stenzel $et\ al.$ (2009), que analisou a influência do tamanho da partícula na hidrólise enzimática do farelo de soja e obteve diâmetro médio de Sauter (d_s) de 1,15 mm baseado no modelo GGS, valor 65% menor que o encontrado nesse trabalho, d_s = 1,73 mm. Isso pode ter ocorrido durante a etapa de laminação para extração do óleo. Por ter sido previamente quebrado, parte dos grãos de soja não foi laminada adequadamente, mantendo um diâmetro de partícula maior, como pode ser observado na Figura 6.3.



Figura 6.3: Sacola de Amostragem com as diferentes frações após peneiramento.

Os parâmetros dos modelos utilizados para a análise granulométrica foram determinados graficamente (Figura 6.4 a Figura 6.6).

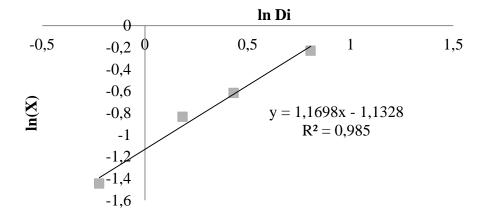


Figura 6.4: Análise gráfica para determinação dos parâmetros do modelo Gates-Gaudin-Schumann

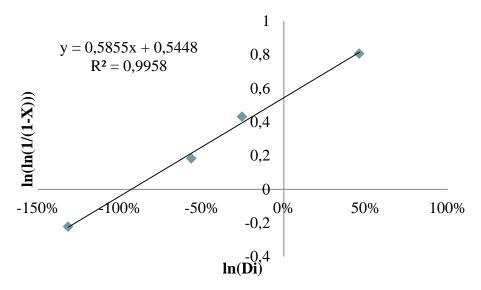


Figura 6.5: Análise gráfica para determinação dos parâmetros do modelo Rosin-Ramler-Bennet

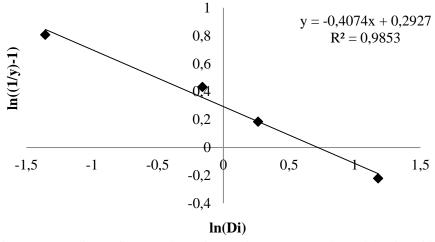


Figura 6.6: Análise gráfica para determinação dos parâmetros do modelo Sigmóide.

Foi possível ajustar os dados experimentais às curvas lineares com excelentes coeficientes de determinação (R² > 0,98), sendo o modelo RRB o que obteve o melhor ajuste linear. As linearizações retornaram as equações de retas expostas nas Figura 6.4 a Figura 6.6 e, por meio do ajuste pelo método dos mínimos quadrados, os parâmetros foram determinados e seus valores estão ilustrados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3: Parâmetros estimados dos modelos de análise granulométrica.

Modelo		GGS			RR	В		Sigmóide	
Parâmetro	m	K	R²	n	d'	R ²	M	K	R ²
Valor	1,17	2,63	0,985	0,59	0,39	0,996	0,41	2,05	0,985

GGS - Gates-Gaudin-Schumann; RRB - Rosin-Ramler-Bennet

As diferentes frações de diâmetro de partícula foram ainda analisadas quanto à extração proteica (Figura 6.7) para analisar sua influência sobre esta resposta.

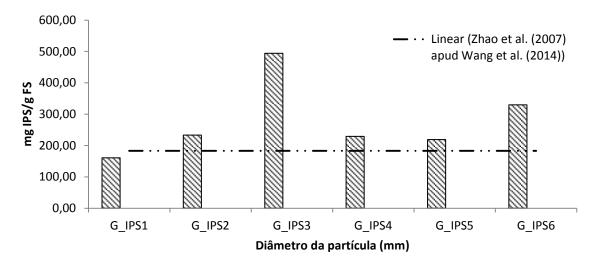


Figura 6.7: Rendimento proteico em relação ao tamanho da partícula do Farelo de soja (FS). IPS – Isolado proteico de soja

Observa-se que a concentração de proteína extraída é dependente do tamanho médio de partícula na fração. Uma possível explicação seria a composição dessas frações. Como o farelo de soja analisado é um resíduo proveniente da extração de óleo, pode, portanto, haver presença de folhas, cascas, caules e inclusive outras impurezas. Ademais, por terem sido quebradas e até laminadas, as partículas nas diferentes frações possuem diferentes áreas superficiais, podendo assim favorecer a extração proteica. Pode-se assumir então, que as frações com os maiores rendimentos em proteína foram obtidas de grãos de soja desengordurados com maiores áreas superficiais.

Em média, as frações apresentaram 277,65 mg IPS.(g FS)⁻¹, resultado 52% maior que o valor encontrado por Zhao *et al.* (2007) apud Wang *et al.*(2014) (183,16 mg IPS.(g FS)⁻¹), o que reporta a eficiência do processo e a capacidade de extração proteica do farelo desengordurado de soja. Nas frações 7 (G_IPS7) e 8 (G_IPS8) foram também quantificadas a concentração de proteína, alcançando-se, respectivamente, 244,35 mg PTN (g FS)⁻¹ e 387,23 mg PTN (g FS)⁻¹.

6.3 Caracterização por eletroforese bidimensional

No primeiro gel de eletroforese não se observou um bom resultado (Figura 6.8). A corrida aconteceu de cima para baixo, do anodo para o catodo, e o marcador de massa molar foi colocado no final do gel resultante da focagem isoelétrica. Observou-se, porém, diversos problemas como ilustrados na imagem da Figura 6.8.

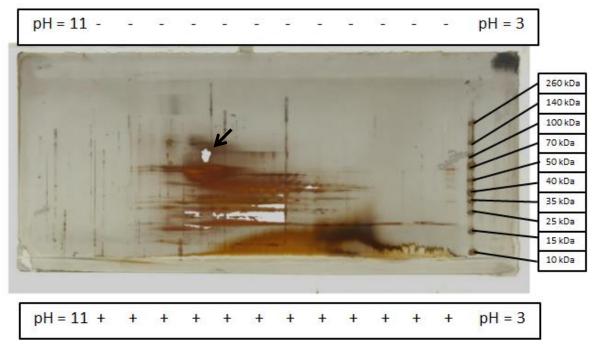


Figura 6.8: Gel resultante da corrida de eletroforese bidimensional do isolado proteico de soja ($D \ge 250 \mu m$).

A imagem não apresenta boa definição, tornando difícil a análise das diferentes proteínas ou subunidades proteicas da soja. Observa-se também uma mancha branca no meio do gel (indicada pela seta na Figura), que resultou de uma lesão física durante a coloração com nitrato de prata. A faixa amarelada no final da corrida é decorrente da solução de reidratação. Isso ocorre em geral, quando ao final da corrida, esta ainda se encontra no gel de segunda dimensão. Uma maneira de evitar esse problema seria seguir o procedimento alternativo descrito na seção 5.2.5.

Observou-se ainda, faixas horizontais ao invés de pontos isolados. Isso ocorre, provavelmente devido ao excesso de proteína carreada. Dessa maneira, as proteínas de maior massa molar acabam bloqueando as de menor massa molar, de modo que estas ficam impossibilitadas de correr corretamente. Neste caso, são identificadas bandas mais largas ao invés de pontos isolados.

Tendo em vista os problemas observados no primeiro gel, a segunda análise foi realizada, usando a metodologia alternativa para evitar a presença de manchas amareladas, com a amostra G_IPS7 diluída 50 vezes para obtenção de uma imagem melhor definida. Observou-se, portanto, um gel com bandas mais nítidas e definidas (Figura 6.9). Mesmo diluindo-se a amostra 50 vezes, não foi possível eliminar completamente as faixas horizontais. É importante notar que esse problema pode ser decorrente de outros fatores. Na literatura, é frequentemente relatada a correlação entre a má definição da imagem e o excesso de proteína. Como previsto, o aumento no tempo total da corrida evitou a mancha amarelada percebida no primeiro gel.

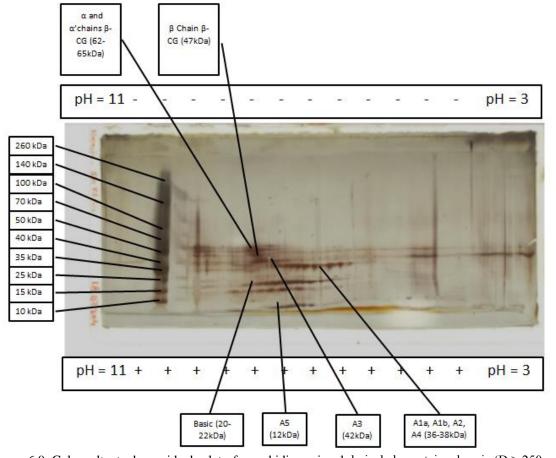


Figura 6.9: Gel resultante da corrida de eletroforese bidimensional do isolado proteico de soja ($D \ge 250~\mu m$) diluído 50X.

Não foi possível conduzir uma análise quantitativa, pois o gel não apresentou a definição mínima exigida pelo software. Entretanto, com os dados conhecidos das diferentes unidades e subunidades proteicas da soja foi possível realizar a análise qualitativa do gel.

Na parte superior da Figura 6.9, estão identificadas as bandas correspondentes às subunidades α , α ' e β da β -conglicinina, enquanto na parte inferior da figura podem-se visualizar as diferentes subunidades ácidas (A1a, A1b, A2, A3, A4 e A5) e básica da glicinina. Essa caracterização se baseou não somente na massa molar das diferentes unidades, como indicado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, mas também nos seus diferentes pIs. Apesar do marcador molecular não estar claramente definido no segundo gel, ainda foi possível identificar as diferentes bandas moleculares.

6.4 Caracterização por CLAE

Sabe-se que a redução na temperatura em cromatografia líquida pode afetar o tempo de análise total, aumentando o tempo de retenção dos compostos. Porém, uma ligeira redução de 50°C a 48°C durante a etapa de otimização do método de CLAE, mostrou um aumento considerável no tempo de retenção dos compostos. Neste caso, todos os compostos eluíram simultaneamente no fim da corrida, não se alcançando, assim, melhores resultados na análise. Portanto, a temperatura de 50°C foi mantida na corrida de CLAE.

O fator que influenciou mais positivamente a separação dos compostos foi um aumento mais lento da fase forte. Neste caso, uma quinta etapa foi adicionada. Na primeira etapa, a concentração de acetonitrila (ACN) aumentou lentamente de 5 a 20%, durante a qual os compostos eluíram em picos claramente definidos e bem separados. Em alguns cromatogramas, um leve desvio na linha de base foi observado na segunda etapa do gradiente, o que, entretanto, não influenciou diretamente o resultado, já que não havia picos evidentes nessa etapa da corrida.

Os cromatogramas da β-CG (Figura 6.10) e da GLY (Figura 6.11) se mostraram muito similares, o que também foi observado por Garcia *et al.* (1997), que justificaram esse fato com base na contínua conversão de uma globulina na outra. A única diferença notada entre os cromatogramas por eles obtidos e os obtidos nesse trabalho foi a presença de um pico não identificado (pico 8) no cromatograma da GLY.

