

DANIEL MANTOVANI

**BIOCONVERSÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSÍDICAS EM ISOFLAVONAS
AGLICONAS DO MELAÇO DE SOJA**

**MARINGÁ – PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

DANIEL MANTOVANI

**BIOCONVERSÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSÍDICAS EM ISOFLAVONAS
AGLICONAS DO MELAÇO DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

**MARINGÁ – PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M293b Mantovani, Daniel
Bioconversão de isoflavonas glicosídicas em
isoflavonas agliconas do melão de soja / Daniel
Mantovani. -- Maringá, 2010.
58 f. : il. color.

Orientador : Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Programa de Pós-graduação em Agronomia,
área de concentração: Produção Vegetal, 2010.

1. Melão de soja - Bioconversão - Isoflavonas.
2. Melão de soja - Fermentação. 3. Melão de soja -
Beta glicosidase. 4. Melão de soja - Fungos. 5.
Melão de soja - Farelo de trigo. I. Universidade
Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em
Agronomia. Área de concentração: Produção Vegetal.
II. Título.


CDD 21.ed.664

DANIEL MANTOVANI


**BIOCONVERSÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSÍDICAS EM
ISOFLAVONAS AGLICONAS DO MELAÇO DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

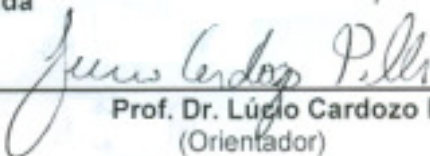
APROVADA EM 05 DE FEVEREIRO DE 2010.



Prof. Dr. Kátia Regina Freitas
Schwan Estrada



Prof. Dr. Everton Fernando Zanoelo



Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho
(Orientador)

DEDICO

Ao meu pai Nilso (*in memoriam*)

A *Deus* pela minha vida;

Aos meus maravilhosos pais, Lúcia
e Domingos que sempre estiveram ao
meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis
encontrados durante o curso, suas palavras me
trouxeram força para poder vencer e estar
aqui hoje usufruindo deste momento tão
especial em minha vida.

Obrigado

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade de realizar o Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Aos professores de Pós-Graduação pela passagem de seus conhecimentos e experiências.

E em especial ao meu orientador Professor Dr. Lúcio Cardozo Filho do Departamento de Agronomia, pelas suas idéias aplicadas neste trabalho, amizade, dedicação e compreensão.

À professora Dra. Gisella Maria Zanin por ter cedido gentilmente toda a infraestrutura do seu laboratório que possibilitou a concretização deste trabalho.

À Profa. MSc Leonilda Correia dos Santos e seus colaboradores, pela sua grande força imposta durante uma das etapas deste trabalho, na doação dos fungos com ATCC, auxílio no isolamento de fungos ambientais, análises microbiológicas e por ceder gentilmente seu local de trabalho.

Ao professor Dr. Sílvio Claudio da Costa pelo acompanhamento deste trabalho.

À minha noiva Solange, pelo amor, carinho, compreensão e apoio em todos os momentos, que foram passados durante o transcorrer de nossas vidas.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus amigos pelos momentos que passamos reunidos em pesquisas, reuniões e conversas afora, Fernando Voll, Rogério Favaretto, Christian G. Alonso, Professor Vladimir, Marcos Kunita, Miguel, Guilherme, Willyan, Márcio, Celso, Wilson e aos que já concretizaram essa fase Marcelo B. Grings e demais colegas.

Aos técnicos e engenheiros do Departamento de Engenharia Química em especial ao Engenheiro Lauro Kambara, pelo seu apoio em momentos de dificuldade no laboratório, Milton, Marilene, Luiza, Luizinho e demais colaboradores não mencionados obrigado pelo carinho, respeito e amizade.

Ao pessoal da oficina pelos diversos momentos de ajuda para consertos de equipamentos Donizete, Sebastião e Fernando.

BIOGRAFIA

DANIEL MANTOVANI, filho de Nilso Mantovani e Lúcia de Avilla Mantovani, nasceu em Missal, Estado do Paraná, no dia 01 de fevereiro de 1980.

Seu segundo grau foi realizado no antigo CEFET – Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná em Medianeira - PR nos anos de 1997 a 2000, obtendo o título de Técnico em Alimentos.

Tecnólogo em Alimentos pela Universidade Federal Tecnológica do Paraná UTFPR de 2002 a 2006.

Especialista na área de Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Maringá, UEM, de 2006 a 2007.

Em março de 2008 iniciou o Curso de Pós-Graduação em Agronomia em nível de Mestrado, na área de concentração em Produção Vegetal, pela Universidade Estadual de Maringá – Maringá - PR.

Especialização área de Métodos e Técnicas de Educação pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná UFPR, de 2009 a 2010.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURASix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL	3
1.1.2 Objetivo Específico	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS ISOFLAVONAS SOBRE O ORGANISMO.....	5
2.1.1 A atuação das isoflavonas no combate às doenças	5
2.1.2 Estudo da soja dirigido na atuação contra o câncer	6
2.1.3 Estudo da soja dirigido a doenças coronárias	7
2.1.4 Estudo da soja dirigido a osteoporose	8
2.1.5 Atuação como antioxidante	9
2.1.6 Atividade Estrogênica	9
2.1.7 Biodisponibilidade de isoflavonas no organismo	11
2.2 FLAVONÓIDES E SUAS DIVISÕES.....	12
2.2.1 Fatores genéticos, ambientais, enzimáticos e industriais que influenciam na quantidade de isoflavonas presentes na soja 14	
2.2.2 Utilização da soja e sua aplicabilidade industrial	15
2.2.3 Produtos derivados de soja	16
2.2.4 Processo de produção dos farináceos de soja e seu subproduto	24
2.3 A ENZIMA β -GLICOSIDASE (EC 3.2.1.21).....	19
2.3.1 O uso dos fungos filamentosos para produção de enzimas .	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 MATERIAIS.....	22
3.1.1 Reagentes	22

3.1.2	Microrganismos utilizados para produção de β-glicosidase	23
3.1.3	Preparo da cultura sólida	26
3.1.4	Manutenção dos microrganismos	26
3.1.5	Produção do inóculo	26
3.2	PRODUÇÃO DE β-GLICOSIDASE MICROBIANA POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA	27
3.2.1	Extração enzimática	28
3.2.2	Determinação da atividade de β-glicosidase	29
3.2.3	Determinação de proteínas totais	29
3.3	EXTRAÇÃO DAS ISOFLAVONAS	31
3.3.1	Determinação dos compostos de isoflavonas por CLAE	31
3.3.2	Conversão de isoflavona glicosídica em isoflavona aglicona a partir da enzima β-glicosidase em extrato bruto microbiano	32
3.3.3	Métodos físico-químicos e cromatográficos no melão de soja	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	PRODUÇÃO DE ENZIMA β-GLICOSIDASE A PARTIR DA FES E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA	34
4.2	QUANTIFICAÇÃO DO MELAÇO DE SOJA SEM ADIÇÃO DE ENZIMA β-GLICOSIDASE	36
4.3	PROCESSO DE BIOCONVERSÃO UTILIZANDO A ENZIMA β-GLICOSIDASE	37
5.	CONCLUSÕES	42
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
	APÊNDICES	54
	APÊNDICE A	54
	APÊNDICE B	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação de afinidade de diversos compostos aos receptores ER- α e ER- β 11
Tabela 2	Teores das concentrações de isoflavonas totais presentes em soja e seus derivados 17
Tabela 3	Transformações microbianas de alguns compostos de flavonóides..... 21
Tabela 4	Quantidades utilizadas para o processo de bioconversão de compostos glicosídicos em compostos agliconas..... 32
Tabela 5	Teores físico-químicos e cromatográficos de carboidratos totais e seus compostos presentes no melaço de soja 33
Tabela 6	Valores da atividade enzimática de β -glicosidase microbiana extrato bruto substrato farelo de trigo 35
Tabela 7	Valores da atividade enzimática de β -glicosidase microbiana extrato bruto substrato farinha de soja desengordurada..... 36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Similaridade nas estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17- β -estradiol e a isoflavonas genisteína10
Figura 2	Estrutura química das isoflavonas agliconas da soja13
Figura 3	Estrutura química das isoflavonas β -glicosídicas e seu subgrupo acetil e malonil presente na soja..... .13
Figura 4	Fluxograma simplificado do processo de produção do subproduto melaço de soja..... .18
Figura 5	Atuação da enzima β -glicosidase na quebra da ligação glicosídica β -1,4 resultando na liberação da glicose..... .20
Figura 6	Fluxograma simplificado do processo das etapas realizadas25
Figura 7	Aspecto físico dos extratos enzimáticos de enzima β -glicosidase após a fermentação em estado sólido29
Figura 8	Efeito do tempo de reação do p-nitrofenol sobre atividade enzimática..... .30
Figura 9	Valores de atividade enzimática de β -glicosidase em extrato bruto após 96 horas de processo fermentação FES..... .35
Figura 10	Valores dos compostos daidzina, genistina, daidzeína e genisteína presentes no melaço de soja sem adição de enzima β -glicosidase..... .37
Figura 11	Valor do composto daidzeína em extrato concentrado após o processo de bioconversão a 40 °C durante 30 minutos..... .38
Figura 12	Valor do composto genisteína em extrato concentrado após o processo de bioconversão a 40 °C durante 30 minutos..... .38
Figura 13	Perfis dos cromatogramas referente à bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas em função do extrato concentrado de melaço de soja..... .40
Figura 14	Valores para os tratamentos em extrato metanólico e extrato concentrado41

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	-	American type culture collection
FES	-	Fermentação em estado Sólido
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
SPC	-	Farelo concentrado protéico
FDA	-	Agência norte americana que regulamenta o uso de medicamentos e alimentos
GRAS	-	Geralmente conhecido como um produto seguro
ER	-	Receptores de estrogênio
LDL	-	Lipoproteínas de baixa densidade
HDL	-	Lipoproteínas de alta densidade
WHO	-	Organização Mundial da saúde
TRH	-	Terapia de reposição hormonal
SERMs	-	Moduladores seletivos dos receptores estrogênicos
IGF-1	-	Hormônio de crescimento
pNPG	-	p-nitrofenil- β -glicosídeo

RESUMO

DANIEL MANTOVANI, Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2010. **Bioconversão de isoflavonas glicosídicas em isoflavonas agliconas do melaço de soja.** Professor orientador: Dr. Lúcio Cardozo Filho. Professora Co-orientadora: Dra. Gisella Maria Zanin.

Dentre os diversos alimentos funcionais disponíveis atualmente, as isoflavonas se destacam pelos efeitos biológicos e benéficos à saúde humana (atividade estrogênica, anti-estrogênica, antioxidante, antifúngica, entre outros) e principalmente pela ação dos fitoestrógenos, que são as formas mais comuns das isoflavonas, sendo predominantemente encontradas em leguminosas. São especialmente abundantes na soja e seus derivados farináceos e subprodutos, como o melaço de soja. Na natureza, as isoflavonas são encontradas predominantemente na forma de glicosídicos (daidzina, genistina e glicitina), os quais não são assimilados pelo organismo, devido à presença deste açúcar em sua composição. Para que ocorra a assimilação das isoflavonas pelo organismo, é necessário que a mesma se encontre em sua forma aglicona (sem a presença da molécula de açúcar). O presente trabalho propôs como objetivo a bioconversão de compostos glicosídicos em agliconas usando o melaço de soja como fonte de isoflavonas. A enzima β -glicosidase utilizada na bioconversão foi produzida a partir de diferentes microrganismos filamentosos do gênero *Aspergillus* (*niger* ATCC 16404, *oryzae* ATCC 1003, *niger* isolado do solo no Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional, *niger* isolado do ar *indoor* no Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional) empregando o processo de fermentação no estado sólido (FES) contendo os substratos farelo de trigo e a farinha de soja desengordurada. O extrato bruto enzimático contendo a β -glicosidase foi empregado diretamente ao processo de bioconversão sem tratamento prévio de purificação. O maior valor de atividade enzimática determinado, 7,6 U/mg, foi obtido usando o *Aspergillus oryzae* ATCC 1003, empregando como substrato o farelo de trigo. O valor de 5,9 U/mg de atividade enzimática foi obtido usando o *Aspergillus niger* ar *indoor*, empregando o substrato com farinha de soja desengordurada. A reação da hidrólise usando os fungos *Aspergillus niger* 16404, *Aspergillus oryzae* ATCC 1003, *Aspergillus niger* solo e *Aspergillus niger* ar *indoor* para a produção de extrato bruto enzimático contendo β -glicosidase a 40 °C por 30 minutos proporcionou 100% de bioconversão para todos os compostos glicosídicos em agliconas. Todas as enzimas produzidas neste estudo, utilizando-se fungos do gênero *Aspergillus*, convertem compostos de isoflavonas glicosídicas (daidzina e genistina) em compostos de isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína). Os compostos glicosídicos e agliconas foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia proposta mostrou-se eficiente para bioconversão de glicosídicos em agliconas a partir do resíduo industrial de melaço de soja.

Palavras-chave: melação de soja, *Aspergillus*, bioconversão, β -glicosidase, agliconas.

ABSTRACT

DANIEL MANTOVANI, State University of Maringá, February, 2010. **Glycoside isoflavones bioconversion into aglycone isoflavones from soy molasses.** Adviser professor: Dr. Lúcio Cardozo Filho. Co-adviser professor: Dra. Gisella Maria Zanin.

Among several functional foods available nowadays, isoflavones are important due to beneficial biological effects to human health (estrogenic, antiestrogenic, antioxidant, and antifungal activity among others) particularly because of phytoestrogens, which are the most common isoflavone types and are predominantly found in legumes. They are especially abundant in soybean, its farinaceous products, and subproducts such as soy molasses. In nature isoflavones are predominantly found as glycosides (daidzin, genistin and glycitein) which are not assimilated by our organism due to the presence of sugar in their composition. For the assimilation of isoflavones to occur in the body, it is necessary that they are in their aglycone form (without the presence of sugar molecule). The aim of this work was the bioconversion of glycoside compounds into aglycones using soy molasses as an isoflavone source. The β -glucosidase enzyme used in bioconversion was produced from different filamentous microorganisms of the genre *Aspergillus* (*niger* ATCC 16404, *oryzae* ATCC 1003, *niger* isolated from soil at the 'Laboratório Ambiental' of 'Itaipu Binacional', *niger* isolated from indoor atmosphere at the 'Laboratório Ambiental' of 'Itaipu Binacional') using the process of solid state fermentation (SSF), and wheat bran and defatted soy flour as substrates. The crude extract containing the enzyme β -glucosidase was used directly to the bioconversion process without prior purification treatment. The highest enzyme specific activity value, 7.6 U/mg, was obtained using *Aspergillus oryzae* ATCC 1003 and wheat bran as substrate. The value of 5.9 U/mg enzyme activity was obtained using the *Aspergillus niger* indoor air employing the substrate with defatted soy flour. The reaction of hydrolysis using 16404 *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ATCC 1003, *Aspergillus niger* and *Aspergillus niger* soil indoor air for the production of crude enzyme with β -glucosidase at 40 °C for 30 minutes provided 100% bioconversion of all glycoside compounds into aglycones. All enzymes produced in this study using the genre *Aspergillus* converted glycoside isoflavone compounds (daidzin and genistin) into aglycone isoflavone compounds (daidzein and genistein). Glycoside and aglycone compounds were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The proposed methodology was efficient for bioconversion of aglycones into glycosides from industrial waste of soy molasses.

Key words: soy molasses, *Aspergillus*, bioconversion, β -glucosidase, aglycones.

1. INTRODUÇÃO

A produção nacional de soja no Brasil indica uma safra de 65,16 milhões de toneladas em 2009/10, apresentando um aumento de 598,1 mil toneladas em relação ao último levantamento da safra de 2008/09 (CONAB, 2010).

Os nutrientes presentes na soja fazem com que ela seja considerada um alimento de alto valor nutricional. As proteínas e isoflavonas presentes no grão de soja são os principais componentes utilizados como compostos funcionais na alimentação humana.

As isoflavonas são as formas mais comuns de fitoestrógenos encontrados na natureza apresentando semelhança estrutural com os hormônios estrogênicos, entre eles o 17 β -estradiol (GENOVESE e LAJOLO, 2001).

Estudos apontam que nenhum animal ou vegetal tem a capacidade de fornecer uma quantidade tão grande de proteínas por hectare ao ano como a soja. A composição protéica da soja apresenta uma variedade muito grande de aminoácidos essenciais ao organismo (KATZ, 1998). Indústrias investem em pesquisas e desenvolvimento de novos produtos, transformando o farelo de soja de 48% em farelo concentrado protéico (SPC) para 60 a 70% de teor de proteína (Imcopa, 2009).

A partir de uma tonelada de farelo de soja, são produzidos 750 kg de SPC, os quais geram 250 kg de um subproduto conhecido como melaço de soja, e diferentemente do SPC, o melaço de soja é um subproduto de baixo valor comercial e gerador de grande impacto ambiental.

Atualmente, o melaço de soja é utilizado principalmente como um ingrediente na nutrição animal e geração de vapor em caldeiras (CEGLA e SHUSTER, 2005).

