

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIEL MANTOVANI

**ESTUDO DA RECUPERAÇÃO E HIDRÓLISE DE ISOFLAVONAS E
CARBOIDRATOS OBTIDOS A PARTIR DO MELAÇO DE SOJA**

CURITIBA

2013

DANIEL MANTOVANI

**ESTUDO DA RECUPERAÇÃO E HIDRÓLISE DE ISOFLAVONAS E
CARBOIDRATOS OBTIDOS A PARTIR DO MELAÇO DE SOJA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

Coorientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho

CURITIBA

2013

M293e

Mantovani, Daniel

Estudo da recuperação e hidrólise de isoflavonas e carboidratos obtidos a partir do melaço de soja / Daniel Mantovani. – Curitiba, 2013.
143f. : il. color. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2013.

Orientador: Marcos Lúcio Corazza – Co-orientador: Lúcio Cardozo Filho.
Bibliografia: p. 122-134.

1. Soja - Biotecnologia. 2. Isoflavonas. 3. Enzimas. 4. Fermentação I. Universidade Federal do Paraná. II. Corazza, Marcos Lúcio. III. Cardozo Filho, Lúcio. IV. Título.

CDD: 664.08

DANIEL MANTOVANI

**ESTUDO DA RECUPERAÇÃO E HIDRÓLISE DE ISOFLAVONAS
E OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DO MELAÇO DE
SOJA**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Orientador: Prof. Dr. MARCOS LÚCIO CORAZZA
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. MARCELO LANZA
Centro Tecnológico, UFSC


Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. MARIA LÚCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. ÉVERTON FERNANDO ZANOELO
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 18 de outubro de 2013.

DEDICO

Ao meu pai Nilso (*in memorian*).

A *Deus* pela minha vida;

À minha amada esposa Solange, sempre tão prestativa e 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.

Aos meus maravilhosos pais, Lúcia e Domingos, pelo amor incondicional.

Obrigado.

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço por todos os momentos concebidos ao longo de minha vida, pela saúde, amor que tenho pela minha família, pela força e determinação para vencer os obstáculos.

À Solange Canevesse Mantovani, meu amor, pelo incentivo e compreensão durante as dificuldades enfrentadas.

Ao amor incondicional prestado pela minha família para enfrentar diversos obstáculos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza pela amizade, aposta no projeto e acima de tudo, pela compreensão durante a confecção do trabalho. O mesmo respeito e admiração dedico ao meu coorientador Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho pela aposta e, acima de tudo, pela nossa amizade que sempre foi um estímulo em minha luta.

Ao Coordenador do Núcleo de Estudos de Produtos Naturais (NEPRON), Prof. Dr. Sílvio Claudio da Costa, por abrir as portas de seu laboratório para realização de parte do presente projeto.

Ao amigo e Prof. Dr. Fernando Pedersen Voll pela valiosa ajuda na confecção dos modelos matemáticos, utilizados especialmente durante a ultrafiltração para obtenção de compostos ricos em carboidratos.

Ao amigo e Químico da Universidade Estadual de Maringá *MSc.* Antônio Sérgio Dacome pela ajuda durante a confecção de alguns dos procedimentos que envolveram extrema dedicação.

Ao amigo e Químico do Tecpar unidade Maringá *MSc.* Nilson Marcos Tazinafo pelas dicas relacionadas a cromatografia.

Ao amigo e professor Dr. Sergio Paulo Severo de Souza Diniz da Universidade Estadual de Maringá, e seu aluno de Pós-Graduação Daniel Pavanello pela ajuda durante a confecção de alguns dos procedimentos que envolveram procedimentos microbiológicos.

À equipe do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) especialmente ao Fábio, Cíntia e Edson pela amizade formada durante os longos meses de análise cromatográfica realizadas neste departamento.

Aos amigos e Engenheiros do Departamento de Engenharia Química (DEQ), Lauro Kambara e Luiza Calsavara, pelo empréstimo de inúmeros reagentes, vidrarias e instalações para realização de análises.

Ao meu amigo Willian Giufrida pelo ensinamento do equipamento Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV), e análises posteriores.

Ao meu amigo Adriano Valin pela instalação dos programas *Statistica* e *Origin*.

Aos demais amigos do laboratório pela formação de uma grande equipe de trabalho, especialmente ao Leandro com sua famosa frase “tudo vai dar certo”, para despertar nossa busca pelo término do presente projeto.

Ao glorioso Paulo Roberto Krainski, secretário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, especialmente pelo seu lado profissional e, acima de tudo, pela nossa amizade que foi conquistada ao longo dos anos.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, pela aposta e auxílio financeiro provindo do REUNI.

Agradeço a ITAIPU Binacional, especialmente à Coordenadora do Laboratório Ambiental, Prof^a Dr^a Leonilda Correia dos Santos, pela dedicação no isolamento, identificação e armazenamento do micro-organismo utilizado neste estudo.

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, fica aqui o meu apoio.

RESUMO

O melão de soja é um resíduo obtido no processo de geração do concentrado proteico. É um resíduo pouco aproveitado em aplicações biotecnológicas, mesmo dispondo de substâncias bioativas, como as isoflavonas, e presença de altas quantidades de carboidratos, em especial os oligossacarídeos de rafinose (RO). Este material apresenta grande potencial para atender demandas das indústrias alimentícias e farmacêuticas. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar a conversão dos compostos de isoflavonas (formas glicosídicas) em formas agliconas por bioconversão com o uso de enzimas presentes no extrato enzimático. Foram utilizados três diferentes solventes extratores de isoflavonas (metanol, etanol e água), e bioconversões dos extratos utilizando o planejamento experimental 2^3 com variáveis independentes (agitação, razão de extrato enzimático e tempo). Foram utilizadas membranas de ultrafiltração com diferentes porosidades para obtenção dos carboidratos livres de sujidades e posterior bioconversão das formas RO em formas monossacarídicas e dissacarídicas, bem como estabelecer um protocolo eficiente para obtenção e aplicação industrial. O extrato enzimático obtido do *Aspergillus niger* contém enzimas β -glicosidase e α -galactosidase obtidas por fermentação em estado semissólido após incubação por 96 h. A caracterização bioquímica da enzima β -glicosidase presente no extrato (Gli) foi avaliada pelo pH e temperatura ótimas, valores 4,9 e 56,5 °C, respectivamente, e estabilidade enzimática na faixa de pH entre 3,5 a 5,5 e temperatura de 50 e 55 °C. O uso da técnica Api-Zym[®] possibilitou um avanço em relação à presença de outras enzimas, antes desconhecidas, presentes no extrato enzimático. Testes de atividade antimicrobiana sobre o fungo *Myrothecium verrucaria* foram realizados com concentração de 0,2 mg/ μ L de isoflavonas bioconvertidas, com a obtenção de resultados satisfatórios em relação ao crescimento do micro-organismo nas proximidades do halo. Os valores da composição centesimal do melão de soja apresentaram baixos teores proteicos e alto teor de carboidratos digeríveis (24,5%) e formas não digeríveis RO (19,5%). A ultrafiltração de compostos de isoflavonas totais possibilitou a obtenção de teores distintos (101,8 e 82,8 μ g/g). No entanto, para os teores de carboidratos totais o maior valor foi de 104,0 mg/g e o menor 39,4 mg/g. Os resultados de bioconversão, utilizando a enzima α -Gal sobre os compostos de carboidratos foram satisfatórios, com observação da redução dos valores de RO de 75,2% e 70%. O método adotado para bioconversão sobre os compostos de isoflavonas extraídos a partir dos solventes metanol, etanol e água, empregando a enzima β -Gli, foi satisfatório, especialmente em relação ao etanol. Ainda neste trabalho, a validação da metodologia de quantificação dos compostos de isoflavonas com obtenção das curvas de calibração e ajustes dentro de valores significativos a nível de ($p < 0,05$), com utilização da análise de variância. Entretanto, para os teores de fenólicos totais, os resultados obtidos foram considerados coerentes por se tratar de um resíduo à base de soja, com valores variando entre 26,8 GAE/100g de extrato metanólico (80%) e 59,8 mg GAE/100g de extrato etanólico (90% v/v).

Palavras-chave: Extrato enzimático. Bioconversão. Rendimento.

ABSTRACT

Soybean molasses is a residue obtained during the process of generating protein concentrate. It has hardly been tapped in biotechnological applications even providing bioactive substances such as isoflavones and the presence of high levels of carbohydrates, especially raffinose oligosaccharides (RO). This material has great potential to meet the demands of food and pharmaceutical industries. Thus, this paper aims to study the conversion of isoflavone compounds (glycoside forms) into aglycone forms through bioconversion using enzymes from the enzyme extract. Three different isoflavone extractor solvents (methanol, ethanol, and water) were used as well as extract bioconversions using the experimental design 2^3 with independent variables (agitation, enzyme extract rate, and time). Ultrafiltration membranes were used with different porosity to obtain carbohydrates free of impurities and subsequent bioconversion of RO forms into monosaccharide and disaccharide forms, as well as establish an efficient protocol for industrial application. The enzyme extract obtained from *Aspergillus niger* has β -glucosidase and α -galactosidase enzymes obtained through semisolid state fermentation after incubation for 96 h. Biochemical characterization of the enzyme β -glucosidase present in the extract (Gli) was evaluated by pH and temperature conditions, values 4.9 and 56.5 °C respectively. Enzymatic stability showed pH ranging from 3.5 to 5.5 and temperature of 50 and 55 °C. The use of the technique Api-Zym[®] enabled the improvement concerning the presence of previously unknown enzymes in the enzyme extract. Tests of antimicrobial activity against the fungus *Myrothecium verrucaria* were performed with 0.2 mg/ μ L of converted isoflavones. Results were satisfactory in relation to the growing of microorganisms near the halo. Proximate composition values of soybean molasses showed low levels of protein and high levels of digestible carbohydrates (24.5%) and non digestible RO forms (19.5%). The infiltration of total isoflavone compounds made it possible to get distinct concentrations (101.8 and 82.8 μ g/g). However, for total carbohydrate levels the highest value was 104.0 mg/g and the lowest 39.4 mg/g. Bioconversion results using the enzyme α -Gal on carbohydrate compounds were satisfactory and the reduction of RO values of 75.2% and 70% were observed. The method adopted for bioconversion on isoflavone compounds extracted from the solvents methanol, ethanol, and water using the enzyme β -Gli was satisfactory, especially with regards to ethanol. Also, the methodology for quantifying isoflavone compounds was validated and calibration curves and adjustments were obtained within significant levels at ($p < 0.05$) using the variance analysis. However, the results for total phenolic levels were considered consistent since it is a soybean-based residue with values ranging from 26.8 GAE/100g of methanol extract (80%) and 59.8 mg GAE/100g of ethanol extract (90% v/v).

Key words: Enzyme extract. Bioconversion. Yield.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sítios de clivagem formados pela atuação das enzimas α -Gal e invertase sobre os compostos de rafinose e estaquiose (LEBLANC et al. 2004)27
Figura 2	<i>Aspergillus niger</i>30
Figura 3	Mecanismo de bioconversão enzimática, realizado pela enzima β -Gli sobre os compostos glicosídicos (PARK et al., 2001)30
Figura 4	Estrutura de flavonóides (ARAÚJO, 2008)31
Figura 5	Estrutura das isoflavonas glicosiladas (I) e não glicosiladas (II) presentes no melão de soja (SONG et al., 1998)33
Figura 6	Representação esquemática de uma membrana com escoamento tangencial36
Figura 7	Estrutura do trabalho por etapas38
Figura 8	Fluxograma descritivo referente a obtenção do extrato enzimático.....42
Figura 9	Sistema Api-Zym [®]46
Figura 10	Fluxograma do processo de limpeza do melão de soja.....49
Figura 11	Perfil do produto após a passagem em peneiras de pré limpeza.....50
Figura 12	Sistema montado para “polimento” da solução de melão de soja50
Figura 13	Produto final, após a passagem da solução de melão de soja em sistema de pré limpeza e “polimento”51
Figura 14	Unidade experimental piloto da Millipore modelo <i>Labscale</i> TFF.52
Figura 15	Fluxograma de obtenção dos extratos de isoflavonas.56
Figura 16	Fluxograma da obtenção de massa seca dos extratos de isoflavonas após a rotaevaporação.....56
Figura 17	Esquema da reação de hidrólise enzimática proposta pelo estudo. 1 - banho ultratermostático; 2 - agitador magnético; 3 - reator encamisado.58
Figura 18	Colunas recheadas com resinas de troca iônica BV1 catiônica e BV2 aniônica.....64

Figura 19	Cromatograma dos padrões de isoflavonas.....	66
Figura 20	Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática.	71
Figura 21	Efeito do pH sobre os valores de atividade enzimática em tampão Macllvaine (*2,5 a 8,0) e tampão de acetato de sódio (•3,6 a 5,8).....	72
Figura 22	Determinação da termoestabilidade da enzima β -Gli com pré-incubação em (*) 50 °C, (\blacktriangle) 55 °C, (\otimes) 60 °C e (x) 65 °C	73
Figura 23	Determinação do pH na estabilidade da enzima β -Gli, em tampão Macllvaine (*2,5 a 8,0) e tampão de acetato de sódio (•3,6 a 5,8).....	74
Figura 24	Inoculação das enzimas produzidas pelo <i>Aspergillus niger</i> , uso do sistema Api-Zym [®]	75
Figura 25	Testes de atividade antimicrobiana com extratos de isoflavonas bioconvertidas.....	77
Figura 26	Obtenção de um produto açucarado sem a presença de cor.....	80
Figura 27	Gráfico de Pareto e os efeitos das variáveis independentes estudadas no planejamento fatorial 2^2 para a atividade enzimática.....	87
Figura 28	Superfície de resposta da atividade enzimática do extrato em função do pH e temperatura.	88
Figura 29	Gráfico de Pareto e os efeitos das variáveis independentes estudadas no planejamento fatorial 2^3 na fração de 5 kDa.....	90
Figura 30	Teores de carboidratos totais em $\mu\text{g}/\text{mg}$ sem o processo de bioconversão fração de 5 kDa.....	91
Figura 31	Teores de carboidratos totais em $\mu\text{g}/\text{mg}$ bioconvertidos fração 5 kDa.	92
Figura 32	Gráficos das superfícies de respostas gerados a partir da fração obtida do permeado 5 kDa, em função do tempo e razão de extrato enzimático: (A) 60 rpm, (B) 90 rpm e (C) 120 rpm	94
Figura 33	Gráfico de Pareto e os efeitos das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^3 no extrato obtido em solvente metanol 80%.	96
Figura 34	Teores de isoflavonas totais em $\mu\text{g}/\text{g}$ sem o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente metanol 80%.	97
Figura 35	Teores de isoflavonas totais em $\mu\text{g}/\text{g}$ com o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente metanol 80%.	98

Figura 36	Gráficos das superfícies de respostas gerados a partir do extrato obtido do solvente metanol 80%, em função do tempo e razão de extrato enzimático: (A) 60 rpm, (B) 90 rpm e (C) 120 rpm100
Figura 37	Teores de isoflavonas totais em $\mu\text{g/g}$ sem o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente etanol 90%.103
Figura 38	Teores de isoflavonas totais em $\mu\text{g/g}$ com o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente etanol 90%104
Figura 39	Gráficos das superfícies de respostas gerados a partir do extrato obtido do solvente etanol 90%, em função do tempo e razão de extrato enzimático: (A) 60 rpm, (B) 90 rpm e (C) 120 rpm106
Figura 40	Gráfico de Pareto e os efeitos das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^3 no extrato obtido em solvente água108
Figura 41	Teores de isoflavonas totais em $\mu\text{g/g}$ sem o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente água109
Figura 42	Teores de isoflavonas totais em $\mu\text{g/g}$ com o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente água110
Figura 43	Gráficos das superfícies de respostas gerados a partir do extrato obtido do solvente água, em função do tempo e razão de extrato enzimático: (A) 60 rpm, (B) 90 rpm e (C) 120 rpm112
Figura 44	Curva de linearidade versus equação linear114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Transformações ocorridas pela adição da enzima β -Gli microbiana aos compostos de flavonóides.....	30
Tabela 2	Fatores e níveis que compõem o planejamento fatorial 2^2 completo com pontos centrais e rotatividade ($\alpha = \sqrt{2}$).....	57
Tabela 3	Planejamento fatorial 2^2 para análise de atividade enzimática do extrato	57
Tabela 4	Fatores e níveis que compõem o planejamento fatorial 2^3 completo com pontos centrais utilizados nas análises de bioconversão das isoflavonas	59
Tabela 5	Fatores e níveis que compõem o planejamento fatorial 2^3 completo com pontos centrais utilizados nas análises de bioconversão dos carboidratos	59
Tabela 6	Gradiente formado para passagem dos compostos de isoflavonas por CLAE.....	62
Tabela 7	Mistura dos padrões de isoflavonas $\mu\text{g/mL}$	62
Tabela 8	Valores das atividades enzimáticas obtidas do extrato enzimático.....	70
Tabela 9	Relação das enzimas avaliadas pelo sistema Api-Zym [®]	76
Tabela 10	Valores da composição centesimal e mineral do melaço de soja	79
Tabela 11	Teores de carboidratos totais do melaço de soja.....	80
Tabela 12	Análise dos teores de isoflavonas presentes no retido de 0,22 μm	82
Tabela 13	Análise dos teores de isoflavonas presentes no permeado de 0,22 μm	83
Tabela 14	Análise dos teores de isoflavonas presentes no permeado de 300 kDa	83
Tabela 15	Análise dos teores de isoflavonas presentes no permeado de 5 kDa.....	84
Tabela 16	Análise dos teores de carboidratos totais presentes nas frações obtidas por Ultrafiltração.....	85
Tabela 17	Planejamento fatorial 2^2 e a influência da combinação entre pH e temperatura em relação a atividade enzimática.....	86

Tabela 18	Dados da ANOVA da atividade enzimática do extrato relativo ao planejamento fatorial 2^2 completo com pontos centrais e rotatividade ($\alpha = \sqrt{2}$).....	86
Tabela 19	Bioconversão dos RO obtidos pelo uso da fração de 5 kDa utilizando o planejamento fatorial 2^3	88
Tabela 20	Dados da ANOVA sobre a bioconversão dos compostos RO com o uso do fatorial 2^3 em fração de 5 kDa	89
Tabela 21	Bioconversão dos compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente metanol 80% utilizando o planejamento fatorial 2^3	95
Tabela 22	Dados da ANOVA sobre os compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente metanol 80% utilizando o planejamento fatorial 2^3	95
Tabela 23	Bioconversão dos compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente água utilizando o planejamento fatorial 2^3	101
Tabela 24	Dados da ANOVA sobre os compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente etanol 90% utilizando o planejamento fatorial 2^3	101
Tabela 25	Modelo otimizado para o extrato obtido pelo solvente etanol 90% . .	102
Tabela 26	Bioconversão dos compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente água utilizando o planejamento fatorial 2^3	107
Tabela 27	Dados da ANOVA sobre os compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente água utilizando o planejamento fatorial 2^3	107
Tabela 28	Curvas dos padrões de isoflavonas versus concentração	113
Tabela 29	Análise de variância	115
Tabela 30	Limites de detecção e quantificação	116
Tabela 31	Teores dos Compostos Fenólicos Totais extratos utilizados na extração das isoflavonas valores expressos em mg GAE/100g	117

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	-	Agência nacional de vigilância sanitária
ATCC	-	American type culture collection
BDA	-	Ágar dextrose batata
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPS	-	Concentrado proteico de soja
CPQBA	-	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas
EPA	-	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos
ER	-	Receptores de estrogênio
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
FDA	-	Agência norte americana, regulamento do uso de medicamentos e alimentos
FES	-	Fermentação em estado sólido
FSS	-	Fermentação em semissólida
GRAS	-	Indicado como um alimento seguro
HDL	-	Lipoproteínas de alta densidade
INMETRO	-	Instituto nacional de metrologia, normalização e qualidade Industrial
K	-	Kilodalton
M	-	Molar
mM	-	Milimolar
MSR	-	Metodologia de superfície de resposta
m/v	-	Massa por volume
nmol	-	Nanomolar
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
p-NPβGl	-	para-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo
p-NPαGal	-	para-nitrofenil α -D-galactopiranosídeo
p-NP	-	para-nitrofenol
PSM	-	Processo de separação por membranas

RO	-	Oligossacarídeos de Rafinose
U	-	Unidade de atividade enzimática
v/v	-	Volume por volume
α-Gal	-	α -Galactosidase
β-Gli	-	β -glicosidase
μM	-	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVO	22
1.1.2 GERAL	22
1.1.3 ESPECÍFICOS	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 GRÃO DE SOJA	24
2.1.1 Melaço de soja	24
2.2 ENZIMAS DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO CONFORME LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E INTERNACIONAL	26
2.2.1 Atuação da enzima β -glicosidase	29
2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS	30
2.3.1 Atuação das isoflavonas no organismo	32
2.3.2 Estudos clínicos dirigidos ao uso de isoflavonas na alimentação humana	33
2.3.3 Atuação das isoflavonas como antioxidante.....	33
2.3.4 Variações dos teores de isoflavonas	34
2.4 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS	34
2.5 CONSIDERAÇÕES	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 MELAÇO DE SOJA E FARELO DE TRIGO	39
3.1.1 Micro-organismos	39
3.1.2 Descrição dos reagentes utilizados	39
3.1.3 Identificação de fungo filamentoso	41
3.2 OBTENÇÃO DAS ENZIMAS β -Gli E α -Gal POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA.....	41
3.2.1 Manutenção do micro-organismo	41
3.2.2 Extração enzimática	42
3.2.3 Determinação da atividade enzimática da enzima β -Gli.....	43
3.2.4 Determinação da atividade enzimática da enzima α -Gal	43
3.2.5 Determinação do teor de proteínas totais.....	44
3.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO ENZIMÁTICO DA β -Gli	44
3.3.1 Efeito da temperatura	44

3.3.2 Efeito do pH.....	45
3.3.3 Efeito da temperatura na estabilidade enzimática.....	45
3.3.4 Efeito do pH na estabilidade enzimática.....	45
3.3.5 Identificação das enzimas provindas do extrato enzimático pelo sistema Api-Zym [®]	46
3.3.6 Determinação do potencial antimicrobiano em relação aos solventes de isoflavonas obtidas por solventes	47
3.4. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E MINERAL DO MELAÇO DE SOJA.....	47
3.4.1 Determinação do teor de umidade	48
3.4.2 Determinação do teor de proteínas	48
3.4.3 Determinação do teor lipídico.....	48
3.4.4 Determinação do conteúdo de cinzas	48
3.4.5 Determinação do teor de carboidratos totais.....	48
3.4.6 Determinação do teor de fibras	48
3.4.7 Determinação do teor de minerais	49
3.5. PROCESSO DE RETIRADA DE SUJIDADES DO MELAÇO DE SOJA	49
3.5.1 Processo de separação por membranas aplicada na recuperação dos carboidratos totais e isoflavonas.....	51
3.5.2 Fluxo do permeado (J)	52
3.5.3 Percentual de entupimento nas membranas	53
3.5.4 Procedimento operacional.....	53
3.5.5 Procedimento de limpeza das membranas	54
3.6 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DAS ISOFLAVONAS.....	55
3.6.1 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática do extrato	57
3.6.2 Determinação do processo de bioconversão	58
3.6.3 Resina de troca iônica Dowex.....	58
3.7 ANÁLISES DOS TEORES DE CARBOIDRATOS TOTAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	60
3.7.1 Análise cromatográfica dos teores de isoflavonas	61
3.8 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	62
3.8.1 Método de quantificação dos compostos fenólicos	63
3.9 RESINAS DE TROCA IÔNICA.....	63

3.10 Validação do método de quantificação dos padrões de isoflavonas	64
3.10.1 Preparo das curvas de calibração dos compostos de isoflavonas	65
3.10.2 Intervalo.....	66
3.10.3 Linearidade.....	66
3.10.4 Limite de detecção (LD)	67
3.10.5 Limite de quantificação (LQ).....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 Identificação do gênero e espécie.....	69
4.2 VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO.....	70
4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO ENZIMÁTICO.....	70
4.3.1 Determinação da temperatura ótima	71
4.3.2 Determinação do pH ótimo.....	71
4.3.3 Estabilidade térmica	72
4.3.4 Estabilidade em pH	73
4.3.5 Identificação de enzimas pelo sistema Api-Zym®	74
4.3.6 Atividade antimicrobiana dos extratos de isoflavonas	77
4.4 VALORES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO MELAÇO DE SOJA	78
4.4.1 Quantificação dos teores de carboidratos sem passagem por ultrafiltração	79
4.4.2 Passagem da fração de 5 kDa por resinas de troca iônica	80
4.4.3 Teores de isoflavonas obtidos por separação por membranas.....	81
4.4.4 Teores de carboidratos totais presentes nas frações obtidas por PSM	84
4.5 DETERMINAÇÃO DA FAIXA ÓTIMA DO pH E TEMPERATURA NO EXTRATO ENZIMÁTICO.....	85
4.6 BIOCONVERSÃO DOS RO A PARTIR DA FRAÇÃO DE 5 kDa.....	88
4.7 BIOCONVERSÃO DOS COMPOSTOS DE ISOFLAVONAS	94
4.7.1 Bioconversão dos extratos obtidos com o uso do solvente metanol 80%	94
4.7.2 Bioconversão dos extratos obtidos com o uso do solvente etanol 90%	100
4.7.3 Bioconversão dos extratos obtidos com o uso do solvente água	106
4.8 VALIDAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS PADRÕES DE ISOFLAVONAS	112
4.8.1 Linearidade versus curva de calibração	112
4.8.2 Limite de detecção e quantificação	115
4.9 TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ISOFLAVONAS BIOCONVERTIDAS	116
4.10 CONSIDERAÇÕES GERAIS	117

5. CONCLUSÃO	120
5.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	121
REFERÊNCIAS.....	122
ANEXOS	135
APÊNDICES	136

1 INTRODUÇÃO

A soja *Glicine Max* (L.) Merrill é uma planta de grande diversidade genética e morfológica e apresenta-se na natureza com tamanhos de grão, cores e composição química variada, dependendo do cultivar plantado e fatores climáticos (HOECK et al., 2000). A área cultivada com soja é de 27,6 milhões de hectares, a maior entre todas as grandes culturas produzidas no Brasil, com uma produção estimada de aproximadamente 82 milhões de toneladas para a safra 2012/2103 (CONAB, 2013). Grande parte desta produção é destinada à fabricação do farelo de soja para incorporação como ingrediente majoritário na alimentação animal, gerando 29 milhões de toneladas deste produto entre 2011/2012, bem como o desenvolvimento de derivados especiais com altas concentrações proteicas (MAPA, 2012).

A receita gerada com os derivados da soja faz com que as indústrias invistam em pesquisas e desenvolvimento de novos produtos, transformando o farelo de soja, que possui 48% de proteína, em concentrado proteico de soja (CPS) elevando os teores de proteínas para 60 a 70% (IMCOPA, 2013). O subproduto melaço de soja é resultante da produção do farelo de soja, que resulta na obtenção de 750 kg de CPS e 250 kg do melaço de soja. Siqueira et al. (2007) estimaram uma produção nacional de aproximadamente 100.000 toneladas de melaço de soja no ano de 2007.

O melaço de soja é considerado um subproduto com grande potencial de mercado, visado para obtenção de alimentos funcionais, especialmente pela presença dos compostos bioativos. Dentre estes destacam-se as isoflavonas e seus efeitos fisiológicos benéficos para saúde humana, como atividade estrogênica, antiestrogênica, capacidade antioxidante e antimicrobiana (NIELSEN e WILLIAMSON, 2007; OMONI e ALUKO, 2005). No entanto, um fator negativo do melaço de soja é a presença dos compostos antinutricionais, como os RO, os quais se consumidos provocam sintomas como náuseas, gases, diarreias, alergias entre outros distúrbios à saúde humana (NIELSEN, 1996).

O estudo da composição química do melaço de soja, descrita por Barnes et al. (1994), apresentou valores de 34,6% de carboidratos, 3,2% de proteínas, 3,1% de gordura, 4,2% de minerais e aproximadamente 2 g/L de isoflavonas. Neste contexto, um fator importante com relação às isoflavonas é sua biodisponibilidade.

Izumi et al. (2000) destacaram que as isoflavonas glicosídicas não são absorvidas diretamente pelo organismo humano por apresentarem em sua composição a estrutura da glicose em ligação beta. Assim, as isoflavonas encontradas no melão de soja, sem qualquer processo de biotransformação, são compostas pelas formas glicosídicas (daidzina, genistina e glicetina), não assimiláveis pelo organismo, bem como pela presença dos RO em sua composição. O processo de biotransformação utilizando a hidrólise enzimática com a enzima β -Gli está relacionada com as transformações bioquímicas benéficas a partir dos compostos glicosídicos (daidzina, genistina e glicetina) transformados em compostos agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), facilmente absorvidos pelo organismo humano sem a formação de compostos indesejáveis (PARK et al., 2001). Há uma grande diversidade de processos fermentativos voltados à obtenção de compostos agliconas, provindos de derivados da soja como *tempeh*, extrato de soja, *miso* e *natto* (CHUN et al., 2008; YAMABE et al., 2007).

A biotransformação sobre os RO presentes no melão de soja ocorre com o uso da enzima α -Gal transformando em compostos digeríveis como sacarose, frutose e glicose, processo enzimático necessário para que os compostos obtidos sejam consumidos sem qualquer problema de desconforto intestinal (LUMEN, 1992; VIANA et al., 2007).

Enzimas como as β -Gli e α -Gal podem ser obtidas a partir dos micro-organismos filamentosos como o *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, destaques no aproveitamento de subprodutos agroindustriais utilizados como substratos na fermentação, especialmente na fermentação em estado sólido (FES) e fermentação semissólida (FSS) (COUTO e SANROMÁN, 2005).

Diante deste cenário, processos que envolvam a hidrólise enzimática juntamente com aplicações voltadas à recuperação de substâncias com o uso do processo de separação por membranas (PSM) têm despertado o interesse científico e industrial, pela não degradação das substâncias ativas e simplicidade operacional.

O interesse pelo melão de soja é voltado ao reaproveitamento industrial por conter valores médios de 23% de RO e teores de isoflavonas glicosídicas não absorvidas pelo organismo. No entanto, a bioconversão enzimática utilizando as enzimas α -Gal e β -Gli tornam atrativa para aproveitamento do subproduto citado devido ao baixo custo operacional e estrutural demandado.

1.1. OBJETIVOS

1.1.2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetivou realizar a bioconversão dos RO com o uso da enzima α -galactosidase para converter em compostos monossacarídeos e dissacarídeos, uso da enzima β -glicosidase na bioconversão de compostos glicosídicos para converter em compostos agliconas.

1.1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o perfil físico-químico do melão de soja, composição centesimal e mineral;
- Quantificar isoflavonas e carboidratos totais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), presentes no melão de soja integral;
- Obter diferentes extratos de isoflavonas com o uso de solventes metanol 80%, etanol 90% e água, todos em meio aquoso e quantificar os compostos fenólicos totais presentes nos diferentes extratos de isoflavonas;
- Obter frações concentradas de carboidratos, utilizando o processo de separação por membranas, aplicando a ultrafiltração (unidade piloto da MILLIPORE *Labscale* TFF);
- Obter enzimas β -Gli e α -Gal por fermentação em estado semissólida (FSS) na forma de extrato enzimático e realizar a quantificação enzimática;
- Caracterizar bioquimicamente os extratos da enzima β -Gli em relação à temperatura, pH, estabilidade térmica e estabilidade em função do pH;

- Estudar a bioconversão enzimática sobre os compostos de isoflavonas glicosídicas em compostos agliconas, para os diferentes processos de extrações com o uso das variáveis (agitação, razão do extrato enzimático e tempo) e aplicação do planejamento de experimentos;
- Identificar enzimas contidas no extrato enzimático utilizando o sistema Api-zym[®].

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GRÃO DE SOJA

O grão de soja é um alimento nutricional, contendo em sua composição cerca de 20% de óleo, 40% de carboidratos, 35% de proteínas e presença de minerais como magnésio, fósforo, ferro, cobre entre outros. As principais vitaminas presentes no grão de soja são A, D, E, K e B₁₂ entre outros compostos vitamínicos (MONTEIRO et al., 2004). Os teores proteicos da soja são aplicados em sua grande maioria na nutrição animal, na forma de farelo de soja concentrado obtido pela extração do óleo. No entanto, o óleo é utilizado na alimentação humana, na animal e nas indústrias produtoras de margarina e de agentes emulsificantes, entre outras funcionalidades industriais (OETTERER, REGITANO-d'ARCE e SPOTO, 2006).

O destaque do grão de soja ocorre pela presença de estruturas químicas, tais como os flavonoides, que conferem efeitos benéficos para saúde humana, por atuarem no combate preventivo e terapêutico sobre os sintomas voltados a doenças cardiovasculares, controle de câncer, e sintomas voltados a perda natural de hormônios, especialmente para mulheres (GENOVESE et al., 2003; HASLER 1998; MORAES e COLLA 2006; SETCHELL, 1999).

2.1.1 Melaço de soja

O melaço de soja foi apresentado como um resíduo agroindustrial obtido do processamento do grão de soja na produção de (farináceos protéicos) alimentos utilizados especialmente para a alimentação humana (SIQUEIRA et al., 2007). O processo consiste no uso da extração hidroalcoólica (60 a 70% de etanol) dos carboidratos a partir do farelo de soja desengordurado para a obtenção de um concentrado rico em carboidratos e com a presença de isoflavonas com valores médios de 60% e 2g/L do total de sólidos solúveis na forma de xarope marrom escuro (BARNES et al., 2004; JOHNSON et al., 1992). Apenas 34,8% dos

carboidratos presentes no melaço de soja são formas digeríveis pelo organismo dos monogástricos (humano, frango, suíno) por conterem em sua composição sacarose, glicose, frutose e galactose. No entanto, 25,2% são formas não digeríveis utilizadas na alimentação de ruminantes (bovino, caprinos entre outros), representadas pelas formas RO (QUERSHI et al., 2001).

Das formas RO quando utilizadas na alimentação dos monogástricos, não apresentam degradação de seus compostos, e são conduzidas até o intestino grosso entrando em contato com bactérias anaeróbicas que possuem sistemas necessários para fermentação desses carboidratos, resultando na liberação de grandes quantidades de gases como CO₂, H₂ e CH₄, fenômeno conhecido como flatulência intestinal associada a cólicas e diarreias entre outros sintomas (SUAREZ et al., 1999).

O descarte de parte dos resíduos (melaço de soja) ricos em carboidratos e compostos de celulose pode gerar problemas ambientais, especialmente em rios e lagoas (YANG et al., 2009). Além da necessidade ambiental verifica-se atualmente uma oportunidade de negócios na utilização de resíduos agroindustriais, tais como alimentos para animais e ainda na transformação aos compostos bioativos e carboidratos totais do melaço de soja com tecnologias simples e eficientes (VENDRUSCOLO et al., 2008; SAID e PIETRO, 2004).

O uso da enzima α -Gal na indústria alimentícia é de fundamental importância, uma vez que atuam em diferentes processos de hidrólises sobre os carboidratos por conter resíduos de galactose. A α -Gal é utilizada especialmente no processo de hidrólise em produtos derivados da soja, beterraba e mel de abelhas na quebra dos carboidratos RO, em carboidratos digeríveis (frutose, glicose entre outros) e inibição completa dos compostos RO causadores de flatulência (KOBAYASHI e SUZUKI, 1972; PORTER et al., 1991). No entanto, o uso da enzima β -Gli sobre os resíduos agroindustriais, em especial o melaço de soja, proporciona a retirada da molécula de glicose presentes nos compostos de isoflavonas formas daidzina, genistina e glicitina biotransformadas em isoflavonas nas formas daidzeína, gliciteína, genisteína, as quais são formas facilmente absorvidas pelo organismo (SETCHELL et al., 2002; XU et al., 1995).