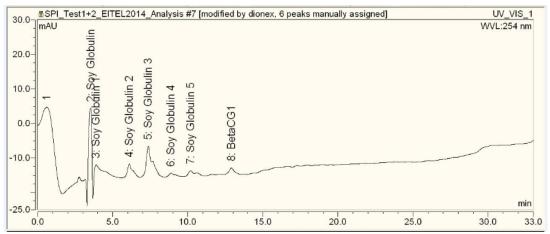


Figura 6.10: Cromatograma do padrão β-conglicinina.

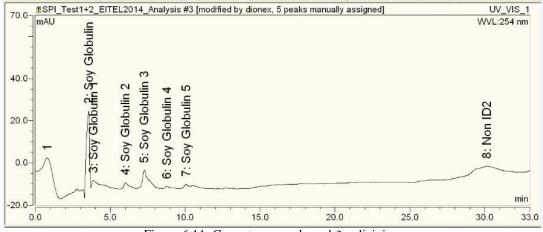


Figura 6.11: Cromatograma do padrão glicinina.

Comparando-se as amostras de IPS com os padrões, seis diferentes picos foram detectados correspondendo a subunidades das globulinas principais (Figura 6.12 e Figura 6.13). Esse resultado também foi coerente com o cromatograma obtido por Garcia *et al.* (1997) ao usar uma metodologia similar. O pico #2 foi o pico predominante com a maior área em todos cromatogramas de todas as frações, correspondendo a aproximadamente 37% da área relativa dos padrões, 64,12 ± 8,85% da área dos picos do IPS (G_IPS5) e 23,75 ± 5,54% do IPS (G_IPS6). No caso da fração G_IPS6, o pico com maior área relativa foi caracterizado como Globulina 3, que também é o segundo maior pico observado no cromatograma dos padrões utilizados.

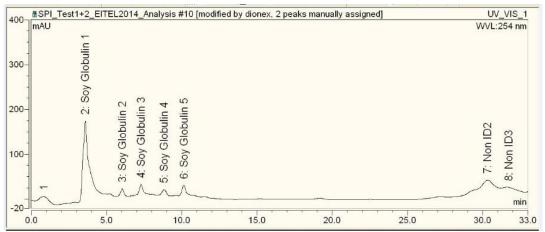


Figura 6.12: Cromatograma do isolado proteico de soja obtido a partir da fração G_IPS5.

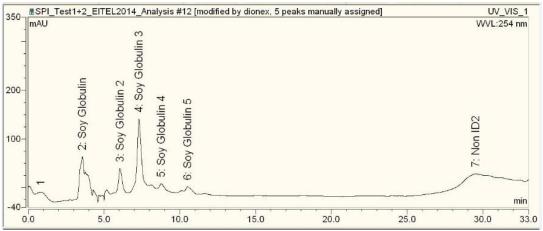


Figura 6.13: Cromatograma do isolado proteico de soja obtido a partir da fração G_IPS6.

Em todos os cromatogramas, observou-se um pico no fim da corrida, que não corresponde a uma subunidade de uma das globulinas da soja, já que, baseado na literatura, as globulinas deveriam ter tempos de retenção mais curtos. Por outro lado, devem-se considerar os diferentes tipos de colunas e, portanto, as diferentes interações com os compostos analisados e consequentes os tempos de retenção. Além disso, esse pico pode estar relacionado ao encontrado no cromatograma do padrão GLY.

6.5 Cinética enzimática

A análise pelo método TCA identificou aproximadamente 58% de GH para todos os ensaios (Figura 6.14). Além disso, ao centrifugar as diferentes amostras, não foi observado precipitado, sugerindo que a hidrólise fosse total em desacordo com o resultado calculado. Alguns autores (Nielsen, Petersen e Dambmann, 2001) afirmam que o teste TCA atinge resultados melhores quando a enzima usada é uma endoprotease. A Alcalase é uma

exoprotease, o que poderia influenciar nos resultados negativos. Optou-se, portanto, por realizar todos os cálculos de GH pelas diferenças estimadas nas diferentes correntes da ultrafiltração.

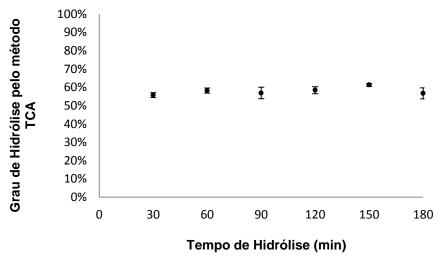


Figura 6.14: Grau de hidrólise calculado pelo método TCA durante a cinética da hidrólise.

Os resultados para proteínas totais e capacidade antioxidante dos hidrolisados estão apresentados na Tabela 6.4. Esses resultados foram os obtidos para o permeado da ultrafiltração.

Tabela 6.4: Resultados da	-: /4:	: <4:	1	:11		4:-	(1,2)
Tabela 0.4: Resultados da	cinetica	enzimanca o	uos	isorados	proteicos	de soia	

Ensaio	BCA (mg PTN.mL ⁻¹)	GH (%)	FRAP (mmol AAE.mg ⁻¹ PTN)	ABTS (mmol TE.mg ⁻¹ PTN)
0	0.01 ± 0.00^{d}	$0,00 \pm 0,00^{\rm e}$	$0,27 \pm 0,01^{\rm e}$	$1,06 \pm 0,02^{c}$
30	0.30 ± 0.01^{c}	$39,71 \pm 0,14^{d}$	$0,64 \pm 0,01^{\rm b}$	$1,36 \pm 0.01^{b,c}$
60	0.39 ± 0.02^{c}	$55,29 \pm 0,93^{c}$	$0,69 \pm 0,03^{a,b}$	$1,74 \pm 0,08^{\mathrm{a,b}}$
90	$0,50 \pm 0,03^{\mathrm{b}}$	$61,22 \pm 2,19^{b}$	$0,42 \pm 0,01^{d}$	$1,83 \pm 0,05^{a,b}$
120	$0,50 \pm 0,03^{\mathrm{b}}$	$66,13 \pm 0,39^{a}$	$0,53 \pm 0,02^{c}$	$1,45 \pm 0,03^{b,c}$
150	0.30 ± 0.07^{c}	$41,13 \pm 2,69^{d}$	$0,72 \pm 0,02^{a}$	$1,54 \pm 0,14^{a,b}$
180	$0,61 \pm 0,02^{a}$	$44,34 \pm 0,27^{a}$	(3)	$2,02 \pm 0,10^{a}$

⁽¹⁾ Resultados expressos em Média + DP de pelo menos três diferentes replicatas.

A análise de variância (ANOVA) confirma que há diferença estatística a p ≤ 0.05 (Tabela 6.5).

⁽²⁾ Médias na mesma coluna com diferentes sobrescritos são estatisticamente diferente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

⁽³⁾ Não foi realizada a análise da cinética em 180 minutos dos hidrolisados, pois a amostra foi perdida.

Tabela 6.5: Análise de variância para os resultados obtidos na cinética da hidrólise enzimática.

		Soma dos	df	Quadrado	F	Sig.
		Quadrados		Médio		C
BCA (mg.mL ⁻¹)	Entre	6,81E-01	6,00E+00	1,14E-01	1,08E+02	0,00E+00
	Grupos					
	Nos	1,50E-02	1,40E+01	1,00E-03		
	grupos					
	Total	6,96E-01	2,00E+01			
ABTS (µmol	Entre	1,96E+06	6,00E+00	3,26E+05	1,04E+01	0,00E+00
TE.mg ⁻¹ PTN)	Grupos					
	Nos	4,40E+05	1,40E+01	3,14E+04		
	grupos					
	Total	2,40E+06	2,00E+01			
FRAP (µmol	Entre	4,59E+05	5,00E+00	9,19E+04	2,63E+02	0,00E+00
AAE.mg ⁻¹ PTN)	Grupos					
	Nos	4,20E+03	1,20E+01	3,50E+02		
	grupos					
	Total	4,63E+05	1,70E+01			
GH (%)	Entre	9,29E-01	6,00E+00	1,55E-01	8,26E+02	0,00E+00
	Grupos					
	Nos	3,00E-03	1,40E+01	0,00E+00		
	grupos					
	Total	9,32E-01	2,00E+01			

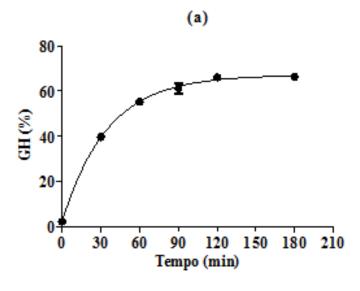
Curvas exponenciais foram ajustadas para o grau de hidrólise e para a capacidade antioxidante em função do tempo de hidrólise (Equações 6.1-6.3; Figura 6.15).

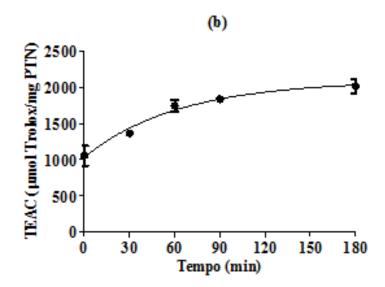
[6.1] GH =
$$(2,314 - 67,11) \exp(-0.02845 t) + 67,11$$
; $R^2 = 0.9992$

[6.2] TEAC =
$$(1042 - 2092) \exp(-0.01558 t) + 2092$$
; $R^2 = 0.9838$

[6.3]
$$FRAP = (271.9 - 714.9) \exp(-0.05907 t) + 714.9; R^2 = 0.9981$$

Nas quais, GH = Grau de Hidrólise; TEAC = Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Power; t=tempo.





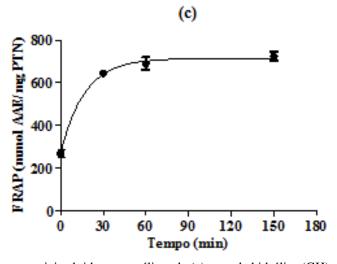


Figura 6.15: Curvas exponenciais obtidas nas análises de (a) grau de hidrólise (GH) e nas análises de capacidade antioxidante realizada através dos métodos (b) ABTS e (c) FRAP.

No caso da capacidade antioxidante pelo método ABTS, os pontos de 120 e 150 minutos foram eliminados para possibilitar melhor ajuste (um aumento de R² = 0,62 para R² = 0,98). Observou-se que apesar desses pontos apresentarem coeficientes de variação baixo, de apenas 2% e 9%, respectivamente, a eliminação desses pontos contribuiu sensivelmente para melhorar o coeficiente de correlação do ajuste não linear. No caso dos resultados da análise pelo método FRAP, o coeficiente de determinação aumentou em quase 70% (de 0,59 para 0,99). Neste caso, eliminou-se os pontos em 90 e 120 minutos. Da mesma forma, observou-se que os coeficientes de variação foram muito baixos, 2% e 4%, respectivamente.

Em todas as curvas obtidas, foi possível observar que uma assintótica é atingida após aproximadamente 60 minutos de hidrólise enzimática com Alcalase, ou seja, a reação enzimática se estabilizou, alcançando taxas reacionais muito baixas. A análise estatística confirma essa tendência, já que não houve diferença estatística nos resultados de capacidade antioxidante e grau de hidrólise após os 60 minutos.

6.6 Influência das condições de hidrólise enzimática nos peptídeos bioativos obtidos

Um planejamento experimental foi realizado para avaliar a influência das condições da hidrólise na bioatividade dos hidrolisados proteicos de soja. Apesar do valor assintótico, ou seja, da taxa de reação muito baixa, observado após 60 minutos no ensaio anterior, optou-se, no planejamento estatístico, por realizar os experimentos durante 120 minutos de hidrólise, por medida de segurança.