O melaço de soja também apresenta isoflavonas glicosídicas em sua composição. No entanto, após transformações bioquímicas via enzimas celulíticas como as β -glicosidases, ocorre à conversão das isoflavonas glicosídicas em isoflavonas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína)

benéficas à saúde de fácil assimilação pelo organismo (MATSUURA et al., 1993; PARK et al., 2001a).

Fungos das espécies *Aspergillus* e *Trichoderma* são bem conhecidos e eficientes produtores de enzimas celulíticas compreendendo as formas endo-1,4- β -glucanases, celobiohidrolases, exo-1,4- β -glicosidases e β -glicosidases (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004).

A enzima β -glicosidase atua na retirada da molécula de glicose das isoflavonas glicosídicas aumentando o teor de isoflavonas agliconas (SETCHELL et al., 2002; XU et al., 1995). A enzima β -glicosidase apresenta diversas aplicabilidades em subprodutos agroindustriais provindos do processamento da indústria de soja, atuando principalmente em reações de hidrólise (PARK et al., 2001a).

A literatura abrange trabalhos relacionados para obtenção de isoflavonas agliconas provindas da fermentação de diversos produtos fermentados entre eles: *tofu*, *tempeh*, *shoyu* e *miso*, consumidos principalmente em países asiáticos. As principais fermentações podem ocorrer na forma sólida, sem adição de água ou semi-sólida, com adição de água e adição de nutrientes necessários ao crescimento microbiano, podendo ser utilizado em grãos de soja, farelo de soja, proteína texturizada e isolado de soja entre outros produtos derivados de soja.

Estudos já realizados demonstraram altos teores em $\mu\text{g/g}$ durante a hidrólise de compostos glicosídicos em agliconas quando relacionados à associação da atividade da enzima β -glicosidase, produzida a partir de microrganismos filamentosos. Essa confirmação já foi realizada por Park et al. (2001b), Aguiar et al. (2003) e IBE et al (2001), os quais avaliaram o uso de microrganismos filamentosos *Aspergillus oryzae* ATCC 22786. Chun et al. (2008) reportaram o uso dos microrganismos *Streptococcus infantarius* 12 e *Weissella* sp. 4 na produção de β -glicosidase e sua bioconversão em compostos agliconas, reportando que 99% das formas glicosiladas daidzina e genistina foram convertidas em agliconas daidzeína e genisteína após um período de 6 h de fermentação. Estudos *in vivo* realizados por Pereira et al. (2002) comprovaram que os compostos agliconas presentes no melão de soja apresentam biodisponibilidade durante a ingestão. Seus estudos clínicos

realizados em ratos demonstraram que as isoflavonas presentes no extrato obtido do melão da soja são absorvidas e metabolizadas contribuindo, desta forma, para a validação de seus estudos experimentais e clínicos.

Estudos realizados por Pereira et al. (2002), Allred et al. (2004) e Allred et al. (2005) são uns dos poucos trabalhos encontrados relacionados à obtenção de isoflavonas a partir de resíduos do processo dos derivados de soja, com boas perspectivas de transformação em outros produtos com alto valor comercial. Diante desta perspectiva, vislumbrou-se o reaproveitamento do melão de soja para a obtenção de isoflavonas agliconas utilizando um processo de bioconversão enzimática via enzima β -glicosidase produzida a partir de fungos filamentosos sem nenhuma etapa de purificação.

1.1 OBJETIVO

A bioconversão de compostos glicosídicos em compostos agliconas, presentes no melão de soja, resíduo industrial, empregando a enzima β -glicosidase, extrato bruto sem purificação, produzido pelos fungos filamentosos *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Apergillus niger* ambiental e *Aspergillus oryzae* ATCC 1003 por fermentação no estado sólido.

1.1.2 Objetivos Específicos

Para alcançar os objetivos específicos foi necessário executar as seguintes metas:

- A primeira meta foi a seleção dos fungos utilizados para a produção de enzima β -glicosidase. As etapas necessárias para realizar essa meta foram: protocolo de crescimento, identificação e isolamento dos fungos de interesse.
- A segunda meta foi a produção de enzima β -glicosidase utilizando diferentes substratos (farelo de trigo e farinha de soja desengordurada).

A etapa necessária para realizar essa meta foi o uso do processo da FES.

- A terceira meta foi a extração das isoflavonas a partir do melaço de soja. As etapas necessárias para realizar essa meta foram: extração via solução aquosa de metanol a 80%, temperatura ambiente, razão de massa de melaço de soja e solvente de 1:20, centrifugação e concentração à vácuo.
- A quarta meta foi a identificação e a quantificação dos compostos presente no melaço de soja. As etapas necessárias foram: as análises de composição centesimal e mineral e perfil cromatográfico das isoflavonas presentes no melaço de soja.
- A quinta meta foi a bioconversão, utilizando a enzima β -glicosidase não purificada, aos compostos glicosídicos de daidzina e de genistina transformando em compostos agliconas daidzeína e genisteína. As etapas necessárias para realizar a meta proposta foram: a aplicação do processo da FES e a quantificação dos compostos utilizando a CLAE.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS ISOFLAVONAS SOBRE O ORGANISMO

As isoflavonas agliconas, daidzeína, genisteína e gliciteína promovem atividade anti-estrogênica por possuírem várias propriedades biológicas benéficas à saúde humana. Entre os efeitos podemos citar a inibição da atividade enzimática, a capacidade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana dentre outras atividades biológicas tornando os alimentos que contém isoflavonas alimentos funcionais (SETCHELL, 1998). O órgão fiscalizador *Food and Drug Administration* (FDA, 1999) concedeu o certificado *Generally Recognized as Safe* (GRAS) às isoflavonas devido às suas propriedades funcionais.

2.1.1 A atuação das isoflavonas no combate a doenças

Infelizmente no Brasil o câncer é apresentado como a segunda causa de morte por doenças. Dados relataram que o câncer é superado somente pelas doenças cardiovasculares (PARKIN e MUIR, 1994). A incidência do câncer é expressiva quando comparada internacionalmente por exibir um perfil próprio, diferente do observado em outros países (MARIGO, 1994). Estudos demonstraram que cerca de 35% dos diversos tipos de câncer ocorrem em razão de dietas inadequadas (DOLL e PETO, 1981). A associação entre padrões alimentares e a prevalência de câncer é identificada por meios de estudos epidemiológicos (BYERS, 1999).

Há diversas pesquisas relacionadas ao uso de isoflavonas de soja e seus derivados para benefício da saúde, devido ao seu potencial de reduzir as ocorrências de doenças ligadas a seres humanos tais como câncer de mama, próstata, câncer do cólon, doenças cardiovasculares, osteoporose, sintomas da menopausa e diabetes *mellitus* (HASLER, 1998; MESSINA et al. 1994; HENDRICH et al. 1994).

A incidência das doenças hiperlipidemia coronariana e síndromes pós-menopausa em asiáticos é insignificante quando comparada aos europeus e americanos, os quais consomem quantidades insignificantes de soja em suas dietas normais (FANTI et al. 2003; HERMAN et al. 1995). Em compensação, as dietas alimentares de chineses e japoneses apresentam grandes quantidades de produtos de soja, os quais podem chegar a apresentar cerca de 40 a 80 mg de isoflavonas de soja para uma alimentação diária.

2.1.2 Estudo da soja dirigido na atuação contra o câncer

Estudos evidenciaram que os níveis de estrogênio são um fator determinante para aumento do risco de câncer (WU et al. 2005). Desta forma, a alimentação rica em alimentos de soja e seus derivados que contenham isoflavonas faz com que as isoflavonas se liguem aos receptores de estrogênio (ER) resultando em resposta estrogênica a nível celular (ALLRED et al. 2004), melhorando, desta forma, a saúde hormonal de mulheres na pré-menopausa levando a um benefício no que diz respeito aos fatores de risco como o de câncer de mama (CASSIDY et al. 1994).

Em compensação, a genisteína é o único composto entre as isoflavonas que possui efeito potencial na inibição do crescimento de células cancerosas em concentrações fisiológicas (ZAVA, 1997).

A genisteína tem sido reportada pela fraca propriedade estrogênica sobre efeitos antioxidantes, para inibição da proteína tirosina kinase, topoisomerase II e oncogênese para induzir diferenciação celular (BARNES, 1995). Outras propostas relacionadas na prevenção de tumores malignos incluem a inibição do sistema tirosinoquinase, a supressão da oncogênese e os efeitos antioxidantes (KASS-ANNESE, 2000). Entretanto Peterson e Barnes (1991) reportaram que a genisteína é um agente anti-cancerígeno potente, semelhante à droga anti-estrogênica tamoxifeno, utilizada na terapia de câncer de mama. Apesar de serem insuficientes para inibir o crescimento de um câncer de mama estabelecido, são suficientes para regular a proliferação de células epiteliais em câncer.

Estudos *in vitro* foram realizados por Messina et al. (2004) no qual relataram que a genisteína tem suprido o crescimento de vários tipos de câncer. Messina et al. (1994) realizaram estudos experimentais em animais sobre o efeito na carcinogênese e a influência em dietas com a presença de isoflavonas.

2.1.3 Estudo da soja dirigido a doenças coronárias

A redução da concentração de colesterol lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no sangue ocorre a partir do consumo de produtos que contenham proteínas de soja aplicadas em diversos estudos com animais e humanos (POTTER, 1996; CARROLL, 1991). Estudos demonstraram elevação das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e redução das LDL em cerca de 10% sobre o organismo (SCHEIBER e REBAR, 1999). Estudo feito por Wong et al. (1998) apontaram que o efeito redutor do colesterol LDL ocorre especialmente em indivíduos hipercolesterolêmicos (redução de 20%).

Anderson et al. (1995) realizaram uma meta-análise de 38 ensaios clínicos comparando o consumo de 47g de proteína de soja/dia, promovendo a redução de 9,3% do colesterol total, 19,9% do LDL e 10,5% dos triglicerídeos. Os valores obtidos para o HDL e LDL não foram significativos. Outro estudo foi realizado com diferentes doses de isoflavonas constatando que a partir de 45mg desses compostos, ou aproximadamente 25g de proteína de soja ao dia, houve uma redução de 5 a 6% do colesterol HDL para homens (CASSIDY et al. 1994; BAKHIT et al. 1994). Um estudo dirigido por Carroll (1991) verificou que houve redução de colesterolemia normal e leve hipercolesterolemia em indivíduos na ordem de 3 e 4%.

Esses e diversos resultados apresentados foram decisivos para que o FDA, em 1999, reconhecesse que o consumo de alimentos que contenham 6,25g de proteína de soja (1/4 da quantidade recomendada pelos estudos, que é de 25g/dia), reduz os níveis de colesterol. Assim, o FDA aprovou, em outubro de 1999, um exemplo de *Health Claim* a qual “dietas com baixo teor de gorduras saturadas e colesterol que incluía 25g de proteína de soja por dia pode reduzir o risco de doença do coração”.

A atuação da soja como agente hipocolesterolemizante é dada pela ligação que as isoflavonas exercem ao ER dentro das células de maneira semelhante ao estradiol, funções que influenciam no metabolismo do colesterol e das lipoproteínas (O'KEEFE, 1996).

2.1.4 Estudo da soja dirigido a osteoporose

Como definição, segundo o *World Health Organization* (WHO, 1994), a osteoporose é o distúrbio ósseo, caracterizado pela diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo sem alterações significativas da proporção entre matriz mineral e não-mineral. A osteoporose aumenta a fragilidade óssea e o risco de fratura.

Dentre as terapias tradicionais no combate a osteoporose de agentes que inibem a reabsorção óssea (entre eles: estrógenos, calcitonina e bisfosfonatos), a anti-reabsorção disponível, conhecida como Terapia de Reposição Hormonal (TRH), é talvez o tratamento mais efetivo. Por outro lado, a TRH vem acompanhada por vários efeitos adversos ao organismo, como o aumento de risco de câncer de mama e de endométrio (ZUMOFF, 1998). Nas últimas décadas houve um grande interesse pelo composto genisteína devido aos numerosos estudos sobre o seu efeito anticarcinogênico ao organismo. Assim como a ação da genisteína ligada a daidzeína desempenha um papel importante na prevenção da osteoporose, estas podem atuar como anti-estrógenos quando os níveis de estrogênio são altos, bem como atuar em mulheres com idade pré-menopausa, e como agonistas de estrogênio quando os níveis destes são baixos, como no caso das mulheres em idade pós-menopausa (MESSINA, 2000).

Em estudo *in vivo* realizado por Potter et al. (1998) em 66 mulheres na pós-menopausa durante um período de 6 meses relacionado a capacidade das isoflavonas em prevenir a osteoporose, foram preparados suplementos à base de soja enriquecidas com 56 mg e 90 mg de isoflavonas. Os autores concluíram que a ingestão da quantidade de 90 mg durante os seis meses pode ser capaz de proteger o organismo contra a perda óssea em vértebras lombares.

Dois mecanismos foram sugeridos por Arjmandi e Smith (2002) para ação da soja e isoflavonas presentes em sua composição sobre a saúde óssea. Primeiro, as isoflavonas são capazes de estimular a atividade osteoblástica pela ativação dos receptores de estrogênio do tipo β localizados nos osteoblastos. Segundo, a soja ou suas isoflavonas podem promover a produção do hormônio de crescimento (IGF-1) que estimula a formação óssea. Os benefícios da proteína de soja e as quantidades de isoflavonas suficientes para promover a saúde óssea ainda não são conclusivos.

2.1.5 Atuação como antioxidante

Produtos fermentados de soja apresentam grande potencial para propriedade antioxidante (REN et al. 2006). Existem diversos outros compostos naturais responsáveis pela ação antioxidante presentes na soja, entre eles saponinas, tocoferóis, fitoesteróis e principalmente a presença de compostos isoflavonas (LEE et al. 2004). As isoflavonas exercem propriedades antioxidantes protegendo os alimentos da deterioração oxidativa dos lipídeos (FRITZ, 2003). Naim et al. (1976) relataram que as formas agliconas tem maior poder antioxidante quando relacionadas às formas glicosiladas.

Esaki et al. (1999a) concluíram que os produtos não fermentados de soja quando comparado com os produtos fermentados tiveram suas propriedades antioxidantes aumentadas devido à sua inoculação com microrganismos.

2.1.6 Atividade Estrogênica

As isoflavonas encontradas na natureza estão na forma glicosilada e biologicamente inativa. Após sua ingestão, ocorre um complexo mecanismo enzimático de conversão no trato gastrointestinal, resultando na formação de fenóis heterocíclicos estruturalmente similares ao 17- β -estradiol (MACKEY e EDEN, 1998). Segundo Setchell (1998), as isoflavonas comportam-se como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos e são classificadas como *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs). Estudos relatados por

Murphy (1982) e Messina (2000) concluíram que as isoflavonas apresentam baixa atividade estrogênica na soja, razão essa entre 1×10^{-1} a 1×10^{-4} e 1×10^{-4} a 1×10^{-2} sendo menos ativas em base molar quando comparada com o hormônio feminino 17- β -estradiol (Figura1).

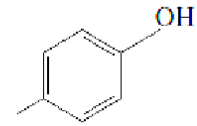


Figura 1 – Similaridade nas estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17- β -estradiol e a isoflavona genisteína (KIM et al., 1998).

A baixa atividade apresentada pelas isoflavonas da soja, quando comparadas aos estrógenos femininos, pode exercer efeitos fisiológicos, quando constatado a presença de níveis de isoflavonas no soro de pessoas que consomem produtos de soja regularmente podendo chegar a 1000 vezes a concentração dos estrogênios endógenos (ADLEURCRETZ et al. 1993). Murphy (1982) comparou a bio-atividade de genisteína e daidzeína em relação ao hormônio sintético dietilestilbestrol encontrando em baixa atividade estrogênica. Já Kuiper et al. (1998) e Messina (2000) demonstraram outra forma de atuação para a genisteína obtendo maior afinidade pelos receptores de estrogênios subtipo ER β localizados nos ossos e sistemas vasculares do que os receptores subtipo ER α localizados principalmente no útero e mama. Kuiper et al. (1997) descreveram as afinidades relativas de vários compostos com os receptores ER- α e ER- β presentes em humanos (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação de afinidade de diversos compostos aos receptores ER- α e ER- β .

Compostos	ER-α	ER- β
Estradiol-17 β	100	100
Estrona	60	37
Estriol	14	21
Progesterona	< 0,001	< 0,001
Testosterona	< 0,01	< 0,01
Coumestrol	94	185
Genisteína	5	36
β -Sitosterol	< 0,001	< 0,001
Tamofixeno	7	6

Fonte: Kuiper et al. (1997).

Segundo Setchell (1998) a genisteína exerce atividade estrogênica com efeito sobre hipercolesterolemia, que leva a diminuição do risco cardiovascular e efeito na osteoporose, além da diminuição dos sintomas da menopausa e prolongamento do ciclo menstrual, que é um benefício porque quanto mais longo o ciclo menstrual, menor o risco do câncer de mama.