2.2 ENZIMAS DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO CONFORME LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E INTERNACIONAL

A adição de enzimas para uso em alimentos destinados ao consumo humano, aqui no Brasil é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) seguindo as determinações descritas na Resolução RDC nº 205/2006 (BRASIL, 2006). E internacionalmente os micro-organismos utilizados para tais procedimentos devem atender os requisitos exigidos pela Generally Recognized As Safe (GRAS) que regulamenta como alimentos seguros. Neste sentido, a resolução define o limite de adição como a quantidade suficiente para obtenção do efeito desejado sobre o alimento, organizada por três diferentes grupos enzimáticos (animal, vegetal, e microbiana). As enzimas β -Gli e α -Gal pertencem ao grupo microbiano e podem ser aplicadas em diferentes formas sobre os alimentos, desde que sejam produzidas pelos seguintes micro-organismos *Aspergillus niger*, *Mortierella vinacea* e *Trichoderma longibrachiatum*.

A biodiversidade na produção de enzimas é inestimada, porém existem enzimas específicas para atuação na clivagem de terminais de uma série de substratos. As enzimas α -galactosidases pertencem a classe das hidrolases (α -D-galactosídeo galactohidrolase E.C. 3.2.1.22) são um exemplo de distribuição na natureza, encontradas em plantas e micro-organismos (MANZANARES et al., 1998).

A enzima α -Gal é facilmente obtida por meios fermentativos FES e FSS, com vantagem de ser obtido com grande rendimento. Os principais micro-organismos utilizados para essas aplicações biotecnológicas são os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Streptomyces* (MANZANARES et al., 1998). O setor biotecnológico tem realizado pesquisas contínuas voltadas ao uso de enzimas estáveis em determinados substratos, e principalmente pela diminuição de custos no isolamento e purificação bem como, enzimas com maior potencial de estabilidade em pH e temperatura, buscando maiores rendimentos na bioconversão quando equiparado ao uso de enzimas purificadas.

A α -Gal atua especificamente nos terminais α -1,6 galactosil unidos por resíduos de galactose, sacarose, rafinose e estaquiose e ligações β -1,2 responsáveis pela união da frutose à glicose, encontrados em uma série de substratos especialmente nas formas RO lineares e ramificados, polissacarídeos e

substratos sintéticos como o para-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (para-NP α Gal) (ADERMAK et al., 2001). A hidrólise realizada pela enzima α -Gal e presença de invertase (β -D-fructofuranosídeo fructohidrolase, E.C. 3.2.126) atuam diretamente sobre os compostos oligossacarídeos do melão de soja, formando compostos de interesse industrial como a galactose e sacarose obtidos pela clivagem realizada pela ligação α -1,6 e formação dos compostos melibiose e frutose ou glicose e frutose obtidas pela clivagem realizada nas ligações β -1,2 sobre os compostos RO causadores de flatulência (GUIMARÃES et al., 2001; FALKOSKI et al. 2006).

A estrutura dos compostos causadores de flatulência, rafinose e estaquiose é formada por um trissacarídeo composto por três moléculas de hexoses (α -galactose + α -glicose + β -frutose). Entretanto, a estaquiose é um tetrassacarídeo composto por quatro moléculas de hexoses (α -galactose + α -galactose + α -glicose + β -frutose), (LEHNINGER, 2007). A degradação dos compostos oligossacarídeos é representada pela ação da enzima α -Gal e podendo ser complementada pela ação da invertase, conforme Figura 1.

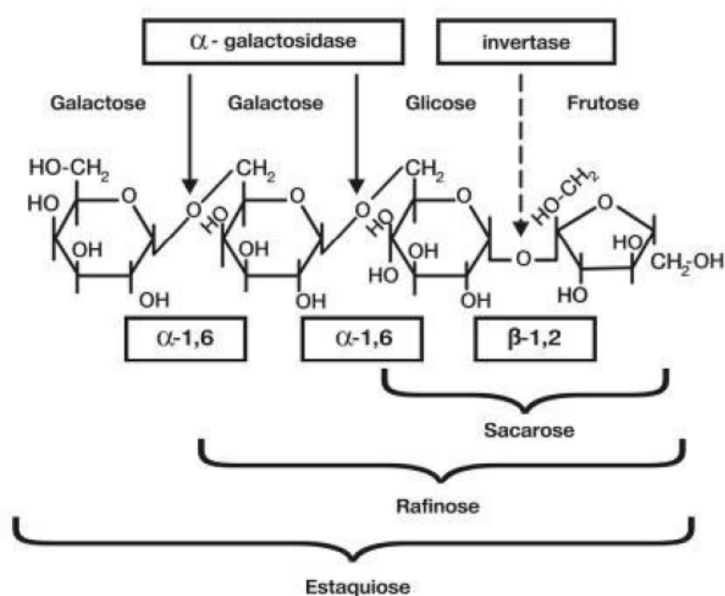


Figura 1 – Sítios de clivagem formados pela atuação das enzimas α -Gal e invertase sobre os compostos de rafinose e estaquiose (LEBLANC et al. 2004).

2.2.1 O *Aspergillus niger*

O uso de fungos filamentosos especialmente do gênero *Aspergillus* é de grande importância para indústria de alimentos e bebidas incluindo os fármacos nas últimas décadas. Para Bon et al. (2008) a vasta gama de enzimas extracelulares aplicadas industrialmente, entre elas (catalases, amilases, celulasas, xilases, peroxidases, invertases entre outras) tornou-se realidade com o avanço da bioquímica genética. A Figura 2 representa a morfologia do micro-organismo *Aspergillus niger*.



Figura 2 – *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* é caracterizado por possuir conídios geralmente negros, estão presentes no mundo todo graças a sua fácil adaptabilidade. São saprófitos e degradam moléculas complexas especialmente derivados celulósicos vegetais, hospedeiros de uma grande variedade de espécies vegetais, incluindo as espécies utilizadas no consumo humano como trigo, milho, soja, café entre outros (DE VRIES; VISSER, 2001).

Seguindo a decisão aplicada pela Environmental Protection Agency (EPA) no dia 1 de setembro de 1994, sob a concessão do registro federal (59FR 45526) os relatos de pauta afirmaram que o risco de doenças causada pelo *Aspergillus niger* é baixo (EPA 2007). No entanto, humanos estão continuamente expostos aos esporos e a forma vegetativa do *Aspergillus niger* presentes nos alimentos e no ar (BON et al. (2008).

A produção de micotoxinas produzidas por *Aspergillus niger* vem sendo comentada mesmo sem relatar efeitos tóxicos durante o processo fermentativo para

obtenção de enzimas e produtos alimentícios. Neste sentido, o uso da espécie *Aspergillus niger* na fermentação comercial não apresenta nenhum risco adicional para a saúde humana ou para o meio ambiente.

A produção enzimática ocorre com a inoculação de fungos filamentosos na maioria das vezes utilizando as técnicas FES e FSS com obtenção de enzimas extracelulares, diferenciadas especialmente pela quantidade de água livre disposta ao meio. Neste sentido, a produção de enzimas microbianas β -Gli e α -Gal utilizando os processos fermentativos, além de contribuir na produção de enzimas de baixo custo podem ser estendidas para uma produção em grande escala (LIN et al. 2006).

2.2.1 Atuação da enzima β -glicosidase

Uma das principais enzimas empregadas nos processos industriais voltados à área alimentícia, farmacêutica e bebidas em geral é a enzima (β -D-glicosídeo-glicosil-hidrolase EC 3.2.1.21). Dentre as principais aplicações destacam-se a hidrólise enzimática sobre os compostos glicosídicos (WALLECHA e MISHRA, 2003), a produção de biocombustível a partir de resíduos agrícolas, a produção de compostos aromáticos conhecidos como terpenos e o melhoramento do aroma em sucos de frutas e agentes livres de contaminantes (HESSLER et al., 1997).

As β -Gli são formadas por um grupo bem diversificado de enzimas que compreendem partes das famílias 1 e 3 das glicosil-hidrolases (FENNEMA et al., 2010). Tal diversidade das β -Gli deve-se ao fato de que esse grupo provém de diversas fontes presentes na natureza, totalizando mais de 57 famílias em todos os reinos que representam a vida (HENRISSAT e BAIROCH, 1996).

Entre os principais fungos filamentosos produtores de metabólitos, os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são conhecidos como eficientes produtores de enzimas que compreendem as formas endo-1,4- β -glucanases, celobiohidrolases, exo-1,4- β -Gli e β -Gli (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004). Enzimas produzidas por estes e outros micro-organismos termofílicos apresentam atividade ótima entre 60 e 80 °C, com características muito bem aceitas em termos de estabilidade térmica na faixa de pHs, levando ao aumento dos estudos voltados à produção de enzimas (VIEILLE e ZEIKUS, 2001).

As principais transformações biotecnológicas ocorrem sobre os compostos de isoflavonas nas formas glicosídicas presentes no grão de soja, a partir do rompimento da ligação glicosídica β -1,4 resultando na liberação da glicose e formação dos compostos agliconas (GENOVESE e LAJOLO, 2001; HARBORNE, 1993). O mecanismo de bioconversão enzimática sobre os compostos de isoflavonas formas glicosídicas em isoflavonas agliconas é apresentado na Figura 2.

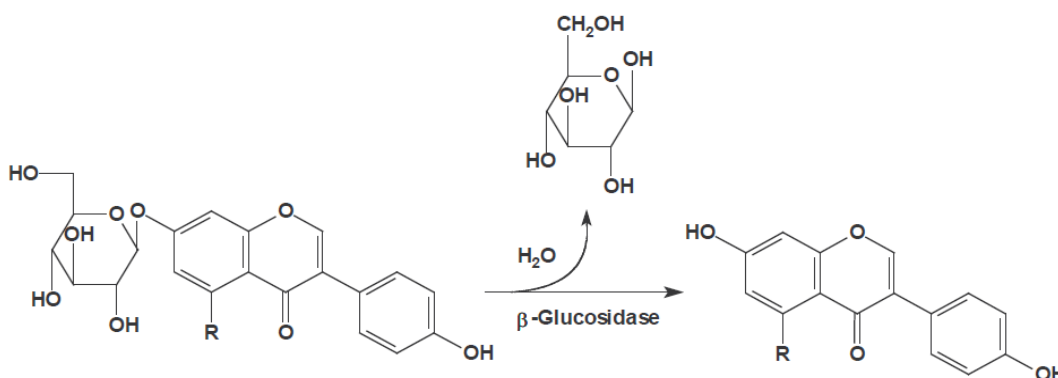


Figura 3 - Mecanismo de bioconversão enzimática, realizado pela enzima β -Gli sobre os compostos glicosídicos (PARK et al., 2001).

No entanto, compostos de isoflavonas contidos no resíduo agroindustrial (melaço de soja) são utilizados no processo de bioconversão enzimática com presença da enzima β -Gli no extrato enzimático, com obtenção de bioconversão próxima de 100% sobre os compostos de isoflavonas glicosídicos (MANTOVANI et al., 2011). Na Tabela 1 são apresentadas as principais conversões ocorridas sobre os compostos fenólicos com o uso de alguns micro-organismos produtores da enzima β -Gli.

Tabela 1 - Transformações ocorridas pela adição da enzima β -Gli microbiana aos compostos de flavonóides.

Substrato	Micro-organismos	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).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são divididos em dois grandes grupos: flavonóides e não flavonóides, gerados a partir do metabolismo secundário das plantas e distribuídos amplamente no reino vegetal em mais de 2.000 espécies nas mais diversas famílias, atuando de forma benéfica com funções fisiológicas e morfológicas (HARBORNE, 1993).

Os flavonóides apresentam estrutura química constituída na forma de (C6-C3-C6) com 15 átomos de carbonos com anéis benzênicos apresentados na forma (A e B), conforme apresentado na Figura 4.



Figura 4 – Estrutura de flavonóides (ARAÚJO, 2008).

O anel benzênico representado com a letra B, na Figura 4 é a posição que irá distinguir a classe dos flavonóides. No entanto, as posições 2 e 3 presentes na estrutura do anel heterocíclico são responsáveis pela formação das subclasses dos isoflavonóides.

Os flavonóides conhecidos como compostos glicosídicos, contém na sua composição a presença de carboidratos e nos compostos agliconas são encontradas as hidroxilas, ambas nos carbonos numerados 4, 5 e 7 (ARAÚJO, 2008).

Os compostos glicosídicos (daidzina, genistina e glicitina) estão presentes em grande quantidade no grão de soja, e quando comparados às formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) são encontrados em menor quantidade, porém apresentam uma alta taxa de atividade biológica (PARK et al., 2001; SONG et al., 1998). No entanto, a estrutura do flavonóide é responsável pela combinação na formação de flavonóides classificados como: flavona, flavonol, diidroflavonol, flavanona e isoflavonóides (ROOS e KASUME, 2002). A solubilidade dos compostos fenólicos é bastante variada em relação aos compostos glicosídicos e agliconas

pertencentes ao grupo dos isoflavonóis, ambas as estruturas são solúveis em solventes orgânicos apolares (ANTOLOVICH et al., 2002; ROBARDS et al., 1999).

2.3.1 Atuação das isoflavonas no organismo

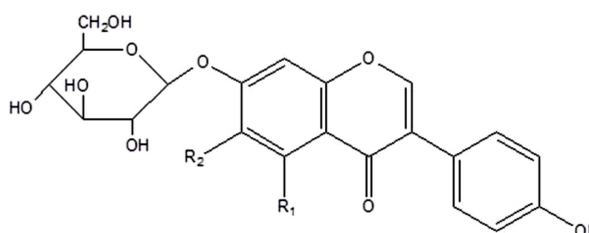
A ingestão diária de isoflavonas nas formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) de compostos fenólicos, tais como os isoflavonóides garante efeitos benéficos atribuídos aos seguintes fatores: atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (BEER et al., 2005; DELMAS, JANNIN e LATRUFFE, 2005). O órgão fiscalizador *Food and Drug Administration* (FDA, 1999) concedeu o certificado *Generally Recognized as Safe* (GRAS) às isoflavonas obtidas de fontes naturais.

As isoflavonas fazem parte de uma ampla variedade de compostos fenólicos pertencente ao grupo dos flavonóides de baixa massa molar, denominados metabólitos secundários, as quais são produzidas pelas leguminosas em teores que variam de 0,1 a 0,5 mg/g (COWARD et al., 1993; GENOVESE e LAJOLO, 2001). A Figura 5 apresenta as estruturas das isoflavonas da soja nas formas glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina) e agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), sendo que as primeiras estão presentes em maiores concentrações no grão de soja, porém apresentam menor atividade biológica em relação às formas não glicosídicas (PARK et al., 2001; SONG et al., 1998).

Isoflavonas glicosiladas

(I)

R1	R2	Composto
H	H	Daidzina
OH	H	Genistina
H	OCH ₃	Glicitina



Isoflavonas agliconas

(II)

R1	R2	Composto
H	H	Daidzeína
OH	H	Genisteína
H	OCH ₃	Gliciteína

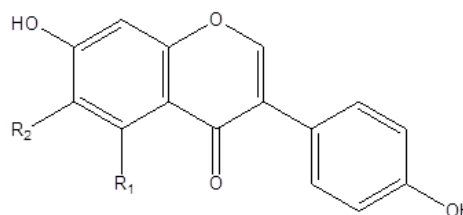


Figura 5 – Estrutura das isoflavonas glicosiladas (I) e não glicosiladas (II) presentes no melão de soja (SONG et al., 1998).

2.3.2 Estudos clínicos dirigidos ao uso de isoflavonas na alimentação humana

Estudos clínicos conduzidos por Bakhit et al. (1994) e Cassidy et al. (1994) no sentido de verificar o efeito das isoflavonas na redução do colesterol formado pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL), foi conduzido para uma população masculina, com dose diária de 45 mg de isoflavonas equivalente a 25 g de proteína de soja, obtendo-se como resultado final a redução do nível de HDL em 6%. Segundo O'Keefe et al. (1996), o efeito hipocolesterolemizante das isoflavonas tem como causa sua capacidade de se ligarem aos receptores de estrogênio (ER) de modo semelhante ao estradiol, influenciando o metabolismo do colesterol e das lipoproteínas.

2.3.3 Atuação das isoflavonas como antioxidante

Produtos fermentados de soja apresentam valores expressivos de atividade antioxidante (REN et al., 2006), embora menores do que os valores observados pelos produtos não fermentados, como é o caso do melão de soja. A atividade antioxidante da soja é conferido principalmente pelos compostos de baixa massa molar, dentre as quais se destacam flavonóides (isoflavonas), saponinas e tocoferóis. O melão de soja é um material com grande potencial de aproveitamento

biotecnológico, uma vez que é uma fração concentrada de compostos de baixa massa molar presentes na soja. A fração de baixa massa molar (isoflavonas, RO, entre outros) pode ser recuperada com sucesso a partir de processos de separação por membranas. O melaço de soja, além de ser uma fonte importante de compostos com atividade estrogênica, também apresenta compostos com pronunciado efeito antioxidante e ainda compostos que podem ser utilizados como edulcorantes, como é o caso dos RO.

2.3.4 Variações dos teores de isoflavonas

As isoflavonas estão presentes especialmente nos vegetais representadas pela leguminosa (soja) com mais de 98% de sua composição na forma de compostos glicosídicos (LIGGINS et al., 2000). A soja representa uma das principais cadeias produtivas do Brasil, e seus derivados são fontes dos mais diversos mercados, em especial pela presença de isoflavonas. Hoeck et al. (2000) relataram sobre as variações dos teores de isoflavonas relacionados aos fatores: cultivar utilizado, local de plantio, clima e tipo de solo, concluindo que os teores de isoflavonas presentes no grão de soja sofrem influência direta destes fatores.

Li-jun et al. (2004) e Wang e Murphy (1994) estudaram os processos que levam às perdas dos teores de isoflavonas nos derivados de soja, destacando: tempo de processo na obtenção dos derivados, processo de extração de proteínas, formulação, preparo de produtos, hidrólise enzimática e fermentativa, com observação de diferenças consideráveis nos teores e distribuição de isoflavonas em ambos os processos.

2.4 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM)

Os principais processos que envolvem a PSM, enquadram-se a ultrafiltração, a nanofiltração, entre outros processos responsáveis pela separação de carboidratos de diferentes fontes provindas de plantas, sementes, frutos, xaropes e outros

compostos (MATSUBARA et al., 1996). No entanto, para alimentos à base de soja são encontrados compostos majoritários e bioativos como os carboidratos, proteínas e isoflavonas, compostos de interesse alimentar que visam à concentração e/ou fracionamento para obter maior rendimento e qualidade nutricional do produto final (ALIBHAI et al., 2006).

A formação de barreiras seletivas nos processos de separação por membranas (PSM) ocorre exclusivamente pela presença das membranas utilizadas. A separação ocorre pelo tamanho da partícula: se o tamanho do poro da membrana for pequeno, ela será retida, se for grande, ela será filtrada, processo denominado de retido (concentrado) e permeado (filtrado). As membranas atuam de forma física, química e estruturais controlando o transporte e a passagem dos compostos entre as duas fases, fazendo com que ocorra a seletividade e passagem dos compostos de interesse (HABERT, BORGES e NÓBREGA et al., 2006). Desta forma, a principal função da PSM é realizar o fracionamento dos solutos dissolvidos em correntes líquidas. Segundo Baker (2004), a maioria dos PSM usa o escoamento tangencial *cross flow*, uma particularidade que as distingue da filtração convencional, na qual promove a separação de partículas sólidas em suspensão de correntes líquidas em escoamento frontal.

As principais características das membranas são suas resistências químicas e mecânicas, que dependem dos materiais envolvidos durante sua fabricação. Os principais componentes utilizados para a produção das membranas são: polisulfona, polietersulfona, acetato de celulose, celulose regenerada, poliamidas, polifluoreto de vinilideno e poliacrilonitrila (CHERYAN, 1986). A Figura 6 apresenta o funcionamento do sistema de PSM tangencial.

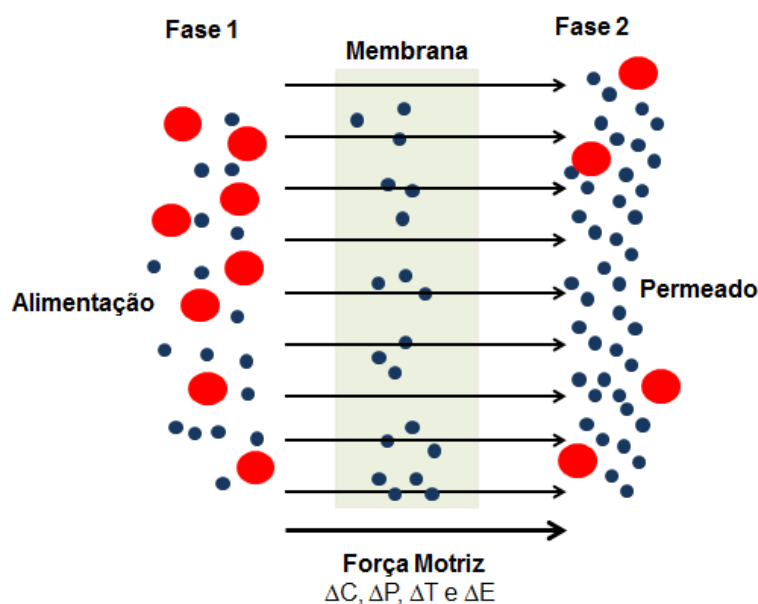


Figura 6 - Representação esquemática de uma membrana com escoamento tangencial.

Habert, Borges e Nóbrega (2006) relacionaram os fatores envolvidos para o transporte das moléculas por membranas, entre eles: a sorção das moléculas na superfície da membrana, a difusão a partir do material que constitui a membrana e, por último, a dessorção das moléculas no lado do permeado.

Entretanto, o uso das membranas sob os mais variados compostos faz com que ocorra uma diminuição do tempo de vida da membrana, baixa seletividade ou baixo fluxo do permeado por formar colmatagem (entupimento) gerando perdas de rendimento e paradas para limpeza. Paralelamente ao uso das PSM são realizados estudos para melhoramento do processo e viabilidade econômica para aplicação desta tecnologia em escalas industriais (MARCOS et al., 2009).

2.5 CONSIDERAÇÕES

A revisão da literatura destacou o melaço de soja como um subproduto agrícola com uma composição química rica em carboidratos divididos basicamente em três grandes grupos RO, dissacarídeos e monossacarídeos com porcentagens variadas, bem como, presença de compostos de isoflavonas nas formas glicosídicas e agliconas. No entanto, os compostos presentes no melaço de soja podem tornar-

se biodisponíveis após o processo de bioconversão enzimática, elevando a valorização comercial. O processo de bioconversão envolve o uso de reações enzimáticas com pouca exigência de temperatura, pH, substrato e processos de purificação que são os principais fatores da inviabilidade comercial de alguns subprodutos submetidos aos processos de bioconversão enzimática.

Dentro deste conceito, este trabalho abordou o processo de bioconversão enzimática com o uso das variáveis agitação, razão extrato enzimático e tempo, utilizando as enzimas α -Gal e β -Gli produzidas a partir da FSS com inoculação do micro-organismo *Aspergillus niger* isolado do solo e caracterizado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A bioconversão realizada sobre o melão de soja apresenta como vantagens a obtenção de carboidratos formados por dissacarídeos, monossacarídeos e compostos de isoflavonas agliconas puros, sem a presença de traços do ácido desoxirribonucléico (DNA) microbiano. Todos os compostos obtidos pela bioconversão são formas assimiláveis pelo organismo humano e animal sem qualquer prejuízo a saúde. Neste sentido, para aumentar o rendimento de extração dos compostos presentes no melão de soja antes da bioconversão, optou-se pelo processo de recuperação dos RO, dissacarídeos e monossacarídeos, utilizando o sistema de PSM e extração dos compostos de isoflavonas com o uso de três diferentes solventes metanol 80%, etanol 90% e água todos em meio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as especificações dos materiais, com descrição dos procedimentos e metodologias utilizadas para obtenção dos dados experimentais como caracterização bioquímica da enzima β -Gli, crescimento microbiano utilizando os extratos obtidos após a bioconversão enzimática sobre os compostos de isoflavonas, análise de composição centesimal e conteúdo de carboidratos totais. Além dos procedimentos já citados foram realizadas caracterizações e quantificações dos teores de isoflavonas após a passagem por ultrafiltração sobre os extratos obtidos com metanol 80%, etanol 90% e água bem como, teores de carboidratos totais e isoflavonas após a passagem pela ultrafiltração. As bioconversões referentes aos compostos RO e isoflavonas glicosídicas foram realizadas com o uso de planejamentos experimentais para obtenção de compostos assimiláveis pelo organismo como carboidratos monossacarídeos e dissacarídeos e compostos de isoflavonas agliconas. A quantificação das isoflavonas totais presentes no melaço de soja e seus extratos obtidos foram realizados conforme metodologia de validação utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. A Figura 7 apresenta a estrutura do trabalho.

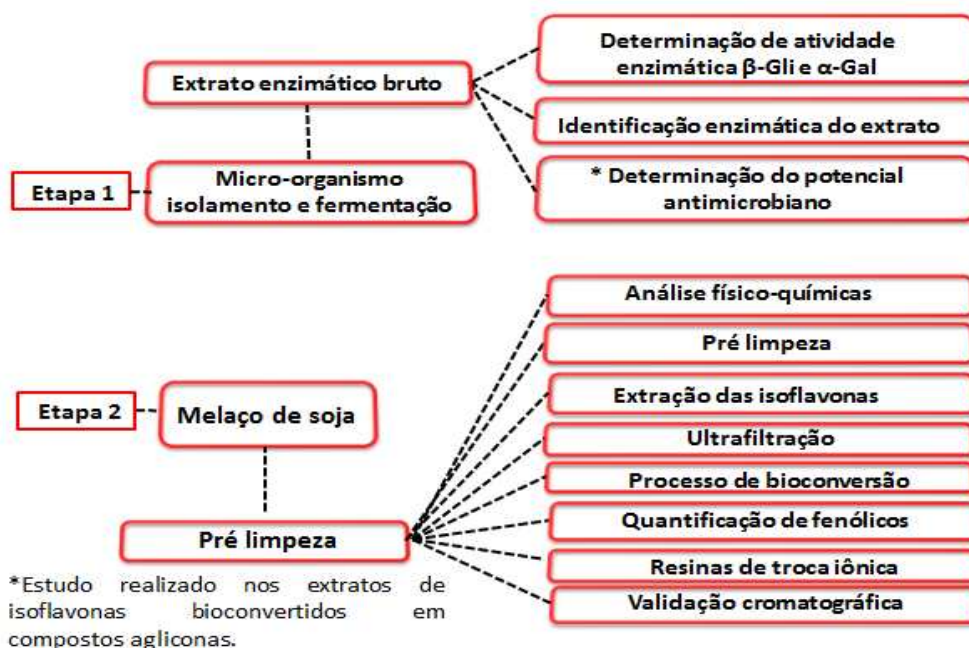


Figura 7 – Estrutura do trabalho por etapas.

3.1 MELAÇO DE SOJA E FARELO DE TRIGO

O melaço de soja foi doado pela empresa IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos Ltda, localizada na cidade de Araucária - Paraná. O farelo de trigo utilizado como substrato durante a FSS foi adquirido da empresa Nutribom Alimentos, localizada na cidade de Maringá - Paraná.

3.1.1 Micro-organismos

O fungo filamentosso *Aspergillus niger* foi coletado e isolado nas seguintes coordenadas (-25.42 e -54.58) no terreno pertencente à Usina Binacional de Itaipu, que contém um solo catalogado como latossolo, predominante da região de Foz do Iguaçu (PR), Brasil (MANTOVANI, 2010). O micro-organismo foi coletado, e posteriormente isolado após seu crescimento e plaqueado em meio aos nutrientes *Sabouraud* misturado com Ágar dextrose batata (BDA) e armazenado sob refrigeração à 7 °C, com repicagem a cada 45 dias para manter suas células ativas por um período indeterminado.

3.1.2 Descrição dos reagentes utilizados

- A água utilizada para o preparo das fases móveis foi purificada pelo sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA) e filtrada por membranas de 0,22 µm *nylon* (Alltech, Deerfield, IL);
- A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, com a adição do *Tween 80*[®] (Synth, Brasil);
- A mistura contendo sais utilizados para auxiliar no crescimento microbiano foi composta pelos reagentes sulfato de amônio, sulfato de magnésio heptahidratado e Nitrato de amônia (Synth, Brasil) ambos com pureza próximas a 98%;

- A atividade enzimática da β -Gli e α -Gal foi determinada com o uso de acetato de sódio (Synth, Brasil) 99,0% de pureza com pH tamponado. Os substratos utilizados foram: para-nitrofenol (para-NP), para-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (para-NP β Gli) e para-nitrofenil α -D-galactopiranosídeo (para-NP α Gal) adquiridos da Sigma Chemicals Co.[®] (St. Louis, EUA);
- A análise referente à proteína total foi realizada com o uso do reagente *coomassie brilliant blue* BG-250 e albumina bovina com pureza de 99,9% adquiridos da empresa Sigma Chemicals Co (St. Louis, EUA);
- Membranas filtrantes Pellicon XL dimensões: 0,22 μ m, 300 e 5 kDa adquiridas da MILLIPORE[®] Billerica (EUA);
- Hexano P.A (Vetec, Brasil) com pureza de 99,5% utilizado na extração dos lipídeos presentes no melão de soja;
- Etanol P.A (Vetec, Brasil) com pureza de 95% e ácido acético (Merck, Brasil) com alto padrão de pureza 99,0% utilizado na extração de isoflavonas totais presentes no melão de soja;
- Ácido clorídrico P.A (Synth, Brasil) com 37% de pureza utilizado para limpeza de resina catiônica;
- Hidróxido de sódio P.A (Synth, Brasil) com 98% de pureza utilizado para limpeza de resina aniônica e limpeza das membranas de ultrafiltração;
- Cloreto de sódio P.A (Synth, Brasil) com 99,9% de pureza utilizado para limpeza das resinas catiônica e aniônica;
- Carbonato de sódio P.A (Synth, Brasil) com 99,0% de pureza utilizado para paralisar a reação enzimática;
- Metanol e acetonitrila padrão HPLC (J.T.Backer[®]) como fase móvel para uso na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Os padrões com grau analítico cromatográfico daidzina, glicitina, genistina, dadzeína, gliciteína e genisteína foram adquiridos do Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar, Curitiba, Brasil);
- Os padrões com grau analítico cromatográfico frutose, glicose, sacarose, galactose, lactose, melibiose, rafinose e estaquiose foram adquiridos da Sigma Chemicals Co.[®] (St. Louis, EUA).

3.1.3 Identificação de fungo filamentoso

A identificação da espécie e gênero do micro-organismo foi realizado pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), localizado na Cidade de Paulínia/SP, sob o registro CPQBA 327/12 DRM.

A amostra foi enviada conforme *check in* solicitado pelo CPQBA para obter total integridade física do material identificado.

3.2 OBTENÇÃO DAS ENZIMAS β -GLI E α -GAL POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA

O farelo de trigo, substrato utilizado na obtenção enzimática, foi devidamente lavado com água destilada e seco em estufa a 55 °C por 36 h. Posteriormente, o material foi acondicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 g de substrato umedecido com 40 mL de solução nutriente. A composição da solução de nutrientes foi composta por sulfato de amônio 0,1% (m/v), sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,1% (m/v) e nitrato de amônia 0,1% (m/v), esterilizada a 121 °C por 15 minutos em autoclave vertical (Phoenix equipamentos científicos SP, modelo AV 30). Após atingir a temperatura ambiente, o material foi inoculado com o *Aspergillus niger* com aproximadamente 10^7 esporos/mL, contabilizado em câmara de Neubauer com transferência de 1 mL desta suspensão. No entanto, a fermentação do micro-organismo ocorreu em temperatura controlada de 28 °C por um período de 96 h de fermentação em incubadora (Fanen B.O.D, modelo 347F).

3.2.1 Manutenção do micro-organismo

Após a utilização do *Aspergillus niger* nos processos fermentativos foi realizado o acondicionamento de suas células em tubos de ensaio inclinados com

nutrientes *Sabouraud* misturado com BDA e armazenamento sob refrigeração a 7 °C. A repicagem foi realizada a cada 45 dias para evitar perdas celulares do micro-organismo.

3.2.2 Extração enzimática

O procedimento da extração enzimática seguiu a metodologia descrita por MATSUURA et al. 1995). Neste sentido, ao término do período de 96 h de fermentação por FSS, o material inoculado recebeu a adição de 100 mL de água formando um extrato aquoso denominado de extrato enzimático o qual foi mantido por 45 minutos em incubadora refrigerada (Tecnal, modelo TE 422) sob agitação de 80 rpm. Em seguida, o material passou por uma pré-filtração utilizando lã de vidro e posterior centrifugação a 7.000 x g por 20 minutos em centrífuga Jouan (modelo BR 4i) com temperatura de 4 °C. Análises de atividade enzimática foram realizadas no sobrenadante contendo (enzimas β -Gli e α -Gal) e proteína total. Ao final deste processo, o extrato enzimático foi armazenado em *freezer* sob temperatura de - 12 °C por 30 dias para evitar perdas de concentração da atividade enzimática. A Figura 8 apresenta o fluxograma de obtenção do extrato enzimático.

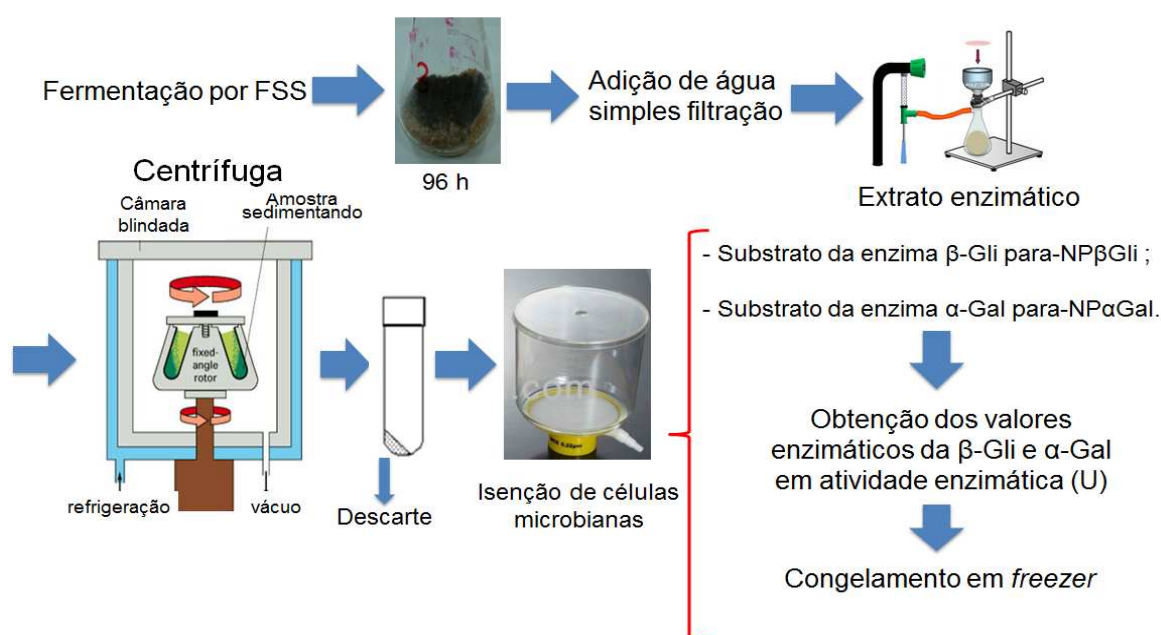


Figura 8 - Fluxograma descritivo referente a obtenção do extrato enzimático.

