

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA CORRÊA DA SILVA VASCONCELLOS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO PROTEICO DE SOJA,
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS ANTIMICROBIANA,
ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS PROTEÍNAS GLICININA E
 β - CONGLICININA E PRODUÇÃO DE UM FITOCOSMÉTICO

CURITIBA

2014

FERNANDA CORRÊA DA SILVA VASCONCELLOS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO PROTEICO DE SOJA,
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS ANTIMICROBIANA,
ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS PROTEÍNAS GLICININA E
 β - CONGLICININA E PRODUÇÃO DE UM FITOCOSMÉTICO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, área de concentração Agroindústria da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adenise Lorenci Woiciechowski

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2014

V331p

Vasconcellos, Fernanda Corrêa da Silva

Produção e caracterização de um isolado proteico de soja, avaliação das atividades biológicas antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória das proteínas glicínica e β -conglícinina e produção de um fitocosmético /

Fernanda Corrêa da Silva Vasconcellos. – Curitiba, 2014.

95f. : il. color. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2014.

Orientador: Adenise Lorenci Woiciechowski -- Coorientador: Carlos Ricardo Soccol.

Bibliografia: p. 94-95.

1. Proteínas de soja. 2. Compostos bioativos das plantas. 3. Cosméticos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Woiciechowski, Adenise Lorenci III. Soccol, Carlos Ricardo. IV. Título.

CDD: 615.32374



RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

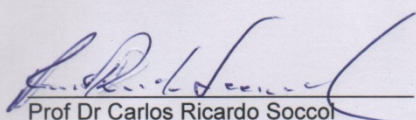
Aos nove dias do mês de maio de 2014, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, Segundo Andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Nonagésima Segunda Defesa de Tese de Doutorado, Área de Concentração: Biotecnologia Agroalimentar. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

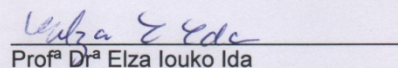
A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, ficou constituída pelos Professores Doutores Elza Louko Ida (UEL), Carlos Ricardo Soccol (UFPR), Débora Brand (UFPR), Adriane Bianchi Pedroni Medeiros (UFPR) e Adenise Lorenci Woiciechowski (UFPR – orientadora da tese).

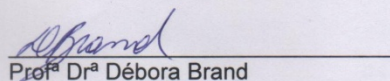
Às 08h30, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Fernanda Corrêa da Silva Vasconcellos** a fazer a apresentação da Tese intitulada: "PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO PROTEICO DE SOJA, AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS PROTEÍNAS GLICININA E β -CONGLICININA E PRODUÇÃO DE UM FITOCOSMÉTICO". Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

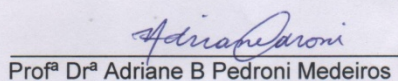
Tendo em vista a tese e a arguição, a banca composta pelos professores Drª Elza Louko Ida, Dr Carlos Ricardo Soccol, Drª Débora Brand, Drª Adriane Bianchi Pedroni Medeiros, e Drª Adenise Lorenci Woiciechowski declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da resolução 65/09 de 30.10.09).

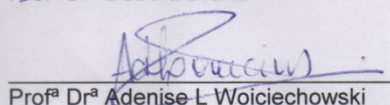
Curitiba, 09 de maio de 2014


Prof Dr Carlos Ricardo Soccol


Profª Drª Elza Louko Ida


Profª Drª Débora Brand


Profª Drª Adriane B Pedroni Medeiros


Profª Drª Adenise L Woiciechowski

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e proteção;

A professora Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski e ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela orientação, conselhos e incentivo durante a execução desta tese;

Aos meus amigos e colegas de laboratório Maria Rosa Prado, Michelle Tanoue, Denise Salmon, Márcio Vasconcelos, Leandro Freire, Mara Eli de Matos, Caroline Tiemi, Vanessa Ghiggi, Denise Kitamura, Joana Rizzolo pela ajuda, conselhos, descontração e apoio nos momentos bons e ruins durante o trabalho;

A Mitiyo Miyaoka pela amizade, conselhos e auxílio;

A Berenice Atrib, pela ajuda e cooperação na execução do fitocosmético;

A CAPES pelo suporte financeiro durante a realização do doutorado;

A UFPR e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela estrutura necessária a realização desta tese;

A minha família em especial aos meus pais, meu irmão, minha cunhada e minha madrinha, pelo apoio incansável e emocional;

Ao Paulo César Urbano pelo carinho, companheirismo e dedicação;

Ao Zack e a Miuki pelos ótimos momentos de descontração.

RESUMO

A soja é um produto de grande interesse mundial, graças à versatilidade de aplicação de seus produtos, suas propriedades nutricionais, facilidade de produção, alta produtividade e baixo custo. Além disso, são reconhecidas propriedades biológicas, devido à presença de diferentes peptídeos bioativos. O farelo desengordurado de soja é um subproduto do processamento dos grãos de soja para obtenção do óleo. Com grande quantidade de proteínas se torna a fonte viável para obtenção de isolados proteicos com alto valor agregado. O isolado proteico de soja, portanto possui proteínas bioativas. O objetivo deste trabalho foi otimizar e produzir a partir do farelo desengordurado de soja, um isolado proteico de soja e a partir deste extrair duas proteínas a glicinina e β - conglucina, por um processo novo e eficiente, avalia-las quanto atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória *in vitro* e produzir um fitocosmético e avalia-lo quanto as mesmas atividades biológicas. Os resultados mostraram que o isolado proteico de soja obtido contém 94,6% de proteínas destacando a otimização do processo que foi realizada e a obtenção das proteínas β - conglucina e glicinina que foram purificadas até o teor de 83,8% e 88,4% de proteínas respectivamente. A glicinina mostrou maior atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória com diferenças estatisticamente significativas em relação à β - conglucina, portanto foi escolhida para composição do fitocosmético que obteve resultados semelhantes aos obtidos anteriormente para as atividades biológicas, constatando ser um grande potencial na área de cosméticos.

Palavras- chave: Isolado Proteico de Soja, β - conglucina, glicinina, atividade biológica, fitocosmético.

ABSTRACT

Soybeans is a global interest because have application versatility of their products, nutritional properties, facility production, high productivity and low cost. Futhemore, it is recognized biological properties due present of different bioactive peptides. The deffated soybean meal is a by-product of the processing of soybeans for obtaining oil. With lots of proteins becomes a viable source for obtaining protein isolates with high value. The soy protein isolate posses bioactive proteins. The goal of this study was to optimize and produce from deffated soybean meal, the soy protein isolate and after extracted two proteins β - conglycinin and glycinin and evaluates them as antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity *in vitro* and produces phytocosmetic and evaluates it as the same activities. The results showed obtained soybean protein isolate containing 94.6% proteins highlighting that good optimization was performed and the protein β -conglycinin and glycinin obtained 83.8% and 88.4% protein, respectively. The glycinin showed higher antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity with statistically significant differences against β -conglycinin, was therefore chosen for composition of phytocosmetic who obtained similar results for the biological activities, noting be a great potential in the area of phytocosmetics.

Keywords: Soy protein isolate, β - conglycinin, glycinin, biological properties and phytocosmetic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fluxograma de produção do Isolado Proteico de Soja	32
FIGURA 2: Diagrama de Pareto para o modelo obtido no planejamento experimental fatorial completo 2^2	39
FIGURA 3: Gráfico de superfície de resposta gerada no planejamento experimental 2^2 DCCR	41
FIGURA 4: Aspecto morfológico do farelo desengordurado de soja (FDS'), isolado proteico de soja (IPS) e das proteínas β - conglucina (7S) e glicina (11S)	43
FIGURA 5: SDS-PAGE do IPS e das proteínas β - conglucina e glicina. Os números a esquerda indicam os marcadores de pesos moleculares (P.M.) em kDa.....	45
FIGURA 6: Concentração de isoflavonas presente no isolado proteico de soja (IPS) e nas frações proteicas β - conglucina (7S) e glicina (11S).....	46
FIGURA 7: MEV do IPS (7A, 7B e 7C) e das frações proteicas β - conglucina (7D, 7E e 7F) e glicina (7G, 7H, 7I)	49-50
FIGURA 8: Cromatogramas das frações glicina (1) e β - conglucina (2), mostrando o perfil de aminoácidos.....	51
FIGURA 9: Atividade anti-inflamatória das frações β - conglucina (7S) e glicina (11S).....	69
FIGURA 10: Curva Padrão do Trolox frente ao radical ABTS	71
FIGURA 11: Atividade antioxidante das frações proteicas glicina (11S) e β - conglucina (7S) pelo método ABTS com o Trolox	71
FIGURA 12: Curva Padrão da vitamina C frente ao radical ABTS	72

FIGURA 13: Atividade antioxidante das frações proteicas glicinina (11S) e β -conglucininina (7S) pelo método ABTS com a vitamina C	72
FIGURA 14: Atividade antioxidante das frações proteicas glicinina (11S) e β -conglucininina (7S) pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico	73
FIGURA 15: Curva cinética de redução do DPPH das frações glicinina (1) e β -conglucininina (2)	73
FIGURA 16: Fitocosmético contendo peptídeos de glicinina	84
FIGURA 17: Variação do pH no fitocosmético durante os 15 dias de análise no teste de estabilidade acelerada.....	88
FIGURA 18: Fitocosmético após os 15 dias do teste de estabilidade acelerada	89
FIGURA 19: Curva Padrão do Trolox frente ao radical ABTS	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^2 , para as variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja	34
TABELA 2: Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , para as variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja.....	34
TABELA 3: Planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^2 , para as variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja	38
TABELA 4: ANOVA da otimização das variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja.....	39
TABELA 5: Planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) para as variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja.....	40
TABELA 6: ANOVA da otimização das variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja.....	41
TABELA 7: Característica do isolado proteico de soja e das proteínas β -conglucina (7S) e glicina (11S)	43
TABELA 8: Composição dos aminoácidos (%) das frações glicina (11S) e β -conglucina (7S), de acordo com os números nos cromatogramas	52
TABELA 9: Bactérias utilizadas para o teste de atividade antimicrobiana com as proteínas β -conglucina (7S) e glicina (11S)	60

TABELA 10: Atividade antimicrobiana das frações glicinina (11S) e β -conglucininina (7S) contra bactérias gram- positivas e gram- negativas através da técnica de difusão em ágar	66
TABELA 11: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das proteínas β - conglucininina (7S) e glicinina (11S) contra bactérias gram- positivas e gram- negativas.....	67
TABELA 12: Atividades antioxidantes das proteínas glicinina e β - conglucininina	71
TABELA 13: Componentes da emulsão base para produção do fitocosmético	83
TABELA 14: Critérios de avaliação de parâmetros organolépticos da emulsão cosmética	86
TABELA 15: Avaliação das características organolépticas (cor, odor e aspecto) e separação de fases do fitocosmético	88
TABELA 16: Atividade antimicrobiana do fitocosmético composto por peptídeos de glicinina (11S) contra cepas bacterianas.....	90

LISTA DE ABREVIATÖES

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

IPS: Isolado proteico de soja

AMPs: Antimicrobial peptides

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

ANOVA: Análise de variância

DCCR: Delineamento composto central rotacional

TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

HIA: Hialuronidase

AH: Ácido Hialurônico

CIM: Concentração inibitória mínima

EC₅₀: Concentração eficiente para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Soja	18
3.2 Proteínas da Soja	20
3.3 Isolado Proteico de Soja (IPS)	20
3.4 Atividade Biológica	21
3.4.1 Atividade antimicrobiana	21
3.4.2 Atividade antioxidante	22
3.4.3 Atividade anti-inflamatória	23
3.5 Fitocosméticos	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

CAPÍTULO I: Produção e caracterização de um Isolado Proteico de Soja e das proteínas β - conglitinina e glicinina.

Resumo	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Obtenção do Isolado Proteico de Soja	32
2.1.1.Planejamentos experimentais	33
2.1.2 Otimização das variáveis física (tempo) e química (pH) para produção do isolado proteico de soja	33
2.2 Extração das proteínas β - conglitinina e glicinina a partir do IPS	34
2.3 Hidrólise enzimática do IPS, glicinina e β - conglitinina	35
2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do IPS e das frações β - conglitinina e glicinina	35
2.5 Análise de isoflavonas no IPS e nas proteínas β - conglitinina e glicinina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	36
2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do IPS e das proteínas β - conglitinina e glicinina	37

2.7 Análise dos aminoácidos das proteínas β - conglícinina e glicínina	37
3. Análise estatística	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Otimização das variáveis física (tempo) e química (pH) para produção do IPS	38
4.2 Precipitação com ácido cítrico	42
4.3 Caracterização do IPS e das proteínas β - conglícinina e glicínina	42
4.4 Balanço de massa do IPS e das proteínas glicínina e β - conglícinina.....	44
4.5 SDS-PAGE do IPS e das frações β - conglícinina e glicínina.....	44
4.6 Análise de isoflavonas no IPS e nas proteínas β - conglícinina e glicínina por CLAE	45
4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura do IPS e das frações β - conglícinina e glicínina	47
4.8 Análise dos aminoácidos das frações β - conglícinina e glicínina.....	51
5. CONCLUSÃO	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

CAPÍTULO II: Atividade Biológica das proteínas β - conglícinina e glicínina.

Resumo	58
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 Atividade Biológica	60
2.1.1 Atividade antimicrobiana	60
2.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar.....	61
2.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	61
2.2 Atividade anti-inflamatória	62
2.3 Atividade antioxidante	63
2.3.1 Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH.....	63
2.3.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS	63
2.3.3 Atividade antioxidante pelo sistema β - caroteno/ ácido linoleico.....	64
3. Análise estatística	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66

4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar.....	66
4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	67
4.3 Atividade anti-inflamatória	68
4.4 Atividade antioxidante	70
5. CONCLUSÃO	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

CAPÍTULO III: Formulação de um Fitocosmético com a proteína glicinina

Resumo	80
1. INTRODUÇÃO	81
2. MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1 Desenvolvimento da emulsão base.....	83
2.2 Estudo de Estabilidade.....	84
2.2.1 Teste de Centrifugação	84
2.2.2 Teste de Estabilidade Acelerada.....	84
2.3 Controle microbiológico do fitocosmético	86
2.4 Atividade Biológica	86
3. Análise Estatística	87
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1 Teste de Centrifugação	87
4.2 Teste de Estabilidade Acelerada.....	87
4.3 Controle microbiológico do fitocosmético	89
4.4 Atividade Biológica	90
4.4.1 Atividade antimicrobiana	90
4.4.2 Atividade anti-inflamatória	90
4.4.3 Atividade antioxidante	90
5. CONCLUSÃO	92
6. Sugestões para trabalhos futuros.....	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma leguminosa amplamente produzida no Brasil. O crescimento da cultura no país esteve sempre associado aos avanços científicos e a disponibilização de tecnologias ao setor produtivo (FREITAS, 2011).

Os grãos de soja caracterizam-se por conter cerca de 20% de óleo e 40% de proteína. O óleo e grande parte das proteínas se encontram em corpúsculos especiais contidos nas células cotiledonares. A maior parte das proteínas da soja é classificada como globulinas. Essas proteínas são insolúveis em água no seu ponto isoelétrico (pH 4,5), mas se dissolvem em valores de pH acima ou abaixo deste ponto. As proteínas de soja quando em solução mostram-se sensíveis ao tratamento térmico e constituem mistura de macromoléculas de tamanhos, cargas e estruturas diferentes (SGARBIERI, 1996; TORREZAN e CRISTIANINI, 2005).

O farelo desengordurado de soja é o subproduto originado na produção do óleo de soja. É rico em proteínas e seu destino final é na incorporação de rações para animais devido a fácil palatabilidade e digestibilidade e para produção de concentrados e isolados proteicos. Concentrado proteico de soja é o produto preparado a partir do farelo desengordurado de soja que deve conter no mínimo 70 % (p/p) de proteínas, por outro lado, o isolado proteico de soja é a forma com maior qualidade e concentração de proteínas que deve conter no mínimo 90 % de proteínas (p/p) (SINGH *et al.*, 2008).

β - conglitinina e glicinina são proteínas de reserva dos grãos de soja em maior quantidade e junto com outras proteínas como, Lunasina, inibidores de Bowman-Birk e Kunitz são responsáveis pelas propriedades bioativas do grão. A quantidade destas proteínas depende da variedade genética e das condições climáticas onde a planta foi produzida (RICKERT, JOHNSON, MURPHY, 2004). Consequentemente, as proteínas β - conglitinina e glicinina são excelentes fontes de peptídeos bioativos.

Os peptídeos tornaram-se ingredientes ativos comuns em cosméticos (VIVO-SESE e PLA, 2007). As propriedades relatadas dos peptídeos são a manutenção do equilíbrio do tecido celular retardando o processo de

envelhecimento precoce, melhora da aparência, diminuição das linhas finas de expressão e aspereza da pele (RUIVO, 2012; SADICK *et al.*, 2014; SECCHI, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho é extrair e produzir a partir do farelo desengordurado de soja, o isolado proteico de soja e a partir deste, separar e purificar as proteínas glicinina e β - conglucina e avaliá-las quanto à atividade biológica produzindo uma emulsão fitocosmética.

2.2 Específicos

- Utilizar o farelo desengordurado de soja como fonte de extração proteica;
- Otimizar a produção do isolado proteico de soja utilizando como agente precipitante o ácido cítrico;
- Caracterizar o isolado proteico de soja; pelos métodos Kjeldahl, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Extrair duas proteínas (glicinina e β - conglucina) a partir do isolado proteico de soja;
- Identificar as isoflavonas presentes no isolado proteico de soja e nas proteínas;
- Caracterizar as proteínas glicinina e β - conglucina; pelos métodos Lowry, SDS-PAGE, MEV e perfil de aminoácidos;

- Verificar a atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* das proteínas glicinina e β - conglucininina;
- Produzir uma emulsão fitocosmética com a (s) proteína (s) que melhor obtiver (am) desempenho nas atividades biológicas;
- Avaliar a estabilidade e as condições da emulsão através do teste de estabilidade acelerada, centrifugação e de contaminação microbiológica;
- Verificar a atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* da emulsão fitocosmética.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Soja

O Brasil é o segundo maior produtor de soja, (*Glycine max* L. Merrill), no mundo, perdendo apenas para os EUA. A produção na safra 2012/2013 foi de 81,5 milhões de toneladas com uma área plantada de 27,7 milhões de hectares (CONAB, 2013). A produção de soja no Brasil é liderada pelos estados do Mato Grosso, com 29% da produção nacional; Paraná com 19,5%; Rio Grande do Sul com 15,4% e Goiás com 10,5%. Mas a produção de soja esta evoluindo também para novas áreas no Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia que em 2012/2013 corresponderam a 8,4% da produção brasileira. Em relação à exportação dos grãos de soja, 42,8 milhões de toneladas foram exportadas na safra 2012/2013. Há uma estimativa do aumento da produção de soja em 10 anos, que ocorrerá pela combinação da expansão da área em 24,3% e da produtividade em 21,8% (ABIOVE e AGROCONSULT, 2014).

O farelo e o óleo de soja são os principais produtos obtidos do processamento dos grãos. A produção do farelo na safra 2012/2013 foi de 27 milhões de toneladas e de óleo foi de 7,5 milhões de toneladas. A projeção para os próximos 10 anos é um aumento de 28,1% para o farelo e de 23,5% para o óleo. A maior parte do óleo é destinada para o consumo humano e para

produção de biodiesel, já o farelo é destinado para alimentação animal. A exportação do óleo foi de 1,3 milhão de tonelada, visto que o consumo interno foi de 5,8 milhões de toneladas e do farelo de 13,2 milhões de toneladas, visto que o consumo interno foi de 14,0 milhões de toneladas (ABIOVE e AGROCONSULT, 2014).

A soja é uma planta herbácea originária da China, pertencente à família das leguminosas, que se disseminou por vários pontos do mundo devido a sua facilidade de cultivo, alto poder nutritivo e grande variedade de subprodutos disponibilizados pelo seu processamento, com alto valor comercial. Um dos primeiros produtos a base de soja obtida pelos chineses foi o óleo de soja. Hoje, com técnicas mais aprimoradas já é possível obter vários outros, tais como: farinha integral, extrato de soja, concentrado proteico, isolado proteico, proteínas texturizadas, entre outros. No Brasil, a soja foi introduzida em 1882, mas sua produção somente atingiu níveis relevantes a partir de 1949 (YANO, 2006).

No processamento, os grãos de soja são transportados através de rolos quebradores, produzindo a soja quebrada com casca, a qual será separada no separador de cascas. A casca é moída e tostada para posterior reincorporação ao farelo de soja, dependendo do tipo de subproduto a ser comercializado. A soja sem casca segue para o condicionador e em seguida para a laminação. Na laminação, os grãos partidos passam por rolos e segue para a expansão, neste estágio, o material é pressionado com vapor para tornar-se esponjoso, seguindo para o resfriador e para o extrator de óleo. A soja é então levada ao extrator de hexano, onde são produzidas duas frações: uma fração líquida, composta pelo óleo solubilizado no hexano, e uma fração sólida, composta pelo farelo de soja. Esta fração sólida é levada ao tostador, que tem duas funções: recuperar parte do hexano ainda presente no farelo e desativar os fatores antinutricionais (inibidores de tripsina e quimiotripsina, hemaglutininas, lipase e lipoxigenase) do farelo. Enquanto isso, a fração líquida segue para processamento que envolve a recuperação do solvente hexano e a obtenção do óleo bruto que é purificado para comercialização (BELLAYER, 1999; ENDRES, 2001).