2.1.7 Biodisponibilidade de isoflavonas no organismo

Pesquisas de absorção de isoflavonas vem sendo desenvolvidas por diversos pesquisadores. Em um estudo, Izumi et al. (2000) utilizaram, na alimentação, produtos fermentados de soja que continham em sua composição formas glicosiladas e agliconas. Como conclusão os pesquisadores notaram que as formas agliconas são mais rápidas durante a absorção pelo organismo do que as formas glicosiladas, e relataram que a concentração de plasma foi de 8,4 h para genisteína, a qual foi significativamente maior quando comparada à forma daidzeína com 5,8 h. A comprovação do estudo feito por Izumi et al. (2000) foi realizada por Tew et al. (1996) e colaboradores concluindo que a daidzeína está presente em maiores concentrações no intestino por um longo período de tempo, sendo mais biodisponível que a genisteína, os quais sugeriram que a genisteína tem menor biodisponibilidade que a daidzeína devido à sua baixa eliminação urinária e comprovada ação na prevenção de doenças como a osteoporose, doenças coronarianas e menopausa. Xu et al.

(1995) concluíram que a daidzeína é mais resistente que genisteína ao ser metabolizada por bactérias presentes em humanos e ratos (GRIFFITHS e SMITH, 1972).

Experimentos com ratos foram realizados por Andlauer et al. (2000) os quais mostraram que as isoflavonas agliconas presentes em fermentados de soja, no caso *tofu*, apresentaram absorção e metabolização pelo intestino delgado. A mesma conclusão foi obtida por Pereira et al. (2002) quando utilizaram as isoflavonas do extrato purificado providas do melaço da soja, que se apresentaram biodisponíveis e foram detectadas no plasma e na urina dos animais.

A biodisponibilidade de isoflavonas em humanos ocorre através da ação da flora intestinal durante a degradação de compostos que é influenciada pela dose ingerida na dieta e ação de enzimas bacterianas, especialmente a enzima β -glicosidase (ARDITI et al. 2000). O açúcar ligado é geralmente a glicose ou ramnose, mas também pode ser galactose, arabinose, xilose ou outros açúcares (SILBERBERG et al. 2006).

Estudos dirigidos por Setchell et al. (2002) concluíram que durante a absorção intestinal, os compostos glicosídicos daidzina e genistina não são absorvidos pelo intestino e sua biodisponibilidade requer primeiramente a quebra da ligação com o açúcar pela ação da enzima β -glicosidase intestinal.

As formas agliconas sem a molécula de açúcar, forma livre, são capazes de serem absorvidas pelo intestino delgado (SANTOS-BUELGA e SCALBERT, 2000).

2.2 – FLAVONÓIDES E SUAS DIVISÕES

A literatura abrange sobre diversas revisões para atividade biológica e estrutura dos diferentes tipos de flavonóides (FORMICA e REGELSON, 1995). Estima-se que haja mais de 4.000 flavonóides, os quais se apresentam pela coloração presente em inúmeras verduras, frutas e flores (ADRIAN et al., 1990). Variando da cor amarela, laranja ao violeta, descritos e categorizados como flavonol, flavona, flavan-3-ol, flavanonol, flavanona, isoflavona e antocianinas, que podem ou não ser glicosiladas. Como os flavonóides estão

presentes na dieta humana, é importante o entendimento das suas propriedades bioativas, sua absorção e subsequente distribuição, seu metabolismo e excreção em humanos (HOLLMAN e KATAN, 1998). De acordo com Liu (1999), as formas ativas das isoflavonas são chamadas de daidzeína, genisteína e gliciteína conforme demonstrado na Figura 2 abaixo.

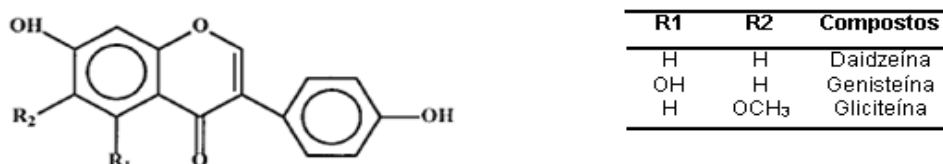


Figura 2 – Estrutura química das isoflavonas agliconas da soja (SONG et al., 1998).

Nas plantas, os flavonóides são encontrados ligados a açúcares como glicosídicos, sendo daidzina, genistina e glicitina bastante estáveis (HERTOG et al., 1993). Existem também as isoflavonas β -glicosídicas conjugadas que podem ser classificadas em acetil glicosídeo e malonil glicosídeo. Estas, por sua vez, podem ser encontradas subdivididas em 6''-O-acetil-daidzina, 6''-O-acetil-genistina e 6''-O-acetil-glicitina, e conjugada malonil-glicosídicas 6''-O-malonil-daidzina, 6''-O-malonil-genistina e 6''-O-malonil-glicitina (Liu, 1999). Na Figura 3, encontram-se as estruturas dos compostos de isoflavonas formados por ligações β -glicosídicas e subgrupo acetil e malonil.

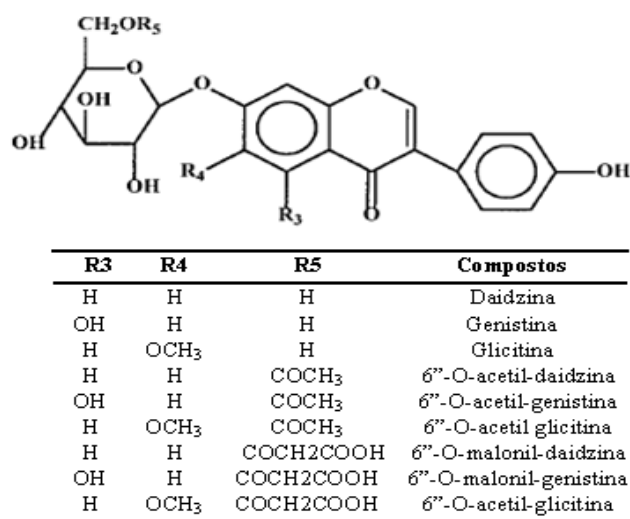


Figura 3 – Estrutura química das isoflavonas β -glicosídicas e seu subgrupo acetil e malonil presente na soja (SONG et al., 1998).

As diferenças químicas e estruturais das isoflavonas de soja resultam em uma variável biodisponibilidade no sistema biológico (XU et al., 1994), e a isoflavona de maior potencial biológico é a genisteína, a qual é capaz de inibir, *in vitro*, a ação de enzimas ligadas à proliferação de tumores, como a tirosina quinase e DNA topoisomerase (PETERSON 1995).

2.2.1 Fatores genéticos, ambientais, enzimáticos e industriais que influenciam na quantidade de isoflavonas presentes na soja

A diversidade botânica espelhada pelo planeta é vasta. Entretanto, quantidades de isoflavonas são encontradas em algumas frutas, nozes, vegetais e outras leguminosas (LIGGINS et al., 2000). Compostos como isoflavonas agliconas, daidzeína e genisteína são encontradas em menores quantidades na natureza. Isso ocorre pela limitada distribuição da enzima chalcona-isomerase (que converte 2 (R)-naringenina um precursor de flavonas passando a 2-hidroxdaidzeína) a qual está largamente presente em legumes tropicais (COWARD et al., 1993). Fatores ambientais devem ser levados em consideração nas concentrações de compostos de isoflavonas, presentes nos grãos de soja, por prejudicar o tipo de cultivo, local de plantio, clima, ano de safra, tipo de solo e as interações entre esses fatores (HOECK et al., 2000).

Ao estudar a enzima β -glicosidase, Matsuura et al. (1993) observaram que as concentrações de daidzeína e genisteína aumentam durante imersão da soja em água, chegando a sua produção máxima na condição de 50 °C e pH 6,0. A enzima β -glicosidase foi responsável pela formação de daidzeína e genisteína durante a imersão, sua atividade foi inibida pela adição de um inibidor competitivo, glucona- δ -lactona, em água. Desta maneira a hidrólise enzimática reduziu a quantidade de glicosídicos na soja. Murphy et al. (1999) realizam a quantificação em diversos alimentos fermentados à base de soja como *shoyu*, *tempeh* e *tofu*.

Já para produtos processados industrialmente a partir da soja e seus derivados, diversos estudos procuram relacionar a quantificação de isoflavonas aos fatores que interferem nesta concentração, entre eles: tempo de processamento, processo de extração de proteína, diluição com outros ingredientes, hidrólise enzimática e fermentação. Murphy (1982) e Wang e

Murphy (1994) relataram que, ao determinar os níveis de isoflavonas usadas na dieta alimentar de soja e produtos à base de soja, foram encontradas diferenças consideráveis no conteúdo e distribuição de isoflavonas em ambas as amostras, principalmente em produtos processados à base de soja.

2.2.2 Utilização da soja e sua aplicabilidade industrial

A soja é uma planta que apresenta uma grande diversidade genética e morfológica por apresentar-se na natureza com tamanhos diferenciados de seus grãos, cores e composição química. Segundo Markley (1974), a soja é conhecida por diversos nomes, entre eles: *Glycine soja*, Soja japônica, *Glycine ussuriensis*.

O grão de soja é uma típica semente leguminosa, o qual é composto por diferentes partes. Segundo Tsukamoto et al. (2001), de todos os componentes que formam o grão de soja, o cotilédone constitui cerca de 90% da massa total do grão de soja, enquanto o hipocotilédone apresenta somente de 2-3% do total da semente e finalmente a casca que representa 6% da massa total do grão de soja.

O principal objetivo da plantação de soja é a produção do grão, e sua composição química, muito complexa, é dependente de alguns fatores tais como: variedade, condições de cultivo, condições climáticas como época de plantio e armazenamento (HOU e CHANG, 1998). O grão da soja é uma semente oleaginosa que apresenta como principais constituintes os lipídios, proteínas, carboidratos, minerais e água.

As proteínas e isoflavonas presentes no grão de soja são os principais componentes utilizados como compostos funcionais na alimentação humana. Vale ressaltar que a soja é o único vegetal que contém uma proteína completa em sua composição química (MORAIS, 2000). A casca dos grãos de soja contém elevada quantidade de carboidratos e apresentam em sua composição moléculas de oligossacarídeos tais como estaquiose e rafinose, podendo ser hidrolisadas pelas enzimas invertase e α -galactosidase (CARRÃO-PANIZZI 1988). Os oligossacarídeos podem ser reduzidos com o uso da maceração e cozimento dos grãos (LIU e MARKAKIS, 1987) para fabricação de fermentados

tais como o *tofu*, e eliminados na dessoração do produto (VAN DER RIET et al., 1989).

Outros processos são utilizados para a produção de derivados de soja e apresentam em sua estrutura quantidades significativas de proteínas e isoflavonas.

2.2.3 Produtos derivados de soja

Tradicionalmente o consumo de soja é voltado à população ocidental, e a produção de seus derivados é dividida em dois grupos: o grupo dos não fermentados, que incluem grão de soja, leite de soja e farinhas protéicas de soja, e o grupo dos fermentados de soja, que são representados por *miso*, *natto*, *shoyu*, *tofu* e *tempeh* (WILSON et al., 1992).

Em geral, os alimentos fermentados mantêm o predomínio das isoflavonas agliconas, devido à hidrólise promovida por enzimas β -glicosidases microbianas (MURAKAMI et al., 1984; IKEDA et al., 1995; citados por ESAKI et al. 1999b). E para alimentos ou ingredientes de soja não fermentados, há predomínio das formas β -glicosídicas conjugadas (WANG e MURPHY, 1994). A Tabela 2 representa os Teores de isoflavonas contidas em alguns alimentos à base de soja, não fermentados e fermentados, considerados essenciais na alimentação.

Tabela 2 – Teores das concentrações de isoflavonas totais presentes em soja e seus derivados.

Produtos alimentícios à base de soja	Teores de isoflavonas (μg)	Referência
Soja em grãos (Brasil)	425 - 1415	Carrão-Panizzi e Kitamura (1995)
Soja em grãos (Japão)	688 - 2389	Wang e Murphy (1994) Franke et al. (1995)
Soja em grãos (Coréia)	458 - 2317	Choi et al. (1996)
Soja em grãos (EUA)	2053 - 4216	Wang e Murphy (1994b)
Farinha desengordurada de soja (Brasil)	919 - 3086	Genovese e Lajolo (2001) Aguiar (2004)
Farinha desengordurada de soja (EUA)	737 - 1681	USDA (1999)
Proteína texturizada de soja (Brasil)	869 - 999	Genovese e Lajolo (2002)
Proteína texturizada de soja (Brasil)	44 - 2956	USDA (1999)
Isolado protéico de soja (Brasil)	1384 - 1637	Genovese e Lajolo (2001)
Isolado protéico de soja (EUA)	465 - 1992	USDA (1999)
Concentrado protéico de soja (processo ácido)	612 - 1670	Coward et al. (1993) USDA (1999)
Concentrado protéico de soja (processo ácido)	208 - 318	USDA (1999)
Leite de soja	12,6 - 211,3	USDA (1999)
<i>Tofu</i>	202 - 512	Coward et al. (1993) Wang e Murphy (1994)
Óleo de soja	Não contém	Murphy et al. (1999)
<i>Shoyu</i>	1,3 - 23	Wang et al. (1990) Coward et al. (1993) Murphy et al. (1999)

Os derivados de soja como farinha desengordurada, proteína texturizada e isolados de soja apresentam teores de isoflavonas oscilantes quando comparados entre países (Tabela 4).

Diversos trabalhos voltados a produtos fermentados foram realizados, entre os trabalhos Hui et al. (2001) analisaram quantidades de isoflavonas em *tofu*. Os autores afirmaram que o consumo diário de 30g de *tofu* fornece entre 5,4 e 17,1 mg/dia de isoflavonas agliconas. Já para produtos como a farinha de soja, descascada e desengordurada, as médias para isoflavonas nas formas β -glicosídicas conjugadas apresentaram teores de 617 $\mu\text{g/g}$ de daidzina e 1198 $\mu\text{g/g}$ de genistina, e para as formas agliconas, 328 $\mu\text{g/g}$ de daidzeína, 267 $\mu\text{g/g}$ de genisteína e 129 $\mu\text{g/g}$ de gliciteína. Atualmente, os produtos derivados de

farinha de soja são muito utilizados na produção de diversos alimentos industrializados, tais como produtos cárneos, produtos de panificação, molhos e sopas. No entanto, para a elaboração de recomendações nutricionais é necessário o conhecimento dos teores de isoflavonas nos alimentos (GENOVESE e LAJOLO, 2001).

2.2.4 Processo de produção dos farináceos de soja e seu subproduto

No Brasil, um produto de grande interesse comercial o qual provêm da produção de farináceos de soja é o melaço de soja, um subproduto importante da indústria de processamento de soja, que é rico em isoflavonas, mas não é consumido devido ao elevado teor de oligossacarídeos presentes em sua composição, (NIELSEN, 1996) citado por Brasil (2007). Na Figura 4 encontra-se representado o fluxograma do processo simplificado da produção do farelo proteínado e isolado de soja, e o subproduto formado durante a produção destes derivados de soja é conhecido como melaço de soja.

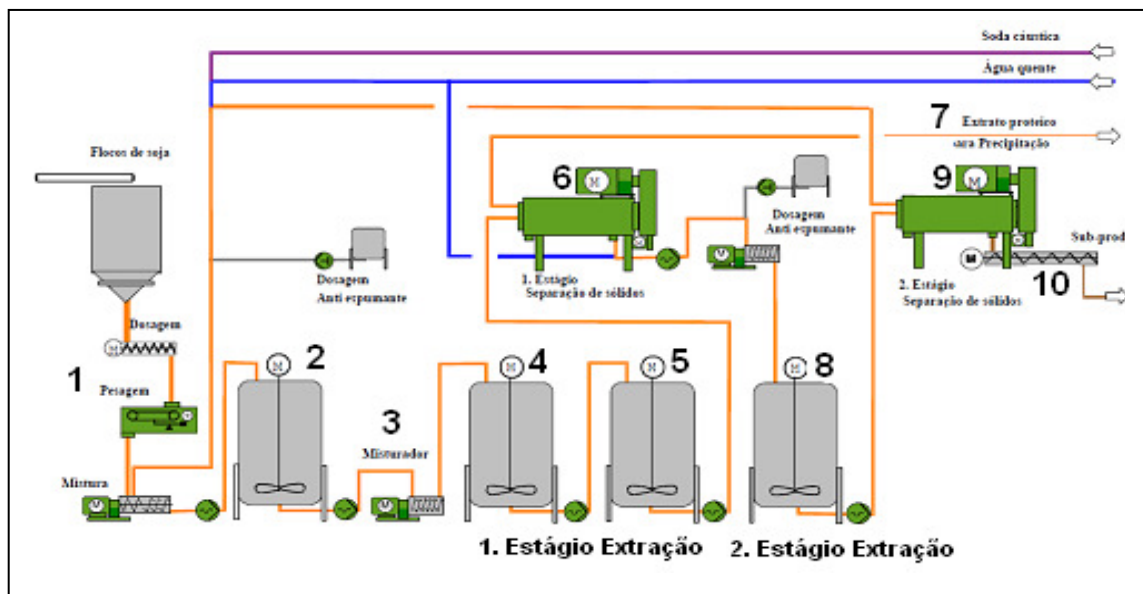


Figura 4 – Fluxograma simplificado do processo de produção do subproduto melaço de soja.