3.2.3 Determinação da atividade enzimática da enzima β -Gli

A atividade enzimática da enzima β -Gli presente no extrato foi determinada conforme método adaptado, descrito por Matsuura et al. (1995). O volume total da mistura foi de 2,55 mL, composta do tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 com adição de 250 μ L do tampão e substrato para-NP β Gli com concentração de 4 mM incubado a uma temperatura de 50 °C em banho ultratermostático (Quimis, modelo Q214S) por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 50 μ L do extrato enzimático e manteve-se a reação por 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 2 mL de carbonato de sódio 2 M e medição da absorbância a 420 nm em espectrofotômetro (Varian, modelo UV visible Cary 50 scan). A quantidade de para-NP liberada foi determinada utilizando a curva de calibração preparada na concentração de 0 a 350 (μ M de para-NP), obtendo-se uma equação linear expressa por $y = 0,049x$, e $R^2 = 0,9971$, para determinação das atividades da β -Gli e α -Gal conforme Apêndice A. Desta forma, 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 (temperatura, pH, concentração de substrato entre outros). Os resultados foram expressos como unidade (U) de atividade da β -Gli (μ M de para-NP min) liberada.

3.2.4 Determinação da atividade enzimática da enzima α -Gal

A atividade enzimática da enzima α -Gal presente no extrato foi determinada conforme método adaptado, descrito por Kuo et al. (1997). O volume total da mistura foi de 2,55 mL, composta do tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 com adição de 250 μ L do tampão acetato de sódio e substrato para-NP α Gal com concentração de 2 mM incubando a uma temperatura de 55 °C em em banho ultratermostático por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 50 μ L do extrato enzimático e manteve-se a reação por 10 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 2 mL de carbonato de sódio 0,5 M e medição da absorbância a 420 nm em

espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como unidade (U) de atividade da α -Gal (μ M de para-NP min) liberada seguindo o mesmo procedimento do Item 3.2.3.

3.2.5 Determinação do teor de proteínas totais

A determinação das proteínas totais que compõem as estruturas das enzimas utilizadas foi quantificada utilizando o método de Bradford (1976), em absorbância de 595 nm em espectrofotômetro. A curva de calibração foi preparada com albumina bovina na concentração de 5 a 200 mg/mL, obtendo-se uma equação linear expressa por $y = 0,0112x$, e $R^2 = 0,99042$. Os teores das amostras analisadas foram expressas em teores de proteína totais por (mg/mL) conforme Apêndice A.

3.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO ENZIMÁTICO DA β -Gli

As variáveis adotadas: temperatura, pH, estabilidade térmica e estabilidade em função do pH, foram utilizadas para obter as características bioquímicas referentes ao extrato enzimático com enzima β -Gli, produzidas com posteriores condições experimentais para realização dos testes de bioconversões.

3.3.1 Efeito da temperatura

A estabilidade térmica na atividade enzimática da β -Gli foi determinada com a incubação do extrato enzimático bruto, e inserção do substrato, para-NP β Gli com concentração de 4 mM em temperaturas variando de 40 a 90 °C de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.3.

3.3.2 Efeito do pH

O efeito do pH na atividade enzimática da β -Gli foi determinado com a incubação do extrato enzimático bruto, e inserção do substrato para-NP β Gli com concentração de 4 mM em solução tampão de acetato de sódio (pH 2,5 a 7,0) e solução tampão McIlvaine (pH 2,5 a 8,0). Após o período de incubação, a atividade foi determinada conforme metodologia descrita no item 3.2.3.

3.3.3 Efeito da temperatura na estabilidade enzimática

A termoestabilidade na atividade enzimática da β -Gli foi determinada incubando o extrato enzimático bruto, e inserção do substrato para-NP β Gli com concentração de 4 mM em diferentes temperaturas variando de (40, 50, 55, 60 e 65 °C) durante um intervalo de tempo (0 a 180 min). Após o período de incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos e análise de atividade determinada conforme metodologia descrita no item 3.2.3.

3.3.4 Efeito do pH na estabilidade enzimática

A estabilidade na atividade enzimática da β -Gli foi determinada incubando o extrato enzimático bruto, com a inserção do substrato para-NP β Gli, com concentração de 4 mM por um período de incubação de 24 h em temperatura controlada a 25 °C utilizando os tampões descritos no item 4.3.2 e metodologia de incubação sobre a atividade conforme descrição no item 3.2.3.

3.3.5 Identificação das enzimas providas do extrato enzimático bruto pelo sistema Api-Zym[®]

Após a obtenção do extrato enzimático bruto provindo da fermentação semissólida por um período de 96 h com inoculação do *Aspergillus niger* CPQBA 327/12 DRM, e quantificação das atividades enzimáticas β -Gli e α -Gal, foi realizado um procedimento para identificação do *poll* enzimático presente no extrato enzimático. Trata-se de uma metodologia com testes semi-qualitativos, conforme apresentado na Figura 9.



Figura 9 -. Sistema Api-Zym[®].

Desta forma, os orifícios do sistema Api-Zym[®] foram inoculados com a adição de 65 μ L da enzima e incubação por 4 h em temperatura de 37 °C em incubadora. Após esse período, foi adicionada uma gota do reagente Zym A (2,5 de Trysma base, 1,1 mL de ácido clorídrico 37%, 1,0 g de lauril sulfato de sódio e 10 mL de água destilada esterelizada), e Zym B (0,03 g de “Fast blue BB” e 10 mL de metoxietanol) a cada poço contendo substrato específico.

A partir da estabilização das colorações (tempo de 10 minutos) foi efetuada a leitura anotando-se os resultados, escala de 0 a 5 conforme a intensidade da cor de cada orifício.

3.3.6 Determinação do potencial antimicrobiano em relação aos extratos de isoflavonas obtidas por solventes

Utensílios como placas de Petri e discos de papel foram esterelizados a 121 °C por 15 minutos, em autoclave vertical. Após resfriadas, as placas foram

preenchidas com o nutriente BDA e distribuição da cultura *Myrothecium verrucaria* com aproximadamente 10^7 esporos/mL, contabilizado em câmara de Neubauer com transferência de 1 mL desta suspensão.

Os discos de papel esterelizados foram dispostos no centro de cada placa de Petri, com a adição de 100 µL dos compostos de isoflavonas bioconvertidas. A incubação do micro-organismo *Myrothecium verrucaria* incubado a 28 °C com acompanhamento inicial das primeiras 24 h de cultivo e final com 96 h.

3.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E MINERAL DO MELAÇO DE SOJA

A composição centesimal, referente ao melaço de soja foi analisada conforme metodologia oficial do IAL (2004). No entanto, as análises referentes aos teores de minerais presentes no melaço de soja: cálcio, cobre e chumbo foram determinados pela metodologia da AOAC (2005).

3.4.1 Determinação do teor de umidade

A determinação do conteúdo de umidade foi conduzida em triplicata, pelo método 12/IV do IAL (2004) utilizando estufa com circulação de ar forçado em temperatura de 105 °C.

3.4.2 Determinação do teor de proteínas

O teor de nitrogênio foi determinado, em triplicata pelo método 36/IV do IAL (2004) relacionado ao método de Kjeldahl clássico. Para o cálculo da conversão do nitrogênio em proteína foi utilizado o fator 6,25.

3.4.3 Determinação do teor lipídico

O teor de lipídeos foi determinado, em triplicata pelo método de 32/IV utilizando o aparelho extrator Soxhlet, com refluxo por 24 h.

3.4.4 Determinação do conteúdo de cinzas

A determinação do conteúdo de cinzas foi conduzida em triplicata pelo método 044/IV do IAL (2004) por calcinação da amostra a 550 °C em mufla.

3.4.5 Determinação do teor de carboidratos totais

O teor de carboidratos foi determinado por diferença percentual, considerando os teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas e fibras.

3.4.6 Determinação do teor de fibras

O teor de fibra bruta foi conduzido em triplicata e determinado pelo método 044/IV do IAL (2004) considerado específico para a determinação dos conteúdos referentes a celulose, lignina e pentosanas, estruturas responsáveis pela composição da fibra bruta.

3.4.7 Determinação do teor de minerais

Os teores de minerais cálcio, cobre e chumbo foram conduzidos em triplicata e determinados pelos seguintes métodos 984.27 e 985.35 conforme descrição da AOAC (2005).

3.5 PROCESSO DE RETIRADA DE SUJIDADES DO MELAÇO DE SOJA

Grandes quantidades de sujidades fazem parte do melaço de soja, entre elas cascas de soja, pedaços de grão de soja, caule entre outros resíduos retirados conforme apresentado na Figura 10 no formato de fluxograma.

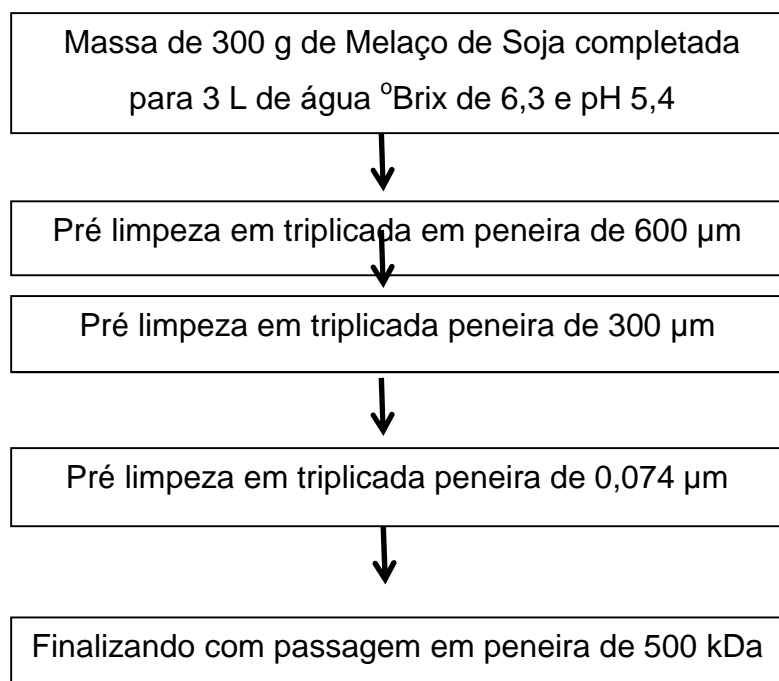


Figura 10 - Fluxograma do processo de limpeza do melaço de soja.

Após a passagem nas peneiras de pré limpeza 600, 300 e 0,074 µm e peneira de 500 kDa obtendo o seguinte perfil do produto, conforme apresentado na Figura 11.



Figura 11 - Perfil do produto após a passagem em peneiras de pré limpeza.

Posterior a etapa de pré limpeza foi realizado um “polimento” para retirada total das partículas retidas referente ao procedimento anterior. Desta forma, foi montado um sistema composto de um reservatório contendo o melaço de soja 1, succionado com auxílio de uma bomba sanitária à vácuo (Wilden, modelo FDA) livre de resíduos que possam contaminar o produto, ligada a um compressor a vácuo para dar sucção na solução de melaço de soja 2, passando por um sistema de cartuchos de algodão com 5 e 0,5 μm etapa 3 e finalizando com a saída da solução melaço de soja límpido 4 em tanque de aço inoxidável, conforme apresentado na Figura 12.



Figura 12 - Sistema montado para “polimento” da solução de melaço de soja.

O volume inicial do melaço de soja foi de 3 L, antes da passagem em peneiras de pré limpeza e cartuchos de algodão. E volume final de 2 L conforme apresentado na Figura 13.



Figura 13 - Produto final, após a passagem da solução de melão de soja em sistema de pré limpeza e “polimento”.

3.5.1 Processo de separação por membranas aplicada na recuperação dos carboidratos totais e isoflavonas

O PSM possibilita a recuperação dos compostos com diferentes massas molares. Neste tipo de experimento foram utilizadas membranas de ultrafiltração (polietersulfona) com área de filtração de $0,005 \text{ m}^2$ e cortes (*cut off*) de $0,22 \mu\text{m}$, 300 kDa e 5 kDa, para se obter frações recuperadas dos compostos formados por carboidratos monossacarídeos, dissacarídeos e RO, isoflavonas glicosídicas e agliconas conforme Apêndice C.

O equipamento utilizado foi a unidade piloto da (Millipore, *Labscale* TFF), constituída de um reservatório de acrílico com capacidade de 500 mL acoplado com bomba de diafragma, com controlador de velocidade, namômetros de entrada e saída da membrana e válvula para controle da pressão transmembrana, conforme apresentado na Figura 14.



Figura 14 - Unidade experimental piloto da Millipore modelo *Labscale* TFF.

3.5.2 Fluxo do permeado (J)

O controle do fluxo do permeado (J), é um dos fatores mais importantes para controle de operação por membranas. Esse parâmetro permite avaliar a quantidade da espécie (em volume ou massa) que permeia na membrana por unidade de tempo e por unidade de área da membrana.

O fluxo do permeado (J) foi determinado pela massa, conforme a equação (1).

$$J = \frac{V_p}{t \cdot A} \quad (1)$$

J = fluxo permeado, L/h.m²

V_p = volume de permeado recolhido num determinado tempo, L.

t = tempo volume de permeado recolhido h.

A = área da membrana filtrante m².

3.5.3 Percentual de entupimento nas membranas

O *fouling* formado na membrana é expresso em percentual de redução da permeabilidade com água, o que determina o percentual de entupimento ou taxa de *fouling* para cada condição de processamento (ALICIEO, 2006).

O fluxo do permeado foi determinado com o uso da água deionizada a 25 °C com pressão de entrada da membrana de 20 psi e pressão de saída 0 psi antes e depois de cada corrida, conforme equação (2).

$$(\% \text{ Entupimento}) = \left[\frac{(J \text{ membrana limpa} - J \text{ membrana suja})}{J \text{ membrana limpa}} \right] 100 \quad (2)$$

3.5.4 Procedimento operacional

O processo de ultrafiltração utilizando o aparato (Millipore, modelo *Labscale* TFF) foi realizado com volume de 500 mL, para cada batelada conforme descrição abaixo:

1. Uso de água deionizada, com medição do fluxo de permeado pela diferença de massa, em temperatura ambiente e tubo do retido conectado ao reservatório de alimentação (com reciclo). O ajuste foi realizado com pressão de entrada em 20 psi (1,4 bar) e pressão de saída igual a zero (válvula de controle de pressão na saída totalmente aberta). O valor do fluxo corrigido foi calculado com a aplicação da Equação 1.
2. As mesmas condições de pressão descritas no item 3.5.3, bem como o uso da agitação, determinaram o fluxo da solução filtrada, permeado com variação do tempo por períodos: tempo 0 e coletas de amostras a cada 5 minutos com volume conhecido até atingir 1 h. Análises de °Brix foram realizadas em refratômetro de mão (Sinotech, modelo RHB-32ATC) para obter o valor do fluxo em relação ao permeado por diferença de massa.

3. Com o auxílio da válvula de controle de pressão, ajustou-se a pressão de saída em 10 psi e pressão de entrada em 30 psi, com auxílio de agitação para a recirculação do rejeito.

3.5.5 Procedimento de limpeza das membranas

Após cada passagem das frações de melão de soja 0,22 μm , 300 e 5 kDa, foi realizada a limpeza e sanitização das respectivas membranas. A limpeza objetivou eliminar a camada formante como gel e a colmatagem, que acabam contribuindo com o entupimento da membrana e perdas de fluxo do permeado. No entanto, a sanitização visa eliminar ou reduzir os micro-organismos presentes na membrana utilizada.

O procedimento de limpeza das membranas utilizadas nas diferentes frações seguiu as especificações do fabricante com adaptações. O processo de limpeza foi realizado conforme descrição abaixo:

- Drenagem da solução residual presente no sistema;
- Enxágue com água deionizada e descarte pelas saídas do permeado e retido;
- Determinação do fluxo de água nas condições de referência do sistema;
- Limpeza alcalina: circulação com solução de hidróxido de sódio 1% em temperatura ambiente, por 40 a 50 minutos. E adição de um detergente não-iônico com (0,1%) à solução de hidróxido de sódio;
- O enxágue do sistema foi realizado com água deionizada até atingir o pH neutro na saída do permeado e aplicação da Equação 2;
- Foi verificado o fluxo de água e, caso fosse necessário, era realizado uma limpeza ácida;
- A limpeza ácida foi realizada com circulação em solução de ácido cítrico 1% em temperatura ambiente por 40 minutos.

3.6 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DAS ISOFLAVONAS

O melaço de soja (70 a 72 °Brix) foi utilizado no processo de bioconversão. Três amostras de 300 g (Gehaka modelo, BK 8000) foram submetidas a um processo de desengorduramento utilizando hexano (1:4 m/v), sob agitação magnética (IKA modelo HS 7) por 30 minutos, em temperatura de 25 °C e centrifugação a 7.000 x g por 20 minutos. O precipitado desengordurado foi submetido a secagem em rotaevaporador (IKA, modelo RV 10 Control), com temperatura de banho controlada em 40 °C e temperatura de 8 °C na circulação interna, trocador de calor acoplada em banho ultratermostático até a obtenção de uma massa seca.

As extrações das isoflavonas presentes no melaço de soja foram realizadas primeiramente com metanol 80% (v/v) na relação (1:10) amostra/solvente (m/v) (Fukutake et al. 1996), com etanol 90% (v/v) com a adição de 0,1% de ácido acético relação (1:20) amostra/solvente (m/v) (King et al. 1996) e água utilizando relação (1:10) amostra/solvente (m/v) sem descrição na literatura.

As frações obtidas pelos respectivos solventes metanol 80%, etanol 90% e água foram destinadas a agitação em agitador magnético por 2 horas em temperatura de 25 °C, com nova centrifugação a 7.000 x g por 20 minutos, para obtenção de duas frações, o sobrenadante e precipitado. O precipitado foi descartado, e o sobrenadante foi coletado e submetido ao processo de secagem por rotaevaporação conforme procedimento descrito no 4.6. Os valores obtidos em °Brix após as extrações foram 12, 9 e 18, para cada uma das frações iniciais. A Figura 15 apresenta o fluxograma de obtenção dos extratos de isoflavonas.

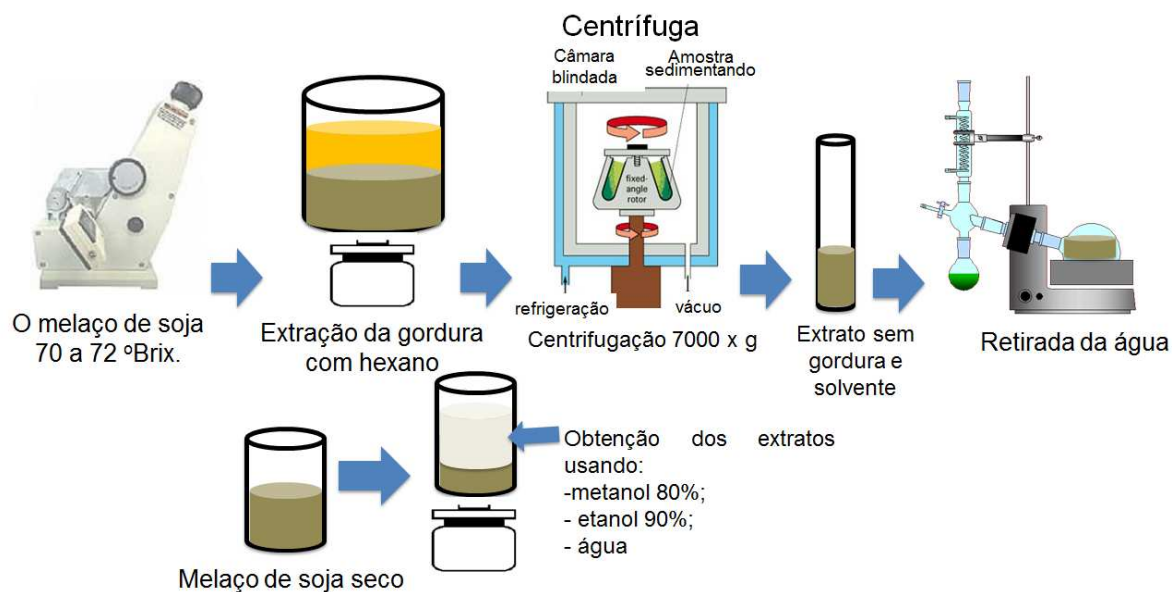


Figura 15 - Fluxograma de obtenção dos extratos de isoflavonas.

Os sobrenadantes foram filtrados em microfiltros de PTFE com porosidade 0,22 μm (Millipore, São Paulo, Brasil) e os filtrados foram armazenados em *freezer* a - 16 °C até a realização das análises de identificação e quantificação por CLAE. A Figura 16 apresenta o fluxograma dos extratos de isoflavonas obtidos e suas respectivas massas secas após o processo de rotaevaporação.

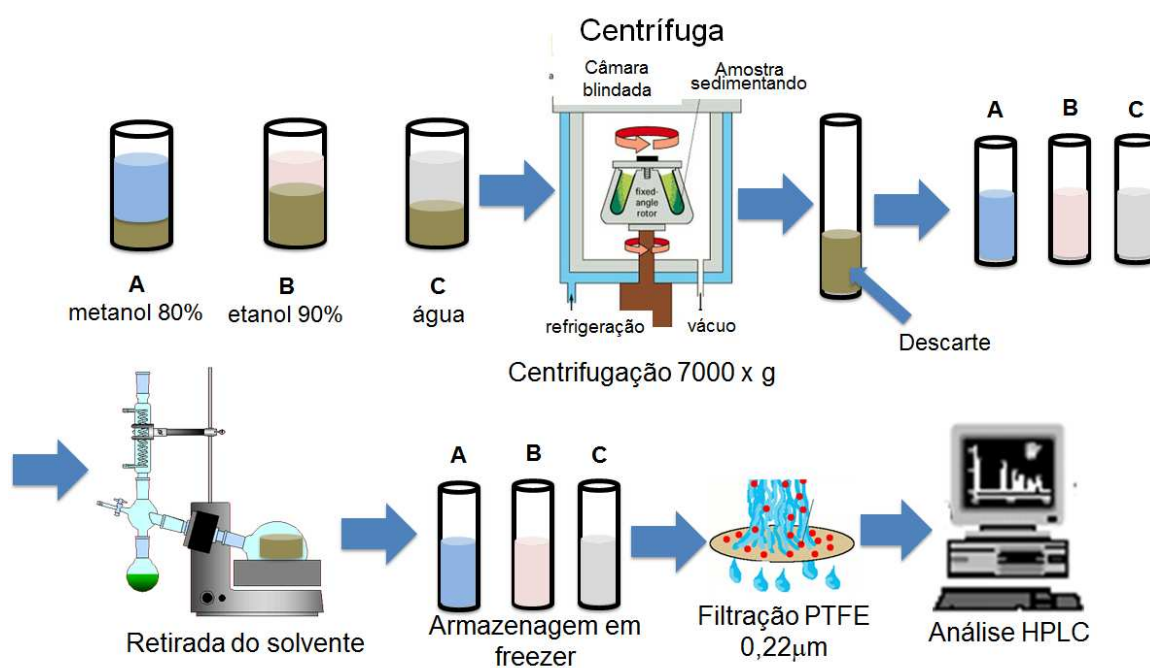


Figura 16 - Fluxograma da obtenção de massa seca dos extratos de isoflavonas após a rotaevaporação.

3.6.1 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática do extrato

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi utilizada para analisar os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade enzimática da β -Gli presente no extrato.

Um planejamento fatorial 2^2 completo com pontos centrais e rotatividade ($\alpha = \sqrt{2}$) foram elaborados apresentando nas seguintes codificações: $-\sqrt{2}$, -1, 0, +1, $\sqrt{2}$. O software StatSoft® Statistica (versão 8, 2007) foi utilizado nas avaliações dos dados. Na Tabela 2 são apresentadas as variáveis (ou fatores) e combinações de cinco níveis utilizados. A atividade enzimática foi tomada como resposta do planejamento, com nível de significância estatística de ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Fatores e níveis que compõem o planejamento fatorial 2^2 completo com pontos centrais e rotatividade ($\alpha = \sqrt{2}$).

Fatores	Unidades	Níveis				
		$\sqrt{2}$	-1	0	1	$\sqrt{2}$
Temperatura	°C	39,5	44	55	66	70,5
pH		3,95	4,4	5,5	6,6	7,05

O planejamento consistiu em 11 experimentos conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Planejamento fatorial 2^2 para análise de atividade enzimática do extrato.

Corridas	Fatores	
	pH	Temperatura (°C)
01	4,4 (-1)	44 (-1)
02	4,4 (-1)	66 (+1)
03	6,6 (+1)	44 (-1)
04	6,6 (+1)	66 (+1)
05	3,9 ($-\sqrt{2}$)	55 (0)
06	7,0 ($+\sqrt{2}$)	55 (0)
07	5,5 (0)	39,4 ($-\sqrt{2}$)
08	5,5 (0)	70,6 ($+\sqrt{2}$)
09 (C)	5,5 (0)	55 (0)
10 (C)	5,5 (0)	55 (0)
11 (C)	5,5 (0)	55 (0)

Ponto Central (C); Rotatividade ($\alpha = \sqrt{2}$).

3.6.2 Determinação do processo de bioconversão

O percentual de bioconversão enzimática foi determinado sobre os compostos de isoflavonas glicosídicas em agliconas obtidas com solventes metanol 80%, etanol 90% e água, bem como a bioconversão enzimática dos carboidratos RO obtidos a partir da fração de 5 kDa.

Os experimentos foram conduzidos por um microrreator de mistura, volume total de 200 mL, com camisa externa para circulação de água conectada a um banho ultratermostático para controle de temperatura, e agitador magnético, conforme representado na Figura 17. Utilizou-se um volume reacional de 60 mL.

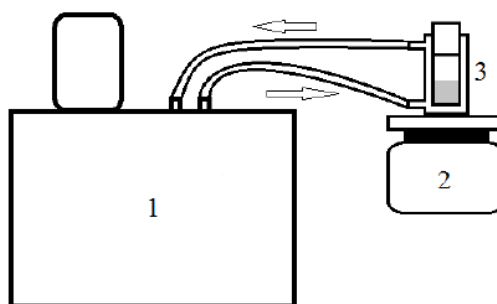


Figura 17 - Esquema da reação de hidrólise enzimática proposta pelo estudo. 1 - banho ultratermostático; 2 - agitador magnético; 3 - reator encamisado.

As variáveis utilizadas no decorrer dos procedimentos foram: agitação (rpm), razão do extrato enzimático e tempo (h). Os seguintes valores foram fixados para a temperatura, atividade enzimática e pH em: 55 °C, 6,5 U e pH 5,0 a 5,5. Alíquotas de 5 mL foram retiradas do microrreator em intervalos de tempos 0, 2, 4, 6 e 8 h e posterior análise cromatográfica por CLAE.

A MSR foi elaborada por um único planejamento fatorial 2^3 completo com pontos centrais, e nível de significância estatística de ($p < 0,05$), conforme apresentadas nas Tabelas 4 e 5.

O processo de bioconversão é explicado conforme equação (3).

$$\text{Bioconversão (\%)} = \frac{C_f - C_o}{C_o} \times 100 \quad (3)$$

C_f = Condição final da reação envolvendo a produtividade dos compostos bioconvertidos na forma de isoflavonas agliconas e compostos monossacarídeos e dissacarídeos com o uso da razão de extrato enzimático, enzimas β -Gli e α -Gal;

C_o = Condição inicial (branco) não ocorre reação referente a produtividade dos compostos de isoflavonas agliconas e compostos monossacarídeos e dissacarídeos.

Tabela 4 - Fatores e níveis que compõem o planejamento fatorial 2^3 completo com pontos centrais utilizados nas análises de bioconversão das isoflavonas.

Fatores	Unidades	Níveis		
		(-1)	(0)	(1)
Agitação	rpm	60	90	120
Razão de extrato enzimático *		0,125	0,368	0,748
Tempo	h	2	5	8

*É a razão entre as quantidades de extrato enzimático e a quantidade de produto (rico em isoflavonas) obtido do melaço de soja.

Tabela 5 - Fatores e níveis que compõem o planejamento fatorial 2^3 completo com pontos centrais utilizados nas análises de bioconversão dos carboidratos.

Fatores	Unidades	Níveis		
		(-1)	(0)	(1)
Agitação	rpm	60	90	120
Razão de extrato enzimático *		0,49	0,85	2,03
Tempo	h	2	5	8

*É a razão entre as quantidades de extrato enzimático e a quantidade de produto (rico em carboidratos) obtido do melaço de soja.

3.6.3 Resina de troca iônica Dowex

Após o processo de bioconversão conforme o item 4.6, verificou-se, na fração de permeado obtida a 5 kDa, a presença de um contaminante, o acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, utilizado para manter a estabilidade do pH da solução enzimática com α -Gal e evitar perdas de atividade enzimática durante o processo de bioconversão.

O contaminante acetato de sódio foi detectado durante as análises cromatográficas especialmente do RO (rafinose) por apresentar o mesmo tempo de retenção sobrepondo os cromatogramas em um único pico, elevando o teor de rafinose de forma errônea. Desta forma, foi montado uma coluna com recheio de

Dowex 50W com 15 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, previamente ativada com ácido clorídrico 7% (v/v), e lavada com água deionizada até atingir o pH 3,0. O tempo de passagem pela coluna foi de 30 minutos, com vazão média de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ obtendo como meta, a ausência dos íons que formam o acetado de sódio confirmado com a análise em CLAE. O precipitado foi submetido ao processo de rotaevaporação para obtenção da massa seca conforme o item 3.6.

3.7 ANÁLISES DOS TEORES DE CARBOIDRATOS TOTAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O perfil e teores dos carboidratos obtidos pela passagem em sistema de PSM $0,22 \mu\text{m}$ com obtenção de retido e permeados $0,22 \mu\text{m}$, 300 e 5 kDa. As frações foram pesadas com massa de 5,0 g em balança (Gehaka, modelo AG 200), e submetidas ao processo de secagem por rotaevaporação conforme procedimento descrito no item 3.6.

As frações dos carboidratos totais massa seca, foram pesadas e dissolvidas em fase móvel formada pelos reagentes acetonitrila/água relação (80:20 v/v) e passagem por 10 min em ultrassom (Unique, modelo USC - 1450) para dissolução dos carboidratos.

A técnica cromatográfica utilizada para quantificação dos compostos formados por carboidratos foi a CLAE, Marca Gilson controlada pelo software Born, equipado com injetor manual Rheodyne, volume de injeção de $10 \mu\text{L}$, bomba isocrática (Gilson, modelo 307) e detector de índice de refração (Gilson, modelo 133). A análise foi conduzida utilizando como fase móvel (acetonitrila/água relação 80:20 v/v) e coluna NH_2 Lichorosorb com dimensões ($5 \mu\text{m}$, $150 \times 4,6 \text{ D.I}$) e vazão de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com fase móvel e temperatura de coluna em forno de $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

As amostras dos carboidratos totais presentes nas diferentes frações foram identificadas e quantificadas a partir da comparação dos diferentes tempos de retenção de cada composto analisado, em comparação com as mesmas condições analíticas, referente aos padrões de sacarose, frutose, glicose, galactose, lactose, melibiose, rafinose e estaquiose. Desta forma, a quantificação foi realizada por padronização externa, utilizando cinco níveis de concentração 100, 80, 60, 40 e 20

$\mu\text{g/mL}$ dos respectivos carboidratos citados, com cada ponto representado pela média de três determinações.

3.7.1 Análise cromatográfica dos teores de isoflavonas

As amostras contendo os compostos de isoflavonas formas glicosídicas e agliconas, após a obtenção de três diferentes extratos providas do uso com solventes (metanol 80%, etanol 90% e água), foram pesadas em balança analítica, massa de 3,0 g, e submetidas ao processo de secagem em rotaevaporador conforme descrição do item 3.6.

A técnica cromatográfica utilizada para quantificação dos compostos de isoflavonas foi a CLAE, equipamento composto por bomba quaternária (Shimadzu, modelo LC-10ADVP), controlador de sistema (Shimadzu, modelo SCL-10AVP), detector Uv-Vis (Shimadzu, modelo SPD-10AV) monitorado em 254 nm, equipado com injetor manual Rheodyne volume de injeção de 10 μL , degaseificador (Shimadzu, modelo DGU-14A) e software Shimadzu CLASS-VP[®] Release (Versão 6.14 SP1). A análise foi conduzida utilizando como fase móvel A: água ultrapura + 0,1% de ácido acético e B: acetonitrila + 0,1% de ácido acético e vazão constante ao longo da corrida com 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e coluna (ODS Hypersil, 5 μm , 4,6 x 250 mm) com fase móvel e temperatura de coluna em forno (Shimadzu, modelo CTO-10AS) a 30 $^{\circ}\text{C}$.

O sistema referente ao gradiente formado para mistura da fase móvel é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Gradiente formado para passagem dos compostos de isoflavonas por CLAE.

Tempo (min)	S1	S2
0	86	14
8	86	14
25	50	50
30	50	50
33	86	14
35	86	14

S1- Solução de Água Ultrapura + 0,1% de ácido acético e S2 - Solução de Acetonitrila + 0,1% de ácido acético.

As amostras de isoflavonas foram identificadas e quantificadas a partir da comparação dos diferentes tempos de retenção de cada composto analisado, em comparação às mesmas condições analíticas, referentes aos padrões de Daidzina, Glicitina, Genistina, Daidzeína, Gliciteína e Genisteína. Desta forma, a quantificação foi realizada por padronização externa, utilizando seis níveis de concentração em mg/mL, com teores variados para cada composto representados pela média de três determinações. A Tabela 7 apresenta as respectivas concentrações $\mu\text{g/mL}$, utilizadas em cada composto.

Tabela 7 - Mistura dos padrões de isoflavonas $\mu\text{g/mL}$

Padrões isoflavonas	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5	Mix 6
Daidzina (Glicosídica)	200	100	40	30	8	4
Glicitina (Glicosídica)	100	50	20	10	4	2
Genistina (Glicosídica)	50	25	10	5	2	1
Daidzeína (Aglicona)	200	100	40	20	8	4
Gliciteína (Aglicona)	200	100	40	20	8	4
Genisteína (Aglicona)	200	100	40	20	8	4

3.8 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos formados por flavonóides foram extraídos a partir do desengorduramento conforme descrição do item 3.6.

A metodologia de extração líquido-líquido seguiu a recomendação de Pereira et al. (2007) com modificações. Pesou-se em balança analítica 1,5 g do extrato de melão de soja desengordurado utilizando os seguintes solventes: metanol 80%,

etanol 90% e água. Na sequência foi utilizado uma alíquota de 30 mL relacionada a cada extração respectivamente, em seguida as amostras foram misturadas aos seus respectivos solventes e conduzidas ao equipamento de ultrassom (Unique, modelo USC - 1450) por 15 minutos, com posterior centrifugação por 10 minutos a 4.000 x g, finalizando com uma filtração em papel filtro.

3.8.1 Método de quantificação dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos totais foram quantificados conforme metodologia descrita por Dewato et al. (2002) com a adição de 125 μ L e adição de 0,5 mL de água ultra pura e 125 μ L do reagente de Folin Ciocalteau 2 N. A mistura foi mantida em repouso por 10 minutos, com posterior adição de 1,25 mL de carbonato de sódio 7% (m/v) e adição de água ultra pura para ajuste do volume em 3 mL. Após o tempo de 90 min, foi realizada a leitura das amostras em absorvância de 760 nm. A curva de calibração foi construída com o padrão de ácido gálico nas concentrações: 0 a 200 μ g/mL, obtendo-se uma equação linear expressa por $y = 0,0075x$, e $R^2 = 0,9986$. Os teores das amostras analisadas foram expressos em teores de fenóis totais em mg de ácido gálico por grama de extrato de melão de soja (mg GAE/g) conforme Apêndice B.

