



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

Produção e caracterização de β -glicosidase vegetal e microbiana e sua aplicação para conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas

Autora: ALICE FUJITA LIMA

Orientador: YONG K. PARK

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas
São Paulo – Brasil
2003

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Yong Kun Park
(Orientador)

Prof. Dr. Roberto Da Silva

Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy

Prof. Dra. Gláucia Maria Pastore

“A pessoa que nunca desiste e tem uma forte determinação para realizar o seu trabalho, mesmo que cometa falha ou seja ridicularizada pelos outros, certamente crescerá bastante”.
(Meishu-Sama)

“Se o ser humano enfrentar tudo com coragem e boa vontade, apreendendo e pesquisando cada coisa, poderá ampliar cada vez mais o seu interesse, a ponto de entender que a vida é um tesouro inesgotável”.
(Nidai-Sama)

Dedico, aos meus pais
e ao meu marido com Amor

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Meishu-Sama sem eles eu nada seria.

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park pela orientação, apoio e pelos incentivos ao futuro.

Aos professores Dr. Roberto Da Silva, Dra. Helena Teixeira Godoy e Dra. Gláucia Maria Pastore, membros da banca examinadora, pelas sugestões apresentadas ao trabalho.

A Prof. Dra. Hélia Harumi Sato pelas sugestões durante o desenvolvimento dos experimentos.

A Prof. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini pelo uso do equipamento.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica pelos bate-papos e desabafos do dia-a-dia.

À toda minha família, pela educação, carinho e incentivo.

Ao meu marido pelo amor e compreensão.

Os técnicos Bia, Eliane, Guilherme, Kleber, Karla e Dora por sempre estarem solícitos em cooperar.

Aos Institutos CATI (Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – Campinas), ao IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) em especial a Dra. Elaine B. Wutke, a EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Viçosa) em especial ao Dr. Rogério Vieira e a indústria Tozan pela doação de amostras para a realização dos experimentos.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos, da Secretaria de Pós-Graduação, Biblioteca, Microcentro e aos demais funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela disposição em ajudar.

Aos amigos de perto e de longe, que de certa maneira sempre estiveram ao meu lado.

A todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xix
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1) Isoflavonas.....	8
2.2) Propriedades biológicas das isoflavonas.....	14
2.2.1) Atividade Estrogênica.....	14
2.2.2) Efeito hipocolesterolêmico e aterosclerose.....	15
2.2.3) Prevenção da osteoporose.....	20
2.2.4) Efeito anti-carcinogênico.....	21
2.2.5) Efeito antioxidante.....	25
2.2.6) Outros efeitos.....	26
2.3) Biodisponibilidade das isoflavonas.....	27
2.4) β -glicosidase.....	31

2.4.1) β -glicosidase vegetal.....	31
2.4.2) β -glicosidase microbiana.....	35
2.5) Feijão fava (<i>Phaseolus lunatus</i>).....	39
2.6) O fungo <i>Aspergillus niger</i>	41
2.7) Análise de flavonóides por cromatografia.....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1) MATERIAIS.....	46
3.1.1) Leguminosas.....	46
3.1.2) Reagentes e Materiais Específicos.....	46
3.2) MÉTODOS.....	47
3.2.1) β -glicosidase vegetal.....	47
3.2.1.1) Coleta de amostras.....	47
3.2.1.2) Extração da enzima.....	47
3.2.2) β -glicosidase microbiana.....	48
3.2.2.1) Microrganismos.....	48
3.2.2.2) Produção de β -glicosidase microbiana por fermentação em meio semi-sólido.....	48
3.2.2.3) Produção de β -glicosidase microbiana por fermentação submersa.....	49
3.2.3) Atividade de β -glicosidase.....	49

3.2.4) Determinação das condições ótimas da atividade (Análise univariável)...	50
3.2.4.1) Efeito da temperatura.....	50
3.2.4.2) Efeito do pH.....	50
3.2.4.3) Efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática.....	51
3.2.4.4) Efeito do pH na estabilidade da atividade enzimática.....	51
3.2.5) Planejamento fatorial para determinação das condições ótimas da atividade enzimática.....	51
3.2.5.1) Planejamento fatorial completo.....	52
3.2.6) Purificação das β -glicosidases.....	53
3.2.6.1) Precipitação com etanol (70% v/v)	53
3.2.6.2) Cromatografia em coluna aberta CM-Sephadex C-50.....	54
3.2.6.3) Cromatografia da enzima de feijão fava (<i>Phaseolus lunatus</i>).....	55
3.2.6.4) Eletroforese SDS-PAGE.....	55
3.2.7) Extração de isoflavonas.....	56
3.2.8) Determinação de isoflavonas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.....	56
3.2.9) Conversão de isoflavona glicosilada em isoflavona aglicona por β - glicosidase vegetal e microbiana.....	57
3.2.9.1) Perfil do substrato.....	58
3.2.9.2) Efeito da concentração do substrato.....	58

3.2.9.3) Efeito do tempo de reação.....	58
3.2.9.4) Comparação das conversões das enzimas obtidas.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1) β -glicosidase vegetal.....	60
4.1.1) Extração e seleção da β -glicosidase vegetal.....	60
4.1.2) Determinação das condições ótimas da atividade enzimática do extrato bruto de feijão fava (<i>Phaseolus lunatus</i>).....	61
4.1.2.1) Caracterização bioquímica (Análise univariável).....	61
4.1.2.1.1) Efeito da temperatura.....	61
4.1.2.1.2) Efeito do pH	62
4.1.2.1.3) Efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática	63
4.1.2.1.4) Efeito do pH na estabilidade da atividade enzimática.....	64
4.1.2.2) Determinação da faixa ótima de pH e temperatura por planejamento estatístico.....	65
4.1.3) Purificação parcial da β -glicosidase vegetal.....	69
4.1.3.1) Eletroforese SDS-PAGE da enzima de feijão fava.....	71
4.2) β -glicosidase microbiana.....	75
4.2.1) Produção de β -glicosidase microbiana por fermentação semi-sólida.....	75
4.2.2) Produção de β -glicosidase microbiana por fermentação submersa.....	77

4.2.3) Determinação das condições ótimas da atividade enzimática do extrato bruto de <i>Aspergillus niger</i>	78
4.2.3.1) Caracterização bioquímica (Análise univariável).....	78
4.2.3.1.1) Efeito da temperatura.....	78
4.2.3.1.2) Efeito do pH	79
4.2.3.1.3) Efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática	81
4.2.3.1.4) Efeito do pH na estabilidade da atividade enzimática.....	82
4.2.3.2) Determinação da faixa ótima de pH e temperatura por planejamento estatístico.....	83
4.2.3) Purificação parcial da β -glicosidase microbiana.....	87
4.2.3.1) Eletroforese SDS-PAGE da enzima de <i>Aspergillus niger</i>	89
4.3) Conversão de isoflavona glicosilada em isoflavona em isoflavona aglicona por β -glicosidases.....	93
4.3.1) Perfil do substrato.....	93
4.3.2) Efeito da concentração do substrato.....	99
4.3.3) Efeito do tempo de reação.....	105
4.3.4) Comparação da conversão das isoflavonas utilizando enzimas brutas e parcialmente purificadas.....	111
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	117

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	119
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Quantidade de isoflavonas em alimentos orientais e ocidentais a base de soja.....	11
Tabela 2. Mecanismo do efeito benéfico da proteína de soja na diminuição do risco de doenças cardiovasculares.....	19
Tabela 3. Possíveis efeitos anticarcinogênico de isoflavonas contidas em produtos de soja.....	23
Tabela 4. Porcentagem relativa de hidrólise e valores de km para diversos substratos de β -glicosidase.....	33
Tabela 5. Nível das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para análise da atividade enzimática.....	52
Tabela 6. Números de ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 para análise da atividade enzimática.....	53
Tabela 7. Números de ensaios do planejamento fatorial completo com pontos centrais e axiais e resultado da atividade enzimática.	66
Tabela 8. Cálculo da ANOVA a 95% de nível de confiança	66

Tabela 9. Purificação parcial de β -glicosidase de feijão fava.....	71
Tabela 10 Números de ensaios do planejamento fatorial completo com pontos centrais e axiais e resultado da atividade enzimática.....	84
Tabela 11 Cálculo da ANOVA a 95% de nível de confiança.....	84
Tabela 12 Purificação parcial de β -glicosidase de <i>Aspergillus niger</i>	89

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura química de isoflavona.....	8
Figura 2. Estruturas moleculares das isoflavonas glicosídicas e agliconas.....	9
Figura 3. Estrutura química de genisteína e seus conjugados indicando vários estágios da degradação ou metabolismo.....	11
Figura 4. Similaridade nas estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17- β -estradiol e da isoflavona genisteína.....	15
Figura 5. Metabolismo da daidzeína nos humanos.....	27
Figura 6. Foto do feijão fava (<i>Phaseolus lunatus</i>).....	39
Figura 7. Foto do fungo <i>Aspergillus niger</i>	41
Figura 8. Atividades de β -glicosidases extraídas de leguminosas.....	60
Figura 9. Efeito da temperatura na β -glicosidase bruta extraída de <i>Phaseolus lunatus</i>	61
Figura 10 Efeito do pH na β -glicosidase bruta extraída de <i>Phaseolus lunatus</i>	62
Figura 11 Determinação da termo-estabilidade da β -glicosidase bruta extraída de <i>Phaseolus lunatus</i>	63

Figura 12	Determinação do pH na estabilidade da β -glicosidase bruta de extraída de <i>Phaseolus lunatus</i>	64
Figura 13	Superfície de resposta para tempo e temperatura.....	67
Figura 14	Área de contorno.....	67
Figura 15	Perfil de eluição da β -glicosidase de <i>Phaseolus lunatus</i>	69
Figura 16	Gel de eletroforese SDS-PAGE de β -glicosidase parcialmente purificada de feijão fava.....	73
Figura 17	Produção de β -glicosidase por fermentação semi-sólida utilizando fungos.....	75
Figura 18	Produção de β -glicosidase por fermentação submersa utilizando fungos.....	77
Figura 19	Efeito da temperatura na β -glicosidase bruta extraída de <i>Aspergillus niger</i>	79
Figura 20	Efeito do pH na β -glicosidase bruta extraída de <i>Aspergillus niger</i> .	80
Figura 21	Determinação da termo-estabilidade da β -glicosidase bruta extraída de <i>Aspergillus niger</i>	81
Figura 22	Determinação do pH na estabilidade da β -glicosidase bruta extraída de <i>Aspergillus niger</i>	82
Figura 23	Superfície de resposta para tempo e temperatura.....	85
Figura 24	Área de contorno.....	85

Figura 25	Perfil de eluição da β -glicosidase de <i>Aspergillus niger</i>	87
Figura 26	Gel de eletroforese SDS-PAGE de β -glicosidase parcialmente purificada de <i>Aspergillus niger</i>	91
Figura 27	Perfis cromatográficos de isoflavonas de duas variedades de soja .	95
Figura 28	Representação gráfica da conversão de isoflavonas de duas variedades de soja.....	97
Figura 29	Perfis cromatográficos da conversão de isoflavonas em função da concentração de substrato.....	101
Figura 30	Curvas de conversão de isoflavonas em função da concentração de substrato.....	103
Figura 31	Perfis cromatográficos da conversão de isoflavonas em função do tempo de reação.....	107
Figura 32	Representação gráfica da conversão de isoflavonas em função do tempo de reação.....	109
Figura 33	Perfis cromatográficos da conversão de isoflavonas utilizando diferentes enzimas.....	113
Figura 34	Representação gráfica da conversão de isoflavonas utilizando diferentes enzimas.....	115

RESUMO

Há evidências de que o consumo de soja beneficia a saúde contribuindo para a prevenção de doenças crônicas devido as isoflavonas presentes nessa leguminosa. Essas isoflavonas têm sido intensamente estudadas devido suas propriedades biológicas, tais como: atividade estrogênica e anti-estrogênica, anti-carcinogênica, antioxidante, antifúngica e anti-hemolítica. A soja possui três tipos de isoflavonas agliconas: daidzeína, genisteína e gliciteína. As mesmas isoflavonas quando glicosiladas são chamadas daidzina, genistina e glicitina. A enzima β -glicosidase é capaz de transformar isoflavonas glicosiladas em agliconas. Há evidências que as isoflavonas glicosiladas não são absorvidas pelo intestino somente as agliconas são absorvidas. O presente trabalho teve como objetivo estudar β -glicosidases de fungos filamentosos e β -glicosidase de leguminosas. A partir da extração enzimática foram selecionadas as de maior atividade enzimática, uma enzima de feijão fava (*Phaseolus lunatus*) com 0,71UI/mL e outra enzima de *Aspergillus niger* com 0,77UI/mL. Foi então feita caracterização bioquímica dos extratos brutos enzimáticos. O extrato bruto de feijão fava apresentou pH e temperatura ótimos a pH 5,5 e 60°C, respectivamente. Mostrou-se estável em uma faixa ampla de pH entre 4,0 a 9,0 e temperatura de 40°C a 55°C. O extrato bruto de *Aspergillus niger* teve pH e temperatura ótimos a pH 5,0 e 60°C, respectivamente. Mostrou-se estável em pH ácido (em torno de 4,0). As enzimas, vegetal e microbiana, foram parcialmente purificadas. A β -glicosidase de feijão fava foi purificada 4 vezes em coluna CM-Sephrose com 77,05% de recuperação e atividade específica de 0,18U/mg de proteína. Apresentando 5 bandas na eletroforese SDS-PAGE. A β -glicosidase de *A. niger* foi purificada 14 vezes em coluna CM-Sephadex C-50 com 2,2% de recuperação e atividade específica de 17U/mg de proteína e apresentou 4 bandas na eletroforese. O estudo da aplicação das enzimas variando o substrato e sua

concentração, tempo de reação, tipo e quantidade da enzima para a conversão das isoflavonas glicosiladas em agliconas mostrou-se que todos esses fatores podem influenciar a conversão. Pode-se concluir que enzimas de *Phaseolus lunatus* e *Aspergillus niger* convertem isoflavonas glicosiladas (daidzina e genistina) em isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína).

SUMMARY

There are evidences that the consumption of soy products provides benefits that may help prevent against chronic diseases due to the isoflavones present in these seeds. The isoflavones have been intensively studied due to their biological properties, such as: estrogenic and anti-estrogenic activities, anti-carcinogenic, antioxidative, antifungal and antihemolytic activities. The soybeans have three types of isoflavones aglycones: daidzein, genistein and glycitein. In the β -glucosidase form, they become: daidzin, genistin and glicitin. Several workers reported that the enzyme β -glucosidase is able to convert isoflavone glycosides to aglucones. Others articles showed that the isoflavone glycosides are not absorbed in the gut, only the aglucones are absorbed. The aim of this work was to study β -glucosidase from filamentous fungus and β -glucosidase from leguminous seeds. It was selected enzymes which had the highest activity, the enzyme from lima beans (*Phaseolus lunatus*) with 0.71UI/mL and other enzyme from *Aspergillus niger* with 0.77UI/mL. The crude extract from lima beans showed optimum activity at pH 5.5 and 60°C, respectively. It's had high thermo stability and pH range of action was between 4.0 and 9.0 and temperature was 40°C to 55°C. The crude extract from *Aspergillus niger* had maximum activity at pH 5.0 and 60°C and it's also showed high thermo stability and stable at acidic pH (about 4.0). The following steps were purified vegetal and microbial enzymes. The β -glucosidase from lima beans was purified 4 times by CM-Sephadex column and obtained 77.05% of recovered and specific activity of 0.18U/mg of protein. The SDS-PAGE electrophoresis gave 5 bands. The β -glucosidase from *A.niger* was purified 14 times by CM-Sephadex C-50 column and obtained 2.2% of recovered and specific activity of 17U/mg of protein. The electrophoresis gave 4 bands. After that, were studied applications of enzymes measuring the profile of isoflavones: changing the substrate and their concentration, reaction time, type and amount of enzyme to convert isoflavone glycosides in

aglucones and were observed that all factors influenced the conversion. In conclusion enzymes from *Phaseolus lunatus* and *Aspergillus niger* hydrolyzed the isoflavone glycosides (daidzin and genistin) to yield isoflavone aglucones (daidzein and genistein).

1. INTRODUÇÃO

As isoflavonas possuem várias propriedades biológicas benéficas à saúde humana. Como exemplo, podemos citar os efeitos: (1) estrogênico e anti-estrogênico, benéficos na hipercolesterolemia, osteoporose e arteriosclerose; (2) anti-carcinogênico, especialmente contra câncer da mama e próstata, trabalhos publicados citam que a genisteína inibe a tirosina quinase e daidzeína inibe a esterol sulfatase, enzimas envolvidas na formação de tumores; (3) antioxidante quando estão na forma 8-hidroxdaidzeína e 8-hidroxi-genisteína; (4) antifúngico e (5) anti-hemolítico. Além disso, foram consideradas produto GRAS (Generally Recognized As Safe), ou seja, reconhecido como seguro para o consumo pela FDA-USA (1999).

Os flavonóides são compostos fenólicos vegetais responsáveis pela coloração de inúmeras verduras, frutas e flores, variando do amarelo, laranja, vermelho ao violeta e são classificados em flavanona, flavona, flavonol, antocianina, catequina e isoflavona.

As isoflavonas são encontradas em frutas, nozes, vegetais e leguminosas, principalmente em soja. A soja possui três tipos de isoflavonas agliconas: daidzeína, genisteína e gliciteína que quando glicosiladas, ou seja, na forma de glicosil isoflavonas, são chamadas de daidzina, genistina e glicitina. Existem também as isoflavonas β -glicosídicas conjugadas, que podem ser classificadas em acetil glicosídeo e malonil glicosídeo. Estas, por sua vez, podem ser sub-divididas em 6''-O-acetil daidzina, 6''-O-acetil genistina, 6''-O-acetil glicitina, 6''-O-malonil daidzina, 6''-O-malonil genistina e 6''-O-malonil glicitina.

As isoflavonas agliconas apresentam maior atividade biológica que as glicosiladas. Trabalhos indicam que as isoflavonas glicosiladas presentes em alimentos não são absorvidas diretamente, devido principalmente ao açúcar unido

através da ligação beta. Somente isoflavonas sem a molécula de açúcar, chamadas agliconas, são capazes de passar através da parede do intestino, aumentando assim sua biodisponibilidade.

O Brasil é um grande produtor e consumidor de vegetais, sendo o segundo maior produtor mundial de soja, com 17,5% da produção mundial (USDA, Department of Agriculture in United States, Out./2001), o que torna viável a produção isoflavonas em grande escala. Considerando que as isoflavonas agliconas são mais biodisponíveis é importante que sejam estudadas a produção e a aplicação da enzima β -glicosidase.

A enzima β -glicosidase é uma celulase responsável pela quebra da ligação glicosídica β -1,4, liberando glicose. Essa enzima pode ser produzida por microrganismos ou ser extraída de frutas e leguminosas.