Os flocos desengordurados sem a presença de solvente (etapa 1) são pesados e misturados em solução de NaOH pH 4,5. Em seguida transportados ao tanque (etapa 2), ficando por um determinado período de tempo sob agitação constante. Após atingir o período, a massa é bombeada e misturada

novamente (etapa 3) seguindo para outros dois tanques os quais representam o primeiro estágio de extração (etapas 4 e 5). Em seguida a massa é transportada por bombas até o primeiro estágio da separação de sólidos (etapa 6) onde a parte sólida é succionada até o estágio de separação de sólido na forma de farináceo protéico (etapa 7). A outra parte, a qual contém massa com NaOH pH 4,5, é bombeada para tanque do segundo estágio de extração (etapa 8) com agitação contínua por um tempo determinado. E após esse intervalo de tempo é bombeada diretamente ao segundo estágio de separação de sólido (etapa 9) obtendo, desta forma, extrato protéico e o subproduto formado durante esse processo conhecido como melaço de soja (etapa 10).

Barnes et al. (1994) estudaram as composições químicas do melaço derivado da soja, apresentando valores de 34,6% de carboidratos, 3,2% de proteína, 3,1% de gordura, 4,2% de minerais e aproximadamente 2 g/L de isoflavonas, representando uma das principais fontes de isoflavonas derivadas da soja.

2.3 A ENZIMA β -GLICOSIDASE (EC 3.2.1.21)

A enzima β -glicosidase é comumente encontrada na natureza, presente em inúmeros vegetais, podendo ser produzida por diversos microrganismos entre eles fungos filamentosos da espécie *Aspergillus* e *Trichoderma*. Atua diretamente no processo biológico da enzima β -glicosidase, formação de hidrólise nas giberelinas conjugadas, além de atuar em processos de hidrólise em ligações β -glicosídicas conjugadas em dissacarídeos, oligossacarídeos (COULON et al., 1998; BHATIA et al., 2002). Esta enzima também atua no metabolismo de estresse e resistência a alguns fitopatógenos (ESEN, 1992).

Em alimentos, especialmente os não fermentados provindos da soja e seus derivados como farinha e concentrados de soja, tais enzimas apresentam em sua composição maiores quantidades de compostos glicosilados. Enquanto que alimentos provindos de fermentação como *miso* e *tempeh* apresentam compostos majoritários na forma de agliconas (COWARD et al., 1993; CHIOU e CHENG, 2001). Trabalhos realizados por Matsuura et al., (1989), Murphy

(1982) e Park et al., (2003) utilizam as enzima β -glicosidase providas principalmente da produção de microrganismos e formas vegetais para o uso da conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas utilizando soja e seus derivados

Aguiar et al., (2003) e Lima (2003) utilizaram linhagens de fungos filamentosos *Aspergillus oryzae* ATCC 22786, *Aspergillus niger* e *Aspergillus awamori* para a produção de enzima β -glicosidase e bioconversão de compostos glicosídicos em agliconas utilizando a fermentação sólida entre 24 a 96 h, e concluíram que a enzima β -glicosidase do *Aspergillus oryzae* ATCC 22786 foi capaz de hidrolizar as formas glicosiladas presentes no farelo de soja desengordurado em agliconas por um período de 24 h de fermentação. Esaki et al. (1999b) estudaram a fermentação com a soja desengordurada em meio ao *Aspergillus saitoi*. Os autores concluíram que a daidzina e a genistina são convertidas em daidzeína e genisteína devido a presença da enzima β -glicosidase.

Há outro mecanismo de hidrólise provocado pela ação das enzimas citosólicas como a β -glicosidase (EC 3.2.1.21) apresentado por SETCHELL et al., (2002) e IZUMI et al., (2000), o qual é produzido pela ação das bactérias intestinais. Após ingerir as isoflavonas nas formas malonil glicosídicas e acetil glicosídicas as mesmas são metabolizadas a compostos β -glicosídeos havendo a liberação de glicose e formação de compostos agliconas. A Figura 2.7 demonstra a formação deste processo.

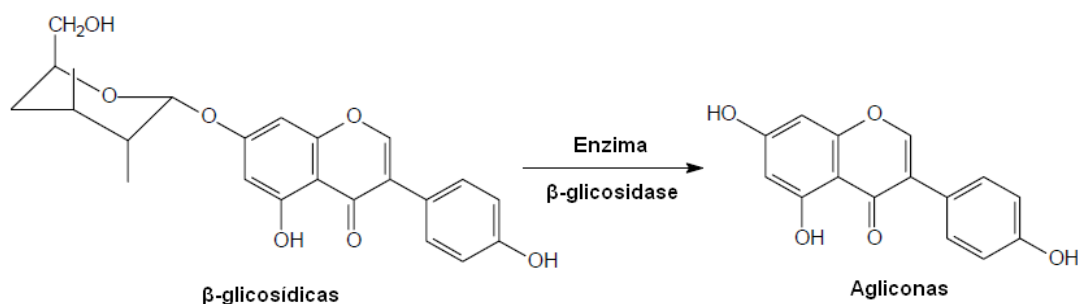


Figura 5 – Atuação da enzima β -glicosidase na quebra da ligação glicosídica β -1,4 resultando na liberação da glicose.

Hawksworth et al. (1971) citado por Xu et al. (1995) descrevem *Lactoabacilli*, *Bacteroides* e *Bifidobacteria* como os principais grupos de bactérias intestinais produtoras de enzima β -glicosidase (EC 3.2.1.21) ativas sobre os flavonóides durante a dieta.

2.3.1 O uso dos fungos filamentosos para produção de enzimas

Os fungos filamentosos são fundamentalmente constituídos por elementos multicelulares. É um dos poucos organismos utilizados em fermentações na escala industrial, que além de serem capazes de produzir as substâncias de interesse, apresentam-se como organismos geneticamente estáveis, crescendo e produzindo os metabólitos desejados (BROCK et al., 1997). Atuam sobre enzimas extracelulares (celulases, hemicelulases, pectinases, ligninases) as quais fornecem aos microrganismos, em especial aos fungos filamentosos, recursos para obter energia e nutrientes a partir destes biopolímeros vegetais disponíveis (ARO et al., 2005). Assim, possibilitam as principais transformações microbianas sobre os flavonóides, gerando produtos com grande interesse comercial.

Entre os principais fungos filamentosos produtores de metabólitos, os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são conhecidos e eficientes produtores de enzimas celulíticas compreendendo as formas endo-1,4- β -glucanases, celobiohidrolases, exo-1,4- β -glicosidases e β -glicosidases (RUEGGER e TAU-K-TORNISIELO, 2004). Algumas das transformações de flavonóides são apresentadas na Tabela 3 representadas por (HARBONE, 1993).

Tabela 3 – Transformações microbianas de alguns compostos de flavonóides.

Substrato	Organismo	Produto Esperado
Isoflavanona	<i>Aspergillus niger</i>	Isoflavona
Daidzina	<i>Bifidobacterium</i> sp. Int-57	Daidzeína
Genistina	<i>Bifidobacterium</i> sp. Int-57	Genisteína
Daidzina	<i>Aspergillus oryzae</i>	Daidzeína
Genistina	<i>Aspergillus oryzae</i>	Genisteína
Glicosil-isoflavonas	<i>Lactobacillus casei</i>	Isoflavonas agliconas

Fonte: Harbone (1993).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

A principal matéria-prima, o melaço de soja, resíduo industrial rico em isoflavonas na forma de compostos glicosídicos, foi gentilmente doada pela empresa IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos Ltda, localizada na cidade de Araucária - Paraná. O farelo de trigo e a farinha de soja desengordurada, utilizadas como substratos durante a FES, foram adquiridos da empresa Nutribom Alimentos localizada na cidade de Maringá - Paraná.

3.1.1 Reagentes

Para o crescimento microbiano, as extrações das isoflavonas, a FES, a atividade enzimática e as análises quantitativas foram utilizados os seguintes reagentes e solventes conforme descrição abaixo:

- O meio de cultura utilizado para o crescimento microbiano foi o *Agar Sabouraud Dextrose* adquirido da empresa PML MICORBIOLOGICALS, INC - EUA;
- O solvente orgânico utilizado para extração das isoflavonas foi o metanol, de grau analítico cromatográfico, adquirido da empresa J.T. Baker (EUA);
- Para contagem de esporos foi adicionado o Tween 80, marca Synth, para melhorar homogeneização das cepas eluídas em água esterelizada e uréia P.A marca Synth;
- A água utilizada para as atividades no laboratório foi passada pelo sistema de deionização em colunas de troca iônica (Simplicity, Millipore do Brasil) e filtrada através de membranas de 0,22 µm *nylon* (Alltech, Deerfield, IL);

- Reagentes de alta pureza foram utilizados para determinação da atividade enzimática. O *p*-nitrofenol (pNP) e substrato sintético *p*-nitrofenil- β -glicosídeo (pNPG) foram adquiridos da empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA);
- Reagentes utilizados para as análises de proteínas totais. O *coomassie brilliant blue* BG-250 e albumina bovina sigma A-2153 (BSA) de alta pureza adquiridos da empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA);
- Os solventes, ácido acético e metanol, empregados na fase móvel são de grau analítico cromatográfico, todos adquiridos da empresa J.T. Baker (EUA);
- Reagentes de grau analítico cromatográfico: daidzina, genistina, dadzeína e genisteína, foram adquiridos da empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA), para confecção das curvas de calibração utilizadas na CLAE.

3.1.2 Microrganismos utilizados para produção de β -glicosidase

As cepas de fungos filamentosos utilizadas para este estudo foram as seguintes:

- *Aspergillus niger* ATCC 16404 American Type Culture Collection (ATCC) isolado a partir da *Blueberry*, local Carolina do Norte EUA;
- *Aspergillus oryzae* ATCC 1003 fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz;
- *Aspergillus niger* isolado do solo pelo Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional;
- *Aspergillus niger* isolado do ar *indoor* pelo Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional.

Após o processo de escolha e aquisição da cepa importada *Aspergillus niger* ATCC 16404 e da cepa nacional *Aspergillus oryzae* ATCC 1003 cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, foram realizados todos os procedimentos de crescimento, isolamento e identificação das cepas adquiridas e fungos

ambientais *Aspergillus niger* isolados do solo e ar *indoor* sob a supervisão da responsável técnica do laboratório Leonilda Correia dos Santos.

Os microrganismos utilizados neste estudo foram armazenados em temperatura de 6 a 8 °C para posterior realização da FES, visando a produção da enzima β -glicosidase em extrato bruto. Todos os fungos caracterizados neste estudo foram inoculados em substratos (farelo de trigo e farinha de soja desengordurada). Os fungos filamentosos selecionados neste estudo adaptam-se bem ao processo da FES empregado, possibilitando que suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas fossem plenamente desenvolvidas (AIDDO et al., 1982). Na Figura 6 encontra-se representado um fluxograma das etapas do processo de bioconversão proposto.

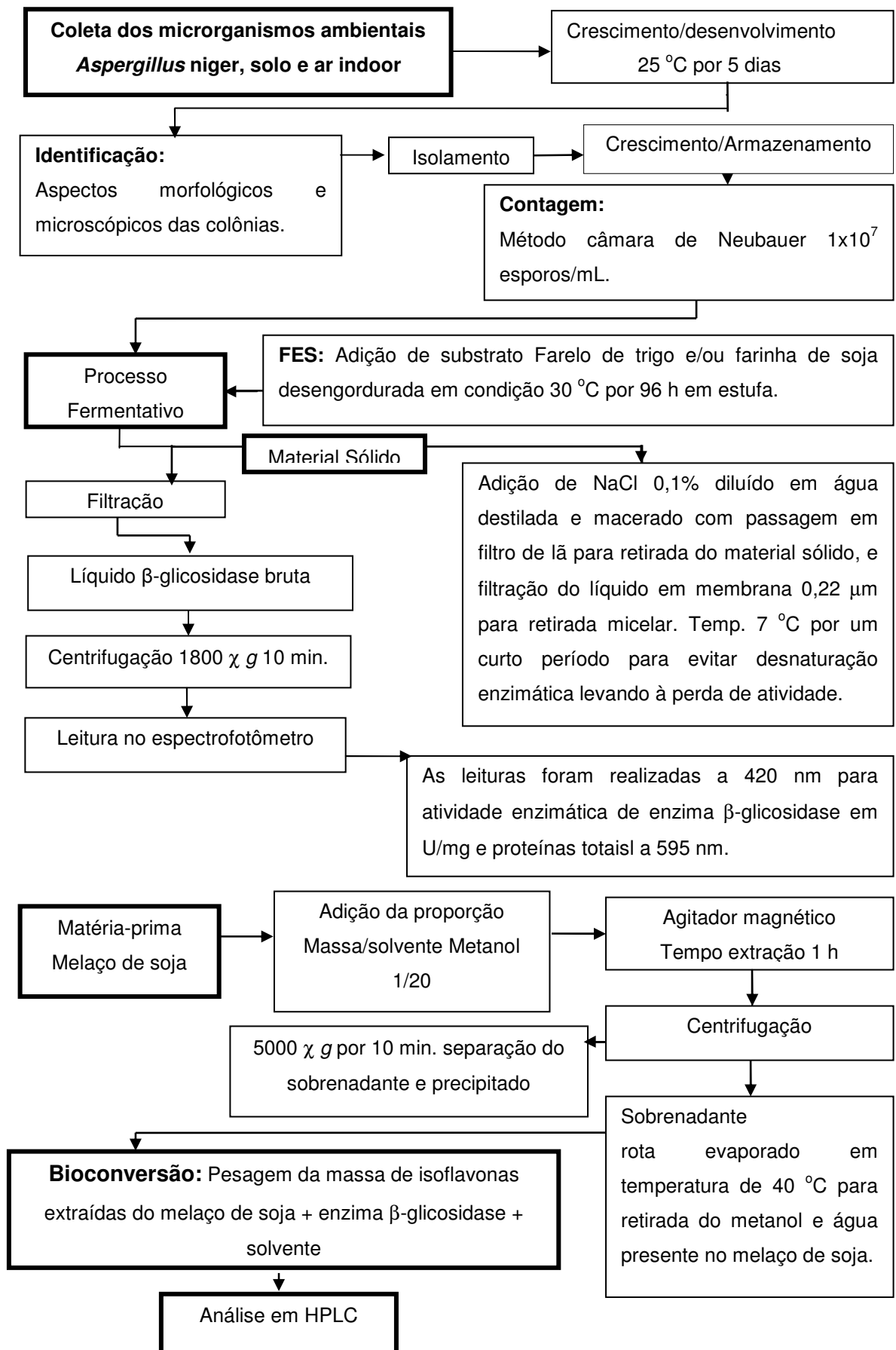


Figura 6 – Fluxograma simplificado do processo das etapas realizadas.

3.1.3 Preparo da cultura sólida

O meio de cultura sólido de *Sabouraud* foi preparado para o desenvolvimento microbiano com a seguinte composição: glicose (40 g/L), peptona (10 g/L) e ágar (12 g/L), diluído em água destilada.

3.1.4 Manutenção dos microrganismos

As cepas liofilizadas contendo ATCC gênero *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* foram reativadas por suspensão em 10 mL de água esterelizada. Em seguida, foi coletada uma aliquota de 1 mL e transferida para placas de Petri contendo nutrientes ágar *Sabouraud* em estado sólido esterelizado a 121 °C por um período de 15 minutos em autoclave vertical (Phoenix equipamentos científicos SP, modelo AV 30) e resfriadas dentro do fluxo laminar e incubadas em estufa (Tecnal, modelo TE 392/1) a temperatura controlada de 25 °C durante 5 dias até o crescimento e desenvolvimento das espécies.

As cepas de ATCC gênero *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* foram conservadas sob refrigeração a 6 °C em tubos de ensaio inclinados e fechados com algodão para futura repicagem e mantidas por um período máximo de 45 dias. O mesmo procedimento foi realizado para os microrganismos coletados do solo e ar *indoor*, após o crescimento, desenvolvimento e identificação do gênero e espécie.

3.1.5 Produção do inóculo

O preparo dos inóculos foi realizado a partir do crescimento das culturas em estoque ao meio *Sabouraud* em frascos erlenmeyer de 250 mL. Após sete dias de crescimento, a temperatura de 30 °C ocorreu a formação dos esporos. Os esporos foram coletados com auxílio de alça e adicionados em 100 mL de água destilada e 4 gotas de Tween 80 esterelizados, e submetidos

à agitação em uma incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, modelo TE 422) a 30 °C e 100 rpm durante 15 minutos.

Após agitação, procedeu-se a coleta de 1 mL da solução de esporos do meio líquido, até atingir a concentração de células da ordem de 1×10^7 a 1×10^8 esporos/mL de microrganismo. Os esporos foram contados em câmara de Neubauer com o uso do microscópio e calculados usando a equação (1).

$$\text{Número total de esporos} = \frac{\text{NTE} \times 1/\text{VR} \times \text{FD} \times 10^{-3}}{\text{NRC}} \quad (1)$$

NTE = Número total de esporos contados em 10 quadrículos

1/VR = Inverso do volume do retículo

FD = Fator de diluição

NRC = Número de retículos contados

3.2 PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE MICROBIANA POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA

Os substratos farelo de trigo e farinha de soja desengordurada utilizados nos ensaios durante a FES foram dispostos em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 20g com umidade controlada em 50% com adição de uma solução com 3% de uréia como fonte de nitrogênio.