3.9 RESINAS DE TROCA IÔNICA

A fração açucarada bioconvertida enzimaticamente do permeado de 5 kDa foi submetida à passagem em resinas específicas para retirada da cor (amarela para incolor), fenômeno conhecido como adsorção composto por duas resinas (Amberlite 252Na) para troca iônica ácida e resina (Amberlite IRA96SB) troca catiônica básica da Rohm e Haas. O sistema foi montado em duas colunas distintas de vidro com 15 cm altura e 1,5 cm de diâmetro. A catiônica (coluna 1) é formada de resina ácida e a aniônica (coluna 2) é formada de resina básica. Desta forma, a regeneração de cada coluna seguiu as especificações do fabricante. Na coluna catiônica foi usada a

solução de ácido clorídrico com concentração de 10% e para a coluna aniônica usou-se a solução de hidróxido de sódio com concentração de 10%.

A regeneração das resinas foi realizada a cada 500 mL de solução tratada para um leito de 50 mL de resina, com vazão de percolação média de $3,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O sistema resinas de troca iônica está apresentado na Figura 18.



Coluna BV1 Coluna BV2

Figura 18 - Colunas recheadas com resinas de troca iônica BV1 catiônica e BV2 aniônica.

3.10 Validação do método de quantificação dos padrões de isoflavonas

O procedimento voltado à validação do método de quantificação dos compostos de isoflavonas foi escolhido por apresentar contribuição acadêmica, baseada nos teores de isoflavonas glicosídicas e agliconas posterior ao uso dos solventes extratores metanol 80%, etanol 90% e água, bem como, bioconversão enzimática. O procedimento de validação deve estar relacionado aos seguintes requisitos: resolução dos picos, simetria, largura das bases dos picos e tempos de retenção. Neste sentido, seguindo as determinações brasileiras em relação as atribuições designadas pelos órgãos de competência nacional credenciados por aplicar recomendações relacionadas a validações e normalizações aos laboratórios analíticos, as amostras obtidas após os ensaios realizados foram direcionadas

conforme diretrizes das normativas relacionadas a ANVISA RE nº 899/2003 da ANVISA intitulada na Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (BRASIL, 2003) e INMETRO DOQ-CGCRE - 008/2003 intitulado nas Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos (INMETRO, 2003).

3.10.1 Preparo das curvas de calibração dos compostos de isoflavonas

As construções das três curvas de calibração referentes aos três dias de injeção cromatográfica foram realizadas separadamente no formato de solução estoque. Pesou-se em balança analítica um valor aproximado de 10 mg de cada padrão de isoflavona (Daidzina, Glicitina, Genistina, Daidzeína, Gliciteína e Genisteína) com adição de 1 mL de DMSO.

A partir da solução estoque, foi obtido a “solução mãe” padronizada de cada composto de isoflavona, o volume foi ajustado em balão volumétrico calibrado com concentração inicial de 0,2 mg/mL. As isoflavonas foram dissolvidas em fase móvel, metanol:água (80:20 v/v) e filtrada por microfiltros de PTFE com porosidade 0,22 µm. A partir desta relação, foram obtidas as demais concentrações na ordem de 0,2 a 0,001 mg/mL.

O cromatograma representado pela Figura 19 é formado pela solução estoque de isoflavonas (mix), identificadas pelo tempo de retenção de cada composto daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína numerados de 1 a 6 respectivamente.

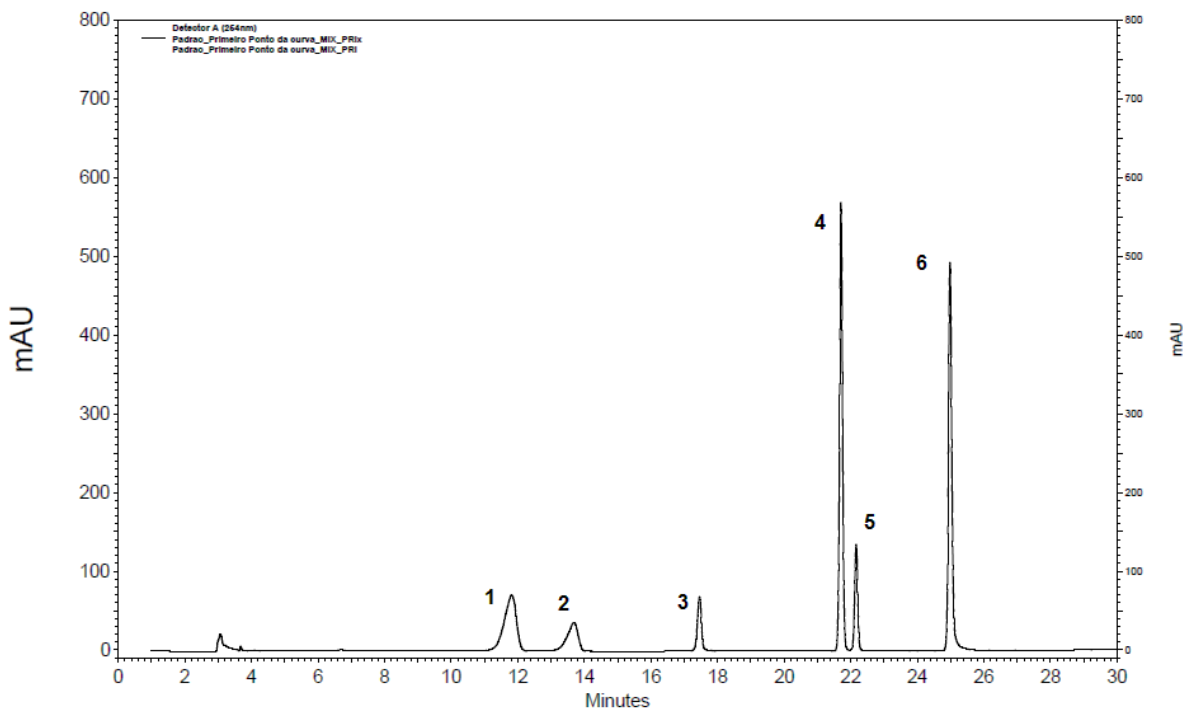


Figura 19 - Cromatograma dos padrões de isoflavonas.

3.10.2 Intervalo

O intervalo foi determinado a partir dos limites de quantificação superior e inferior. As principais características são: exatidão, precisão e linearidade.

3.10.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada mediante a construção da curva de calibração relacionada para cada padrão preparado. Desta forma, para demonstrar a presença da linearidade para cada um dos compostos analisados, utilizou-se a equação linear com o objetivo de obter um coeficiente de correlação (r) igual ou maior que 0,99.

3.10.4 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) estimado baseado com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, em relação a menor concentração detectável do analito.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Onde:

LD: limite de detecção;

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC = inclinação da curva;

3 = relação sinal-ruído.

3.10.5 Limite de quantificação (LQ)

A partir da curva de linearidade foi determinada pela menor concentração, com valores de coeficiente de correlação (r) igual ou maior que 0,99. Desta forma, os limites de quantificação (LQ) foram determinados a partir das curvas da linearidade.

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde:

LQ: limite de quantificação;

Dpa = desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC = inclinação da curva;

10 = relação sinal-ruído.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no presente trabalho referente à descrição dos procedimentos e metodologias utilizadas para obtenção de dados experimentais como identificação microbiana, caracterizada com 100% de similaridade para a espécie *Aspergillus niger* e caracterização bioquímica da enzima β -Gli, para obtenção de valores relacionados a atividade enzimática em relação aos parâmetros temperatura e pH ótimos, bem como, estabilidade enzimática em relação a temperatura e pH. Diante dos resultados obtidos da caracterização bioquímica decidiu-se utilizar a temperatura de 55 °C e pH 5,0 com tampão de acetato de sódio. A finalização da caracterização enzimática ocorreu com o uso do sistema Api-Zym[®] sobre o extrato enzimático obtido após a fermentação por FSS, obtendo-se como resultado final grande concentração das enzimas α -Gal e β -Gli. O estudo voltado ao potencial de redução microbiana com o uso das isoflavonas obtidas a partir dos solventes metanol 80%, etanol 90% e água após a bioconversão enzimática foi positiva pois, reduziu a carga microbiana do micro-organismo *Myrothecium verrucaria*. A microscopia realizada sobre as frações do retido 0,22 μ m e permeados 0,22 μ m, 300 kDa e 5 kDa contendo carboidratos apresentaram diferenças visuais especialmente pela superfície rugosa observada no retido de 5 kDa. No entanto, os extratos contendo as isoflavonas provindas das extrações com solventes metanol 80%, etanol 90% e água apresentaram superfície rugosa com maior intensidade no solvente etanol 90%. Realizou-se a análise referente a composição centesimal e quantificação de carboidratos totais do melaço de soja, com obtenção de valores díspares para a proteína, lipídeo e RO, valores considerados normais por se tratar de um subproduto agrícola. Após a obtenção dos extratos com presença de isoflavonas foi utilizado o processo de passagem por ultrafiltração para obtenção do teor de isoflavonas totais obtidos após a passagem por membranas de 0,22 μ m, 300 kDa e 5 kDa, divididas em retido de 0,22 μ m e permeados de 0,22 μ m, 300 kDa e 5 kDa, o interesse deste estudo foi avaliar os teores de isoflavonas obtidas em cada fração analisada, e observou-se maiores teores de isoflavonas no retido da membrana de 0,22 μ m e menores teores para a membrana de 300 kDa. No entanto, o mesmo procedimento foi aplicado para obtenção das frações de carboidratos e observou-se menores teores de carboidratos para a fração retido de 0,22 μ m e

maiores teores para a fração de 300 kDa. A atividade enzimática obtida pela enzima β -Gli foi determinada com o uso de um planejamento de experimentos com combinação entre pH e temperatura, com os valores obtidos foram dados seqüências para realização dos processos de bioconversão enzimática como pH 4,9 e temperatura 56,5 °C. A bioconversão dos compostos de carboidratos foi realizada com o uso da fração de 5 kDa e uso da enzima α -Gal utilizando um planejamento padrão em todos os processos de bioconversão deste estudo com planejamento fatorial 2^3 com o uso das variáveis agitação (rpm), fração de extrato enzimático bruto e tempo (h) os valores obtidos após a bioconversão foram satisfatórios pois, ocorreu a redução dos RO com 75,2 e 70% e aumento significativo de compostos monossacarídeos e dissacarídeos na ordem de 72%. No entanto, a bioconversão dos compostos de isoflavonas extraídas a partir dos solventes etanol 90%, metanol 80% e água apresentaram distorções de teores em relação a formação dos compostos agliconas, com maiores teores de bioconversão sobre os compostos extraídos a partir do etanol 90%, metanol 80% e água. A análise dos compostos de isoflavonas totais foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com posterior validação da metodologia conforme parâmetros descritos pela normativa RE n° 899/2003. A finalização do estudo foi efetivada pela quantificação do teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos obtidos a partir do uso dos solventes estudados focando os teores obtidos em cada extrato.

4.1 Identificação do gênero e espécie

O uso de micro-organismos isolados em ambientes internos e externos traz consigo a entrada de inúmeras outras espécies microbianas, conforme procedimento descrito no item 3.1.3. Neste sentido, foi necessário realizar a identificação microbiana de gênero e espécie por PCR, o resultado final foi expresso com 100% de similaridade referente às sequências aplicadas no desenvolvimento da metodologia, concluindo que a presente amostra enviada ao CPQBA, identificada pelo número do processo **CPQBA 327/12 DRM**, trata-se da espécie *Aspergillus niger* conforme apresentado no Anexo A.

4.2 VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO

O extrato enzimático bruto foi obtido com a realização da FSS conforme o item 3.2. Os valores de atividade enzimática, proteína total e atividade específica referente a enzima β -Gli foram conduzidas em triplicada e os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valor da atividade enzimática total obtida do extrato enzimático.

Micro-organismo	Volume (mL)	Ativ. Total (U)	Proteína Total (mg)	Ativ. Específica (U/mg)
<i>Aspergillus niger</i>	400	68381	633,9	107,8

A partir dos valores observados na Tabela 8 especialmente valores de atividade enzimática presentes no respectivo extrato enzimático 68381U foram realizadas condições voltadas a caracterização bioquímica do presente extrato. A avaliação bioquímica proporciona uma melhor visão em relação as condições de perdas de atividade enzimáticas envolvidas em processos de bioconversão como temperatura, pH e suas interações com o tempo de reação (DECKER et al., 2001). A partir destes fenômenos foram avaliados as condições *in loco* do comportamento da enzima em relação a atividade enzimática propiciam o tempo de reação com o substrato utilizado para obtenção dos compostos esperados (SARRY e GÜNATA, 2004).

4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Procedeu-se a caracterização bioquímica com referência aos valores de atividade enzimática da enzima β -Gli em duas condições distintas. Na primeira foi avaliado as condições experimentais dos itens 4.3.1 e 4.3.2.

A segunda parte experimental buscou encontrar as melhores condições de análise relacionadas aos itens 4.3.3 e 4.3.4, com obtenção de valores em atividade relativa que é expressa em porcentagem máxima no tempo zero de incubação valor de 100%.

4.3.1 Determinação da temperatura ótima

A análise referente a determinação da temperatura foi realizada conforme descrito no item 3.3.1 (Figura 20). A melhor condição de atividade hidrolítica encontrada neste estudo foi com 65 °C durante a incubação da enzima β -Gli. No entanto Peshin e Mathur (1999) encontram a melhor condição a 50 °C ao avaliar o extrato enzimático produzido pelo *Aspergillus niger*. Neste contexto, é necessária a utilização da estabilidade térmica para obter a melhor condição da temperatura utilizada em processos de bioconversão sobre compostos por longos períodos, pois as enzimas são estruturas frágeis e sofrem alterações com perda de atividade se expostas em condições extremas.

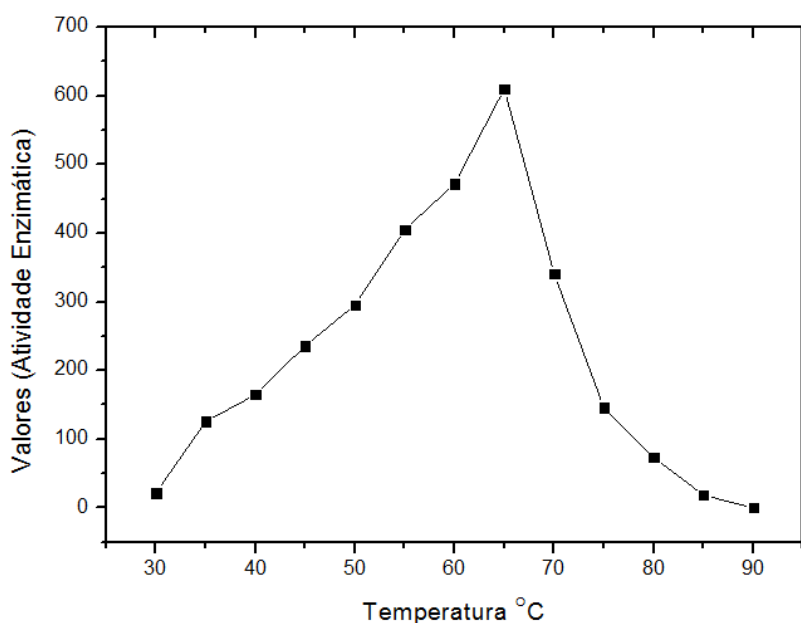


Figura 20 - Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática.

4.3.2 Determinação do pH ótimo

A análise do efeito do pH na atividade enzimática foi realizada conforme descrito no item 3.3.2. Fez-se esta análise para a obtenção das faixas de pHs ótimas em relação aos valores da atividade enzimática, com estudo dos tampões

Macllvaine e acetato de sódio e escolha do melhor tampão a ser aplicado durante os processos de bioconversão sobre os compostos de isoflavonas e RO. Na Figura 21 está apresentado o efeito do pH sobre a atividade enzimática, e os melhores valores de pHs encontrados estão na faixa de 5,5 e 4,8, para os tampões Macllvaine e acetato de sódio. Valores de pH 5,5 foram citados em estudos realizados por Pitson et al. (1997); Peshin e Mathur (1999) como ótimo para a enzima β -Gli produzida pelo *Aspergillus niger*.

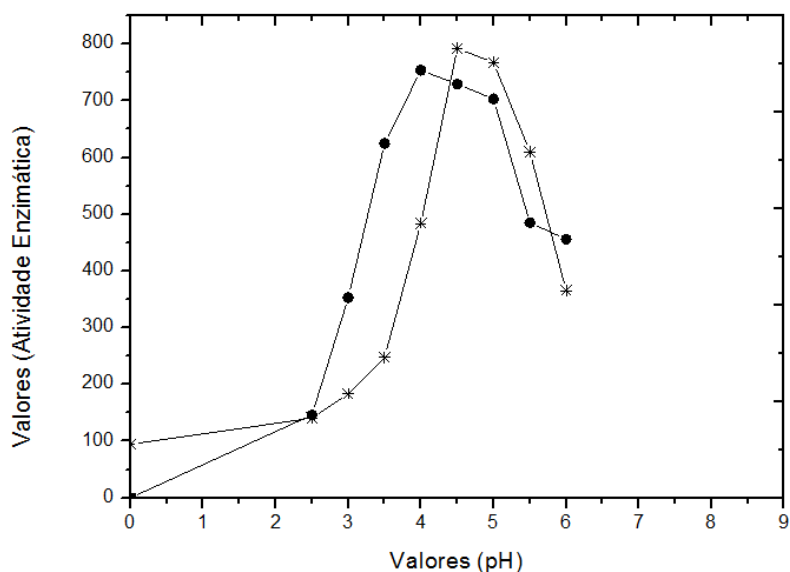


Figura 21 - Efeito do pH sobre os valores de atividade enzimática em tampão Macllvaine (*2,5 a 8,0) e tampão de acetato de sódio (•3,6 a 5,8).

4.3.3 Estabilidade térmica

Determinação da temperatura

A análise referente a determinação da temperatura foi realizada conforme descrição no item 3.3.3. Primeiramente, realizou-se uma pré-incubação enzimática com intervalos de temperaturas (60 e 65 °C consideradas críticas) por 5 min para avaliar a estabilidade enzimática neste intervalo de tempo. No entanto, os valores obtidos para esse pequeno intervalo de reação 5 min não influenciou na perda de atividade. As perdas das atividades somente foram observadas quando mantidas as

temperaturas de 60 e 65 °C durante um intervalo de até 180 min, com redução das atividades enzimáticas para 30 e 2% conforme representado na Figura 22. Entretanto, ao se utilizar temperaturas de 50 a 55 °C, o extrato manteve-se resistente com valores de atividade de 90% para ambos os tratamentos.

As enzimas β -Gli são produzidas por diversos micro-organismos, os mais estudados são *A. phoenicis*, *A. niger*, *A. oryzae* e *A. carbonarius* entre outros, por apresentar estabilidade térmica em até 50 °C com valores 87 a 53% de atividade e grandes perdas de atividade em temperatura de 70 °C (JÄGER et al. 2001). No entanto, a produção da β -Gli pelo *Aspergillus niger* mantém maior estabilidade enzimática em temperaturas abaixo de 60 °C (YAN e LIAU, 1998).

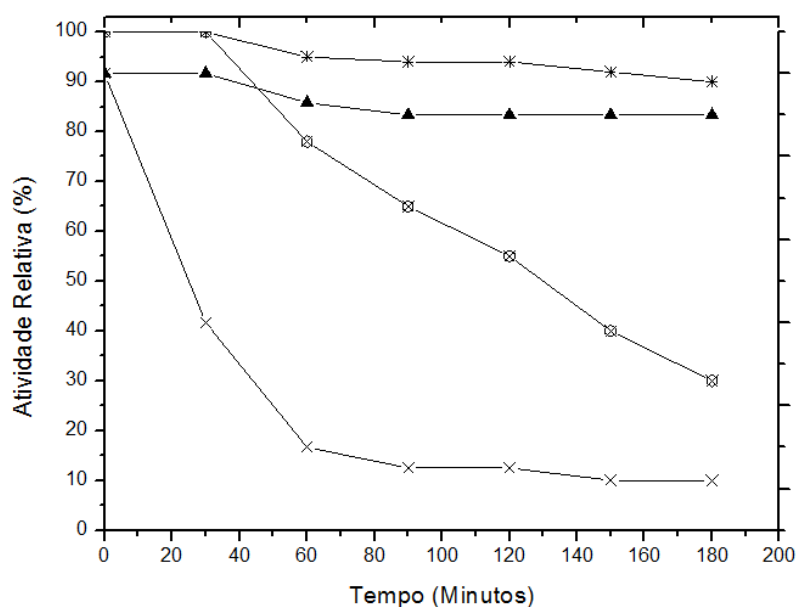


Figura 22 - Determinação da termoestabilidade da enzima β -Gli com pré-incubação em (*) 50 °C, (▲) 55 °C, (⊗) 60 °C e (x) 65 °C.

4.3.4 Estabilidade em pH

Determinação do pH

A análise referente a determinação do pH foi realizada conforme descrito no item 3.3.4 com o objetivo de representar a estabilidade enzimática do extrato. A Figura 23 representa uma baixa faixa de estabilidade sobre os tampões utilizados,

com valores na atividade enzimática variando de 88 a 100% no tampão MacIlvaine, faixa de pH 3,5 a 5,5 e para o tampão acetato de sódio variando de 100 a 92% na faixa de pH 4,4 a 5,8.

De forma semelhante ao realizado neste estudo, Lima (2003) estudou a estabilidade enzimática do extrato encontrando estabilidade de 100% no pH 6,0 e perda de atividade em pH ácido de 2,5 a 3,5.

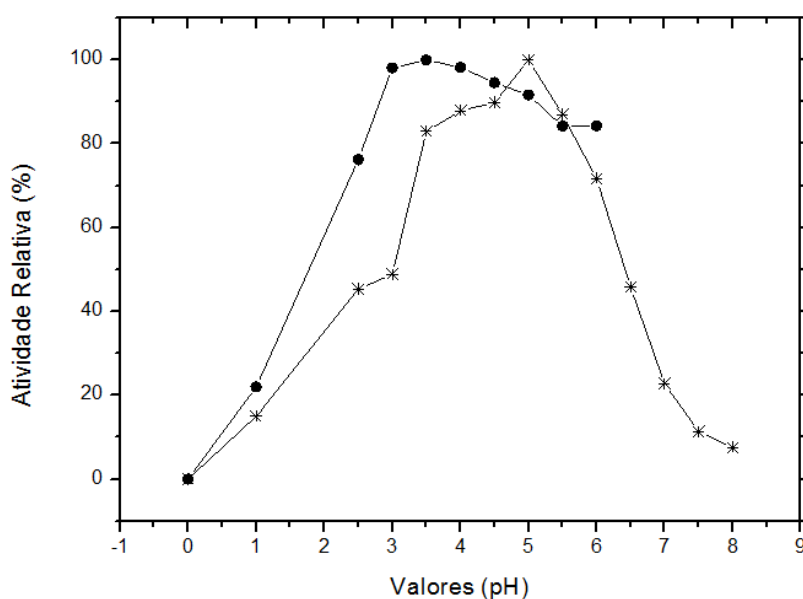


Figura 23 - Determinação do pH na estabilidade da enzima β -Gli, em tampão MacIlvaine (*2,5 a 8,0) e tampão de acetato de sódio (●3,6 a 5,8).

4.3.5 Identificação de enzimas pelo sistema Api-Zym[®]

O sistema Api-Zym[®] é um método considerado semi-qualitativo para verificação de atividades enzimáticas. É aplicado de forma direta aos tecidos, células, líquidos biológicos, micro-organismos diversos, solo, entre outras aplicações, permitindo uma análise rápida e simultânea de dezenove atividades enzimáticas. O uso do sistema Api-Zym[®] segundo Humble et al. (1977) foi introduzido graças à fácil aplicação de seus reagentes, praticidade, interpretabilidade, repetibilidade e resultado simultâneo. De acordo com Zanette (2010) e Hesami et al. (2008) o sistema Api-Zym[®] não foi desenvolvido para

substituir metodologias tradicionais como as espectrofotométricas e/ou eletroforéticas, mas no uso diário na aplicação de “screening” para obtenção de amplo espectro nas determinações enzimáticas.

O sistema Api-Zym[®] é um procedimento simples, de fácil aplicação para a micologia, especialmente na pesquisa voltada à produção enzimática por fungos filamentosos (MANCIANTI et al., 2000). O sistema Api-Zym[®] é formado por dezenove “poços” contendo diferentes substratos enzimáticos utilizados para identificação rápida dos mais diferentes grupos enzimáticos produzidos durante uma fermentação, conforme representado na Figura 24.



Figura 24 -. Inoculação das enzimas produzidas pelo *Aspergillus niger*, uso do sistema Api-Zym[®].

Os “poços” do kit foram preenchidos com 65 μ L do extrato enzimático, deixando incubado por um período de 4 h em temperatura de 25 °C. Após o período exigido, adicionou-se conforme a sequência numérica dos “poços” 1 a 20 a quantidade de uma gota do reagente Zym A e Zym B e deixou-se reagir até a estabilidade da cor, por 10 min.

As interpretações das leituras obtidas pelo método variam de “0”, correspondendo a uma reação negativa, até “5”, correspondendo à reação máxima conforme representação na Tabela 9. Os valores são obtidos pela intensidade da cor e convertidos em nanomoles (nmol) de substrato hidrolizado após a reação enzimática: 1 = 5 nmol, 2 = 10 nmol, 3 = 20 nmol, 4 = 30 nmol e 5 \geq 40 nmol. As leituras foram realizadas em triplicada e os resultados referentes a reação enzimática são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Relação das enzimas avaliadas pelo sistema Api-Zym[®]

Orifício Kit	Enzimas avaliadas	Substratos	Reação positiva (cor)
1	Controle	sem substrato	Incolor
2	Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato	Violeta
3	Esterase (C4)	2-naftil butirato	Violeta
4	Esterase lipase (C8)	2-naftil caprilato	Violeta
5	Lipase (C14)	2-naftil miristato	Incolor
6	Leucina arilamidase	L-Leucil-2-naftalimida	Incolor
7	Valina arilamidase	L-Leucil-2-naftalimida	Incolor
8	Cistina arilamidase	L-cistil-2-naftalimida	Incolor
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginil-2-naftalimida	Incolor
10	Quimiotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftalimida	Incolor
11	Fosfatase ácida	2-naftil fosfato	Violeta
12	Naphthol-AS-BI-Fosfohidrolase	Naftol-AS-BI-fosfato	Azul
13	α -galactosidase	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosida	Violeta
14	β -galactosidase	2-naftil-Bd-galactopiranosida	Violeta
15	β -glucuronidase	Naftil-AS-BI- β D-glucuronida	Incolor
16	α -glucosidase	2-naftil- α D-glucopiranosida	Violeta
17	β -glucosidase	6-Br-2naftil- β Dglucosaminida	Violeta
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	1-naftil-N- α D-mannopiranosida	Castanho
19	α -mannosidase	6-Br-2-naftil- α D-mannopiranosida	Incolor
20	α -fucosidase	2-naftil- α L-fucopiranosida	Incolor

*Resultado incolor = reação negativa.

A análise referente à metodologia tradicional por espectrofotometria, conforme o Item 3.3.5, foi realizada para determinar a atividade enzimática dos substratos de interesse, enzimas β -Gli e α -Gal com valores de 10,2 e 8,4 U. No entanto, a análise realizada com o sistema Api-Zym[®] possibilitou um maior conhecimento das enzimas presentes no extrato enzimático obtido durante a fermentação por FSS, demonstrando a presença de enzimas antes desconhecidas: Esterase (C₄), Esterase Lipase (C₈) e α -glucosidase com menor expressão. E maior expressão para Fosfatase ácida, Naphthol-AS-BI-Fosfohidrolase, β -Gli, α -Gli, β -Gal e α -Gal.

4.3.6 Atividade antimicrobiana dos extratos de isoflavonas

No trabalho realizado por Aguiar (2004) verificou-se a atividade antimicrobiana com o uso do micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, coagulase positiva com a adição de isoflavonas concentradas provindas de extrato de soja. Os resultados obtidos por Aguiar (2004) foram discutidos em relação a formação de halo ao redor dos discos, e verificação da inibição parcial do crescimento da bactéria testada.

O interesse do nosso estudo foi aplicar os extratos obtidos a partir da água, etanol 90% e metanol 80% após o processo de bioconversão dos compostos de isoflavonas formas glicosídicas em agliconas sobre o micro-organismo *Myrothecium verrucaria*, fungo esse que afeta diretamente as culturas economicamente importantes, dentre as quais, cereais, plantas ornamentais e madeiras (WALKER e TILLEY, 1997). Esse fungo é um produtor de toxinas que comprometem a qualidade de rações e alimentos (REDDY e AHMED, 1998).

Diante deste cenário, preparou-se halos com 100 μ L de extrato de isoflavonas com concentração de 0,2 mg de isoflavonas bioconvertidas enzimaticamente, inseridos no centro das placas de Petri contendo o micro-organismo do estudo. Entretanto, a amostra descrita como controle contém a mesma concentração de isoflavonas 0,2 mg porém, sem bioconversão enzimática.

A Figura 25 representada pelas letras A, B, C e D formando o experimento realizado conforme condições descritas acima.

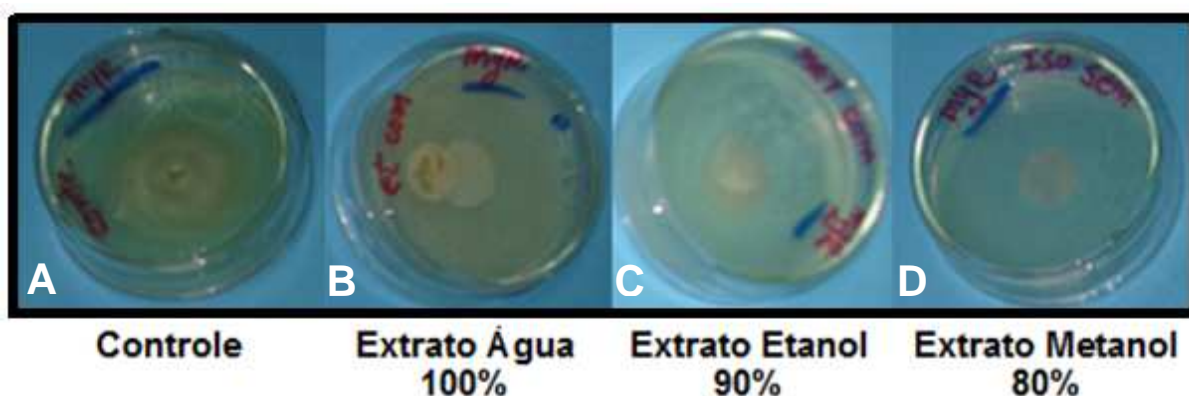


Figura 25 - Testes de atividade antimicrobiana com extratos de isoflavonas bioconvertidas.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram o recuo do crescimento microbiano na região do halo enriquecido com isoflavonas bioconvertidas enzimaticamente conforme o item 3.6.2 e extraídas com o uso dos solventes representados pela Figura 19 (B), (C) e (D) em água, etanol 90% e metanol 80%. No entanto, observou-se na amostra controle Figura 19 (A) sem bioconversão enzimática um crescimento completo na região do halo. Neste sentido, os resultados obtidos apontam para a redução da capacidade microbiana com a presença dos compostos de isoflavonas formas agliconas. Segundo Cook e Samman (1996) os micro-organismos que recebem a adição dos compostos de isoflavonas formas agliconas não conseguem crescer nesta região principalmente pela estrutura química do composto aglicona que contém um grupamento hidroxila responsável pelo efeito antimicrobiano.

4.4 VALORES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO MELAÇO DE SOJA

A composição centesimal do melaço de soja foi determinada em relação aos compostos: umidade, proteína bruta, extrato etéreo, resíduo mineral, carboidratos e fibras, valores observados na Tabela 10. Os valores obtidos neste estudo apresentaram-se distantes dos encontrados na literatura (Siqueira et al., 2008). Essa oscilação da composição centesimal do melaço de soja é considerada normal, principalmente pela sua forma de obtenção que provém da concentração das proteínas presentes no farelo de soja, as quais são responsáveis pela produção de dois extratos distintos: concentrado proteico de soja (composto majoritário) e o melaço de soja (IMCOPA, 2013).

Os valores díspares encontrados nas análises de composição centesimal no melaço de soja foram o lipídeo e proteína, isso se deve pelo processo industrial de extração do grão de soja (SIQUEIRA 2006; KARP 2007; SILVA 2010). No entanto, na comparação aos teores de minerais presentes no grão de soja e minerais presentes no melaço de soja, ocorre grande perda de seus teores especialmente para o composto cálcio e cobre (RIAZ, 2006).

Tabela 10 - Valores da composição centesimal e mineral do melaço de soja

Parâmetros	Unidades	Este Trabalho	Valores Literatura
Umidade	%	26,3	
Proteína bruta	%	4,6	9,4
Extrato etéreo	%	2,8	21,2
Resíduo mineral fixo	%	12,5	6,3
Carboidratos totais*	%	53,2	57,3
Fibras	%	0,11	6,3
Cálcio	mg/100g	56,4	230,0
Cobre	mg/100g	6,3	0,1

Fonte: (SIQUEIRA 2006; KARP 2007 e RIAZ, 2006).

Média aritmética de três repetições *Calculado por diferença = 100 – (umidade + proteína bruta + lipídeos + cinzas + fibras).

4.4.1 Quantificação dos teores de carboidratos sem passagem por ultrafiltração

Os teores de carboidratos encontrados no melaço de soja apresentaram grande porcentagem na composição centesimal, conforme apresentada na Tabela 11. No entanto, a presença de carboidratos com estruturas RO compromete o seu uso na nutrição animal, especialmente na alimentação de monogástricos, uma vez que geram flatulências por apresentarem compostos que dificultam a absorção intestinal (SUAREZ et al., 1999).

Siqueira (2006) e Karp (2007) realizaram análises referentes aos teores de carboidratos presentes no melaço de soja, para as formas dissacarídicas e monossacarídicas, encontrando valores de 28,8%, já para as formas RO os valores foram de 28,2%. Qureshi et al. (2001), ao estudarem os compostos açucarados provenientes do grão de soja, relataram que os compostos, monossacarídicos e dissacarídicos apresentam 65% do total de carboidratos presentes na soja, as demais presenças são atribuídas aos RO. Desta forma, ao estudar a amostra de melaço de soja utilizada no presente trabalho, foram encontrados teores de carboidratos compostos nas formas dissacarídicas e monossacarídicas na ordem de 27,1% e para os RO com teores de 19,5%.

Os teores obtidos para os carboidratos presentes no melaço de soja apresentaram-se próximos aos resultados encontrados na literatura por (Siqueira et al., 2008; CEGLA, 2005; VELDMAN et al., 1993).

Tabela 11 - Teores de carboidratos totais do melaço de soja

Parâmetros	Este Trabalho	Valores Literatura
Glicose	0,3%	0,25%
Frutose	0,8%	0,15%
Galactose	1,5%	0,25%
Sacarose	24,5%	28,4%
Rafinose	6,5%	9,7%
Estaquiose	13,0%	18,6%

Fonte: (SIQUEIRA et al., 2008).

4.4.2 Passagem da fração de 5 kDa por resinas de troca iônica

O produto açucarado obtido da fração de permeado de 5 kDa após o processo de bioconversão, com presença majoritária dos compostos monossacarídeos e dissacarídeos, foi submetido ao processo de passagem por resina de troca iônica para retirada da cor. O produto passou da cor amarela à incolor conforme procedimento realizado no Item 3.9 e apresentado na Figura 26.