Tendo como base que os trabalhos publicados relacionam a enzima β -glicosidase e isoflavonas utilizando soja como fonte da enzima, e que o Brasil possui uma grande variedade de vegetais que podem constituir fontes inesgotáveis de enzimas, este trabalho teve como objetivo estudar β -glicosidases microbianas (fungos filamentosos) e vegetais (leguminosas) para conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas. Após a extração da enzima, foram selecionadas as enzimas de maior atividade, a enzima vegetal de feijão fava (*Phaseolus lunatus*) com 0,71UI/mL e a enzima de *Aspergillus niger* com 0,77UI/mL. Foi então feita caracterização bioquímica dos extratos brutos enzimáticos. O extrato bruto de feijão fava apresentou pH e temperatura ótimos a pH 5,5 e 60°C, respectivamente. Mostrou-se estável em uma faixa ampla de pH entre 4,0 a 9,0 e temperatura de 40°C a 55°C, respectivamente. O extrato bruto de *Aspergillus niger* teve pH e temperatura ótimos a pH 5,0 e 60°C, respectivamente. Mostrou-se estável em pH ácido (em torno de 4,0). As enzimas, vegetal e microbiana, foram parcialmente purificadas. A β -

glicosidase de feijão fava foi purificada 4 vezes em coluna CM-Sephrose com 77,05% de recuperação e atividade específica de 0,182 U/mg de proteína. Apresentando 5 bandas na eletroforese SDS-PAGE. A β -glicosidase de *A. niger* foi purificada 14 vezes em coluna CM-Sephadex C-50 com 2,2% de recuperação e atividade específica de 17 U/mg de proteína e apresentou 4 bandas na eletroforese. O estudo da aplicação das enzimas variando o substrato e sua concentração, tempo de reação, tipo e quantidade da enzima para a conversão das isoflavonas glicosiladas em agliconas mostrou-se que todos esses fatores podem influenciar a conversão. Pode-se concluir que enzimas de *Phaseolus lunatus* e *Aspergillus niger* convertem isoflavonas glicosiladas (daidzina e genistina) em isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ISOFLAVONAS

Os flavonóides são compostos fenólicos vegetais responsáveis pela coloração de inúmeras verduras, frutas e flores (Adrian et al., 1990) variando do amarelo, laranja, vermelho ao violeta (Alais et al., 1991). Dentre os flavonóides encontramos as flavanonas, flavonas, flavonols, antocianinas, catequinas e as isoflavonas (Merken e Beecher, 2000).

As isoflavonas são isômeros que se diferenciam das demais estruturas dos flavonóides por apresentarem o ciclo benzênico unido ao carbono 3 do heterociclo em vez do carbono 2, como mostra a Figura 1 (Kerckhoffs et al., 2002).

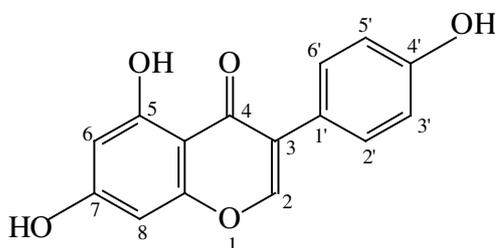


Figura 1: Estrutura química de isoflavona (Kerckhoffs et al., 2002).

De acordo com Liu (1999) a soja possui três tipos de isoflavonas, cada uma em quatro formas químicas diferentes, totalizando 12 isômeros. As formas agliconas são chamadas de daidzeína, genisteína e gliciteína. Quando glicosiladas, ou seja, na forma de glicosídeos, são chamadas de daidzina, genistina e glicitina, cujas

estruturas podem ser observadas na Figura 2. Existem também as isoflavonas β -glicosídicas conjugadas que podem ser classificadas em acetil glicosídeo e malonil glicosídeo. Estas, por sua vez, podem ser sub-divididas em 6''-o-acetil daidzina, 6''-o-acetil genistina, 6''-o-acetil glicitina, 6''-o-malonil daidzina, 6''-o-malonil genistina e 6''-o-malonil glicitina.

Isoflavona	R1	R2	R3	R4
Genistina	O-glicosil	H	OH	OH
Genisteína	OH	H	OH	OH
Daidzina	O-glicosil	H	H	OH
Daidzeína	OH	H	H	OH
Glicitina	O-glicosil	OCH ₃	H	OH
Gliciteína	OH	OCH ₃	H	OH

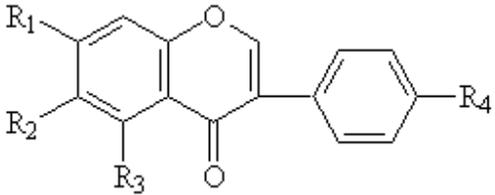


Figura 2: Estruturas moleculares das isoflavonas glicosídicas e agliconas

As isoflavonas agliconas mais pesquisadas são daidzeína e genisteína, as quais são encontradas principalmente em soja (Coward et al., 1993) e, em menor quantidade em frutas, nozes (Liggins et al., 2000b), vegetais e outras leguminosas (Mazur et al., 1998; Liggins et al., 2000a). Wang e Murphy (1994b) determinaram que a forma predominante é a malonil genistina, que representa 25 a 42% do total de isoflavonóides em cultivares de soja. Resultados semelhantes foram relatados por Kudou et al. (1991) os quais verificaram que as formas malonil daidzina e malonil genistina compreendem 66% do total de isoflavonóides da soja. Sabe-se que a quantidade de isoflavonas varia com as condições ambientais e com diferentes cultivares de soja (Carrão-Panizzi, 1996; Hutabarat et al., 2001; Eldridge e Kwolek 1983; Hoeck et al., 2000). Existem extensos trabalhos de Murphy et al. que estão citadas a seguir, em relação à quantificação de isoflavonas. Em 1994b, Wang e Murphy relataram grande variação de isoflavonas em soja colhidas em 1989 a 1991 de 1176 a 3309 $\mu\text{g/g}$. No mesmo ano (1994a), Wang e Murphy quantificaram

isoflavonas em produtos de soja cujos dados podem ser visualizado na Tabela 1. Neste trabalho concluíram que produtos de soja fermentados apresentam diferença em relação aos não fermentados, os produtos fermentados apresentam grande número de agliconas e os não fermentados de glicosilados. Em 1996, Wang e Murphy analisaram cada etapa do processamento de tempeh, leite de soja, tofu e proteína isolada de soja para verificar a conversão e a perda de isoflavonas. Os autores concluíram que o aumento das quantidades de daidzeína e genisteína durante a produção de tempeh e de proteína isolada provavelmente foi devido à hidrólise enzimática e alcalina, respectivamente. Em 1997, Murphy et al. quantificaram isoflavonas em alimentos infantis, e o total em média observado foi de 214 a 285 $\mu\text{g/g}$. Em 1999, Murphy et al. fizeram a quantificação em vários alimentos de soja como shoyu, tempeh, leite de soja e tofu. Trabalhos semelhantes como a de Hui et al. (2001) analisaram a quantidade de isoflavonas em tofu e afirmaram que o consumo diário de 30 g de tofu provém em média de 5,4 a 17,1mg/dia de isoflavonas agliconas. Em farinha de soja, descascada e desengordurada as médias foram de 617 $\mu\text{g/g}$ para daidzina, 129 $\mu\text{g/g}$ para gliciteína, 1198 $\mu\text{g/g}$ para genistina, 328 $\mu\text{g/g}$ para daidzeína e 267 $\mu\text{g/g}$ para genisteína (Eldridge, 1982). Fukutake et al., 1996, quantificaram genistina e genisteína em soja e produtos de soja no Japão e encontraram grande variação no teor de isoflavonas.

Tabela 1: Quantidade de isoflavonas em alimentos orientais e ocidentais a base de soja

Produtos	Malonil			Acetil			Glicosídeo			Agliconas			Total
	Din	Gin	Glin	Din	Gin	Glin	Din	Gin	Glin	Dein	Gein	Glein	
Soja torrada	45	63	72	397	743	102	460	551	68	39	69	52	2661
Beb. instantânea A	39	144	40	05	24	33	444	775	76	18	44	20	1662
Beb. instantânea B	98	259	44	12	26	33	525	745	75	30	50	21	1918
Tofu	159	108	Nd	08	01	29	25	84	08	46	52	12	531
Tempeh	255	164	Nd	11	Nd	Nd	02	65	14	137	193	24	865
Misô	Nd	Nd	19	01	02	Nd	Nd	96	21	271	183	54	647
Honzukuri Misô	Nd	Nd	22	01	11	Nd	72	123	18	34	93	15	389
Soja fermentada	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Tr	Nd	143	223	23	389
Salchicha de soja	12	42	15	Tr	04	14	35	67	15	08	16	08	236
Bacon de soja	Tr	05	12	Tr	03	Nd	Tr	27	14	26	48	09	144
Tempeh burger	25	Nd	Nd	Nd	01	Nd	36	158	18	34	96	18	386
Iogurte tofu	61	79	Nd	Nd	Tr	Nd	42	80	12	Tr	03	05	282
Parmesão de soja	26	Tr	Nd	Tr	Tr	36	Tr	Tr	Nd	Tr	06	20	88
Queijo Cheddar A	Nd	Tr	Nd	Tr	Tr	19	Tr	Nd	12	Tr	04	08	43
Queijo Cheddar B	67	07	Nd	Nd	Tr	27	16	46	17	Tr	09	08	197
Queijo mussarela	17	06	Nd	Nd	09	19	07	33	15	Tr	08	09	123
Macarrão chato	15	37	37	Nd	Tr	Nd	Tr	06	Nd	Tr	13	19	127

Fonte: Andreson & Wolf; 1995; Wang & Murphy, 1994b

Beb = bebida; Din = daidzina; Gin = genistina; Glin = glicitina; Dein = daidzeína; Gein = genisteína; Glein = gliciteína; tr = traços; nd = não detectado. Resultados expressos em µg/g.

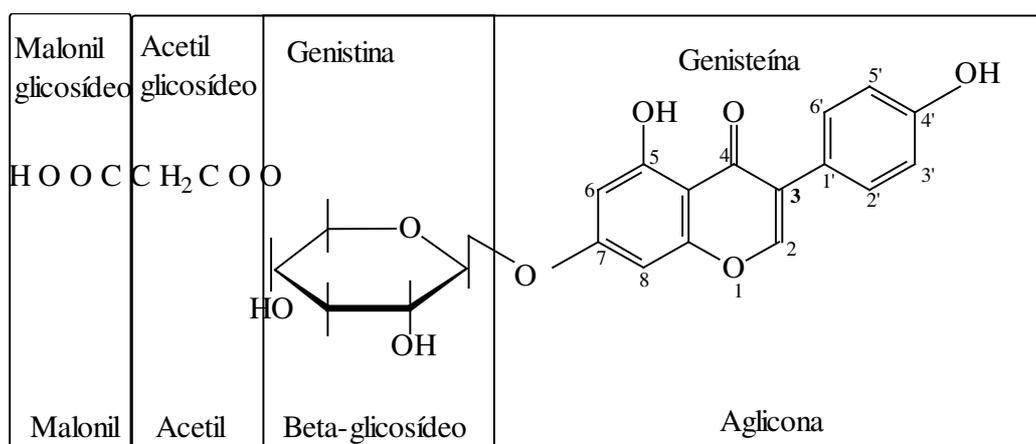


Figura 3: Estrutura química de genisteína e seus conjugados indicando vários estágios da degradação ou metabolismo (Setchell, 1998).

A Figura 3 mostra a estrutura química de genisteína e seus conjugados indicando vários estágios de degradação ou metabolismo. Segundo Setchell (1998) as isoflavonas agliconas são bastante estáveis à alta temperatura. Estudos examinando a estabilidade da farinha de soja e misô fervidos por 30 minutos mostram que não há diferença significativa na quantidade de agliconas ou glicosilados (Setchell, 1998; Ha et al., 1992). No entanto, dependendo do modo de preparo do alimento ocorrerá em maior ou menor grau a conversão das formas conjugadas malonil e acetil que são instáveis quando expostas ao calor e facilmente alteradas durante a extração, processamento e cocção (Coward et al., 1998; Kudou, 1991) ou pela adição de outros ingredientes (Wang e Murphy, 1994b). Produtos assados apresentam grande quantidade de β -glicosídeos e produtos fritos contém maior número das formas acetil glicosídeos, no entanto o total de isoflavonas não é reduzido nas condições normais de cozimento (Coward et al., 1998). Pandjaintan et al. (2000c) analisaram quantidade de genistina e genisteína preparando concentrado protéico de soja por três métodos: ácido, água quente e alcoólico. As perdas nos sobrenadantes dos processos foram de 20,3%, 24,2% e 91,2% do total de isoflavonas, respectivamente, o que denota a alta solubilidade das isoflavonas em álcool. A extração de isoflavonas com metanol e sob aquecimento promove rápida conversão às formas β -glicosídicas, enquanto que à temperatura ambiente a velocidade de conversão é menor e a solução é estável a 4°C por 24 horas. Estocagem prolongada desses extratos pode promover a conversão (Coward et al., 1998).

2.2. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS ISOFLAVONAS

As isoflavonas possuem várias propriedades biológicas benéficas à saúde humana. Como exemplo, pode-se citar as atividades (1) estrogênica e anti-estrogênica que exercem efeito sobre a hipercolesterolemia, arteriosclerose e osteoporose, (2) anti-carcinogênica, especialmente contra câncer da mama e próstata, (3) antioxidante quando na forma 8-hidroxi-daidzeína e 8-hidroxi-genisteína, (4) antifúngico e (5) anti-hemolítico. Além disso, elas foram consideradas produto GRAS (Generally Recognized As Safe), ou seja, reconhecido como seguro para o consumo pela FDA-USA (1999).

2.2.1. Atividade Estrogênica

A genistina, daidzina e suas respectivas agliconas são consideradas SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators), na sigla em inglês que significa moduladores seletivos dos receptores estrogênicos, possuindo afinidade com os receptores de estrogênio pois suas estruturas se assemelham ao hormônio feminino 17- β -estradiol (Figura 4). Murphy (1982) relatou que as isoflavonas de soja são 10^{-1} a 10^{-4} menos ativas em base molar quando comparada com o hormônio feminino, e comparou a bio-atividade de genisteína e daidzeína em relação ao hormônio sintético dietilestilbestrol encontrando também baixa atividade estrogênica. Devido à atividade estrogênica, a genisteína exerce efeito sobre a hipercolesterolemia que tem como consequência diminuição no risco cardiovascular e efeito na osteoporose, que serão detalhados nos itens a seguir. Outros fatores positivos da atividade estrogênica das isoflavonas são a diminuição dos sintomas da menopausa e também o prolongamento do ciclo menstrual, que é um benefício porque quanto mais longo o ciclo menstrual, menor o risco de câncer de mama (Setchell, 1998).

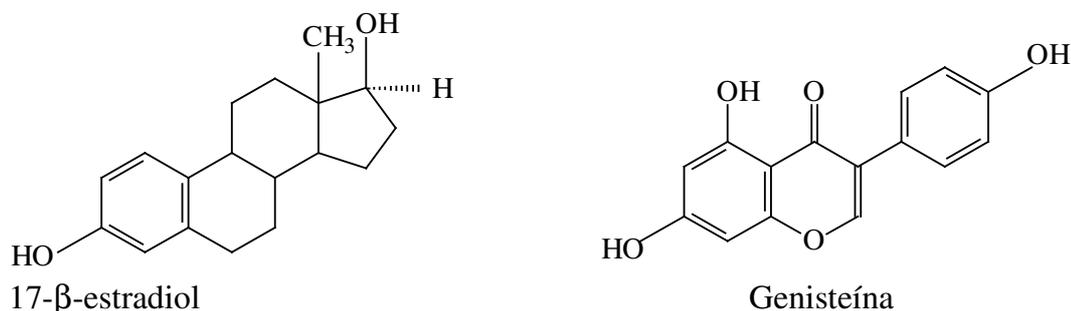


Figura 4: Similaridade nas estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17-β-estradiol e a isoflavona genisteína (Kim et al., 1998).

2.2.2. Efeito hipocolesterolêmico e aterosclerose

Em 26 de outubro de 1999, a FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos aprovou um “health claim” (alegação de saúde / propriedade funcional) para proteína de soja. “A ingestão diária de 25g de proteína de soja, como parte de uma dieta com baixo teor de gordura saturada e colesterol pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares”.

Messina (2000) concluiu que a ingestão de 25 g de proteína de soja pode reduzir os níveis da lipoproteína de baixa densidade (colesterol LDL) em aproximadamente 10%. O efeito hipocolesterolêmico da proteína de soja poderia ser explicado pela atividade estrogênica devido à presença de isoflavonas. A interação da genisteína com os receptores de estrogênico é diferente do 17-β-estradiol. A genisteína tem 87% de afinidade pelo receptor estrogênico β (localizado nos ossos e sistema vascular) e 4% pelo receptor α (localizado no útero e mama). Essa afinidade diminui a vasodilatação e alivia os sintomas da menopausa (Abdalla, 2002). Messina (2000) relatou que a genisteína possui 5 a 20 vezes mais afinidade pelo receptor

estrogênico β que o α , explicando o efeito estrogênico e anti-estrogênico das isoflavonas. Essa afinidade sugere que isoflavona seja um modulador seletivo natural do receptor estrogênico (SERMs). Em geral, as isoflavonas podem reduzir o nível de colesterol no sangue reduzindo o colesterol LDL e aumentando a concentração de HDL (Kerckhoffs et al., 2002), e também abaixam teores de gordura saturada podendo reduzir o risco de doenças cardiovasculares (Ho et al., 2000).

Desde o começo da década de 40, cientistas vêm examinando o efeito da proteína de soja na concentração de colesterol sanguíneo e as isoflavonas têm sido citadas como as responsáveis por esse efeito hipocolesterolêmico em animais e humanos (Lichtenstein, 1998). Como exemplo de experimentos com animais, Yamakoshi et al. (2000) realizaram estudos com coelhos machos de 12 semanas de vida que foram divididos em 3 grupos: o primeiro alimentado com uma dieta rica em isoflavonas agliconas, outro com saponinas e o último com dieta isenta de colesterol. O estudo concluiu que os coelhos alimentados com dieta rica em isoflavonas apresentaram diminuição do colesterol e aumento da concentração de daidzeína no sangue.

Kerckhoffs et al. (2002) fizeram uma revisão bibliográfica e relataram que de modo geral, em homens e mulheres com concentração normal de colesterol e com pouca hipercolesterolemia, as isoflavonas não promoveram decréscimo significativo no colesterol (3 e 4 % respectivamente). Em contraste, homens e mulheres com moderada hipercolesterolemia apresentaram redução de 7% e os com alta hipercolesterolemia, decréscimo de 20%. A modificação de LDL acompanhou a redução de colesterol.

Os trabalhos citados a seguir tiveram como grupos de estudo mulheres na pré-menopausa e com teores normais de colesterol. Takatsuka et al. (2000) demonstraram uma diminuição de 5,3% na concentração no total de colesterol e

também a diminuição no teor de ácidos poli-insaturados, pelo consumo de 400 mL/dia de leite de soja comercial durante dois meses. Washburn et al. (1999) observaram diminuição de 7% do colesterol LDL através do consumo de 20g de proteína de soja em pó contendo 34 mg por dia de isoflavonas, por um período de 6 meses. Cassidy et al. (1995) observaram a maior diminuição na concentração de colesterol total que foi de 9% para um consumo de 60 g/dia de proteína de soja texturizada, o equivalente a 45 mg de isoflavonas/dia durante um mês.

Para mulheres em idade pós-menopausa e Goodman-Gruen e Kritz-Silverstein (2001) e Ho et al. (2000) verificaram o efeito da ingestão de isoflavonas sobre o teor do colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL e LDL. Os resultados mostraram que as isoflavonas protegem contra o risco de doenças cardiovasculares. Em trabalho semelhante Potter et al. (1998) mostraram que a ingestão de 56 a 90 mg de isoflavonas diminuiu os níveis do colesterol de LDL e VLDL e aumentou o nível de HDL em mulheres em idade pós-menopausa e com hipercolesterolemia. Outra descoberta de estudos de Powell e Kroon (1994) foi o fato de que após a ingestão de isoflavonas ocorre a regulação do receptor LDL hepático.