Os fungos necessitam de nitrogênio para suas reações metabólicas, dentre as fontes mais comuns de nitrogênio encontram-se a uréia, sais de amônio, aminoácidos e peptídeos (WAINWRIGHT, 1995). A uréia apresenta normalmente atuação tamponante sobre o meio de cultivo e isso foi fundamental para sua aplicação neste estudo.

Todos os frascos com os substratos foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix equipamentos científicos SP, modelo AV 30), esfriados em fluxo laminar, em seguida inoculados com a suspensão de esporos de aproximadamente 1×10^7 a 1×10^8 esporos/mL do microrganismo e incubados em estufa bacteriológica (Tecnal, modelo TE 392/1) controlada a 30 °C por um período de 96 horas.

3.2.1 Extração enzimática

Após a fermentação, o extrato bruto da enzima passou por um processo de filtração onde alguns passos foram seguidos:

- À cada erlenmeyer contendo as espécies de fungos filamentosos foi adicionado 100 mL de solução de NaCl a 1%. O micélio fúngico foi macerado e colocado na incubadora (Tecnal, modelo TE 422) refrigerado a 30 °C com agitação 100 rpm durante 2 horas;
- Os substratos fermentados foram separados pelo uso da filtração em lã de vidro;
- Foram realizadas centrifugações sobre os filtrados a 1800 χ g por 10 minutos em centrífuga (Jouan, modelo BR 4i);
- Novas filtrações foram realizadas com o uso de membranas de 0,22 μ m nylon (Alltech, Deerfield, IL) para eliminação dos micélios fúngicos;
- Os sobrenadantes contendo os extratos *in natura* das enzimas foram armazenados em temperatura de 6 a 8 °C para análises posteriores de atividade enzimática;
- O extrato enzimático filtrado usado nos processos de bioconversão, contendo a enzima β -glicosidase, não passou por nenhum processo de purificação *a posteriori*. Assim, para simplificar a notação escrita ao longo do texto será empregado o termo extrato enzimático bruto contendo a enzima β -glicosidase, a Figura 7 abaixo demonstra as colorações obtidas destes extratos que variam do amarelo pálido ao amarelo ouro.

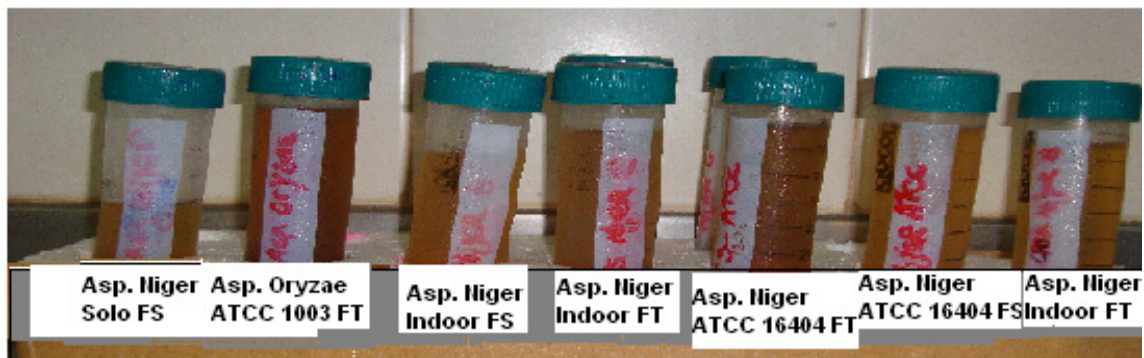


Figura 7. Aspecto físico dos extratos enzimáticos de enzima β -glicosidase após a fermentação em estado sólido com o uso dos substratos farelo de trigo e farinha de soja desengordurada em meio aos fungos (*Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus oryzae* ATCC 1003, *Aspergillus niger* isolado do solo, e *Aspergillus niger* isolado do ar indoor).

3.2.2 Determinação da atividade de β -glicosidase

A atividade de enzima β -glicosidase foi determinada conforme descrito por Matsuura et al. (1995):

- A mistura de 2 mL de solução 1 mM de *p*-nitrofenil- β -glicosídeo (pNPG) em tampão fosfato citrato 0,1M pH 5,0 foi incubada a 40 °C em banho de água por 5 minutos;
- Após a adição de 0,5 mL de solução de enzima bruta, a mistura foi incubada a 40 °C por 20 minutos;
- A reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 0,1 M. A absorbância da solução foi medida a 420 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini, modelo 1240).

A quantidade de *p*-nitrofenol liberada foi determinada usando curva padrão preparada com 5 a 300 μ M de *p*-nitrofenol. A curva de calibração é apresentada no Apêndice A.

O princípio da ação enzimática procede da seguinte forma: a enzima β -glicosidase age sobre o substrato sintético (pNPG) liberando *p*-nitrofenol como um dos produtos da reação. O *p*-nitrofenol produz uma cor amarela intensa em solução alcalina acima de pH 8,0 e medido quantitativamente a 420 nm.

A determinação da atividade enzimática envolve a medida da velocidade de reação. Geralmente utiliza-se temperatura de 30 °C, pH ideal para cada tipo de enzima utilizada e concentrações definidas de substratos e ativadores (PETER et al., 1987). Segundo a *Enzyme Commission*, “uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μ M de substrato ou a formação de 1 μ M de produto por minuto”, nas condições de ensaio estabelecidas (temperatura, pH, concentração de substrato). A atividade específica é expressa em termos de atividade por miligrama de proteína (U/mg) (PRICE e STEVENS 1989).

Portanto, para todas as medições da atividade enzimática do extrato bruto de β -glicosidase foi utilizado o extrato bruto inativo como controle (branco). Para garantir a inativação, foi usado a alteração da temperatura e do pH. A Figura 8 representa o efeito do tempo de reação do *p*-nitrofenol sobre a atividade enzimática conforme os tempos utilizados neste estudo, de 0 a 20 minutos a 40 °C de incubação.

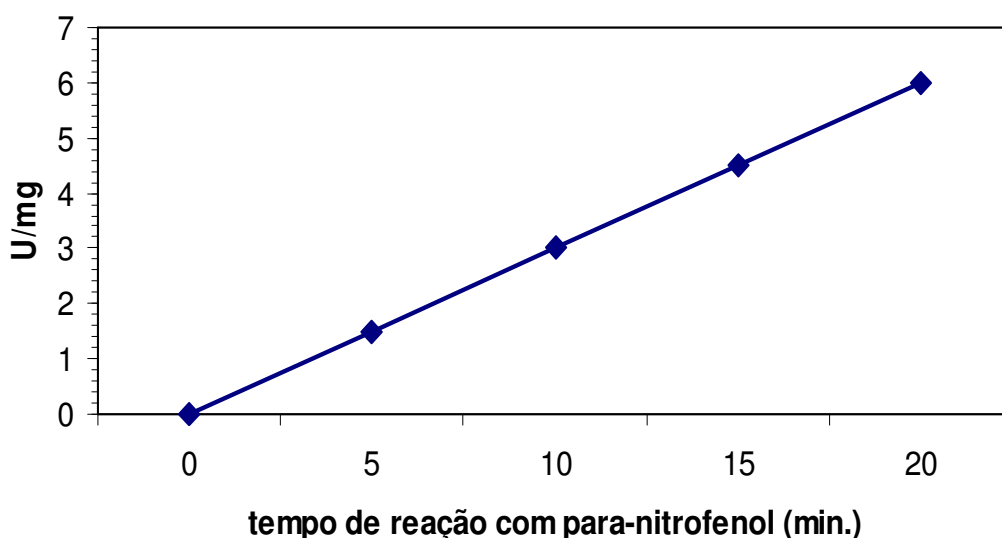


Figura 8 - Efeito do tempo de reação do *p*-nitrofenol sobre atividade enzimática.

Os valores apresentados em U/mg de atividade enzimática provinda de β -glicosidase em meio ao extrato bruto, demonstrou coerência sobre os resultados obtidos em relação aos intervalos de tempo da reação aplicada.

3.2.3 Determinação de proteínas totais

Para a determinação de proteínas totais, foi empregado o método do *coomassie brilliant blue* BG-250 (BRADFORD, 1976). A absorbância da solução foi medida a 595 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini, modelo 1240). A curva de calibração foi preparada usando a albumina bovina (Sigma A-2153 BSA) com concentração de 30 a 200 mg% conforme demonstrado no Apêndice A.

3.3 EXTRAÇÃO DAS ISOFLAVONAS

Para a produção dos extratos metanólicos foi utilizado o melão de soja. As isoflavonas foram extraídas do melão de soja conforme método modificado descrito por Grün et al. (2001). A massa foi pesada e eluída na proporção de 1:20 (m/v), com metanol 80% e agitada constantemente por um período de 1 h a 25 °C. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 5000 χ g por 10 minutos em centrífuga (Jouan, modelo BR 4i). O sobrenadante foi concentrado em sistema evaporativo a vácuo, rotaevaporador (Fisatom, modelo 801) até atingir o volume de 1 mL. Em seguida completou-se o volume para 5 mL em balão volumétrico com metanol (grau analítico HPLC). Filtrou-se as amostras utilizando filtros de membranas de 0,22 μ m *nylon* (Alltech, Deerfield, IL) seguido de análise por CLAE. As extrações realizadas para o melão de soja foram feitas em triplicata.

3.3.1 Determinação dos compostos de isoflavonas por CLAE

Os extratos concentrados de soja foram determinados por CLAE, de acordo com o método modificado descrito por Park et al. (2001c). Alíquotas de 20 μ L foram injetadas automaticamente no cromatógrafo líquido equipado com coluna (Microsorb-MV, 5 μ m, 100 Å; 4,6 ϕ - 250 mm) acoplado com detector UV-Vis (modelo Gilson 152). As isoflavonas foram isoladas utilizando sistema de gradiente e eluição, com uma vazão inicial de 0,5 mL/min, mantendo-se a temperatura da coluna a 35 °C. Foi utilizado um gradiente linear solvente. A

(água misturada ao ácido acético na proporção de 19:1 v/v) e metanol como solvente B. Iniciou-se o gradiente com 20% do solvente B, passando para 40% em 35 minutos, subindo para 50% entre 35 e 45 minutos, atingindo 80% em 75 minutos, decrescendo para 20% entre 95 e 105 minutos. Um intervalo de tempo de 15 minutos foi deixado para reequilibrar a coluna com 20% de solvente B entre as corridas realizadas. A detecção foi realizada em absorção de 254 nm.

Os valores das concentrações de daidzina, genistina, daidzeína e genisteína foram calculados com base nas curvas adquiridas através dos padrões utilizados da empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA). As curvas de calibração encontram-se no Apêndice A.

3.3.2 Conversão de isoflavona glicosídica em isoflavona aglicona a partir da enzima β -glicosidase em extrato bruto microbiano

O extrato concentrado provindo do melaço de soja foi hidrolizado usando a enzima β -glicosidase em extrato bruto microbiano do gênero *Aspergillus*. Na Tabela 4 encontram-se as quantidades utilizadas para realização da bioconversão.

Tabela 4 – Quantidades utilizadas para o processo de bioconversão de compostos glicosídicos em compostos agliconas.

Componentes	Quantidade em mL
Extrato concentrado do melaço de soja	0,1
Enzima β -glicosidase em extrato bruto	0,2
Água ultrapura	1,7
Total:	2,0

A mistura (extrato concentrado do melaço de soja + enzima β -glicosidase em extrato bruto + água ultrapura), foi incubada em banho ultratermostático (Quimis, modelo 214S) a 40 °C durante 30 minutos seguindo metodologia descrita por Lima (2003). Após o processo de hidrólise, a mistura foi filtrada por membranas de 0,22 μ m *nylon* (Alltech, Deerfield, IL) para realização das análises de isoflavonas via CLAE.

3.3.3 Métodos físico-químicos e cromatográficos no melaço de soja

A composição centesimal e mineral bem como o perfil de carboidratos totais presente na composição do melaço de soja encontram-se representados na Tabela 5. As quantificações físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Águas e Alimentos do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. As análises de CLAE em carboidratos totais e seus compostos foram realizados pela Empresa Sanrisil S/A Indústria e Comércio – Indústrias.

Tabela 5 – Teores físico-químicos e cromatográficos de carboidratos totais e seus compostos presentes no melaço de soja.

Análises físico-químicas			Análises de carboidratos totais pela cromatografia líquida (CLAE)		
Parâmetros	Teores		Parâmetros	Teores	
Umidade	26,32	(%)	Carboidratos Totais	46,97	(%)
Sólidos totais	73,68	(%)	Glicose	0,35	(%)
Proteína Bruta	4,66	(%)	Frutose	0,85	(%)
Carboidratos Totais	53,29	(%)	Galactose	1,57	(%)
Extrato Etéreo	2,83	(%)	Lactose		n.d
Fibra bruta	0,11	(%)	Sacarose	24,56	(%)
Resíduo Mineral Fixo	12,53 mg/100g		Rafinose	6,58	(%)
Cálcio	56,4 mg/100g		Estaquiose	13,07	(%)
Cobre	6,34 mg/100g				
Chumbo		n.d			

Legenda: n.d = não detectado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE ENZIMA β -GLICOSIDASE A PARTIR DA FES E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA

Os microrganismos selecionados *Aspergillus oryzae* ATCC 22786, *Aspergillus niger* e *Aspergillus awamori* (AGUIAR et al., 2003) são os mais pesquisados para a produção de enzima β -glicosidase utilizando FES.

A atividade enzimática de β -glicosidase produzida pelos microrganismos utilizados (*Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus oryzae* ATCC 1003, *Aspergillus niger* isolado do solo e *Aspergillus niger* isolado do ar *indoor*) foi determinada até o 5 dia de fermentação ou 96 horas baseado em estudo feito por Aguiar et al., (2003).

O valor do pH utilizado em todos os testes de atividade enzimática realizados neste trabalho foi de pH 5,5. Este valor foi o mesmo utilizado por Matssura e Obata (1993) que produziram a enzima β -glicosidase extraída da soja.

O estudo da estabilidade enzimática para β -glicosidase em extrato bruto foi pesquisado por Lima (2003) que observou que a enzima é termo resistente mantendo sua atividade de até 76% depois de 4 horas de incubação em uma temperatura de 55 °C, onde obteve 100% de atividade enzimática na temperatura de 40 a 50 °C e mesmo após 4 horas de incubação mantinha 90% de sua atividade. Essas informações foram utilizadas para definir a temperatura de 40 °C durante 30 minutos para os ensaios realizados na reação enzimática.

Na Figura 9 encontram-se os valores da atividade enzimática de β -glicosidase, sem purificação, obtido a partir da FES, utilizando como substrato o farelo de trigo e a farinha de soja desengordurada para desenvolvimento dos fungos filamentosos com ATCC e isolados do meio ambiente. Os melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos utilizando o *Aspergillus oryzae* ATCC 1003 no substrato farelo de trigo. O *Aspergillus niger* ar *indoor* apresentou um valor de 5,9 U/mg utilizando substrato com farinha de soja desengordurada.

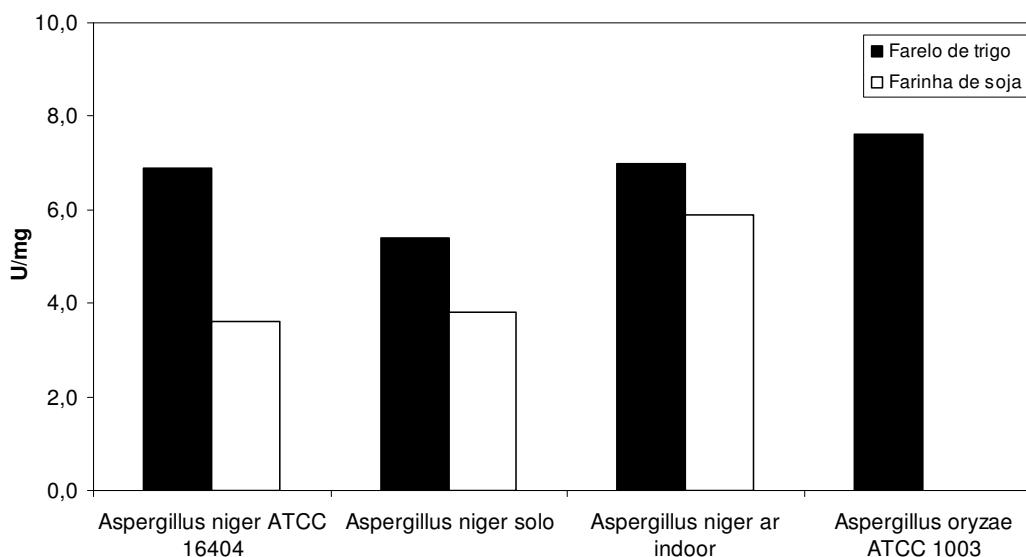


Figura 9 – Valores de atividade enzimática de β -glicosidase em extrato bruto após 96 horas de processo de fermentação FES. Quantificação em pH 5,5 e incubação a 40 °C por 20 min.

Resultados de atividade enzimática semelhantes foram obtidos por Ikeda et al. (1995), Murphy (1982) e Aguiar et al. (2003) utilizando a enzima da soja para a bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas.