6.6.1 Resultados para o permeado

Os resultados do planejamento fatorial completo do permeado estão expostos na Tabela 6.6.

Tabela 6.6: Resultado das análises realizadas no permeado do planejamento fatorial 2³ com triplicata no ponto central (*).

Ensaio	BCA (mg PTN.mL ⁻¹)	GH (%)	ABTS (mmol TE. mg ⁻¹ PTN)	FRAP (mmol AAE. mg ⁻¹ PTN)	IER (iECA%. (mg PTN.mL) ⁻¹)
1	$4,90 \pm 0,15^{e}$	$33,48 \pm 1,01^{cd}$	$326,26 \pm 2,58^{a}$	$26,20 \pm 0,00^{a}$	$102,15 \pm 3,04^{d}$
2	$6,61 \pm 0,38^{ab}$	$45,65 \pm 2,59^{a}$	$20,32 \pm 2,06^{\rm e}$	$20,45 \pm 0,47^{\rm f}$	$85,24 \pm 4,87^{ef}$
3	$5,27 \pm 0,15^{de}$	$22,15 \pm 0,63^{g}$	$39,90 \pm 2,47^{d}$	$25,38 \pm 0,30^{ab}$	$94,87 \pm 2,74^{de}$
4	$6,08 \pm 0,23^{bc}$	$34,29 \pm 1,32^{bc}$	$32,88 \pm 1,85^{de}$	$21,58 \pm 0,36^{ef}$	$82,27 \pm 3,20^{\mathrm{f}}$
5	$5,41 \pm 0,36^{\text{cde}}$	$33,00 \pm 2,17^{cd}$	$45,61 \pm 1,73^{d}$	$24,04 \pm 0,19^{bc}$	$104,21 \pm 6,67^{d}$
6	$7,06 \pm 0,06^{a}$	$43,09 \pm 0,34^{a}$	$61,71 \pm 6,45^{c}$	$18,98 \pm 0,21^{g}$	$79,73 \pm 0,63^{\mathrm{f}}$
7	$5,25 \pm 0,01^{de}$	$23,52 \pm 0,06^{fg}$	$45,62 \pm 3.59^{d}$	$24,53 \pm 0,71^{bc}$	$35,71 \pm 0,09^{g}$
8	$7,25 \pm 0,55^{a}$	$38,12 \pm 2,12^{b}$	$112,26 \pm 3,63^{b}$	$18,50 \pm 0,53^{g}$	$77,86 \pm 5,96^{\mathrm{f}}$
9 (C)	$5,86 \pm 0,15^{cd}$	$29,54 \pm 0,76^{de}$	$22,84 \pm 0,67^{e}$	$23,39 \pm 0,16^{cd}$	277,40 ±7,24 ^b
10 (C)	$5,97 \pm 0,09^{bcd}$	$30,22 \pm 0,45^{\text{cde}}$	$61,39 \pm 2,18^{c}$	$22,51 \pm 0,72^{de}$	$209,31 \pm 3,14^{c}$
11 (C)	$5,59 \pm 0,04^{\text{cde}}$	$27,47 \pm 0,22^{ef}$	$46,12 \pm 0,40^{d}$	$24,01 \pm 0,92^{bc}$	$335,44 \pm 2,65^{a}$

^(*) Médias na mesma coluna com diferentes sobrescritos são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Os resultados do planejamento experimental foram usados para avaliar o efeito dos fatores sobre as bioatividades, porém não foram usados para obtenção de modelos matemáticos descritivos. Esta decisão deve-se ao fato de se obter bons coeficientes de determinação, $R^2 > 0.9$, para todas as variáveis dependentes: proteínas totais ($R^2 = 0.99$), grau de hidrólise ($R^2 = 0.99$), ABTS ($R^2 = 0.99$), FRAP ($R^2 = 0.98$) e IER ($R^2 = 0.91$), porém os resíduos não seguiram distribuição normal e a variância dos mesmos não apresentou comportamento aleatório. A análise quantitativa usando o método de Shapiro-Wilk indicou distribuição não normal com p < 0.05, para todas as análises realizadas. Além disso, observase que todos os gráficos 'P-P normal' (ANEXO A) apresentam variância constante e não aleatória.

BCA – Proteínas totais; GH – Grau de Hidrólise; ABTS e FRAP – capacidade antioxidante; IER – Razão da Eficiência Inibitória.

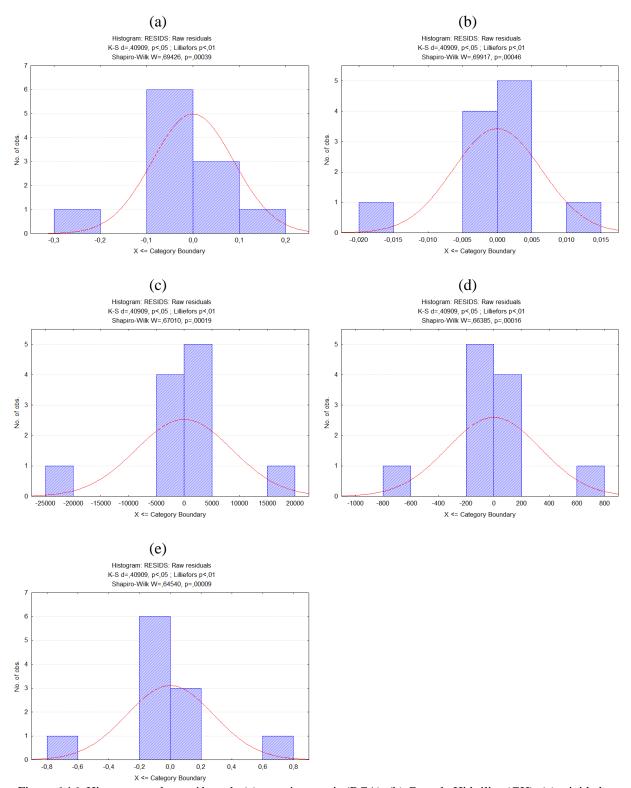


Figura 6.16: Histogramas dos resíduos de (a) proteínas totais (BCA), (b) Grau de Hidrólise (GH), (c) atividade antioxidante pelo método ABTS, (d) atividade antioxidante pelo método FRAP e (e) razão da eficiência inibitória (IER). Usando o método quantitativo de Shapiro-Wilk, os p obtidos mostraram que nenhum dos resultados seguiu distribuição normal, com p = 0,00039, p = 0,00046, p = 0,00019, p = 0,00016 e p = 0,00009

É possível observar que, no caso da corrente do permeado, as proteínas totais apresentam um comportamento contrário à capacidade antioxidante (Figura 6.17), ou seja, as condições em que se observaram maior concentração de proteínas (maiores temperaturas e maiores razões FS: tampão) foram as mesmas que resultaram em menores valores de capacidade antioxidante, para ambos os métodos. Foi possível ainda observar uma correlação positiva entre os resultados de ABTS e FRAP, o que já era esperado, já que ambas as metodologias quantificam a capacidade antioxidante.

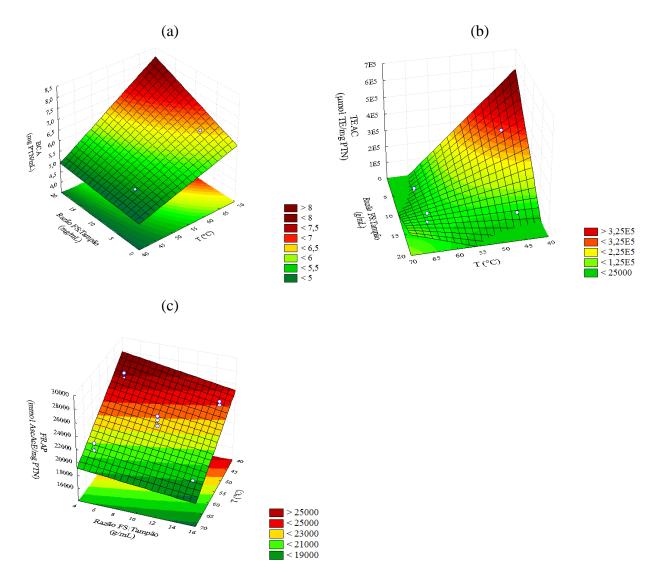


Figura 6.17: Superfícies de resposta em função da razão farelo de soja: tampão e temperatura de (a) proteínas totais (BCA), capacidade antioxidante pelos métodos (b) ABTS e (c) FRAP.

Ao analisarmos os resultados de proteínas totais e grau de hidrólise, a temperatura apresentou significância estatística com uma correlação positiva (Figura 6.18), ou seja, o aumento da temperatura resultou em um aumento destas respostas. Isso já era esperado, já que a temperatura ótima da Alcalase é 60°C. Além disso, temperaturas mais altas também

promovem hidrólise térmica, de modo que o GH avaliado pode não ter sido resultante apenas da ação enzimática, mas também de fatores físicos. Liu e Zhao (2010) reportaram que altas temperaturas podem desnaturar as proteínas, alterando sua estrutura tridimensional, e expondo resíduos hidrofóbicos, ricos em Leu, Tyr e Lys. Essa exposição favorece o acesso da Alcalase às moléculas proteicas.

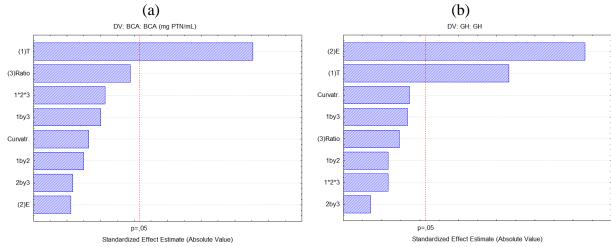


Figura 6.18: Gráfico de Pareto para (a) proteínas totais e (b) grau de hidrólise

Observa-se ainda no gráfico de Pareto que a concentração enzimática também influenciou estatisticamente o GH avaliado. Contudo, observa-se nas superfícies de resposta (Figura 6.19) que a concentração enzimática está correlacionada negativamente com o grau de hidrólise. Este fato pode indicar um excesso de enzimas e, consequentemente, a autodigestão enzimática. Por ser uma exoenzima secretada por uma bactéria do gênero *Bacillus*, é provável que a Alcalase tenha sítios alvos de autodigestão, como reportado por Vandenburg *et al.* (1990). Em seu estudo, os autores identificaram diversos sítios alvos em enzimas de *Bacillus* e analisaram sua degradação autocatalítica em diversas condições.

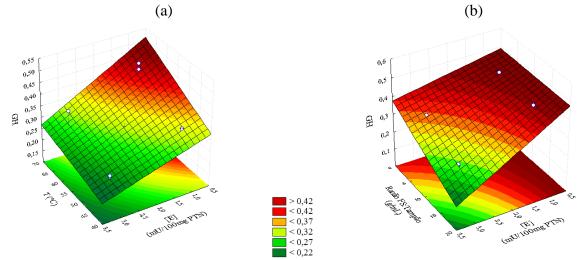


Figura 6.19: Superfícies de resposta do grau de hidrólise (GH) em função de (a) temperatura e concentração enzimática e de (b) concentração enzimática e razão farelo de soja: tampão.