3.2 Proteínas da soja

Os componentes presentes em maiores quantidades nos grãos da soja são as proteínas (40%), os carboidratos (30%) e lipídeos (20%). A maioria das proteínas da soja são globulinas, proteínas de reserva do grão. Estas proteínas foram inicialmente classificadas, de acordo com seu coeficiente de sedimentação (S), em quatro frações: 2S, 7S, 11S e 15S (BARAC *et al.*, 2004).

As frações 7S e 11S representam cerca de 80% das proteínas contidas no grão de soja. A fração 7S é composta por β -amilase, lipoxigenase e a proteína β -conglucina que representa 92% da fração 7S. A β -conglucina é uma glicoproteína que contém resíduos de manose e glucosamina, apresenta estrutura trimérica com peso molecular (PM) entre 150-190 kDa composta por três subunidades $-\alpha$ (PM ~68 kDa), $-\alpha$ (PM ~72 kDa) e $-\beta$ (PM ~48 kDa). A fração 11S é composta pela globulina glicina que apresenta estrutura hexamera, possui PM de aproximadamente 360 kDa e apresenta vários polipeptídeos básicos (PM ~20 kDa) e ácidos (PM ~32 kDa) ligados por pontes de dissulfeto (BARAC *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2011).

A fração 2S representa cerca de 10% das proteínas e é composta por inibidores de tripsina, que são destruídos pelo tratamento térmico industrial do farelo de soja. A fração 15S representa cerca de 5-10% das proteínas e é composta por urease e globulina 15S (LIU, 1997).

As proteínas são mais solúveis em pH ácido ou básico devido a quantidade de cargas positivas ou negativas presentes na molécula a esse pH. Excesso de cargas do mesmo sinal produz repulsão entre as moléculas, que contribui para sua maior solubilidade. O pH de menor solubilidade é o pI (ponto isoelétrico) da proteína, com mesma quantidade de cargas positivas e negativas, com isso, as proteínas não se repelem, se aglutinam, formando precipitados (GIBBS *et al.*, 2004; LIU, 1997; SGARBIERI, 1996).

3.3 Isolado Proteico de Soja

A forma mais refinada de obtenção de proteínas de soja é o isolado proteico de soja (IPS) que é por definição um produto obtido de grãos de soja limpos, descascados e desengordurados, por remoção dos componentes não

proteicos e que contem no mínimo 90% de proteína, utilizando o índice de conversão do nitrogênio o valor de 6,25 ($N \times 6,25$) em base seca (SINGH *et al.*, 2008).

A aplicação final dos IPS é na composição de formulações de alimentos à base de carnes, molhos, misturas de leite, bebidas de alta concentração proteica, alimentos infantis (PEISKER, 2001; SAMOTO *et al.*, 2007), cosméticos, plásticos, antibióticos, inseticidas, nutrientes para fermentações, produtos para limpeza e adesivos (ENDRES, 2001); há indícios que o IPS promove ainda a redução do colesterol, atua na prevenção de determinados tipos de cânceres, além de apresentar atividade antioxidante, antitrombótica e efeito cardioprotetor (ISANGA e ZHANG, 2008). Isto se deve a presença de peptídeos bioativos, contendo cerca de 2 a 20 aminoácidos que, dependendo da sua sequência, pode apresentar uma função específica (MEJIA e LUMEN, 2006).

3.4 Atividade Biológica

3.4.1 Atividade antimicrobiana

O aumento crescente dos problemas com a resistência microbiana aos antibióticos vem incentivando a busca por novos métodos terapêuticos com a aplicação de peptídeos antimicrobianos (EPAND e VOGEL, 1999).

Excelente fonte de peptídeos antimicrobianos são os AMPs (*Antimicrobial Peptides*), que de acordo com Matsuzaki, (2009) foram descobertos em plantas, insetos e mamíferos. Possuem grande espectro contra bactérias gram- positivas e gram- negativas. Os AMPs possuem aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos (lisina, arginina, isoleucina, alanina, leucina, valina, metionina, histidina) caracterizando a seletividade somente contra micro-organismos não agindo contra células eucarióticas (VEIGA *et al.*, 2012). As composições e organizações das células eucarióticas e procarióticas diferem significativamente. Pode-se destacar a parede celular das bactérias gram- positivas que possuem ácido teicóico e lipoteicóico no peptideoglicano e as gram- negativas que possuem lipopolissacarídeos na membrana externa, que através destes elementos aniônicos, permitem a interação e a seleção

somente contra as bactérias patogênicas (ZASLOFF, 2002; YEAMAN e YOUNT, 2003; MATSUZAKI, 2009).

As plantas estão sempre sendo expostas a micro-organismos patogênicos e há um constante desenvolvimento de diversos mecanismos de defesa, incluindo a síntese de compostos antimicrobianos como as proteínas (PELEGRINI, 2007). Portanto, diversas proteínas com propriedades antimicrobianas são isolados de diferentes plantas (ORDÓÑEZ *et al.*, 2006). Barbosa, (2008); Farrokhi, Whitelegge e Brusslan, (2008) relatam que muitos AMPs identificados e caracterizados provenientes de plantas têm grande potencial para o desenvolvimento de drogas semelhantes aos antibióticos para humanos, mostrando uma alternativa viável como agentes terapêuticos.

3.4.2 Atividade antioxidante

Os radicais livres estão envolvidos em diferentes funções no organismo, como sinalização e regulação do crescimento celular. Entretanto, seu excesso produz efeitos deletérios, como danos ao DNA, proteínas e organelas citoplasmáticas provocando alterações na estrutura e função celular. Com isso, organismos produzem substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, como por exemplo, a enzima superóxido dismutase, porém quando a produção de antioxidantes pelo organismo é insuficiente, ocorre o estresse oxidativo, que através de várias reações degradativas, ocorre o envelhecimento precoce e doenças degenerativas (ALVES *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, os peptídeos com capacidade antioxidante têm atraído à atenção de pesquisadores, devido seu baixo peso molecular, fácil absorção e alta atividade biológica (XIE *et al.*, 2008).

A capacidade antioxidante de peptídeos provenientes da soja já foi descrita na literatura por Chen *et al.*, (1996); Moure, Domínguez e Parajó, (2006); Peña-ramos e Xiong, (2002); Sarmadi e Ismail, (2010). Elias, Kellerby e Decker, (2008) relataram que todos os 20 aminoácidos que compõem as proteínas têm potencial de interagir com os radicais livres, doando elétrons e neutralizando-os.

3.4.3 Atividade anti-inflamatória

O envelhecimento precoce da pele é causado por vários fatores como, exposição demasiada aos raios ultravioleta (UVA/UVB), fumo e processos inflamatórios (RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013)

O processo inflamatório tem sido relacionado a diferentes grupos de substâncias, como a enzima hialuronidase que atua despolimerizando o ácido hialurônico, um polissacarídeo que se encontra nos tecidos conectivos presente na matriz extracelular (AGUIAR, 2004; SGARIGLIA *et al.*, 2013) responsável pela viscoelasticidade e hidratação da pele, que envelhecida mostra uma diminuição desta matriz, degradação do colágeno e diminuição de fibroblastos (EL-SAFORY, FAZARY e LEE, 2010).

Os peptídeos têm a capacidade de regenerar a matriz extracelular, bem como, aumentar a produção de colágeno (SADICK *et al.*, 2014). Portanto, os peptídeos têm um grande potencial na utilização no tratamento de inflamações cutâneas (LANG e KOFLER, 2011).

3.5 Fitocosméticos

Inovações cosméticas estão em amplo crescimento e um dos fatores fundamentais para expansão são as investigações científicas (RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2013).

Fitocosméticos podem ser definidos como o cosmético que contém ativo natural, de origem vegetal (ISAAC *et al.*, 2008). É uma maneira segura e eficaz para melhorar os efeitos indesejáveis do envelhecimento exercendo efeito local sem absorção sistêmica. Geralmente são bem tolerados e sem grande efeito adverso (SADICK *et al.*, 2014).

Os peptídeos provenientes de plantas podem ser utilizados em formulações cosméticas e a maioria dos peptídeos utilizados para este fim são oriundos de proteínas simples como fibrilares e globulares. Os peptídeos provenientes do glúten de trigo e da proteína de soja são os que apresentam maior interesse da indústria para formulação de fitocosméticos (SECCHI, 2008). De acordo com Allemann e Baumann, (2009) as proteínas de soja apresentam atividade regeneradora do tecido cutâneo e ação despigmentante.

A estabilidade das emulsões pode ser influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos estão à incompatibilidade entre os componentes da formulação seja ativo ou não e para os fatores extrínsecos estão o tempo, a temperatura, luz, umidade e material de acondicionamento (BRASIL, 2004; CEFALI, 2009; ISAAC *et al.*, 2008).

Com isso, pode-se constatar o grande potencial do uso do farelo desengordurado de soja, um subproduto da indústria, para obtenção de isolado proteico de soja e consequentemente a obtenção de proteínas/ peptídeos com alto valor agregado para a formulação de um fitocosmético, com propriedades biológicas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE. **Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais**. Disponível em: <www.abiove.org.br>. Acesso em: 16 mar. 2014.

AGROCONSULT. **Consultoria e Projetos**. Disponível em: <www.agroconsult.com.br>. Acesso em: 16 mar. 2014.

AGUIAR, C. **Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine max* L.) e o efeito na atividade biológica *in vitro***. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP), 2004.

ALLEMANN, I.B. e BAUMANN, L. Botanicals in skin care products. **Int J Dermatol**, v. 48, n. 9, p. 923–934, 2009.

ALVES, C.Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

BARAC, M.B. *et al.* Soy protein modification - a review. **Acta Periodica Technol**, v. 35, p. 3–16, 2004.

BARBOSA, M. **Prospecção de peptídeos antimicrobianos de soja (*Glycine max*) utilizando ferramentas proteômicas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, (UFV), 2008.

BELLAVER, C. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves. **Congresso Brasileiro de Soja - Embrapa Soja**, p. 183–199, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos - séries temáticas**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 17 jul. 2013. 2004.

CEFALI, L. **Desenvolvimento e atividade do fitocosmético contendo licopeno para o combate à aceleração do envelhecimento cutâneo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, (UNESP), 2009.

CHEN, H.M. *et al.* Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2619–2623, 1996.

CONAB. **Levantamento de safras**. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 30 nov. 2013.

ELIAS, R.J.; KELLERBY, S.S.; DECKER, E.A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Science**, v. 48, p. 37–41, 2008.

EL-SAFORY, N.S.; FAZARY, A.E.; LEE, C.K. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. **Carbohydr Polym**, v. 81, n. 2, p. 165–181, 2010.

ENDRES, J. **Soy protein products: characteristics, nutritional aspects and utilization**. AOCS Press ed. 61 p., 2001.

EPAND, R.M. e VOGEL, H.J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim Biophys Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 11–28, 1999.

FARROKHI, N.; WHITELEGGE, J. P.; BRUSSLAN, J.A. Plant peptides and peptidomics. **Plant Biotechnol J**, v. 6, n. 2, p. 105–134, 2008.

FREITAS, M.A. cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1–12, 2011.

GIBBS, B.F. *et al.* Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Res Int**, v. 37, n. 2, p. 123–131, 2004.

ISAAC, V.L.B. *et al.* Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev Ciên Farm Básica Apl**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

ISANGA, J. e ZHANG, G.N. Soybean Bioactive Components and their Implications to Health—A Review. **Food Rev Int**, v. 24, n. 2, p. 252–276, 2008.

LANG, R. e KOFLER, B. The galanin peptide family in inflammation. **Neuropeptides**, v. 45, n. 1, p. 1–8, 2011.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. Springer ed. 532 p. 1997.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1687–1692, 2009.

MEJIA, E. e LUMEN, B. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases. **Sex, Reprod Menopause**, v. 4, n. 2, p. 91–95, 2006.

MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Proc Biochem**, v. 41, n. 2, p. 447–456, 2006.

ORDÓÑEZ, R.M. *et al.* Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. **Peptides**, v. 27, n. 6, p. 1187–1191, 2006.

PEISKER, M. Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition. **Cah Options Méditerr**, v. 54, 2001.

PELEGRINI, P. **Peptídeos vegetais: novas ferramentas no controle de patógenos humanos e de plantas**. Tese de Doutorado. Universidade Católica de Brasília, (UCB), 2007.

PEÑA-RAMOS, E.A. e XIONG, Y.L. Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. **J Food Scien**, v. 67, n. 8, p. 2952–2956, 2002.

QI, G. *et al.* Physicochemical Properties of Soy Protein Adhesives Obtained by In Situ Sodium Bisulfite Modification During Acid Precipitation. **J Am Oil Chem Soc**, v. 89, n. 2, p. 301–312, 2011.

RAMOS-E-SILVA, M. *et al.* Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. **Clin Dermatol**, v. 31, n. 6, p. 750–758, 2013.

RICKERT, D.; JOHNSON, L.; MURPHY, P. Functional Properties of Improved Glycinin and β - Conglycinin Fractions. **J Chemi Toxicol**, v. 69, n. 4, p. 303–311, 2004.

RUIVO, J. **Fitocosmética: aplicação de extratos vegetais em cosmética e dermatologia**. Dissertação de Mestrado. Universidade Fernando Pessoa, 2012.

SADICK, N.S. *et al.* Next Generation Cosmeceuticals. **Dermatol Clinics**, v. 32, n. 1, p. 13–21, 2014.

SAMOTO, M. *et al.* Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. **Food Chem**, v. 102, n. 1, p. 317–322, 2007.

SARMADI, B.H. e ISMAIL, A. Peptides Antioxidative peptides from food proteins : A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.

SCARBIERI, V. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. Livraria Varela, 517p. 1996.

SECCHI, G. Role of protein in cosmetics. **Clin Dermatol**, v. 26, n. 4, p. 321–325, 2008.

SGARIGLIA, M.A. *et al.* Anti-inflammatory properties of phenolic lactones isolated from *Caesalpinia paraguariensis* stem bark. **J Ethnopharmacol**, v. 147, n. 1, p. 63–73, 2013.

SINGH, P. *et al.* Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, v. 7, p. 14–28, 2008.

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

VEIGA, A.S. *et al.* Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels. **Biomaterials**, v. 33, n. 35, p. 8907–8916, 2012.

VIVO-SESÉ, I. e PLA, M. Bioactive ingredients in cosmetics. **Anal Cosm Prod**, p. 380-389, 2007.

WU, Y. *et al.* Inhibitory effect of antioxidant peptides derived from *Pinctada fucata* protein on ultraviolet-induced photoaging in mice. **J Funct Foods**, v. 5, n. 2, p. 527–538, 2013.

XIE, Z. *et al.* Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. **Agriculture**, v. 111, p. 370–376, 2008.

YANO, H. **Determinação de isoflavonas em formulações farmacêuticas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, (USP), 2006.

YEAMAN, M.R. e YOUNT, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol Rev**, v.55, p. 27-55, 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 2002.

Capítulo I: Produção e caracterização de um Isolado Proteico de Soja e das proteínas β - conglycinina e glicinina

Resumo

O isolado proteico de soja é o produto mais refinado obtido a partir do subproduto da indústria de processamento de grãos de soja, o farelo desengordurado de soja. Para a precipitação proteica pode ser utilizado o ácido cítrico, este ácido é usado em grande escala na indústria alimentícia como, acidulante e realçador do sabor cítrico. As proteínas β - conglycinina e glicinina são as proteínas de maior quantidade no isolado proteico de soja e há relatos na literatura que possuem atividade biológica. Portanto o objetivo deste capítulo foi otimizar a produção do isolado proteico de soja utilizando ácido cítrico como agente precipitante e a partir do isolado, extrair as duas proteínas β - conglycinina e glicinina. Realizou-se a caracterização do isolado proteico e das proteínas obtidas através de técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida, microscopia eletrônica de varredura e somente para as proteínas β - conglycinina e glicinina foi realizado o perfil de aminoácidos. Os resultados obtidos mostraram que o ácido cítrico pode ser utilizado como agente precipitante e o isolado proteico obtido manteve as características de isolado, com 94,6% de proteínas. Pode-se também confirmar que as proteínas extraídas são a β - conglycinina com 83,8% de proteínas e a glicinina com 88,4% de proteínas e que mantiveram as características necessárias. Portanto, conclui-se que o ácido cítrico pode ser utilizado como agente precipitante não alterando as características básicas do isolado proteico de soja que serviu como fonte de extração das proteínas β - conglycinina e glicinina.

Palavras- chave: Farelo Desengordurado de Soja, Isolado Proteico de Soja, glicinina e β - conglycinina.

1. INTRODUÇÃO

A soja é uma das mais versáteis culturas mundiais, amplamente cultivada proporcionando uma variedade de produtos e subprodutos para o consumo humano, animal e aplicações industriais. O grão, inicialmente é cultivado para extração de óleo e de componentes para ração animal, porém seus produtos proteicos (farinha, concentrados e isolados) atualmente são utilizados em grande escala pela indústria alimentícia e cosmética (DINIZ, 2007).

O principal componente nutricional dos grãos de soja são as proteínas, obtidas a partir do subproduto, o farelo desengordurado, oriundo da produção do óleo de soja. A obtenção do óleo e do farelo ocorre em três etapas: armazenamento dos grãos, preparação dos grãos e extração do óleo. O armazenamento antecede a produção do óleo onde os grãos permanecem em locais com temperatura e umidade controladas. Na preparação ocorre a pré-limpeza no qual são retirados grãos quebrados e impurezas, após acontece o descascamento e a trituração para facilitar a extração do óleo que através de prensas mecânicas utilizando hexano como solvente extrator, o óleo é extraído, purificado e refinado. O farelo obtido passa por um tratamento térmico para inativação de fatores antinutricionais, como os inibidores de tripsina, bem como substâncias que causam sabores desagradáveis. O hexano é retirado do óleo e do farelo através de evaporação a vácuo (MANDARINO e ROESSING, 2001).

A forma mais purificada para obtenção de proteínas a partir do farelo desengordurado é através do isolado proteico de soja que é considerado a maior fração proteica pela remoção dos constituintes não proteicos, como os carboidratos (LUI *et al.* 2003; LUI, 2004).

Em escala laboratorial o isolado proteico de soja é produzido através da precipitação das proteínas utilizando uma solução aquosa de ácido clorídrico ou ácido tricloroacético (LUI *et al.*, 2003; SCILINGO e AÑÓN, 2004). Estes ácidos são poluentes ambientais e ocasionam danos à saúde, causando queimaduras na pele e irritações nas vias respiratórias (SALMON *et al.*, 1999). Uma alternativa para precipitação ácida é a utilização de outros ácidos

utilizados na indústria alimentícia que não prejudicam a saúde e produzem o mesmo efeito desejado na precipitação.

Um destes ácidos utilizados na indústria é o ácido cítrico, presente naturalmente nas frutas cítricas. Devido às propriedades de acidulante, atoxicidade, tamponamento e facilidade de assimilação pelo organismo humano, o ácido cítrico apresenta uma série de aplicações industriais. Na indústria alimentícia é utilizado como aditivo na fabricação de refrigerantes, sobremesas, conservas de frutas e doces. Também em bebidas em pó para realçar o sabor (NAJAFPOUR, 2007; REDDY *et al.*, 2012). Com tudo, ideal para ser utilizado na precipitação das proteínas da soja, sem causar qualquer dano à saúde.

O isolado proteico de soja deve conter mais de 90% de proteínas (p/p), no qual em torno de 80% são globulinas. Por serem majoritárias, são de um modo geral, responsáveis pelas propriedades nutricionais dos grãos, farinhas e produtos obtidos. Existem várias formas de extração, com pHs, tempos e temperaturas diferentes, depende da qualidade e quantidade de proteínas no farelo desengordurado, todavia é fundamental a execução de planejamentos experimentais para identificar as variáveis ótimas a fim de se obter um isolado proteico com mais de 90% de proteínas (p/p) (LUI, 2004).

A maioria destas globulinas são conhecidas como proteínas β -conglícinina (7S) e glicínina (11S). A proteína β -conglícinina é formada por trímeros de polipeptídeos enquanto que a proteína glicínina é formada por hexâmeros de polipeptídeos. A composição e quantidade destas globulinas nos grãos de soja são influenciadas pela espécie de cultivar, solo, clima e temperatura durante a germinação dos grãos (FASSINI, 2010).

Portanto, a soja é uma fonte de produtos e subprodutos, como o farelo desengordurado de soja que pode ser utilizado para extração e produção de um isolado proteico de soja com proteínas com alto valor agregado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do Isolado Proteico de Soja

A figura 1 detalha todo o procedimento de obtenção do Isolado Proteico de Soja (IPS) a partir do farelo desengordurado de soja.