Na Tabela 6 encontram-se valores referentes às proporções de atividade específica (U/mg) obtidas após o processo da FES por 96 horas, sobre fungos da espécie *Aspergillus* utilizando como substrato o farelo de trigo.

Tabela 6 – Valores da atividade enzimática de β -glicosidase microbiana extrato bruto, substrato farelo de trigo.

Microrganismos	Volume inicial (mL)	Proteínas totais (mg)	Atividade Específica (U/mg)
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 1003	100	0,41	7,6
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	100	0,58	6,9
<i>Aspergillus niger</i> solo	100	0,54	5,4
<i>Aspergillus niger</i> ar indoor	100	0,56	7,0

Na Tabela 7 encontram-se os valores referentes às proporções de atividade específica (U/mg) obtidas após o processo da FES por 96 horas, sobre fungos da espécie *Aspergillus* utilizando como substrato a farinha de soja desengordurada.

Tabela 7 – Valores da atividade enzimática de β -glicosidase microbiana extrato bruto, substrato farinha de soja desengordurada.

Microrganismos	Volume inicial (mL)	Proteínas totais (mg)	Atividade Específica (U/mg)
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 1003	100	---	---
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	100	0,42	3,6
<i>Aspergillus niger</i> solo	100	0,36	3,8
<i>Aspergillus niger</i> ar indoor	100	0,37	5,9

Não houve crescimento microbiano para o *Aspergillus oryzae* ATCC 1003 empregando o substrato com farinha de soja desengodurada.

Lembo et al., (2002) relatou que o farelo de trigo na FES foi superior a todos os outros substratos utilizados, incluindo a farinha de soja, para a produção de enzima β -glicosidase por *Aureobasidium sp.* Os resultados da atividade enzimática de β -glicosidase em todos os testes realizados em nosso estudo, utilizando fungos filamentosos presentes nas Tabelas 6 e 7, demonstram a superioridade do substrato farelo de trigo na produção de β -glicosidase, quando comparado ao substrato farinha de soja desengordurada.

Cabe destacar que, até o momento, não foi encontrado a aplicação do fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 1003, *Aspergillus niger* ATCC 16404 e *Aspergillus niger* ambiental ar indoor para a produção de enzima β -glicosidase e nem aplicação para o processo de bioconversão.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DO MELAÇO DE SOJA SEM ADIÇÃO DE ENZIMA β -GLICOSIDASE

Os teores de isoflavonas presentes na matéria-prima melaço de soja (Figura 10) foram analisados via cromatografia CLAE, conforme descrito no item 3.3.1.

Os teores de isoflavonas foram quantificados em fração mássica percentual para um melhor entendimento e discussão dos resultados referentes aos compostos glicosídicos e agliconas, presentes no melaço de soja sem adição de enzima β -glicosidase. As formas glicosídicas são as formas majoritárias quando comparadas aos teores de isoflavonas agliconas, principalmente por não passarem por nenhum processo de fermentação ou hidrólise durante o processo industrial. Pereira et al. (2002) estudaram a fração

mássica percentual de isoflavonas presentes no melaço de soja encontrando para os compostos glicosídicos, daidzina 38% e genistina 53% e para os compostos agliconas, daidzeína 5% e genisteína 4%. É importante mencionar que as formas químicas das isoflavonas podem variar dependendo das condições ambientais, solo e variedades do cultivar (HOECK et al., 2000).

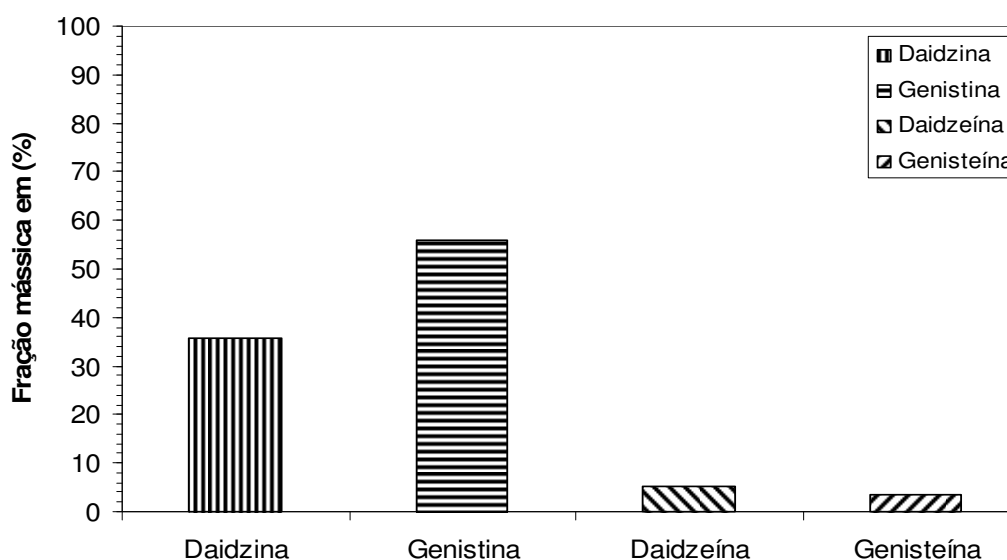


Figura 10 – Valores dos compostos daidzina, genistina, daidzeína e genisteína presentes no melaço de soja sem adição de enzima β -glicosidase.

4.3 PROCESSO DE BIOCONVERSÃO UTILIZANDO A ENZIMA β -GLICOSIDASE

As Figuras 11 e 12 demonstram a obtenção das frações mássicas para a bioconversão dos compostos glicosídicos, daidzina e genistina em agliconas, daidzeína e genisteína utilizando a enzima β -glicosidase extrato bruto, obtidas dos fungos filamentosos (*Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus oryzae* ATCC 1003, *Aspergillus niger* isolado do solo e *Aspergillus niger* isolado do ar indoor) após a FES com o uso dos substratos farelo de trigo e farinha de soja desengordurada, incubados a 40 °C durante 30 minutos em meio ao extrato concentrado extraído do melaço de soja. Após o término da reação, os teores de isoflavonas foram quantificados via CLAE conforme descrito no item 3.3.1.

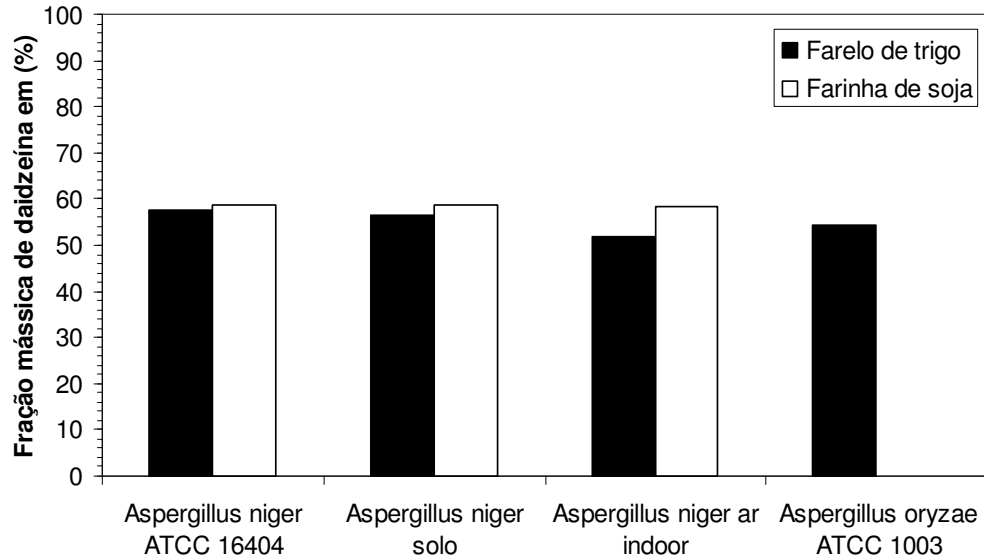


Figura 11 – Valor do composto daidzeína em extrato concentrado após o processo de bioconversão a 40 °C durante 30 minutos.

Os teores médios de bioconversão para os compostos daidzeína e genisteína foram de 56,7% para o composto daidzeína, e 43% para o composto genisteína.

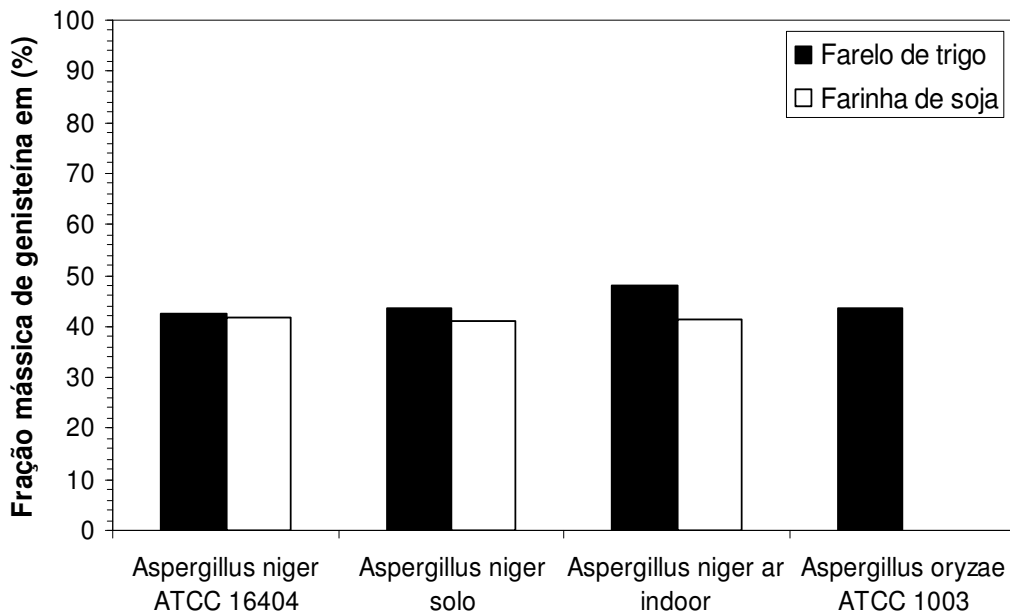


Figura 12 – Valor do composto genisteína em extrato concentrado após o processo de bioconversão a 40 °C durante 30 minutos.

Lima (2003), usando a enzima β -glicosidase produzida pelo *Aspergillus niger* utilizado na forma de extrato bruto e parcialmente purificado em 40 °C

durante 30 minutos em meio ao extrato metanólico de soja Tozan, observou que as enzimas parcialmente purificadas e na forma de extrato bruto providas do *Aspergillus niger* apresentaram praticamente as mesmas taxas de bioconversão, 32% em relação ao tempo inicial para o composto estudado daidzeína, e ao estudar o teor de genisteína houve um pequeno aumento de 33% para enzima extrato bruto e 30% para enzima parcialmente purificada.

A Figura 13 representa os perfis cromatográficos obtidos antes do processo de bioconversão da matéria-prima melaço de soja (a) e após seus processos de bioconversão (b a h). A bioconversão ocorreu na forma majoritária levando os extratos concentrados de melaço de soja transformando em compostos agliconas daidzeína e genisteína em 100% de conversão para os tratamentos com o uso de enzima β -glicosidase (b, c, d, e, g, h).

A conversão dos compostos somente foi possível devido à quebra da ligação glicosídica sobre os compostos glicosídicos daidzina e genistina promovida pela ação de enzima β -glicosidase na forma de extrato bruto atuando a uma temperatura de 40 °C durante 30 minutos. O efeito do tempo de reação enzimática foi descrito por Lima (2003) ao estudar o uso de (30, 60 e 90 minutos) concluindo que, quanto maior o tempo de reação, maior a diminuição das isoflavonas glicosídicas e conseqüentemente maiores as quantidades dos compostos agliconas. Marazza et al. (2009) estudaram a produção de enzima β -glicosidase produzida via *Lactobacillus* (L.) rhamnosus CRL981 e sua bioconversão sobre o leite de soja e concluíram que uma temperatura de 37 °C durante 12 h de fermentação é capaz de bioconverter 100% dos compostos glicosídicos transformando em compostos agliconas.

Aguiar e Park (2004) converteram as isoflavonas glicosídicas nas formas daidzeína e genisteína via fermentação semi-sólida com o uso do *Aspergillus. oryzae* ATCC 22786, utilizando como substrato o farelo de soja em temperatura de 30 °C durante 48 h obtendo 100% da bioconversão.

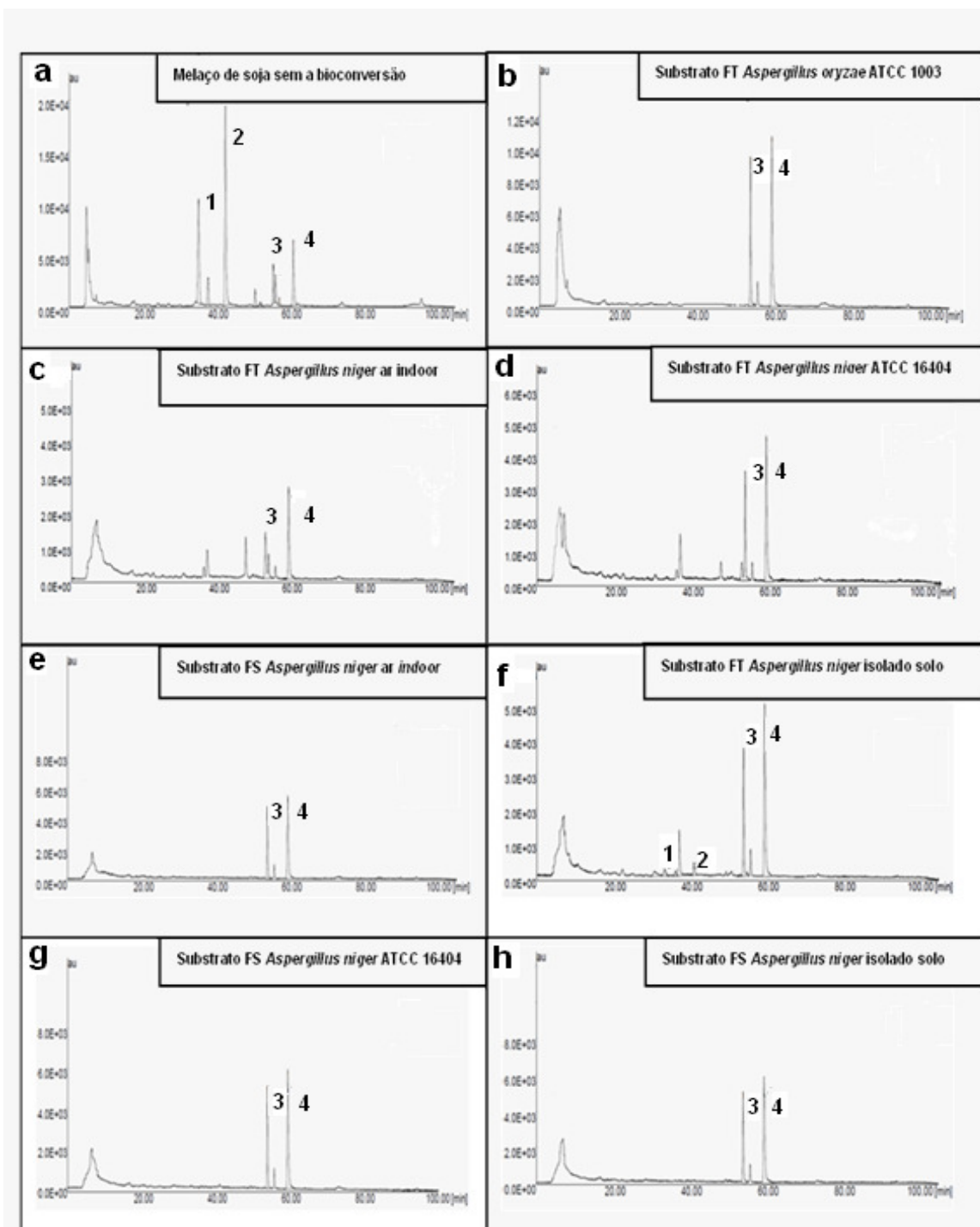


Figura 13 – Perfis dos cromatogramas referentes à bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas em função do extrato concentrado de melaço de soja. Reação com a enzima β -glicosidase em extrato bruto, provinda dos substratos farelo de trigo e farinha de soja desengordurada. **a**: controle sem processo de bioconversão 1,85 mg/mL de extrato concentrado; **b-h**: bioconversão do substrato contendo 1,85 mg/mL do extrato concentrado reagido com a enzima de β -glicosidase em extrato bruto. Compostos: 1: daidzina; 2: genistina; 3: daidzeína; 4: genisteína.

Para que não houvesse dúvidas sobre os tratamentos utilizados após a extração das isoflavonas presentes no melão de soja, foram realizados dois tratamentos diferentes. O primeiro tratamento considera o extrato de melão de soja eluído em meio ao solvente metanol (80%) após a extração das isoflavonas. O segundo tratamento, após obter o extrato de isoflavonas, é rotaevaporado até a retirada total da água e solvente metanol presente na amostra.