Na Tabela 6.7, é possível visualizar como a concentração de proteínas no permeado tem uma alta correlação positiva e estatisticamente significativa (p < 0.01) com o GH, já que quanto maior o grau de hidrólise, maior será a o teor proteico na corrente do permeado da ultrafiltração.

Tabela 6.7: Correlação de Pearson entre proteínas totais e grau de hidrólise.

		BCA (mg PTN/mL)	GH (%)
	Correlação de Pearson	1	0,750**
BCA (mg PTN.mL ⁻¹)	Sig. (2 extremidades)		0,000
	N	33	33
	Correlação de Pearson	0,750**	1
GH (%)	Sig. (2 extremidades)	0,000	
	N	33	33

^{**.} A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

De acordo com as superfícies de resposta (Figura 6.20), observou-se que quanto mais baixa a temperatura, maior a capacidade antioxidante e atividade iECA. Isto ocorre, pois altas temperaturas podem promover oxidação térmica, inativando os peptídeos bioativos. Além disso, Liu e Zhao (2010) reportaram que o aquecimento excessivo pode levar a um desdobramento de proteínas intensivo, expondo muito sítios hidrofóbicos e diminuindo a solubilidade proteica. Isto ocorre já que as interações hidrofóbicas destes sítios causam agregação das proteínas. Consequentemente, os sítios ativos são isolados dentro destes agregados, dificultando a ação da protease.

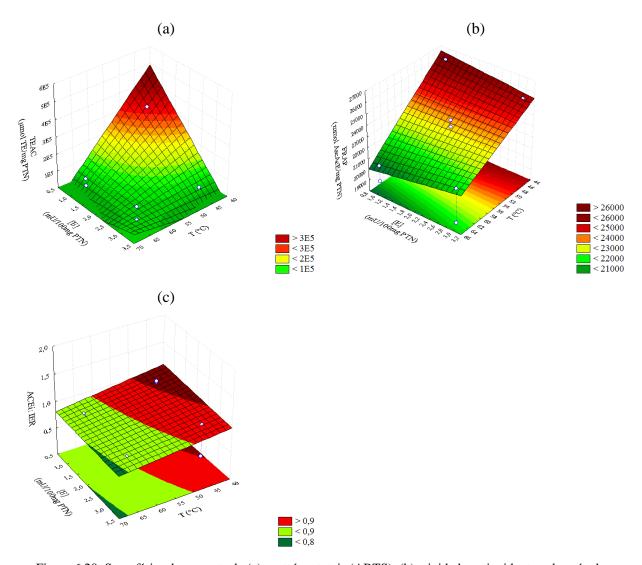


Figura 6.20: Superfícies de resposta de (a) proteínas totais (ABTS), (b) atividade antioxidante pelo método FRAP e (c) Razão de eficiência inibitória em função de concentração enzimática e temperatura.

De acordo com os resultados descritos, um maior grau de hidrólise pode influenciar negativamente a atividade dos peptídeos. Isso pode estar relacionado tanto à oxidação térmica, como também à clivagem enzimática. Neste caso, valores de GH elevados podem clivar uma das ligações peptídicas no meio da sequência ativa, inativando assim, os hidrolisados. Resultados similares foram reportados por Tsou *et al.* (2012) ao analisar o efeito da hidrólise limitada de usando Flavourzyme na acumulação lipídica em adipócitos.

Outros estudos do mesmo grupo também indicaram que GH mais altos resultam em uma redução funcional, já que essa clivagem no meio da sequencia peptídica ativa altera negativamente a estrutura (Tsou, Kao, *et al.*, 2010; Tsou, Lin, *et al.*, 2010). Moure, Dominguez e Parajo (2006) observaram a mesma tendência na análise de capacidade antioxidante, usando a metodologia FRAP, em peptídeos de soja com massa molar inferior a 1kDa. Lo e Li-Chan (2005) reportaram essa tendência ao analisar a atividade iECA% dos

peptídeos de soja. Enquanto a iECA% reduziu de 60% a 50%, o GH aumentou de 10% a 30% em 90 minutos de hidrólise com pancreatina.

Na tabela ANOVA (Tabela 6.8) observa-se que, para a análise ABTS, todos os fatores de interação apresentaram significância estatística, porém isolados apresentaram diferenças apenas marginalmente significativas, com 0.05 . Essa influência pode ser analisada graficamente nas superfícies de resposta (Figura 6.17(b), Figura 6.20(a) e Figura 6.21).

Tabela 6.8: Tabela ANOVA para a variável de resposta atividade antioxidante pelo método ABTS.

Fator	$R^2 = 0.99011$; QM Residual = 376736E3							
rator	SQ	GL	QM	F	P			
Curvatura	3,87E+09	1	3,87E+09	10,27416	0,085092			
(1) T	6,620E+09	1	6,62E+09	17,58678	0,052429			
(2) E	6,23E+09	1	6,23E+09	16,53446	0,055493			
(3) Razão FS: Tampão	2,97E+09	1	2,97E+09	7,88457	0,106879			
1×2	1,53E+10	1	1,53E+10	40,51776	0,023803			
1×3	1,96E+10	1	1,96E+10	51,95662	0,018708			
2×3	1,32E+10	1	1,32E+10	34,91055	0,027470			
$1 \times 2 \times 3$	7,71E+09	1	7,71E+09	20,47071	0,045539			
Erro	7,53E+08	2	3,77E+08					
SQ Total	7,61E+10	10						

SQ – soma dos quadrados; GL – Graus de Liberdade, MQ – Quadrado Médio.

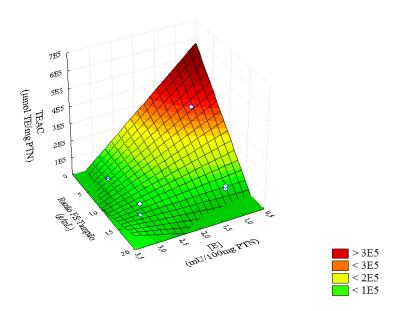


Figura 6.21: Superfície de resposta de atividade antioxidante pelo método ABTS em função da concentração enzimática e razão farelo de soja: tampão.

Observou-se também nas curvas de superfície que todos os fatores apresentam correlação negativa com a resposta ABTS. Valores menores de temperatura, concentração de enzima e razão FS: tampão aumentaram a capacidade antioxidante medida *in vitro* por este

método. A melhor resposta, respeitando as fronteiras $45^{\circ}\text{C} \leq \text{T} \leq 65^{\circ}\text{C}$, 5 mg.mL⁻¹ \leq razão FS: tampão \leq 15 mg.mL⁻¹ e 0,01 mU.mg⁻¹ PTN \leq E \leq 0,03 mU.mg⁻¹ PTN, foi obtida na condição de mínima de T = 45°C , E= 0,01 mU.mg⁻¹ PTN e razão FS: tampão Trizma = 5 mg.mL⁻¹, sendo $326,26 \pm 2,58$ mmol TE. mg⁻¹ PTN. Esse resultado foi aproximadamente 100 vezes superior aos obtidos por Ranamukhaarachchi, Meissner e Moresoli (2013) ao analisarem a capacidade antioxidante de hidrolisados enzimaticamente com pepsina e pancreatina com ou sem pré-tratamento térmico. No trabalho citado, os peptídeos foram purificados usando membrana de ultrafiltração com MMC = 10 kDa e analisados pela metodologia ORAC, obtendo capacidade antioxidante na corrente do permeado de 3,07 mmol TE.mg⁻¹ PTN e 2,37 mmol TE.mg⁻¹ PTN com e sem pré-aquecimento térmico, respectivamente.

Vernaza *et al.* (2012) analisaram a capacidade antioxidante de hidrolisados de soja obtidos com Alcalase a partir de farinha de soja. A melhor resposta para os hidrolisados da farinha não germinada foi 608,9 mM TE.mg⁻¹ PTN após 3 h de hidrólise, o dobro da encontrada nesse trabalho.

Quando Moure, Dominguez e Parajo (2006) analisaram a capacidade antioxidante pelo método FRAP, obtiveram resultados variando de 0,785 a 1,009 mM AAE com um teor total de proteína de 5 mg.mL⁻¹, ou seja, 0,157 a 0,2018 mmol AAE. mg⁻¹ PTN. Esse resultado foi novamente aproximadamente 100 vezes inferior aos resultados obtidos nesse estudo, que variaram de $18,50 \pm 0,53$ a $26,20 \pm 0,00$ mmol AAE.mg⁻¹ PTN. Diferentes condições de hidrólise foram adotadas nos ensaios realizados pelos autores.

A temperatura foi o único fator que apresentou diferença estatística na análise de variância de FRAP, porém a razão FS: tampão Trizma apresentou diferença marginalmente estatística com p = 0,07 (Tabela 6.9). Esse resultado está explicitado graficamente nas superfícies de resposta (Figura 6.17(c), Figura 6.20(b) e Figura 6.22), na qual é possível observar a influência negativa tanto da temperatura quanto da razão FS: tampão sobre a capacidade redutora medida por FRAP.

Tubela 0.9. Tubela 7110 771 para a variavel de l'esposa anvidade antioxidante pelo metodo 11011.								
Estan	\mathbb{R}^2	$R^2 = 0.98232$; QM Residual = 571673,2						
Fator	SQ	GL	QM	F	P			
Curvatura	1,56E+06	1	1,56E+06	2,74	0,2397			
T	53,30E+06	1	53,30E+06	93,22	0,0106			
E	11,84E+03	1	11,84E+03	0,02	0,8988			
Razão FS: Tempão Tris	7,15E+06	1	7,15E+06	12,50	0,0715			
1 com 2	119,75E+03	1	119,75E+03	0,21	0,6921			
1 com 3	299,11E+03	1	299,11E+03	0,52	0,5446			
2 com 3	9,93E+03	1	9,93E+03	0,02	0,9072			
1 com 2 e 3	1,06E+06	1	1,06E+06	1,86	0,3060			
Erro	1,14E+06	2	571,67E+03					
Total SO	64,65E+06	10						

Tabela 6.9: Tabela ANOVA para a variável de resposta atividade antioxidante pelo método FRAP.

SQ – soma dos quadrados; GL – Graus de Liberdade, MQ – Quadrado Médio.

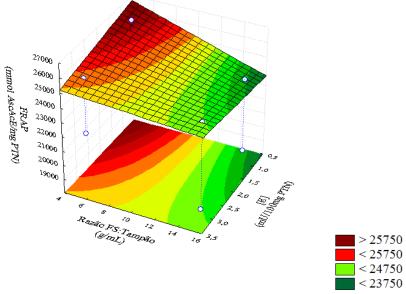


Figura 6.22: Superfície de resposta de atividade antioxidante pelo método FRAP em função da concentração enzimática e razão farelo de soja: tampão.

Lo e Li-Chan (2005) reportaram um máximo de iECA% de 60% para alíquotas com uma concentração de 0,29 mg.mL⁻¹ retiradas durante uma digestão com Pancreatina. Nesse estudo, a atividade máxima de iECA% atingiu 75% para um hidrolisado com concentração de 0,22 ± 0,00 mg PTN. mL⁻¹, correspondendo ao ensaio 11 (Figura 6.23), que confirma a alta bioatividade dos hidrolisados. Deve-se considerar ainda que esses resultados são os obtidos com amostras diluídas 25 vezes. Como já descrito na seção 5.2.4, os resultados reportados em termos de IER representam uma melhor abordagem, já que se baseiam na concentração de proteína quantificada analiticamente. Levando isso em consideração, o melhor valor de atividade antihipertensiva *in vitro* foi IER = 335,44 ± 2,65%. (mg/mL PTN)⁻¹ (ensaio 11).