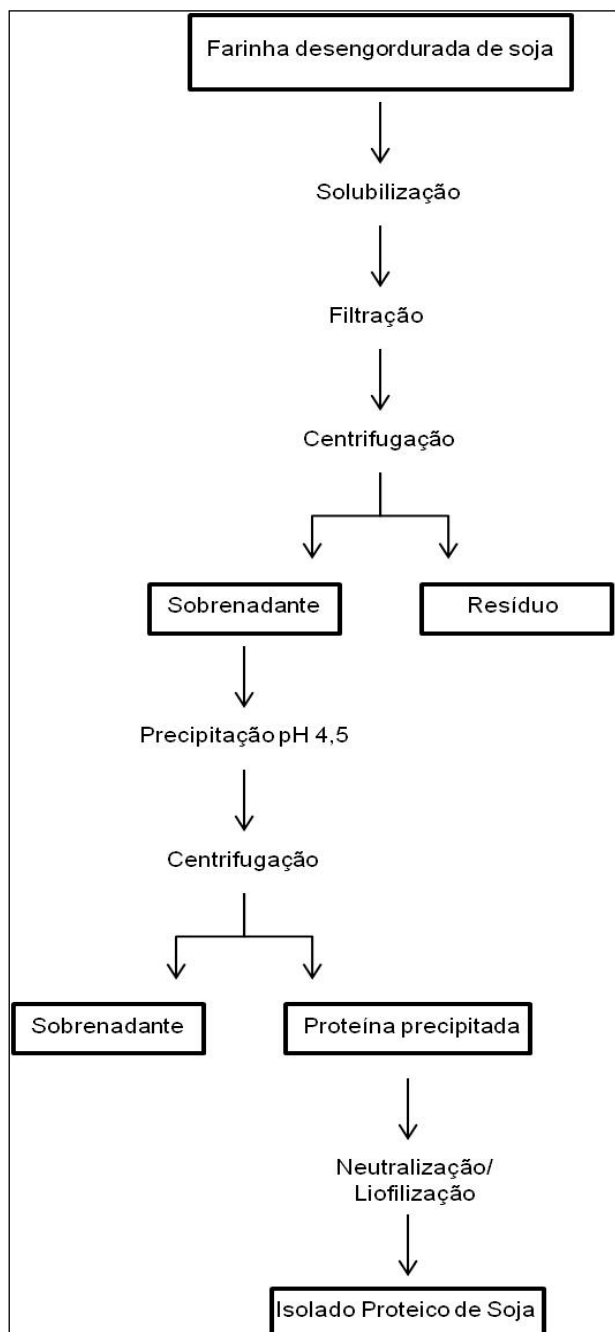


Figura 1: Fluxograma de produção do Isolado Proteico de Soja.

O farelo desengordurado de soja (FDS') com 46% de proteína (p/p) foi gentilmente cedido pela indústria IMCOPA Importação, Exportação e Indústria de Óleos Ltda, localizada na cidade de Araucária- Paraná/Brasil.

Este farelo foi moído em moedor elétrico até obtenção de uma farinha desengordurada de soja (FDS), após foi feita uma suspensão aquosa (1:20 p/v) com a correção de pH, no qual foi mantida a 25°C sob agitação de 120 rpm com determinado tempo. Esta suspensão foi filtrada com gaze de 13 fios e o líquido obtido centrifugado a 9.000 rpm por 20 min a 4°C. No sobrenadante foi adicionado uma solução aquosa de ácido cítrico 3N (pureza 99,5% p/p) até atingir o pH 4,5 e esta solução foi mantida a 25°C sob agitação de 120 rpm por determinado tempo. Após esta solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 min a 4°C, o precipitado foi recolhido, o pH ajustado para 7,0 e dialisado utilizando a membrana de diálise (Spectra/Por® 6 - 3.500 kDa) em água destilada por 48 h. O precipitado foi liofilizado para quantificação proteica pelo método Kjeldahl, determinação da umidade pelo método gravimétrico em estufa à 105°C e determinação de cinzas pelo método de incineração em mufla à 550°C (AOAC, 1995). A FDS após a filtração, o resíduo obtido após a primeira centrifugação rico em polissacarídeos, o sobrenadante obtido após a precipitação proteica também foram liofilizados para posterior análise do teor de proteínas, através do método Kjeldahl.

2.1.1 Planejamentos experimentais

Foram realizados dois planejamentos experimentais a fim de avaliar as variáveis importantes do processo de extração das proteínas do farelo desengordurado de soja como o tempo de extração e o pH da suspensão.

2.1.2 Otimização das variáveis física (tempo) e química (pH) para produção do isolado proteico de soja.

O primeiro planejamento experimental foi do tipo fatorial completo com 02 variáveis em 02 níveis e 03 repetições no ponto central totalizando 07 ensaios. Os níveis utilizados para cada variável estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^2 , para as variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja.

Variáveis	-1	Níveis 0	+1
Tempo (h)	12	18	24
pH	7,0	7,5	8,0

Através dos resultados obtidos com o primeiro planejamento foi realizado o segundo planejamento experimental que foi do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com as 02 variáveis com 04 pontos axiais e 03 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Os níveis estudados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , para as variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja.

Variáveis	-1,42	-1	Níveis 0	+1	+1,42
Tempo (h)	31	36	48	60	65
pH	8,0	8,5	9,5	10,5	11,0

2.2 Extração das proteínas β - conglucina e glicina a partir do IPS.

A extração das proteínas β - conglucina e glicina foi de acordo com Giora, (2009) e Nagano *et al.*, (1992). O IPS foi homogeneizado em água destilada (1:10 p/v), em seguida metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) foi adicionado (0,98 g/l) e o pH ajustado para 6,4. A solução foi mantida à 4°C por 12 h. Após este período a solução foi centrifugada a 9,500 rpm por 30 min à 4°C. O precipitado obtido foi suspenso em água destilada e o pH ajustado para 7,0, caracterizando a proteína glicina ou 11S. No sobrenadante cloreto de sódio (NaCl) foi adicionado (0,25 mol/l) e o pH ajustado para 5,5. Novamente foi centrifugado a 9,500 rpm por 30 min à 4°C e no sobrenadante obtido o pH

foi ajustado para 4,8 e realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, o precipitado obtido foi suspenso em água destilada e o pH ajustado para 7,0, caracterizando a proteína β - conglucina ou 7S. As proteínas foram dialisadas com membrana de diálise (Spectra/Por® 6 – 3.500 kDa) em água destilada por 48 h.

As suspensões foram liofilizadas e mantidas à 4°C. Cinzas e umidade foram determinadas (AOAC, 1995) e a quantificação proteica foi determinada pelo método Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

2.3 Hidrólise enzimática do IPS, glicina e β - conglucina

O procedimento para a hidrólise enzimática foi de acordo com Peña-Ramos e Xiong, (2002) e Roblet *et al.*, (2005). O IPS e as proteínas glicina e β - conglucina foram homogeneizadas em água destilada (2% p/v) e pré-aquecidas à 37°C por 30 min. Após o pH foi ajustado para 1,3 com HCl 2N e adicionou-se a solução de pepsina diluída em HCl 0,01N, com a relação final enzima substrato 1:100 e a hidrólise ocorreu durante 2 h. A reação foi interrompida aumentando o pH para 7,0, com NaOH 2N. O IPS e as proteínas foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 min para remover o resíduo não hidrolisado e as soluções obtidas foram dialisadas com membrana de diálise (Spectra/Por® 6 – 3.500 kDa) em água destilada por 48 h. As suspensões foram liofilizadas e mantidas à 4°C para posteriores análises.

2.4 SDS-PAGE do IPS e das frações β - conglucina e glicina.

A técnica de eletroforese SDS-PAGE foi realizada de acordo com Laemmli, (1970). As amostras foram preparadas em condições redutoras com β -mercaptoetanol (β -ME) utilizando concentração de 12% para o gel de separação e 5% para o gel de empilhamento. Peso molecular foi utilizado (Amersham full-range rainbow) para determinar os pesos moleculares das proteínas. A eletroforese foi realizada com 200 V por 5 h. O gel foi corado com a solução Coomassie Brilliant Blue R-250 por 24 h e descorado com uma solução de ácido acético glacial e metanol. A imagem foi feita no equipamento Transiluminator Loccus L.PIX Molecular Image.

2.5 Análise de isoflavonas no IPS e nas proteínas β - conglucina e glicina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A análise de isoflavonas foi de acordo com Mantovani *et al.*, (2009). O procedimento foi realizado na Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob a supervisão do Prof. Dr. Daniel Mantovani.

As amostras liofilizadas foram eluídas em metanol 80% (1:10 p/v) sob agitação por 30 min. A seguir, as amostras foram centrifugadas à 5,000 rpm por 15 min. Os sobrenadantes foram filtrados utilizando papel de filtro Whatman nº1 e posteriormente filtrados com membrana 0,22 μ m (Millipore, MA, USA).

A técnica cromatográfica utilizou o equipamento de CLAE composto por uma coluna (Hypersil ODS C 18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm), 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 μ L, degaseificador (Shimadzu, modelo DGU-14A) e software Shimadzu CLASS-VP® Release (Versão 6.14 SP1).

As isoflavonas foram isoladas utilizando gradiente de eluição, com vazão de solvente de 1 ml/min, mantendo a temperatura da coluna em 30°C. A fase móvel A (solvente A) consistiu em: água ultrapura + 0,1% de ácido acético e a fase móvel B (solvente B) consistiu em: acetonitrila + 0,1% de ácido acético. O gradiente foi iniciado com 86% de solvente A até 8 min, decrescendo para 50% entre 9 e 25 min permanecendo até 33 min no qual, sobe novamente para 86% até 35 min. A detecção foi feita a 254nm e espectro entre 200-300nm.

As concentrações de isoflavonas foram identificadas e quantificadas em μ g/g de amostra 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 (Sigma Co. EUA).

2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura do IPS e das proteínas β - conglucina e glicina.

A análise do isolado proteico de soja e das frações proteicas foi de acordo com Nagano e Tokita, (2011) e Zhao *et al.*, (2011). As amostras foram fixadas nos suportes de metal com uso de fita adesiva e metalizadas com ouro em alto vácuo em Sputter (120 s/30 mA). A observação foi feita em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM – 6360LV), com ampliações de 100, 400 e 1,600 vezes.

2.7 Análise dos aminoácidos das proteínas β - conglucina e glicina.

A determinação dos aminoácidos que compõe a cadeia de polipeptídeos envolve duas etapas, a hidrólise total das amostras e análise cromatográfica (FOUNTOULAKIS e LAHM, 1998). As amostras foram hidrolisadas com ácido clorídrico 6N contendo 0,2% de fenol e 0,2% de azida sódica (p/v). A hidrólise foi feita à 105°C por 24 h, sobre sistema de vácuo a fim de minimizar a degradação dos aminoácidos. As amostras foram filtradas com membrana 0,22 μ m (Millipore, MA, USA) para remoção de partículas e a solução foi evaporada em estufa á vácuo (Vacucell MMM-group) para remoção do ácido. As amostras (1 μ g/ml) foram dissolvidas na solução tampão específica do equipamento e analisadas no Sykam amino acid analyzer S 433.

3. Análise estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão de triplicatas. Foram analisados pelo Statistica 5.0 Software (Statsoft, Tulsa, OK, USA) e pelo Graphpad prism 5.0 Software (San Diego, CA, USA). Diferenças foram analisadas usando ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização das variáveis física (tempo) e química (pH) para produção do IPS.

Na tabela 3 estão apresentados os resultados do planejamento fatorial completo para otimização das variáveis física e química. A melhor produção foi com o tempo totalizando 24 h e pH 8,0 obtendo 70,5% de proteína (ensaio 1). Os pontos centrais com o tempo de 18 h e pH 7,5 obtiveram o segundo melhor resultado com média de 46,7% de extração proteica (ensaios 5, 6 e 7).

Os menores valores obtidos foram com o tempo 12 h e pH 7,0; 12 h e pH 8,0 e 24 h e pH 7,0 (ensaios 4, 3 e 2) obtendo 10,4%; 27,7% e 38,6% de extração proteica respectivamente.

Tabela 3: Planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^2 , para as variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja.

Ensaio	Tempo	pH	Proteína (%)
1	1 (24)	1 (8,0)	70,5
2	1 (24)	-1 (7,0)	38,6
3	-1 (12)	1 (8,0)	27,7
4	-1 (12)	-1 (7,0)	10,4
5 (C)	0 (18)	0 (7,5)	46,8
6 (C)	0 (18)	0 (7,5)	46,4
7 (C)	0 (18)	0 (7,5)	47,0

Pode-se observar na análise de variância (ANOVA), na tabela 3, que as variáveis tempo e pH foram significativos para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) e influenciaram positivamente na produção do isolado proteico de soja, ou seja, aumentando o tempo e o pH, aumenta-se a produção do isolado proteico de soja, o R^2 obtido foi de 0,9189 e o R ajustado obtido foi de 0,8378 (Tabela 4).

Tabela 4: ANOVA da otimização das variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	Razão f	Razão p
(1) Tempo	1260,250	1	1260,250	22,32676	0,017959
(2) pH	605,160	1	605,160	10,72110	0,046625
1 com 2	53,290	1	53,290	0,94409	0,402894

Isto também pode ser verificado no diagrama de Pareto (Figura 2). Neste diagrama pode-se observar que as variáveis tempo e o pH foram significativas ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$), o que justificou novos estudos com estas duas variáveis para definir o tempo e o pH ideais para produção de um isolado proteico de soja com mais de 90% de proteína em base seca.

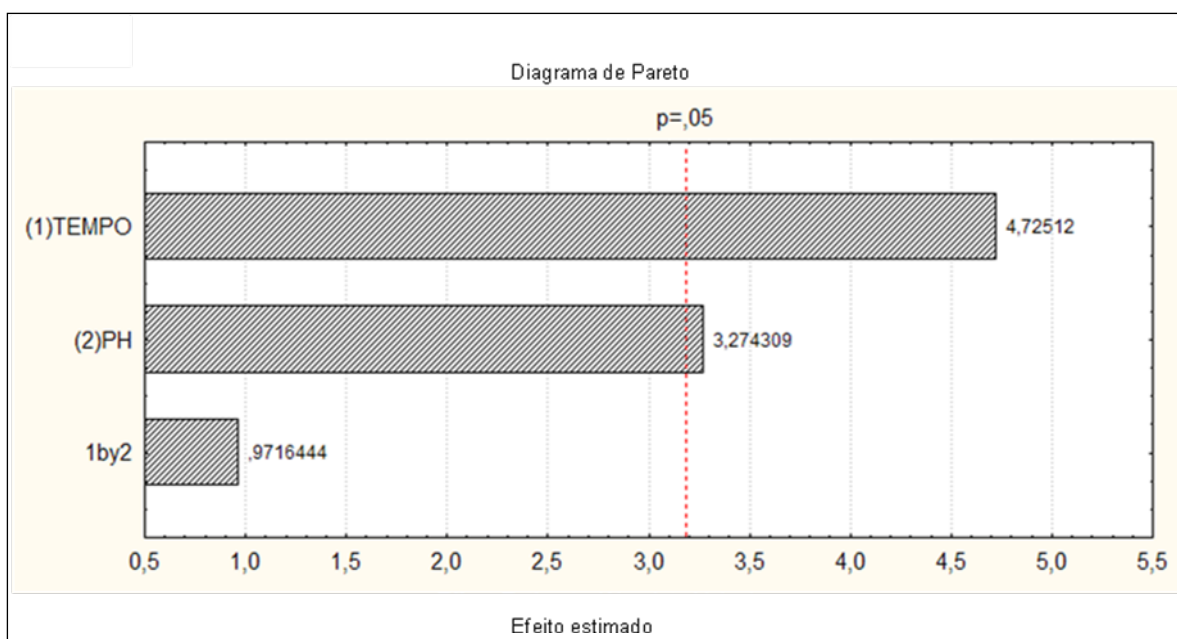


Figura 2: Diagrama de Pareto para o modelo obtido no planejamento experimental fatorial completo 2^2 .

Devido ao planejamento anterior não ter atingido o ponto ótimo de concentração proteica para produção do isolado proteico de soja, realizou-se um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR). Para este estudo valeu-se das mesmas variáveis do

planejamento fatorial completo 2^2 por influenciarem positivamente no processo. Na tabela 5 observam-se os resultados obtidos nesta análise.

Tabela 5: Planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) para as variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja.

Ensaio	Tempo	pH	Proteína (%)
1	-1 (36)	-1 (8,5)	80,4
2	-1 (36)	1 (10,5)	65,9
3	1 (60)	-1 (8,5)	68,2
4	1 (60)	1 (10,5)	63,7
5	-1,42 (31)	0 (9,5)	59,1
6	1,42 (65)	0 (9,5)	55,4
7	0 (48)	-1,42 (8,0)	75,0
8	0 (48)	1,42 (11,0)	40,5
9 (C)	0 (48)	0 (9,5)	94,7
10 (C)	0 (48)	0 (9,5)	94,6
11 (C)	0 (48)	0 (9,5)	94,4

Analisando os resultados da tabela 5, observa-se que os melhores resultados foram alcançados nas condições do ponto central, ou seja, para produção do isolado proteico de soja foi 48 h e pH 9,5 obtendo a média de 94,6% de proteínas.

A importância deste estudo está na tabela 6, no qual a análise de variância (ANOVA) mostra que os fatores tempo com interação quadrática e pH com interação linear e quadrática foram significativos a nível de 95% de confiança ($p < 0,05$), R^2 obtido foi de 0,90022 e o R ajustado obtido foi de 0,80043.

Tabela 6: ANOVA da otimização das variáveis física (tempo) e química (pH) para obtenção do Isolado Proteico de Soja a partir da Farinha desengordurada de soja.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	Razão f	Razão p
(1) Tempo (L)	48,141	1	48,141	0,76286	0,422392
Tempo (Q)	1462,907	1	1462,907	23,18194	0,004821
(2) pH (L)	588,890	1	588,890	9,33183	0,028269
pH (Q)	1420,307	1	1420,307	22,50688	0,005131
1L com 2L	25,000	1	25,000	0,39616	0,556713

Estes resultados confirmam a importância destas duas variáveis para o processo de produção do isolado proteico de soja.

O resultado desta otimização gerou um gráfico de superfície de resposta (Figura 3), na qual é possível observar que o melhor resultado para produção do isolado proteico de soja foi obtido na condição central das variáveis.

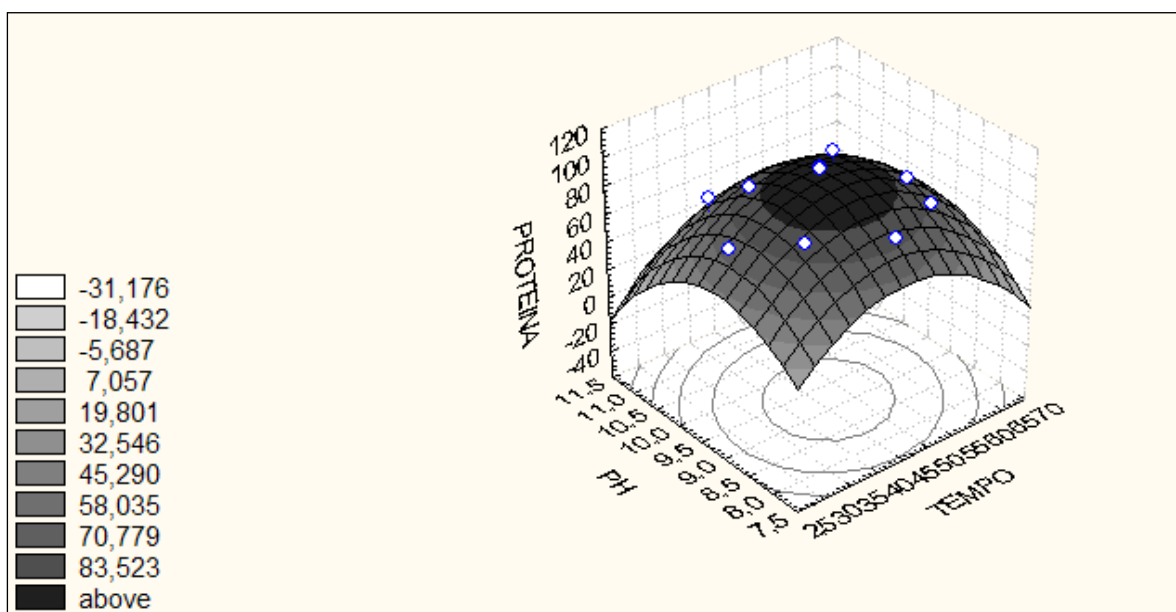


Figura 3: Gráfico de superfície de resposta gerada no planejamento experimental 2^2 DCCR.

Portanto, a maior produção de isolado proteico de soja alcançada neste experimento foi com o tempo total de 48 h de extração com o pH inicial de 9,5.

Deak e Johnson, (2007), estudaram o efeito da temperatura no rendimento da extração proteica e constataram que não houve diferença significativa entre as temperaturas 25°C, 40°C e 60°C, obtendo 92% de proteínas no IPS. Portanto, a utilização da temperatura de 25°C foi adequada e correta não prejudicando a extração proteica, facilitando todo o processo de produção, já que temperaturas maiores requerem equipamentos específicos, que suportem altas temperaturas; Lusas e Riaz, (1995) relatam que os IPS em escala laboratorial devem ser produzidos com pH entre 7,8-10, temperaturas entre 20-60°C e tempo de extração entre 12-48 h e a escolha da faixa adequada depende da qualidade da farinha desengordura de soja e a finalidade do IPS.

4.2 Precipitação com ácido cítrico

Lui *et al.*, (2003) produziram a partir de uma FDS (56% proteína p/p) (1:20 p/v) um IPS utilizando o pH 9,0, temperatura de 55°C e precipitação proteica com HCl 2N e obtiveram 95,2% de proteínas no IPS. Souza (2000) produziu um IPS a partir da FDS (56% proteína p/p) (1:10 p/v) e precipitação proteica com 2N HCl e obteve 96% de proteínas no IPS. Conclui-se que a utilização do ácido cítrico não prejudicou a produção do IPS e está de acordo com a literatura, apesar de que o rendimento proteico foi pouco menor em relação a estes trabalhos.