Crouse et al. (1999) sugeriram que a diminuição do colesterol pela proteína de soja depende do teor de isoflavonas. Em seus estudos, homens e mulheres com moderada hipercolesterolemia consumiram bebidas com 3, 27, 37 ou 62 mg por dia de isoflavonas durante 9 semanas. As pessoas que ingeriram 3 e 27 mg não sofreram efeitos no plasma. Já as que ingeriram 37 mg apresentaram 8% de diminuição do teor de LDL e as que ingeriram 62 mg tiveram redução de 6%. Teixeira et al. (2000) fizeram um teste similar demonstrando que a ingestão de 38 mg de isoflavonas reduziu o teor de colesterol total em 2% e a soma de LDL e VLDL em 3% para homens com teores moderados de colesterol. A ingestão de 57, 76 ou 95 mg de isoflavonas, diminuiu o teor de LDL e VLDL juntos em 3, 2 e 5% respectivamente.

Resultados contraditórios também são relatados. Por exemplo, Sanders et al. (2002) concluíram que a dieta com 56 mg/dia de isoflavonas aumentou o colesterol HDL, mas não influenciou no colesterol LDL. O estudo de Anderson et al. (1995) relatou diminuição no valor de colesterol total, colesterol LDL e triacilglicerídeo em 9%, 13% e 11% respectivamente, mas não houve alteração no teor de HDL.

Lichtenstein (1998) e Kerckhoffs et al. (2002) sugeriram que as isoflavonas reduzem a concentração de colesterol sanguíneo devido a sua propriedade estrôgenica que aumenta a excreção de ácidos biliares, a atividade pelo receptor LDL e o hormônio estimulador de tiroxina e tiróide e supressão da absorção do colesterol, que tem como consequência redução da susceptibilidade do LDL à oxidação e aumento da complacência arterial (Tabela 2). Messina (2000) concluiu as isoflavonas exibem propriedades antioxidantes porque possuem efeitos favoráveis no complexo arterial.

Tabela 2: Mecanismo do efeito benéfico da proteína de soja na diminuição do risco de doenças cardiovasculares (Lichtenstein,1998)

-
- 1) ↓ Taxa do colesterol plasmático
↑ Excreção de ácidos biliares
↑ Atividade do receptor de LDL
↑ Hormônio estimuladora da tiroxina e tiróide
↓ Absorção do colesterol
 - 2) ↓ Susceptibilidade do LDL a oxidação
 - 3) ↑ Complacência arterial (elasticidade arterial)
 - 4) Atividade estrogênica da isoflavonas de soja
-

2.2.3. Prevenção da osteoporose

A especulação inicial de que a soja poderia trazer benefício à condição óssea foram baseadas na propriedade estrogênica de isoflavonas, a baixa incidência de osteoporose e o risco de fratura em mulheres orientais em estudos comparativos com mulheres ocidentais pós-menopausa. Setchell (1998) relatou que as isoflavonas têm o potencial de minimizar a perda de massa óssea durante o período da menopausa, pois o principal remédio usado para combater a osteoporose, ipriflavona, é um sintético de isoflavona.

Setchell (1998) cita trabalhos de Komm et al. (1988) e Eriksen et al. (1988) que descobriram a presença de receptores estrogênicos em células osteoblastos e a importância do estrógeno na diminuição da atividade de osteoclastos, limitando a reabsorção óssea. Em mamíferos roedores, o isolado de isoflavonas retarda a perda de ossos sempre como efetividade estrogênica (Messina, 2000). Estudos com animais e humanos indicam que as isoflavonas podem estimular a formação de ossos e inibir a reabsorção destes. Uesugi et al. (2002) determinaram o efeito da isoflavona de soja com atividade estrogênica no metabolismo do osso e o nível de lipídeos, utilizando um grupo de 23 mulheres saudáveis. As pessoas foram divididas dois sub-grupos: um que recebeu isoflavonas e outro, placebo. O sub-grupo que recebeu isoflavonas ingeriu diariamente uma cápsula com extrato de isoflavonas contendo 61,8 mg de isoflavonas, por um período de 4 semanas. A excreção de isoflavonas e seus metabólitos na urina foi medida em 0, 2 e 4 semanas. Os níveis de colesterol, triglicérides e frações de colesterol foram medidos em 0 e 4 semanas. Os autores concluíram que a suplementação de dieta com 61,8 mg de isoflavonas diárias por 4 semanas mostrou um benefício potencial no metabolismo ósseo e no nível de lipídeos em mulheres. Estes efeitos poderiam reduzir o risco de osteoporose e de doenças cardiovasculares em mulheres. Ohta et al. (2002) fizeram um experimento

com 32 ratos utilizando frutooligossacarídeos (FOS) e isoflavonas. Os ratos foram divididos em quatro grupos: o primeiro ingeriu a dieta controle, o segundo teve a dieta controle suplementada de 5% de FOS, o terceiro teve suplemento de 0,5% de isoflavonas e o último uma dieta com suplemento de 5% de FOS e 0,5% de isoflavonas durante 6 semanas. Seus resultados sugeriram que os frutooligossacarídeos estimulam o crescimento de bifidobactérias, que por sua vez hidrolisam as isoflavonas glicosiladas, e conseqüentemente aumentam a biodisponibilidade de isoflavonas agliconas mostrando um benefício na prevenção de osteoporose em ratos.

2.2.4. Efeito anti-carcinogênico

A dieta asiática é rica em alimentos fermentados de soja, portanto há maior consumo de isoflavonas agliconas em comparação à dieta americana. A população americana consome 20 a 50 vezes menos produtos à base de soja per capita que a população asiática (Kim et al., 1998). Este fato pode ser a causa da baixa incidência e mortalidade de câncer de mama ou próstata nos japoneses em relação aos americanos (Coward et al., 1993). Persky e Horn (1995) também admitiram através de observações epidemiológicas, que o consumo de soja é efetivo na proteção contra a incidência de câncer. Entretanto, os mesmos autores sugeriram que, para caracterização do efeito da soja no processo cancerígeno, bem como a adequação de dietas preventivas ao câncer, mais estudos deveriam ser conduzidos, considerando-se outros fatores como o baixo teor de gorduras da dieta oriental ou a alta ingestão de fibras.

Os efeitos das isoflavonas sobre vários tipos de câncer podem ser visualizados na Tabela 3 (Herman et al., 1995). Miyazawa et al. (1999) concluíram que daidzeína e genisteína agem como compostos antimutagênicos quando em contato com reagentes químicos mutagênicos. Em outro trabalho, Onozawa et al. (1998) demonstraram que a isoflavona aglicona genisteína possui maior poder de inibição contra o crescimento de células cancerígenas do que as outras isoflavonas glicosiladas. Tendo como base o estudo anterior, Ohta et al. (2000) testaram leite fermentado de soja em ratos induzidos com câncer mamário e atribuíram às isoflavonas agliconas a diminuição no tamanho do tumor. A genisteína é um inibidor específico da tirosina quinase (associada ao câncer de mama), DNA topoisomerase I e II e histidina quinase que são enzimas associadas com a proliferação celular e formação de tumores (Herman et al., 1995; Setchell, 1998; Kim, 1998). Deve-se ressaltar, todavia, que uma alta dosagem de genisteína, em torno de 20 $\mu\text{mol/L}$, é requerida para inibir tirosina quinase (Williams et al., 1998).

Coghlan (citado por Harborne e Williams, 2000) sugere que a genisteína é capaz de inibir o crescimento de câncer e angiogênese porque bloqueia a ação do fator de transcrição celular conhecido com CCAAT. Outros estudos confirmam a atividade anticancerígena da genisteína em câncer de próstata (Peterson e Barnes, 1993) e câncer de colon (Steele et al., 1995).

Tabela 3: Possíveis efeitos anticarcinogênico de isoflavonas contidas em produtos de soja

Tipo de Câncer	Composto ou Alimento	Grupo Étnico ou Tecido Estudado	Efeito ou Resultado	Referência
Mama	Genisteína	Células MCF-7	Competição com estradiol	Martin et al. (1978)
Mama	Dieta de suplementação	Mulheres americanas e japonesas	Baixa excreção de urina em mulheres de alto risco	Adlercreutz et al. (1986)
Mama	Dieta de suplementação	Mulheres	Baixa excreção de urina em câncer de mama	Adlercreutz et al. (1988b)
Próstata	Produtos de soja	Ancestrais de japoneses	Menos risco	Severson et al. (1989)
Mama	Daidzeína	Linfócitos humanos	Inibição da proliferação	Hirano et al. (1989a)
Leucemia	Genisteína	Células humanas HL-60 e K562	Diferenciação	Constantinous et al. (1990)
Mama	Produtos de soja	Mulheres da Singapura	Alta ingestão associada com menor risco	Lee et al. (1991)
Leucemia	Genisteína	Células ML-1, HL-60	Diferenciação	Makishima et al. (1991)
Leucemia	Genisteína	Células MO7E	Inibição da proliferação	Kiriú et al. (1991)
Mama	Genisteína, Biocanina A	Células MCF-7 e outras	Inibição da proliferação	Peterson e Barnes (1991)
Leucemia	Genisteína	Células humanas MOLT-4 e HL-60	Inibição do ciclo celular, progressão e crescimento	Traganos et al. (1992)
Tumores pediátricos sólidos	Genisteína	Neuroblastoma, células sarcoma	Inibição da proliferação	Schweigerer et al. (1992)
Células endoteliais	Genisteína	Células endoteliais	Inibição da angiogênese	Fotsis et al. (1993)
Leucemia	Daidzeína	Células HL-60	Diferenciação	Jing et al. (1993)
Gástrico	Genisteína	Células HGC-27	Inibição do crescimento	Matsukawa et al. (1993)
Fígado	Genisteína	Células HepG2	Inibição da proliferação	Mousavi e Adlercreutz (1993)
Cólon	Soja	Japoneses (as)	Redução do risco	Watanabe e Koessel (1993)

Fonte: (Herman et al.,1995).

O estrogênio, hormônio sintetizado nos ovários e testículos, é um potente estimulador do crescimento de células dos tecidos da mama, ovário, útero e próstata. Quanto mais as células se dividem maior o risco de proliferação descontrolada de células tumorais (Vines, 1994). As isoflavonas são hormônios vegetais, conhecidos como fitoestrogênios, que se comportam como estrogênicos fracos e competem com os hormônios esteróides por enzimas (Adlercreutz et al., 1993) e receptores (Adlercreutz et al., 1992). Pesquisas “in vitro” têm sido realizadas para descobrir a ação inibitória de isoflavonas sobre as células cancerígenas, mas aparentemente o mecanismo de ação pode não ser apenas hormonal (Barnes, 1995; Kim, 1998). Peterson e Barnes (1991) sugeriram que a genisteína é um agente anticancerígeno potente, semelhante à droga anti-estrogênica tamoxifeno, utilizada na terapia de câncer de mama.

2.2.5. Efeito antioxidante

As isoflavonas podem atuar como antioxidantes, devido à estrutura polifenólica protegendo os alimentos da deterioração oxidativa dos lipídeos (Hammerschmidt e Pratt, 1978). Em 1976, Naim et al. analisaram a atividade antioxidante de isoflavonas medindo a inibição da enzima lipoxigenase em eritrócitos de ovelhas. As isoflavonas agliconas genisteína, daidzeína e gliciteína apresentam atividade antioxidante superior à das suas respectivas formas glicosídicas devido à posição das hidroxilas e do grau de hidroxilação. Dessa forma o efeito antioxidante é da seguinte ordem decrescente: genisteína > genistina > daidzeína > daidzina > gliciteína > glicitina (Aurora et al., 1998; Pratt et al., 1979). Esaki et al. (1998) isolaram potentes antioxidantes utilizando *Aspergillus saitoi* em fermentação à base de soja, e os identificaram como 8-hidroxdaidzeína e 8-hidroxisenisteína. Em 1999b, Esaki et al. isolaram outro potente antioxidante e o identificaram como 6-hidroxdaidzeína de

Aspergillus oryzae. Estes antioxidantes potentes são formados através da daidzina e genistina contidas na soja pela ação da enzima β -glicosidase do microrganismo. São liberadas daidzeína e genisteína, que sofrem hidroxilação durante a incubação. Comparando os produtos não fermentados de soja com os fermentados, os autores concluíram que esses últimos, por terem sido inoculados com microrganismos tiveram suas propriedades antioxidantes aumentadas (Esaki et al., 1999a).

2.2.6. Outros efeitos

As isoflavonas têm sido também descritas pela sua ação anti-fúngica. Naim et al. (1974) observaram que as isoflavonas glicosiladas não são capazes de inibir o crescimento de fungos patogênicos, enquanto que as agliconas podem inibir o crescimento de fungos como *Trichoderma lignorum*, *Pythium spp.*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus spp.*, *Sclerotium rolsii* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente, em ordem decrescente de inibição, que foi em torno de 50% em relação ao controle.

Em 1976, Naim et al. fizeram teste anti-hemolítico “in vitro” e reportaram que as isoflavonas têm atividade anti-hemolítica em eritrócitos de ovelhas.

2.3. BIODISPONIBILIDADE DAS ISOFLAVONAS

Pesquisas de absorção de isoflavonas utilizando ratos foram realizadas, como o trabalho de Uehara et al. (2001) que utilizaram uma dieta de frutooligossacarídeos com isoflavonas e verificaram um aumento no teor de genisteína no sangue e um aumento do teor de frutooligossacarídeo e isoflavonas na urina. King et al. (1996), também concluíram que a genisteína demonstrou ser mais biodisponível na sua forma aglicona. Hutchins et al. (1995) mostraram que daidzeína e genisteína são mais biodisponíveis em “tempeh” com 30-60% de isoflavona aglicona do que em grão de soja, com 10-15% de aglicona. Outro experimento com ratos realizados por Andlauer et al. (2000) mostrou que as isoflavonas de tofu são absorvidas e metabolizadas no intestino delgado. King et al. (1998) concluíram que a biodisponibilidade das isoflavonas de soja em humanos e ratos são semelhantes.

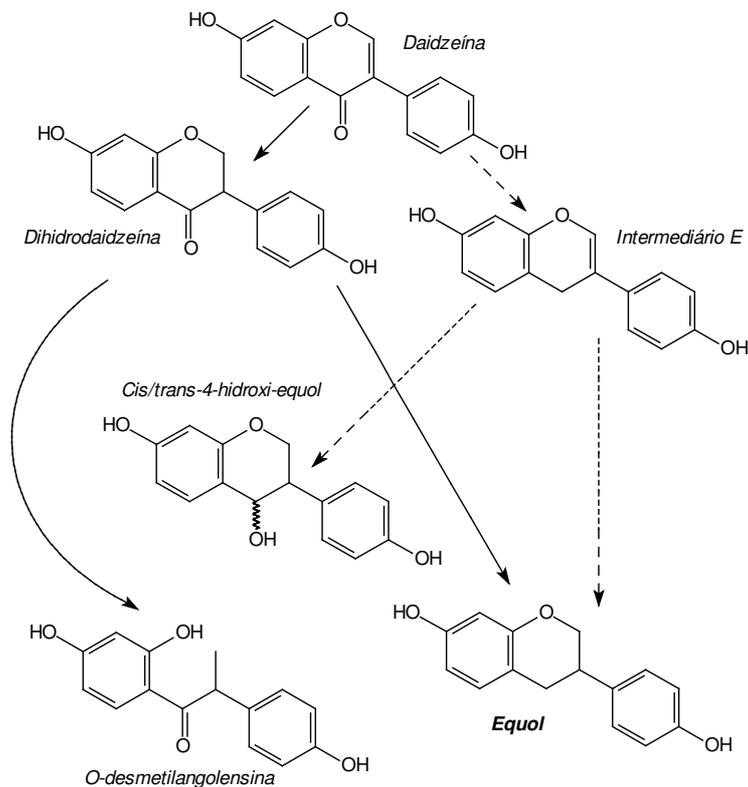


Figura 5: Metabolismo da daidzeína nos humanos (Heinonen et al., 1999).

Inúmeras pesquisas estão sendo realizadas com humanos para verificar a biodisponibilidade das isoflavonas. Arditi et al. (2000) afirmaram que a biodisponibilidade de isoflavonas em humanos depende da capacidade de ação da flora intestinal em degradar a isoflavona glicosilada, e é influenciada pela dose ingerida na dieta. A alta ingestão de carboidratos pode causar o aumento da fermentação intestinal, e conseqüentemente excessiva biotransformação das isoflavonas. A absorção, excreção e concentração de isoflavonas no plasma dependem da dose ingerida e da flora microbiana intestinal (Xu et al., 1995).

Atkinson et al. (2002) verificaram a relação entre ingestão e excreção de isoflavonas na população ocidental, medindo teores de genisteína, daidzeína, o-desmetilangolensina e equol, sendo estes dois últimos metabólitos das isoflavonas. Mulheres que consumiam soja pelo menos uma vez por semana apresentaram maior excreção de isoflavonas do que as que não consumiam. Adlercreutz et al. (1991) chegaram à mesma conclusão correlacionando a alta ingestão de produtos à base de soja com o alto teor de isoflavonas excretado na urina do grupo estudado. Heinonen et al. (1999) elucidaram o metabolismo de daidzina nos humanos (Figura 5) por cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Zhang et al. (1999) compararam o metabolismo de gliciteína com outras isoflavonas para entender o efeito destes compostos. Foram testadas isoflavonas de leite de soja com dosagem de 4,5 $\mu\text{mol/kg}$ corpóreo (rico em genisteína e daidzeína) e germe de soja (rico de daidzeína e gliciteína). A biodisponibilidade da daidzeína e genisteína foi similar tanto em homens como nas mulheres. A alta dosagem de gliciteína depois de 24 horas teve uma modesta diferença na concentração da mesma no plasma sanguíneo.

Izumi et al. (2000) investigaram a diferença na absorção das formas glicosiladas e agliconas em humanos e verificaram que o grupo que ingeriu isoflavona agliconas resultou na absorção mais rápida e em maior quantidade do que

o grupo que ingeriu as glicosiladas, e, além disso, a concentração no plasma de genisteína foi significativamente mais alta que daidzeína. Os autores concluíram que produtos ricos em isoflavonas agliconas podem ser mais efetivos que produtos ricos em glicosilados na prevenção de doenças crônicas como doenças coronárias.

Estudos mostram a importância em se assegurar à qualidade e a padronização dos produtos, como o realizado por Setchell et al. (2001) que compararam a cinética no plasma de padrões de daidzeína, genisteína e seus β -glicosídeos. Este estudo foi realizado dividindo em 4 grupos, cada um consumindo daidzeína, genisteína, daidzina e genistina respectivamente. A concentração no plasma de genisteína foi maior que daidzeína. O tempo médio do pico no plasma de genisteína e daidzeína foi de 5,2 e 6,6 horas e para genisteína e daidzeína nos grupos que ingeriram os glicosilados foram, 9,3 e 9 horas, respectivamente. Peterson e Dwyer (2000) citam que o pico da presença de isoflavonóides no plasma foi de 6,5 horas após a ingestão.

Em relação a trabalhos sobre a absorção intestinal, estes têm mostrado que as isoflavonas glicosiladas (daidzina e genistina) não são absorvidas pelo intestino e sua biodisponibilidade requer inicialmente a quebra da ligação com o açúcar pela enzima β -glicosidase intestinal (Setchell et al., 2002). Xu et al. (1995) concluíram que as isoflavonas glicosiladas não são absorvidas diretamente, devido principalmente ao açúcar unido através da ligação beta. Somente isoflavonas sem a molécula de açúcar (agliconas), são capazes de passar através da parede do intestino.