Figura 26 - Obtenção de um produto açucarado sem a presença de cor.

Durante a passagem da solução de permeado de 5 kDa pelo sistema de coluna BV₁ e BV₂, para que não houvesse perdas em relação ao volume da solução foram realizadas leituras com o uso de refratômetro de mão até obter leitura com valor mínimo de 0,3 °Brix indicando o final processo.

4.4.3 Teores de isoflavonas obtidos por separação por membranas

Após a limpeza do extrato aquoso de melão de soja, conforme o item 3.5, o extrato foi submetido ao processo de extração das isoflavonas com utilização dos solventes descritos no item 3.6 e posterior passagem dos respectivos extratos pelo processo de separação por membranas (PSM) com o objetivo de obter extratos com maior límpidez e presença dos compostos de isoflavonas formas glicosídicas e agliconas.

Para manter a estabilidade dos compostos de isoflavonas durante o processo de PSM foi controlado o valor do pH em 5,5 seguindo a faixa recomendada de (3,0 a 9,0) conforme procedimento descrito (TORREZAN e CRISTIANINI, 2005).

O processo de PSM foi iniciado primeiramente com o uso de uma membrana de maior abertura com 0,22 μm para evitar possíveis entupimentos nas membranas de menor abertura (300 e 5 kDa). Desta forma, todos os experimentos conduzidos sobre os extratos mencionados anteriormente foram determinados neste formato. Ao utilizar o processo de PSM com abertura da membrana de 0,22 μm , foram obtidas duas frações diferenciadas: a primeira é composta pelo retido, ou seja, material que não passou pela membrana de 0,22 μm por conter em sua composição maior massa molar em relação à membrana utilizada neste processo. Neste sentido, concluiu-se em não utilizar a presente fração (retido) em processos posteriores. A segunda fração denominada permeado foi conduzida para futuras obtenções (300 e 5 kDa). Assim, optou-se pela realização de análises referentes aos teores de isoflavonas totais para obter o teor presente neste composto, conforme apresentados nas Tabelas 12, 13, 14 e 15.

Na Tabela 12 pode ser observado os teores de isoflavonas totais encontrados para a condição de material retido em membrana de 0,22 μm , valores superiores quando relacionados ao extrato metanólico 80% com valor máximo $101,8 \pm 2,5 \mu\text{g/g}$ seguidos pelos extratos obtidos com etanol 90%.

Tabela 12 - Análise dos teores de isoflavonas presentes no retido de 0,22 μm .

Isoflavonas	Fatores Aplicados		
	Extração água	Extração etanol 90	Extração metanol 80
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
Daidzina	$34,5 \pm 1,1^b$	$28,2 \pm 0,2^c$	$37,2 \pm 1,2^a$
Glicitina	$3,2 \pm 2,1^b$	$2,5 \pm 0,5^c$	$3,8 \pm 1,6^a$
Genistina	$24,3 \pm 0,9^b$	$19,4 \pm 0,4^c$	$28,1 \pm 1,4^a$
*Total Glicosídicas	$62,0 \pm 0,8^b$	$50,1 \pm 0,1^c$	$69,0 \pm 3,7^a$
Daidzeína	$16,9 \pm 3,3^b$	$16,4 \pm 0,8^b$	$21,2 \pm 2,0^a$
Gliciteína	$7,0 \pm 1,2^b$	$6,4 \pm 0,3^c$	$8,0 \pm 1,2^a$
Genisteína	$1,6 \pm 0,9^c$	$3,0 \pm 1,1^b$	$3,5 \pm 0,9^a$
**Total Agliconas	$25,5 \pm 4,1^b$	$25,7 \pm 0,2^b$	$32,7 \pm 4,1^a$
Total isoflavonas	$87,5 \pm 1,0^b$	$75,9 \pm 0,4^c$	$101,8 \pm 2,5^a$

Amostras analisadas em triplicata com desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferença estatística entre si, teste de Tukey ($p < 0,05$). *Tratamento estatístico realizado para compostos glicosídicos; **Tratamento estatístico realizado para compostos agliconas.

A fração permeado obtida durante a passagem em membrana de 0,22 μm contém compostos de isoflavonas quantificados, conforme valores apresentados na Tabela 13. Além da quantificação dos compostos de isoflavonas obtidos pela passagem em membrana de 0,22 μm foi destinado à realização de novos procedimentos de passagem por membranas de menor abertura (300 e 5 kDa).

Os teores de isoflavonas totais presentes nesta fração extraída com solvente metanólico 80%, em que o valor máximo de $94,4 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ foi observado, maiores que os comparados entre as frações obtidas em 300 e 5 kDa.

Tabela 13 - Análise dos teores de isoflavonas presentes no permeado de 0,22 µm.

Isoflavonas	Fatores Aplicados		
	Extração água	Extração etanol 90	Extração metanol 80
	µg/g	µg/g	µg/g
Daidzina	37,8 ± 0,4 ^b	25,9 ± 1,2 ^c	39,4 ± 1,0 ^a
Glicitina	3,6 ± 2,9 ^a	2,1 ± 1,4 ^b	3,6 ± 0,9 ^a
Genistina	25,9 ± 1,0 ^a	14,1 ± 0,5 ^b	25,5 ± 0,9 ^a
*Total Glicosídicas	67,3 ± 0,3^b	42,1 ± 1,1^c	68,5 ± 0,1^a
Daidzeína	17,6 ± 0,2 ^a	9,2 ± 0,3 ^b	17,1 ± 1,3 ^a
Gliciteína	7,2 ± 1,2 ^a	3,6 ± 2,6 ^b	7,4 ± 1,5 ^a
Genisteína	1,6 ± 1,1 ^a	0,5 ± 0,8 ^c	1,4 ± 1,2 ^b
**Total Agliconas	26,4 ± 3,4^a	13,3 ± 1,3^b	25,9 ± 0,5^a
Total isoflavonas	93,7 ± 0,7^b	55,4 ± 1,1^c	94,4 ± 0,1^a

Amostras analisadas em triplicata com desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferença estatística entre si, teste de Tukey (p<0,05). *Tratamento estatístico realizado para compostos glicosídicos; **Tratamento estatístico realizado para compostos agliconas.

Na Tabela 14 são apresentados os teores dos compostos de isoflavonas totais, presentes no permeado obtido pela passagem em membrana de 300 kDa. Assim como no procedimento anterior, 80% do volume do permeado obtido foi destinado à realização de um novo procedimento com passagem pela membrana de menor abertura 5 kDa. Os teores de isoflavonas totais presentes nesta fração extraída com solvente metanólico 80% apresentaram valores máximos de 85,8 ± 0,6 µg/g, valor superior à fração obtida em 5 kDa.

Tabela 14 - Análise dos teores de isoflavonas presentes no permeado de 300 kDa.

Isoflavonas	Fatores Aplicados		
	Extração água	Extração etanol 90	Extração metanol 80
	µg/g	µg/g	µg/g
Daidzina	31,1 ± 1,0 ^b	26,8 ± 1,1 ^c	38,2 ± 0,9 ^a
Glicitina	2,7 ± 0,9 ^b	2,2 ± 0,9 ^c	3,4 ± 0,6 ^a
Genistina	19,0 ± 0,6 ^b	16,6 ± 0,6 ^c	22,8 ± 1,1 ^a
*Total Glicosídicas	52,8 ± 1,7^b	45,6 ± 1,7^c	64,4 ± 1,4^a
Daidzeína	10,7 ± 0,5 ^b	10,4 ± 0,6 ^b	14,5 ± 0,7 ^a
Gliciteína	3,8 ± 0,3 ^c	4,6 ± 0,2 ^b	5,9 ± 1,2 ^a
Genisteína	0,53 ± 0,4 ^c	1,3 ± 0,9 ^a	0,98 ± 1,5 ^b
**Total Agliconas	15,0 ± 0,6^c	16,3 ± 2,3^b	21,4 ± 3,9^a
Total isoflavonas	67,8 ± 1,1^b	61,9 ± 0,5^c	85,8 ± 0,6^a

Amostras analisadas em triplicata com desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferença estatística entre si, teste de Tukey (p<0,05). *Tratamento estatístico realizado para compostos glicosídicos; **Tratamento estatístico realizado para compostos agliconas.

Os teores de isoflavonas totais obtidos na passagem por membranas, fração de 5 kDa apresentaram os menores valores $82,9 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$, em relação às passagens realizadas anteriormente, conforme apresentado na Tabela 15. No entanto, foi observado no fluxo do permeado de 5 kDa um comportamento típico para esse processo, especialmente no envolvimento dos fenômenos de polarização por concentração e *fouling* da membrana, levando a uma redução gradual deste fluxo. Entretanto, observou-se durante as passagens realizadas nas membranas de ultrafiltração a concentração dos teores de isoflavonas totais, quantificados em dois grupos formas glicosídicas e agliconas, possibilitando a certeza de não haver perdas referentes aos teores de isoflavonas com o uso da técnica de ultrafiltração.

Tabela 15 - Análise dos teores de isoflavonas presentes no permeado de 5 kDa.

Isoflavonas	Fatores Aplicados		
	Extração água	Extração etanol 90	Extração metanol 80
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
Daidzina	$32,9 \pm 0,4^b$	$28,2 \pm 0,2^c$	$38,4 \pm 0,2^a$
Glicitina	$2,8 \pm 0,3^b$	$2,3 \pm 0,9^c$	$3,3 \pm 0,3^a$
Genistina	$19,7 \pm 0,9^b$	$16,8 \pm 0,2^c$	$22,9 \pm 0,1^a$
*Total Glicosídicas	$55,4 \pm 0,3^b$	$47,3 \pm 0,1^c$	$64,6 \pm 0,2^a$
Daidzeína	$9,2 \pm 1,4^b$	$8,6 \pm 1,4^c$	$12,3 \pm 0,7^a$
Gliciteína	$3,7 \pm 1,5^b$	$2,8 \pm 0,7^c$	$5,3 \pm 1,6^a$
Genisteína	$0,3 \pm 0,8^c$	$0,4 \pm 0,9^b$	$0,7 \pm 0,3^a$
**Total Agliconas	$13,2 \pm 2,4^b$	$11,8 \pm 1,0^c$	$18,3 \pm 1,4^a$
Total isoflavonas	$68,6 \pm 0,4^b$	$59,1 \pm 0,1^c$	$82,9 \pm 0,2^a$

Amostras analisadas em triplicata com desvio-padrão Letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferença estatística entre si, teste de Tukey ($p < 0,05$). *Tratamento estatístico realizado para compostos glicosídicos; **Tratamento estatístico realizado para compostos agliconas.

4.4.4 Teores de carboidratos totais presentes nas frações obtidas por PSM

O fracionamento do melão de soja aquoso foi realizado conforme o item 3.5.4, com posterior passagem por PSM, começando com a membrana de maior abertura de $0,22 \mu\text{m}$, 300 e 5 kDa. O processo para obtenção dos carboidratos totais iniciou-se com o uso da membrana de $0,22 \mu\text{m}$ e obtenção das frações retido e permeado. A fração permeado da membrana de $0,22 \mu\text{m}$ foi utilizada para obter as demais frações de 300 e 5 kDa. No entanto, os teores de carboidratos totais $39,4 \pm$

0,2 presentes no retido após a passagem da membrana de 0,22 μm foram menores em relação às outras frações aplicadas de menor abertura (300 e 5 kDa).

A fração de 300 kDa apresentou maior valor de carboidratos totais com $104,0 \pm 0,2$ mg/g. Entretanto, o uso da membrana de 5 kDa é necessária para reduzir o número de contaminantes presentes no extrato aquoso de melão de soja, diretamente responsáveis pela redução na atividade enzimática e perdas durante a bioconversão de compostos de interesse comercial, conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16 - Análise dos teores de carboidratos totais presentes nas frações obtidas por ultrafiltração.

Carboidratos	Membranas Utilizadas			
	Retido	Permeado	Permeado	Permeado
	0,22 μm	0,22 μm	300 kDa	5 kDa
	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
Frutose	$2,0 \pm 0,6^c$	$4,7 \pm 0,1^b$	$5,2 \pm 0,3^a$	$5,0 \pm 0,2^a$
Glicose	$1,9 \pm 0,4^d$	$4,3 \pm 0,3^c$	$4,8 \pm 0,4^a$	$4,5 \pm 0,3^b$
Galactose	$1,9 \pm 0,3^d$	$4,3 \pm 0,1^c$	$4,8 \pm 0,3^a$	$4,5 \pm 0,1^b$
Sacarose	$18,7 \pm 0,3^d$	$43,9 \pm 0,3^c$	$51,6 \pm 0,2^a$	$47,2 \pm 0,4^b$
<i>Total</i>	$24,5 \pm 0,1^d$	$52,9 \pm 0,1^c$	$66,4 \pm 0,3^a$	$61,2 \pm 0,3^b$
Rafinose	$3,8 \pm 0,4^d$	$13,6 \pm 0,6^c$	$14,2 \pm 0,4^a$	$12,5 \pm 0,5^b$
Estaquiose	$11,1 \pm 0,3^c$	$17,8 \pm 0,5^b$	$23,4 \pm 0,4^a$	$22,4 \pm 0,3^a$
<i>Total</i>	$14,9 \pm 0,1^d$	$31,4 \pm 0,1^c$	$37,6 \pm 0,1^a$	$34,9 \pm 0,2^b$
Total Carboidratos	$39,4 \pm 0,2^d$	$84,3 \pm 0,3^c$	$104,0 \pm 0,2^a$	$96,1 \pm 0,2^b$

Amostras analisadas em triplicata com desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferença estatística entre si, teste de Tukey ($p < 0,05$). *Tratamento estatístico realizado para compostos monossacarídeos e dissacarídeos; **Tratamento estatístico realizado para os RO.

4.5 DETERMINAÇÃO DA FAIXA ÓTIMA DO pH E TEMPERATURA NO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

A Tabela 17 apresenta os valores das atividades enzimáticas obtidas com a utilização do extrato enzimático, e variáveis analisadas.

Tabela 17 - Planejamento fatorial 2^2 e a influência da combinação entre pH e temperatura em relação a atividade enzimática.

Corridas	Fatores		Resposta
	pH	Temperatura (°C)	Atividades (U)
01	4,4 (-1)	44 (-1)	849,8
02	4,4 (-1)	66 (+1)	1049,4
03	6,6 (+1)	44 (-1)	186,4
04	6,6 (+1)	66 (+1)	56,74
05	3,9 ($-\sqrt{2}$)	55 (0)	1135,1
06	7,0 ($+\sqrt{2}$)	55 (0)	191,0
07	5,5 (0)	39,4 ($-\sqrt{2}$)	448,4
08	5,5 (0)	70,6 ($+\sqrt{2}$)	744,5
09 (C)	5,5 (0)	55 (0)	1307,7
10 (C)	5,5 (0)	55 (0)	1318,6
11 (C)	5,5 (0)	55 (0)	1316,7

Ponto Central (C); Rotatividade ($\alpha = \sqrt{2}$).

As análises de variância (ANOVA) para a atividade enzimática do extrato estão descritas na Tabela 18.

Tabela 18 - Dados da ANOVA atividade enzimática do extrato relativo ao planejamento fatorial 2^2 completo com pontos centrais e rotatividade ($\alpha = \sqrt{2}$).

Parâmetros	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Média dos Quadrados	Valor de F	Valor de P
pH*	1118388	1	1118388	32540,31	0,000031
pH ² *	688507	1	688507	20032,63	0,000050
T*	29857	1	29857	868,70	0,001149
T ² *	826200	1	826200	24038,90	0,000042
pH x T*	27116	1	27116	788,97	0,001265
Falta de ajuste	45835	3	15278	444,54	0,002245
Erro puro	69	2	34		
Total	2393739	10			

*Parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Os valores representados nas análises da ANOVA verificaram-se, dentro dos intervalos de confiança de 95%, e valores ($p < 0,05$) para todas as variáveis independentes estudadas pH e temperatura. O baixo valor de P para o parâmetro, falta de ajuste é um indicativo referente ao modelo quadrático adotado com ajuste significativo dentro dos intervalos de confiança de 95%, e valores ($p > 0,05$). O ajuste do modelo aos dados experimentais também pode ser enfatizado pelo valor do coeficiente de correlação múltipla $R^2 = 98,0\%$ e ajuste $R^2_{adj} = 96,1\%$.

A Figura 27 apresenta a estimativa dos efeitos e a interação com as variáveis independentes no nível de 95% de confiança. A linha vermelha pontilhada à direita representa os efeitos das variáveis analisadas como significativas para pH e

temperatura, outros fatores estudados foram as interações entre o modelo quadrático adotado e as variáveis, todas estatisticamente significativas no nível de 95% de confiança.

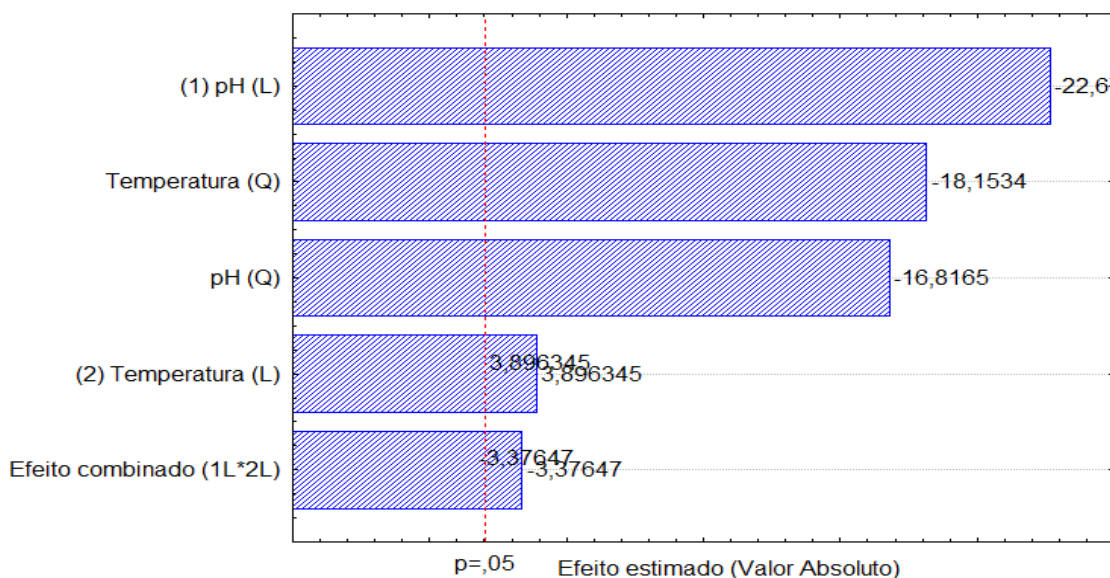


Figura 27 - Gráfico de Pareto e os efeitos das variáveis independentes estudadas no planejamento fatorial 2^2 para a atividade enzimática.

$$\text{Atividade (U)} = 1747 + 3208 \text{ pH} - 288 \text{ pH}^2 + 390 \text{ T} - 3,16\text{T}^2 - 6,8 \text{ pH} * \text{T}$$

A Figura 28 apresenta a superfície de resposta da atividade enzimática total referente ao extrato dentro dos limites de pH e temperatura estudados. Os círculos abertos indicam os dados experimentais. O valor máximo de atividade enzimática no extrato predito pelo software foi 1421,9 U, obtido na combinação de pH próximo a 4,9 e temperatura de 56,5 °C.

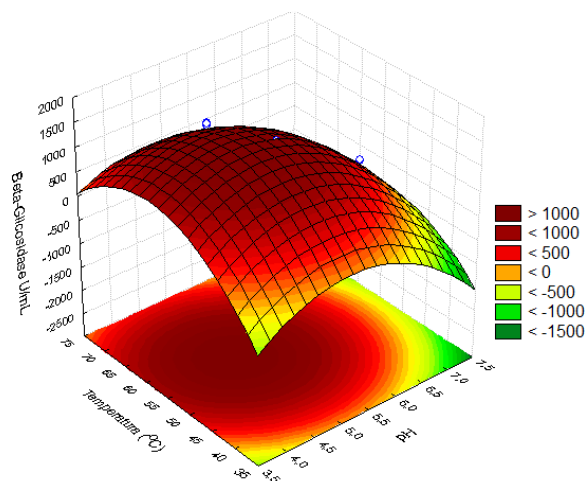


Figura 28 - Superfície de resposta da atividade enzimática do extrato em função do pH e temperatura.

4.6 BIOCONVERSÃO DOS RO A PARTIR DA FRAÇÃO DE 5 kDa

O procedimento de bioconversão dos RO em compostos monossacarídeos e dissacarídeos provindos da fração de 5 kDa, foi definido conforme o item 3.6.2. Desta forma, foi utilizado o planejamento fatorial 2^3 com triplicada dos pontos centrais, avaliação das variáveis independentes agitação, razão de extrato enzimático e tempo na bioconversão dos carboidratos. A Tabela 19 apresenta os valores obtidos durante os experimentos.

Tabela 19 - Bioconversão dos RO obtidos pelo uso da fração de 5 kDa utilizando o planejamento fatorial 2^3 .

Corridas	Fatores			Resposta
	Agitação (rpm)	Razão de extrato enzimático	Tempo (h)	Bioconversão (%)
01	60	0,49	2	13,7
02	120	0,49	2	54,4
03	60	2,03	2	0,00
04	120	2,03	2	47,3
05	60	0,49	8	13,7
06	120	0,49	8	0,89
07	60	2,03	8	0,00
08	120	2,03	8	6,70
09 (C)	90 (0)	0,85 (0)	5 (0)	15,9
10 (C)	90 (0)	0,85 (0)	5 (0)	16,2
11 (C)	90 (0)	0,85 (0)	5 (0)	16,0

Ponto Central (C).

As análises de variância (ANOVA) relacionadas aos valores das bioconversões dos RO em percentual de monossacarídeos e dissacarídeos estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Dados da ANOVA sobre a bioconversão dos RO com o uso do fatorial 2^3 em fração de 5 kDa.

Parâmetros	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Média dos Quadrados	Valor de F	Valor de P
(1) Agitação*	837,632	1	837,632	35898,53	0,000028
(2) ES*	103,968	1	103,968	4455,78	0,000224
(3) Tempo*	1109,676	1	1109,676	47557,54	0,000021
1 x 2*	86,067	1	86,067	3688,59	0,000271
1 x 3*	1109,676	1	1109,676	47557,54	0,000021
2 x 3*	20,866	1	20,866	894,25	0,001116
1*2*3*	20,866	1	20,866		
Erro Puro	0,047	2	0,023		
Total	3291,363	10			

*Parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A análise de bioconversão sobre os RO e transformação em compostos monossacarídeos e dissacarídeos presentes no melaço de soja são representadas pelos resultados da ANOVA, e verificam-se dentro dos intervalos de confiança de 95%, valores ($p < 0,05$) sobre as variáveis estudadas agitação, razão de extrato enzimático e tempo. O ajuste do modelo proposto com relação aos dados experimentais pode ser visualizado pelo valor do coeficiente de correlação múltipla $R^2 = 99,9\%$ e ajuste $R^2_{adj} = 99,9\%$.

Na Figura 29 a linha vermelha pontilhada à direita representa os efeitos das variáveis analisadas dentro dos intervalos de confiança de 95% para (A) agitação (ES) razão extrato enzimático e (t) tempo de reação, com obtenção da mesma significância estatística na interação das variáveis propostas.

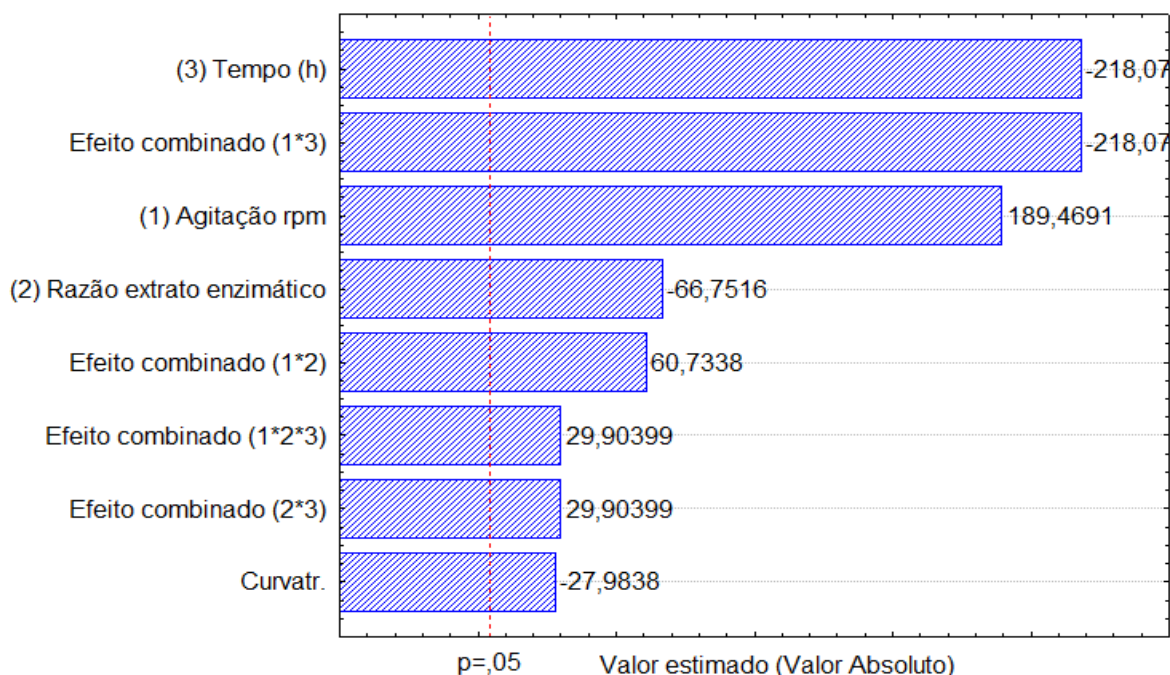


Figura 29 - Gráfico de Pareto e os efeitos das variáveis independentes estudadas no planejamento fatorial 2^3 na fração de 5 kDa.

A equação (5) gerada pelo planejamento fatorial é:

$$\text{Carboidratos (\%)} = -35,0871 - 0,3875 \cdot \text{ES} + 0,9521 \cdot \text{AG} + 10,2224 \cdot t + 0,0094 \cdot \text{AG} \cdot \text{ES} - 0,1703 \cdot \text{AG} \cdot t - 0,0517 \cdot \text{ES} \cdot t + 0,00086 \cdot \text{AG} \cdot \text{ES} \cdot t \quad (5)$$

Onde: ES = razão de extrato enzimático; AG = Agitação (rpm) t = Relação tempo (h).

A enzima α -Gal presente no extrato enzimático foi utilizada para hidrolisar os RO presentes no melaço de soja obtendo um efeito positivo para esse tratamento ao formar compostos de interesse: frutose, glicose, galactose e sacarose. O melhor valor de bioconversão foi obtido na condição com 120 rpm e menor quantidade de razão de extrato enzimático com 0,49 e tempo de 2 h gerando valor de bioconversão de 54,4%. No entanto, a formação dos compostos de galactose e sacarose, carboidratos hidrolizados e facilmente absorvidos pelo nosso organismo, é foco de estudos sobre os alimentos que possuem altas taxas de carboidratos em sua composição para serem hidrolizados e absorvidos (GUIMARÃES et al., 2001). Neste sentido, o melaço de soja, por ser um produto de baixo valor comercial e conter altos

teores de carboidratos, é vislumbrado como um excelente substituto de carboidratos provindos de outros processos industriais.

A Figura 30 apresenta os valores de carboidratos totais sem o uso da bioconversão. É observada neste caso a presença de compostos majoritários como sacarose e RO, bem como a presença dos compostos minoritários frutose, glicose e galactose.

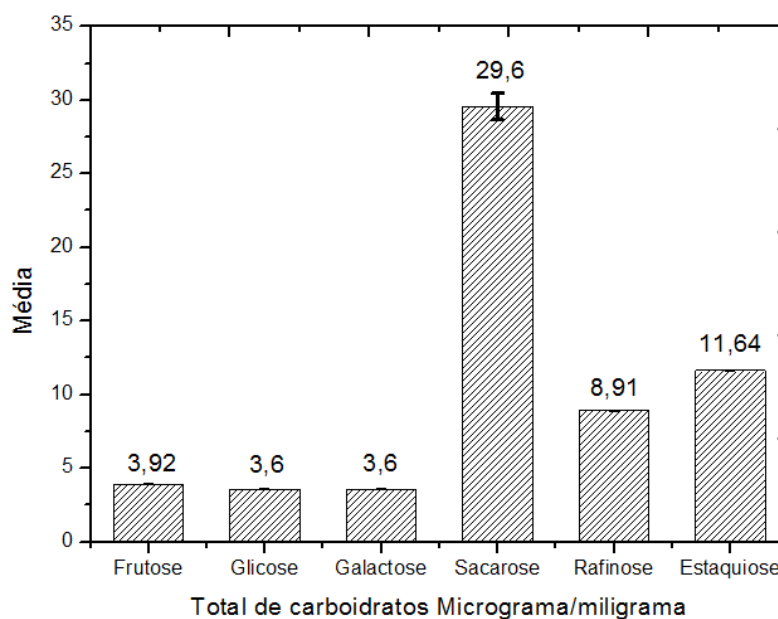


Figura 30 - Teores de carboidratos totais em $\mu\text{g}/\text{mg}$ sem o processo de bioconversão fração de 5 kDa.

Após o processo de bioconversão enzimática, utilizando o planejamento experimental 2^3 variáveis (agitação, razão extrato enzimático e tempo) a Figura 31 apresenta a inversão dos teores referentes aos compostos frutose, glicose e galactose, com aumento significativo de 72,7, 72,5 e 72,5% ocorrido pela ação da clivagem realizada nas ligações α -1,6 e β -1,2 com redução de 67,2% do composto sacarose e aumento significativo para os compostos lactose e melibiose. Entretanto, observou-se a redução dos compostos RO causadores de flatulência de grande interesse comercial para 75,2 e 70,0% respectivamente.

Os processos de bioconversão dos compostos RO são de grande importância para as indústrias alimentícias especialmente por não ocorrer a clivagem destes compostos durante a aplicação de tratamentos com calor. Neste sentido, estudos realizados por Said e Pietro, (2004) e Mulimani et al. (1997) reportaram o uso de

farinha de soja com a aplicação da enzima α -galactosidase na forma de extrato enzimático reduzindo o conteúdo dos compostos RO em até 90,4% e 91,9%. Entretanto, a redução dos compostos RO presentes no melaço de soja foram estudadas por Viana et al. (2006) com reações enzimáticas de 4 h utilizando a enzima α -galactosidase provinda do *Debaryomyces hansenii* UFV1 obtendo redução dos compostos RO em 100% e 50%.

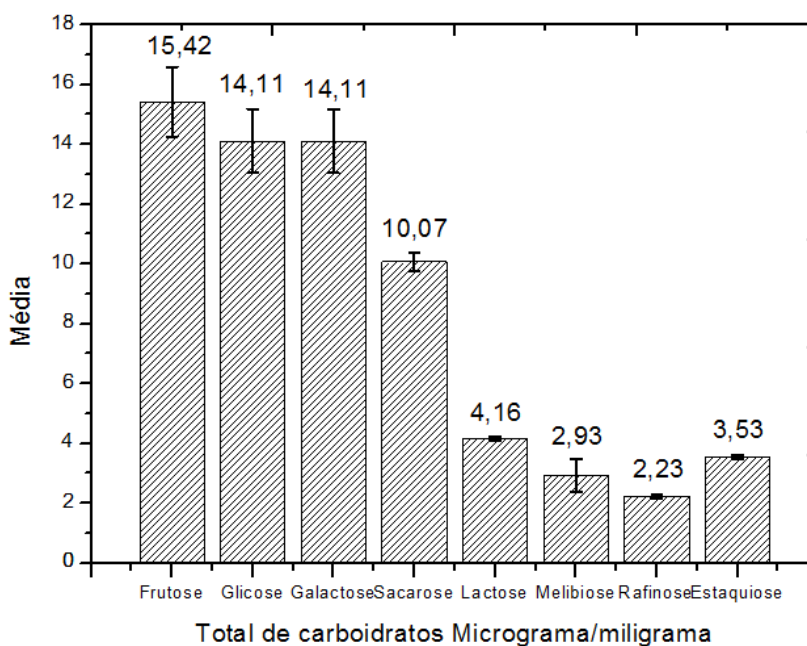
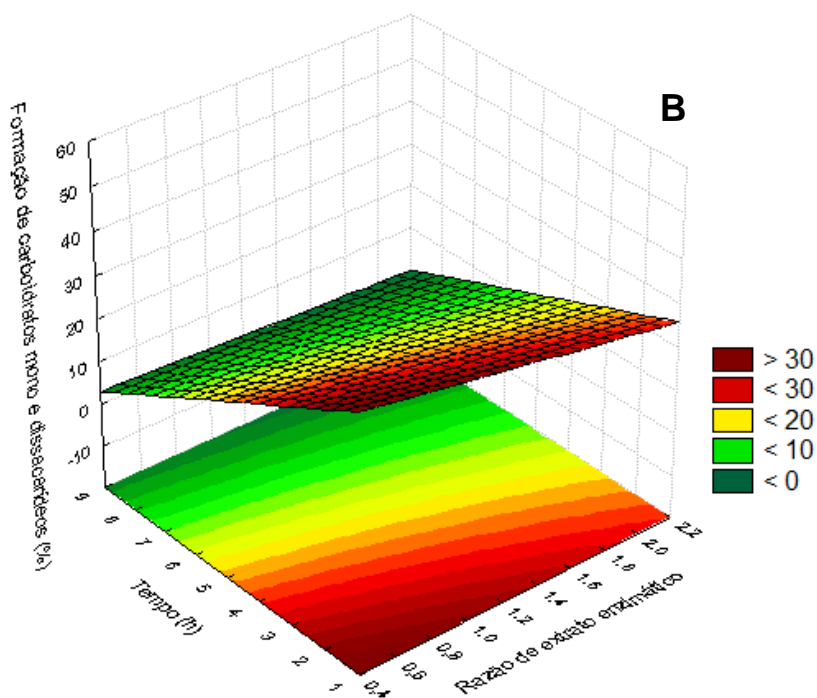
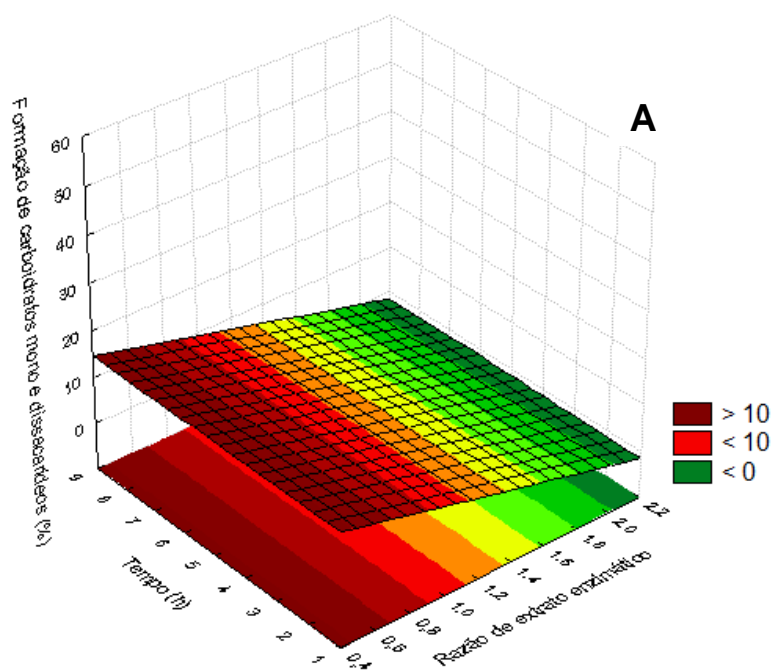


Figura 31 - Teores de carboidratos totais em $\mu\text{g}/\text{mg}$ bioconvertidos fração 5 de kDa.