4.3 Caracterização do IPS e das proteínas β - conglícinina e glicínina.

A tabela 7 e a figura 4 mostram as características do isolado proteico de soja e das proteínas β - conglícinina e glicínina.

Tabela 7: Característica do isolado proteico de soja e das proteínas β - conglucina (7S) e glicina (11S)*.

Amostras/ Análises**	Proteína (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)
IPS	94,6 $\pm$ 0,2 ^a	2,6 $\pm$ 0,1 ^a	2,1 $\pm$ 0,05 ^a
7S	83,8 $\pm$ 0,4 ^b	2,2 $\pm$ 0,3 ^b	1,6 $\pm$ 0,02 ^b
11S	88,4 $\pm$ 0,2 ^c	2,0 $\pm$ 0,2 ^c	2,3 $\pm$ 0,03 ^c

*Média $\pm$ desvio padrão de triplicatas

**Valores na mesma coluna seguidos por letras diferentes significa diferença significativa
Teste Tukey (p < 0,05)

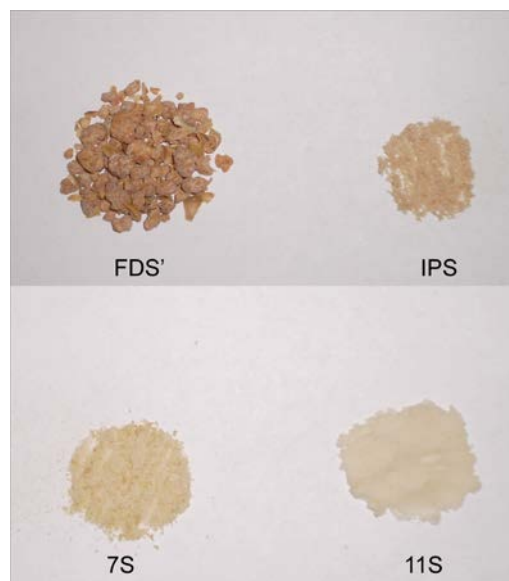


Figura 4: Aspecto morfológico do farelo desengordurado de soja (FDS'), isolado proteico de soja (IPS) e das proteínas β - conglucina (7S) e glicina (11S).

A quantidade de proteína encontrada no isolado proteico de soja, determinado pelo método Kjeldahl foi de 94,6% (N x 6,25), confirmando que a amostra realmente é um IPS por conter mais de 90% de proteína (DEAK e JOHNSON, 2007). A proteína β - conglucina (7S) contém 83,8% de proteínas e a proteína glicina (11S) contém 88,4% de proteínas. As duas proteínas mostraram valores similares encontradas em outras pesquisas feitas por Puppo *et al.*, (2011) que encontraram 85,9% para a proteína 7S e 88,2% para a proteína 11S e Tarone *et al.*, (2013) que encontraram 84,3% para a proteína 7S, porém um valor menor de 83,0% para a proteína 11S. Por outro lado, os valores obtidos nesta pesquisa foram diferentes de Samoto *et al.*, (2007) que obtiveram 87,0% para a proteína 7S e 93,1% para a proteína 11S, esta diferença provavelmente ocorreu porque estes autores utilizaram ácido sulfúrico, ou seja, outro método para extração destas frações proteicas.

4.4. Balanço de massa do IPS e das proteínas glicinina e β - conglucina.

O rendimento de extração do IPS em escala laboratorial foi de 40,8% (p/p) em relação à FDS. Lui (2003), extraiu o IPS utilizando HCl 2N como agente precipitante a partir da solução com o pH 9,0 e temperatura de 55°C e obteve um rendimento de 38% utilizando uma FDS com 56% de proteína (p/p). Portanto, o rendimento obtido neste trabalho foi superior devido a FDS conter 46% de proteína (p/p) e em uma temperatura menor, o que facilita o processo de extração. Constatou-se também que o ácido cítrico pode ser utilizado como agente precipitante, não causando perdas no rendimento de extração do IPS em relação à FDS. Berk (1992) relata que processamentos em escala laboratorial podem recuperar até 84% do total de proteínas presentes na matéria-prima, que contém geralmente 50% de proteínas, o que resulta em um rendimento de 42% (p/p). Neste trabalho houve uma recuperação de 83,9% de proteínas em relação à matéria-prima, a FDS. Pode-se concluir que os resultados obtidos neste experimento estão superiores aos relatados na literatura já que a matéria-prima utilizada contém 46% de proteína (p/p). Em relação às frações proteicas, obteve-se um rendimento de 44,6% para a proteína β - conglucina e 53,2% para a proteína Glicina, confirmando que o IPS contém mais de 80% destas globulinas (SCILINGO e AÑÓN, 2004; VERNAZA *et al.*, 2012).

4.5 SDS-PAGE do IPS e das frações β - conglucina e glicina.

Os perfis eletroforéticos do isolado proteico de soja e das frações proteicas estão na Figura 5.

O peso molecular da fração β - conglucina ficou entre 48 a 75 kDa e o peso molecular da fração glicina ficou entorno de 20 kDa e 30 kDa correspondendo as subunidades básica e ácida, respectivamente.

De acordo com Sitohy, Mahgoub e Osman, (2012) quando se consegue isolar estas duas subunidades indica uma boa separação eletroforética e isto só é possível com o uso do β -mercaptoetanol que rompe as ligações de dissulfeto presentes nesta proteína. O perfil do SDS-PAGE esta semelhante a

outros relatados na literatura que utilizaram as mesmas condições, como Bittencourt *et al.*, (2007); Fassini, (2010); Medrano e Del castillo, (2011); Qi *et al.*, (2011); Souza, (2000).

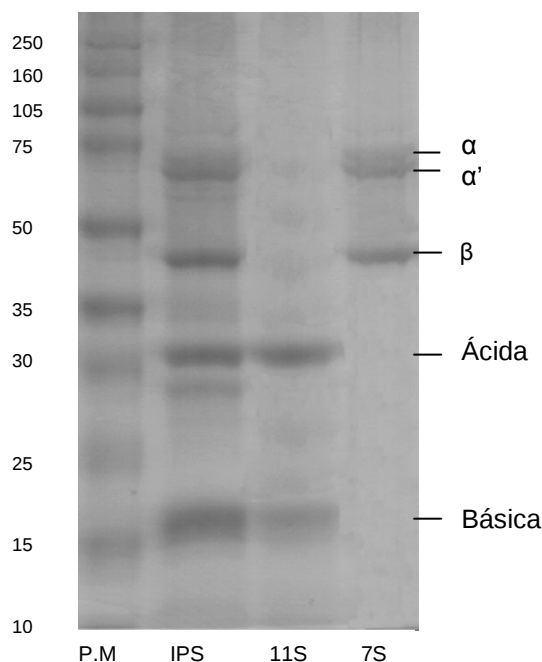


Figura 5: SDS-PAGE do IPS e das proteínas β - conglucina e glicina. Os números a esquerda indicam os marcadores de pesos moleculares (P.M.) em kDa.

4.6 Análise de isoflavonas no IPS e nas proteínas β - conglucina e glicina por CLAE

A concentração de isoflavonas presentes no isolado proteico de soja, β -conglucina e glicina esta na figura 6.

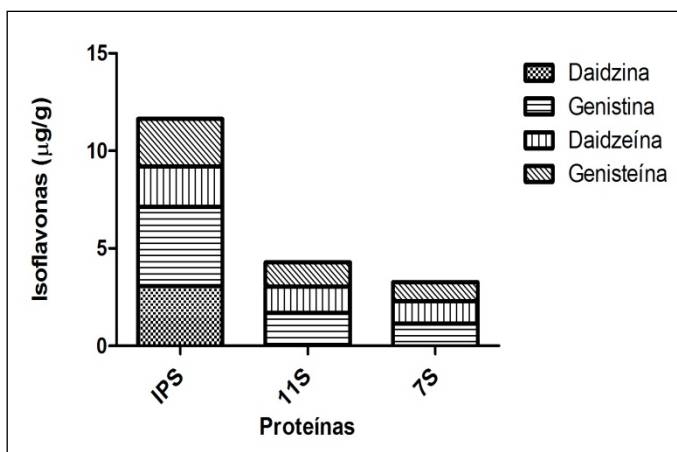


Figura 6: Concentração de isoflavonas presente no isolado proteico de soja (IPS) e nas frações proteicas β - conglucina (7S) e glicina (11S).

A soja contém isoflavonas que possuem diferentes formas químicas sendo as principais as agliconas daidzeína, genisteína, gliciteína e as glicosídicas daidzina, genistina e glicitina (CALLOU, 2009). A solução de metanol 80% é a mais utilizada para extração destas isoflavonas a partir de produtos derivados dos grãos de soja, isto pode ser observado em alguns trabalhos, como Mantovani (2009); Kulling, Honig e Metzler (2001) e Zuo *et al.* (2008).

Lui *et al.* (2003) compararam o perfil de isoflavonas no FDS', concentrado e isolado proteico, observaram que o IPS possui menor quantidade de isoflavonas, sendo a Genistina em maior quantidade, semelhante a este trabalho. Anderson e Wolf (1995), também constataram que o IPS contém menor quantidade de isoflavonas, quando compara-se com os grãos e a farinha de soja.

Os teores de isoflavonas na soja também variam conforme a parte morfológica da qual são extraídas (cotilédone, hipocótilo e casca). Estudos mostraram que a maior concentração de isoflavonas se encontra no hipocótilo, com valores de 10 a 20 vezes maiores do que nos grãos inteiros (TSUKAMOTO *et al.*, 1995). Kudou *et al.* (1991) observaram que o hipocótilo apresenta 5 a 6 vezes mais isoflavonas que os cotilédones, sendo que a glicitina e seus derivados somente ocorrem no hipocótilo e que a casca não possui isoflavonas.

Pode-se observar na figura a inexistência das isoflavonas Gliciteína e Glicitina em todas as amostras, de acordo com Aguiar (2004) isto é característico das cultivares de soja no Brasil, no qual a concentração de isoflavonas nos grãos é geneticamente controlada e influenciada pelas condições climáticas, variedade do grão e tipo de solo. Benassi e Prudencio (2013) destacam que a comparação entre os resultados obtidos em um trabalho e os resultados na literatura é difícil, justamente por causa da variabilidade de cultivares, condições de plantio (ano, temperatura e local) e de pós- colheita (armazenagem, umidade e temperatura) que podem influenciar a concentração de isoflavonas.

4.7 MEV do IPS e das frações β - conglícinina e glicínina.

O isolado proteico de soja é composto por mais de 80% de proteínas, chamadas globulinas, as figuras 7A, 7B e 7C mostram claramente o formato globular e os agregados proteicos semelhantes aos encontrados por Tian *et al.*, (2011); Scilingo e Añón, (2004) e Vernaza *et al.*, (2012). Também pode-se constatar que o formato inicial das mesmas não foi totalmente alterado com todo o processo de extração. Entretanto as figuras 7D, 7E, 7F mostram a fração β - conglícinina e as figuras 7G, 7H e 7I mostram a fração Glicínina. Consegue-se perceber nitidamente a mudança da conformação proteica em ambas as frações, quando compara-se com a MEV do isolado proteico de soja. A β - conglícinina mostra-se em agregados maiores compactos e formas não globulares, já a Glicínina mostra-se com filamentos longos, poros superficiais desuniformes e também formas não globulares.

A utilização de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ e NaCl para extração das frações, faz com que modifique a conformação proteica, solubilidade, dispersibilidade e viscosidade entretanto não modificando completamente as propriedades funcionais de uma proteína, devido a pouca quantidade utilizada dos sais. A adição do $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ se faz necessário, para a precipitação da fração Glicínina, que contém entre 18-20 pontes de dissulfeto, importantes para manutenção da estrutura espacial proteica. O $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ abre as ligações das pontes de dissulfeto, expondo peptídeos hidrofóbicos na superfície da proteína, aumentando a

hidrofobicidade, viscosidade e consequentemente modificando a conformação proteica. Após os grupos hidrofóbicos estarem expostos, há uma associação proteína-proteína, através das pontes de dissulfeto, formando os agregados proteicos. O NaCl adicionado para extração da β - conglucina facilita a formação de agregados, através do *salting out*, forçando a atração eletrostática entre as proteínas devido a 'competição' do NaCl e das proteínas pelas moléculas de água (ABTAHI e AMINLARI, 1997; DENG, HUANG e HUA, 2012; QI *et al.*, 2011; SALAS *et al.*, 2012; TRAN e ROUSSEAU, 2010; ZHANG e SUN, 2008).

Zhao *et al.*, (2011) extraíram estas duas frações pelo mesmo método utilizado neste estudo e constataram através da MEV e Espectroscopia Eletrônica de Raios-X que as superfícies das frações β - conglucina e glicina modificam devido à alteração da distribuição dos átomos Carbono, Oxigênio e Nitrogênio, que compõe os aminoácidos, formando poros e agregados irregulares, semelhantes aos encontrados nesta pesquisa. Qi *et al.*, (2011) também extraíram as frações proteicas da mesma forma utilizada neste trabalho e relataram que a força eletrostática e a interação hidrofóbica são importantes para uma forte ligação proteína-proteína formando agregados sólidos e compactos, como é visto na fração β - conglucina. Zhang e Sun, (2008) estudaram a influencia de várias concentrações (3, 6, 12, 24 e 36g/L) do $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ na morfologia da fração Glicina e observaram que na menor concentração formam-se pequenos agregados com filamentos, como é observado neste trabalho que utilizou 0,98g/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, no qual os agregados estão dispersos e com uma grande quantidade de filamentos. E com o aumento da concentração do $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ os agregados proteicos ficam maiores.

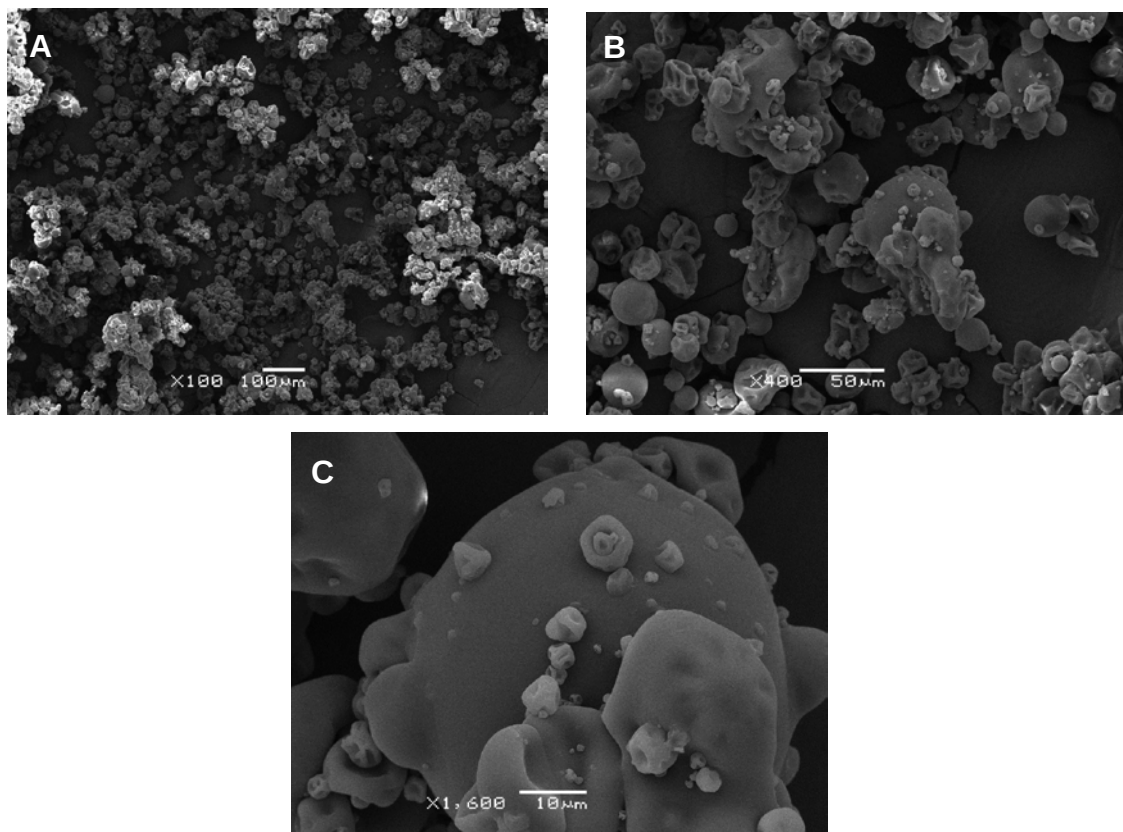


Figura 7: Microscopia Eletrônica de Varredura do IPS (7A, 7B e 7C) (Continua).

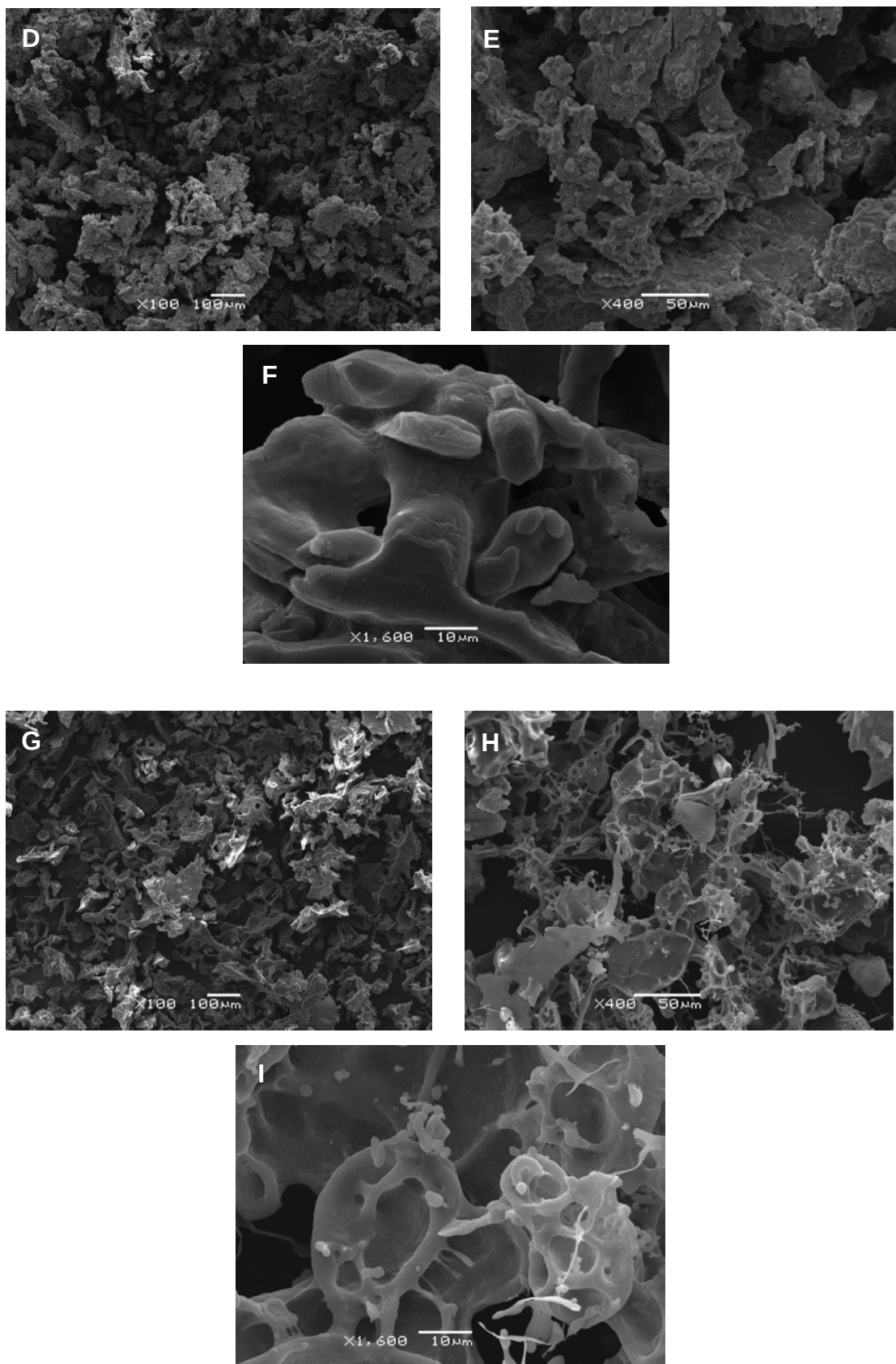


Figura 7: Microscopia Eletrônica de Varredura das frações proteicas β - conglucina (7D, 7E e 7F) e glicina (7G, 7H, 7I) (Término).

4.8 Análise dos aminoácidos das frações β - conglucina e glicina

O perfil dos aminoácidos da fração β - conglucina e da fração glicina estão representados na figura 8 e na tabela 8.