2.4. β -GLICOSIDASE

É importante que sejam desenvolvidas investigações da produção da enzima β -glicosidase, pois trabalhos indicam que a mesma retira a molécula de glicose das isoflavonas glicosiladas aumentando assim o teor de isoflavonas agliconas (Setchell et al., 2002; Xu et al., 1995) e conseqüentemente aumentando a sua biodisponibilidade.

É sabido que a β -glicosidase é uma enzima do complexo celulolítico responsável pela quebra da ligação glicosídica β -1,4 de celooligossacarídeos, resultando na liberação de glicose, no processo de degradação da celulose. Essa enzima pode ser produzida por microrganismos ou ser extraída de frutas e leguminosas (Gräbnitz e Staudenbauer 1988).

2.4.1. β -GLICOSIDASE VEGETAL

Vários autores têm indicado que a enzima β -glicosidase de soja pode converter isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas (Matsuura et al., 1989; Ha et al., 1992). Murphy (1982) pesquisou a concentração de isoflavona em broto de soja e em “tofu”, e constatou que a concentração de genisteína aumentou significativamente durante a maceração da soja em água. Araújo et al. (1997) concluíram que a β -glicosidase é responsável pela liberação de daidzeína e genisteína em grãos de soja imersos em água. Ikeda et al. (1995) verificaram a variação da quantidade de isoflavona e a atividade β -glicosidase durante a fermentação de soja desengordurada. Pandjaitan et al. (2000a) avaliaram a

efetividade da β -glicosidase na conversão de genistina a genisteína durante a preparação do concentrado protéico de soja com alta concentração de genisteína, encontrando como parâmetros ótimos da reação pH 5,0 a 50°C utilizando 2 unidades de enzima/g de farinha de soja por 1 hora de reação.

Matsuura et al. (1989) relataram que a presença da β -glicosidase está relacionada com a produção de daidzeína e genisteína, que são responsáveis pelo gosto residual do leite de soja; também se detectou o aumento destas substâncias durante a maceração do grão de soja que teve como consequência o aumento da intensidade do sabor desagradável no extrato solúvel de soja. Por isso o ideal seria o uso das agliconas em forma de cápsulas. Sabe-se que a variedade da espécie de soja e o ano de cultivo afetam a concentração de isoflavonas presentes (Araújo et al., 1997), mas a atividade enzimática não está relacionada com a concentração de isoflavonas glicolisadas em soja crua (Carrão-Panizzi et al., 2000).

A produção máxima de agliconas de soja ocorreu a 50°C em pH 6,0 para Matsuura et al., 1989 e Ha et al., 1992. Matsuura e Obata (1993) isolaram três β -glicosidases do cotilédone da soja separadas com CM – Sephadex C-50, Sephadex G-150 encontrando como ótimo o pH 5,0 a 45°C. Com a enzima parcialmente purificada fizeram teste preliminar utilizando leite de soja e verificaram que a genistina era mais facilmente hidrolisada que a daidzina. No trabalho subsequente em 1995, Matsuura et al. purificaram e estimaram o peso molecular da enzima em 81000 e 36000 por gel de filtração e eletroforese SDS-PAGE, respectivamente. O ponto isoelétrico foi estimado em 6,68 e a atividade enzimática máxima ocorreu em pH 4,5 a 45°C. Neste trabalho os autores verificaram a porcentagem de hidrólise de vários substratos (Tabela 4) que foi de 100% para pNPG (para-nitrofenil β -glicosídeo), 38% para daidzina e 12% para genistina. Outra enzima foi parcialmente purificada de soja por Hsieh e Graham (2001) apresentando pH ótimo de 6,0 a 30°C. Esses autores fizeram um interessante trabalho verificando o km da enzima para

diversos substratos incluindo pNPG, genistina, daidzina, malonil genistina e malonil daidzina que podem ser visualizados na mesma tabela. Píslewska et al. (2002) purificaram β -glicosidase de tremoço (*Lupinus albus* L.) e calcularam também o km da enzima (Tabela 4). Banerjee (1992) relatou que temperaturas acima a 60°C inativaram a enzima β -glicosidase.

Tabela 4: Porcentagem relativa de hidrólise e valores de km para diversos substratos de β -glicosidase

Substratos	Porcentagem relativa de hidrólise (%)*	Km (mM)**	Km (mM)***
pNPG (para-nitrofenil β -glicosídeo)	100	1,3	0,14
Genistina	12	0,33	0,44
Malonilgenistina		0,054	
Daidzina	38	0,091	
Malonildaizina		0,12	

* Atividade relativa foi medida para enzima purificada de soja contendo 1mM de substrato (Matsuura et al., 1995).

** Reação com enzima parcialmente purificada de soja com reação a pH 5,0 a 40°C por 30 minutos (Hsieh e Graham, 2001).

*** Reação com enzima parcialmente purificada de tremoço com reação a pH 5,0 a 50°C (Hsieh e Graham, 2001).

Os trabalhos que relacionam β -glicosidase com isoflavonas utilizaram soja como descrito anteriormente. O Brasil possui uma grande variedade de vegetais que podem constituir fontes desta enzima. Assim, este trabalho teve como objetivo extrair e selecionar β -glicosidase de fontes vegetais que possuam maior atividade enzimática que a enzima de soja. As publicações mostram a purificação e caracterização de β -glicosidase utilizando vegetais ou frutas. Pelos trabalhos, observa-se que a β -glicosidase é uma enzima catiônica com cargas negativas, de peso molecular em torno de 60 kDa. O método de purificação empregado pelos autores é cromatografia de troca iônica em coluna aberta utilizando resinas. O pH

ótimo da enzima fica em torno de 5,5 e a temperatura ótima de 50°C. Itoh-Nashida et al. (1987) purificaram e caracterizaram β -glicosidase (linamarase) a partir do feijão fava, *Phaseolus lunatus*. A enzima foi extraída com tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6,0, precipitada com sulfato de amônio, tratada com acetona, e depois purificada em colunas com resina CM-Sephadex, DEAE-Sephadex e Sephadex G-200. A purificação foi confirmada por eletroforese de gel poliacrilamida e SDS-gel poliacrilamida encontrando o peso molecular de 59000 ± 2400 . Após a purificação foi encontrado pH ótimo de 5,9 utilizando pNPG (para nitrofenil β glicosídeo) como substrato. A enzima mostrou-se bastante estável ao pH nos valores de 4,0 a 8,1.

Esen (1992) utilizando milho germinado por 5 a 6 dias purificou β -glicosidase em coluna de Acell-CM, confirmou por eletroforese SDS-PAGE e estimou o peso molecular em torno de 60 kDa. A enzima purificada apresentou o pH ótimo semelhante à enzima de feijão fava no valor de 5,8 e temperatura ótima de 50°C. Este autor calculou também o ponto isoelétrico de 5,2. Os valores ótimos para a enzima extraída de cenoura (Konno et al., 1996), que foi purificada utilizando CM-Sepharose CL-6B, Con A-Sepharose e SDS-PAGE, apresentaram valores diferentes dos trabalhos anteriores: o valor obtido foi pI 8,2, pH ótimo de 4,6 a 5,2 e o peso molecular menor, entre 48000 a 52000. No entanto a temperatura ótima foi de 50°C, semelhante a trabalhos anteriores. Sue et al. (2000) fizeram a purificação e caracterização de β -glicosidase utilizando o mesmo método de Esen (1992), extraíndo a enzima do trigo germinado por dois dias. O peso molecular foi estimado em 60 a 58 kDa e a atividade enzimática máxima encontrada foi a pH 5,5.

Alguns autores extraíram a enzima de frutas, que apresentam pesos moleculares bem distintos. Hartmann-Schreier e Schreier (1986) fizeram a purificação (utilizando Phenyl-Sepharose CL-4B e Sephacryl S-200) e caracterização parcial de β -glicosidase isolada da polpa do mamão, encontrando pI de 5,2; pH ótimo de 5,0 e a temperatura ótima de 50°C. Esses autores encontraram

valores diferentes do peso molecular para essa enzima, que por gel de filtração foi de 54000 e por SDS-PAGE de 27000 com duas subunidades. Lecas et al. (1991) fizeram extração de β -glicosidase a partir da uva madura. A purificação foi feita usando cromatografia com Ultrogel AcA 44 e DEAE-Sepharose CL-6B, encontrando dois picos distintos de β -glicosidase, uma com peso molecular de 98000 e outra 50000. Os dois picos não apresentaram distinção nas características bioquímicas. Em ambas foi encontrado um valor ótimo em pH 5,0 e a 45°C. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH entre 6,0 a 8,0. Gerardi et al. (2001) mediram a atividade enzimática extraída de cereja em vários estágios de maturação, purificando por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica seguida da exclusão molecular. O peso molecular obtido foi em torno de 68 kDa.

2.4.2. β -GLICOSIDASE MICROBIANA

Existem muitos produtos fermentados à base de soja, principalmente no continente asiático, como o misô, natto, tempeh e shoyu. No Brasil, a soja vem sendo consumida como substituinte protéico em embutidos, achocolatados, bebidas lácticas, bolos, biscoitos e outros produtos. As isoflavonas agliconas e β -glicosídicas são muito estáveis a alta temperatura, podendo ser adicionadas durante o processamento de alimentos (Setchell et al., 1998).

Em produtos à base de soja, foi reportado que os alimentos não fermentados (extrato hidrosolúvel, tofu, farinha e concentrados) apresentam maior quantidade de conjugados glicosídicos, enquanto que os alimentos fermentados tradicionais (“miso”, “tempeh”) apresentaram concentrações mais altas de agliconas (Coward et al., 1993; Kiyosawa et al., 1995; Fukutake et al., 1996; Chiou e Cheng, 2001). No

entanto, produtos fermentados como “natto”, leite de soja e “shoyu” apresentaram alto teor de glicosilados. Isto pode ser explicado por Kiyosawa et al. (1995) que concluíram que determinados microrganismos como *Bacillus natto* e bactérias ácidas lácticas não produzem a enzima β -glicosidase responsável por essa biotransformação. Já no “shoyu” é possível que tenha ocorrido a remoção da isoflavona aglicona durante o seu processamento. Há controvérsia com Matsuda et al. (1992) que mostra várias espécies de *Lactobacillus* hidrolisando soja durante o processamento de natto. Em 1994, Matsuda et al. encontraram uma linhagem de *Lactotobacillus casei* (bactéria láctica) com significativa atividade hidrolítica das isoflavonas glicosiladas pela β -glicosidase. Murphy (1982) encontrou em amostras de tofu valores altos de agliconas, entretanto, a causa poderia ter sido contaminação por microrganismos depois da abertura do produto.

As isoflavonas agliconas mostraram maior atividade biológica que as glicosiladas (Esaki et al., 1999ab; Matsuura et al., 1995; Pandjaitan et al., 2000b). Vários outros trabalhos publicados relacionam a existência da enzima β -glicosidase em produtos fermentados de soja. György (1964); Ebata et al. (1972) fizeram trabalhos similares, provando que a hidrólise das isoflavonas glicosiladas em agliconas no processamento de “tempeh” ocorre por ação de β -glicosidases isoladas de *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus oligosporus*, respectivamente. Esaki et al. (1999a) fermentaram a soja com *Aspergillus saitoi* e concluíram que a daidzina e a genistina são convertidas em daidzeína e genisteína respectivamente, devido à presença da enzima β -glicosidase. Park et al. (2001) chegaram a mesma conclusão utilizando a enzima produzida por *Aspergillus oryzae* isolada de “miso”. Hur et al. (2000) identificaram a bactéria intestinal *Escherichia coli* como a responsável pela conversão de daidzina e genistina em daidzeína e genisteína nos humanos.

Segundo Spagna et al. (2002) a principal característica de β -glicosidase de *Aspergillus spp* é o peso molecular em torno de 120 kDa e ponto isoelétrico de 4,2.

Especificamente para *Aspergillus niger*, o peso molecular é em torno de 61 kDa e pI 3,5. Peshin e Mathur (1999) purificaram enzima β -glicosidase de *Aspergillus niger* e estimaram em 64 kDa por eletroforese em gel SDS, apresentando como ótimo em pH 5,5 a 50°C. Traon-Masson e Pellerin (1998) purificaram a enzima de *Aspergillus niger* para converter produtos glicosilados durante o processamento de frutas. Utilizando enzima comercial de *A. niger*, purificaram por precipitação com sulfato de amônio, e depois com várias colunas de cromatografia, encontrando duas enzimas β -glicosidasas de 118 kDa e 109 kDa. A primeira enzima apresentou atividade 3 vezes maior que a segunda enzima. Foi feita a caracterização bioquímica das enzimas purificadas, encontrando 60°C e 70°C em pH 4,0 e 3,0 como parâmetros ótimos, respectivamente. Em relação a termoestabilidade a segunda mostrou-se mais resistente, mas com atividade enzimática menor. Ambas apresentaram estabilidade ao pH semelhante, sendo resistentes na faixa de pH entre 2,0 e 9,0.

As enzimas purificadas de microrganismos possuem características bioquímicas e pesos moleculares bem variadas. Goyal et al. (2001) purificaram β -glicosidase de *Thermotoga marítima* hiper termofílica capaz de crescer acima de 90°C. A enzima tem 81 kDa com temperatura ótima a 85°C e pH 5,0. Pitson et al. (1997) purificaram β -glicosidase extracelular do fungo filamentoso *Acremonium persicinum* por meio submerso e precipitação com sulfato de amônio, seguido de cromatografia por troca iônica utilizando Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) com coluna Mono Q e gel de filtração. O purificado foi analisado por eletroforese SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic) encontrando uma enzima com peso molecular estimada em 128 kDa. A enzima é uma proteína monomérica com ponto isoelétrico de 4,3 e pH ótimo 5,5.

Alguns autores purificaram mais de uma enzima β -glicosidase de um único microrganismo. Como Lyman et al. (1995) que purificaram três β -glicosidasas extracelulares de *Phanerochaete chrysosporium* com pesos moleculares de 96000,

98000 e 114000, utilizando cromatografia com resina DEAE-Sephadex e Sephacryl S-200 seguido de FPLC com coluna Mono Q. Takashima et al. (1996) encontraram seis β -glicosidases do fungo termofílico *Humicola grisea* com peso moleculares de 46000 até 115000 por eletroforese SDS-PAGE. O pH ótimo foi de 5,0 a 7,0 e a temperatura ótima de 50°C a 70°C.

2.5. FEIJÃO FAVA (*Phaseolus lunatus*)



Figura 6: Foto do feijão fava (*Phaseolus lunatus*)

Feijão fava (*Phaseolus lunatus*) cuja foto pode ser visualizada na Figura 6, também é conhecido como feijão de lima, fava de lima ou simplesmente fava. É encontrada mais de cem nomes do cultivar de feijão fava. Em inglês por ser encontrado com “lima bean”, “sieva bean”, “butter bean”, “Madagascar bean”, “sugar bean”, etc (Vieira, 1978).

Segundo Mackie (1943) é originário da Guatemala, onde são encontradas formas silvestres que são perenes, trepadeiras, possuindo sementes pequenas (5 - 14 g cada 100 grãos). O feijão fava teria sido introduzido no Brasil através das Antilhas. Erickson et al. (1967) em expedição de coletas de favas, encontraram no Nordeste, onde a cultura é comum, principalmente sementes pequenas e redondas. No vale amazônico, entretanto, encontraram sementes muito grandes com até 32 mm de comprimento.

Seu valor nutritivo é semelhante ao do feijão comum. Apresenta certo conteúdo de um glicosídeo cianogênico, que produz ácido cianídrico (HCN) por hidrólise, o qual não é prejudicial ao homem, quando em pequena quantidade. Algumas pessoas são sensíveis a pequena quantidade do glicosídeo cianogênico e não podem ingeri-lo. A cocção remove a maior parte de toxicidade do composto. Esse glicosídeo, comum a todas as variedades, confere ao feijão fava sabor característico, ausente em outras espécies de feijão. Análise de variedades da Califórnia, EUA, acusaram baixos teores desse veneno, variando de 25 a 55 ppm de HCN, bem aquém das doses perigosas ao homem (Vieira, 1989).

O feijão fava é ingerido normalmente descascado, fervido em forma de sopa, ensopado e como salada fria. No Japão, o feijão é fermentado para produzir “tempeh kara”.

2.6. O FUNGO *Aspergillus niger*

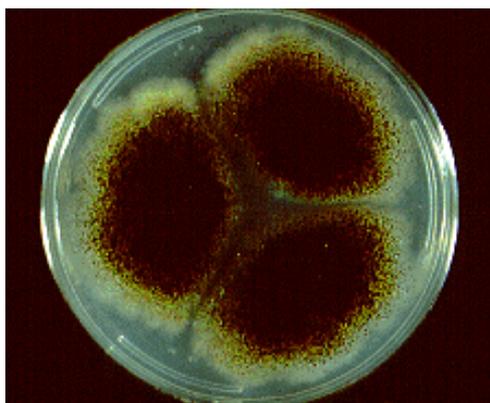


Figura 7: Foto do fungo *Aspergillus niger*

Aspergillus niger é um membro do gênero *Aspergillus* que é definida como fungo saprofítico assexual, embora possuam todas as formas de reprodução sexuada (Raper e Fennell, 1965). O fungo *Aspergillus niger* da Figura 7 é encontrado pelo mundo inteiro devido a sua capacidade de crescer em vários substratos, como por exemplo, produtos de padaria e confeitaria, frutas, vegetais, grãos estocados, algodão cru, folhas mortas, adubos e vegetação em deterioração. Produzem esporos e estes são freqüentemente encontrados em materiais orgânicos e no solo.

O fungo *Aspergillus niger* tem sido utilizado principalmente para produção de enzimas e ácido orgânicos por fermentação. Na indústria de alimentos as enzimas são utilizadas durante o processamento dos alimentos. Algumas das enzimas produzidas são alfa-amilase, amiloglicosidase, celulase, lactase, invertase, pectinase e proteases ácidas (Bennett, 1985; Ward, 1989). A produção diária de enzimas pode ser de mais de 100.000 litros (Finkelsten et al., 1989). O fungo também é utilizado para produzir ácidos orgânicos, como o ácido cítrico e o ácido glucônico. A produção anual de ácido cítrico por fermentação é de aproximadamente 350.000 toneladas, usando o fungo *A. niger* ou a levedura *Cândida sp.* O ácido cítrico produzido comercialmente por *A. niger* pode ser obtido por fermentação em meio semi-sólido ou em meio submerso (Ward, 1989).

O crescimento de *Aspergillus* no tecido humano responsável pela respiração, como os brônquios e cavidades pulmonares, pode causar a aspergillose (Bennet, 1979). Outra doença é a otomicose quando o *A. niger* inflama as cavidades do ouvido (Austwick, 1965). O fungo ao ser inalado por pessoas hiper sensíveis pode causar alergias como asma e espirros (Edwars e Alzubaidy, 1977). No entanto, estas doenças são raras.

A resolução do dia 1 de setembro de 1994, registro federal (59FR 45526) do EPA (Environmental Protection Agency) disse que: “O risco de doenças causado pelo *A. niger* é baixo. Os humanos estão continuamente expostos aos esporos e a

forma vegetativa do *A. niger* que estão nos alimentos e no ar. Enquanto o *A. niger* tem sido associado na produção de micotoxinas, as indústrias têm utilizado espécies de *A. niger* para produzir uma variedade de produtos há vários anos sem relatar efeitos tóxicos, pois a maioria das espécies não tem sido documentada em causar sérias doenças patogênicas nos humanos, animais ou plantas. Portanto, o uso da espécie deste fungo na fermentação comercial não apresenta nenhum risco adicional para a saúde humana ou para o meio ambiente.”