O fator agitação foi predominante nas condições voltadas à bioconversão dos RO em compostos monossacarídeos e dissacarídeos, conforme valores obtidos pela superfície de resposta apresentada pela Figura 32 letra A, B e C. Na condição inicial (letra A) com agitação de 60 rpm são observados os melhores valores de bioconversão na razão extrato enzimático com 0,49 e intervalo de tempo de 8 h.

Ao estudar a condição de agitação com 90 rpm (ponto central) letra B, é observado valor da razão extrato enzimático com 0,49 e tempo de 2 h para obtenção dos melhores resultados de bioconversão. Essa condição de aumento da bioconversão é explicada pela interação enzima substrato ocorrida pela velocidade de agitação, influenciando de forma significativa os resultados obtidos. Entretanto, ao ser analisada, a variável agitação a 90 rpm após 4 h de bioconversão deixa de ser significativa, ocorrendo perdas de bioconversão.

Na superfície de resposta representada pela letra C, a razão extrato enzimático com 2,03 foi pouco influenciada pelos valores de bioconversão. Ou seja, a concentração da razão extrato enzimático poderia ter concentração de 0,49 e os resultados da bioconversão seriam superiores aos valores obtidos. Já para a variável agitação a 120 rpm foi significativa até as primeiras 4 h, conforme observado na letra B e após esse intervalo ocorre a perda de bioconversão.



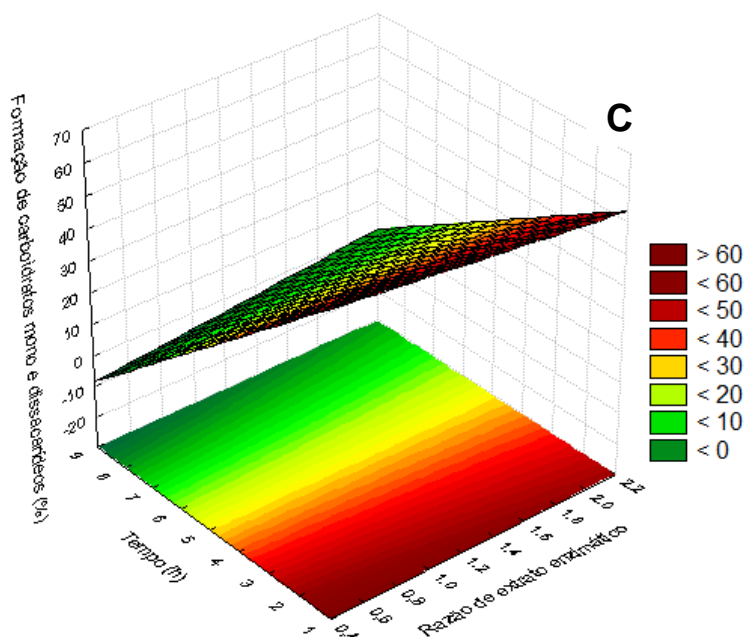


Figura 32 - Gráficos das superfícies de respostas gerados a partir da fração obtida do permeado 5 kDa, em função do tempo e razão de extrato enzimático: (A) 60 rpm, (B) 90 rpm e (C) 120 rpm.

4.7 BIOCONVERSÃO DOS COMPOSTOS DE ISOFLAVONAS

4.7.1 Bioconversão dos extratos obtidos com o uso do solvente metanol 80%

O procedimento de bioconversão dos extratos de melão de soja obtidos com o uso dos solventes metanol 80%, etanol 90% e água sobre os compostos de isoflavonas formas glicosídicas em agliconas, foi definido conforme o item 3.6.2. Desta forma, foi utilizado o planejamento fatorial 2^3 com triplicada dos pontos centrais, e avaliação das variáveis independentes agitação, razão de extrato enzimático e tempo na bioconversão dos compostos de isoflavonas. A Tabela 21 apresenta os valores obtidos durante os experimentos.

Tabela 21 - Bioconversão dos compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente metanol 80% utilizando o planejamento fatorial 2^3 .

Corridas	Fatores			Resposta
	Agitação (rpm)	Razão de extrato enzimático bruto	Tempo (h)	Bioconversão (%)
01	60	0,125	2	60,6
02	120	0,125	2	39,5
03	60	0,748	2	99,9
04	120	0,748	2	79,0
05	60	0,125	8	110,4
06	120	0,125	8	85,4
07	60	0,748	8	145,3
08	120	0,748	8	76,7
09 (C)	90 (0)	0,368 (0)	5 (0)	89,1
10 (C)	90 (0)	0,368 (0)	5 (0)	86,9
11 (C)	90 (0)	0,368 (0)	5 (0)	88,2

Ponto Central (C).

As análises de variância (ANOVA) relacionadas aos valores de bioconversão dos compostos de isoflavonas glicosídicas em agliconas estão apresentadas na Tabela 22.

Tabela 22 - Dados da ANOVA sobre os compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente metanol 80% utilizando o planejamento fatorial 2^3 .

Parâmetros	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Média dos Quadrados	Valor de F	Valor de P
(1) Agitação*	2295,709	1	2295,709	1876,601	0,000532
(2) ES *	1376,550	1	1376,550	1125,246	0,000888
(3) Tempo*	2408,180	1	2408,180	1968,540	0,000508
1 x 2*	235,011	1	235,011	192,107	0,005165
1 x 3*	331,531	1	331,531	271,006	0,003670
2 x 3*	346,371	1	346,371	283,137	0,003513
1*2*3*	238,711	1	238,711		
Erro Puro	2,447	2	1,223		
Total	7236,294	10			

*Parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A análise de bioconversão sobre os compostos de isoflavonas glicosídicas em agliconas presentes no melaço de soja é representada pelos resultados da ANOVA, verificando-se dentro dos intervalos de confiança de 95%, e valores ($p < 0,05$) sobre as variáveis estudadas agitação, razão de extrato enzimático e tempo. O ajuste do modelo proposto, com relação aos dados experimentais pode ser

visualizado pelo valor do coeficiente de correlação múltipla $R^2 = 99,9\%$ e ajuste $R^2_{adj} = 99,8\%$.

Na Figura 33 a linha vermelha pontilhada à direita representa os efeitos das variáveis analisadas como significativas no nível de 95% de confiança para (A) agitação (ES) razão extrato enzimático e (t) tempo de reação, com obtenção da mesma significância estatística na interação das variáveis propostas.

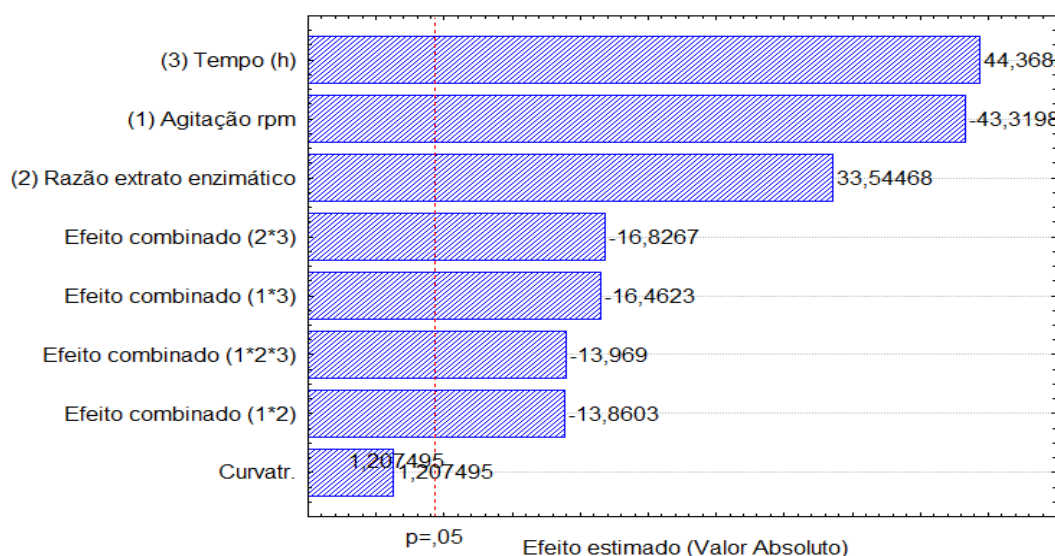


Figura 33 - Gráfico de Pareto e os efeitos das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^3 no extrato obtido em solvente metanol 80%.

A equação (6) gerada pelo planejamento fatorial é:

$$\text{Bioconversão (\%)} = 54,7020 + 0,8224 \cdot \text{ES} - 0,415 \cdot \text{AG} + 6,6594 \cdot t + 0,0077 \cdot \text{AG} \cdot \text{ES} + 0,0317 \cdot \text{AG} \cdot t + 0,2063 \cdot \text{ES} \cdot t - 0,0038 \cdot \text{AG} \cdot \text{ES} \cdot t \quad (6)$$

Onde: ES = razão de extrato enzimático; AG = Agitação (rpm) t = Relação tempo (h).

Da Silva (2009), ao estudar a influência das condições de fermentação sobre as porcentagens de isoflavonas glicosídicas e formação de agliconas, obteve valores superiores a 77% na formação de compostos agliconas durante a incubação de 36 h. Entretanto, para valores de bioconversão dos compostos agliconas propostos para este estudo foram obtidas oscilações de valores entre 39,5% na condição de 120 rpm e 60,6% para a condição 60 rpm com razão de extrato enzimático de 0,125 em 2 h, e com o uso da condição 120 e 60 rpm na razão de extrato enzimático com

0,748 em 8 h o rendimento passou a ser 79,0 e 145,3%. A Figura 34 apresenta os valores obtidos antes e depois da bioconversão dos compostos de isoflavonas. Os cromatogramas estão apresentados nos Apêndices (D) – (G).

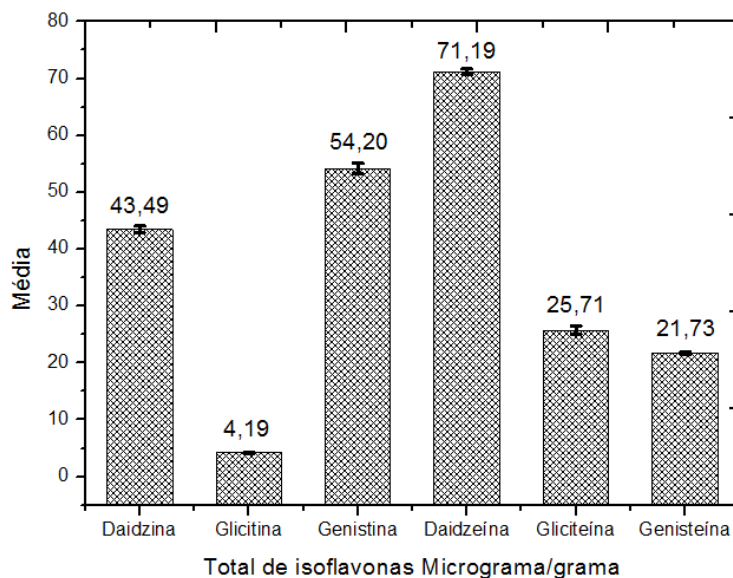


Figura 34 - Teores de isoflavonas totais em µg/g sem o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente metanol 80%.

A bioconversão dos compostos glicosídicos em agliconas ocorre especialmente pela ação da enzima β -Gli, responsável pela quebra da ligação da molécula de glicose ligada a estrutura das isoflavonas glicosídicas transformadas em agliconas (SETCHELL et al., 2002). A maior parte dos trabalhos voltados à bioconversão dos compostos de isoflavonas ocorre durante a FES, com inoculação microbiana por um período médio de 48 a 96 h em temperatura controlada (AGUIAR et al., 2003; COWARD et al., 1993; CHIOU e CHENG, 2001; MATSUURA et al., 1989).

Os valores percentuais de bioconversão com relação à redução dos compostos glicosídicos formas daidzina, glicitina e genistina, chegaram a 76,0, 32,9 e 62,0%. No entanto, o aumento dos valores percentuais para os compostos glicosídicos daidzeína, gliciteína e genisteína chegaram a 46,7, 31,2 e 55,3% conforme apresentado na Figura 35.

O rendimento de bioconversão é explicado por Faber (2004) ao descrever a influência dos fatores relacionados a solubilidade do substrato, atividade enzimática,

complexidade da extração dos compostos, controles como temperatura, pH, agitação entre outros fatores.

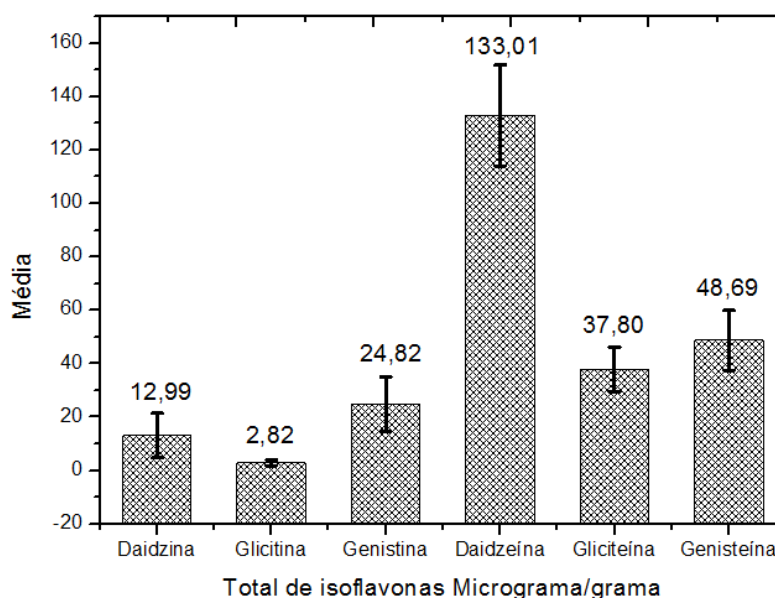
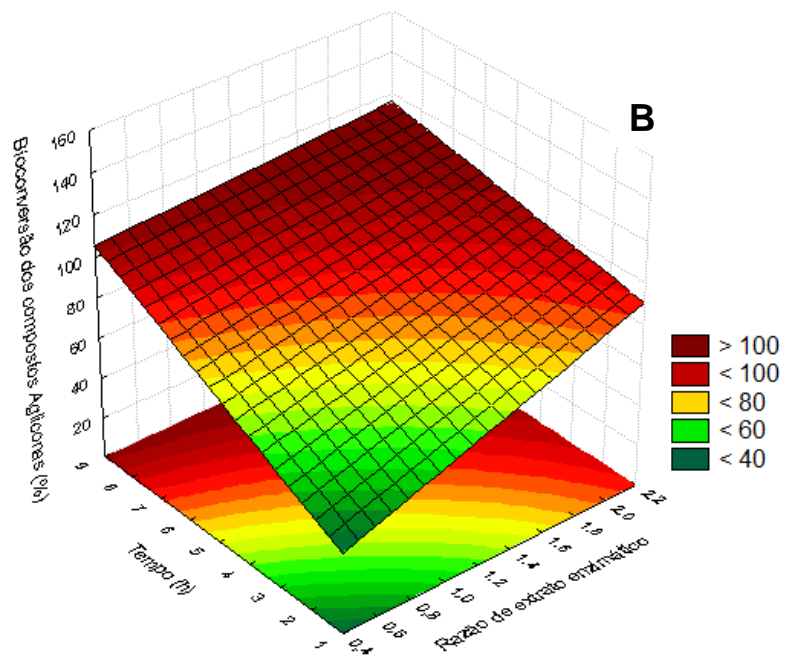
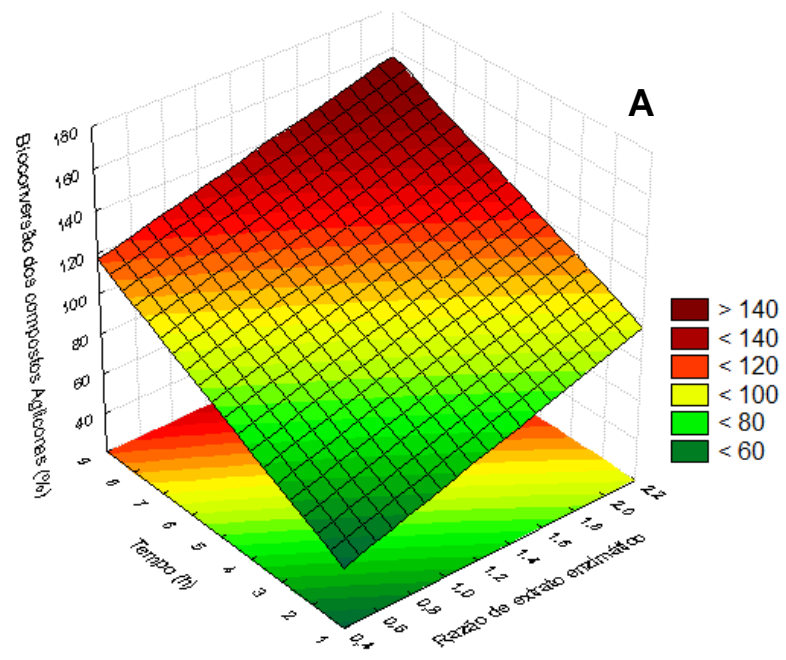


Figura 35 - Teores de isoflavonas totais em µg/g com o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente metanol 80%.

Os valores das bioconversões dos compostos de isoflavonas em agliconas e os efeitos das variáveis aplicadas são comentados pelos gráficos obtidos no estudo das superfícies de respostas apresentadas na Figura 36 letras A, B e C.

A bioconversão obtida com o uso do solvente metanol 80% letra A teve seu resultado de bioconversão máximo influenciado positivamente pela razão extrato enzimático com 0,748, tempo de reação enzimática de 8 h e valor de agitação de 60 rpm. Entretanto, para a condição com 90 rpm (ponto central) letra B, foi observado um aumento do potencial de bioconversão a partir do intervalo de tempo de 6 a 8 h de reação com a razão extrato enzimático na concentração máxima 0,748, porém, foram observados valores de bioconversão menores, ao serem comparados aos resultados obtidos na primeira condição letra A.

Ao estudar a condição de agitação 120 rpm letra C, o valor da bioconversão diminui quando comparado às outras condições de agitação estudadas 60 e 90 rpm. A redução da bioconversão é um fenômeno explicado pelo excesso de agitação, comprometendo a interação da atividade enzimática com o substrato.



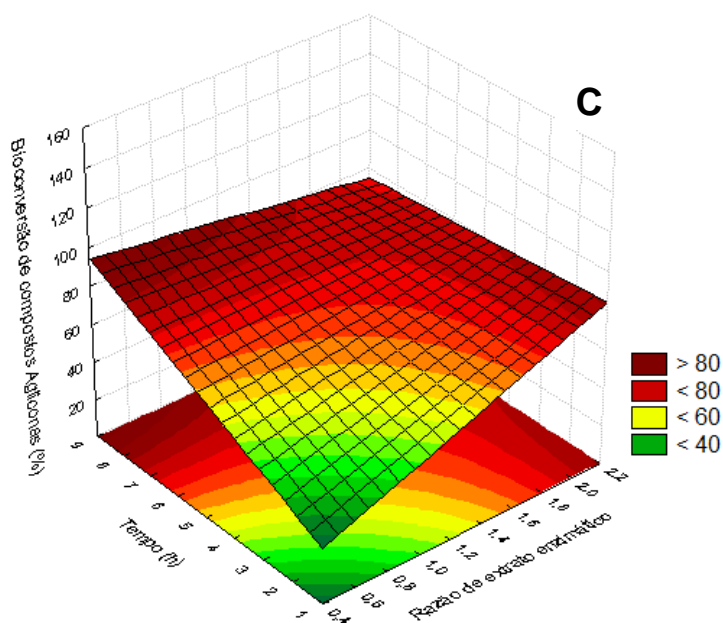


Figura 36 - Gráficos das superfícies de respostas gerados a partir do extrato obtido do solvente metanol 80%, em função do tempo e razão de extrato enzimático: (A) 60 rpm, (B) 90 rpm e (C) 120 rpm.

4.7.2 Bioconversão dos extratos obtidos com o uso do solvente etanol 90%

O procedimento de bioconversão dos extratos de melação de soja obtidos com o uso do solvente etanol 90%, sobre os compostos de isoflavonas formas glicosídicas em agliconas, foi definido conforme o item 3.6.2.

A Tabela 23 apresenta os valores em porcentagem da bioconversão dos compostos de isoflavonas.

Tabela 23 - Bioconversão dos compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente etanol 90% utilizando o planejamento fatorial 2^3 .

Corridas	Fatores			Resposta
	Agitação (rpm)	Razão de extrato enzimático bruto	Tempo (h)	Bioconversão (%)
01	60	0,125	2	91,0
02	120	0,125	2	80,6
03	60	0,748	2	15,6
04	120	0,748	2	128,7
05	60	0,125	8	131,5
06	120	0,125	8	108,6
07	60	0,748	8	115,8
08	120	0,748	8	96,3
09 (C)	90 (0)	0,368 (0)	5 (0)	110,3
10 (C)	90 (0)	0,368 (0)	5 (0)	108,6
11 (C)	90 (0)	0,368 (0)	5 (0)	104,2

Ponto Central (C).

As análises de variância (ANOVA) relacionadas aos valores de bioconversão dos compostos de isoflavonas glicosídicas em agliconas estão apresentadas na Tabela 24.

Tabela 24 - Dados da ANOVA sobre os compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente etanol 90% utilizando o planejamento fatorial 2^3 .

Parâmetros	Coef. Regressão	Erro Padrão	Soma dos Quadrados	G.L	Média dos Quadrados	Valor F	Valor P
(1) Agitação	- 0,3589	0,1171	110,410	1	110,410	11,1413	0,079235
(2) ES	- 0,5941	0,3554	151,380	1	151,380	15,2755	0,059665
(3) Tempo*	8,8339	1,9062	267,267	1	267,267	26,9694	0,035136
1 x 2	0,0229	0,0037	170,570	1	170,570	17,2120	0,053481
1 x 3*	- 0,0053	0,0200	378,400	1	378,400	38,1837	0,025203
2 x 3*	- 0,0011	0,0609	1027,404	1	1027,404	103,6735	0,009508
1*2*3	- 0,0026	0,0006	113,101	1	113,101	11,4128	0,077564
Erro Puro			19,820	2	0,336		
Total			2238,68	10			

*Parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

As análises de bioconversão sobre os compostos de isoflavonas glicosídicas em agliconas presentes no melão de soja, utilizando o extrato obtido do solvente etanol 90% são representadas pelos resultados da ANOVA. Foi observado a falta de ajuste em relação aos intervalos de confiança de 95% e valores ($p < 0,05$) para as

variáveis independentes agitação, razão de extrato enzimático e interações: agitação versus razão de extrato enzimático e a relação entre as três variáveis citadas. O ajuste do modelo proposto em relação aos dados experimentais pode ser visualizado pelo valor do coeficiente de correlação múltipla $R^2 = 99,1\%$ e ajuste $R^2_{adj} = 95,5$.

A equação (7) gerada pelo planejamento fatorial é:

$$\text{Bioconversão (\%)} = 90,4481 - 0,5941 * \text{ES} - 0,36 * \text{AG} + 8,833 * t + 0,023 * \text{AG} * \text{ES} - 0,0053 * \text{AG} * t - 0,0011 * \text{ES} * t - 0,0026 * \text{AG} * \text{ES} * t \quad (7)$$

Onde: ES = razão de extrato enzimático; AG = Agitação (rpm) t = Relação tempo (h).

Desta forma, optou-se por realizar um modelo otimizado sobre as variáveis significativas obtidas pelos dados da ANOVA. O modelo descrito apresenta variância de 83,3% e $R^2 = 95,5$ conforme equação (12).

$$\text{Bioconversão (\%)} = A_0 + A_1 * t + A_2 * \text{AG} * \text{ES} + A_3 * \text{AG} * \text{ES} * t \quad (8)$$

Modelo otimizado relacionado aos valores de bioconversão dos compostos de isoflavonas glicosídicas em agliconas estão apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25 - Modelo otimizado para o extrato obtido pelo solvente etanol 90%.

Parâmetros	Estimativa	Erro Padrão	P
Bioconversão	60,66399	8,622910	0,000205
Tempo	8,45182	1,496816	0,000777
AG x ES	0,01530	0,002942	0,001253
AG x ES x t	- 0,00269	0,000505	0,001087

O modelo otimizado fez os ajustes sobre as variáveis que antes não estavam ajustadas ao modelo da ANOVA. Esse ajuste é voltado entre as interações com a agitação versus razão extrato enzimático e a relação entre as três variáveis citadas, com significância estatística dentro dos intervalos de confiança de 95%. Desta forma, os valores de isoflavonas totais extraídas com o uso do solvente etanol

90% são apresentadas pela Figura 37. Os cromatogramas estão apresentados nos Apêndices (D) – (G).

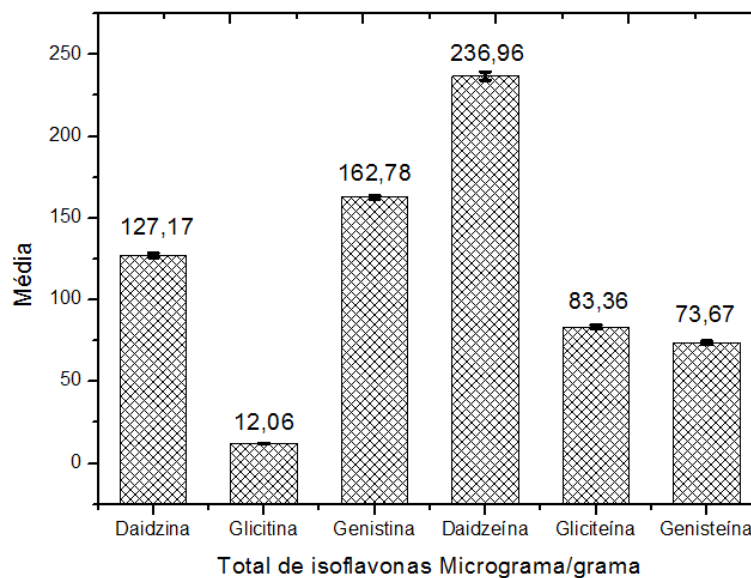


Figura 37 - Teores de isoflavonas totais em µg/g sem o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente etanol 90%.

Na literatura não é comum a descrição de um procedimento voltado à extração de isoflavonas totais com o uso do etanol 90%. Portanto, ao estudar três solventes foram obtidos diferentes valores de isoflavonas totais com maior concentração para o etanol 90%, superior aos demais solventes utilizados metanol 80% e água. Pereira et al. (2002) estudaram o uso de solventes para extração de isoflavonas considerados tradicionais, como metanol 80% e acetonitrila em meio ácido, e ao relacionarem o etanol 90% como solvente, observaram sua eficiência em comparação ao teor de isoflavonas totais obtidas. Esse aumento dos valores de isoflavonas em etanol 90% se deve pela eliminação de grande parte dos contaminantes, incluindo os carboidratos presentes no melaço de soja.

A porcentagem de bioconversão sobre as formas glicosídicas daidzina, glicitina e genistina chegou à redução de 95,8, 55,0 e 83,7% com aumento representativo de 50,0, 43,0 e 62,2% para as formas agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína, conforme apresentado na Figura 38. Os valores percentuais obtidos para esses experimentos foram considerados acima do esperado com o uso solvente etanol 90%, em relação ao solvente metanol 80%, que é o solvente mais

indicado na extração de isoflavonas com posterior quantificação (BARNES et al., 1994; MANTOVANI et al., 2009; PARK et al., 2001).

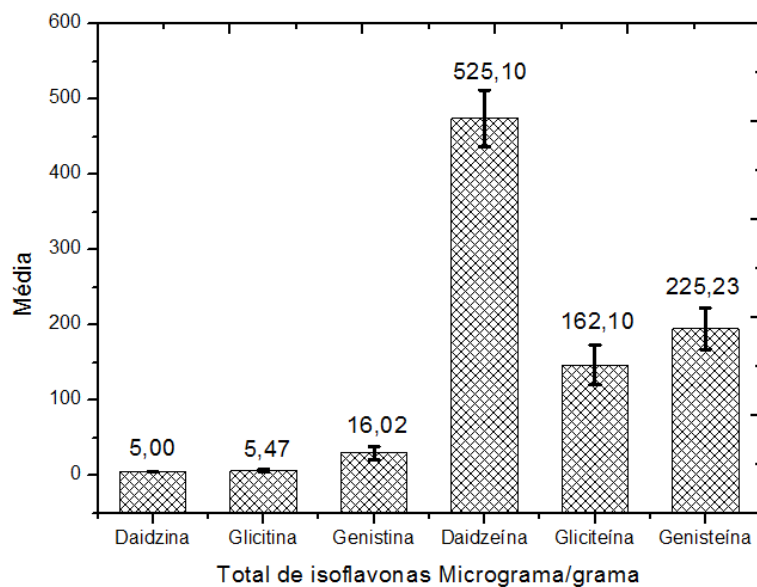
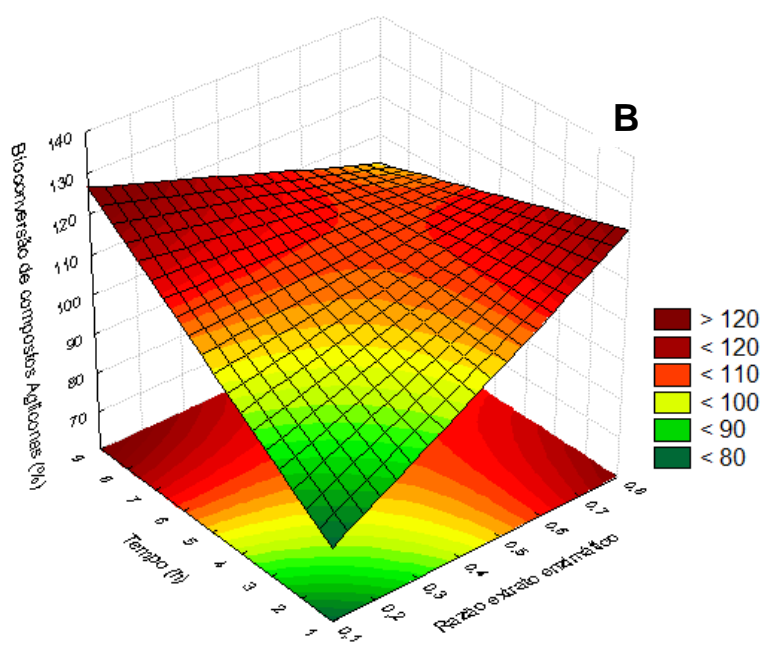
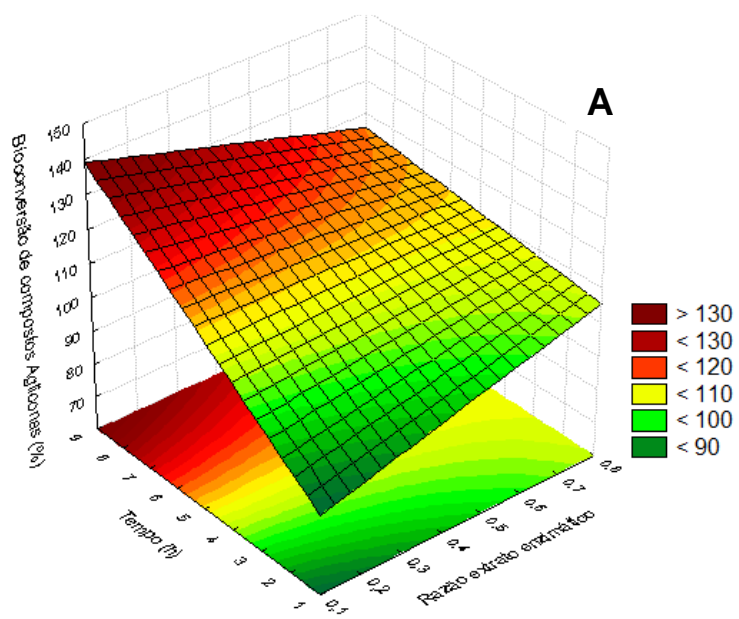


Figura 38 - Teores de isoflavonas totais em µg/g com o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente etanol 90%.

Os valores da bioconversão com o uso do solvente etanol 90% Figura 39 letra A resultaram na máxima bioconversão, com 0,125 da razão extrato enzimático relacionada ao tempo de reação para obtenção de resultados significativos iniciado em 6 h e valor máximo em 8 h na condição de agitação em 60 rpm. Ao estudar a superfície de resposta letra B, é observado um novo efeito relacionado à bioconversão, com maiores valores de bioconversão obtidos com a agitação 90 rpm (ponto central) influenciando significativamente o tempo de reação enzimática na faixa entre 7 e 8 h para obtenção de melhores resultados. No entanto, ao estudar a condição conforme apresentado pela letra C é observado a forte influência da agitação a 120 rpm, pois os valores formados durante a bioconversão ocorreram em menor tempo de reação enzimática na faixa entre 1 à 2 h e valor da razão extrato enzimático com 0,748. Desta forma, podemos concluir ainda que o valor da razão extrato enzimático com 0,125 é capaz de obter bons resultados de bioconversão, mas com valor de tempo de reação estendido para 8 h.



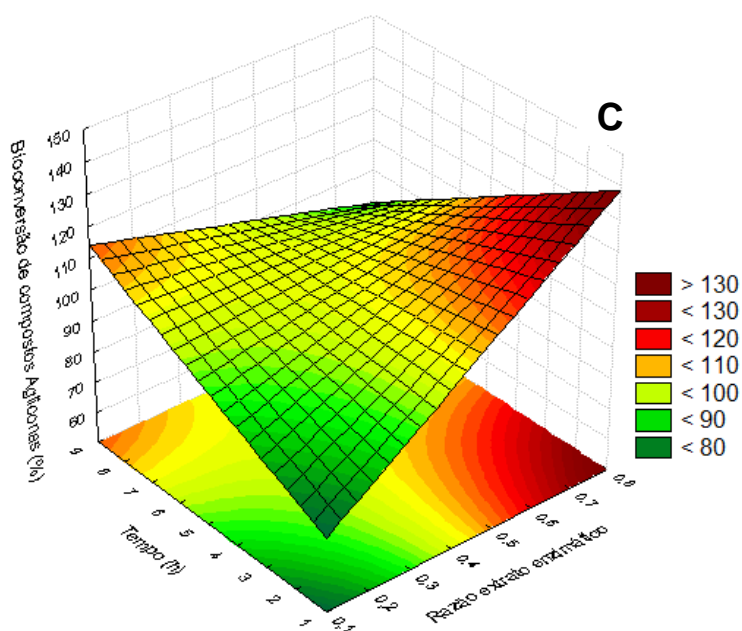


Figura 39 - Gráficos das superfícies de respostas gerados a partir do extrato obtido do solvente etanol 90%, em função do tempo e razão de extrato enzimático: (A) 60 rpm, (B) 90 rpm e (C) 120 rpm.

4.7.3 Bioconversão dos extratos obtidos com o uso do solvente água

O procedimento de bioconversão dos extratos de melão de soja obtidos com o uso do solvente água sobre os compostos de isoflavonas formas glicosídicas em agliconas foi definido conforme o item 3.6.2.

A Tabela 26 apresenta os valores em porcentagem da bioconversão dos compostos de isoflavonas.