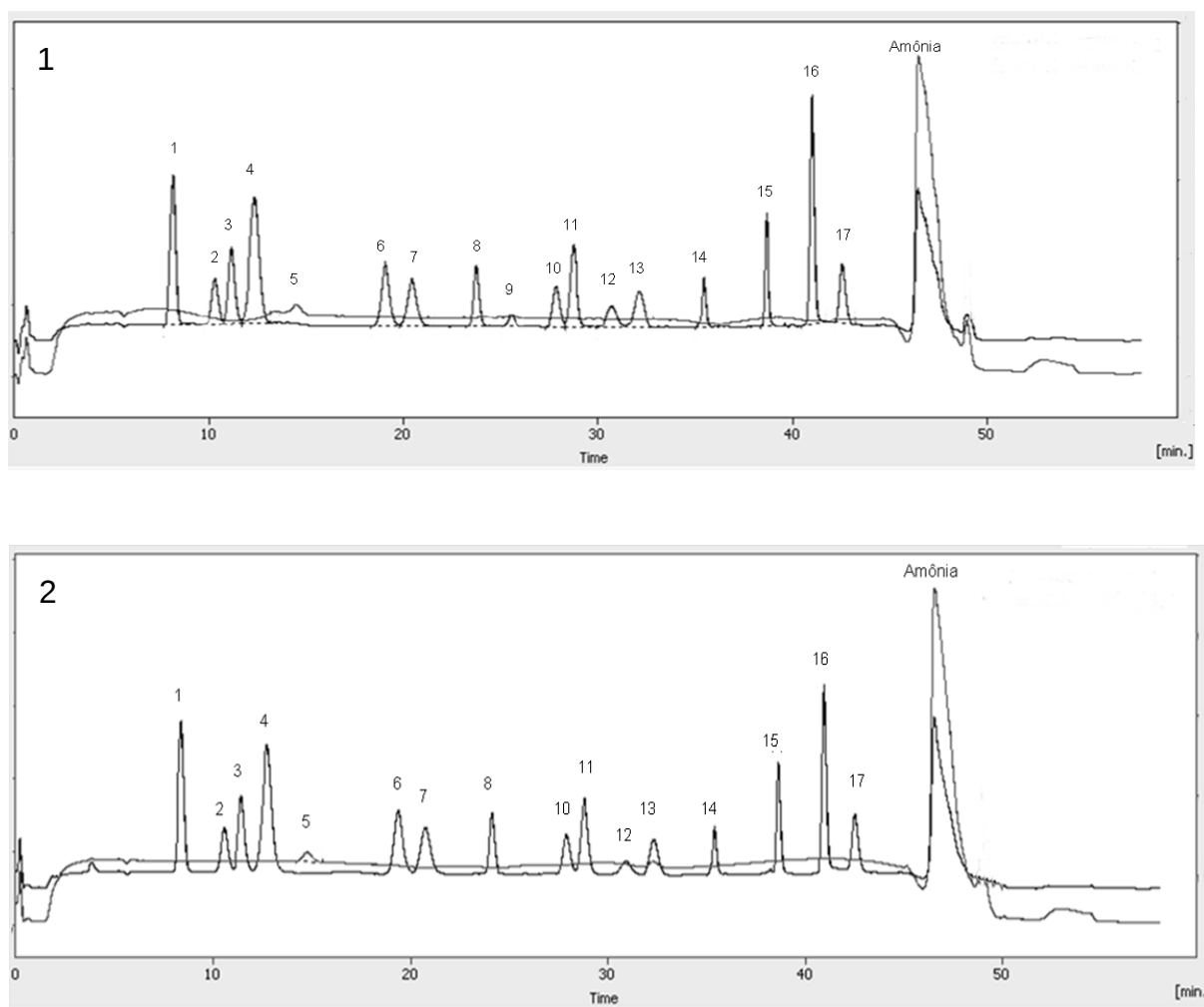


Figura 8: Cromatogramas das frações glicina (1) e β - conglucina (2), mostrando o perfil de aminoácidos.

Tabela 8: Composição dos aminoácidos (% p/v) das frações glicinina (11S) e β - conglucina (7S), de acordo com os números dos picos (esquerda) nos cromatogramas.

Aminoácidos	11S	7S
1. Ácido Aspártico	9,1	9,6
2. Treonina	3,9	4,2
3. Serina	6,3	5,7
4. Ácido Glutâmico	8,5	8,2
5. Prolina	0,4	0,2
6. Glicina	6,7	6,0
7. Alanina	4,8	4,5
8. Cisteína	5,7	5,4
9. Valina	1,1	-
10. Metionina	2,9	2,6
11. Isoleucina	6,1	6,3
12. Leucina	2,4	2,1
13. Tirosina	2,6	2,5
14. Fenilalanina	4,6	4,4
15. Histidina	7,4	7,2
16. Lisina	11,3	10,1
17. Arginina	6,2	6,0
Amônia	10,0	15,0

Pode-se observar que todos os aminoácidos, como ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, histidina, lisina e arginina estão presentes na fração Glicinina, para a fração β - conglucina somente o aminoácido valina não está presente. O aminoácido triptofano não foi detectado porque o equipamento utilizado não identifica este aminoácido e a amônia presente nas duas proteínas é o resíduo proveniente da própria hidrólise.

Samoto *et al.*, (2007) isolaram estas mesmas frações através de um método diferente descrito nesta pesquisa usando ácido sulfúrico para precipitação proteica e encontram quantidades similares e os mesmos aminoácidos, com exceção do aminoácido valina que foi detectado na fração β -conglucina. Fountoulakis e Lahm, (1998); Pickering e Newton, (1990)

relataram que os aminoácidos com grupos alifáticos, como a valina, podem resistir à hidrólise ácida requerendo um tempo maior de hidrólise, provavelmente isto deve ter acontecido na fração β -conglucininina, estudada nesta pesquisa.

5. CONCLUSÃO

O farelo desengordurado de soja, subproduto da indústria, é uma matéria prima para extração de proteínas que podem ser aplicadas em diversas áreas, reduzindo problemas ambientais e econômicos, maximizando seus benefícios.

O ácido cítrico pode ser utilizado como agente precipitante de proteínas para produção de um isolado proteico de soja com excelente qualidade. O melhor rendimento de extração foi com o tempo de 48 h e com o pH 9,5.

Obteve-se baixa concentração de isoflavonas nas proteínas glicinina e β -conglucininina, não interferindo nas características proteicas destacando a pureza destas frações.

Os resultados obtidos nas análises de eletroforese em gel de poliacrilamida, microscopia eletrônica de varredura e perfil de aminoácidos, foram conclusivos para identificar as proteínas β -conglucininina e glicinina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABTAHI, S. e AMINLARI, M. Effect of Sodium Sulfite, Sodium Bisulfite, Cysteine, and pH on Protein Solubility and Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Soybean Milk Base. **J Agric Food Chem**, v. 45, n. 12, p. 4768–4772, 1997.

AGUIAR, C.L. **Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine max* L.) e o efeito na atividade biológica *in vitro***. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP), 2004.

ANDERSON, R. e WOLF, W. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **J Nutr**, v.125, n. 3, p. 581S-588S, 1995.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

BENASSI, V.T. e PRUDENCIO, S.H. Impactos do processamento de soja na retenção de minerais, isoflavonas e proteínas em tofus. **Braz J Food Nutr**, v. 24, n. 1, p. 51-59, 2013.

BITTENCOURT, A.L. *et al.* Immunogenicity and allergenicity of 2S, 7S and 11S soy protein fractions. **Rev Bras Ciên Farm**, v. 43, n. 4, p. 597–606, dez. 2007.

CALLOU, K.R.A. **Teor de isoflavonas e capacidade antioxidante de bebidas à base de soja**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, (USP), 2009.

DEAK, N.A. e JOHNSON, L.A. Effects of Extraction Temperature and Preservation Method on Functionality of Soy Protein. **J Am Oil Chem Soc**, v. 84, n. 3, p. 259–268, 2007.

DENG, K.; HUANG, Y.; HUA, Y. Isolation of glycinin (11S) from lipid-reduced soybean flour: effect of processing conditions on yields and purity. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 3, p. 2968–2979, 2012.

DINIZ, A.C.P. **Geleificação a frio de isolados proteicos de soja**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP), 170 p. 2007.

FASSINI, P.G. **Estudo experimental do efeito da proteína glicínina da soja (*Glycine max* L.) no metabolismo do colesterol**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, (UNESP), 2010.

FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H.W. Hydrolysis and amino acid composition of proteins. **J Chromatogr A**, v. 826, n. 2, p. 109–134, 1998.

GIORA, C.B. **Avaliação de equivalência substancial e potencial de alergenicidade de cultivares de soja tolerantes ao herbicida glifosato.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, (USP), 2009.

KUDOU *et al.* Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agri Biol Chem**, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.

KULLING, S.E.; HONIG, D.M.; METZLER, M. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*. **J Agri Food Chem**, v. 49, n. 3, p.3024-3033, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUI, M.C.Y. *et al.* Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciênc Tecnol Alim**, v. 23, p. 206–212, 2003.

LUI, M.C.Y. **Estudo do balanço de massa e do perfil de isoflavonas no processamento de isolado e concentrado proteicos de soja.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP), 2004.

LUSAS, E.W. e RIAZ, M.N. Soy protein products: processing and use. **J Nutr**, v. 125, n. 3 Suppl, p. 573S–580S, 1995.

MANDARINO, J.M.G. e ROESSING, A.C. Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos. **Embrapa**, n. 171, 2001.

MANTOVANI, D. *et al.* Chromatographic quantification of isoflavone content from soy derivatives using HPLC technique. **J Chromatogr Sci**, v. 47, 2009.

MEDRANO, A. e DEL CASTILLO, M.D. Obtención de péptidos antioxidantes de glicinina de soja. **Innotec**, v. 6, p. 32–36, 2011.

NAGANO, T. *et al.* Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7 S globulin from soybeans. **J Agri Food Chem**, v. 40, n. 6, p. 941–944, 1992.

NAGANO, T. e TOKITA, M. Viscoelastic properties and microstructures of 11S globulin and soybean protein isolate gels: Magnesium chloride-induced gels. **Food Hydrocolloid**, v. 25, n. 7, p. 1647–1654, 2011.

NAJAFPOUR, G.D. Production of citric acid. In: **Biochemical Engineering and Biotechnology**, p. 280-286, 2007.

PEÑA-RAMOS, E.A. e XIONG, Y.L. Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. **J Food Sci**, v. 67, n. 8, p. 2952–2956, 2002.

PICKERING, M.V.; NEWTON, P. Amino acid hydrolysis: old problems, new solutions. **LC GC**, v. 8, p. 778–781, 1990.

PUPPO, M.C. *et al.* β -Conglycinin and Glycinin soybean protein emulsions treated by combined temperature–high-pressure treatment. **Food Hydrocolloid**, v. 25, n. 3, p. 389–397, 2011.

QI, G. *et al.* Physicochemical Properties of Soy Protein Adhesives Obtained by In Situ Sodium Bisulfite Modification During Acid Precipitation. **J Am Oil Chem Soc**, v. 89, n. 2, p. 301–312, 2011.

QI, G. *et al.* Physicochemical properties of soy protein: effects of subunit composition. **J Agri Food Chem**, v. 59, n. 18, p. 9958–64, 2011.

REDDY, N. *et al.* Preparation and properties of peanut protein films crosslinked with citric acid. **Ind Crop Prod**, v. 39, p. 26–30, 2012.

ROBLET, C. *et al.* Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes. **Food Res Int**, v. 46, n. 1, p. 237–249, 2005.

SALAS, C. *et al.* Adsorption of glycinin and β -conglycinin on silica and cellulose: surface interactions as a function of denaturation, pH, and electrolytes. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 2, p. 387–396, 2012.

SALMON, A. *et al.* Evidence on the carcinogenicity of trichloroacetic acid and its salts. **Oehha**, p. 1–28, 1999.

SAMOTO, M. *et al.* Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. **Food Chem**, v. 102, n. 1, p. 317–322, 2007.

SCILINGO, A.A.; AÑÓN, M.C. Characterization of soybean protein isolates The effect of calcium presence. **J Am Oil Chem Soc**, v. 81, n. 1, p. 63–69, 2004.

SITOHY, M.Z.; MAHGOUB, S.A.; OSMAN, A.O. In vitro and in situ antimicrobial action and mechanism of glycinin and its basic subunit. **Int J Food Microbiol**, v. 154, n. 1, p. 19–29, 2012.

SOUZA, A.S. **Efeito do tratamento térmico nas características de isolados proteicos de soja e seus hidrolisados enzimáticos.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP), 2000.

TARONE, A.G. *et al.* Influence of drying conditions on the gelling properties of the 7S and 11S soy protein fractions. **Food and Bioprod Process**, v. 91, n. 2, p. 111–120, 2013.

TIAN, H. *et al.* Microstructure and mechanical properties of soy protein/agar blend films: Effect of composition and processing methods. **J Food Eng**, v. 107, n. 1, p. 21–26, 2011.

TRAN, T. e ROUSSEAU, D. Food hydrocolloids stabilization of acidic soy protein-based dispersions and emulsions by soy soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloid**, v. 30, n. 2013, p. 382–392, 2010.

TSUKAMOTO, C. *et al.* Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **J Agri Food Chem**, v. 43, n. 5, p. 1184–1192, 1995.

VERNAZA, M.G. *et al.* Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. **Food Chem**, v. 134, n. 4, p. 2217–2225, 2012.

ZHANG, L. e SUN, X.S. Effect of sodium bisulfite on properties of soybean glycinin. **J Agri Food Chem**, v. 56, n. 23, p. 11192–11197, 2008.

ZHAO, X. *et al.* Surface characterization of 7S and 11S globulin powders from soy protein examined by X-ray photoelectron spectroscopy and scanning electron microscopy. **Colloids Surf B: Bio**, v. 86, n. 2, p. 260–266, 2011.

ZUO, Y.B. *et al.* Extraction of soybean isoflavones from soybean meal with aqueous methanol modified supercritical carbon dioxide. **J Food Eng**, v. 89, p. 384–389, 2008.

Capítulo II: Atividade Biológica das proteínas

β - conglícinina e glicínina

Resumo

A soja é uma planta oleaginosa que produz grãos com maior conteúdo proteico. Devido ao seu excelente conteúdo nutricional, atualmente a proteína da soja é a melhor proteína vegetal disponível no mercado. A utilização de proteínas alimentícias na área da saúde vem aumentando nos últimos anos. Portanto, o objetivo deste capítulo é avaliar a atividade biológica das proteínas β - conglícinina e glicínina, extraídas do IPS e testá-las *in vitro* em relação à atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória e atividade antioxidante. Para a atividade antimicrobiana foram realizados os testes de difusão em ágar e concentração inibitória mínima contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. A atividade anti-inflamatória foi realizada pelo método de inibição da enzima hialuronidase e a avaliação da atividade antioxidante foi feita pelos métodos DPPH, ABTS e sistema β -caroteno/ácido linoleico. Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana mostraram que a bactéria *Escherichia coli* foi a mais suscetível nos testes com as duas proteínas, porém a glicínina mostrou-se mais eficaz em relação à β - conglícinina. A glicínina também mostrou maior capacidade anti-inflamatória com 86,3% de inibição do que a β -conglícinina que apresentou 70% de inibição ambas com a concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$. E para atividade antioxidante a glicínina mostrou valores de 28,5 TEAC e 23,4 VCEAC para o ABTS, 71,7% para o sistema β -caroteno/ácido linoleico com a concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$ e EC_{50} de 46,8 com a concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$, por outro lado a β - conglícinina mostrou 15,2 TEAC e 12,7 VCEAC para o ABTS, 56,3% para o sistema β -caroteno/ácido linoleico com a concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$ e EC_{50} de 71,6 com a concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$. Portanto, conclui-se que ambas as proteínas têm potencial para a área da saúde, porém a glicínina mostra-se mais potente e promissora em relação à β - conglícinina.

Palavras-chave: Atividade Biológica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, β - conglícinina e glicínina.

1. INTRODUÇÃO

Existem cerca de 400 mil espécies de plantas em solo brasileiro e somente 10% são estudadas em relação aos aspectos biológicos, o que permite deduzir que muitos compostos podem ser identificados, no qual representa um valioso potencial econômico (SILVA, 2004). A diversidade presente neste patrimônio natural depara-se com um universo de oportunidades para um desenvolvimento que valoriza esta biodiversidade capaz de estruturar arranjos produtivos baseados em aplicações biotecnológicas (MAPA, 2010).

Porém, nos últimos anos observa-se um grande avanço científico envolvendo estudos de plantas para identificação de compostos com atividade biológica e neste aspecto, tem-se dado grande destaque a soja. Um grande número de proteínas vem sendo identificadas por meio de estudos científicos, entretanto estas proteínas devem ser hidrolisadas a peptídeos, para facilitar sua interação com a substância alvo (FERREIRA, 2008).

Farrokhi *et al.* (2008) relataram que diversos peptídeos em plantas estão sendo identificados e caracterizados e são candidatos promissores as mais diversas aplicações. Na literatura há relatos que as principais atividades biológicas que possuem, são a atividade antioxidante, a atividade antimicrobiana, a atividade anti-inflamatória, a atividade antitumoral, a atividade anticolesterolêmica e a atividade anti-hipertensiva (FASSINI, 2010; ROBLET *et al.*, 2012; SITOHY *et al.*, 2012; VERNAZA *et al.*, 2012).

Os grãos de soja contem uma grande quantidade e variedade de proteínas que possuem atividade biológica, dentre estas proteínas estão a β -conglucina e a Glicinina. Estas proteínas são denominadas de reserva do grão e perfazem em torno de 80% do total de proteínas.

Portanto, a pesquisa da atividade biológica destas proteínas é de fundamental importância devido a grande quantidade nos grãos de soja, sendo uma fonte promissora com potencial terapêutico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. 1 Atividade Biológica

2.1.1 Atividade antimicrobiana

Bactérias gram- positivas e gram- negativas foram utilizadas nesta pesquisa, como consta na tabela 9.

Tabela 9: Bactérias utilizadas para o teste de atividade antimicrobiana com as proteínas β -conglucina (7S) e glicina (11S).

Bactérias	Meio de cultivo	Condições de cultivo
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Mueller Hinton	37°C/ 48h/ Aerobiose
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Mueller Hinton	37°C/ 48h/ Aerobiose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo Mueller Hinton	37°C/ 48h/ Aerobiose
<i>Salmonella enterica</i>	Caldo Nutriente	37°C/ 48h/ Aerobiose
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Nutriente	37°C/ 48h/ Aerobiose
<i>Streptococcus mutans</i>	Caldo Tripsina de Soja	37°C/ 48h/ Microaerobiose
<i>Propionibacterium acnes</i>	Caldo Reinforced Clostridial	37°C/7 dias/ Anaerobiose

Todas as cepas foram mantidas no glicerol 20% à -20°C. *Escherichia coli* ATCC 26922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 reativadas em caldo Mueller Hinton incubadas à 37°C por 48 h. *Salmonella enterica* ATCC 13312 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 reativadas em caldo nutriente e incubadas à 37°C por 48 h. *Streptococcus mutans* ATCC 25175 reativada em caldo Tripsina de Soja e incubada à 37°C por 48 h em sistema de microaerobiose e *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 reativada no caldo Reinforced Clostridial incubada à 37°C por sete dias em sistema de anaerobiose. Todas as bactérias foram repicadas duas vezes nos mesmos meios de cultura, porém em meio sólido (YALTIRAK *et al.*, 2009).

2.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada de acordo com Kalemba e Kunicka, (2003); Oliveira *et al.*, (2011) e Yaltirak *et al.*, (2009). O planejamento experimental foi realizado com três concentrações (1000µg/ml, 450µg/ml e 50µg/ml) das frações β- conglícinina e glicínina, o controle positivo foi o antibiótico tetraciclina (30µg/ml) e o controle negativo foi água destilada estéril. As proteínas foram esterilizadas através de filtração com membrana 0,22 µm (Millipore, MA, USA). As suspensões bacterianas foram realizadas em solução salina estéril (0,85% NaCl) e ajustadas comparando com o padrão 0,5 da escala Mcfarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Na técnica de *pour plate*, foi adicionado nas placas de petri um ml de cada suspensão bacteriana com aproximadamente 20 ml de meio de cultura específico para cada cepa. Após a solidificação do meio de cultura, poços foram feitos e alíquotas de 150 µl de cada concentração das proteínas, controle positivo e negativo foram adicionados. As placas foram incubadas à 37°C com as necessidades de cada cepa.

A leitura foi feita com a medição dos halos (mm) de inibição. O experimento foi realizado em triplicatas de cada cepa com cada concentração das frações.

2.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada de acordo com Oliveira *et al.*, (2011). Em placas de 24 poços foram adicionados 1,8 ml de meio de cultura, 100 µl de suspensão bacteriana ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) e 100 µl de cada concentração das frações proteicas (50µg/ml, 25µg/ml, 12,5µg/ml, 6,25µg/ml, 3,12µg/ml). Para as cepas *S. mutans* e *P. acnes* a CIM foi realizada em tubos de vidros. As placas e os tubos foram incubados de acordo com cada tipo de cepa. Para o controle positivo foi considerado meio de cultura e a suspensão bacteriana e para controle negativo foi considerado meio de cultura e água destilada estéril. Após o período de incubação foram adicionados 20 µl de uma solução 1% de cloreto 2, 3, 5- trifênil tetrazólio (TTC) em todos os poços e novamente incubados por

apenas 30 min. Para a bactéria *P. acnes* somente a microaerobiose foi utilizada.

A leitura foi realizada através da mudança de cor da observação da viabilidade celular, foi considerado sensível (-) na ausência de mudança cor e resistente (+) na presença de cor rosa - avermelhada. O experimento foi realizado em triplicatas de cada cepa com cada concentração das frações. A CIM foi definida como a menor concentração das frações que inibiram visualmente o crescimento bacteriano.