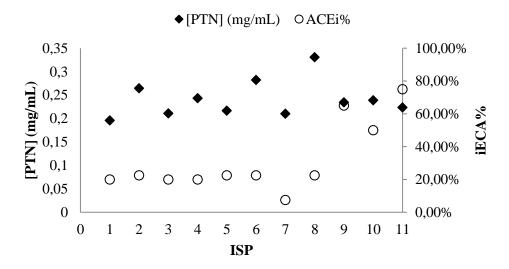


Figura 6.23: iECA% e concentração proteica da fase permeada do planejamento fatorial completo 2³ com triplicata no ponto central. Os resultados reportados são das amostras diluídas 25x.

Nenhum dos fatores com exceção da curvatura apresentou diferenças significativas para a atividade anti-hipertensiva, como se pode observar no gráfico de Pareto (Figura 6.24).

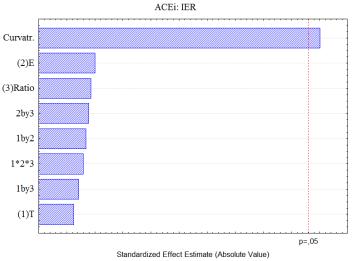


Figura 6.24: Gráfico de Pareto para a resposta iECA.

Baseado na correlação negativa dos fatores selecionados com as bioatividades do produto decidiu-se por analisar o processo EHSP usando a seguinte condição de hidrólise: T=45°C; Razão FS: tampão de 5 mg.mL⁻¹ e concentração enzimática de E = 0,01mU.mg⁻¹ PTN.

6.6.2 Resultados para o retido

Na corrente do retido foram encontrados proteínas e peptídeos com massa molar maior que 10 kDa. Os resultados do planejamento fatorial completo da corrente do retido estão ilustrados na Tabela 6.10, abaixo.

Tabela 6.10: Resultado das análises realizadas na corrente do retido do planejamento fatorial 2³ com triplicata no ponto central.

Ensaio	BCA (mg PTN.mL ⁻¹)	GH (%)	ABTS (mmol TE. mg ⁻¹ PTN)	FRAP (mmol AAE. mg ⁻¹ PTN)	IER (iECA%. (mg/mL PTN) ⁻¹
1	$9,73 \pm 0,31$	33,48 ± 1,01	$45,40 \pm 1,58$	$14,26 \pm 0,86$	$32,14 \pm 1,03\%$
2	$7,87 \pm 0,30$	$45,65 \pm 2,59$	$70,52 \pm 2,98$	$17,\!48 \pm 0,\!75$	$31,78 \pm 1,19\%$
3	18,53 ±0,55	22,15 ± 0,63	$35,98 \pm 1,57$	$7,39 \pm 0,24$	$10,12 \pm 0,31\%$
4	11,66 ± 0,78	34,29 ± 1,32	$73,90 \pm 6,58$	$11,40 \pm 0,12$	$16,13 \pm 1,07\%$
5	10,99 ± 0,85	33,00 ± 2,17	36,78 ±0,72	$14,53 \pm 0,50$	$39,97 \pm 3,02\%$
6	10,96 ± 0,24	43,09 ± 0,34	39,75 ±2,44	$12,62 \pm 0,10$	$22,81 \pm 0,52\%$
7	17,08 ± 0,80	23,52 ± 0,06	$33,30 \pm 1,68$	$8,13 \pm 0,19$	$25,65 \pm 1,18\%$
8	11,78 ± 0,95	38,10 ± 2,90	$104,06 \pm 3,06$	$11,32 \pm 0,14$	$26,63 \pm 2,06\%$
9 (C)	13,98 ± 1,33	29,54 ± 0,76	$80,65 \pm 4,62$	$10,82 \pm 0,23$	$4,50 \pm 0,42\%$
10 (C)	13,79 ± 0,10	30,22 ± 0,45	$31,57 \pm 2,09$	$10,06 \pm 0,68$	$13,59 \pm 0,10\%$
11 (C)	14,76 ± 0,40	27,47 ± 0,22	$29,85 \pm 1,32$	$9,17 \pm 0,07$	$16,95 \pm 0,46\%$

BCA – Proteínas totais; GH – Grau de Hidrólise; ABTS e FRAP – capacidade antioxidante; IER – Razão da Eficiência Inibitória.

Observou-se mais uma vez a mesma tendência no ajuste dos dados com bons coeficientes de determinação para todas as respostas: proteínas totais ($R^2 = 0.99$), ABTS ($R^2 = 0.74$), FRAP ($R^2 = 0.99$) e IER ($R^2 = 0.87$).

Os histogramas, assim como a análise quantitativa usando os métodos de Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors e Shapiro-Wilks podem ser visualizados na Figura 6.25. Observa-se que pelo método Kolmogorov-Smirnov, a análise poderia ser considerada normal, com p > 0,2. Porém, deve-se levar em consideração que esse método tem uma abordagem mais geral, e é um método mais sensível no centro que nas extremidades do modelo. Além

disso, os gráficos 'P-P normal' apresentam variância constante, ao invés de variância aleatória como requerido pela distribuição normal (ANEXO B).

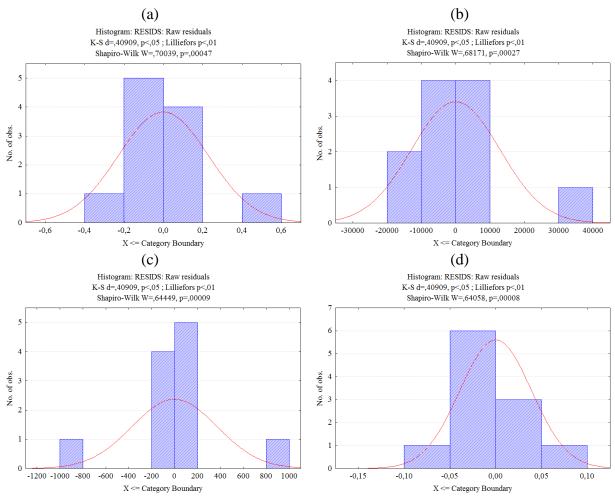


Figura 6.25: Histogramas dos resíduos de (a) BCA, (b) ABTS, (c) FRAP e (d) IER. Os p obtidos mostraram que nenhum dos resultados seguiu distribuição normal, com p = 0,00047; 0,00027; p = 0,00009; p = 0,00008, respectivamente.

De acordo com os resultados discutidos anteriormente, as superfícies de resposta obtidas foram usadas para avaliar a influência dos fatores sobre as bioatividades. Observouse, que no caso da corrente do retido, as proteínas totais tem um comportamento contrário à observada na corrente do permeado, principalmente em relação à influência da temperatura, já que, neste caso, uma temperatura mais baixa favorece o teor de proteínas totais.

Como já explicado anteriormente, temperaturas elevadas podem acarretar na hidrólise física das proteínas e peptídeos, de tal modo que proteínas de maior massa molar foram hidrolisadas e permearam durante a etapa de ultrafiltração. Por outro lado, a concentração enzimática também apresentou diferenças estatísticas, contribuindo positivamente para a concentração de proteínas.

Dessa vez, na análise de proteínas totais, os fatores concentração enzimática, temperatura, a interação da temperatura e enzima, e, curvatura foram estatisticamente diferentes, como indicado em negrito na tabela de análise de variância (Tabela 6.11). O fator de interação da concentração enzimática com a razão FS: tampão apresentou diferença marginalmente significativa. Os efeitos podem ser claramente visualizados nas superfícies de resposta (Figura 6.26).

Tabela 6.11: Tabela ANOVA para a variável proteínas totais (BCA) da corrente do retido.

Fator	$R^2 = 0.99475$; QM Residual = 0.2628869					
	SQ	GL	QM	F	P	
Curvatura	7,4805	1	7,48052	28,4553	0,033393	
(1)T	24,6818	1	24,68175	93,8873	0,010484	
(2)E	47,5074	1	47,50738	180,7141	0,005488	
(3) Razão FS: Tampão	1,1426	1	1,14261	4,3464	0,172437	
1 por 2	13,2313	1	13,23132	50,3308	0,019295	
1 por 3	1,4504	1	1,45042	5,5173	0,143294	
2 por 3	4,0250	1	4,02496	15,3106	0,059541	
1*2*3	0,0081	1	0,00806	0,0307	0,877118	
Erro	0,5258	2	0,26289			
Total SQ	100,0528	10				

SQ – soma dos quadrados; GL – Graus de Liberdade, MQ – Quadrado Médio.

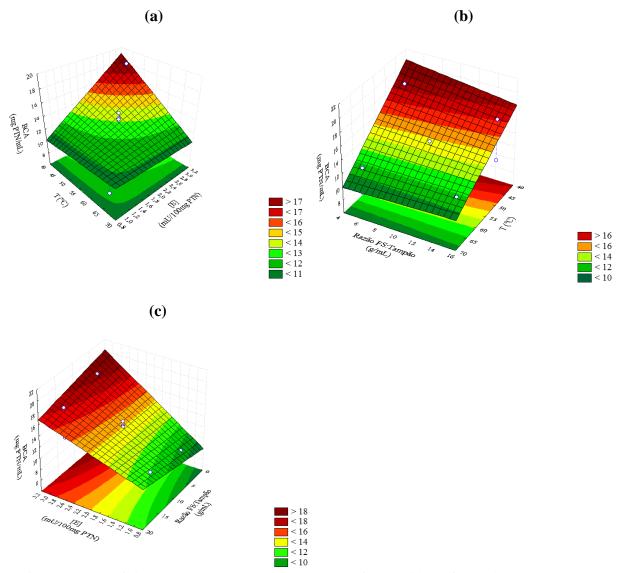


Figura 6.26: Superfícies de resposta para o teor de proteínas na fração retida em função de (a) temperatura e concentração enzimática, (b) razão farelo de soja: tampão e temperatura, e, (c), razão farelo de soja: tampão e concentração enzimática.

A Figura 6.27 apresenta o gráfico de Pareto para a variável de resposta ABTS, no qual é possível ver que todos os fatores não apresentaram diferença significativa.

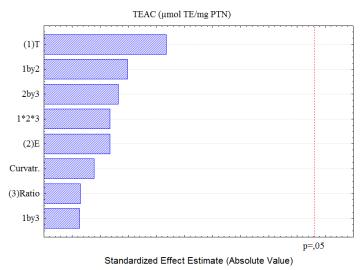


Figura 6.27: Gráfico de Pareto para a variável de resposta proteínas totais (ABTS).

Esse resultado está em desacordo com a análise realizada para a capacidade antioxidante pela metodologia FRAP. Neste caso, pode-se constatar no Gráfico de Pareto (Figura 6.28), que todos os fatores analisados foram estatisticamente significativos.

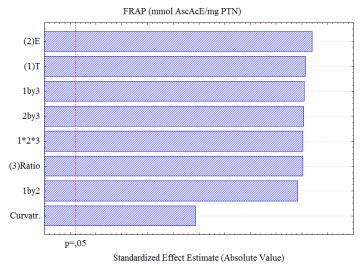


Figura 6.28: Gráfico de Pareto para a variável de resposta atividade antioxidante pelo método FRAP.