2.7. ANÁLISE DE FLAVONÓIDES POR CROMATOGRAFIA

A cromatografia de alta eficiência (CLAE) foi usada pela primeira vez para determinar flavonóides em 1976 por Fisher e Wheaton (Merken e Beecher, 2000). Normalmente as colunas utilizadas para as análises são de fase reversa de 100 a 300 mm de comprimento e com 4,6 mm de diâmetro interno. A eluição utilizada é binária: o solvente A é composto de um solvente polar acidificado, por ácido acético, perclórico, fosfórico ou fórmico e o solvente B por um solvente menos polar como metanol ou acetonitrila. O fluxo normalmente utilizado varia de 1,0 ou 1,5 mL/min e o volume de injeção de 1 a 100 µL. O composto fenol absorve na região UV (ultravioleta) e há duas regiões de absorção dos flavonóides: Banda II com o máximo de absorção entre 240-285 nm devido ao anel A e a Banda I com o máximo de absorção 300-550 nm, presumivelmente pelo anel B (Merken e Beecher, 2000).

As isoflavonas são detectadas em vários comprimentos de ondas diferentes como a 236 nm (Graham, 1991), 260 nm (Garrett et al., 1999), 262 nm (Barnes et al., 1994) e 280 nm (Kinoshita et al., 1997). Wang et al. (1990) usaram detecção a 254 nm e detecção fluorescente a 365 nm para excitação com filtro de emissão a 418

nm. Detecções por arranjo de diodos e por colorimetria foram usadas simultaneamente para quantificar isoflavonas em produtos de soja (Franke et al., 1998).

O método para quantificação de isoflavonas tem sido variado. As maiorias dos métodos utilizam CLAE ou cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG – MS). Satterfield et al. (2001) melhoraram o método de detecção de isoflavonas agliconas, daidzeína e genisteína, utilizando microextração em fase-sólida, CLAE e espectrometria de massa com ionização eletro-spray analisando urina após o consumo de bebida contendo soja. Hutabarat et al. (1998) desenvolveram e validaram o método de CLAE na condição isocrática para quantificação de isoflavonas como daidzeína, genisteína e biocanina A em grão de soja. Griffith e Collison (2001) melhoraram o método de análise de isoflavonas em produtos contendo soja e suplementos nutricionais por CLAE em fase reversa, durante a análise foram detectados pequenos picos da forma malonil e acetil nos extratos de proteínas de soja e nos padrões de isoflavonas, que por cromatografia líquida e espectrometria de massa III foram identificados com 6"-o-malonil e 6"-o-acetil. Heinonen et al. (1999) identificaram metabólitos da ingestão de genisteína e daidzeína na urina utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Aramendia et al. (1995) quantificaram isoflavonas usando eletroforese capilar em combinação com espectrometria de massa. Barnes et al. (1998) analisaram isoflavonóides utilizando CLAE e espectrometria de massa na urina e no sangue. Liggins et al. (1998) desenvolveram um método de quantificação de isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína) utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massa com padronização interna das isoflavonas glicosídicas sintéticas (daidzina e genistina).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. LEGUMINOSAS

Foram coletadas no comércio da cidade de Campinas amostras de leguminosas como do feijão fava, feijão carioca, feijão branco, feijão preto, feijão vermelho, lentilha, grão de bico e ervilha. E doadas pelas instituições como a CATI (Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - Campinas) amostras de arroz e milho, pelo IAC (Instituto Agronômico de Campinas) amostras de soja e tremoço e pela EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais Viçosa) amostras de feijão fava vermelha. E outra amostra de soja pela indústria Tozan.

3.1.2. REAGENTES E MATERIAIS ESPECÍFICOS

Meios de cultura:

PDA (Agar-batata-dextrose)

Meio líquido (g/L): NaNO_3 (2), K_2HPO_4 (1), KCl (2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), NH_4NO_3 (1) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1), extrato de levedura (0,5) e sacarose (5)

Reagentes Químicos:

Acetona, etanol, metanol, hexano, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, cloreto de sódio, ácido cítrico, fosfato de sódio bibásico, glicina, bórax, tris (hidroximetil) aminometano

Outros Materiais:

Lã de vidro (Ecibra - SP)

Filtros Millipore 0,22 μ m (Millipore do Brasil)

Membrana de ultrafiltração Diaflo Amicon (Membrana de PM10; PM-30; PM-50)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. β -GLICOSIDASE VEGETAL

3.2.1.1. COLETA DE AMOSTRAS

Foram extraídas β -glicosidases de vegetais, de leguminosas comercializadas no Brasil, como a soja (*Glycine max*), grão de bico (*Cicer arietinum*), fava (*Phaseolus lunatus*) e (*Vicia faba L.*), ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), tremoço (*Lupinus albus L.*), milho (*Zea mays L.*), arroz (*Oryza sativa L.*) e lentilha (*Lens esculenta Moench.*).

3.2.1.2. EXTRAÇÃO DA ENZIMA

A extração de β -glicosidase foi realizada tomando-se 10 gramas de grãos triturados e peneirados (mesh 16) foram pesados em balança eletrônica digital Marte (modelo AS 1000) em um tubo de centrífuga de 50 mL. 100 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0 – medidor Marte MB-10) foram adicionados e a mistura agitada lentamente num agitador magnético Fisatom, durante 1 hora, à temperatura ambiente (cerca de 24°C). A suspensão foi centrifugada numa centrífuga refrigerada

(Beckman modelo J2-21) a 8000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto enzimático para análise da atividade enzimática.

3.2.2. β -GLICOSIDASE MICROBIANA

3.2.2.1. MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados foram àqueles isolados do solo e alimentos pela equipe do professor Dr. Yong Kun Park do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, previamente identificados como: *Aspergillus oryzae* ATCC 22786 (American Type Culture Collection), *Aspergillus oryzae* (solo), *Aspergillus niger* (solo), *Aspergillus awamori* NRRL 3112 (número de registro no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – USDA – Agricultural Research Service Culture Collection).

3.2.2.2. PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE MICROBIANA POR FERMENTAÇÃO EM MEIO SEMI-SÓLIDO (FMSS)

Para a fermentação foram utilizados frascos do tipo erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g de farelo de trigo (umidade 60%). Os frascos com o meio foram esterilizados em autoclave vertical Phoenix (Equipamentos Científicos, SP Mod. AV50), inoculados com a suspensão de esporos de aproximadamente 10^7 esporos/mL do microrganismo e incubados em estufa Fanen (modelo 002CB) a 30°C. O tempo de incubação foi otimizado. Após a fermentação foram adicionados 100 mL de água destilada em cada frasco e o meio de cultura foi triturado com

auxílio de bastão de vidro. A suspensão foi filtrada em lã de vidro para obtenção do extrato enzimático bruto. O filtrado foi mantido em congelador a -12°C.

3.2.2.3. PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE MICROBIANA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FS)

Para a fermentação foram utilizados frascos de 500 mL contendo meio líquido de composição (em g/L): NaNO₃ (2), K₂HPO₄ (1), KCl (2), MgSO₄.7H₂O (0,5), NH₄NO₃ (1) NH₄H₂PO₄ (1), extrato de levedura (0,5) e sacarose (5), ajustado para pH 6,0. Os meios foram inoculados com a suspensão de esporos de aproximadamente 10⁷ esporos/mL do microrganismo e incubados em incubadora com sistema de agitação New Brunswick Scientific Co. Inc. (Series 25) a 30°C sob agitação de 150 rpm. Foram retiradas amostras diárias do meio fermentado e filtradas em lã de vidro para obtenção do extrato enzimático bruto. O filtrado foi mantido em congelador a -12°C.

3.2.3. ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE

A atividade de β -glicosidase foi determinada como descrito por Matsuura *et al* (1995). A mistura de 2 mL de solução 1mM de para-nitrofenil- β -glicosídeo (pNPG) em tampão fosfato-citrato 0,1M pH 5,0 foi incubada a 40°C em banhos de água (Polyscience) por 5 minutos. Após a adição de 0,5 mL de solução de enzima, a mistura foi incubada a 40°C por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 0,1M. A absorbância da solução foi medida a 420 nm (Espectrofotômetro Beckman Coulter DU-640). A quantidade de para-nitrofenol liberada foi determinada usando curva padrão preparada da mesma maneira com 5 a 300 μ mol de p-nitrofenol. Uma unidade da atividade enzimática foi definida com a

quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto sob as condições padronizadas.

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

3.2.4. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (Análise Univariável)

Foram avaliadas as condições ótimas de β -glicosidase do extrato bruto vegetal e microbiano, como temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e estabilidade em função do pH.

3.2.4.1. EFEITO DA TEMPERATURA

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado incubando-se a enzima em soluções contendo substrato, em temperaturas de 30°C a 90°C conforme condições de ensaios enzimáticos definidas no item 3.2.3.

3.2.4.2. EFEITO DO PH

O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi determinado incubando-se a enzima obtida em soluções tampão citrato-fosfato (pH 2,5 a 7,0); tampão fosfato (pH 6,5 a 8,0); tampão borato (pH 8,0 a 10,0) contendo o substrato. Os ensaios de atividade foram realizados conforme definidas anteriormente no item 3.2.3.

3.2.4.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática foi determinado incubando-se a enzima, sem o seu substrato, em várias temperaturas variando também o tempo de incubação. Após o tempo determinado de incubação a atividade residual foi medida incubando-se a enzima tratada, conforme condições de ensaios enzimáticos definidas no item 3.2.3.

3.2.4.4. EFEITO DO PH NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito do pH na estabilidade da atividade enzimática foi determinado incubando-se a enzima, sem o seu substrato, em soluções tampão de diferentes valores de pH. O tratamento foi de 20 horas a temperatura ambiente. A atividade residual, após o tratamento, foi medida incubando-se a enzima tratada conforme definido anteriormente no item 3.2.3.

3.2.5. PLANEJAMENTO FATORIAL PARA DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A análise univariável ou o estudo de uma variável por vez mantendo as outras constantes, dificulta muito a discussão dos resultados, além do tempo gasto, material e principalmente a falta de uma conclusão baseada em uma metodologia científica. A maior falta de informação no estudo univariável relaciona se há efeito sinérgico ou antagônico entre as variáveis, que só podem ser obtidas pela determinação dos

efeitos de interação entre as variáveis através de um planejamento fatorial. Uma nova vantagem do planejamento fatorial é a possibilidade de otimizar várias respostas ao mesmo tempo.

Para se aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste na seleção de um número fixo de níveis de cada um dos fatores ou variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações (Barros Neto et al., 2001).

3.2.5.1. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO

O objetivo do planejamento fatorial completo foi verificar os efeitos de interação entre as variáveis de pH e temperatura ótimas da atividade enzimática, cujos níveis das variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 5 e os números de ensaios na Tabela 6. As condições de incubação e análise de ensaios foram às mesmas citadas no item 3.2.3.

Tabela 5: Nível das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais para análise da atividade enzimática.

Nível	Temperatura	pH
-1,41	40	4,0
-1	44	4,4
0	55	5,5
+1	66	6,6
+1,41	70	7,0

Tabela 6: Números de ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 para análise da atividade enzimática.

Ensaio	x_1	x_2	X_1	X_2
			T	pH
1	-1	-1	44	4,4
2	+1	-1	66	4,4
3	-1	+1	44	6,6
4	+1	+1	66	6,6
5	0	0	55	5,5
6	0	0	55	5,5
7	0	0	55	5,5
8	-1,41	0	40	5,5
9	+1,41	0	70	5,5
10	0	-1,41	55	4,0
11	0	+1,41	55	7,0

3.2.6. PURIFICAÇÃO DAS β -GLICOSIDASES

As β -glicosidases brutas obtidas conforme item 3.2.1.2 e 3.2.2.2 foram precipitadas com etanol 70% (v/v) e purificadas através de cromatografia em coluna CM – Sephadex C-50 para enzima microbiana e CM-Sepharose para enzima vegetal (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), de acordo com Silva et al. (1994, modificado).

3.2.6.1. PRECIPITAÇÃO COM ETANOL (70% V/V)

Foram testados vários métodos de concentração das proteínas, sendo que o melhor método foi por precipitação com etanol a 70% (v/v), sob agitação lenta e

constante a 10°C, com descanso de 20 h. O precipitado de proteína foi retirado por centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos e dissolvido em tampão citrato-fosfato 0,05M (pH 5,0 para *Aspergillus niger* e pH 5,5 para feijão fava, *Phaseolus lunatus*) e em seguida dialisado utilizando o mesmo tampão.

3.2.6.2. CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA CM - SEPHADEX C-50 **(*A. niger*)**

A resina CM – Sephadex C-50 foi equilibrada em tampão citrato-fosfato 0,05M no pH 5,0 e empacotada em coluna de 56 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro.

O concentrado enzimático, obtido de acordo com o item 3.2.6.1, foi aplicado à coluna de CM – Sephadex C –50, sendo coletadas frações (coletor Merkle Korff Gear) de 5 mL a cada 30 minutos. Em seguida, a coluna foi eluída com gradiente linear de NaCl, de 0,1 a 1 M no tampão de equilíbrio.

O curso de eluição das proteínas foi acompanhado através da medida da absorbância a 280 nm. A quantidade de proteínas foi determinada pela metodologia de Lowry (modificado por Hartree, 1972) usando soro albumina bovino como padrão (Sigma Co.) e a atividade de β -glicosidase conforme item 3.2.3.

As frações contendo picos de maior atividade enzimática, foram reunidas e submetidas à diálise contra tampão citrato-fosfato 0,05M no pH 5,0 durante 24 horas, sendo, em seguida, concentradas através de sistema de ultrafiltração em membrana de 10 kDa (modelo TCF2A Amicon Co.) e por último liofilizadas (FTS-Systems).

3.2.6.3. CROMATOGRAFIA DA ENZIMA DE FEIJÃO FAVA (*Phaseolus lunatus*)

O concentrado enzimático obtido de acordo com o item 3.2.6.1. foi liofilizado e 100 mg (Balança analítica Ohaus modelo Adventurer) foi re-dissolvido em 10 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M no pH 5,5 e finalmente filtrado em membranas de 0,22 μ m.

O filtrado foi aplicado à coluna CM Sepharose e utilizado equipamento FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) Pharmacia, com coluna de 1 mL de capacidade. A proteína eluída com tampão citrato-fosfato 0,05M no pH 5,5 num gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M, num fluxo de 1 mL/min.

As frações coletadas contendo picos de maior atividade enzimática foram reunidas e submetidas à diálise e liofilizadas. A quantificação de proteínas foi determinada pela metodologia de Lowry (modificado por Hartree, 1972) e a atividade de β -glicosidase, de acordo com o item 3.2.3.

3.2.6.4. ELETROFORESE SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada de acordo com Laemmli (1970). A amostra foi fervida com 1% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 2% (v/v) de 2-mercaptoetanol, e submetida a eletroforese em gel de acrilamida com SDS (SDS-PAGE) a 12%, em equipamento Pharmacia Biotech SE250 Phastsystem. O gel foi corado com Coomassie Blue R-250.

A mistura padrão de proteínas continha a α -lactoalbumina (14.400), o inibidor tripsina de soja (20.100), a anidrase carbônica (30.000), a ovoalbumina (45.000), o soro albumina bovino (66.000) e a fosforilase b (97.000).

3.2.7. EXTRAÇÃO DE ISOFLAVONAS

Para a produção dos extratos metanólicos de isoflavonas de soja foram utilizadas diferentes variedades brasileiras.

As isoflavonas de soja foram extraídas de acordo com o método descrito por Fukutake et al. (1996, modificado). A massa de grãos de soja, aproximadamente 500g, foi triturada e peneirada de mesh 20 (abertura 0,84 mm). Em seguida a amostra foi desengordurada com 1000 mL de n-hexano por 30 minutos a temperatura ambiente (cerca de 24°C) com agitação constante (Agitador magnético Fisatom). A seguir a amostra foi centrifugada e o resíduo foi seco à temperatura ambiente. Amostras de 10g de farinha de soja desengordurada, foram extraídas com 100 mL de metanol a 80% (melhor método por Park et al, 2001b; Genovese e Lajolo, 2001; Barnes et al, 1994), durante 60 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm e o sobrenadante foi concentrado em sistema evaporativo a vácuo, empregando rota-evaporador Bucler (LabConco Co., EUA). O concentrado obtido foi mantido sob refrigeração a -12°C e foi considerado substrato para as análises de conversão enzimática das isoflavonas glicosiladas.

3.2.8. DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA (CLAE)

As análises dos extratos metanólicos de soja por CLAE em fase reversa, foram feitas de acordo com o método descrito por Koo et al. (2000) e modificado por Park et al. (2001a). Alíquotas de 20 µL foram injetadas em um cromatógrafo líquido, equipado com coluna YMC PACK ODS-A C-18, S-5µm, 120Å; 4,6φ - 250 mm e com detector de arranjo de diodos (SPD-M10A, Shimadzu Co., Kyoto, Japão). Um gradiente linear de água acidificada (solvente A; 19:1 v/v) e metanol (solvente

B), começou com 20% de B (0-15 min), aumentou até 80% (75-95min) e decresceu até 20% de B (95-105 min) com um fluxo de 0,5 mL/min. A coluna foi re-equilibrada com 20% de B por 15 minutos entre as corridas. A detecção foi feita pela absorção a 254 nm, a identificação por comparação do tempo de retenção e espectro de absorção a 200-300 nm dos padrões e das amostras. A análise quantitativa de daidzina, genistina, daidzeína e genisteína foram calculadas por comparação com os padrões autênticos. Como Kudou et al. (1991) demonstraram que os coeficientes de extinção molar das formas conjugadas malonil e acetil aproximam-se aos de daidzina e genistina, respectivamente, as concentrações dos malonil e acetil conjugados foram calculadas pela curvas-padrão correspondente. Glicitina e seus conjugados foram calculados usando o padrão de daidzina (Barnes et al, 1994; Coward et al., 1998). Os valores foram normalizados considerando-se as diferenças de peso molecular das formas glicosiladas, multiplicando-se a massa de cada derivado pela razão entre o peso molecular da forma glicosilada (Song et al., 1998; Hoeck et al., 2000).

3.2.9. CONVERSÃO DE ISOFLAVONA GLICOSILADA EM ISOFLAVONA AGLICONA POR β -GLICOSIDASE VEGETAL E MICROBIANA

A hidrólise do extrato metanólico de soja foi realizada usando β -glicosidases de vegetal (*Phaseollus lunatus*) e fúngica (*Aspergillus niger*). A mistura de 10 mL de isoflavona, obtidas de acordo com o item 3.2.7 e 1 mL de solução de β -glicosidase foi incubada durante 30 minutos a 40°C. A mistura foi filtrada através de membrana de 0,22 μ m (Millipore do Brasil, SP) para a análise das isoflavonas

agliconas por CLAE. Foram utilizados os padrões da forma aglicona: daidzeína e genisteína e, as glicosiladas: daidzina e genistina (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA).

3.2.9.1. PERFIL DO SUBSTRATO

Duas variedades de soja foram analisadas utilizando 100 mg do substrato (extrato metanólico item 3.2.7) de soja do IAC e soja Tozan a 40°C por 30 minutos com extrato bruto de feijão fava (19,3 UI/mL). Após a reação, a amostra foi liofilizada, re-suspendida em solução de metanol 80% e analisada por CLAE (item 3.2.8).

3.2.9.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

Para avaliar o efeito da concentração do substrato foi variado a quantidade do extrato metanólico de soja em 50, 100, 150 e 200 mg na reação de conversão de isoflavonas utilizando enzima parcialmente purificada de feijão fava (0,2 UI/mL) a 40°C por 30 minutos. Após a reação, a amostra foi liofilizada, re-suspendida em solução de metanol 80% e analisada por CLAE (item 3.2.8).