2. 2 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória das proteínas foi determinada de acordo com Aronson e Davidson, (1967); Reissig, Strominger e Leloir, (1955); Silva *et al.*, (2012). Foi feita uma mistura com 50 µl das frações proteicas (1000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 62,5µg/ml, 31,3µg/ml, 15,6µg/ml) com 500 µl de uma solução de ácido hialurônico (AH) (1,2 mg de ácido hialurônico por mL de solução tampão acetato 0,1M, pH 3,6 contendo 0,15 M de NaCl). Os tubos foram incubados à 37°C por 5 min. Logo, adicionou-se 50 µL (350 unidades) da enzima hialuronidase (HIA) (Tipo IV-S de testículos bovinos, Sigma Co.) dissolvida no mesmo tampão na concentração de 6,5 mg/mL. Os tubos foram incubados à 37°C por 40 min. A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de solução 4 N de NaCl. Adicionou-se 100 µl de solução 0,8 M de tetraborato de potássio e os tubos foram aquecidos sob ebulição por 3 min. Em seguida, foram adicionados 03 ml de *p*-dimetilaminobenzaldeído (solução de 10% de ácido acético glacial contendo 12,5 % de ácido clorídrico 10 N) e os tubos incubados novamente à 37°C por 20 min.

O controle positivo foi dimetilsulfoxido (DMSO), um anti-inflamatório de uso tópico, e controle negativo foi água destilada. As leituras de absorbância foram medidas em espectrofotômetro a 585 nm. Os testes foram feitos em triplicatas de cada concentração de cada fração. A atividade anti-inflamatória (AA) foi mensurada pela porcentagem de inibição.

2.3 Atividade antioxidante

2.3.1 Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH

Esta metodologia foi baseada em Predes *et al.*, (2011) e Rufino *et al.*, (2007a). O DPPH (2,2 difenil-1- picril- hidrazil) é um radical de coloração violeta que ao receber o íon $H\cdot$ da substância antioxidante adquire a coloração amarela.

A solução de DPPH (0,06mM) foi preparada com metanol até atingir absorvância 0,6-0,7 em 517nm, medida em um leitor de microplacas Power Wave XS- Biotek. Também foram preparadas as concentrações (1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62.5 μ g/ml, 31.3 μ g/ml, 15.6 μ g/ml) das frações proteicas.

Em placas de 96 poços foram adicionados 200 μ l da solução de DPPH e 50 μ l de cada concentração de cada fração e metanol para o controle. As placas foram incubadas no escuro por 20min em temperatura ambiente. A absorvância foi medida em 517nm de 10 em 10min até atingir 80min, determinando a curva cinética da reação. Os testes foram realizados em triplicatas e a porcentagem de inibição do radical livre DPPH (ID) foi calculada:

$$ID (\%) = \frac{A_c - A}{A_c} \times 100$$

Onde:

A_c = absorvância do controle

A = absorvância da amostra

Os valores de EC_{50} (concentração necessária da amostra para inibir 50% do radical inicial da reação) foram calculados por regressão linear dos gráficos obtidos na curva cinética da reação.

2.3.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS

Esta metodologia foi baseada em Rufino *et al.*, (2007b) e Zhu *et al.*, (2011). A técnica do radical ABTS está diretamente relacionada com a coloração azul esverdeada, obtida através da reação entre o radical e o

persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), na qual é perdida à medida que reage com os antioxidantes do meio.

O radical ABTS foi produzido através da reação de 5 ml da solução estoque do ABTS (7mM) com 88 µl do persulfato de potássio (140mM). Esta solução foi mantida no escuro por 12-16 h a temperatura ambiente. A solução foi diluída em etanol até obter a absorbância 0,6-0,7 em 734nm no leitor de microplacas Power Wave XS- Biotek. Também foram preparadas as concentrações (1000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 62,5µg/ml, 31,3µg/ml, 15,6µg/ml) das frações proteicas.

Em placas de 96 poços foram adicionados 200 µl da solução de ABTS, 50 µl de cada concentração de cada fração e 50 µl de solução Trolox, antioxidante sintético análogo à vitamina E, nas concentrações 100-2000 µM, para produzir uma curva padrão. A leitura foi realizada após 6min de incubação das placas em temperatura ambiente. Os testes foram realizados em triplicatas e os resultados (µM Trolox/ g de amostra) foram expressos em TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

O padrão Trolox é amplamente utilizado como referência para as análises de atividade antioxidante, porém ele não é encontrado naturalmente na natureza. Por outro lado, a vitamina C (ácido ascórbico) é encontrada em vários alimentos de acordo com Kin *et al.* (2002). É hidrossolúvel, participa no metabolismo da tirosina, dos carboidratos, na síntese de lipídeos, oferece suporte ao sistema imunológico, em virtude de sua propriedade antioxidante. A necessidade diária de ingestão recomendada é de 50 mg/ dia para adultos (BRASIL, 2005).

Portanto, analisou-se através do método ABTS, com as mesmas concentrações das frações proteicas utilizadas anteriormente, a capacidade antioxidante equivalente à vitamina C (VCEAC), a curva padrão foi feita com a própria vitamina, nas concentrações 100-2000 µM e os resultados (µM de vitamina C/ g de amostra) expressos em VCEAC.

2.3.3 Atividade antioxidante pelo sistema β- caroteno/ ácido linoleico

Esta metodologia foi baseada em Duarte-Almeida *et al.*, (2006); Rufino *et al.*, (2010); Tyug, Prasad e Ismail, (2010), no qual avalia o poder antioxidante

da substância de interesse contra a oxidação do β - caroteno induzida pela degradação oxidativa do ácido linoleico. O β - caroteno foi dissolvido em clorofórmio (2mg/ml) e 25 μ l desta mistura foram homogeneizados com 20 μ l de ácido linoleico, 200mg de Tween 40 e 500 μ l de clorofórmio. O clorofórmio foi removido em estufa a vácuo (Vacucell MMM-group) à 40°C por 20 min. Em seguida foi adicionada aos poucos água destilada e agitou-se vigorosamente até obter uma emulsão amarela. A absorbância foi medida até atingir 0,6-0,7 em 470nm no leitor de microplacas Power Wave XS- Biotek. Também foram preparadas as concentrações (1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62,5 μ g/ml, 31,3 μ g/ml, 15,6 μ g/ml) das frações proteicas.

Em placas de 96 poços foram adicionados 250 μ l da emulsão e 20 μ l de cada concentração de cada fração e 20 μ l de metanol para o controle. As placas foram incubadas à 37°C por 5 minutos e a absorbância medida imediatamente. As leituras foram feitas de 15 em 15 minutos até atingir 100 min. Os testes foram feitos em triplicatas e os resultados expressos em porcentagem de inibição de oxidação (IO).

$$Ac = Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}$$

$$Aam = Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}$$

$$IO (\%) = (Ac - Aam) / Ac \times 100$$

Onde:

Ac = absorbância controle

Abs = absorbância

Aam = absorbância amostra

3. Análise estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão de triplicatas. Foram analisados pelo Statistica 5.0 Software (Statsoft, Tulsa, OK, USA) e pelo Graphpad prism 5.0 Software (San Diego, CA, USA). Diferenças foram analisadas usando ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar

A tabela 10 apresenta os resultados obtidos da atividade antimicrobiana das frações proteicas glicinina (11S) e β - conglucina (7S).

Tabela 10: Atividade antimicrobiana das frações proteicas glicinina (11S) e β - conglucina (7S) contra bactérias gram- positivas e gram- negativas através da técnica de difusão em ágar*

	1000 μ g/ml		450 μ g/ml		50 μ g/ml		Tetraciclina (30 μ g/ml)
	7S	11S	7S	11S	7S	11S	
<i>E. coli</i>	24,0 $\pm$ 0,57 ^{Aa}	32,0 $\pm$ 0,57 ^{Db}	14,0 $\pm$ 1,52 ^{Bc}	18,0 $\pm$ 1,00 ^{Ed}	08,5 $\pm$ 0,30 ^{Ce}	11,0 $\pm$ 0,50 ^{Ff}	33,0 $\pm$ 0,05
<i>K. pneumonie</i>	23,0 $\pm$ 0,50 ^{Aa}	30,5 $\pm$ 1,00 ^{Db}	13,5 $\pm$ 0,00 ^{Bc}	16,5 $\pm$ 0,00 ^{Ed}	08,0 $\pm$ 0,30 ^{Ce}	10,0 $\pm$ 0,30 ^{Ff}	32,5 $\pm$ 0,05
<i>P. acnes</i>	21,0 $\pm$ 0,57 ^{Aa}	28,5 $\pm$ 0,76 ^{Db}	09,0 $\pm$ 0,86 ^{Bc}	13,5 $\pm$ 0,50 ^{Ed}	04,0 $\pm$ 0,30 ^{Ce}	07,0 $\pm$ 0,76 ^{Ff}	33,0 $\pm$ 0,00
<i>P. aeruginosa</i>	22,0 $\pm$ 0,57 ^{Aa}	30,5 $\pm$ 0,86 ^{Db}	12,0 $\pm$ 0,50 ^{Bc}	17,0 $\pm$ 0,30 ^{Ed}	08,0 $\pm$ 0,57 ^{Ce}	09,5 $\pm$ 0,50 ^{Ff}	33,0 $\pm$ 0,07
<i>S. aureus</i>	23,0 $\pm$ 0,76 ^{Aa}	29,0 $\pm$ 0,00 ^{Db}	10,0 $\pm$ 0,57 ^{Bc}	15,5 $\pm$ 0,00 ^{Ed}	06,5 $\pm$ 0,50 ^{Ce}	08,0 $\pm$ 0,30 ^{Ff}	32,5 $\pm$ 0,05
<i>S. enterica</i>	23,0 $\pm$ 1,05 ^{Aa}	31,0 $\pm$ 0,30 ^{Db}	14,0 $\pm$ 1,73 ^{Bc}	17,5 $\pm$ 0,50 ^{Ed}	07,0 $\pm$ 0,00 ^{Ce}	09,0 $\pm$ 0,30 ^{Ff}	33,0 $\pm$ 0,00
<i>S. mutans</i>	22,5 $\pm$ 0,00 ^{Aa}	27,0 $\pm$ 0,30 ^{Db}	11,0 $\pm$ 0,76 ^{Bc}	15,0 $\pm$ 0,00 ^{Ed}	05,0 $\pm$ 0,00 ^{Ce}	06,5 $\pm$ 0,30 ^{Ff}	33,0 $\pm$ 0,04

*Média $\pm$ desvio padrão de triplicatas

** Valores do halo de inibição (mm)

Letras em caixa alta em linha mostram diferença significativa na mesma fração entre as concentrações na mesma cepa.

Letras em caixa baixa em linha mostram diferença significativa em cada concentração entre as frações na mesma cepa.

Teste de Tukey ($p < 0,05$)

A proteína glicinina apresentou maior atividade antimicrobiana comparando com a proteína β - conglucina. Pode-se observar que todas as bactérias foram suscetíveis às concentrações das duas frações proteicas, porém as cepas *E. coli*, *K. pneumonie* e *S. enterica* foram mais sensíveis em relação as outras cepas. O controle positivo com o antibiótico tetraciclina (30 μ g/ml) apresentou halos, com média entre todas as bactérias, de 33,0 mm de

diâmetro e o controle negativo com água destilada estéril as bactérias mantiveram-se intactas, sem formação de halos. Também pode-se observar que a concentração 1000µg/ml da fração glicinina é semelhante a concentração do antibiótico utilizado como controle, portanto é necessário uma concentração maior da fração para obter o mesmo efeito do antibiótico comercial.

Papagianni, (2003); Teixeira, Feio e Bastos, (2012) relatam que diversos peptídeos podem hidrolisar bactérias através da permeabilização e formação de poros na membrana plasmática extravazando o conteúdo citoplasmático. A carga positiva presente em alguns aminoácidos facilitam a interação com a carga negativa presente na camada fosfolipídica das bactérias.

Zasloff, (2002) comenta que bactérias gram- negativas são suscetíveis porque possuem uma grande quantidade de lipopolissacarídeo (LPS) responsável pela carga negativa na membrana externa bacteriana, facilitando a ligação dos peptídeos catiônicos e Matsuzaki, (2009) descreve que nas bactérias gram- positivas os ácidos teicóicos e lipoteicóicos presentes na camada do peptideoglicano são responsáveis pela carga negativa, consequentemente ambas são suscetíveis a peptídeos bioativos.

4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os valores da CIM estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das proteínas β - conglucina (7S) e glicinina (11S) contra cepas bacterianas.

Cepas/Proteínas	CIM (µg/ml)	
	7S	11S
<i>E. coli</i>	3.12	3.12
<i>K. pneumonie</i>	12.5	6.25
<i>P. acnes</i>	25.0	6.25
<i>P. aeruginosa</i>	12.5	3.12
<i>S. aureus</i>	6.25	3.12
<i>S. enterica</i>	12.5	6.25
<i>S. mutans</i>	25.0	12.5

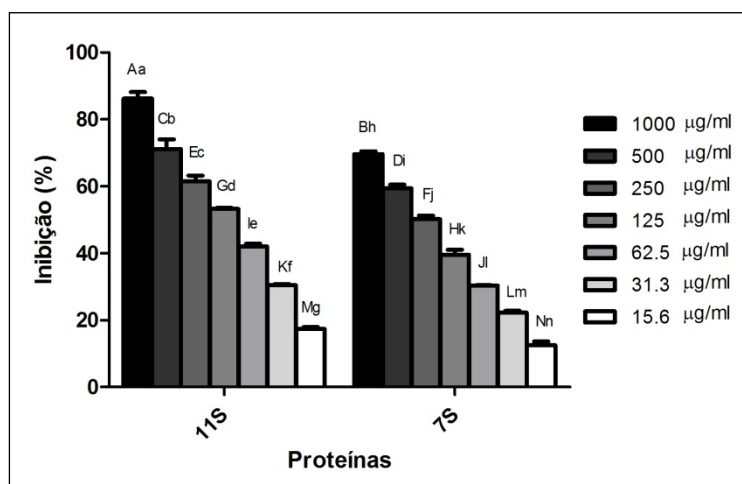
Consegue-se observar na tabela que todas as cepas são realmente suscetíveis, somente a bactéria *E. coli* apresentou o mesmo valor de suscetibilidade para as duas frações proteicas. A fração β - conglucina mostrou uma CIM mais alta comparando com a fração glicina, indicando uma baixa efetividade de ação antimicrobiana.

Sitohy, Mahgoub e Osman, (2012) avaliaram a CIM de outras bactérias com estas mesmas frações e observaram que a fração glicina obteve uma melhor atividade antimicrobiana em relação à fração β - conglucina. Estes autores acreditam que a subunidade básica presente na fração glicina pode orientar o alvo na membrana bacteriana através de forças eletrostáticas entre a carga positiva presente nos peptídeos catiônicos e carga negativa presente na membrana bacteriana.

Conclui-se que a fração glicina foi mais eficiente contra as bactérias gram- negativas e gram- positivas e que a parede celular e a membrana plasmática possuem elementos que favorecem a orientação e seleção dos peptídeos somente contra os próprios micro-organismos.

4.3 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é a resposta imune do organismo contra determinada lesão e infecção (VERNAZA *et al.*, 2012). Hialuronidase (HIA) pertence à classe das glicosidases que degradam o ácido hialurônico (AH). A enzima atua na matriz extracelular dos tecidos aumentando a permeabilidade e facilitando o acesso de patógenos envolvidos em processos inflamatórios, como *S. aureus* e *P. pneumoniae* (EL-SAFORY, FAZARY e LEE, 2010; GIRISH e KEMPARAJU, 2007; SGARIGLIA *et al.*, 2013). Os resultados da atividade anti-inflamatória estão na figura 9.



Letras em caixa alta mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre as proteínas.
 Letras em caixa baixa mostram diferença significativa entre as concentrações em cada proteína.
 Teste de Tukey (p < 0.05)

Figura 9: Atividade anti-inflamatória das frações β - conglucina (7S) e glicina (11S).

As proteínas β - conglucina e glicina mostraram ação anti-inflamatória em todas as concentrações testadas, porém a ação anti-inflamatória aumenta com o aumento da concentração das frações proteicas. A fração β - conglucina apresentou 70% de atividade anti-inflamatória e a fração glicina apresentou 86,3% de atividade anti-inflamatória, portanto a melhor fração foi a glicina com a concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$. A ação de peptídeos sobre o processo anti-inflamatório ainda não está bem elucidado na literatura. Relata-se que é provável que o mecanismo de ação da atividade inibitória da enzima hialuronidase, seja similar às drogas salicilato, indometacina, cromoglicato dissódico, apigenina e aurotiomalato sódico que previnem a geração de fragmentos de ácido hialurônico produzidos pela enzima hialuronidase, estes fragmentos têm alto potencial de indução do processo inflamatório (KHANUM *et al.*, 2005; YINGPRASERTCHAI, BUNYASRISAWAT e RATANABANANGKOON, 2003).

Por outro lado, Lenormand *et al.*, (2009) estudaram a influência da proteína albumina bovina no complexo HIA-AH e descobriram que a proteína compete com a HIA para formar o complexo com o AH. A presença da proteína albumina bovina impede a formação do complexo e a HIA permanece livre impedindo sua ação catalítica. Também observaram que altas concentrações

da proteína albumina bovina decresce consideravelmente a atividade da HIA, portanto a concentração é dose-dependente neste caso, sendo fundamental para melhor efetividade do processo anti-inflamatório, como foi visto neste trabalho.

Park *et al.* (2013), estudaram a atividade anti-inflamatória de extrato etanólico de própolis nas concentrações de 20% a 90% (p/v) com a mesma metodologia descrita neste trabalho e constataram que a concentração etanólica 80% foi que apresentou maior atividade anti-inflamatória com 30% de inibição da enzima hialuronidase e que esta atividade decresce a medida que as concentrações diminuem. Silva *et al.* (2012), analisaram a atividade anti-inflamatória de extrato aquoso de própolis e também observaram que existe uma relação dose-dependente para atividade anti-inflamatória, ou seja, com a maior concentração estudada (25mg/ml) obtiveram 76% de inibição da enzima hialuronidase. Marchesan *et al.* (2006) trabalharam com óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* D.C. e de *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae), para analisar a atividade anti-inflamatória destes óleos na inibição da enzima hialuronidase e também perceberam que a maior concentração utilizada (50µl/ml) inibiu 78% da atividade da enzima com a *B. dracunculifolia* e 74,4% de inibição com a *B. uncinella*. Portanto, pode-se observar que os resultados obtidos neste trabalho com as proteínas oriundas da soja estão dentre as substâncias que possuem atividade anti-inflamatória com o método de inibição da enzima hialuronidase e que há uma busca por novos compostos com esta propriedade.

4.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das frações proteicas glicinina e β - conglucina determinada pelas metodologias DPPH, ABTS e sistema β - caroteno/ácido linoleico esta demonstrada na tabela 12. A figura 10 mostra a curva padrão do trolox, a figura 11 a análise do ABTS, a figura 12 mostra a curva padrão da vitamina C, a figura 13 a análise do ABTS, a figura 14 a análise do sistema β - caroteno/ácido linoleico e na figura 15 a análise de DPPH.

Tabela 12: Atividades antioxidantes das proteínas glicinina e β - conglucina. ^a

Proteínas/Análises	DPPH	ABTS	ABTS	βC^b
	EC ₅₀	TEAC	VCEAC	% I.O. ^c
glicinina	46,8±1,2 ^a	28,5±3,1 ^a	23,4±1,8 ^a	71,7±2,0 ^a
β - conglucina	71,6±2,6 ^b	15,2±2,5 ^b	12,7±2,2 ^b	56,3±1,5 ^b

a: Média $\pm$ desvio padrão de triplicatasb: β - caroteno

c: Inibição de oxidação

Letras em caixa baixa nas colunas mostram diferença significativa entre as proteínas na mesma análise.

Teste Tukey (p < 0,05)

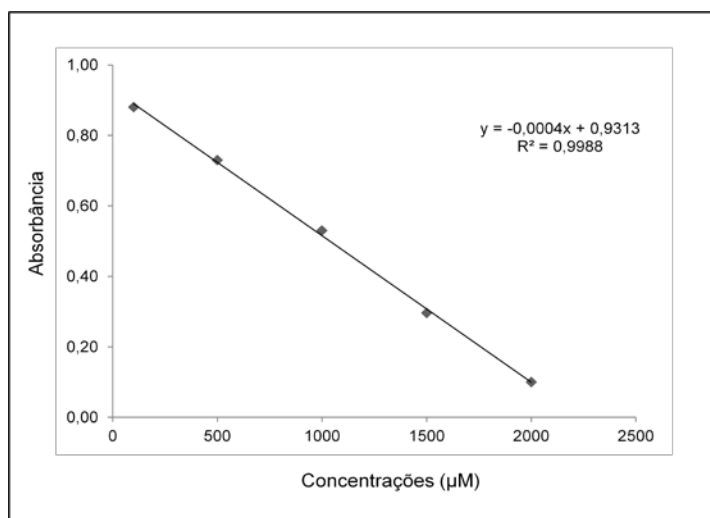
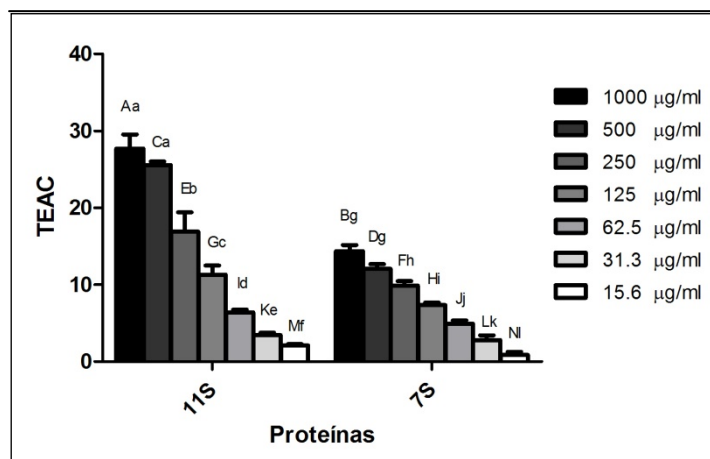


Figura 10: Curva Padrão do Trolox frente ao radical ABTS



Letras em caixa alta mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre as proteínas.