Observa-se nas curvas de superfícies de resposta que a temperatura tem uma correlação positiva com a capacidade redutora medida (Figura 6.29 (a) e (b)). Na corrente do retido, a temperatura não contribuiu para uma oxidação térmica, mas promoveu uma hidrólise física, produzindo hidrolisados com maior massa molar e com alta capacidade redutora.

Baseado nesse fato e no que foi discutido previamente a partir dos dados na seção 6.6.1, pode-se afirmar que a temperatura favoreceu a capacidade antioxidante, no caso de hidrolisados com massa molar maior que 10 kDa, ao alterar a estrutura tridimensional destes.

Porém, em peptídeos com menor cadeia peptídica, a temperatura atua como um oxidante térmico, reduzindo sua capacidade antioxidante.

Nota-se que a maior capacidade redutora ocorreu em temperaturas mais elevadas e concentrações enzimáticas mais baixas. Uma possível explicação para esse fato pode ser a temperatura ótima de atuação da Alcalase, 60 °C, sendo que em altas temperaturas, além de ocorrer hidrólise térmica, a hidrólise enzimática foi mais efetiva.

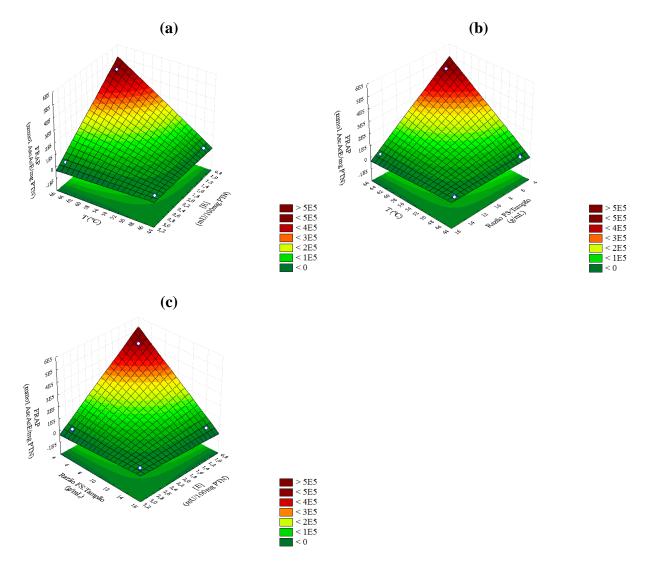


Figura 6.29: Superfícies de resposta da atividade antioxidante pelo método FRAP em função de (a) temperatura e concentração enzimática, (b) razão farelo de soja: tampão e temperatura, e (c) concentração enzimática e razão farelo de soja: tampão.

No caso da atividade iECA%, novamente nenhum dos fatores foi estatisticamente significativo, como observado no gráfico de Pareto (Figura 6.30), abaixo.

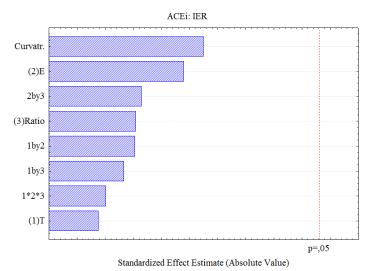


Figura 6.30: Gráfico de Pareto para a variável de resposta iECA% em termos da razão da eficiência inibitória (IER).

6.7 Processo EHSP de isolamento proteico e hidrólise enzimática simultânea

No caso do processo EHSP, já que ocorrem, simultaneamente, a extração e a hidrólise de proteínas da soja, o tempo selecionado foi maior, durando 3,5 horas no total. O processo foi realizado em triplicata para avaliar a sua reprodutibilidade. Os resultados estão expostos na Tabela 6.12.

Tabela 6.12: Resultado do processo de extração e hidrólise simultânea de proteínas (EHSP) para as três replicatas do processo. Os resultados estão expressos em Média ± DP de pelo menos 3 replicatas de cada análise.

Replicatas do	BCA (1)	ABTS (1)	FRAP (1)
Processo (2)	(mg PTN.mL ⁻¹)	(mmol TE.mg ⁻¹ PTN)	(mmol AAE.mg ⁻¹ PTN)
PI_1A	$26,55 \pm 0.82^{\text{Ca}}$	$20,32 \pm 0,90^{Aa}$	$1,72 \pm 0,10^{ABCa}$
PI_2A	$27,09 \pm 0,74^{\text{BCa}}$	$20,10 \pm 0,39^{Aa}$	$1,53 \pm 0,20^{\text{BCDa}}$
PI_3A	$26,58 \pm 0,71^{\text{Ca}}$	$19,72 \pm 0,12^{Aa}$	$1,55 \pm 0,07^{\mathrm{BCDa}}$
PI_1R	$28,82 \pm 0,49^{ABb}$	$19,93 \pm 0,05^{Ab}$	$1,50 \pm 0,09^{\text{CDb}}$
PI_2R	$30,17 \pm 1,27^{Ab}$	$19,86 \pm 0,40^{\mathrm{Ab}}$	$1,36 \pm 0,3^{\text{Db}}$
PI_3R	$28,90 \pm 0,60^{ABb}$	$19,34 \pm 0,38^{Ab}$	$1,38 \pm 0.01^{\mathrm{Db}}$
PI_1P	$19,60 \pm 0,28^{Dc}$	$21,52 \pm 0,98^{Ac}$	$1,96 \pm 0,04^{Ac}$
PI_2P	$18,77 \pm 0,37^{\text{Dcd}}$	$22,64 \pm 1,06^{Ac}$	$1,90 \pm 0,10^{Ac}$
PI_3P	$18,49 \pm 0,37^{\mathrm{Dd}}$	$22,80 \pm 0,81^{Ac}$	$1,84 \pm 0,16^{ABc}$

⁽¹⁾ Sobrescritos com letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05) intergrupos; com letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05) intragrupos.

⁽²⁾ PI_XY – Processo EHSP (X= 1, 2, 3 para as diferentes replicatas de processo e Y=A para corrente de alimentação, Y=P para permeado e Y=R para retido).

BCA – Proteínas totais; ABTS e FRAP – capacidade antioxidante.

Ao se analisar a correlação entre as variáveis BCA e GH (Tabela 6.13 e Tabela 6.14), observa-se que na corrente do permeado quanto maior o GH, maior foi o teor de proteínas totais; já, na corrente do retido, essa correlação foi negativa.

Tabela 6.13: Correlação de Pearson entre as variáveis proteínas totais (BCA) e grau de hidrólise (GH) para a corrente do permeado.

		BCA (mg PTN/mL)	GH (%)
BCA (mg PTN.mL ⁻¹)	Correlação de Pearson	1	0,891**
	Sig. (2 extremidades)		0,001
	N	9	9
GH (%)	Correlação de Pearson	0,891**	1
	Sig. (2 extremidades)	0,001	
	N	9	9

^{**.} A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Tabela 6.14: Correlação de Pearson entre as variáveis proteínas totais (BCA) e grau de hidrólise (GH) para a corrente do retido.

		BCA (mg PTN/mL)	GH (%)
BCA (mg PTN.mL ⁻¹)	Correlação de Pearson	1	-0,660
	Sig. (2 extremidades)		0,053
	N	9	9
GH (%)	Correlação de Pearson	-0,660*	1
	Sig. (2 extremidades)	0,053	
	N	9	9

^{*.} A correlação é marginalmente significativa (p < 0,10; 2 extremidades).

A análise estatística mostrou ainda que houve uma boa reprodutibilidade do processo. O coeficiente de variância para cada uma das correntes variou entre 2,64% e 3,39%; 2,37% e 4,36%; e, entre 5,81% e 9,37% para proteínas totais, ABTS e FRAP, respectivamente. Os GH nos três diferentes processos foram: $40,48\% \pm 0,59\%$, $38,35\% \pm 0,75\%$ e $39,02\% \pm 0,78\%$, tendo um coeficiente de variância de apenas 2,87% entre os três processos.

Os resultados obtidos no processo EHSP foram 90% inferiores às melhores respostas de capacidade antioxidante da corrente permeada obtidas no planejamento experimental discutido anteriormente tanto para FRAP quanto para ABTS. Por outro lado, a corrente do permeado apresentou resultado de ABTS superior ao 2 com 20,32 \pm 2,06 mmol TE.mg⁻¹ PTN; e FRAP superior aos 18,50 \pm 0,53 mmol AAE.mg⁻¹ PTN (Ensaio 8) e 18,98 \pm 0,21 mmol AAE.mg⁻¹ PTN (6). Isso comprovou o potencial do processo EHSP.

Esses resultados foram bem superiores aos reportados por Moure, Dominguez e Parajo (2006) cujos valores de capacidade antioxidante pelo método ABTS foram $6,64 \pm 0,02$ mM TE com uma concentração de 5 mg PTN.mL⁻¹ (ou seja: $1,33.10^{-3}$ mmol TE.mg⁻¹ PTN) com massa molar maior do que 50 kDa e uma concentração enzimática de 100 U.g⁻¹ PTN usando *Flavourzyme*.

Observou-se, ainda, que a análise de ABTS não diferiu estatisticamente entre as diferentes correntes. Esse fato também foi notado por Ranamukhaarachchi, Meissner e Moresoli (2013) nos hidrolisados que não sofreram pré-tratamento térmico.

7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os objetivos foram alcançados.

Peptídeos e hidrolisados proteicos foram obtidos a partir da hidrolisa enzimática com Alcalase de um farelo de soja desengordurado proveniente da produção de óleo de soja brasileiro.

O rendimento da extração de proteínas do farelo de soja foi determinado, sendo 149,70 mg IPS.g⁻¹ FS com uma razão farelo de soja: água = 10; e 87,27 mg IPS.g⁻¹ FS com uma razão farelo de soja: água = 15.

As influencias das condições de hidrólise do isolado proteico de farelo de soja obtido foram avaliadas através de um planejamento fatorial completo com dois níveis e três fatores. Na melhor condição de hidrólise, os parâmetros operacionais foram $T = 45^{\circ}C$, E = 0,01 mU. mg⁻¹ PTN, Razão FS: tampão Trizma 5 mg.mL⁻¹. Neste caso, obteve-se peptídeos na corrente do permeado com $4,90 \pm 0,15$ mg PTN.mL⁻¹, GH = $33,48\% \pm 1,01\%$, $326,26 \pm 2,58$ mmol TE.mg⁻¹ PTN e $26,20 \pm 0,00$ mmol AAE.mg⁻¹ PTN de capacidade antioxidante e IER = $102,15 \pm 3,04$ iECA%.(mg/mL PTN)⁻¹ de atividade iECA.

O processo EHSP foi eficiente, em escala de bancada, usando as mesmas condições do melhor ensaio do planejamento fatorial completo, obtendo-se peptídeos bioativos com capacidade antioxidante de 22,42 \pm 0,98 mmol TE.mg⁻¹ PTN e 1,90 \pm 0,11 mmol AAE.mg⁻¹ PTN e com 19,96 \pm 0,58 mg PTN.mL⁻¹ e GH = 39,28% \pm 1,13%.