Os dois tratamentos foram utilizados no procedimento da bioconversão para obtenção de compostos agliconas. O segundo tratamento foi o que demonstrou melhor desempenho por apresentar apenas um dos compostos glicosídicos após o procedimento de bioconversão. Na Figura 14, encontram-se os teores dos compostos glicosídicos e agliconas para os dois tratamentos realizados.

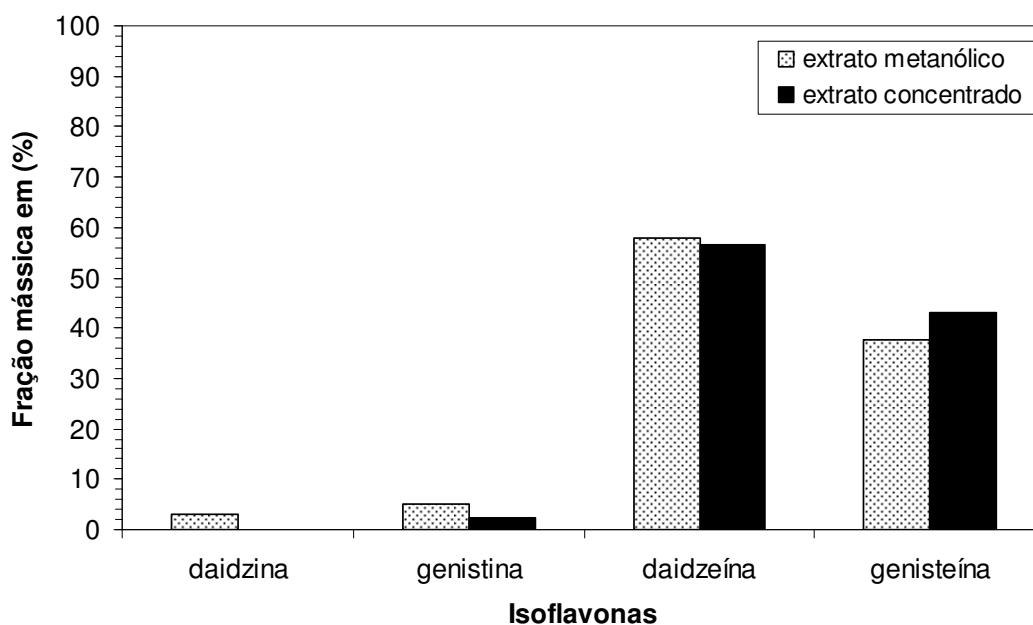


Figura 14 – Valores para os tratamentos em extrato metanólico e extrato concentrado.

5. CONCLUSÕES

O uso da fermentação em estado sólido FES, apesar de ser um método simples e de baixo custo, proporcionou valores da atividade enzimática de β -glicosidase em conformidade com a literatura.

Os fungos da espécie *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus oryzae* ATCC 1003, *Aspergillus niger* isolado do solo, e *Aspergillus niger* isolado do ar *indoor* desenvolveram em todas as fases de crescimento utilizadas e principalmente no processo de fermentação na FES.

O fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 1003 apresentou a maior atividade enzimática de β -glicosidase quando comparado aos demais fungos estudados para este trabalho em meio ao substrato farelo de trigo.

O extrato bruto enzimático dos *Aspergillus* apresentou-se estável para as condições utilizadas a 40 °C durante 30 minutos e favoreceu, desta forma, o processo de bioconversão na transformação dos compostos glicosídicos em agliconas.

Apesar de optado por não purificar o extrato bruto enzimático contendo a β -glicosidase devido às limitações de equipamentos e recursos disponíveis, os trabalhos disponíveis na literatura especializada que tratam sobre produção e extração de β -glicosidase geralmente utilizam os processos de purificação para aumentar a quantidade disponível de β -glicosidase para garantir teores máximos de bioconversão. Como os teores de bioconversão obtidos neste trabalho foram de 100% para os fungos *Aspergillus oryzae* ATCC 1003, *Aspergillus niger* isolado do solo, e *Aspergillus niger* isolado do ar *indoor* utilizando substratos provindo do farelo de trigo e farinha de soja desengordurada, pode-se concluir que a ausência do processo de purificação não foi a etapa determinante.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Usar biorreatores para melhorar o controle de alguns parâmetros fundamentais durante um processo de fermentação tais como: temperatura, pH e agitação.

Implementar um processo de purificação de enzima β -glicosidase obtida após o uso de microrganismos filamentosos utilizados no estudo.

Estudar outras formas de hidrólise sobre as isoflavonas provindas de subprodutos de soja.

Melhorar a bioconversão de compostos glicosídeos em agliconas a partir de parâmetros que promovam uma melhor bioconversão, principalmente pelo uso de enzimas e variando diferentes substratos.

Utilizar o produto final rico em isoflavonas agliconas na produção de nanopartículas para que possam ser mais eficientes na absorção do organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAN, J.; FRANGNE, R. **La ciência de los alimentos de La A ala Z**. Tradução: Miguel Calvo Rebollar e outros. Zaragoza – Espanha, Editorial Acribia S.A., p.113-154, 1990.

AGUIAR, C. L.; SUZUKI, C. N.; PAREDES-GUZMÁN, J. F.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Transformación de las β -glicosil isoflavonas por fermentación semi- sólida de harina de soja. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v.4, n.2, p.115-121, 2003.

AGUIAR, L. C.; PARK, Y. K. Conversão de daidzina e genistina de soja por β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, 22, n.1, p.183-195, jan/jun, 2004.

AIDDO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Solid substrate fermentations. **Advances in applied microbiology**, v.28, p.201-237, 1982.

ALLRED, C. D.; ALLRED, K. F.; JU, Y. H.; GOEPPINGER, T. S.; DOERGE, D. R.; HELFERICH, W. G. Soy processing influences growth of estrogendependent breast cancer tumors. **Carcinogenesis**, v. 25, n.9, p.1649–1657, 2004.

ALLRED, C. D.; TWADDLE, N. C.; ALLRED, K. F.; GOEPPINGER, T.; CHURCHWELL, I. M.; JU, Y. H.; HELFERICH, W. G. DOERGE, D. R. Soy Processing Affects Metabolism and Disposition of Dietary Isoflavones in Ovariectomized Balb/c Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8542-8550, 2005.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake in serum lipids. **The New England Journal of Medicine**, v.333, p.276-282, 1995.

ANDLAUER, W.; KOLB, J.; FÜRST, P. Isoflavones from tofu are absorbed and metabolized in the isolated rat small intestine. **The Journal of Nutrition**, v.130, p. 3021-3027, 2000.

ARDITI, T.; MERDITH, T.; FLOWERMAN, P. Renewed interest in soy isoflavones and saponins. **Cereal Foods World**, n.45, p.414-417, 2000.

ARJMANDI, B. H.; SMITH, B. J. Soy isoflavones osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.130-137, 2002.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v.29, p.719-739, 2005.

BAKHIT, R. M.; KLEIN, B. P.; ESSEX-SORLIE, D. HAM, J. O.; ERDMAN, J. W JR.; POTTER, S. M. Intake of 25 g soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. **The Journal of Nutrition**, v.124, p.213–222, 1994.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods - extraction conditions and analysis by HPLC Mass-Spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v.42, n.11, p.2466-2474, 1994.

BARNES, S. Effect of Genistein on In Vitro and In Vivo Models of Cancer. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.777S-783S, 1995.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, p.375–407, 2002.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of Microorganisms**. 8th edition Prentice Hall International Editions, New Jersey, 1997.

BYERS, T. The role of epidemiology in developing nutritional recommendations: Past, present and future. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, (suppl.), p.1304S-13088S, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Valor nutritivo da soja e potencial de utilização na dieta brasileira. Londrina: **EMBRAPA-CNPSO**, documentos, 29, p.13, 1988.

CARROLL, K. K. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. **Journal of the American Dietetic Association**, v.91, n.7, p.820–827, 1991.

CASSIDY, A.; BINGHAM, S.; SETCHELL, K. D. R. Biological effects of isoflavones present in soy in premenopausal women: implications for the prevention of breast cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.60, p.333–340, 1994.

CEGLA, U. G.; SHUSTER, M. **Process for the production of soybean sugars and the product produced thereof**. US Patent 6.913.771, 2005.

CHIOU, R. Y. Y.; CHENG, S. L. Isoflavone transformation during soybean koji preparation and subsequent miso fermentation supplemented with ethanol and NaCl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3656-3660, 2001.

CHUN, J.; KIM, J. S.; KIM, J. H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. 4. **Food Chemistry**, v.109, p.278–284, 2008.

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.41, p.1961-1967, 1993.

COULON, S. et al. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.74, p.105-114, 1998.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2009/2010. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4graos_07.01.10.pdf. Jan. 2010. Acesso: 18 Jan de 2010.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**, v.66, p.1191-308, 1981.

ESEN, A. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase. **Plant Physiology**, v.98, p.174–182, 1992.

ESAKI, H.; WATANABE, R.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Formation mechanism for potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in soybean fermented with *Aspergillus saitoi*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.63, n.5, p.851-858, 1999b.

ESAKI, H. KAWAKISHI, S.; MORIMITSU, Y.; OSAWA, T. New potent antioxidative odihydroxyisoflavones in fermented Japanese soybean products. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.63, p.1637-1639, 1999a.

FANTI, P.; STEPHENSON, T.J.; KAARIAINEN, I.M.; REZKALLA, B.; TSUKAMOTO, Y.; MORISHITA, T.; NOMURA, M.; KITAYAKARA, C.; CUSTER, L.J.; FRANKE, A.A. Serum isoflavones and soya food intake in Japanese, Thai and American end-stage renal disease patients on chronic haemodialysis. **Nephrology Dialyses Transplantation**, v.18, p.1862–1868, 2003.

FDA Isoflavone research. **U.S. Food and Drug Administration**. Federal Register: v.64, n.206, October 26, 1999.

FDA - Food and Drug Administration, Health and Human Service. Food labeling: health claims: soy protein and coronary heart disease: final rule. **Federal Registration**, v.64, 55700-55733, 1999.

FORMICA, J. V.; REGELSON W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, p.1061–1080, 1995.

FRITZ, K. L.; SEPPANEN, C. M.; KURZER, M. S.; CSALLANY, A. S. The in vivo antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. **Nutrition Research**, v.23, p.479–487, 2003.

GENOVESE M. I.; LAJOLO, M. F. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Revista Ciência e tecnologia de alimentos**, v.21, n.1, p.3-5, jan/abr, 2001.

GRIFFITHS, L. A.; SMITH, G. E. Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. **Biochemistry Journal Colchester**, v.128, p.901-911, 1972.

GRÜN, I. U.; LI, C. A. K.; LIN, B.; ZHANG, J.; LAKDAS, N. F. Changes in the profile of Genistein, Daidzein, and their Conjugates during Thermal Processing of Tofu. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2839-2843, 2001.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. Chapman and Hall, p.543, 1993.

HASLER, C. M. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v.52, n.11, p.63-70, 1998.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderlystudy. **The Lancet**, v.342, p.1007–1011, 1993.

HENDRICH, S.; LEE, K. W.; KU, X.; WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Defining food components as new nutrients, **The Journal of Nutrition**, v.124, p.1789S-1792S, 1994.

HERMAN, C.; T. ADLERCRETUZ, T. Z.; GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L.; HÖCKERSTEDT, K. A. V.; WATANABE, S.; MARKKANEN, M. H.; MAKELA, T. H.; WÄHÄLÄ, K. T.; HASE, T. A.; FOTSIS, T. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk, **The Journal of Nutrition**, v.125, p.757S-770S, 1995.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. **Archives of Toxicology**, v.20, p.237-248, 1998.

HOU, H. J.; CHANG, K. C. Yield and quality of soft tofu as affected by soybean physical damage and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.116, p.4798-4805, 1998.

HOECK, J. A.; FEHR, W. R.; MUHRPHY, P. A.; WELKE, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Science**, v.40, p.48-51, 2000.

HUI, E.; HENNING, S. M.; PARK, N.; HEBER, D.; GO, V. L. W. Genistein and daidzein/glycitein content in tofu. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.199-206, 2001.

IBE, S.; KUMADA, K.; YOSHIBA, M.; ONGA, T. Production of natto which contains a high level of isoflavona aglycones. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**, v.48, n.1, p.27-34, 2001.

IKEDA, R.; OHTA, N.; WATANABE, T. Changes of isoflavones at various stages of fermentation in defatted soybeans. **Journal Japanese Society of Food Science and Technology** – Nippon Shokuhin, v.42, n.5, p.322-327, 1995. (Citado por ESAKI et al., 1999b).

IMCOPA, Disponível em: www.imcopa.com.br. Ago. 2009. Acesso em: 27 Ago. 2009.

IZUMI T.; PISKULA M. K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **The Journal of Nutrition**, v.130 p.1695–9, 2000.

KATZ, F. That's using the old bean. **Food Technology**, Chicago, v.52, n.6, p.42-43, 1998.

KASS-ANNESE, B. Alternative therapies for menopause. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.43, n.1, p.162-183, 2000

KIM, H.; PETERSON, T. G.; BARNES, S.; Mechanisms of action of the soy isoflavona genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor β signaling pathways. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68 (suppl.), p.1418S-1425S, 1998.

KUIPER, G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . **Endocrinology**, v.38, p.863-870, 1997.

KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON J. C.; SAFE, S. H.; VAN der SAAG, P. T.; VAN der BURG, B.; GUSTAFSSON, J. A. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . **Endocrinology**, v.139 (suppl.), p.4252-4263, 1998.

LEMBO, I.; DA SILVA, R.; PAGNOCCA, F. C. E.; GOMES, E. Production, characterization, and properties of β -glucosidase and β -xylosidase from a strain of *Aureobasidium sp.* **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.38, n.6, p.549-552, 2002.

LEE, S. J.; CHUNG, I. M.; AHN, J. K.; LEE, S. K.; KIM, S. H.; YOO, N. H. Variation in antioxidative activity of soybean (*Glycine max* L.) varieties with crop

year and duration of storage time. **Food Science and Biotechnology**, v.11, p.649–653, 2002.

LEE, J. H.; RENITA, M.; FIORITTO, R. J.; MARTIN, S. K.; SCHWARTZ, S. J.; VODOVOTZ, Y. Isoflavone characterization and antioxidant activity of Ohio soybean. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.2647–2651, 2004.

LIU, K.; MARKAKIS, P. Effect of maturity and processing on the trypsin inhibitor and oligosaccharides of soybeans. **Journal of Food Science**, v.52, p.222-225, Jan/Feb, 1987.

LIU, K. Soybeans. **Chemistry, Technology and Utilizations**, 2^a ed., Gaithersburg, Maryland, an Aspen Publication, p.83-93, 1999.

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J. C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.11, p.326-331, 2000.

LIMA, F. A. **Produção e caracterização de β -glicosidase vegetal e microbiana e sua aplicação para conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas**. Campinas – SP, 2003. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MARKLEY, K. S. **Soybean and soybean products**. New York: Interscience Publishers, v.2, 1974.

MATSSURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. **Journal of Food Science**, v.54 n.3, p.602-605, 1989.

MATSSURA, M.; OBATA, A. β -glycosidases from soybean hydrolyze daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v.58, n.1, p.144-147, 1993.

MARIGO, C. Epidemiologia. In: Estratégias para o controle de câncer. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, p.20-29, 1994.

MATSSURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on β -glucosidases from soybeans that hydrolyse daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.9, p.1623-1627, 1995.

MACKAY, R.; EDEN, J. Phytoestrogens and the menopause. **Climacteric**, n.1, p.302-308, 1998.

MARAZZA, J. A.; GARRO, M. S.; GIORI, G. S. Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. **Food Microbiology**, v.26, p. 333–339, 2009.

MESSINA, M. J.; PERSKY, V.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. **Nutrition and Cancer**, v.124, p.113-131, 1994.

MESSINA, M. Soyfoods and soybean phyto-estrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European Journal of Cancer**, v.36, p.71-77, 2000.

MESSINA, M.; ERDMAN, J. JR., SETCHELL, K. D. R. Introduction to and perspectives from the Fifth International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.1205S-1206S, 2004.

MORAIS, A. A. C. Valor nutritivo e funcional da soja. **Revista Brasileira Nutrição clínica**, v.15, n.2, p.306-315, 2000.

MURPHY, P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. **Food Technology**, v.36, p.60-64, 1982.

MURPHY, P. A.; SONG, T.; BUSEMAN, G.; BARUA, K.; BEECHER, G. R.; TRAINER, D.; HOLDEN, J. Isoflavones in retail and institutional soy foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.2697-2704, 1999.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; BONDI, A.; BIRK, Y. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.24, p.1174-1177, 1976.

NIELSEN, N. C. Soybean seed composition. In: Verma, D.P.S., Shoemaker, R.C. (eds). **Soybean: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology**. CAB International, Wallingford, p.127-164, 1996. (Citado por Brasil, 2007).

O'KEEFE, J. H.; NELSON, J.; HARRIS, W. B. Life-style change for coronary artery disease. **Postgraduate Medicinal**, v.99, n.2, p.89-106, 1996.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; NERY, I. A.; AGUIAR, C. L.; PACHECO, T. A. R. C. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. **Food and Science Industry**, v.34, p.14-19, 2001a.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja. **Biotecnologia, Ciência, Desenvolvimento**, v.20, n.3, p.12-14, 2001b.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Survey of isoflavone contents in Brazilian Soybean. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, v.3, n.2, p.156-160, 2001c.