Letras em caixa baixa mostram diferença significativa entre as concentrações em cada proteína.

Teste de Tukey (p < 0.05)

Figura 11: Atividade antioxidante das frações proteicas glicinina (11S) e β - conglucina (7S) pelo método ABTS com o Trolox.

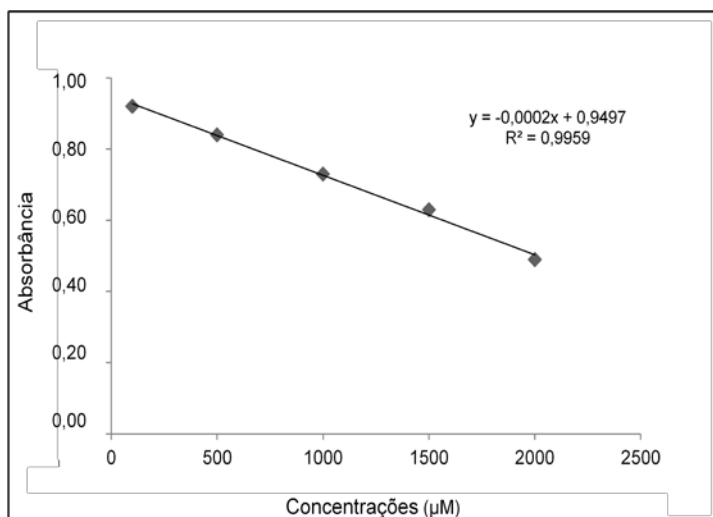
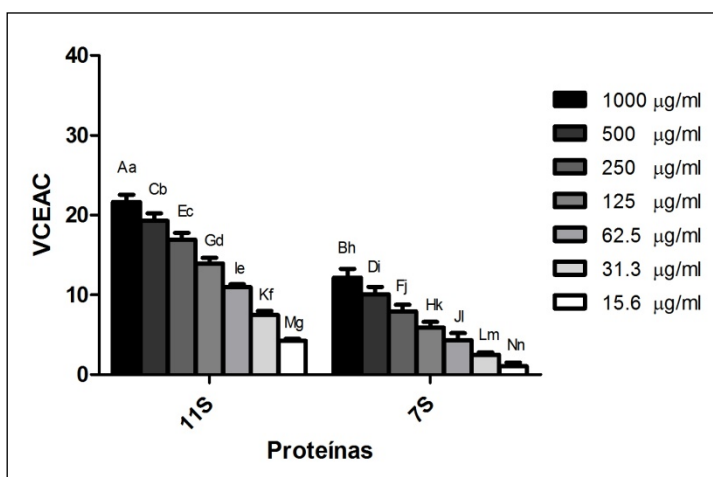
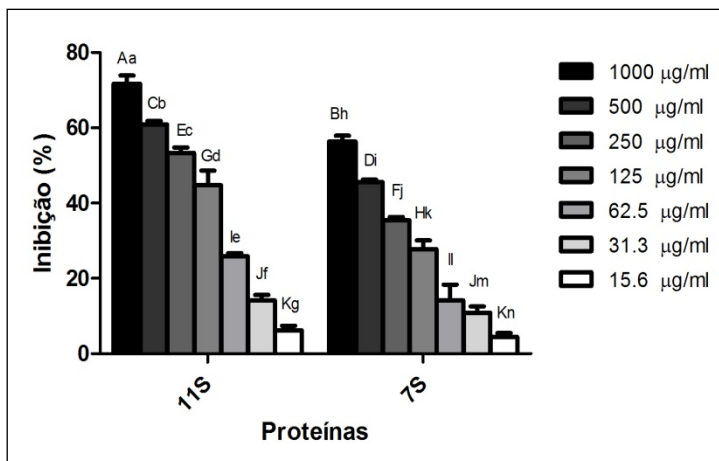


Figura 12: Curva Padrão da vitamina C frente ao radical ABTS



Letras em caixa alta mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre as proteínas.
 Letras em caixa baixa mostram diferença significativa entre as concentrações em cada proteína.
 Teste de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 13: Atividade antioxidante das frações proteicas glicinina (11S) e β- conglucina (7S) pelo método ABTS com a vitamina C.



Letras em caixa alta mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre as proteínas.
 Letras em caixa baixa mostram diferença significativa entre as concentrações em cada proteína.
 Teste de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 14: Atividade antioxidante das frações proteicas glicinina (11S) e β -conglycinina (7S) pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.

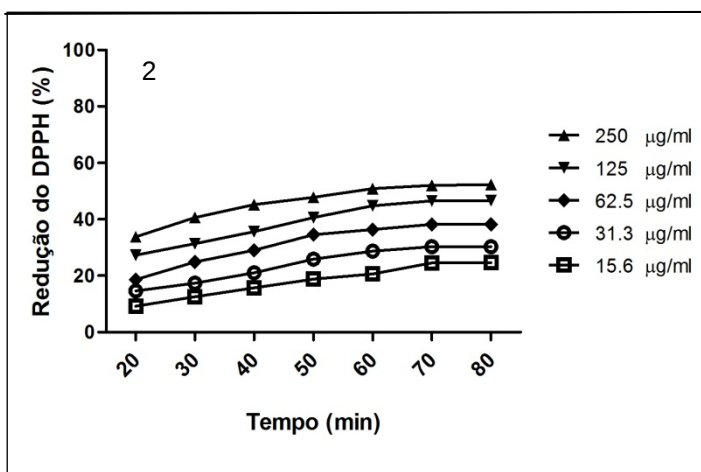
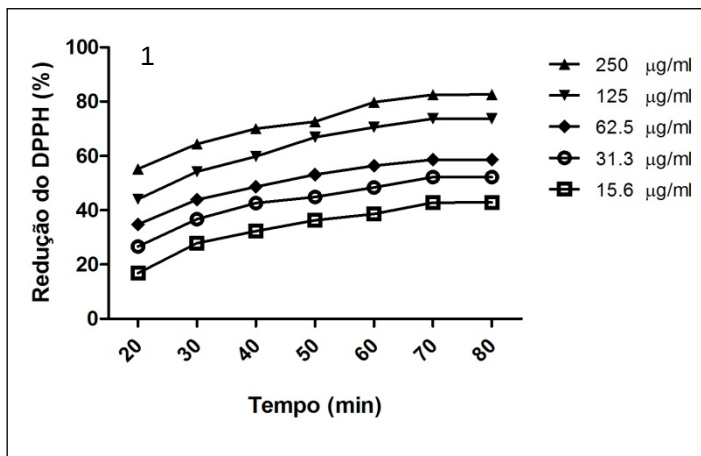


Figura 15: Curva cinética de redução do DPPH das frações glicinina (1) e β -conglycinina (2).

Na análise do ABTS a fração glicinina apresentou atividade antioxidante de 28,5 TEAC em contra partida a fração β - conglucina apresentou atividade antioxidante de 15,2 TEAC com a concentração de 1000 μ g/ml, porém não houve diferença significativa entre esta concentração e a de 500 μ g/ml, demonstrando que atividade antioxidante não aumentará além da concentração de 500 μ g/ml. Na outra análise do ABTS a fração glicinina apresentou atividade antioxidante de 23,4 VCEAC e a fração β - conglucina apresentou atividade de 12,7 VCEAC, com a concentração de 1000 μ g/ml. Na atividade antioxidante do sistema β - caroteno/ácido linoleico a glicinina apresentou 71,7% de atividade enquanto a β - conglucina apresentou 56,3%, com a concentração de 1000 μ g/ml em ambas as proteínas. Na metodologia do DPPH, o menor valor de EC₅₀ que está associado à alta capacidade antioxidante (ZHU *et al.*, 2011), foi obtido com a concentração de 250 μ g/ml nas duas proteínas. Para a fração glicinina o valor de EC₅₀ foi de 46,8 e para a fração β -conglucina o valor de EC₅₀ foi de 71,6. As concentrações 1000 μ g/ml e 500 μ g/ml não mostraram valores absolutos durante a análise no leitor de microplacas, provavelmente devido à intensa coloração, não podendo ser identificadas no comprimento de onda utilizado.

Existem vários estudos que demonstram a habilidade das proteínas como agente antioxidante. Peptídeos originados do leite e da soja exibem grande poder antioxidante (ELIAS, KELLERBY e DECKER, 2008).

Em sistemas aeróbios é essencial o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante, caso haja um desequilíbrio há o estresse oxidativo. O termo radical livre refere-se à molécula que contém número ímpar de elétrons na última camada eletrônica e é este não emparelhamento de elétrons que confere a alta reatividade. A maioria dos radicais livres são derivados do metabolismo do oxigênio (O₂) originando as espécies reativas de oxigênio (ERO), ou seja, durante a respiração celular. Podem ser formados os radicais superóxidos (O₂^{•-}), hidroperoxila (HO₂[•]), hidroxila (OH[•]) altamente tóxicos para as células (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HATEM *et al.*, 2013; SAEIDNIA e ABDOLLAHI, 2013).

Elias, Kellerby e Decker, (2008); Sarmadi e Ismail, (2010); Zhuang, Tang e Yuan, (2013) descreveram os mecanismos de ação antioxidante dos

aminoácidos. Aminoácidos aromáticos convertem as ERO, em moléculas estáveis, doando elétrons. Aminoácidos hidrofóbicos possuem facilidade de solubilização em meios lipídicos permitindo o acesso as ERO neste meio. Aminoácidos catiônicos e aniônicos utilizam o grupo amino e carboxílico das cadeias laterais para quelar íons metálicos (Fe e Cu) e doar hidrogênio impedindo a formação do radical hidroxila. Mendis *et al.* (2005), atribuem a capacidade antioxidante aos aminoácidos prolina, alanina, valina e leucina.

Chen *et al.*, (2012) isolaram os aminoácidos alanina, ácido aspártico e fenilalanina de nozes (*Juglans regia* L.) que possuem característica hidrofóbica e constataram que foram responsáveis pela capacidade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Xie *et al.*, (2008) analisaram a atividade antioxidante de peptídeos de alfafa e observaram que a histidina, tirosina, metionina e cisteína foram os aminoácidos responsáveis pela capacidade antioxidante nesta planta.

Park *et al.*, (2008) avaliaram o potencial antioxidante de peptídeos de soja através das análises de DPPH e ABTS e observaram que peptídeos que continham em sua maioria aminoácidos catiônicos e aniônicos a capacidade antioxidante contra o radical DPPH e o radical ABTS era maior.

Portanto, pode-se concluir que a maioria dos aminoácidos possui atividade antioxidante sendo uma alternativa viável contra os radicais livres (ELIAS, KELLERBY e DECKER, 2008).

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a soja é uma excelente fonte de peptídeos bioativos e as frações proteicas β - conglucina e glicina possuem alto potencial biológico, devido às atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante mostrarem resultados satisfatórios. Pode-se observar também através do teste de Tukey que a fração glicina mostrou maior atividade biológica em relação à fração β -conglucina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARONSON, N.N.J. e DAVIDSON, E.A. Lysosomal Hyaluronidase from Rat Liver . **J Biol Chem**, v. 242, n. 3, p. 437–440, 1967.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada de proteínas, vitaminas e minerais**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 02 abr. 2014. 2005.

CHEN, N. *et al.* Peptides Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. **Peptides**, v. 38, n. 2, p. 344–349, 2012.

DUARTE-ALMEIDA, J.M. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciêñ Tecnol Alim**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

ELIAS, R.J.; KELLERBY, S.S.; DECKER, E.A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Science**, v. 48, p. 37–41, 2008.

EL-SAFORY, N.S.; FAZARY, A.E.; LEE, C. Hyaluronidases , a group of glycosidases : Current and future perspectives. **Carbohydr Polym**, v. 81, n. 2, p. 165–181, 2010.

FARROKHI, N. *et al.* Plant peptides and peptidomics. **Plant Biotechnol J**, v.6, p. 105-134, 2008.

FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Méd Bras**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, E.S. **Efeito da proteína β - conglícinina da soja no metabolismo lipídico de animais submetidos a dieta hipercolesterolêmica**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 103 p. 2008.

GIRISH, K.S. e KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. **Life Sci**, v. 80, n. 21, p. 1921–1943, 2007.

HATEM, E. *et al.* Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 18, n. 67, p. 103–114, 2013.

KALEMBA, D. e KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 10, p. 813–829, 2003.

KHANUM, S.A. *et al.* Synthesis of benzoyl phenyl benzoates as effective inhibitors for phospholipase A2 and hyaluronidase enzymes. **Bioor Med Chem Lett**, v. 15, n. 18, p. 4100–41004, 2005.

KIN *et al.* Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.

LENORMAND, H. *et al.* The hyaluronan–protein complexes at low ionic strength: How the hyaluronidase activity is controlled by the bovine serum albumin. **Matrix Biol**, v. 28, n. 6, p. 365–372, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento e Agropecuária. **Boletim técnico: Biotecnologia agropecuária**, 73 p., 2010.

MARCHESAN *et al.* Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis Dracunculifolia* D.C. e *Baccharis Uncinella* D.C. (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. **Arq Ciênc Saúde**, v.10, n.2, 2006.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1687–1692, 2009.

MENDIS, E. *et al.* Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. **Life Sci**, v. 77, n. 17, p. 2166-2178, 2005.

OLIVEIRA, A. G. *et al.* Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biol Control**, v. 56, n. 2, p. 125–131, 2011.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnol Adv**, v. 21, n. 6, p. 465–499, 2003.

PARK, E.Y. *et al.* Antioxidant activity of some protein hydrolysates and their fractions with different isoelectric points. **J Agri Food Chem**, v. 56, n. 19, p. 9246–9251, 2008.

PARK, Y.K. *et al.* Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 18, n. 3, p. 313- 329, 2013.

PREDES, F.S. *et al.* Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. **BMC Complem Altern Med**, v. 11, n. 1, p. 25, 2011.

REISSIG, J.L.; STROMINGER, J.L.; LELOIR, L.F.A. Modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **J Biol Chem**, v. 217, n. 2, p. 959–966, 1955.

RUFINO, M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico- EMBRAPA**, v. 127, 2007a.

RUFINO, M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico- EMBRAPA**, v. 128, 2007b.

RUFINO, M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SAEIDNIA, S. e ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicol Appl Pharm**, v. 13, p. 432–438, 2013.

SARMADI, B. H. e ISMAIL, A. Peptides Antioxidative peptides from food proteins : A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.

SGARIGLIA, M.A. *et al.* Anti-inflammatory properties of phenolic lactones isolated from *Caesalpinia paraguariensis* stem bark. **J Ethnopharmacol**, v. 147, n. 1, p. 63–73, 2013.

SILVA, M.R.O. **Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de Vila Velha, Itamaracá-Pe.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, (UFPE), p. 61, 2004.

SILVA, J.C. *et al.* Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 5, p. 1790–1795, 2012.

SITOHY, M.Z.; MAHGOUB, S.A.; OSMAN, A.O. In vitro and in situ antimicrobial action and mechanism of glycinin and its basic subunit. **Int J Food Microbiol**, v. 154, n. 1, p. 19–29, 2012.

TANG, X. *et al.* Effects of heat treatment on structural modification and in vivo antioxidant capacity of soy protein. **Nutrition**, v. 28, n. 11-12, p. 1180–1185, 2012.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M.J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Prog Lipid Res**, v. 51, n. 2, p. 149–177, 2012.

TYUG, T.S.; PRASAD, K.N.; ISMAIL, A. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. **Food Chem**, v. 123, n. 3, p. 583–589, 2010.

VERNAZA, M.G. *et al.* Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. **Food Chem**, v. 134, n. 4, p. 2217–2225, 2012.

XIE, Z. *et al.* Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. **Agriculture**, v. 111, p. 370–376, 2008.

YALTIRAK, T. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 8, p. 2052–2056, 2009.

YINGPRASERTCHAI, S.; BUNYASRISAWAT, S.; RATANABANANGKOON, K. Hyaluronidase inhibitors (sodium cromoglycate and sodium auro-thiomalate) reduce the local tissue damage and prolong the survival time of mice injected with *Naja kaouthia* and *Calloselasma rhodostoma* venoms. **Control**, v. 42, p. 635–646, 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 2002.

ZHU, K.X. *et al.* Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. **Food Chem**, v. 126, n. 3, p. 1122–1126, 2011.

ZHUANG, H.; TANG, N.; YUAN, Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. **J Func Food**, v. 5, n. 4, p. 1810–1821, 2013.

Capítulo III: Formulação de um Fitocosmético com a proteína glicinina

Resumo

Fitocosméticos estão ganhando cada vez mais a atenção de consumidores que buscam alternativas para a manutenção da pele. Portanto o objetivo deste capítulo foi adicionar o hidrolisado da proteína glicinina (1000 µg/ml) a uma emulsão-base, originando um fitocosmético. Este foi testado quanto à estabilidade, controle microbiológico e atividades biológicas: antimicrobiana (método de difusão em agar), antioxidante (método do radical ABTS/TEAC) e anti-inflamatória descritas anteriormente no Capítulo II. Observou-se que o fitocosmético manteve a estabilidade e possui índices inferiores de micro-organismos, conforme a Resolução 481/99. A bioatividade da fração glicinina, não foi alterada e nem prejudicada com os outros componentes da emulsão-base. Os resultados das atividades biológicas mantiveram-se semelhantes aos resultados obtidos no capítulo anterior. Para a atividade antimicrobiana, as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. acnes* obtiveram valores de 30,5 mm, 28 mm e 25 mm de halos, respectivamente. A atividade antioxidante o resultado foi de 25,1 TEAC e para a atividade anti-inflamatória foi de 83,4%. Conclui-se que o fitocosmético é um grande potencial para utilização tópica e uma alternativa de cosmético antienvelhecimento e cuidados diários da pele devido às propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana.

Palavras-chave: glicinina, atividade biológica, fitocosmético.

1. INTRODUÇÃO

A constante busca de uma aparência jovem, bonita e saudável tem despertado cada vez mais o interesse da indústria cosmética. Segundo a Abihpec (2014), o Brasil é o terceiro maior produtor de cosméticos no mundo é um dos povos mais vaidosos ficando atrás apenas dos EUA e Japão. Em 2012 as vendas com cosméticos somaram 84,5 bilhões de reais.

O primeiro teste para avaliar as condições do cosmético é o teste de centrifugação que serve como teste de triagem para selecionar as emulsões para o teste de estabilidade. Este teste produz estresse na amostra, aumentando a mobilidade entre as partículas antecipando possível instabilidade e separação de fases, sugerindo uma nova formulação dos componentes, porém caso a emulsão permaneça estável pode-se prosseguir para o teste de estabilidade (BONTORIN, 2009; ZANON, 2010).

Portanto, quando se produz um cosmético deve-se avaliar a estabilidade, antes de disponibilizá-lo ao consumo, requisito fundamental à qualidade e à segurança. Produtos expostos ao consumo e que apresentam problemas de estabilidade organoléptica, físico-química e ou microbiológica, além de descumprirem os requisitos técnicos de qualidade podem colocar em risco a saúde do consumidor configurando infração sanitária (BRASIL, 2004).

O estudo da estabilidade contribui para orientar o desenvolvimento das formulações e do material adequado de acondicionamento, oferecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações, estimar o prazo de validade e auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, oferecendo informações da eficácia e segurança do produto. Uma emulsão é considerada fisicamente instável se há a separação dos componentes da formulação formando agregados, estas alterações podem estar relacionadas a fatores externos, como, temperatura, luz, umidade e micro-organismos ou fatores internos, como, incompatibilidade dos componentes, floculação e pH inadequado (BRASIL, 2004).

Com isso, o estudo de estabilidade deve expor o produto a condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade, fornecendo informações sobre a estabilidade do produto no menor tempo possível. Os parâmetros a serem avaliados durante o estudo de estabilidade

devem ser capazes de garantir a qualidade do produto, dentre estes parâmetros estão o microbiológico, químico e organoléptico (BRASIL, 2004; ZANON, 2010).

Produtos de origem vegetal são incorporados em emulsões cosméticas, sendo responsáveis pela atividade biológica do mesmo (ISAAC *et al.*, 2008). A emulsão cosmética pode ter atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, sendo utilizada no rosto como adjuvante no controle da acne e do envelhecimento precoce.

A acne ocorre devido a um desequilíbrio dos hormônios sexuais, que estimulam a produção de gordura pela pele. É muito comum na adolescência, porém pode ocorrer também durante a gravidez e na menopausa. As bactérias que normalmente habitam os folículos, onde os pelos se abrigam, alimentam-se do excesso de gordura, formando colônias que causam inchaço, vermelhidão e a posterior erupção do folículo (RAMOS E SILVA *et al.*, 2013).