3.2.9.3. EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO

Para o efeito do tempo de reação foi utilizado 50 mg de substrato e variado o tempo de reação em 30, 60 e 90 minutos a 40°C utilizando enzima parcialmente purificada de feijão fava e *Aspergillus niger*, ambos com a mesma atividade enzimática.

3.2.9.4. COMPARAÇÃO DAS CONVERSÕES DAS ENZIMAS OBTIDAS

Foram feitas uma comparação da eficiência hidrolítica obtidas pelos extratos brutos e pelas enzimas parcialmente purificadas de *Phaseolus lunatus* e *Aspergillus niger* na conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas. Utilizando 50 mg do substrato a reação foi a 40°C por 30 minutos utilizando as enzimas com a mesma atividade enzimática.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. β -GLICOSIDASE VEGETAL

4.1.1. EXTRAÇÃO E SELEÇÃO DA β -GLICOSIDASE VEGETAL

Foram coletadas no comércio da cidade de Campinas amostras de leguminosas e fornecidas pelas instituições citados na metodologia. A Figura 8 apresenta os valores das atividades enzimáticas de enzimas β -glicosidasas extraídas de diferentes leguminosas. Dentre as amostras analisadas, nota-se que a Fava 1 (*Phaseolus lunatus*) apresentou maior atividade enzimática com 0,71 UI/mL, sendo escolhida para as etapas subseqüentes. As outras leguminosas apresentaram atividade em torno de 0,01UI/mL. A enzima extraída de soja apresentou atividade muito baixa (0,02 UI/mL). Vários autores (Murphy, 1982; Araújo et al., 1997; Ikeda et al., 1995) comentaram sobre a conversão da isoflavona glicosilada em aglicona pela enzima de soja. Como a atividade enzimática da fava mostrou-se 44 vezes maior do que da soja, é possível que seja também mais eficiente na conversão dos mesmos.

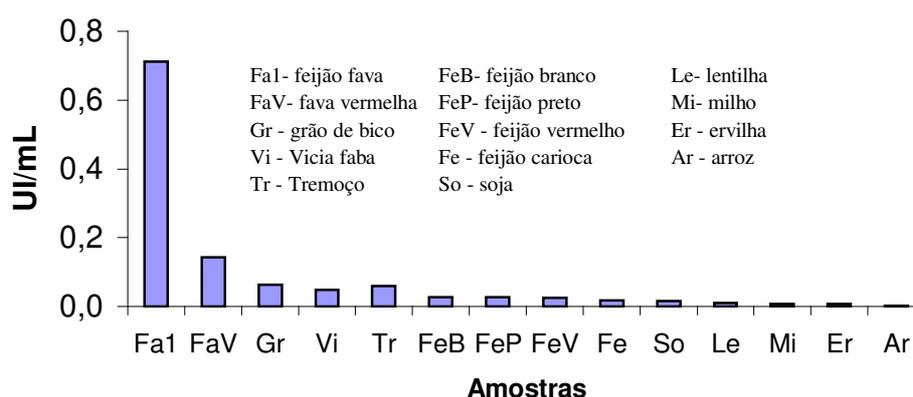


Figura 8: Atividades de β -glicosidasas extraídas de leguminosas. A enzima foi extraída com tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0.

4.1.2. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO DE FEIJÃO FAVA (*Phaseolus lunatus*)

4.1.2.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA (Análise Univariável)

4.1.2.1.1. EFEITO DA TEMPERATURA

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática no filtrado bruto foi verificado de acordo com o item 3.2.4.1.

Em relação ao efeito da temperatura, pode-se notar pela Figura 9 que a atividade hidrolítica foi maior a 60°C. Essa temperatura é superior as temperaturas ótimas das β -glicosidases do milho, cenoura e mamão (50°C) (Esen, 1992; Konno et al., 1996; Hartmann-Schreier e Schreier, 1986) e de soja, tremoço e uva (45°C) (Matsuura e Obata, 1993; Píslewska et al., 2002; Lecas et al., 1991).

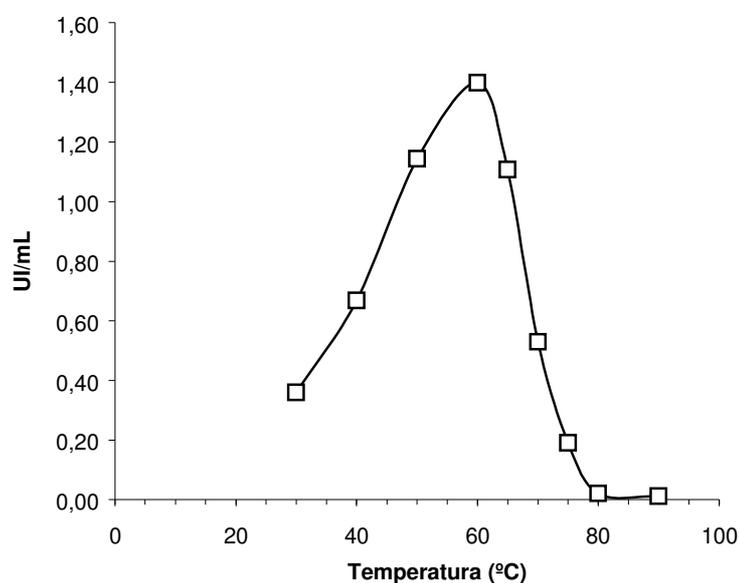


Figura 9: Efeito da temperatura na β -glicosidase bruta extraída de *Phaseolus lunatus*.

4.1.2.1.2. EFEITO DO PH

O efeito do pH sobre a atividade enzimática no filtrado bruto foi verificado incubando-se o extrato enzimático contendo o substrato em soluções tampões de vários pHs, de acordo com o item 3.2.4.2.

Pela Figura 10 nota-se o efeito do extrato bruto em relação ao pH. O extrato bruto extraído de feijão-fava apresentou um pico de alta atividade enzimática no pH 5,5. Pela revisão bibliográfica foi encontrado valor semelhante de pH ótimo, como por exemplo, o valor de 5,9 para a enzima β -glicosidase purificada de feijão-fava, *Phaseolus lunatus*, utilizando o mesmo substrato (Itoh-Nashida et al., 1987), e de pH 5,8 para milho (Esen, 1992). Konno et al. (1996) purificaram a enzima de cenoura que apresentou uma faixa de 4,6 a 5,2 como ótimo. Sue et al. (2000) fizeram a purificação e caracterização de β -glicosidase extraída do trigo germinado por dois dias e encontraram o máximo da atividade da enzima em pH 5,5. Em β -glicosidase extraída de soja (Matsuura e Obata, 1993), tremoço (Píslewska et al., 2002), polpa de mamão (Hartmann-Schreier e Schreier, 1986) e uva (Lecas et al., 1991) o valor ótimo foi em pH 5,0.

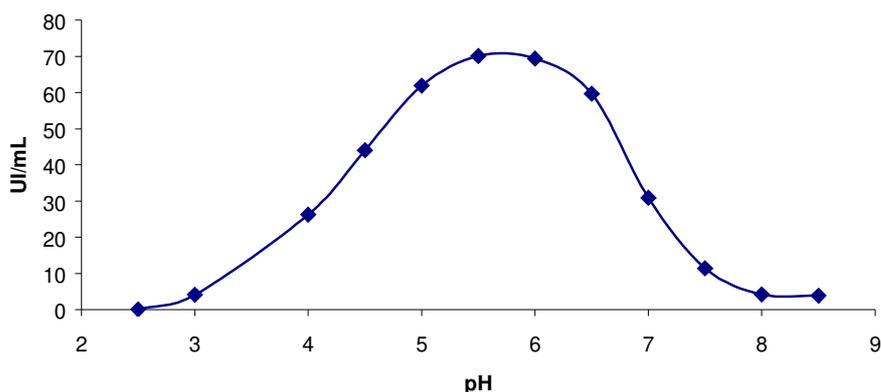


Figura 10: Efeito do pH na β -glicosidase bruta extraída de *Phaseolus lunatus*. Tampão citrato-fosfato (pH 2,5 a 7,0); tampão fosfato (pH 6,5 a 8,0); tampão borato (pH 8,0 a 10,0).

4.1.2.1.3. EFEITO DE TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A estabilidade térmica da atividade enzimática bruta foi verificada seguindo o procedimento descrito no item 3.2.4.3. O resultado apresentado na Figura 11 mostra que a enzima bruta é bastante termo resistente mantendo até 76% da sua atividade enzimática depois de 4 horas de incubação numa temperatura de 55°C. Numa temperatura de 40°C e 50°C o extrato bruto reteve 100% da sua atividade enzimática e foi perdendo sua atividade retendo 90% depois de 4 horas de incubação. A 60°C o extrato bruto reteve 27% da sua atividade enzimática quando incubada por uma hora e perdeu totalmente sua atividade depois de 4 horas de incubação. Essa enzima mostrou-se mais estável que a enzima purificada de milho (Esen 1992) que reteve 60% de atividade enzimática depois de 1 hora de incubação a 40°C. E apresentou resultados similares a enzima de feijão fava de Itoh-Nashida et al., 1987 quando incubada a 50°C e 60°C por uma hora.

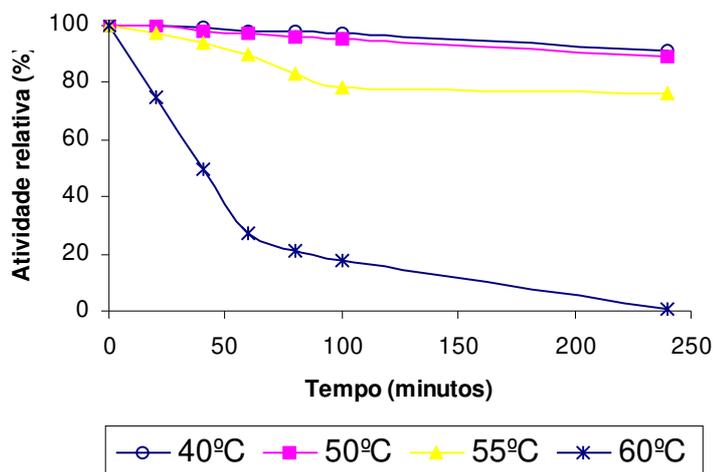


Figura 11: Determinação da termo estabilidade da β -glicosidase bruta extraída de *Phaseolus lunatus*.

4.1.2.1.4. EFEITO DO PH NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O pH de estabilidade da atividade enzimática bruta foi verificado seguindo o procedimento descrito no item 3.2.4.4. O resultado apresentado na Figura 12 mostra que a enzima bruta de *Phaseolus lunatus* é estável a uma grande faixa de pH. A atividade enzimática do extrato bruto apresentou-se 100% de estabilidade ao pH 6,0. Reteve 90% da atividade em pH 5,0 a 9,0. No entanto, o extrato bruto perdeu totalmente sua atividade enzimática em pH ácido de 2,5 a 3,5. A enzima purificada por Itoh-Nashida et al. (1987) extraída de feijão fava apresentou 100% de atividade enzimática em pH 6,0. Para Lecas et al., (1991) a enzima parcialmente purificada de uva apresentou estabilidade entre pH 6,0 a 8,0. O perfil da enzima modifica quando a mesma é purificada.

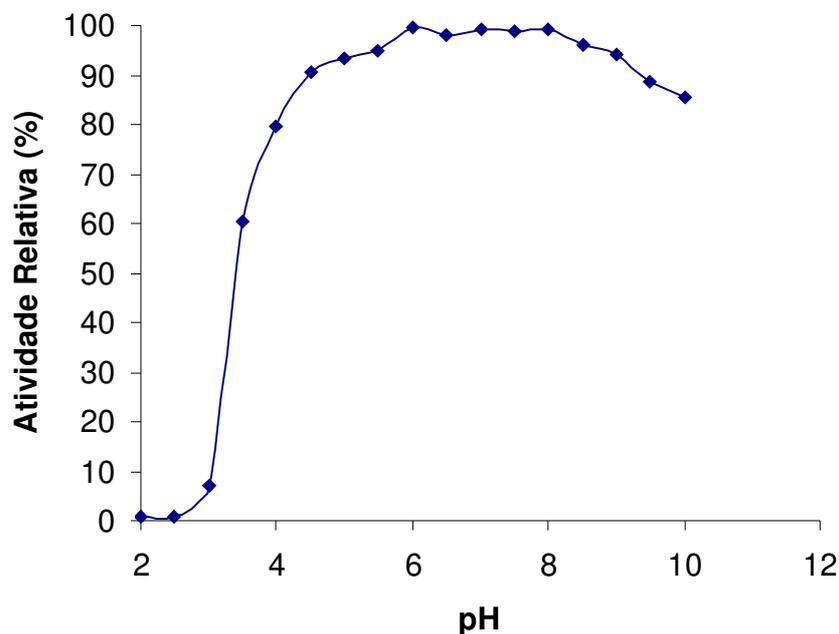


Figura 12: Determinação do pH na estabilidade da β -glicosidase bruta extraída de *Phaseolus lunatus*. Tampão citrato-fosfato (pH 2,5 a 7,0); tampão fosfato (pH 6,5 a 8,0); tampão borato (pH 8,0 a 10,0).

4.1.2.2. DETERMINAÇÃO DA FAIXA ÓTIMA DE PH E TEMPERATURA POR PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Para a determinação da faixa ótima de temperatura e pH do extrato bruto de feijão fava foi feita por planejamento estatístico. Neste experimento foi utilizado planejamento fatorial completo 2^2 cujos níveis utilizados encontra-se na metodologia (item 3.2.5.1). A tabela 7 mostra o valor da atividade enzimática das variáveis analisadas. Pelo cálculo da ANOVA (Tabela 8) nota-se que o F calculado da regressão (24,74) é maior que o Ftabelado (4,53) e o valor do coeficiente de determinação (R) possui um valor de 0,97 bem próximo de 1,0 indicando que os valores preditivos estão bem próximos dos valores experimentais, portanto o modelo é válido e preditivo para valores dentro da faixa estudada. Portanto neste experimento, pode-se tirar a superfície de resposta e área de contorno (Figuras 13 e 14), pelas figuras citadas pode-se afirmar que a faixa ótima de atividade enzimática para o extrato bruto de feijão fava está em pH 4,5 a 6,4 quando a temperatura de incubação for de 45°C a 60°C, esses valores inclui o ponto ótimo obtido pela análise univariável que foi em pH 5,5 a 60°C.

Tabela 7: Números de ensaios do planejamento fatorial completo com pontos centrais e axiais e resultado da atividade enzimática

Ensaio	x_1	x_2	X_1	X_2	UI/ML
			T	pH	
1	-1	-1	42	4,2	44,67
2	+1	-1	68	4,2	22,11
3	-1	+1	42	6,8	40,13
4	+1	+1	68	6,8	11,75
5	0	0	55	5,5	123,23
6	0	0	55	5,5	122,80
7	0	0	55	5,5	122,84
8	-1,15	0	40	5,5	63,98
9	+1,15	0	70	5,5	7,28
10	0	-1,15	55	4,0	49,51
11	0	+1,15	55	7,0	49,00

Tabela 8: Cálculo da ANOVA a 95% de nível de confiança ($R = 0.97$).

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	FCAL	F tab
Regressão	18207,51	4,00	4551,88		0,95/4/6
Resíduos	1103,84	6,00	183,97	24,74	4,53
F. ajuste	1103,72	4,00	275,93		
Erro Puro	0,11	2,00	0,06		
Total	19311,35	10,00			

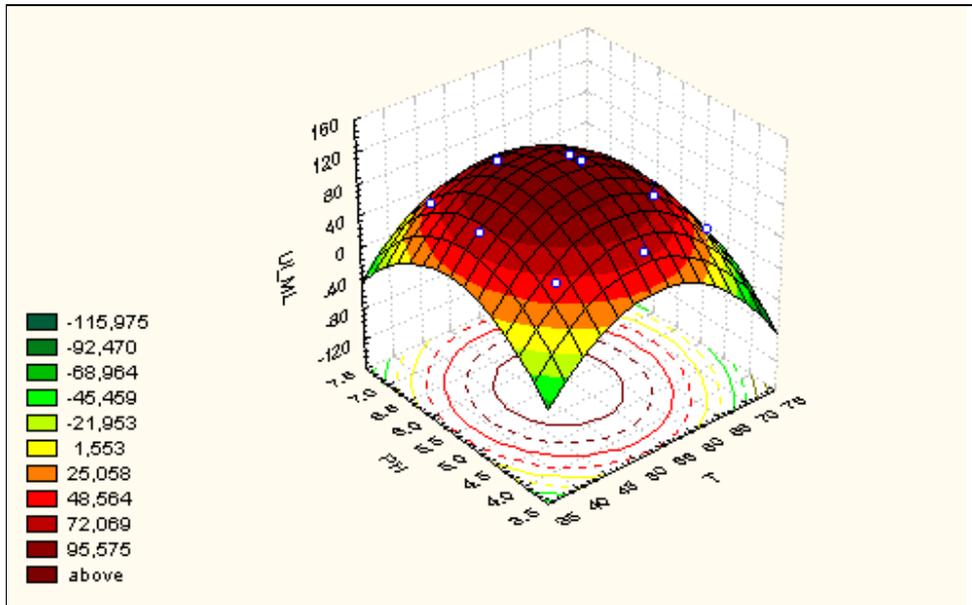


Figura 13: Superfície de resposta para tempo e temperatura

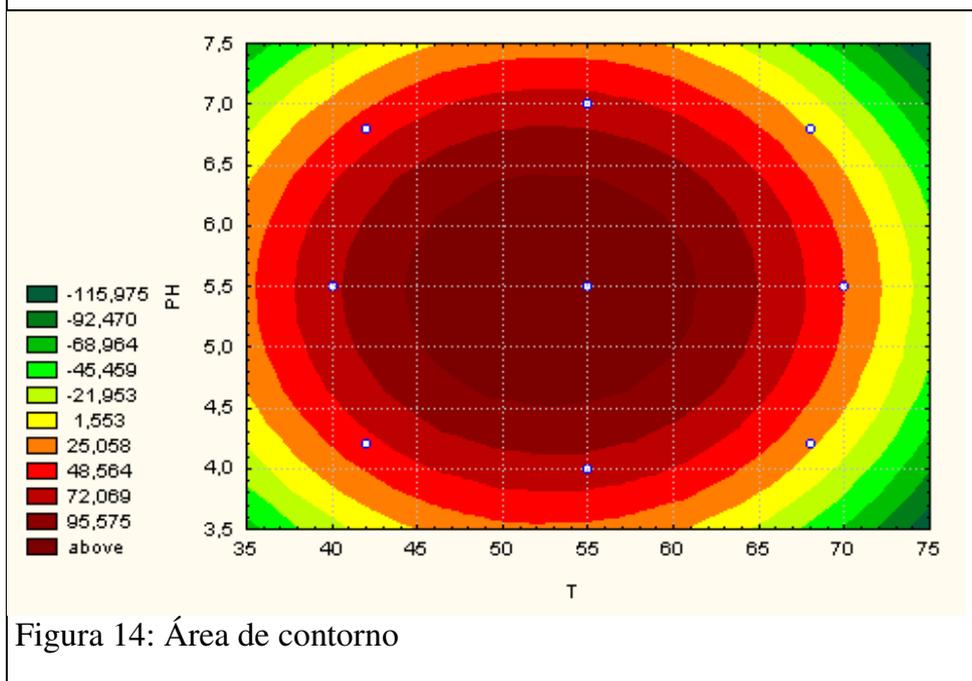


Figura 14: Área de contorno

O modelo predito é:

$$Y = -1513,89 + 33,188 \cdot X_1 + 276,8 \cdot X_2 - 0,31 \cdot X_1^2 - 25,33 \cdot X_2^2$$

Onde, Y: valor predito em UI/mL; X_1 : valor da temperatura em °C; X_2 : valor do pH. Dentro dos parâmetros analisados.