PARKIN, D. M.; MUIR, C. S. Cancer incidence in five continents. Comparability and quality of data. **IARC Sci Publ**, v.120, p.45-173, 1992.

PETER, H. W.; AHLERS, J.; MOREIRA, R. A. **Cinética enzimática**. EUFC: Fortaleza, 1987.

PETERSON, G.; BARNES, S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer-cells: independence from strogen receptors and the multi-drug resistance gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.179, n.1, p.661-667, 1991.

PETERSON, G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. **The Journal of Nutrition**, v.125 (suppl.), p.784S-789S, 1995.

PEREIRA, I. R. O.; DAMASCENO, N. R. T.; PEREIRA, E. C.; TAVARES, L. C.; ABDALLA, D. S. P. Avaliação das concentrações plasmática e urinária de isoflavonas purificadas de soja. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.38, n.3, jul/set, 2002.

POTTER, S. M. Soy protein and serum lipids. **Current Opinion in Lipidology**, v.7, p.260–264, 1996.

POTTER S. M.; BAUM, J. A.; TENG, H.; et al. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 68 (suppl), p.1373S–1379S, 1998.

PRICE, N. C.; STEVENS, L. **Fundamentals of Enzymology**. Oxford Science Publications. Second edition, New York, 1989.

REN, H.; LIU, H.; ENDO, H.; TAKAGI, Y.; HAYASHI, T. Antimutagenic and anti-oxidative activities found in chinese traditional soybean fermented products furu. **Food Chemistry**, v.95, p.71–76, 2006.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista brasileira de Botânica**. V.27, (2), p.205-211, 2004.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. “Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health”. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1094-1117, 2000.

SCHEIBER, M. D.; REBAR, R. W. Isoflavones and postmenoausal bone health: a viable alternative to estrogen therapy? **Menopause**, v.6, p.233-241, 1999.

SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.134, n.6, (suppl.), p.1333S-1343S, 1998.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, B. E.; KIRSCHNER, A. S.; HEUBI, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of

intestinal metabolism for bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.447–453, 2002.

SILBERBERG, M. et al. “The bioavailability of polyphenols is highly governed by capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites”. **Europe Journal of Nutrition**, v.45, p.88-96, 2006.

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P. A. Soy isoflavones analysis: quality control and a new internal standard. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.1474S-1479S, 1998.

TEW, B. Y.; XU, X.; WANG, H. J.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. A. Diet high in wheat fiber decreases the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.126, n.4, p.871-877, 1996.

TSUKAMOTO, C.; KUDOU, S.; KIKUCHI, A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; ONO, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Isoflavones in soybean products: composition, concentration, and physiological effects. **Documentos da Embrapa**, v.169, n.1, p.9-14, 2001.

VAN DER RIET, W. B.; WIGHT, A. W.; CILLIERS, J. J. L.; DATEL, J. M. Food chemical investigation of tofu and its by product okara. **Food Chemistry**, v.34, n.3, p.193-202, 1989.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa. Effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1674-1677, 1994.

WAINWRIGHT, M. **Introduccion a la biotecnologia de los hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995.

WHO. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of WHO Study Group. **World Health Organization Technical Report Series**, v.843, p.1-129, 1994.

WILSON, L. A.; MURPHY, P. A.; GALLAGHER, P. Soyfood product markets in Japan: U.S. export opportunities. **Food Science and Human Nutrition Department**, Iowa State University, Ames, IA, 1992.

WONG W. W.; SMITH, E. O. B.; STUFF, J. E.; HACHEY, D. L.; HEIRD, W. C.; POWNELL, H. J. Cholesterol-lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68 (suppl), p.1385S-1389S, 1998.

WU, A. H.; STANCZYK, F. Z.; MARTINEZ, C.; TSENG, C. C.; HENDRICH, S.; MURPHY, P.; CHAIKITTISILPA, S. STRAM, D. O.; PIKE, M. C. A. Controlled 2-mo dietary fat reduction and soy food supplementation study in postmenopausal

women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, n.5, p.1133–1141, 2005.

XU, X.; WANG, H. J.; MURPHY, P. A.; COOK, L.; HENDRICH, S. Daidzein is more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. **The Journal of Nutrition**, v.124, p.825-832, 1994.

XU, X.; HARRIS, K. S.; WANG, H.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.2307-2315, 1995.

ZAVA, D. T.; DUWE, G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v.27, n.1, p.31-40, 1997.

ZUMOFF, B. Does postmenopausal estrogen administration increase the risk of breast cancer? Contributions of animal, biochemical and clinical investigative studies to resolution of the controversy. **Experimental Biology and Medicine**, v.217, p.30-37, 1998.

APÊNDICE - A

Neste apêndice são apresentadas as curvas de calibração realizadas em condições cromatográficas e espectrofotométricas bem como a metodologia de cálculos.

A – 1 Emprego das curvas de calibração para a determinação dos teores de isoflavonas e atividade enzimática

A curva de calibração foi realizada para construir gráficos relacionados à resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito em estudo, contendo uma variável independente (eixo horizontal ou x) relacionada às várias concentrações preparadas do padrão analítico da substância de interesse, e a dependente (eixo vertical ou y) ao sinal analítico obtido para cada concentração do padrão. As Figuras A1 a A6 representam os valores obtidos para o parâmetro (r) que auxilia na definição da faixa dinâmica ou intervalo dinâmico de cada composto presente.

As equações obtidas com as curvas de calibração (área versus concentração) para cada composto podem ser observadas nas Figuras A1 – A6.

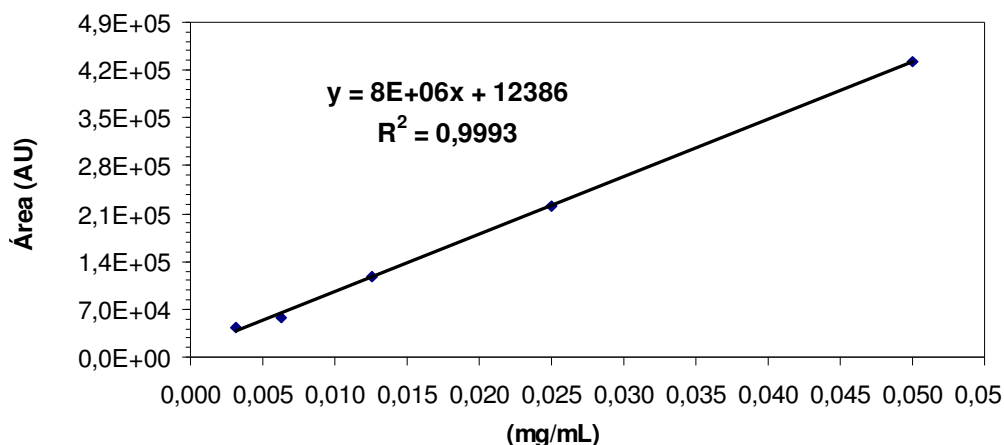


Figura A 1 – Curva de calibração da daidzina.

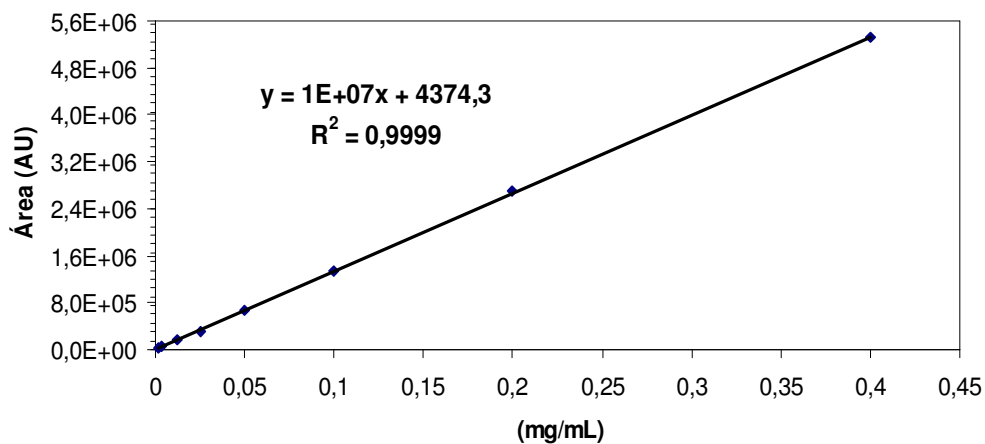


Figura A 2 – Curva de calibração da genistina.

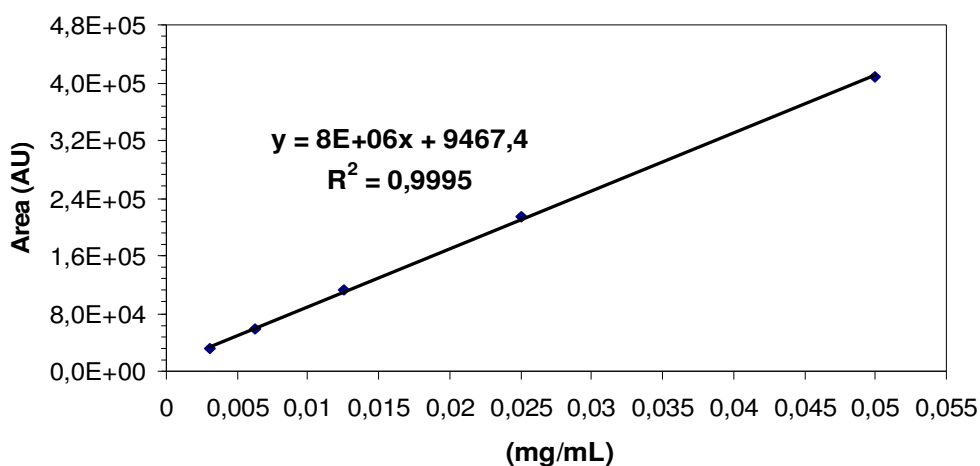


Figura A 3 – Curva de calibração da daidzeína.

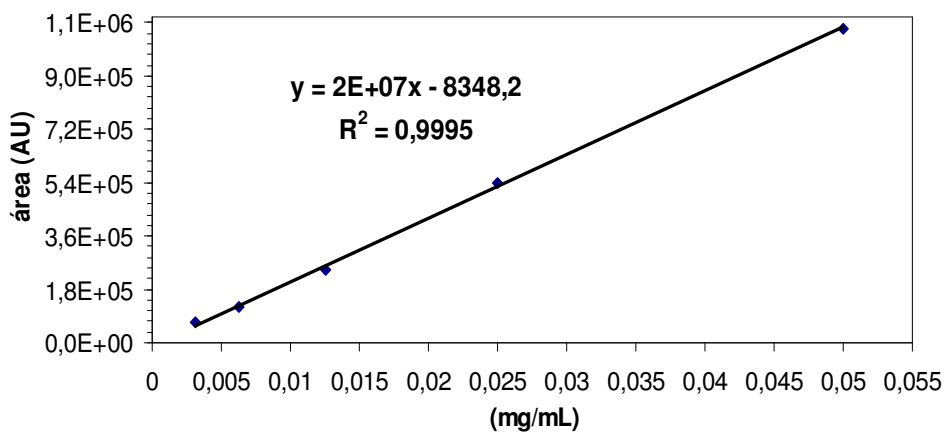


Figura A 4 – Curva de calibração da genisteína.

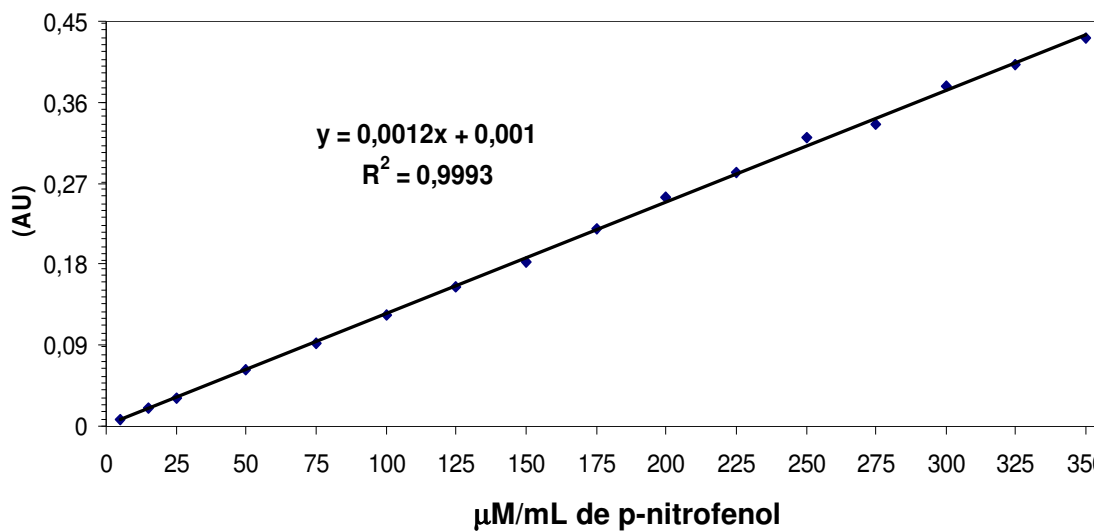


Figura A 5 – Curva de calibração do p-nitrofenol.

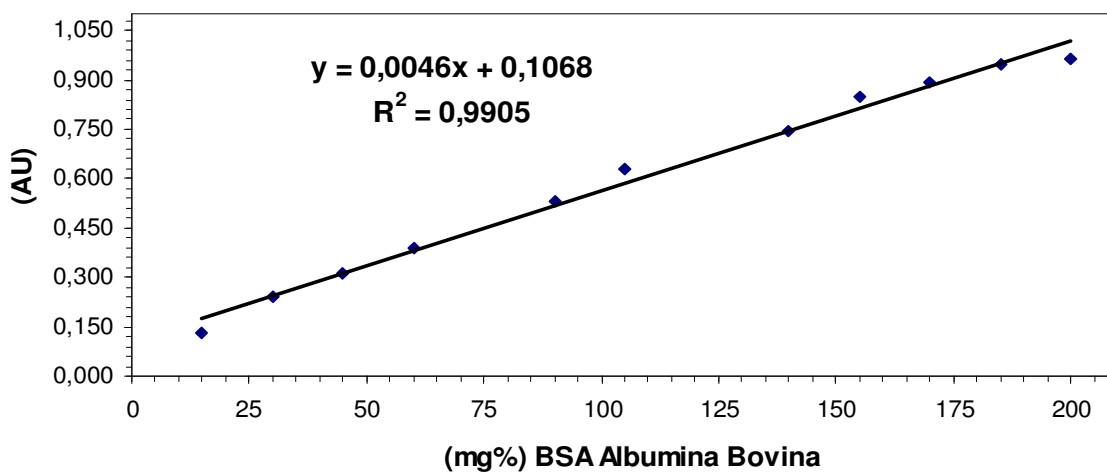


Figura A 6 – Curva de calibração para proteínas totais.

APÊNDICE - B

A curva de calibração para análise de proteína total foi utilizada para confecção dos cálculos de atividade enzimática de β -glicosidase conforme metodologia descrita por (BRADFORD, 1976). A curva de calibração do p -nitrofenol, foi determinada para confecção dos cálculos relacionados para determinar valores das atividades enzimáticas de β -glicosidase, conforme método descrito por (MATSUURA et al., 1995).

B – 1 Aplicação da fórmula para obter valores de β -glicosidase

Equação da curva de calibração da proteína bruta em mg/100mL ou mg%

$$C = (\mu\text{g/mL}) = 0,0046x (\text{AU}) + 0,1068$$

Valor obtido na leitura em AU = **0,493**

$$C = \frac{0,493 - 0,1068}{0,0046} = 83,95 \text{ (mg\%)}$$

83,95mg% _____ 100 mL

X _____ 0,5 mL

X = 0,4198mg de proteína total

Equação da curva de calibração do p -nitrofenol ($\mu\text{M/mL}$):

$$Y (\mu\text{M/mL}) = 0,0012x (\text{AU}) + 0,001$$

Valor obtido na leitura em AU = **0,183**

$$C = \frac{0,183 - 0,001}{0,0012}$$

$$C = 151,66 \mu\text{M}$$

$$fc = \text{Fator de diluição da solução: } 151,66 \mu\text{M} \cdot 80 = 12.132 \mu\text{M}$$

$$\begin{array}{l} 12.132 \mu\text{mol} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000 \text{ mL} \\ X (\mu\text{mol}) \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 2,5 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 30.3 \mu\text{mol}$$

Dividido pelo tempo de reação de 20 min para solução composta de: 0,5 mL de enzima + 1 mL de solução tampão + 1 mL de solução pNPG = 2,5 mL (Total)

$$30.3 \mu\text{mol} / 20 \text{ min} = 1,51 \mu\text{molmin}^{-1}$$

Valor da atividade específica de β -glicosidase:

$$0,4198 \text{ mg de proteína} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1 \text{ U}$$

$$1,51 \mu\text{mol} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad X$$

$$U = 3,6 \text{ U/mg (Valor da atividade específica)}$$