Esse trabalho foi apresentado na conferência internacional *Total Food 2014*, em Norwich na Inglaterra em novembro de 2014 na forma de pôster. O seu resumo se encontra no ANEXO C.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- (a) Sugere-se para trabalhos futuros um estudo de viabilidade econômica para avaliar o seu verdadeiro potencial de venda;
- (b) É importante ainda a análise por cromatografia líquida de alta eficiência com espectro de massa (CLAE-EM) não somente para analisar a sequência peptídica dos hidrolisados bioativos e sua comparação na literatura, mas também para verificar a ausência de alergênicos da soja nesses hidrolisados;
- (c) A análise da atividade antihipertensiva no processo EHSP, assim como o estudo in vivo das bioatividades desses peptídeos para verificar os efeitos dos mesmos no organismo;
- (d) Realizar o processo EHSP em escala piloto com posterior fracionamento dos peptídeos gerados em diferentes faixas de massa molar por processo com membranas e avaliar suas propriedades;
- (e) Estudar a viabilidade da utilização e aplicabilidade dos hidrolisados como ingrediente na formulação de algum alimento;
- (f) Realização de testes sensoriais para avaliar impedimentos sensoriais, tais como a percepção do gosto amargo nos hidrolisados proteicos obtidos;
- (g) Uso de diferentes membranas de ultrafiltração para avaliar a influência do tamanho da cadeia peptídica sobre as bioatividades avaliadas, funcionalidade e impedimentos sensoriais.

9 BIBLIOGRAFIA

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 3, p. 175-183, Jun 1998. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074638100003 >.

AOYAMA, T. et al. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). **Nutrition,** v. 16, n. 5, p. 349-354, May 2000. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086727700006>.

APROSOJA/MT. Os Usos da Soja - Sobre a Soja - APROSOJA/MT. Disponível em: < http://www.aprosoja.com.br/sobre-a-soja/os-usos-da-soja/ >. Acesso em: Fevereiro.

ARRUDA, N. P. Caracterização de Hidrolisado Proteico como Co-Produto da Extração Aquosa-Enzimática de Óleo de Soja. <u>Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências</u>. Rio de Janeiro: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ: 18-20 p. 1998.

BACK, J.; PROKOPCZUK, M.; RUDOLF, M. Seasonality and the valuation of commodity options. **Journal of Banking & Finance,** v. 37, n. 2, p. 273-290, Feb 2013. ISSN 0378-4266. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312979100004 >.

BAO, X. L. et al. Calcium-binding ability of soy protein hydrolysates. **Chinese Chemical Letters,** v. 18, n. 9, p. 1115-1118, Sep 2007. ISSN 1001-8417. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249711000028>.

BEN HENDA, Y. et al. Measuring Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity by Micro Plate Assays: Comparison Using Marine Cryptides and Tentative Threshold Determinations with Captopril and Losartan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 61, n. 45, p. 10685-10690, Nov 13 2013. ISSN 0021-8561; 1520-5118. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000330160900008 >.Disponível em: < http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/jf403004e >.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, Jul 15 1996. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UY64800010 >.

BERKELMAN, T. et al. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients.

Principles and Methods. Amersham Biosciences, 2002. ISBN 80-6429-60AC.

CELESTE, A. et al. New dual active fusion molecule comprises anti-proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) antibody stably fused to glucagon-like peptide (GLP)-1 peptide, for treating diabetes, controlling glucose, and for promoting weight loss: Medimmune Llc; Medimmune Ltd; Celeste a; Chodorge M; Buchanan a; Rondinone C; Grimsby J; Ravn P; Seaman J; Fairman D.

CHEN, N. N.; ZHAO, M. M.; SUN, W. Z. Effect of protein oxidation on the in vitro digestibility of soy protein isolate. **Food Chemistry,** v. 141, n. 3, p. 3224-3229, Dec 2013. ISSN 0308-8146. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000326766700220>.

CHIANG, W. D. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 725-

732, 2006 2006. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237148700019 >.

CHO, M. J. et al. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 52, n. 19, p. 5895-5901, Sep 22 2004. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223927900022>.

CHOBANIAN, A. V. et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure - The JNC 7 Report. **Jama-Journal of the American Medical Association,** v. 289, n. 19, p. 2560-2572, May 2003. ISSN 0098-7484. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000182976500025 >.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Nono levantamento, junho 2015. 2 2015.

CUI, C. et al. Effect of pH and Pepsin Limited Hydrolysis on the Structure and Functional Properties of Soybean Protein Hydrolysates. **Journal of Food Science,** v. 78, n. 12, p. C1871-C1877, Dec 2013. ISSN 0022-1147; 1750-3841. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000328102200006>.

Dicionário de ciência e tecnologia dos alimentos. São Paulo: Roca, 2008. ISBN 978-85-7241-728-0.

DIEBEL, W. et al. Material property characterization of co-products from biofuel industries: Potential uses in value-added biocomposites. Biomass and Bioenergy: 88-96 p. 2012.

EMBRAPA. Os diferentes usos da soja 2012.

FISCHER, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, n. 27, p. 2985–2993, 1894.

FUKUSHIMA, D. Soy proteins. **Handbook of Food Proteins**, n. 222, p. 210-232, 2011 2011. ISSN 2042-8049. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303421900009>.

GARCIA, M. C. et al. Composition and characterization of soyabean and related products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 37, n. 4, p. 361-391, 1997 1997. ISSN 1040-8398. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XJ35300002>.

GIBBS, B. F. et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International,** v. 37, n. 2, p. 123-131, 2004 2004. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220020900002>.

HE, R. et al. Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. **Food Chemistry,** v. 141, n. 1, p. 153-159, Nov 1 2013. ISSN 0308-8146; 1873-7072. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000321314000025>.

JAMDAR, S. N. et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry,** v. 121, n. 1, p. 178-184, Jul 1 2010. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275360200025>.

JIMENEZ-ESCRIG, A. et al. Health-promoting activities of ultra-filtered okara protein hydrolysates released by in vitro gastrointestinal digestion: identification of active peptide from soybean lipoxygenase. **European Food Research and Technology,** v. 230, n. 4, p. 655-663, Feb 2010. ISSN 1438-2377. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000273589900013 >.

KAO, F.-J. et al. Optimization of Enzymatic Hydrolysis Conditions for Producing Soy Protein Hydrolysate with Maximum Lipolysis-Stimulating Activity. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 19, n. 2, p. 197-201, Jun 2011. ISSN 1021-9498. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292126200013 >.

KLOMPONG, V. et al. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry,** v. 102, n. 4, p. 1317-1327, 2007 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000244940500042>.

KOSHLAND, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 44, n. 2, p. 98-104, 1958-Feb 1958. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://MEDLINE:16590179>.

KOSSEVA, M. R. Processing of Food Wastes. **Advances in Food and Nutrition Research, Vol 58,** v. 58, p. 57-136, 2009 2009. ISSN 1043-4526. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310873800003 >.Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S1043452609580035/1-s2.0-S1043452609580035-main.pdf? tid=0e83c07a-ad45-11e4-be47-00000aacb360&acdnat=1423147463_a2bc3efa5406b47a55584fcb0bdf27d2 >.

KUANG, D. Cosmetic cream, useful for dispelling freckle, comprises subtilisin protease and sweetening additive including white granulated sugar powder, syrup or honey: Yantai Dayang Pharm Co Ltd.

LAMSAL, B. P.; JUNG, S.; JOHNSON, L. A. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. <u>LWT</u>: 1215-1223 p. 2007.

LEE, H. W. et al. Allergenicity of proteolytic hydrolysates of the soybean 11S globulin. **Journal of Food Science,** v. 72, n. 3, p. C168-C172, Apr 2007. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245896000007>.

LI, B.; QIAO, M.; LU, F. Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue). **Food Reviews International,** v. 28, n. 3, p. 231-252, Jul-Sep 2012. ISSN 8755-9129. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303971500001 >.

LI, Q. et al. Commercial proteases: Present and future. **Febs Letters,** v. 587, n. 8, p. 1155-1163, Apr 17 2013. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000317188700021>.

LIM, S. S.; VOS, T.; FLAXMAN, A. D. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 (vol 380, pg 2224, 2012). **Lancet,** v. 381, n. 9874, p. 1276-1276, Apr 13 2013. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000317351000028>.

LIU, Q. et al. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry,** v. 118, n. 2, p. 403-

410, Jan 15 2010. ISSN 0308-8146; 1873-7072. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000270526300031>.

LIU, T.-X.; ZHAO, M. Physical and chemical modification of SPI as a potential means to enhance small peptide contents and antioxidant activity found in hydrolysates. **Innovative Food Science & Emerging Technologies,** v. 11, n. 4, p. 677-683, Oct 2010. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284812700023 >.

LO, W. M. Y.; LI-CHAN, E. C. Y. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 53, n. 9, p. 3369-3376, May 4 2005. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228810200017 >.Disponível em: < http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/jf048174d>.

LUSAS, E. W.; RIAZ, M. N. SOY PROTEIN PRODUCTS - PROCESSING AND USE. **Journal of Nutrition,** v. 125, n. 3, p. S573-S580, Mar 1995. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995QM16100004>.

MA, W.; YANG, R. Treating ophthalmology disease, e.g. diabetic retinopathy, neovascular glaucoma, and senile macular degeneration comprises degradation, interdiction, combination and inhibition of morbigenous content in vitreous body and/or retina: MA W (MAWW-Individual).

MALLIKARJUN GOUDA, K. G. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (Glycine max). **Journal of agricultural and food chemistry,** v. 54, n. 13, p. 4568-73, 2006-Jun-28 2006. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://MEDLINE:16786999 >.

MAPA. Saiba Mais. 2015a. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja/saiba-mais >. Acesso em: 02.06.2015.

_____. Soja. Cultura, 2015b. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja >. Acesso em: 02.06.2015.

MATEOS-APARICIO, I. et al. Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. **Carbohydrate Polymers,** v. 82, n. 2, p. 245-250, Sep 5 2010. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280574600004 >.

MATOBA, T.; HATA, T. RELATIONSHIP BETWEEN BITTERNESS OF PEPTIDES AND THEIR CHEMICAL STRUCTURES. **Agricultural and Biological Chemistry,** v. 36, n. 8, p. 1423-&, 1972 1972. ISSN 0002-1369. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1972N731000019>.

MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry,** v. 41, n. 2, p. 447-456, Feb 2006. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234624200027 >.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 642-646, Jun-Jul 2001. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170455400003 >.Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x/asset/j.1365-

2621.2001.tb04614.x.pdf?v=1&t=i5s92kgg&s=9a3a4f3e2de1d65f15883d08b0c28b0a29409c ae >.

PARK, S. Y. et al. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANT PEPTIDES FROM SOY PROTEIN HYDROLYSATE. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 120-132, Mar 2010. ISSN 0145-8884; 1745-4514. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000275884000009 >.Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4514.2009.00313.x/abstract >.Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1745-4514.2009.00313.x/asset/j.1745-4514.2009.00313.x.pdf?v=1&t=i5s95o7b&s=1d13b067bf48c6653c1be440836b803b96bb452 a >.

PHILIPP, M.; BENDER, M. L. KINETICS OF SUBTILISIN AND THIOLSUBTILISIN. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 51, n. 1, p. 5-32, 1983 1983. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983QN48200001 >.

RANAMUKHAARACHCHI, S.; MEISSNER, L.; MORESOLI, C. Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. **Journal of Membrane Science,** v. 429, p. 81-87, Feb 15 2013. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314115500010>.

RAYAPROLU, S. J. et al. **Peptides derived from high oleic acid soybean meals inhibit colon, liver and lung cancer cell growth**. Food Research International: 282-288 p. 2013.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, May 1999. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000080705000021 >.Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0891584998003153/1-s2.0-S0891584998003153-

main.pdf?_tid=074770d0-426b-11e4-ae9b-

00000aab0f01&acdnat=1411398997_c12495bc6533fc715d272ec288df760d >.