4.1.3 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA β -GLICOSIDASE VEGETAL

O extrato bruto de feijão fava (*Phaseolus lunatus*) foi testado em várias resinas e a que melhor se adequou foi CM Sepharose e por isso foi parcialmente purificado de acordo com item 3.2.6.3 utilizando equipamento de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). O perfil do extrato bruto observado na Figura 15 tem pelo menos três proteínas e pela análise da atividade enzimática de β -glicosidase, o extrato bruto apresentou um pico de alta atividade enzimática. As frações contendo este pico foram dialisadas e liofilizadas.

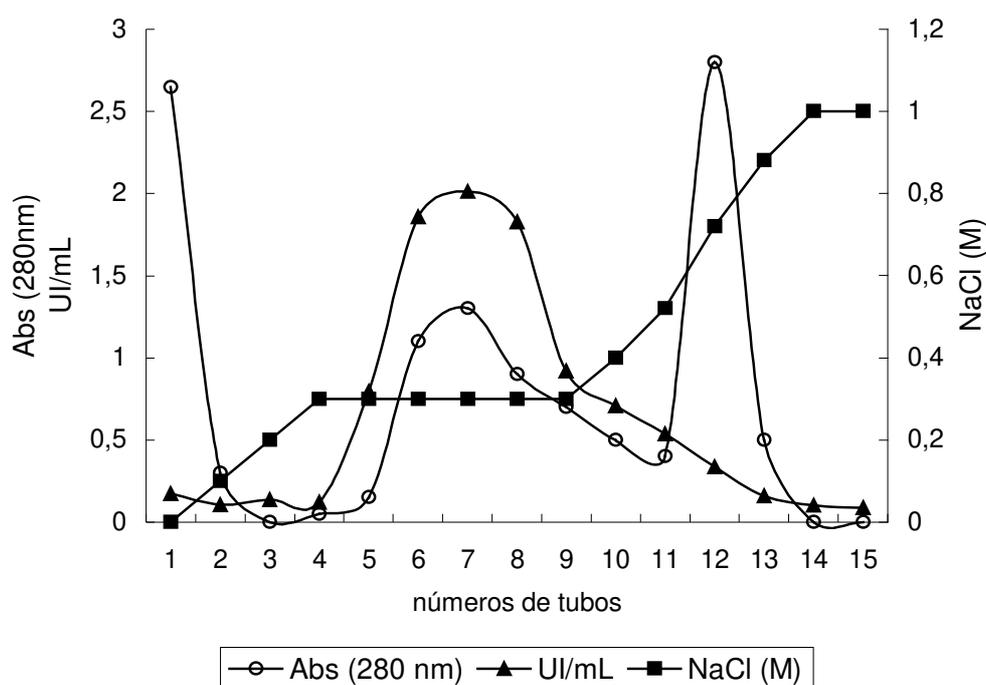


Figura 15: Perfil de eluição da β -glicosidase de *Phaseolus lunatus*. Coluna CM – Sepharose (1 mL), equilibrada com solução tampão citrato-fostato 0,05 M pH 5,5. A enzima foi eluída com gradiente de NaCl (0 a 1M) com fluxo de 1mL/min, coletando frações de 2mL/tubo.

Tabela 9: Purificação parcial da β -glicosidase de feijão fava.

Etapa	Volume (mL)	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Extrato Bruto	490	9633,4	436,1	0,045	100,00	1,0
Precipitação com etanol a 70% v/v	1400	9058	378	0,042	86,68	0,9
CM Sepharose	16800	1848	336	0,182	77,05	4,0

A Tabela 9 apresenta o sumário dos processos utilizados na purificação parcial da β -glicosidase de *Phaseolus lunatus*. A β -glicosidase foi purificada 4 vezes, após a passagem pelo FPLC em coluna de CM – Sepharose, com 77,05% de recuperação e atividade específica de 0,182 unidades/mg proteína.

4.1.3.1. ELETROFORESE SDS-PAGE DA ENZIMA DE FEIJÃO FAVA

A Figura 16 mostra o gel de eletroforese das etapas para a β -glicosidase parcialmente purificada de feijão fava corada com Comassie Blue de acordo com o item 3.2.6.4. Pode-se observar que o extrato bruto (b) e o concentrado após a precipitação com etanol (c) apresentaram mesmo número de bandas. Na figura (d) após o extrato passar pela coluna CM – Sepharose visualiza-se 5 bandas de proteínas.

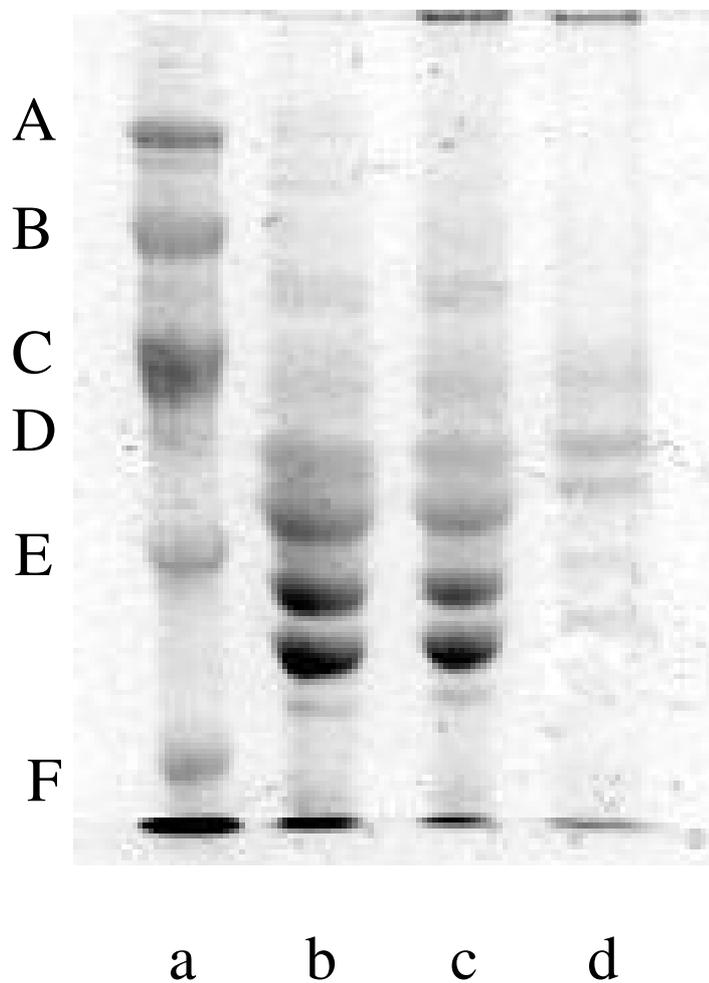


Figura 16: Gel de eletroforese SDS-PAGE de β -glicosidase parcialmente purificada de feijão fava corada com Comassie Blue

- a) Mistura de padrões de peso moleculares; A: fosforilase b (97000); B: soro albumina bovino (66000); C: ovoalbumina (45000); D: anidrase carbônica (30000); E: inibidor tripsina (20100); F: α -lactoalbumina (14400);
- b) Extrato bruto de feijão fava
- c) Extrato precipitado com etanol 70% (v/v)
- d) Enzima parcialmente purificada após a passagem pela coluna CM Sepharose

4.2. β -GLICOSIDASE MICROBIANA

4.2.1. PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

Procedeu-se a fermentação semi-sólida de acordo com o item 6.2.2.3., utilizando farelo de trigo com fonte de carbono e retirando-se uma amostra a cada dia. A atividade enzimática foi calculada como no item 3.2.3. Pela Figura 17 nota-se que a linhagem *Aspergillus niger* apresentou atividade enzimática bem superior a das outras linhagens. O valor obtido foi de 0,77 UI/mL no 5º dia de fermentação, 100% maior que a linhagem *A. oryzae* ATTCC 22786 e *A. oryzae* (solo). A linhagem *A. awamori* NRRL 3112 apresentou atividade em torno de 0,3 UI/mL desde o 3º dia de cultivo.

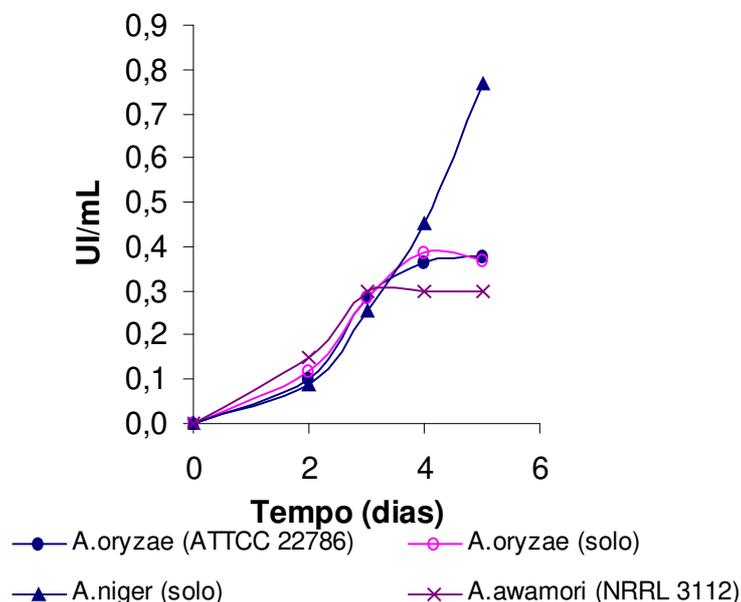


Figura 17: Produção de β -glicosidase por fermentação semi-sólida utilizando fungos. A fermentação procedeu-se em frascos de 250 mL contendo 10 g de farelo de trigo (umidade 60%) incubados a 30°C.

4.2.2. PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A fermentação submersa utilizou os sais citados no item 3.2.2.3, foram retiradas alíquotas diárias do mesmo frasco, obedecendo ao critério de retirar até 10% do volume total. O cálculo da atividade enzimática foi feito de acordo com o item 3.2.3. Nota-se pela Figura 18, que a fermentação submersa não produz alta atividade da enzima. A linhagem que apresentou maior atividade enzimática foi o *A. oryzae* (ATTCC 22786), com 0,27 UI/mL, 150% maior que *A. oryzae* (solo) no 6º dia de fermentação. As linhagens *A. awamori* (NRRL 3112) e *A. niger* começaram a apresentar atividade enzimática no 7º dia de cultivo.

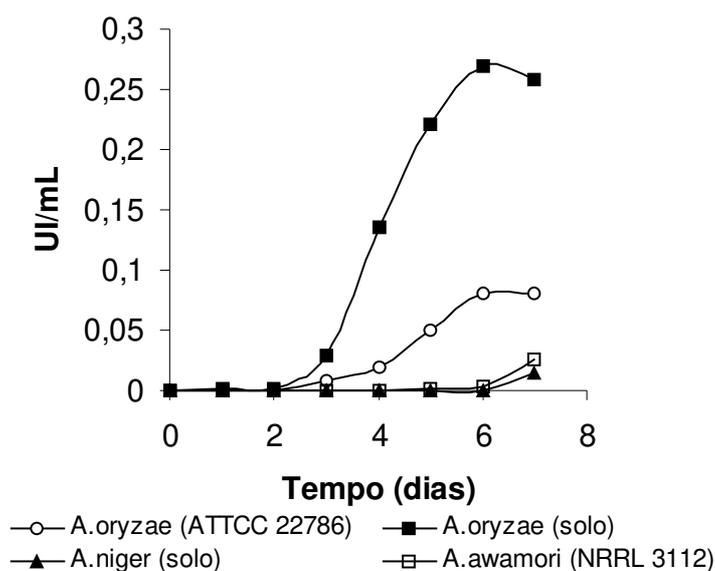


Figura 18: Produção de β -glicosidase por fermentação submersa utilizando fungos. A fermentação procedeu-se em frascos de 500 mL contendo meio líquido de composição (em g/L): NaNO_3 (2), K_2HPO_4 (1), KCl (2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), NH_4NO_3 (1) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1), extrato de levedura (0,5) e sacarose (5), ajustado para pH 6,0. Os meios foram inoculados com microrganismos produtor de β -glicosidase e incubados em shaker a 30°C sob agitação de 150 rpm.

Comparando-se os resultados dos experimentos do meio semi-sólido e submerso, verificou-se a superioridade do meio semi-sólido para produção das enzimas β -glicosidasas em relação ao meio submerso. A linhagem *A. oryzae* (ATTCC 22786), por exemplo, no terceiro dia de cultivo pelo meio semi-sólido apresentou uma atividade enzimática de mesmo valor que do 6º dia da fermentação submersa. Além disso, a fermentação semi-sólida tem sido usada desde a antiguidade pelos países asiáticos devido a sua simplicidade, e é viável economicamente porque não utiliza vários sais e não necessita de agitação durante o seu crescimento.

A linhagem *A. niger* inoculada por fermentação semi-sólida foi selecionada para testes subseqüentes por apresentar maior produção enzimática de β -glicosidase. O fungo *Aspergillus* é utilizado em fermentações industriais principalmente na forma semi-sólida para produção de várias enzimas como a α -amilase, amiloglicosidase, celulase, lactase, invertase, pectinase e protease ácida (Bennett 1985; Ward, 1989).

4.2.3. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO DE *Aspergillus niger*

4.2.3.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA UNIVARIÁVEL

4.2.3.1.1. EFEITO DA TEMPERATURA

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática no filtrado bruto foi verificado de acordo com o item 3.2.4.1.

Em relação ao efeito da temperatura, pode-se notar pela Figura 19 que a temperatura de maior atividade hidrolítica foi a 60°C, mesma temperatura obtida para a enzima vegetal, para Traon-Masson e Pellerin (1998) utilizando *A. niger* e *Humicola grisea* (Takashima et al., 1996). No entanto para Peshin e Mathur (1999) encontraram 50°C como ótimo utilizando também *A. niger*.

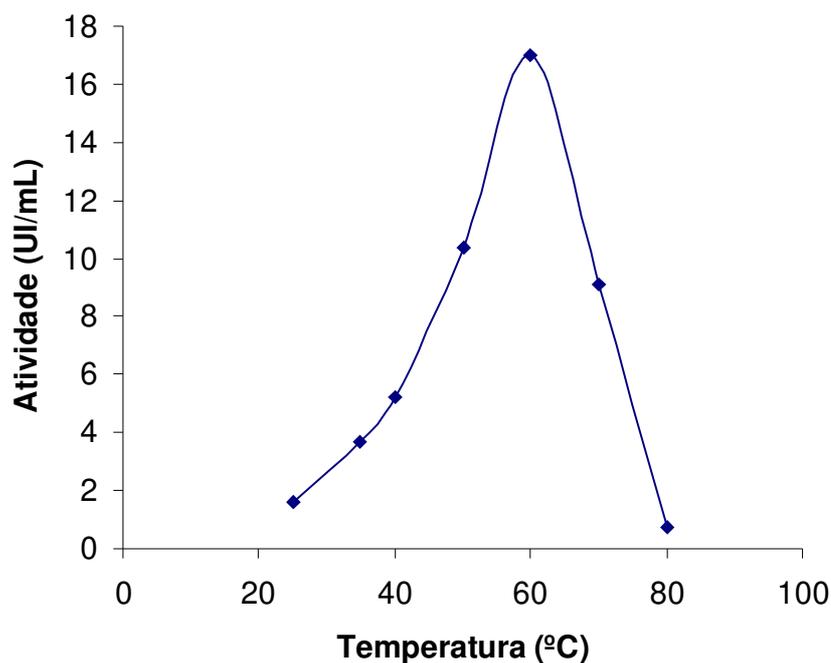


Figura 19: Efeito da temperatura na β -glicosidase bruta de *Aspergillus niger*.

4.2.3.1.2. EFEITO DO PH

O efeito do pH sobre a atividade enzimática no filtrado bruto foi verificado incubando-se o extrato enzimático contendo o substrato em soluções tampões de vários pHs, de acordo com o item 3.2.4.2.

Pela Figura 20 nota-se o efeito do extrato bruto em relação ao pH. O extrato bruto extraído de *Aspergillus niger* apresentou um pico de alta atividade enzimática no pH 5,0. Pela revisão bibliográfica, outros autores também encontraram valores semelhantes de pH ótimo, como por exemplo, o mesmo valor para *Humicola grisea* (Takashima et al., 1996) e para *Thermotoga marítima* (Goyal et al., 2001). Pitson et al. (1997) e Peshin e Mathur (1999) encontraram o pH 5,5 como ótimo, para a enzima β -glicosidase purificada *Acremonium persicinum* e *Aspergillus niger*, respectivamente.

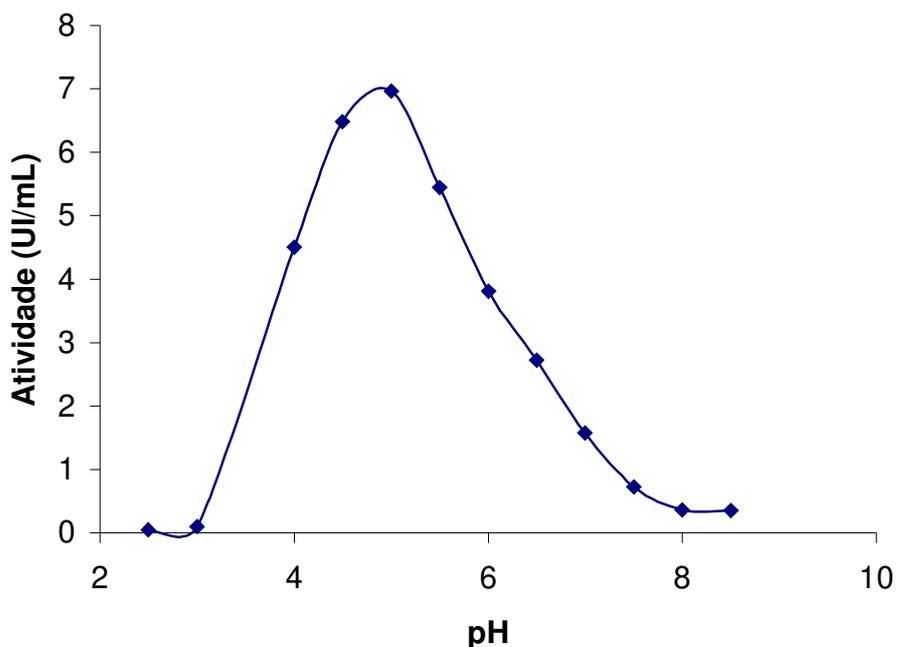


Figura 20: Efeito do pH na β -glicosidase bruta de *Aspergillus niger*. Tampão citrato-fosfato (pH 2,5 a 7,0); tampão fosfato (pH 6,5 a 8,0); tampão borato (pH 8,0 a 10,0).

4.2.3.1.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

A estabilidade térmica da atividade enzimática bruta foi verificada seguindo o procedimento descrito no item 3.2.4.3. O resultado apresentado na Figura 21 mostra que a enzima bruta bastante termo resistente mantendo 100% da sua atividade enzimática depois de 2 horas de incubação a 40°C, retendo 94% da atividade enzimática a 50°C e 87% a 55°C. A 60°C o extrato bruto reteve metade da sua atividade enzimática quando incubada por uma hora e 22% depois de 2 horas de incubação. No entanto a 65°C a enzima perdeu sua atividade a meia hora de incubação. Essa enzima mostrou-se com características semelhantes a enzima vegetal de *Phaseolus lunatus*.