O envelhecimento constitui o conjunto de alterações fisiológicas irreversíveis e inevitáveis, sendo um processo dinâmico observado na epiderme como um reflexo das modificações que ocorrem também no tecido conjuntivo da derme. O envelhecimento da pele participa das mudanças que ocorrem em diversos setores do organismo, podendo ser considerado de dois tipos. O envelhecimento intrínseco decorrente do desgaste natural do organismo, causado pelo passar dos anos, esperado, previsível, inevitável, progressivo, sem a interferência de agentes externos e equivale ao envelhecimento de todos os órgãos e o envelhecimento extrínseco que ocorre através do tabagismo, fatores físicos, nutricionais e mecânicos (DRAELOS, 1999).

Peptídeos têm sido utilizados em cosméticos por apresentarem diferentes funções: efeito cicatrizante, despigmentante, regenerador da matriz extracelular, diminuição de rugas melhorando a firmeza e elasticidade (ZANOLINI, 2011).

Contudo, a incorporação de peptídeos, obtidos a partir da proteína glicinina, em uma emulsão e a avaliação do potencial biológico deste cosmético é altamente favorável para inovação na área de cosméticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenvolvimento da emulsão base

Os componentes da emulsão base estão descritos na tabela 13. A fase aquosa foi aquecida até 75°C e a fase oleosa foi aquecida até o ponto de fusão. A fase aquosa foi transferida para fase oleosa, com agitação até o resfriamento.

Tabela 13: Componentes da emulsão base para produção do fitocosmético.

Componentes	Ação	Quantidade (%)
Água deionizada	Veículo	qsp
EDTA dissódico	Sequestrante	0,10
Propilenoglicol	Umectante	2,00
Metilparabeno	Conservante	0,50
Ciclometicone	Emoliente	1,00
Estearato de glicerina	Emulsionante	1,50
Carbomero	Espessante	1,00
Álcool cetílico	Emulsionante	0,20
Glicerina	Hidratante	2,50

Soluções estoque de peptídeos de glicinina foram produzidas e incorporadas na emulsão para obter uma concentração final de 1000 µg/ml, pois nesta concentração a fração proteica apresentou a melhor atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória dentre as concentrações avaliadas, apresentadas no Capítulo II deste trabalho. A aparência do fitocosmético foi uma coloração levemente amarelada, devido à presença da fração proteica e aspecto uniforme (Figura 16).



Figura 16: Fitocosmético contendo peptídeos de glicinina

2.2 Estudo de Estabilidade

A formulação foi avaliada conforme preconiza o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004).

2.2.1. Teste de Centrifugação

Foram pesados 5 g do fitocosmético e centrifugou-se por 3 vezes a 3,000 rpm por 30 min com temperatura de 25°C. Para o controle foi utilizado o cosmético sem a proteína. Após este período as formulações foram avaliadas quanto à separação de fases, indicando ou não a instabilidade. Esta análise foi realizada em triplicatas.

2.2.2. Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)

Após o teste de centrifugação foi realizado o TEA. Este teste consiste no emprego de temperaturas com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes, que devem ser observados (BRASIL, 2004).

Foram pesados 20 g do fitocosmético e do controle e acondicionados em frascos transparentes de boca larga e com tampa de rosca. As formulações foram submetidas ao armazenamento em situações de temperatura:

- Temperatura ambiente (luz indireta): $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 15 dias, análises no tempo 0, 5, 10 e 15 dias;
- Refrigerador: $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 15 dias, análises no tempo 0, 5, 10 e 15 dias;
- *Freezer*: $-10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 15 dias, análises no tempo 0, 5, 10 e 15 dias;
- Estufa: $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 15 dias, análises no tempo 0, 5, 10 e 15 dias;
- Ciclos de congelamento e descongelamento: alternância das temperaturas $-10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (24 h para cada temperatura), durante 15 dias, análises no tempo 0, 5, 10 e 15 dias.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas para o fitocosmético e controle. Os parâmetros analisados envolveram as possíveis alterações, como, aspecto, cor, odor, valor de pH e separação de fases (CEFALI, 2009).

Segundo Brasil, (2004) para o parâmetro aspecto, o produto deve manter-se íntegro, durante todos os dias de análise, mantendo a aparência inicial, exceto em temperaturas elevadas, *freezer* ou ciclos de congelamento e descongelamento que pequenas alterações são aceitáveis. Para os parâmetros cor e odor a estabilidade deve ocorrer durante os 15 dias de teste e pequenas alterações somente são aceitáveis em temperaturas elevadas. A separação de fases é analisada visualmente e para os valores de pH, uma alíquota de 1g é retirada e homogeneizada em 9 ml de água destilada determinando o valor de pH em temperatura ambiente.

A tabela 14 mostra os critérios de avaliação da emulsão fitocosmética.

Tabela 14: Critérios de avaliação de parâmetros organolépticos da emulsão cosmética

Simbologia	Aspecto, Cor e Odor
N	normal sem alteração
L	levemente modificado
M	modificado
I	intensamente modificado

2.3 Controle microbiológico do fitocosmético

A realização do controle microbiológico de produtos não estéreis visa à determinação de micro-organismos presentes na amostra. Para a contagem destes micro-organismos, foi pesado 1 g do fitocosmético, dissolvido e homogeneizado em 9 ml de água peptonada estéril 0,1%. Um ml desta solução foi colocado em placas de petri contendo aproximadamente 20 ml de ágar nutriente para bactérias e 20 ml de ágar sabouraud para fungos. As placas foram incubadas à 37°C por 24 h para análise de bactérias e 25°C por 7 dias para análise de fungos. Após este período foi realizado a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/g amostra). As análises foram realizadas em triplicatas e como controle foi utilizado à emulsão base sem a fração proteica (BRASIL, 2004).

2.4 Atividade Biológica

As atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante foram realizadas conforme o capítulo II, itens 2.1.2, 2.2, e 2.3.2, no qual para atividade antimicrobiana foi realizado o teste de difusão em ágar apenas para as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. acnes* que habitam a pele podendo causar infecção cutânea, como a acne (*P. acnes*) a atividade antioxidante apenas com o método do radical livre ABTS. As análises foram realizadas em triplicatas e como controle foi utilizado à emulsão- base sem a fração glicinina.

3. Análise Estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão de triplicatas. Foram analisados pelo Graphpad prism 5.0 Software (San Diego, CA, USA). Diferenças foram analisadas usando ANOVA seguido pelo teste de Tukey e teste t para comparação entre médias, quando necessário. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de Centrifugação

Este procedimento é eficaz para a determinação da instabilidade dos produtos emulsionados, já que a simulação do aumento da força de gravidade pode promover a separação dos componentes de diferentes densidades (MORAES, 2011).

Neste trabalho não houve separação das fases tanto no grupo controle quanto no grupo do fitocosmético, sugerindo a estabilidade da emulsão frente ao estresse gravitacional.

De acordo com Tadros, 2004 a ausência da separação de fases demonstra que em condições normais de gravidade e de temperatura ambiente o fitocosmético é fisicamente estável; como ocorreu neste trabalho.

4.2 Teste de Estabilidade Acelerada

Em relação aos parâmetros organolépticos aspecto, cor, odor e separação de fases não houve alterações relevantes em todas as condições de estresse, para o fitocosmético durante os 15 dias de análises, como podem ser observados na tabela 15. Os controles mantiveram-se semelhantes ao fitocosmético (dados não apresentados na tabela).

Para o parâmetro pH, pode-se observar a estabilidade a partir do 10º dia de análises, conforme mostra o figura 17, a emulsão base comportou-se

semelhante ao fitocosmético (dados não apresentados na figura), demonstrando que a adição da glicinina não alterou as propriedades dos componentes da emulsão.

Tabela 15: Avaliação das características organolépticas (cor, odor e aspecto) e separação de fases do fitocosmético.

Variáveis/ Dias	0	5	10	15
Temperatura ambiente	N	N	N	N
Refrigerador	N	N	N	N
Freezer	N	N	N	N
Estufa	N	N	N	L
Ciclos	N	N	N	L

Legenda: N: normal sem alteração, L: levemente modificado.

A variável estufa e ciclos apresentaram mudanças sutis somente no aspecto do fitocosmético e no controle. De acordo com Cefali, (2009) e Isaac *et al.*, (2008) esta mudança pode ter ocorrido devido à evaporação de água durante a permanência do fitocosmético e do controle na estufa.

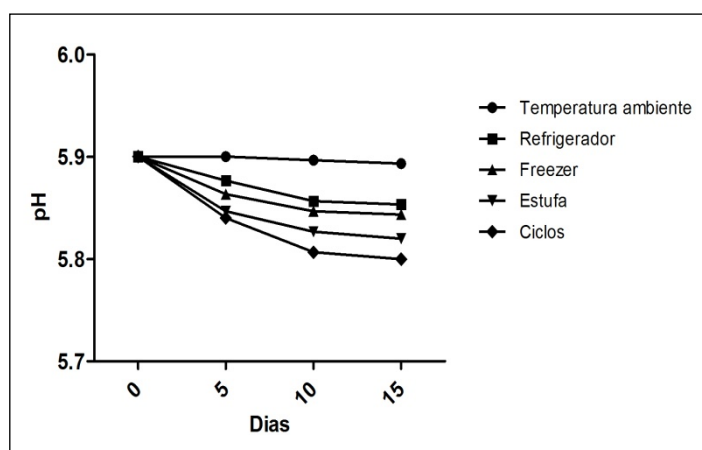


Figura 17: Variação do pH no fitocosmético durante os 15 dias de análise no teste de estabilidade acelerada.

A formulação apresentou valores entre 5,8-5,9 compatível com o pH cutâneo que fica em torno de 5,0-6,0 (FLYNN *et al.*, 2001). Todas as condições testadas durante os 15 dias não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), confirmando a estabilidade da emulsão formulada neste estudo. A figura 18

mostra os fitocosméticos e controle (temperatura ambiente) ao final dos 15 dias de teste.

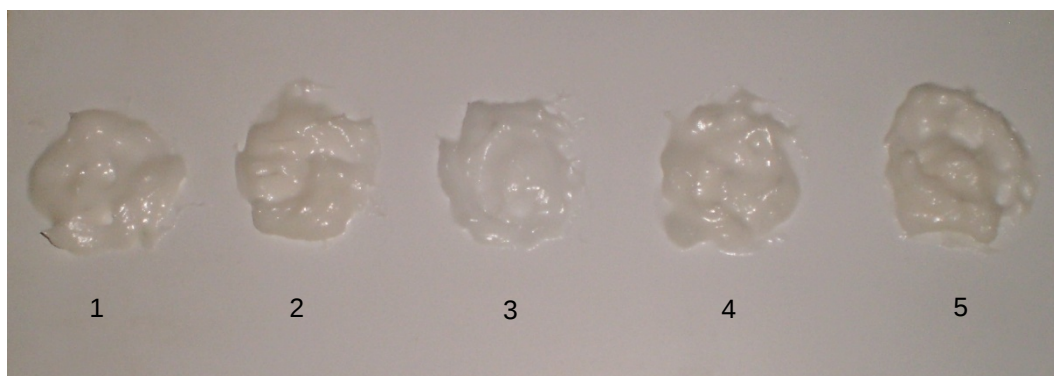


Figura 18: Fitocosmético após os 15 dias do teste de estabilidade acelerada.

Legenda: 1: Temperatura ambiente, 2: Ciclos, 3: Controle, 4: *Freezer*, 5: Estufa.

4.3 Controle microbiológico do fitocosmético.

A Resolução – RDC 481/ 99 estabelece os limites para o controle microbiológico para produtos de higiene pessoal, perfumes e cosméticos. O fitocosmético produzido neste trabalho, de acordo com esta resolução se enquadra no grau II, ou seja, produtos que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações, cuidados, modo e restrições de uso, portanto, o máximo permitido para contaminação com micro-organismos aeróbios é de 5×10^3 UFC/ g ou ml de amostra.

A contagem total de micro-organismos no fitocosmético e no controle, para bactérias foi ausente e para fungos, foi com índices inferiores a 4 UFC/g de amostra, estes resultados demonstraram que estão dentro do limite preconizado pela resolução, não havendo necessidade de isolamento de colônias e identificação das mesmas, sendo assim aprovado pelo teste microbiológico.

4.4 Atividade Biológica

4.4.1 Atividade antimicrobiana

Os resultados do teste de difusão em ágar para as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. acnes* não diferiram significativamente aos resultados encontrados no Capítulo II, como pode-se observar na tabela 16.

Tabela 16: Atividade antimicrobiana do fitocosmético composto por peptídeos de glicinina (11S) contra cepas bacterianas*.

Cepas	Fitocosmético (halos em mm)
<i>E.coli</i>	30.5±0.50 ^a
<i>S. aureus</i>	28.0±0.20 ^b
<i>P. acnes</i>	25.0±0.30 ^c

*Média ± desvio padrão de triplicatas

Letras em caixa baixa mostram diferença significativa entre as cepas.

Teste de Tukey (p < 0.05)

4.4.2 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória do fitocosmético apresentou resultado semelhante ao encontrado no Capítulo II. O fitocosmético possui 83,4% de atividade anti-inflamatória. Este resultado não foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao resultado encontrado anteriormente (p < 0,05).

4.4.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante encontrada no fitocosmético pelo método do radical ABTS foi de 25,1±1,75 TEAC. A curva padrão do trolox esta na figura 19. Este resultado foi similar ao encontrado no Capítulo II deste trabalho e, portanto estatisticamente não significativo (p < 0,05).

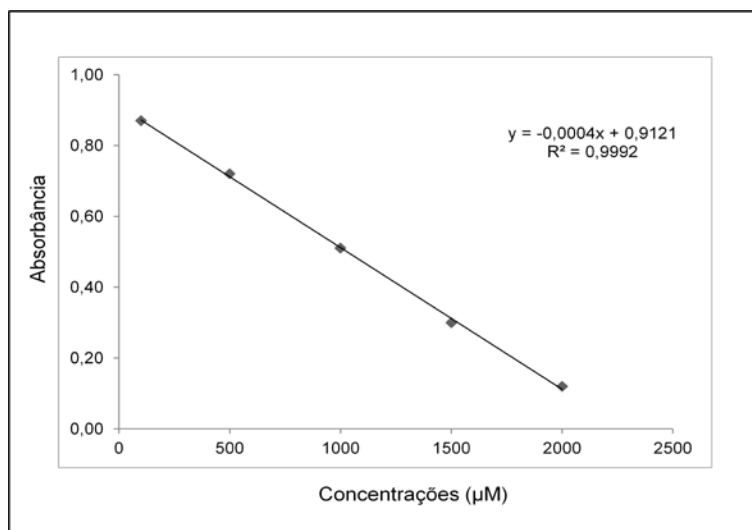


Figura 19: Curva Padrão do Trolox frente ao radical ABTS

A emulsão base não apresentou nenhuma atividade biológica.

Nas últimas décadas novas moléculas estão surgindo com específicas funções para o cuidado da pele (ANTÓN, 2010). Proteínas de origem vegetal como trigo, milho, aveia, arroz, girassol e soja, tornaram-se importantes fontes de peptídeos na área de cosméticos, podendo ser incorporadas em loções, géis e cremes. O IPS é a fonte principal da transformação proteica de origem vegetal em fitocosmético (TEGLIA e SECCHI, 1999).

De acordo com Gaspar *et al.*, (2008); Hirata, Sato e Santos (2004); Scibisz, Artc e Pytkowska, (2008); Teglia e Secchi, (1999), os peptídeos atuam no extrato córneo da pele (camada superficial), melhorando a hidratação, elasticidade, rugas de expressão, auxiliando na capacidade antioxidante, regeneração de fibroblastos e redução da acne. Há evidências que EROs estão envolvidas no processo de envelhecimento cutâneo e a aplicação tópica de cosméticos com propriedades antioxidantes tem efeitos biológicos comprovados.

Os aminoácidos arginina, lisina, histidina (catiônicos), alanina, leucina, isoleucina e metionina (hidrofóbicos) são os responsáveis pela ligação nas células epiteliais do extrato córneo que possuem carga negativa, aumentando a permeabilidade destas e facilitando a passagem do fitocosmético (APOLINARIO *et al.*, 2010; JANŮŠOVÁ *et al.*, 2013; PATLOLLA *et al.*, 2010).

Atualmente existem alguns cosméticos indicados para o rosto que possuem proteína de soja em sua formulação como agente principal, como por

exemplo, o *Anti- sagging and ultra hydrating night cream with dermo peptide* da marca L'oreal®, *Bye bye redness correcting creme* da marca It Cosmetics®, *Age reform hydro dynamic ultimate moisture* da marca Murad® e *Chronos Politenor de soja* da marca Natura®, porém nenhuma destas marcas identificam a/as proteínas da soja utilizadas nestes fitocosméticos (Fonte: próprio autor).

De acordo com Mukherjee *et al.*, (2011), os fitocosméticos desempenham um papel importante na área cosmecêutica devido à relevância e alta eficácia. A aplicação de peptídeos bioativos nesta área é promissora, devido à grande versatilidade e diversidade das atividades biológicas (ZHANG e FALLA, 2009). Como foi observado neste trabalho que demonstrou a capacidade da utilização da farinha desengordurada de soja como fonte de proteínas para formulação de um fitocosmético com grande poder bioativo.

5. CONCLUSÃO

O estudo de estabilidade mostrou que o fitocosmético foi estável quanto às alterações ambientais, durante o período de análises e também não possui índices relevantes de contaminação externa de micro-organismos.

O fitocosmético foi eficaz quanto às atividades biológicas antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória. Mostrando o grande potencial da fração glicinina como fonte de matéria- prima de origem vegetal para o uso na área cosmecêutica.

No entanto este fitocosmético requer mais pesquisas para sua utilização tópica. Há a necessidade de conhecer a estabilidade da formulação durante o período de permanência no mercado e pelo usuário, bem como, realizar mais testes *in vitro* avaliando possíveis reações que impossibilitem o uso por humanos.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados deste trabalho foram bastante promissores, permitindo futuras pesquisas a serem realizadas, como:

- Sequenciamento dos aminoácidos que compõem a proteína glicinina;
- Realização de outros testes de atividades biológicas, como foto-protetora e clareadora;
- Microencapsulação da fração proteica;
- Desenvolvimento de testes de permeação cutânea para posterior confirmação de atividade biológica nas camadas da pele;
- Teste de *shelf life*, ou seja, tempo de duração de prateleira;
- Teste de citotoxicidade;
- Teste de alergenicidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. **Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**. Disponível em: < www.abihpec.com.br > Acesso em: 9 jan. 2014.

ANTÓN, J.M.G. Los péptidos: las nuevas moléculas para el tratamiento de la piel. **Piel**, v. 25, n. 10, p. 545–546, 2010.

APOLINARIO, A. *et al.* Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciên Farm Básica Apl**, v. 31, n. 3, p. 225–231, 2010.

BONTORIN, G. **Estudo de estabilidade de emulsão cosmética utilizando reologia e técnicas convencionais de análise**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, (UFPR), 74 p. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos - séries temáticas**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 17 jul. 2013. 2004.

CEFALI, L. **Desenvolvimento e atividade do fitocosmético contendo licopeno para o combate à aceleração do envelhecimento cutâneo**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. (UNESP), 2009.

DRAELOS, D.Z. **Cosméticos em dermatologia**. 329 p. 1999.

FLYNN, T.C. *et al.* Dry skin and moisturizers. **Clin Dermatol**, v. 19, n. 4, p. 387–92, 2001.

GASPAR, L.R. *et al.* Evaluation of dermatological effects of cosmetic formulations containing *Saccharomyces cerevisiae* extract and vitamins. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 11, p. 3493–500, 2008.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farm Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418–424, 2004.

ISAAC, V.L.B. *et al.* Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev Ciên Farm Básica Apl**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

JANUŠOVÁ, B. *et al.* Amino acid derivatives as transdermal permeation enhancers. **J Control Release**, v. 165, n. 2, p. 91–100, 128, 2013.

MORAES, J. **Desenvolvimento de cosmético contendo ácido alfa- lipólico para prevenção de alterações da pele e do envelhecimento cutâneo**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, (UNESP), 2011.

MUKHERJEE, P.K. *et al.* Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine** v. 19, n. 1, p. 64–73, 15, 2011.

PATLOLLA, R.R. *et al.* Translocation of cell penetrating peptide engrafted nanoparticles across skin layers. **Biomaterial**, v. 31, n. 21, p. 5598–607, 2010.

RAMOS-E-SILVA, M. *et al.* Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. **Clin Dermatol**, v. 31, n. 6, p. 750–758, 2013.

Resolução - RDC 481/ 99. (1999). Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 9 jan. 2014

SCIBISZ, M.J.A.; ARTC, J.; PYTKOWSKA, K. Hydrolysed proteins in cosmetic production, part II. **SOFW J Wydanie Polskie**, v. 1, n. 4, p. 12 – 16, 2008.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Adv Coll Int Sci**, v. 108, p. 227–258, 2004.

TEGLIA, A. e SECCHI, G. Proteins in cosmetics. In: **Principles of polymer science and technology in cosmetic and personal care**, p. 404–477, 1999.

ZANOLINI, C. **Estabilidade de formulações cosméticas antienvelhecimento com hidrolisado de proteína do arroz (*Oryza sativa*)**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, (USP), 146 p. 2011.

ZANON, A.B. **Aspectos teóricos e práticos sobre avaliação da estabilidade de emulsões manipuladas em farmácia**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (UFRGS), 52 p. 2010.

ZHANG, L. e FALLA, T.J. Cosmeceuticals and peptides. **Clin Dermatol**, v. 27, n. 5, p. 485–94, 2009.