Tabela 26 - Bioconversão dos compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente água utilizando o planejamento fatorial 2^3 .

Corridas	Fatores			Resposta
	Agitação (rpm)	Razão de extrato enzimático	Tempo (h)	Bioconversão (%)
01	60	0,125	2	9,34
02	120	0,125	2	10,93
03	60	0,748	2	0,00
04	120	0,748	2	33,03
05	60	0,125	8	48,83
06	120	0,125	8	5,24
07	60	0,748	8	79,15
08	120	0,748	8	88,46
09 (C)	90 (0)	0,368 (0)	5 (0)	34,70
10 (C)	90 (0)	0,368 (0)	5 (0)	36,30
11 (C)	90 (0)	0,368 (0)	5 (0)	35,10

Ponto Central (C).

As análises de variância (ANOVA) relacionadas aos valores de bioconversão dos compostos de isoflavonas glicosídicas em agliconas estão apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27 - Dados da ANOVA sobre os compostos de isoflavonas obtidas pelo solvente água utilizando o planejamento fatorial 2^3 .

Parâmetros	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Média dos Quadrados	Valor de <i>F</i>	Valor de <i>P</i>
(1) Agitação	0,014	1	0,014	0,021	0,898446
(2) ES*	1993,961	1	1993,961	2875,906	0,000348
(3) Tempo*	3543,978	1	3543,978	5111,507	0,000196
1 x 2*	889,154	1	889,154	1282,434	0,000779
1 x 3*	593,401	1	593,401	855,867	0,001166
2 x 3*	1269,576	1	1269,576	1831,119	0,000546
1*2*3*	57,566	1	57,566	83,029	0,011831
Erro Puro	1,387	2	0,693		
Total	8351,195	10			

*Parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Para a análise de bioconversão sobre os compostos de isoflavonas glicosídicas em agliconas presentes no melaço de soja, utilizando o extrato obtido do solvente água são representadas pelos resultados da ANOVA. Para este procedimento foi observada a falta de ajuste em relação aos intervalos de confiança de 95% e valores ($p < 0,05$) para a variável independente agitação. O ajuste do

modelo proposto, em relação aos dados experimentais, pode ser visualizado pelo valor do coeficiente de correlação múltipla $R^2 = 99,9\%$ e ajuste $R^2_{adj} = 99,9\%$.

Na Figura 40 a linha vermelha pontilhada à direita representa os efeitos das variáveis analisadas como significativas no nível de 95% de confiança para (ES) razão extrato enzimático e (t) tempo de reação, com obtenção da mesma significância estatística na interação das variáveis propostas.

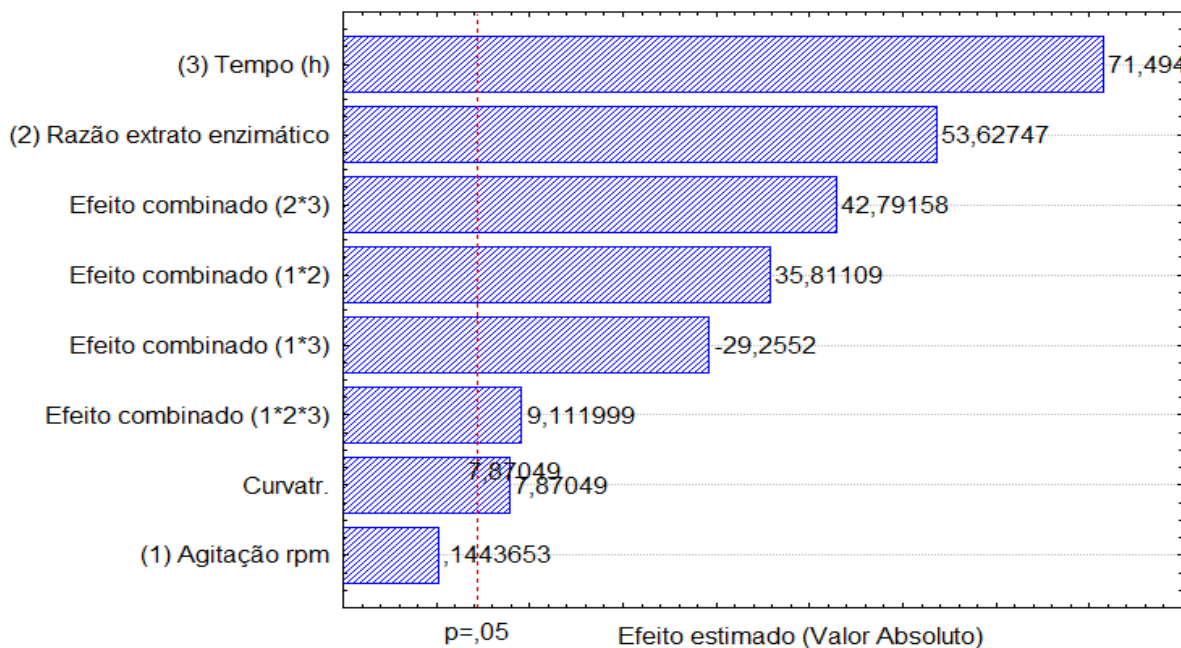


Figura 40 - Gráfico de Pareto e os efeitos das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^3 no extrato obtido em solvente água.

A equação (9) gerada pelo planejamento fatorial é:

$$\text{Bioconversão (\%)} = - 4,0496 - 1,4782^* \text{ ES} + 13,0482^* \text{ t} + 0,1355^* \text{ AG} + 0,0127^* \text{ AG}^* \text{ ES} - 0,1463^* \text{ AG}^* \text{ t} + 0,09571^* \text{ ES}^* \text{ t} + 0,0018^* \text{ AG}^* \text{ ES}^* \text{ t} \quad (9)$$

Onde: ES = razão de extrato enzimático; AG = Agitação (rpm) t = Relação tempo (h).

O uso da água como solvente extrator sobre os compostos de isoflavonas não é relatado na literatura. Entretanto, o estudo proposto objetivou sua utilização para realizar testes de confronto com os resultados obtidos para os solventes já utilizados por outras pesquisas como metanol 80% e etanol 90%. É observado de forma clara que os teores de isoflavonas extraídos do melado de soja por água são bem inferiores, essa característica é definida pela grande presença de carboidratos

solúveis em água que migraram juntamente com a isoflavonas, formando um extrato com 18 °Brix e valores de isoflavonas extraídos sem bioconversão apresentados na Figura 41. Os cromatogramas estão apresentados nos Apêndices (D) – (G).

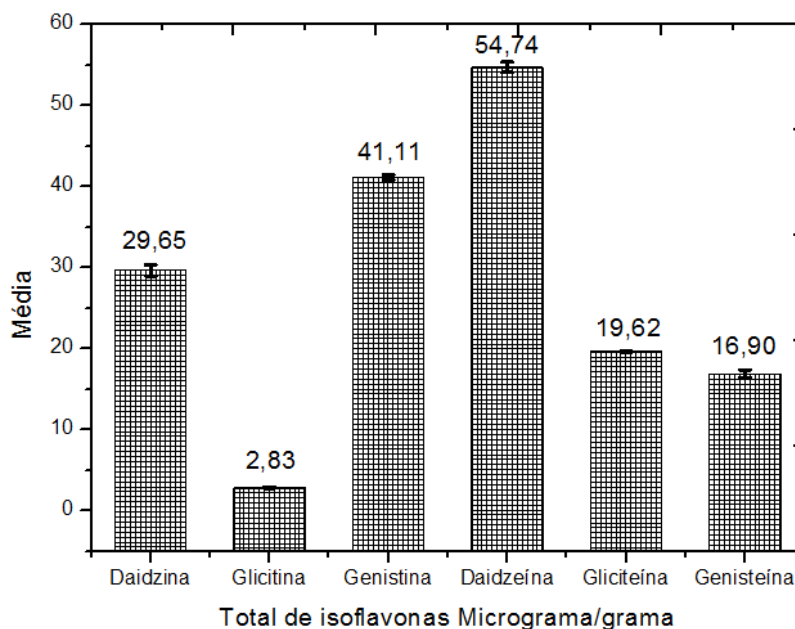


Figura 41 - Teores de isoflavonas totais em µg/g sem o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente água.

Os valores de bioconversão sobre os compostos glicosídicos formas daidzina, glicitina e genistina, chegaram à redução de 4,3, 0,0 e 0,0%. Entretanto, os valores bioconvertidos para as formas agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína foram de 28,2, 10,7 e 29,8 conforme apresentado na Figura 42. Os valores obtidos para esse experimento demonstram a falta de interação do extrato de isoflavonas obtido com o uso do solvente água no processo de bioconversão.

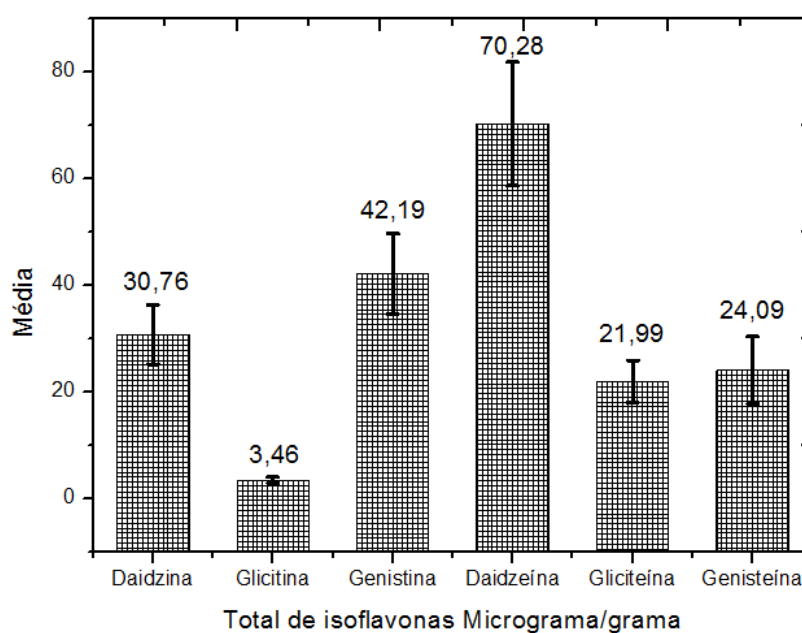
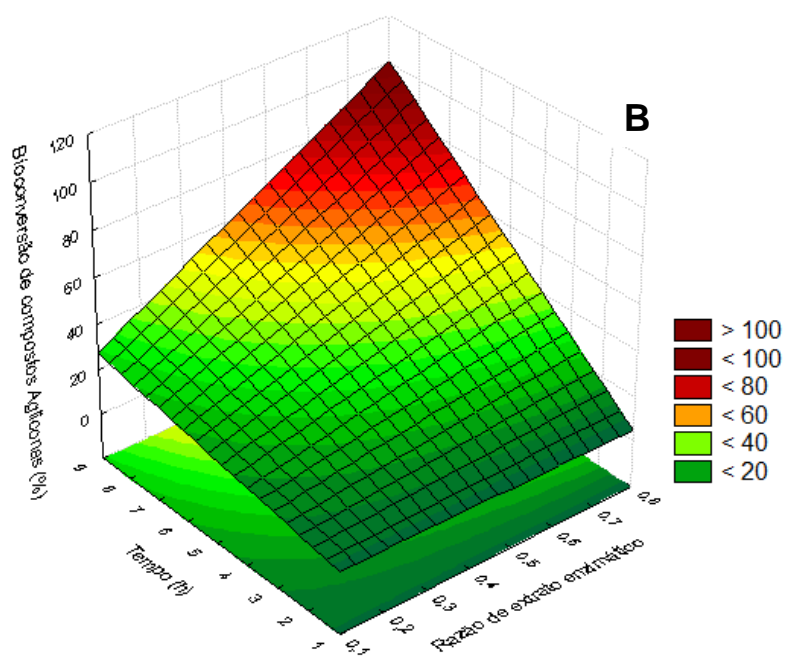
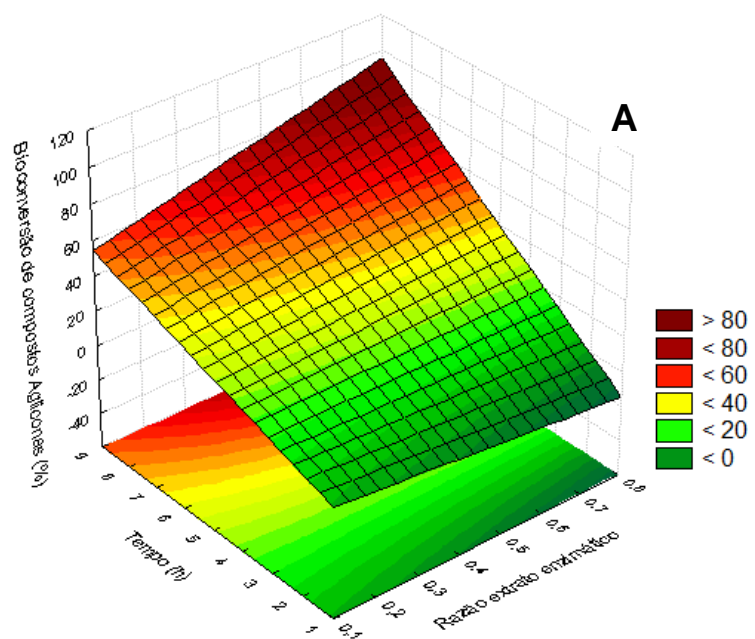


Figura 42 - Teores de isoflavonas totais em $\mu\text{g/g}$ com o processo de bioconversão no extrato obtido em solvente água.

As bioconversões realizadas sobre o extrato obtido do solvente água demonstradas na Figura 43 letras A, resultou na máxima bioconversão dos compostos de isoflavonas com a adição entre o valor mínimo de 0,125 e máximo 0,748 razão extrato enzimático relacionada ao tempo de reação para obtenção de resultados significativos, iniciado em 7 h e máximo em 8 h na condição de agitação em 60 rpm. Entretanto, na superfície de resposta letra B é observada uma nova condição na bioconversão, nas quais as variáveis independentes foram eficientes nas condições máximas da razão extrato enzimático e tempo de reação de 8 h. E ao estudar a superfície de resposta letra C é observado uma condição semelhante a letra B, com uso da variável razão extrato enzimático e intervalo do tempo de reação variando entre 6 e 8 h.



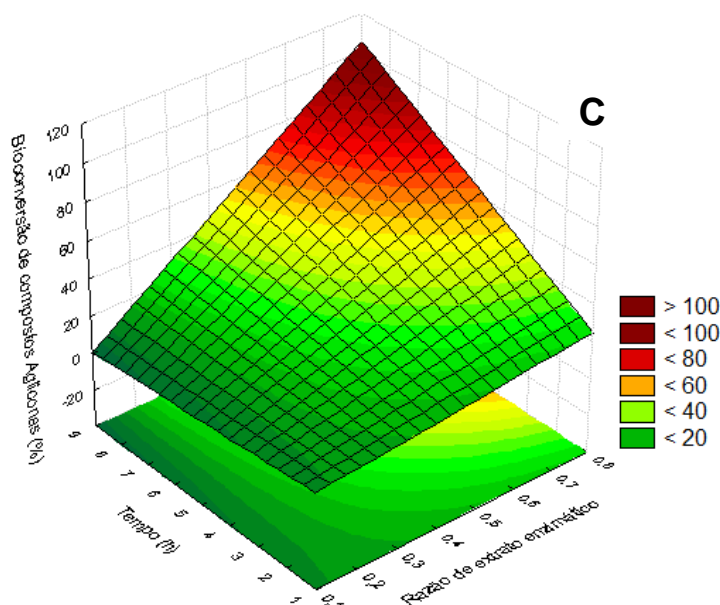


Figura 43 - Gráficos das superfícies de respostas gerados a partir do extrato obtido do solvente água, em função do tempo e razão de extrato enzimático: (A) 60 rpm, (B) 90 rpm e (C) 120 rpm.

4.8 VALIDAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS PADRÕES DE ISOFLAVONAS

4.8.1 Linearidade versus curva de calibração

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica na busca de resultados (variável dependente y) diretamente proporcional à concentração do analito (variável independente x) dentro de um intervalo específico (BRASIL, 2003). Desta forma, foi utilizado como suporte de validação metodológica a RE n° 899/2003 que descreve como critério mínimo aceitável (r) com valor maior ou igual a 0,99. O valor de (r) determina a estimativa da qualidade da curva, e quanto mais próximo de 1,0 menor será a dispersão dos pontos experimentais com menor incerteza dos coeficientes de regressão (RIBANI et al. 2004).

O método utilizado ajustou-se à linearidade, coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 em todas as concentrações testadas, conforme apresentado na Tabela 28. Entretanto, a Figura 46 apresenta os valores obtidos pela regressão linear sobre os padrões de isoflavonas.

Tabela 28 - Curvas dos padrões de isoflavonas versus concentração.

Daidzina mg/mL						
Concentração	0,2	0,1	0,04	0,03	0,008	0,004
Média	1851757	937794	351704	180307	71543	38274
<i>dp</i>	22722	9234	6228	1483	519	959
CV %	1,2	1,0	1,8	0,8	0,7	2,5
Glicitina mg/mL						
Concentração	0,1	0,05	0,02	0,01	0,004	0,002
Média	860524	436781	155799	75785	28951	14398
<i>dp</i>	11558	5189	3210	1010	330	215
CV %	1,3	1,2	2,1	1,3	1,1	1,5
Genistina mg/mL						
Concentração	0,05	0,025	0,01	0,005	0,002	0,001
Média	608688	294316	114774	55190	21509	10593
<i>dp</i>	4808	4122	1216	942	354	308
CV %	0,8	1,4	1,1	1,7	1,6	2,9
Daidzeína mg/mL						
Concentração	0,2	0,1	0,04	0,02	0,008	0,004
Média	3595803	1772467	704286	340822	134972	70280
<i>dp</i>	40357	25815	11421	5077	1176	983
CV %	1,1	1,5	1,6	1,5	0,9	1,4
Gliciteína mg/mL						
Concentração	0,2	0,1	0,04	0,02	0,008	0,004
Média	860012	422581	167366	81826	35103	16639
<i>dp</i>	8750	6913	3100	1486	1113	674
CV %	1,0	1,6	1,9	1,8	3,2	4,1
Genisteína mg/mL						
Concentração	0,2	0,1	0,04	0,02	0,008	0,004
Média	3564636	1715278	684581	346514	153779	76541
<i>dp</i>	33466	39693	13292	5778	357	865
CV %	0,9	2,3	1,9	1,7	0,2	1,1

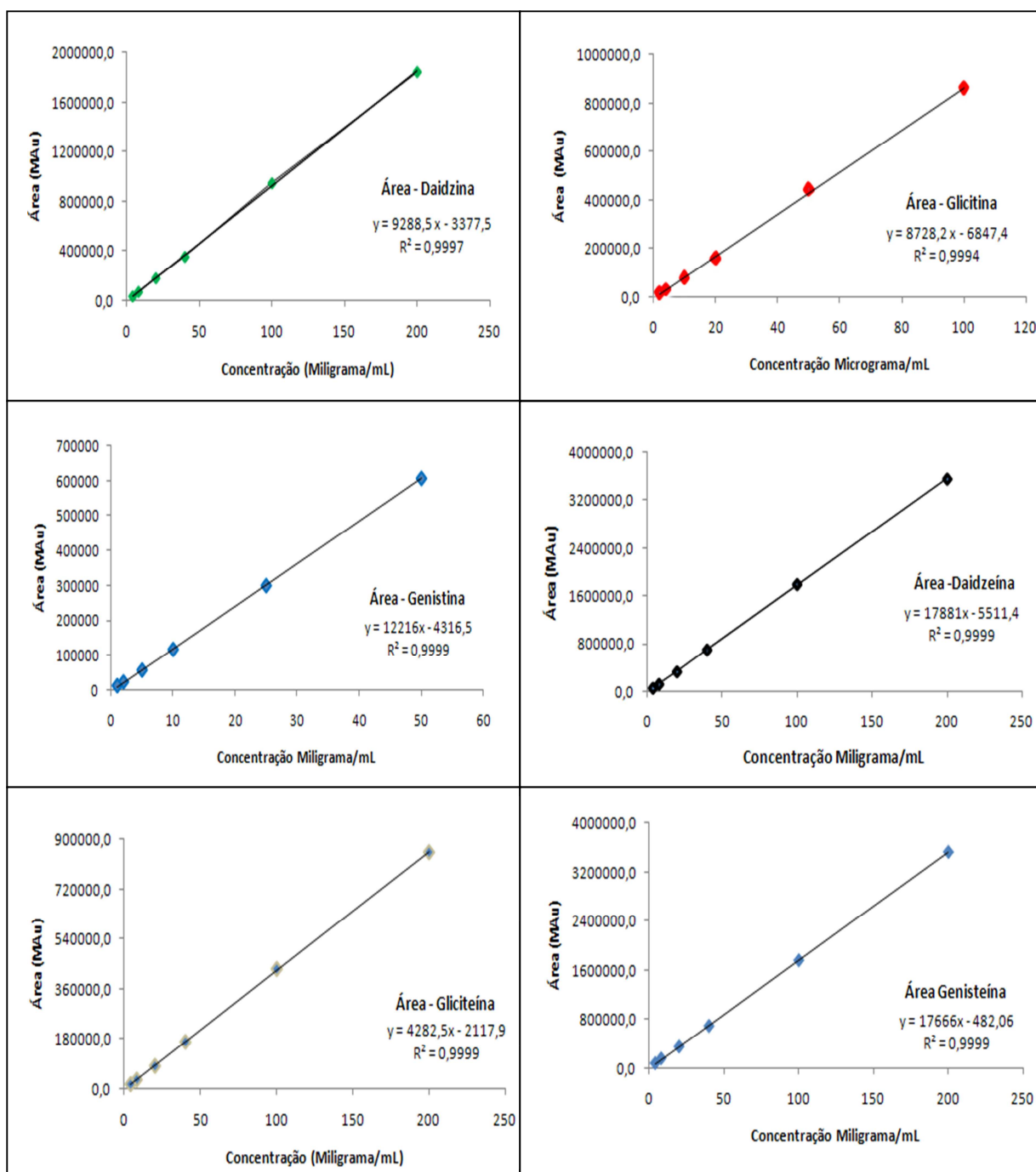


Figura 44 - Curva de linearidade versus equação linear.

É observado na descrição acima que os valores obtidos se ajustaram bem à linearidade, mas a garantia da redução do erro contido na análise, somente é observado com o uso da variância que busca fornecer resultados menos tendenciosos (BARROS NETO et al., 2007).

A análise de variância foi aplicada para todas as curvas de calibração referentes aos compostos de isoflavonas, conforme apresentado na Tabela 29,

apresenta o valor P do modelo bem inferior ($p < 0,05$) com significância estatística. Os outros parâmetros obtidos na análise de variância apenas corroboram com a robustez estatística do modelo matemático proposto.

Tabela 29 - Análise de variância.

Daidzina					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	29007,54	1	29007,54	13718,42	0,00
Resíduo	8,457984	4	2,114496		
Glicitina					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	7249,857	1	7249,857	6999,061	0,00
Resíduo	4,143331	4	1,035833		
Genistina					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	1813,409	1	1813,409	79743,14	0,00
Resíduo	0,090963	4	0,022741		
Daidzeína					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	29014,21	1	29014,21	64956,47	0,00
Resíduo	1,786687	4	0,446672		
Gliciteína					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	29007,54	1	29007,54	13718,42	0,00
Resíduo	8,457984	4	2,114496		
Genisteína					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	29014,52	1	29014,52	78492,12	0,00
Resíduo	1,478595	4	0,369649		

SS = (Soma quadrática dos quadrados) df = (Grau de liberdade), MS = (Média dos quadrados).

4.8.2 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é determinado como a menor concentração do analito, podendo ser diferenciada do ruído do sistema com segurança (LANÇAS, 2004). No entanto, o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito determinado pela precisão e exatidão em condições estabelecidas. O uso dos limites LD e LQ direcionam aos parâmetros exatidão, precisão e linearidade (BRASIL, 2003).

A obtenção dos valores referentes ao uso das equações LD e LQ foram baseadas pelas equações lineares, e desvio padrão intercepto y e a inclinação da reta, referente às curvas das isoflavonas, conforme apresentado na Tabela 30.

As concentrações dos intervalos estudados foram 0,2 e 0,001 mg/mL representando linearidade, exatidão e precisão.

Tabela 30 - Limites de detecção e quantificação.

Isoflavonas	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)
Daidzina	0,90	3,01
Glicitina	0,20	0,66
Genistina	0,47	1,59
Daidzeína	1,24	4,14
Gliciteína	0,89	2,98
Genisteína	1,39	4,64

4.9 TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ISOFLAVONAS BIOCONVERTIDAS

O grão de soja, assim como seus derivados, apresentam teores variados de compostos fenólicos totais. Barbosa et al. (2006), realizaram análises referentes aos compostos farináceos de soja, tais como farinha desengordurada de soja, farinha integral, isolado proteico, concentrado proteico com valores de 222, 101 e 148 mg GAE/100g e grãos de soja com 200 mg GAE/100g.

Já os teores fenólicos totais encontrados nas frações referentes aos extratos de metanol 80%, etanol 90% e água provenientes dos tratamentos enzimáticos realizados para obtenção de compostos de isoflavonas agliconas apresentaram resultados baixos quando relacionados aos compostos fenólicos totais provindos de amostras farináceas e grão de soja, conforme apresentado na Tabela 31.

As concentrações de isoflavonas nos grãos de soja, fermentados de soja, farináceos de soja entre outros produtos obtidos a partir do grão de soja, apresentam variações com relação aos teores de isoflavonas encontrados em sua composição (TSUKAMOTO et al., 1995). Fatores esses já explicados por (Carrão-Panizzi et al., 1998) relacionados ao clima, solo e processos industriais as quais os compostos formados por isoflavonas são envolvidos.

Tabela 31 - Teores dos Compostos Fenólicos Totais extratos utilizados na extração das isoflavonas valores expressos em mg GAE/100g.

Ensaio	Metanol 80%	Etanol 90%	Água
120/0,78/2 h	26,8 ± 3,6 ^c	59,8 ± 2,3 ^a	35,6 ± 1,0 ^b
120/0,78/8 h	32,8 ± 2,7 ^c	53,5 ± 2,5 ^a	40,6 ± 0,7 ^b
60/0,125/2 h	33,8 ± 1,9 ^b	28,3 ± 3,1 ^c	58,7 ± 1,2 ^a
60/0,125/8 h	35,4 ± 2,3 ^b	30,9 ± 2,3 ^c	59,0 ± 2,2 ^a
90/0,368/2,5 h	45,7 ± 1,9 ^b	58,4 ± 1,7 ^a	27,6 ± 1,9 ^c
90/0,368/5 h	40,6 ± 1,3 ^b	55,9 ± 0,9 ^a	30,8 ± 1,2 ^c

Amostras analisadas em triplicata com desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferença estatística entre si, teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.10 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Esse final de capítulo visa discutir os métodos e técnicas abordadas durante a confecção deste estudo, dando segmento aos resultados e discussões. O cultivo de espécies isoladas do solo é de grande interesse comercial porém, cuidados como identificação do micro-organismos são necessários, pois a normativa RDC nº 205/2006 enfatiza o uso dos micro-organismos *Aspergillus niger*, *Mortierella vinacea* e *Trichoderma longibrachiatum* para obtenção de enzimas alimentares como a α -Gal e β -Gli. Desta forma, pensando no atendimento da presente norma foi realizado a caracterização do micro-organismo via PCR com o principal objetivo de identificar a espécie estudada.

A caracterização bioquímica da enzima β -Gli foi estudada para abordar as melhores condições de pH, temperatura e fatores de estabilidade enzimática por períodos prolongados durante o estudo da bioconversão.

O processo fermentativo FSS utilizado neste estudo visou obter um *pool* enzimático com grandes concentrações enzimáticas especialmente das enzimas α -Gal e β -Gli. No entanto, a presença de outras formas enzimáticas podem prejudicar a bioconversão, e havendo a necessidade de obter um melhor perfil enzimático foi utilizado o sistema Api-Zym[®] que apresenta 20 diferentes substratos capazes de reagir com o extrato enzimático.

O estudo focado na redução do crescimento microbiano utilizando diferentes extratos de isoflavonas bioconvertidas sobre o micro-organismo *Myrothecium verrucaria* vislumbra um grande interesse comercial com relação ao controle

microbiano em plantas e alimentos, levando a redução de perdas e aumento de custos.

As micrografias dos compostos de carboidratos frações obtidas com o uso das membranas 0,22 μm , 300 kDa e 5 kDa e micrografias dos extratos com o uso dos solventes metanol 80%, etanol 90% e água foram importantes para obter um perfil especialmente dos substratos, considerado um dos principais problemas enfrentados durante o processo de bioconversão pela falta de afinidade entre o substrato utilizado e a enzima.

Os resultados referentes aos teores obtidos de carboidratos presentes no melaço de soja indicaram grandes quantidades destes compostos, considerados de extrema relevância nutricional na alimentação animal, pois caso venham a ser consumidos com a presença dos RO sintomas como flatulências e perda de peso serão facilmente identificados.

Os valores referentes a atividade enzimática da enzima β -Gli foram obtidos com o uso do planejamento de experimentos 2^2 utilizando as variáveis pH e temperatura relacionados a faixa ótima. Desta forma, a contribuição deste procedimento foi a obtenção de dados ajustados dentro de um intervalo de confiança de ($p < 0,05$) e valores de referência utilizados no processo de bioconversão das isoflavonas.

A bioconversão enzimática foi aplicada nos carboidratos presentes no melaço de soja após a passagem destes compostos pelo sistema de ultrafiltração com obtenção das frações do retido de 0,22 μm e permeados de 0,22 μm , 300 kDa e 5 kDa. Após a passagem destes compostos pelo sistema de ultrafiltração foi possibilitado a escolha de uma única fração para a realização do processo de bioconversão, fração de 5 kDa. As demais frações obtidas permeados de 0,22 μm e 300 kDa não foram utilizadas no processo de bioconversão por não haver a justificativa de seu uso, pois os valores obtidos referentes aos teores de carboidratos totais de cada fração obtida ficaram com seus teores muito próximos.

Os valores obtidos após as bioconversões realizadas sobre os extratos obtidos a partir dos solventes etanol 90%, metanol 80% e água apresentaram distorções de teores em relação a formação dos compostos agliconas, com maiores teores de bioconversão sobre os compostos extraídos a partir do etanol 90%, metanol 80% e água. Desta forma, as principais distorções observadas para os

valores obtidos após o processo de bioconversão são justificadas pela interação substrato enzima.

A validação metodológica utilizada para quantificar os teores de isoflavonas totais foi aplicada para obtenção de resultados seguros, pois grande parte dos compostos analisados com o uso da técnica cromatográfica CLAE publicados na literatura, não fazem qualquer menção com relação a validação metodológica utilizada.

A análise em relação aos teores de compostos fenólicos totais representa a quantidade dos mais diversos compostos fenólicos presentes no extrato. Desta forma, os compostos estudados como as isoflavonas totais fazem parte deste grupo e devem ser inclusos aos teores quantificados.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi realizado um estudo direcionado para a bioconversão dos RO em compostos monossacarídeos e dissacarídeos bem como, bioconversão dos compostos de isoflavonas formas glicosídicas em agliconas. Para aplicação desta metodologia, foi necessário produzir enzimas capazes de realizar o processo de bioconversão com o uso do micro-organismo *Aspergillus niger* (isolado do solo) que foi capaz de produzir um extrato enzimático com presença das enzimas β -glicosidase e α -galactosidase com alto valor de atividade enzimática, ambas utilizadas na bioconversão sobre os compostos de isoflavonas e carboidratos totais.

A passagem do melação de soja pelo processo de ultrafiltração por diferentes porosidades fracionou os compostos de carboidratos totais em diferentes concentrações maior 104,0 mg/g e menor 39,4 mg/g bem como, obtenção de compostos lípidos de impurezas destinados aos experimentos de bioconversão para redução dos RO na ordem de 75,2 e 70,0% e aumento significativo dos compostos frutose, glicose e galactose.

Na bioconversão sobre os compostos de isoflavonas formas glicosídicas em agliconas, a extração realizada com o etanol 90% obteve os melhores valores de bioconversão, seguidas pelo metanol 80% e água.

O uso das variáveis de processo (agitação, razão extrato enzimático e tempo) estudadas durante o processo de bioconversão enzimática atuaram com efeitos estatisticamente significativos a nível de ($p < 0,05$) na redução dos RO obtidos da fração de 5 kDa e conversão dos compostos glicosídicos em agliconas obtidos pela extração com os solventes metanol 80%, etanol 90% e água.

A atividade antimicrobiana sobre o fungo *Myrothecium verrucaria* com concentração de 0,2 mg/ μ L de isoflavonas bioconvertidas levou à obtenção de resultados satisfatórios em relação à falta de crescimento microbiano ao redor do halo.

Os resultados obtidos durante a quantificação dos compostos de isoflavonas totais, ilustram claramente o desenvolvimento e a validação do método proposto por apresentar significância a nível de ($p < 0,05$) para todas as classes de compostos analisadas.

Os teores de fenólicos totais quantificados nos diferentes extratos de isoflavonas apresentaram valores expressos mg GAE/100g coerentes quando comparados aos teores de resíduos agroindustriais provindos do grão de soja.

Os compostos monossacarídeos e dissacarídeos obtidos após a bioconversão enzimática são de total aproveitamento para a nutrição humana e/ou animal por apresentarem baixos teores de RO.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

O crescente momento visando a reutilização de subprodutos agrícolas como caroço de algodão, bagaço de laranja, melaço de soja entre outros, são alvos de estudos especialmente focando o setor da biotecnologia alimentar. Pois, os compostos químicos presentes nestes subprodutos como carboidratos, flavonóides, terpenos, compostos fenólicos totais entre outras substâncias podem ser inseridas na alimentação humana e animal após a aplicação dos processos fermentativos de baixo custo utilizando as técnicas fermentativas, FES e FSS para a produção de enzimas específicas e responsáveis por hidrólises especialmente sobre os compostos formados por carboidratos e flavonóides. Neste sentido, novas sugestões de trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Estudar uma melhor condição para reduzir o tempo necessário em relação a bioconversão dos compostos de isoflavonas;
- Estudar novos solventes para extração de isoflavonas utilizando concentrações variadas;
- Estudar novas alternativas voltadas na redução dos RO;
- Quantificar a atividade antioxidante sobre os extratos de isoflavonas;
- Aplicar procedimentos alternativos de pré limpeza sobre o melaço de soja para evitar problemas relacionados a presença de impurezas e redução do potencial de bioconversão.

REFERÊNCIAS

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, p. 115-121, 2003.

AGUIAR, L. C. **Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine max L.*) e o efeito na atividade biológica *in vitro***. 313 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

ALIBHAI, Z.; MONDOR, M.; MORESOLI, C.; IPPERSIEL, D.; LAMARCHE, F. Production of soy protein concentrates/isolates: traditional and membrane technologies. **Desalination**, v.191, p. 351-358, 2006.

ALICIEO, T. V. R. **Aplicação de processos com membranas na clarificação de cerveja**. 134 f. Tese (Doutorado Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, 2006.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S., ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183 – 198, 2002.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**; 18th ed. AOAC: Gaithersburg, Maryland, 2005. Chapter 50, methods, 985.35 and 984.27, 15-18p.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4^o ed., Editora UFV, Viçosa/MG, 2008.

BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. John Wiley & Sons, 2004.

BAKHIT, R. M.; KLEIN, B. P.; ESSEX-SORLIE, D. HAM, J. O.; ERDMAN, J. W. J. R.; 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, p. 2466-2474, 1994.

BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidanteda soja e produtos derivados. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, (4): 921-926, out/dez. 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. R. **Como fazer experimentos**. 3º Ed., Editora Unicamp, Campinas/SP, 2007.

BEER, D.; JOUBERT, E.; WENTZEL, C. A. G.; MANLEY, M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. **Food Chemistry**, v. 90, p. 569-577, 2005.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Editora Interciência, Rio de Janeiro RJ, 2008.

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.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova a lista de enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem. Resolução - RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006. Ministério da Saúde, 2006.

CASSIDY, K. D. R. A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 758S-767S, 1999.

CEGLA, U.G.; SHUSTER, M. **Process for the production of soybean sugars and the product produced thereof**. United States Patent. 6,913,771, July 5, 2005.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v.76, p. 291-302, 2005.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2012/2013 <http://www.conab.gov.br/OladaCMS/uploads/arquivos/13_03_07_10_39_19_levantamento_safras_graos_6.pdf>. Acesso em: 10/04/2013.

COOK, N. S.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effect and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

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**, v. 41, p. 1961-1967, 1993.

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.

DA SILVA, H. L. **Efeito da fermentação utilizando *aspergillus oryzae* sobre as características funcionais, tecnológicas e físico-químicas da farinha de soja integral e aplicação em pão de forma funcional**. 214 f. Tese (Doutorado em Tecnologia em Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

DECKER, C. H.; VISSER, J.; SHREIER, P. β -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -Glucosidase and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 55, p. 157-163, 2001.

DELMAS, D.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 49, p. 377-395, 2005.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497-522, 2001.

EPA (Environmental Protection Agency) *Aspergillus niger* tsca section 5(h)(4) exemption: final decision document<http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fd006.htm>. Acesso em: 12/06/2013.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; CALLEGARI, C. M.; REIS, A. P.; DE REZENDE, S. T. Processing of soybean products by semipurified plant and microbial alpha-galactosidases. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 27, p. 10184-10190, 2006.

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

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 Ed., Editora Artmed, Porto Alegre, 2010.

FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, M.; KANAMURA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 457-461, 1996.

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

GENOVESE, M. I.; PINTO, M. S.; BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M. Avaliação do teor de isoflavonas de “suplementos nutricionais à base de soja”. **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**, v. 39, p. 159-167, 2003.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration Handbook**. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing, 1986.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K.; BELÉIA, A. D. P.; OLIVEIRA, M. C. N. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, v. 48, p. 409-413, 1998.

GUIMARÃES, V. M.; DE REZENDE, S. T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G.; FELIZ, C.R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67-73, 2001.
HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006.

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, p. 63-70, 1998.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Journal Biochemistry**, v. 316, p. 695-696, 1996.

HESAMI, S.; ALLEN, K. J.; METCALF, D.; OSTLAND, V. E. MACINNES, J. I. LUMSDEN, J.S. Phenotypic and genotypic analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from Ontario salmonids with bacterial coldwater disease. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 54, p. 619-629, 2008.

HESSLER, P. E.; LARSEN, P. E.; CONSTANTINOU, A. I.; SCHRAM, K. H.; WEBER, J. M. Isolation of isoflavones from soy-based fermentations of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea*. **Application Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 398-404, 1997.

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.

HUMBLE, M. V.; KING, M. W.; PHILIPS, I. Api Zym: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *Journal of Clinical Pathology*, v. 30, p. 275-277, 1977.

IMCOPA, **Produção do melão de soja**. Disponível em: <<http://www.imcopa.com.br>>. Acesso em: 02/05/2013.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV Ed., São Paulo, 2004.

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. 1695–1699, 2000.

JÄGER, S.; BRUMBAUER, A.; FEHER, E.; RÉCZEY, K.; KISS, L. Production and characterization of β -Glucosidases from different *Aspergillus strains*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 455-461, 2001.

JOHNSON, L. A.; MYERS, D. J.; BURDEN, D. J. Soy Protein's History, Prospectis in Food, Feed. **Inform**, v. 3, p. 429-444, 1992.

KARP, S. G. Production of L-lactic acid from the soybean vinasse. Master dissertation, Federal University of Paraná/Universities of Provence and of the Mediterranean Sea, Brazil/France, 2007.

KOBAYASHI, H.; SUZUKI H. Studies on the decomposition of raffinose by α -galactosidase of mold. II. Formation of mold pellet and its enzyme activity. **Journal Fermentation Technology**, v. 50, p. 625-632, 1972.

KING, R. A.; BROADBENT, J. L.; HEAD, R. J. Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. **Journal Nutrition**, v. 126, p. 176-82, 1996.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Editora Rima, São Carlos, 2004

KUO, T. M.; LOWELL, C. A.; SMITH, P. T. Changes in soluble carbohydrates and activities in maturing soybean seed tissues. **Plant Science**, Amsterdam, v.125, p.1-11, 1997.

LEBLANC, J. G.; SILVESTRONI, A.; CONNES, C.; JUILLARD, V.; GIORI, G. S.; PIARD, J. C; SESMA, F. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce alpha-galactosidase. **Genetics and Molecular Research**. v. 3, p. 432-440, 2004.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. 4^o ed., Editora Edgard Blucher, São Paulo/SP, 2007.

LI-JUN, Y.; LI-TE, L.; ZAI-GUI, L.; TATSUMI, E.; SAITO, M. Changes in isoflavone contents and composition of sufu (fermented tofu) during manufacturing. **Food Chemistry**, v. 87, p. 587-592, 2004.

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**. 137 f. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

Lin E. S.; Wang C. C.; Sung S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 98-102, 2006.

LUMEN, B. O. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legumes: A review. **Food Structure**, v. 11, p. 33-46, 1992.

MANCIANTI, F.; RUM, A.; NARDONI, S.; CORAZZA M. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. **Mycopathologia**, v. 149, p. 131-135, 2000.

MANTOVANI, D.; CARDOZO, F. L.; SANTOS, C. L.; DE SOUZA, F. L. V; WATANABE, S. C. Chromatographic Quantification of Isoflavone Content from Soy Derivates Using HPLC Technique. **Journal Chromatography Science**, v. 47: 766-769 2009.

MANTOVANI, D. **Bioconversão de isoflavonas glicosídicas em isoflavonas agliconas do melaço de soja**. 74 f. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, 2010.

MANTOVANI, D.; Cardozo F. L.; Corazza, M.L.; ZANIN, G. M.; TAZINAFO, N. M.; COSTA, S. C.. Presença de isoflavonas glicosídicas em resíduo industrial e sua bioconversão enzimática para transformação em compostos isoflavonas agliconas. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 5, p. 606-617, 2011.

MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-022%20%282%29%281%29.pdf>. Acesso em: 10/04/2013.

MARCOS, B.; MORESOLI, C.; SKOREPOVAB, J.; VAUGHAN, B. C. F. D. Modeling of a transient hollow fiber ultrafiltration system for protein concentration. **Journal of Membrane Science**, v. 337, p. 136-144, 2009.

MATSUBARA, Y., IWASAKI, K., NAKAJIMA, M., NABETANI, H.; NAKAO, S. Recovery of oligosaccharides from steamed soybean waste water in Tofu processing by reverse osmosis and nanofiltration membranes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, p. 421-428, 1996.

MATSUURA, 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, p. 1623-1627, 1995.

MATSUURA, 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, p. 602-605, 1989.

MANZANARES, P.; GRAAFF, L. H.; VISSER, J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel α -galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 383-390, 1998.

MONTEIRO, M. R. P.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; MOREIRA, M. A. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina e das isoenzimas lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 195-205, 2004.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.

MULIMANI, V. H.; THIPPESWAMY, S.; RAMALINGAM, E. Enzymatic degradation of oligosaccharides in soybean flours. **Food Chemistry**, v. 59, p. 279-282, 1997.

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.

NIELSEN, I. L.; WILLIAMSON, G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. **Nutrition and Cancer-An International Journal**, v. 57, p. 1-10, 2007.

OETTERER, M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B.; SPOTO, F. M. H. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Editora Malone, Baueri SP, 2006.

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.

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. Soybean foods and their benefits: Potential mechanisms of action. **Nutrition Reviews**, v. 63, p. 272-283, 2005.

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, 2001.

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, jul/set, 2002.

PEREIRA, M. C.; GULARTE, J. P.; VIZZOTTO, M. Otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes de amora-preta (*Rubus* sp.). In: **XVI Congresso de Iniciação Científica da UFPEL**, 2007, Pelotas.

PESHIN, A.; MATHUR, J. M. S. Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* strain 322. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 401-404, 1999.

PITSON, M. S.; SEVIOUR R. J.; MCDOUGALL, B. M. Purification and characterization of an extracellular β -glicosidase from the filamentous fungus *Acremontium persicinum* and its probable role in β -glucan degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 182-190, 1997.

PORTER, J. E.; LADSCH, M. E.; HERRMANN, K. M. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 356-363, 1991.

QURESHI, N.; LOLAS, A.; BLASCHEK, H. P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 290-295, 2001.

REDDY, P.; AHMED, M. N. Hematological studies in bullocks in natural out-breaks of myrothecio toxicosis. **Indian Veterinary Journal**, v. 75, p. 416-418, 1998.

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

RIAZ, M.N. **Soy Applications in Food**. 1ª Edição, London, Ed Taylor e Francis, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771- 780, 2004.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; STWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Kidlington, v. 66, p. 401-436, 1999.

ROSS, J. A.; KASUME, C. M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. **Annual Review Nutrition**. v.22, p. 19–34, 2002.

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, p. 205-211, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SARRY, J. E.; GÜNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, p. 509-521, 2004.

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.

SIQUEIRA, P. F. **Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae***. Master dissertation. Federal University of Paraná/Universities of Provence and of the Mediterranean Sea, Brazil/France, 2006.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; IGASHIYAMA, A. H.; WIETZIKOSKI, F. G.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. **Production of Bio-ethanol from Soybean**

Molasses by *Saccharomyces cerevisiae*: Process Scale-up. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Anais Sinaferm 2007, GRAFFIT, v. CD. p. 1-1, Curitiba, 2007.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S.G.; CARVALHO, J. C.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; THOLOZAN, J. L.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8156-8163, 2008.

SILVA, R. C. Remoção de Galactooligossacarídeos em Melaço de Soja para Obtenção de Produtos de Interesse Industrial. 73 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2010.

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.

SUAREZ, F. L.; SPRINGFIELD, J.; FURNE, J. K.; LOHRMANN, T. T.; KERR, P. S.; LEVITT, M. D. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 135-139, 1999.

STRATHMANN, H. Synthetic membranes and their preparation. In: PORTER, M.C. **Handbook of Industrial Membrane Technology**. Nova Jersey: Noyes Publications, 1990.

STATSOFT. **STATISTICA® 8.0** from Statsoft Inc. Tulsa, USA: Statsoft.

TORREZAN, R.; CRISTIANINI, M. Revisão: efeito do tratamento sob alta pressão sobre as propriedades funcionais da proteína de soja e interação proteína-polissacarídeos. **Boletim CEPPA**, v. 23, p. 201-220, 2005.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 1184-1192, 1995.

VELDMAN, A.; VEEN, W. A. G.; BARUG, D.; VAN PARIDON, P. A. Effect of a-galactosides and α -galactosidase in feed on ileal piglet digestive physiology. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 69, p. 57-65, 1993.

VENDRUSCOLO, F. P. M.; ALBUQUERQUE, F. Streit, Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications, **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 1-12, 2008.

VIANA, P.; REZENDE, S.; MARQUES, V.; TREVIZANO, L.; PASSOS, F.; OLIVEIRA, M.; BEMQUERER, M.; OLIVEIRA, J.; GUIMARÃES, V. Extracellular α -Galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and Its Use in the Hydrolysis of Raffinose Oligosaccharides. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 54, p. 2385-2391, 2006.

VIANA, P. A.; DE REZENDE, S. T., FALKOSKI, D. L.; LEITE, T. A.; JOSÉ, I. C.; MOREIRA, M. A.; GUIMARÃES, V. M. Hidrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidases. **Food Chemistry**, v. 103, p. 331-337, 2007.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p.1-43, 2001.

WALKER, H. L.; TILLEY, A. M. Evolution of an isolate of *Myrothecium verrucaria* from Sicklepood (*Senna obtusifolia*) as a potential mycoherbicide agent. **Biological Control**, v. 10, p. 104-112, 1997.

WALLECHA, A.; MISHRA, S. Purification and characterization of two β -glucosidases from a thermo-tolereant yeast *Pichia etchellsii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1649, p. 74-84, 2003.

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.

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.

YAN, T. R.; LIAU, J. C. Synthesis of cello-oligosaccharides from cellobiose with β -glucosidase II from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, p. 591-594, 1998.



YANG, Q.; PENG, X.; YANG, L.; HAN, J.; YANG, Y.; WU, G. The utilisation of vinegar waste. **Journal Shanxi Agricultural Science**. v.37, p. 44-46, 2009.

YAMABE, S.; KOBAYASHI-HATTORI, K.; KANEKO, K.; ENDO, H.; TAKITA, T. Effect of soybean varieties on the content and composition of isoflavone in rice-koji miso. **Food Chemistry**, v. 100, p. 369-374, 2007.

ZANETTE, R. A. Variações no perfil enzimático de isolados do oociceto *Pythium insidiosum*. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

ANEXO A

Resultado referente a identificação da espécie e gênero do micro-organismo isolado do solo realizado pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGQ	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 327/12 DRM		PÁGINA: 4 de 5

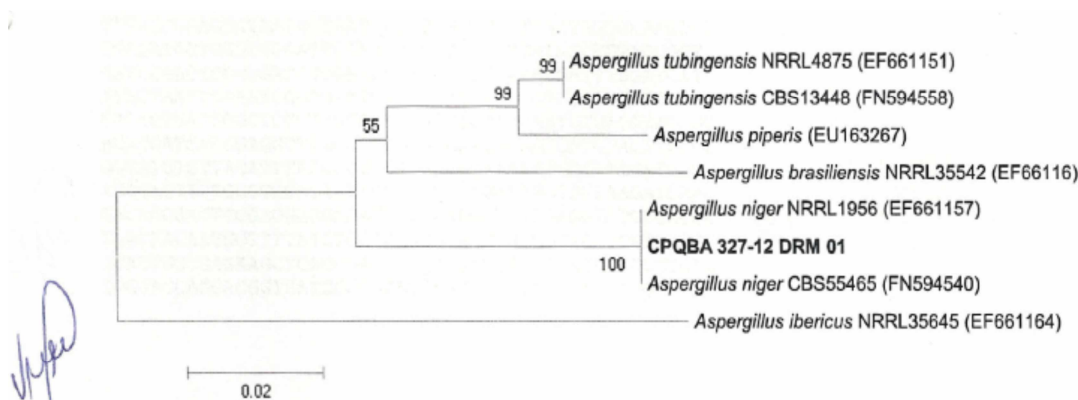
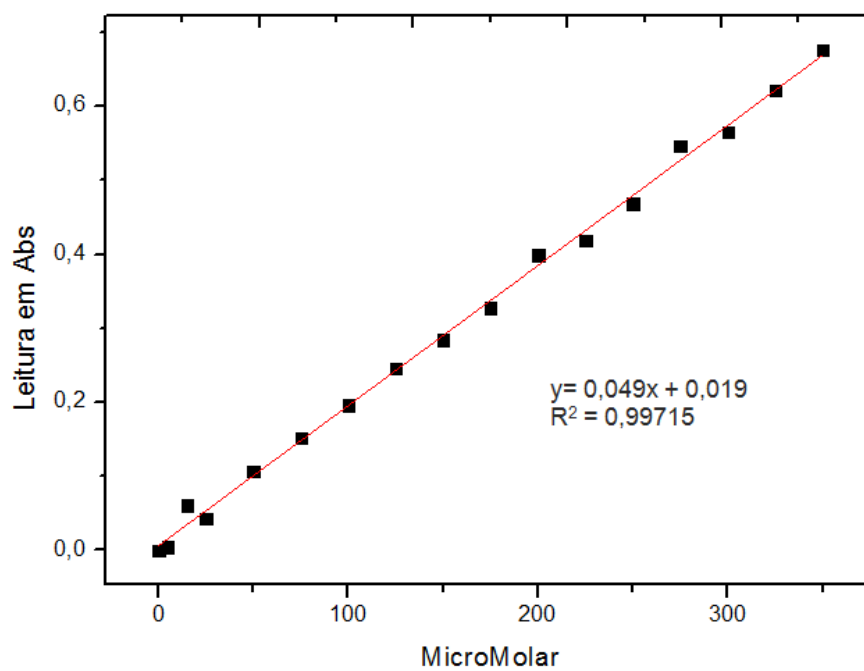


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais do gene da calmodulina da amostra **CPQBA 327-12 DRM 01** e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

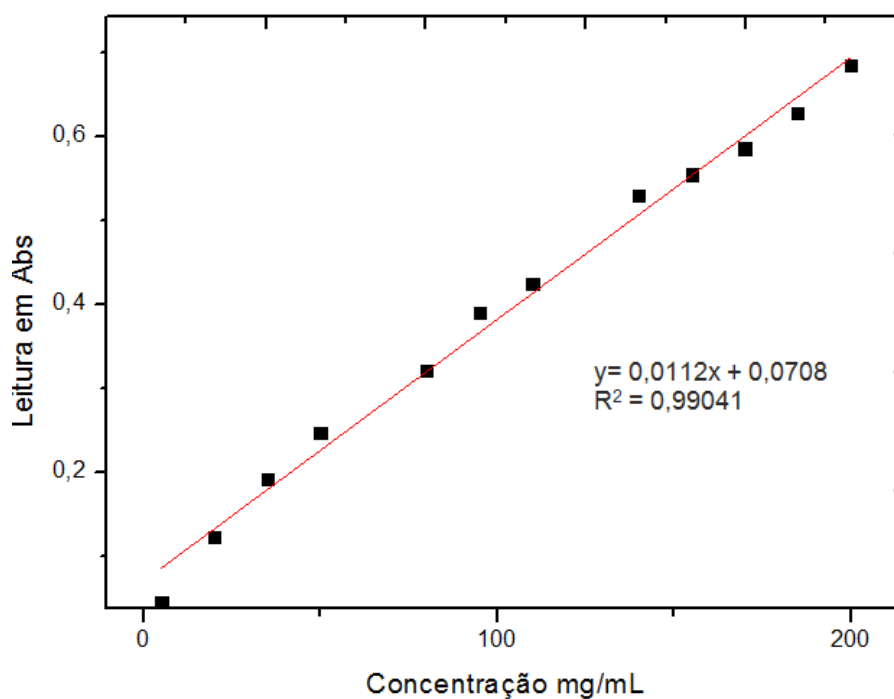
Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

APÊNDICE A

Curva de Calibração referente aos valores de atividade enzimática das enzimas β -Gli e α -Gal

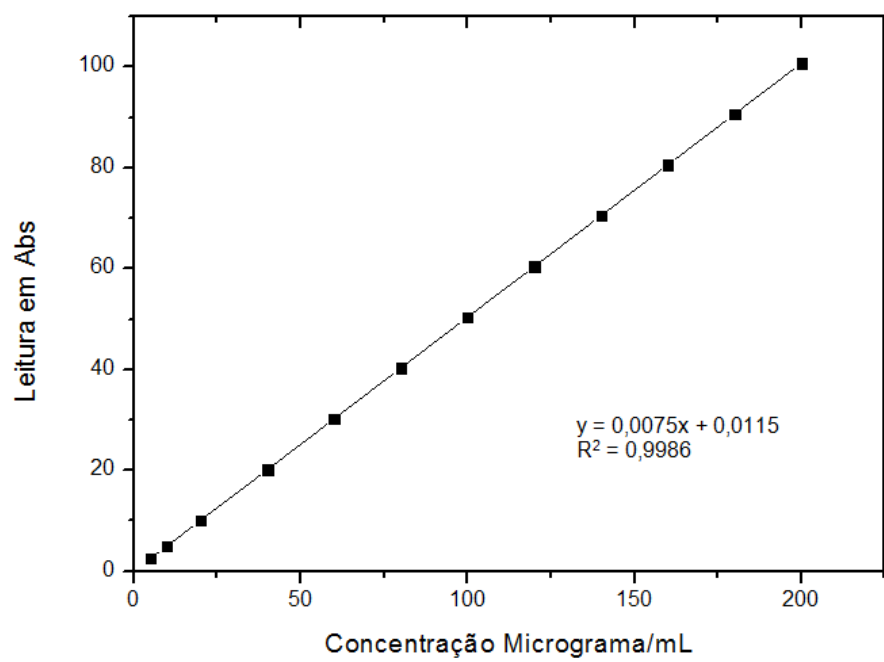


Curva de calibração da proteína total.



APÊNDICE B

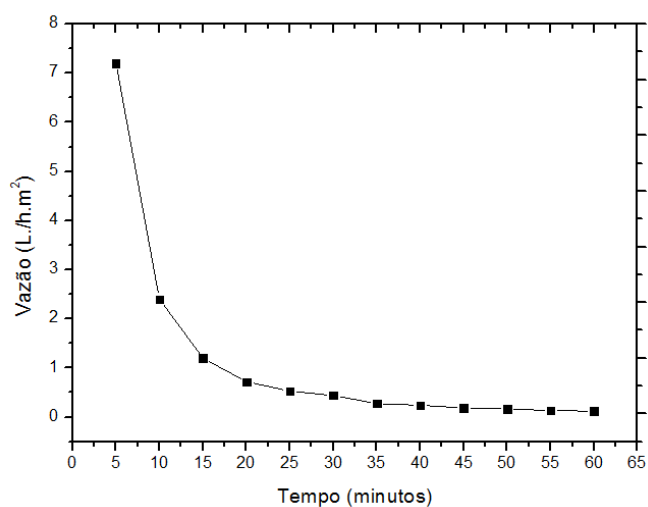
Curva de calibração do ácido gálico.



APÊNDICE C

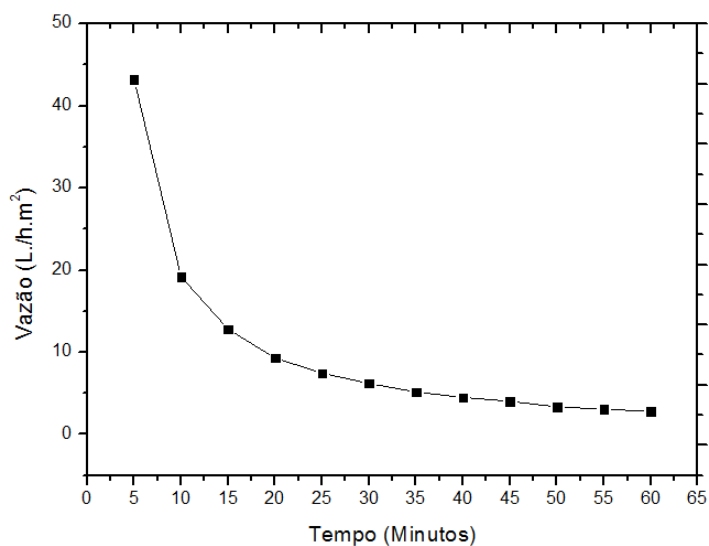
Para cada passagem em membranas contendo tamanhos específicos estudados 0,22 μ m, 300 kDa e 30 kDa, foram realizados cálculos relacionados à recuperação de fluxo e *fouling*, valores demonstrados para cada fração.

Processo de separação por membranas (PSM), passagem com 0,22 μ m



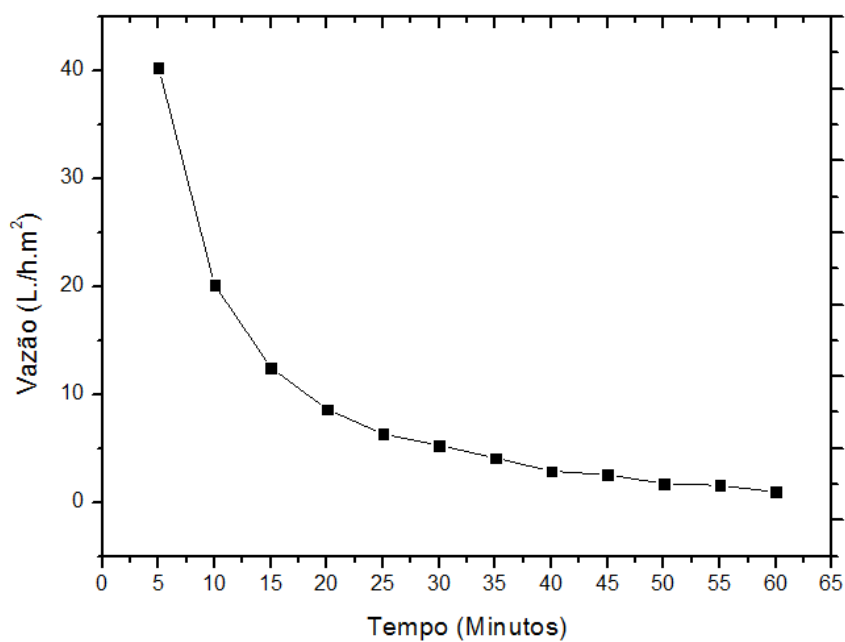
Parâmetros	Valores (%)
<i>Fouling</i>	99,7
Recuperação fluxo	75,1
°Brix do permeado	5,8

Processo de separação por membranas (PSM), passagem com 300 kDa



Parâmetros	Valores (%)
<i>Fouling</i>	99,0
Recuperação fluxo	69,7
°Brix do permeado	5,1

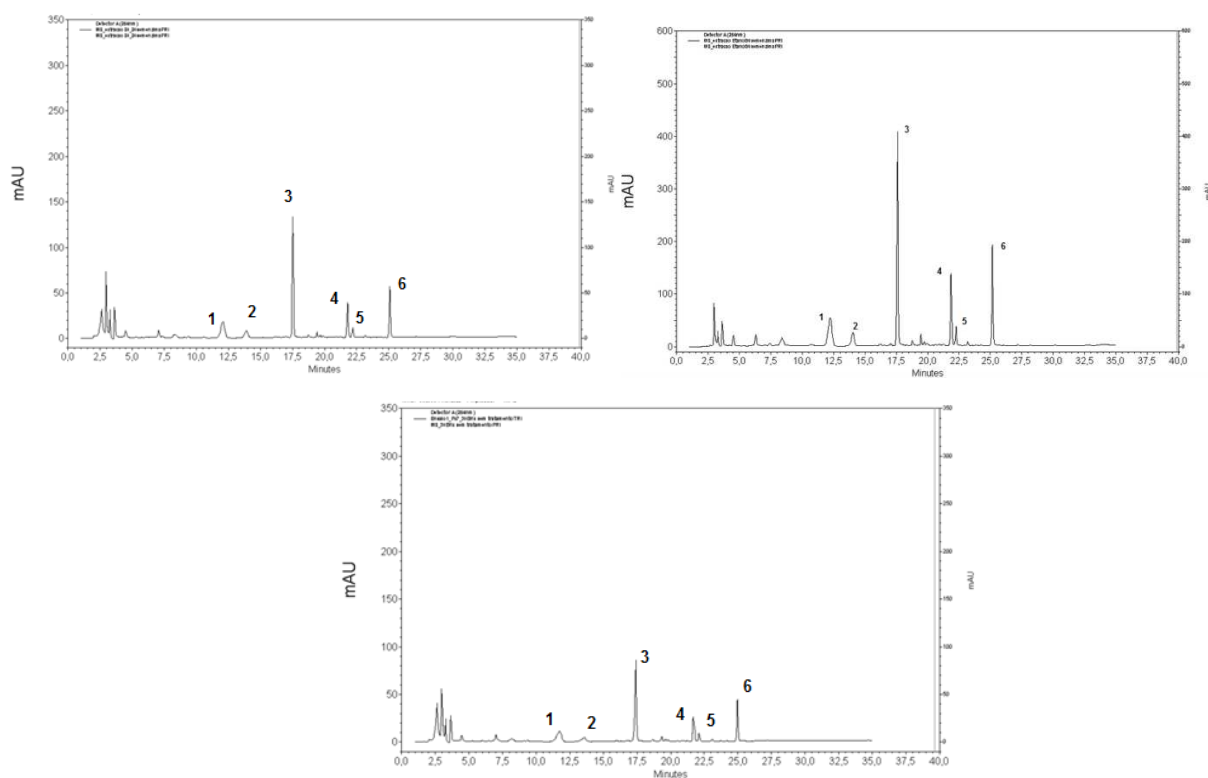
Processo de separação por membranas (PSM), passagem com 5 kDa



Parâmetros	Valores (%)
<i>Fouling</i>	99,1
Recuperação fluxo	68,9
°Brix do permeado	4,6

APÊNDICE D

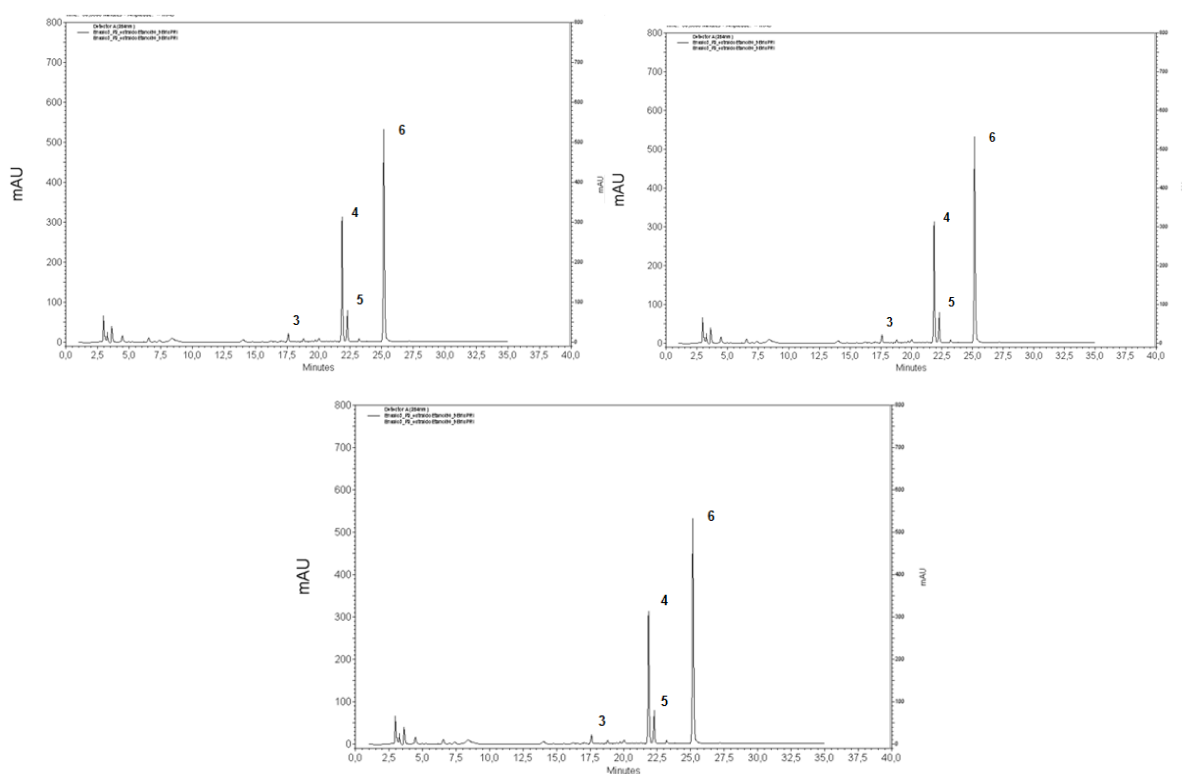
Os cromatogramas das Figuras A, B e C representam as condições iniciais dos extratos de isoflavonas obtidas dos extratores metanol 80%, etanol 90% e água antes da bioconversão enzimática. Todos os compostos de isoflavonas são identificados pelos números: 1- daidzina, 2- glicitina, 3- genistina, 4- daidzeína, 5- gliciteína e 6- genisteína.



APÊNDICE E

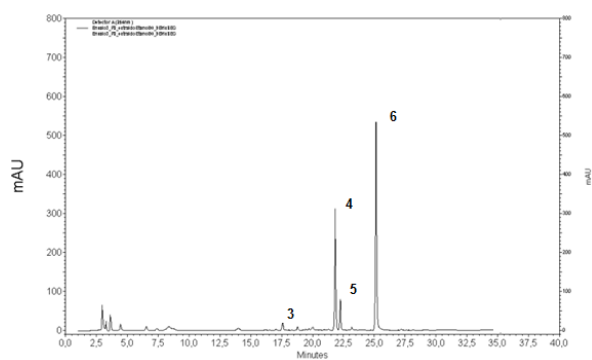
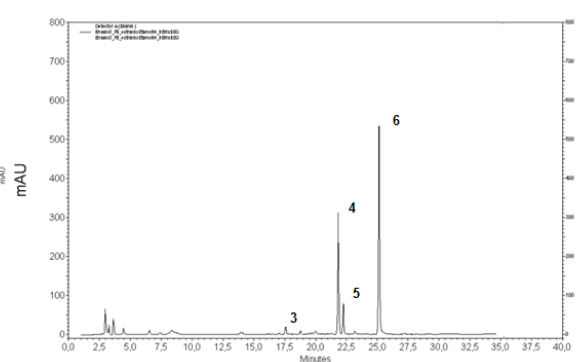
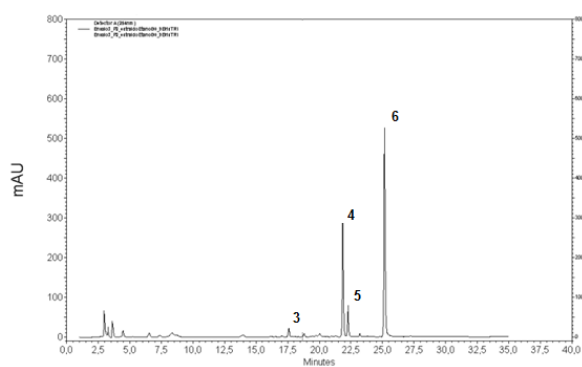
As condições cromatográficas referentes aos extratos de isoflavonas obtidos com o uso dos solventes metanol 80%, etanol 90% e água foram realizadas seguindo determinações dos órgãos de competência nacional credenciados por aplicar recomendações relacionadas a validações e normalizações aos laboratórios analíticos, ANVISA RE nº 899 de 29/05/2003 e INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 03/2003. Neste sentido, todos os processos de bioconversão referentes aos compostos de isoflavonas formas glicosídicas e agliconas foram realizados por planejamento de experimentos 2³ utilizando variáveis independentes (agitação, razão extrato enzimático e tempo), e condução dos resultados em triplicada.

As amostras obtidas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com repetibilidade intra e inter-ensaios. Os cromatogramas das Figuras A, B e C representam as condições em triplicata dos extratos de isoflavonas obtidas dos extratores metanol 80% bioconvertidos com o uso da enzima β -Gli. Todos os compostos de isoflavonas são identificados pelos números: 1- daidzina, 2- glicitina, 3- genistina, 4- daidzeína, 5- gliciteína e 6- genisteína.



APÊNDICE F

Os cromatogramas das Figuras A, B e C representam as condições em triplicata dos extratos de isoflavonas obtidas dos extratores etanol 90% bioconvertidos com o uso da enzima β -Gli. Todos os compostos de isoflavonas são identificados pelos números: 1- daidzina, 2- glicitina, 3- genistina, 4- daidzeína, 5- gliciteína e 6- genisteína.



APÊNDICE G

Os cromatogramas das Figuras A, B e C representam as condições em triplicata dos extratos de isoflavonas obtidas dos extratores água bioconvertidos com o uso da enzima β -Gli. Todos os compostos de isoflavonas são identificados pelos números: 1- daidzina, 2- glicitina, 3- genistina, 4- daidzeína, 5- gliciteína e 6- genisteína.