ROSIN, P.; RAMMLER, E. The laws governing the fineness of powdered coal. **J. Inst. Fuel,** v. 7, p. 29–36, 1933.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides,** v. 31, n. 10, p. 1949-1956, Oct 2010. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282617200024>.

SAVAGE, J. H. et al. The natural history of soy allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology,** v. 125, n. 3, p. 683-686, Mar 2010. ISSN 0091-6749. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275883200026>.

SCHMITKE, J. L.; STERN, L. J.; KLIBANOV, A. M. The crystal structure of subtilisin Carlsberg in anhydrous dioxane and its comparison with those in water and acetonitrile. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 94, n. 9, p. 4250-4255, Apr 29 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WX36200005>.

SCHUMANN. Tech. Paper 1189. Am. Inst. Min. Metall. Pet. Eng. 1940

SHARP, S. I. et al. Hypertension is a potential risk factor for vascular dementia: systematic review. **International Journal of Geriatric Psychiatry,** v. 26, n. 7, p. 661-669, Jul 2011. ISSN 0885-6230. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289697100001 >.

SIEZEN, R. J.; LEUNISSEN, J. A. M. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. **Protein Science,** v. 6, n. 3, p. 501-523, Mar 1997. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WM74000001 >.

SMITH, P. K. et al. MEASUREMENT OF PROTEIN USING BICINCHONINIC ACID. **Analytical Biochemistry,** v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985 1985. ISSN 0003-2697. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:A1985ASJ2400010>.

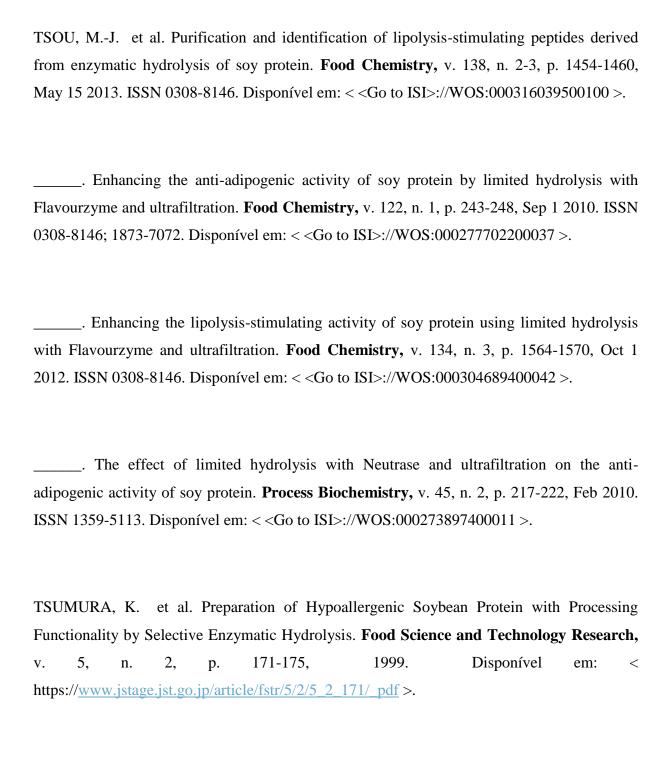
STENZEL, M. et al. The influence of particle size in the enzymatic extraction of soybean meal protein. **Acta Scientiarum-Technology,** v. 31, n. 2, p. 195-200, 2009 2009. ISSN 1806-2563. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268277200009>.

SUNG, D. et al. Allergenicity of an enzymatic hydrolysate of soybean 2S protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** v. 94, n. 12, p. 2482-2487, Sep 2014. ISSN 0022-5142. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000339712900016 >.

SUNG, M.-J.; PARK, Y.-S.; CHANG, H.-G. Quality characteristics of sponge cake supplemented with soy protein concentrate. **Food Science and Biotechnology,** v. 15, n. 6, p. 860-865, Dec 2006. ISSN 1226-7708. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243333200007>.

TAMURA, A.; KAWABATA, M. Novel mutated subtilisin having more activity compared with wild-type enzyme, in low temperature, useful in tanning and food processing industries: New Ind Res Org.

THAKUR, M.; HURBURGH, C. R. Quality of US Soybean Meal Compared to the Quality of Soybean Meal from Other Origins. J Am Oil Chem Soc: 835-843 p. 2007.



VANDENBURG, B. et al. IDENTIFICATION OF AUTODIGESTION TARGET SITES IN BACILLUS-SUBTILIS NEUTRAL PROTEINASE. **Biochemical Journal,** v. 272, n. 1, p. 93-97, Nov 15 1990. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990EK06600013>.

VERNAZA, M. G. et al. Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2217-2225, Oct 15 2012. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305859800067>.

VILLANUEVA, M. J. et al. Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. **Food Chemistry,** v. 124, n. 1, p. 72-79, Jan 1 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282500000011>.

VOJCIC, L. et al. Advances in protease engineering for laundry detergents. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 629-634, Dec 25 2015. ISSN 1871-6784. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000360920400014 >.

WANG, T. et al. Advances of Research on Glycinin and beta-Conglycinin: A Review of Two Major Soybean Allergenic Proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 54, n. 7, p. 850-862, Jan 1 2014. ISSN 1040-8398. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000330692700002 >.

WANG, Z. et al. Reduction of the allergenic protein in soybean meal by enzymatic hydrolysis. **Food and Agricultural Immunology,** v. 25, n. 3, p. 301-310, Jul 3 2014. ISSN 0954-0105. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000334825700001 >.

XIANGZHEN, K. et al. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. **Bioresource Technology,** v. 99, n. 18, p. 8873-8879, 2008 2008. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <Go to ISI>://FSTA:2008-12-Gg1823>.

XIAO, C. W. Functional soy products. **Functional Foods: Concept to Product, 2nd Edition**, n. 205, p. 534-556, 2011 2011. ISSN 2042-8049. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000300723100023>.

XU, H.; TAN, S. M.; LI, S. Q. Effects of soybean fibers on blood sugar, lipid levels and hepatic-nephritic histomorphology in mice with diabetes mellitus. **Biomedical and Environmental Sciences,** v. 14, n. 3, p. 256-261, Sep 2001. ISSN 0895-3988. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000171205000012>.

YOKOMIZO, A.; TAKENAKA, Y.; TAKENAKA, T. Antioxidative activity of peptides prepared from Okara protein. **Food Science and Technology Research,** v. 8, n. 4, p. 357-359, Nov 2002. ISSN 1344-6606. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180210100013 >.

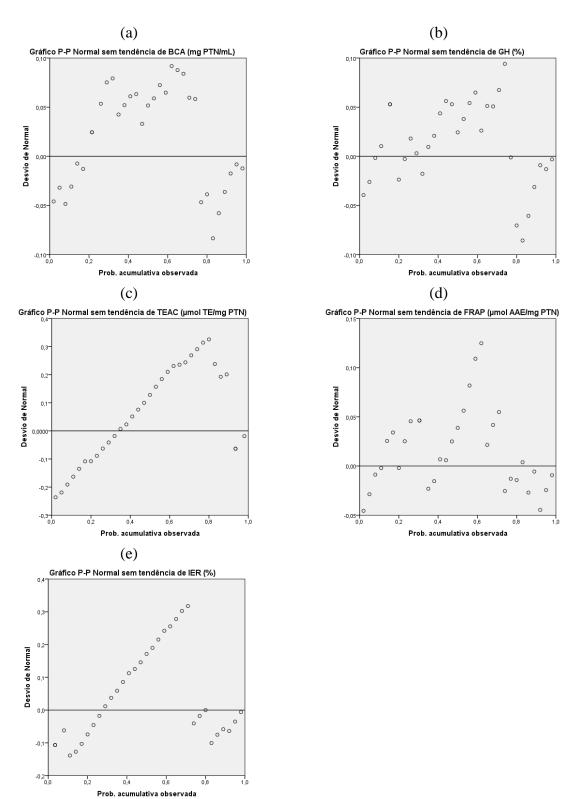
ZAFALON, M. Soja supera minério de ferro e lidera exportações do país em 2014. <u>Folha</u> de São Paulo. São Paulo 2015.

ZHANG, L.; LI, J.; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2084-2089, Apr 2010. ISSN 0960-8524; 1873-2976. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274609900003 >.

10 ANEXOS

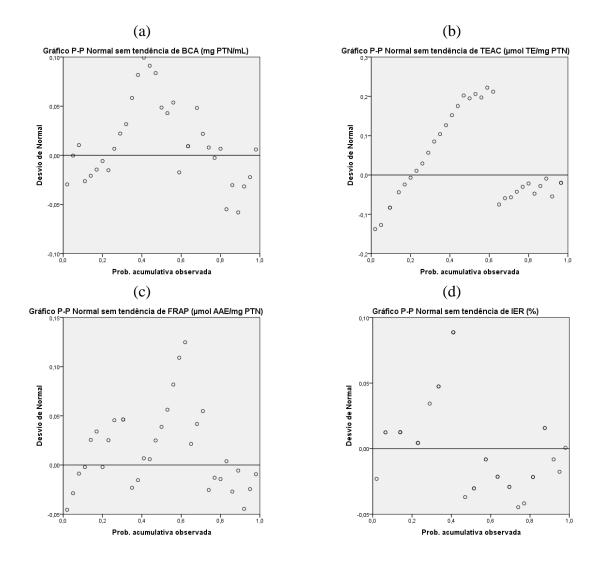
10.1 ANEXO A

Gráficos P-P normal de (a) BCA, (b) GH, (c) ABTS, (d) FRAP e (e) IER.



10.2 ANEXO B

Gráficos P-P normal de (a) BCA, (b) ABTS, (c) FRAP e (d) IER.



10.3 ANEXO C

Evaluation of an integrative process for obtaining soymeal derived bioactive peptides

Natalia Barbosa Eitel¹², Renata Tonon³, Suely Pereira Freitas², Paula Jauregi¹

¹University of Reading, Reading/UK; <u>n.b.eitel@pgr.reading.ac.uk</u>

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/Brazil

³EMBRAPA Agroindustria de Alimentos, Rio de Janeiro/Brazil

According to the United States Department of Agriculture (USDA) 44.61 million metric tons of Soybean oil have been produced in 2013/14, generating 58.05 million metric tons of meal. The residual soybean meal is being destined mainly to the feed industries. One must take into account that with an increasing demand of vegetable oils, the residual meal production will also increase. This can affect biofuels and edible oil industries negatively, since the feed industry can become saturated and therefore the produced meal wouldn't have a destination. Thus, it is very important to diversify its use. Many studies are being carried out on different beneficial bioactivities of the soybean derived hydrolysates. It has been reported its high antioxidant capacity, antitumor and anti-hypertensive activities, etc. The aim of this study was, therefore, to analyse different hydrolysis conditions for recovering bioactive peptides. Preliminary results show a high protein content (25 g/L). The effect of soya meal particle size is being investigated on the yield of protein extraction. In addition a 2³ full factorial design with a centre point triplicate in bench scale will be performed to evaluate the effects of the H₂O: meal ratio (5-15), the enzyme concentration (1%-3%) and the pH of the suspension (4-7) in the antioxidant and antihypertensive bioactivities of the peptides.