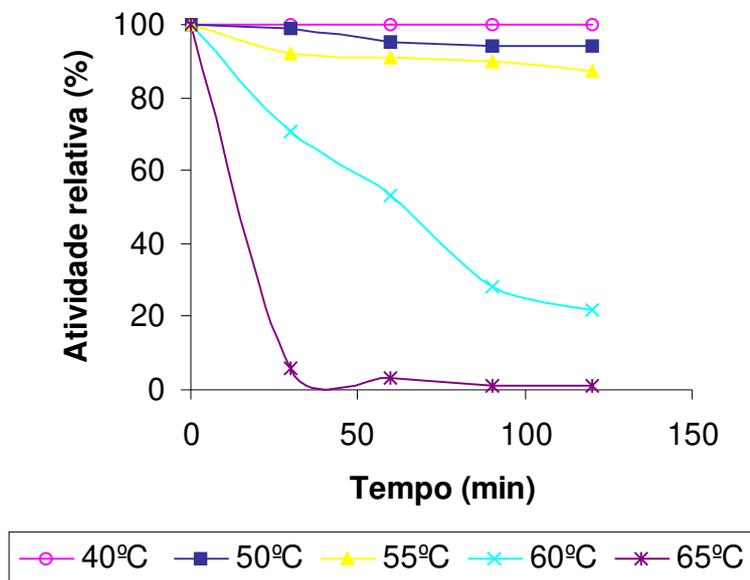


Figura 21: Determinação da termoestabilidade da β-glicosidase bruta de *Aspergillus niger*.

4.2.3.1.4. EFEITO DO PH NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

O pH de estabilidade da atividade enzimática bruta foi verificado seguindo o procedimento descrito no item 3.2.4.4. O resultado apresentado na Figura 22 mostra que a enzima bruta de *Aspergillus niger* é estável a uma faixa ampla de pH. O extrato bruto apresentou-se semelhante ao do feijão fava. A atividade enzimática apresentou 90% de estabilidade entre o pH 4,0 a 9,0. O resultado coincide com alguns autores, como, Traon-Masson e Pellerin (1998) purificaram *A. niger* que mostrou uma faixa ampla de estabilidade do pH 2,0 ao 9,0 e Silva (1992) encontrou uma faixa ampla de estabilidade em função do pH para a enzima β -glicosidase do extrato bruto produzida por *Humicola sp.*

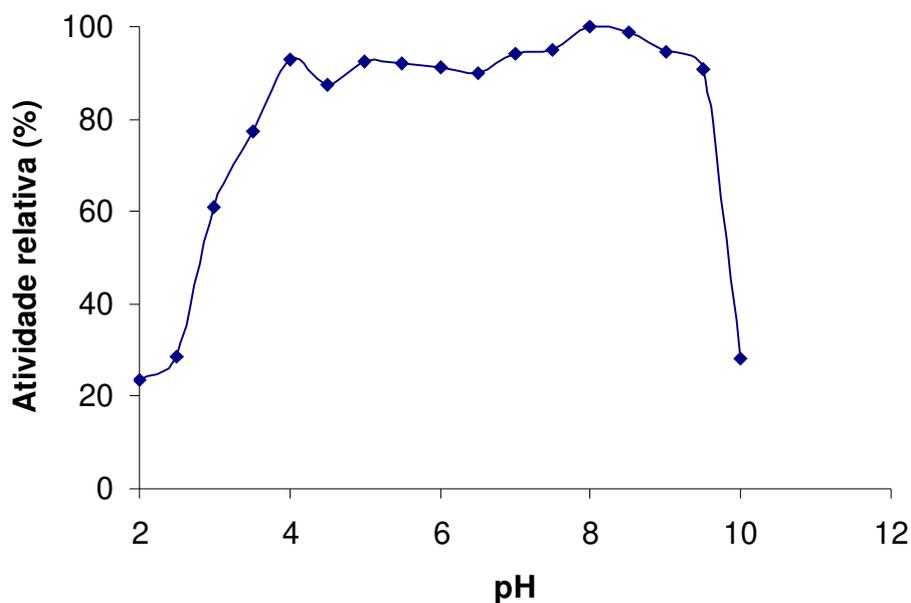


Figura 22: Determinação do pH na estabilidade da β -glicosidase bruta de *Aspergillus niger*. Tampão citrato-fosfato (pH 2,5 a 7,0); tampão fosfato (pH 6,5 a 8,0); tampão borato (pH 8,0 a 10,0).

4.2.3.2. DETERMINAÇÃO DA FAIXA ÓTIMA DE PH E TEMPERATURA POR PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Para a caracterização bioquímica de β -glicosidase microbiano por planejamento estatístico foi verificada, a faixa ótima de temperatura e pH do extrato bruto de *Aspergillus niger*. Neste experimento foi utilizado planejamento fatorial completo 2^2 cujos níveis utilizados encontra-se na metodologia (item 3.2.5.1). A Tabela 10 mostra o valor da atividade enzimática das variáveis analisadas. Pelo cálculo da ANOVA (Tabela 11) nota-se que o F calculado da regressão (13,92) é maior que o Ftabelado (5,05), e o valor do coeficiente de determinação (R) possui um valor de 0,96 bem próximo de 1,0 indicando que os valores preditos estão bem próximos dos valores experimentais, portanto o modelo é válido e preditivo dentro da faixa analisada. Portanto neste exemplo, pode-se tirar a superfície de resposta e de contorno (Figuras 23 e 24), pelas figuras não se pode visualizar a faixa ótima de atividade para o extrato bruto de *Aspergillus niger*, no entanto temos uma idéia de que a faixa ótima estará em pH abaixo de 5,0 quando a temperatura de incubação for superior a 62°C. Este resultado não inclui o ponto ótimo obtido pela análise univariável que foi em pH 5,0 a 60°C mostrando a importância do planejamento estatístico.

Tabela 10: Números de ensaios do planejamento fatorial completo com pontos centrais e axiais da atividade enzimática

Ensaio	X1	x2	X1	X2	UI/ML
			T	pH	
1	-1	-1	44	4,4	0,93
2	1	-1	66	4,4	2,35
3	-1	1	44	6,6	0,40
4	1	1	66	6,6	0,28
5	0	0	55	5,5	1,53
6	0	0	55	5,5	1,56
7	0	0	55	5,5	1,52
8	-1,41	0	40	5,5	0,61
9	1,41	0	70	5,5	1,57
10	0	-1,41	55	4,0	1,16
11	0	1,41	55	7,0	0,40

Tabela 11: Cálculo da ANOVA a 95% de nível de confiança (R=0,96).

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	FCAL	F tab
Regressão	3,99	5,00	0,80		0,95/5/5
Resíduos	0,29	5,00	0,06	13,92	5,05
F. ajuste	0,29	3,00	0,10		
Erro Puro	0,00	2,00	0,00		
Total	4,28	10,00			

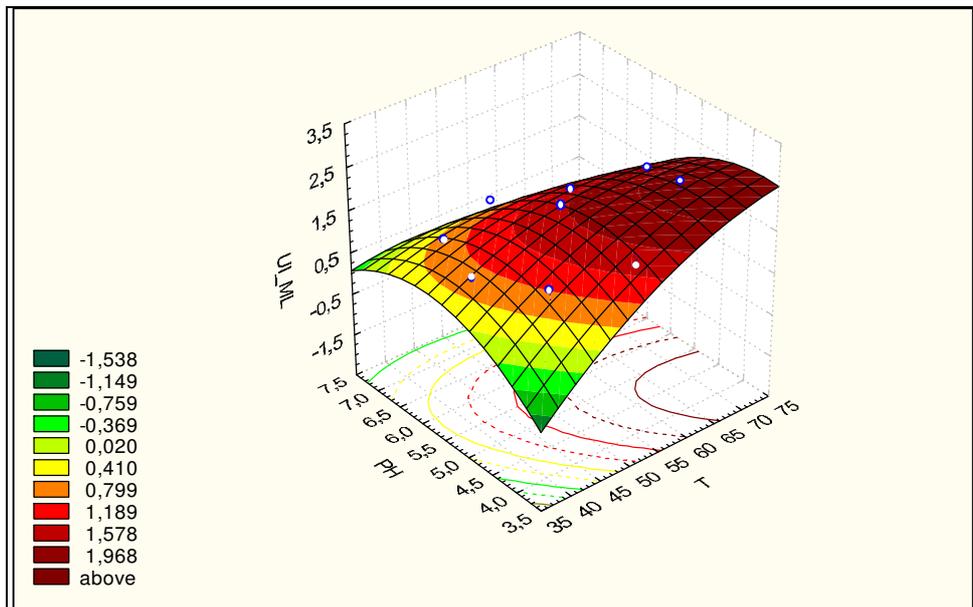


Figura 23: Superfície de resposta para tempo e temperatura

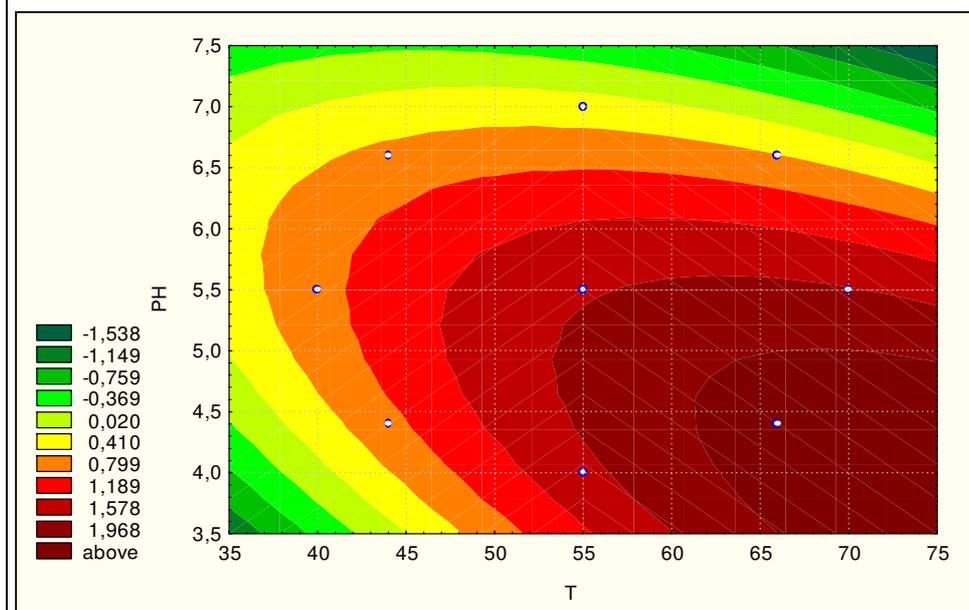


Figura 24: Área de contorno

O modelo predito para os parâmetros analisados:

$$Y = -22,14 + 0,4 * X_1 + 4,75 * X_2 - 0 * X_1^2 - 0,31 * X_2^2 - 0,03 * X_1 * X_2$$

Onde, Y: valor predito em UI/mL; X_1 : valor da temperatura em°C; X_2 : valor do pH.

4.2.3. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA β -GLICOSIDASE MICROBIANA

O extrato bruto de *Aspergillus niger* foi purificado de acordo com item 3.2.6.2 utilizando cromatografia de coluna aberta com CM-Sephadex C-50. Pela Figura 25 observamos pela leitura no espectrofotômetro a 280 nm que o extrato bruto possui inúmeras proteínas e pela análise da atividade enzimática de β -glicosidase que o extrato bruto apresentou dois picos de alta atividade enzimática. O primeiro pico foi eluído antes do gradiente da solução de NaCl, mostrando que o mesmo não aderiu a resina catiônica. As frações contendo o segundo pico foram dialisadas e liofilizadas.

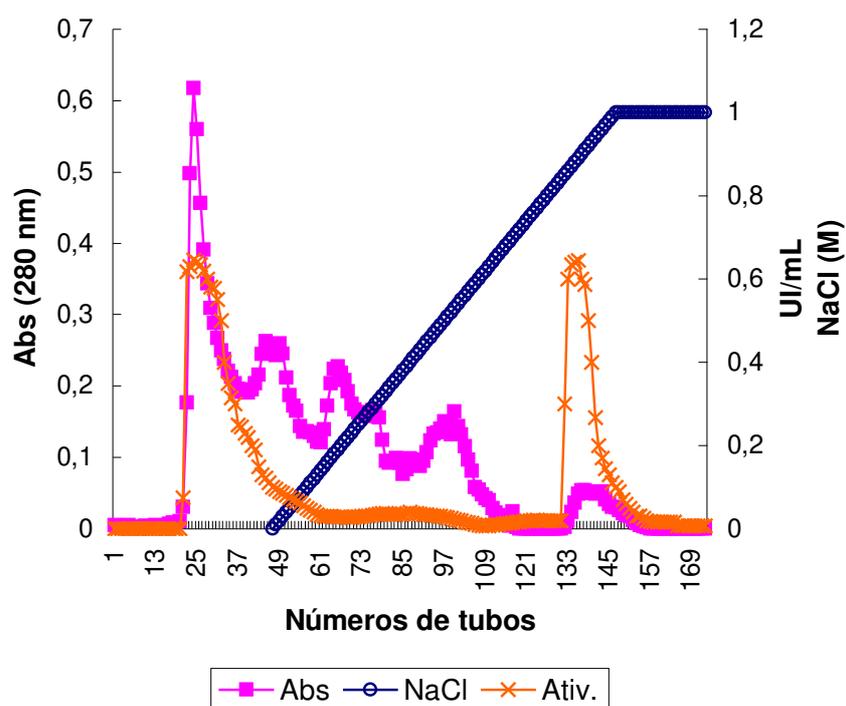


Figura 25: Perfil de eluição da β -glicosidase de *Aspergillus niger*, em coluna CM – SephadexC-50. A coluna 2,5 x 50 cm foi equilibrada com solução tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0. A enzima foi eluída com gradiente de NaCl (0 a 1M) com fluxo de 30mL/h, coletando frações de 6mL/tubo.

Tabela 12: Purificação parcial da β -glicosidase de *Aspergillus niger*

Etapa	Volume (mL)	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Extrato Bruto	2670	1655,4	2029,2	1,23	100,00	1,0
Precipitação com etanol a 70% v/v	150	178,5	1053	5,90	51,89	4,8
CM Sephadex C-50	87	2,61	44,37	17,00	2,19	13,8
Ultrafiltração de 10kDa	28	1,96	34,44	17,57	1,70	14,3

A Tabela 12 apresenta o sumário dos processos utilizados na purificação da β -glicosidase de *Aspergillus niger*. Pelos resultados obtidos podemos observar que a fração contém a enzima β -glicosidase e que foi purificada 14 vezes, após a cromatografia em coluna de CM – Sephadex C-50, com 2,2% de recuperação e atividade específica de 17 unidades/mg proteína. Na ultrafiltração aumentou a atividade específica em 17,6 unidades/mg proteína e diminuiu a taxa de recuperação em 1,7%.

4.2.3.1. ELETROFORESE SDS-PAGE DA ENZIMA DE *Aspergillus niger*

A Figura 26 mostra o gel de eletroforese das etapas para a β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus niger* corada com Comassie Blue de acordo com o item 3.2.6.4. Pode-se observar que o extrato bruto (d) e o concentrado após a precipitação com etanol (c) apresentaram o mesmo número de bandas que o extrato bruto. Na Figura (b) após o extrato passar pela coluna CM- Sephadex C-50 visualiza-se 4 bandas de proteínas.

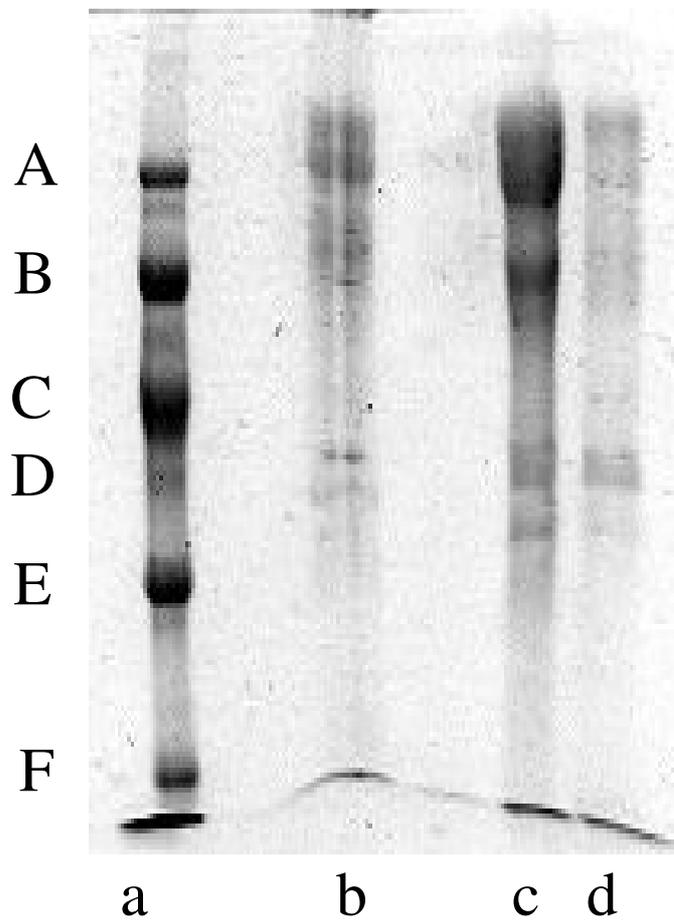


Figura 26: Gel de eletroforese SDS-PAGE de β -glicosidase parcialmente purificada de *Aspergillus niger*

- a) Mistura de padrões de peso moleculares; A: fosforilase b (97000); B: soro albumina bovino (66000); C: ovoalbumina (45000); D: anidrase carbônica (30000); E: inibidor tripsina (20100); F: α -lactoalbumina (14400);
- b) Enzima parcialmente purificada após a passagem pela coluna CM Sephadex C-50
- c) Extrato precipitado com etanol 70% (v/v)
- d) Extrato bruto de *Aspergillus niger* após 5 dias de fermentação semi-sólida

4.3. CONVERSÃO DE ISOFLAVONA GLICOSILADA EM ISOFLAVONA AGLICONA POR β -GLICOSIDASES

Para verificar a conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas por β -glicosidase foram realizados experimentos como para verificar o perfil de isoflavonas contido no substrato, efeito da concentração do substrato, efeito do tempo de reação e comparação da conversão de isoflavonas pelos extratos brutos e pelas enzimas parcialmente purificadas. As análises foram realizadas de acordo com o item 3.2.9.

4.3.1. PERFIL DO SUBSTRATO

De acordo com Carrão-Panizi, 1996 a forma química de isoflavonas em soja pode variar conforme as condições ambientais e a variedade do cultivar. Neste experimento foram analisadas duas amostras de soja, uma doada pelo IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) e outra doada pela indústria Tozan. Na Figura 27 nota-se os perfis cromatográficos dos extratos metanólicos das duas amostras de soja após a reação com extrato bruto de feijão fava (19,3UI/mL) a 40°C durante 30 minutos. Para melhor interpretação dos resultados obtidos fez-se a representação gráfica da conversão de isoflavonas das duas amostras de soja (Figura 28). A Figura 28a mostra o perfil de isoflavonas da soja do IAC, nota-se por essa figura, maior quantidade de isoflavonas malonil glicosídicas que a soja Tozan (Figura 28b). Pode-se observar também na Figura 28a que a enzima utilizada converteu todo teor de isoflavona glicosilada (daidzina, glicitina e genistina) em agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína). Em relação ao teor de malonil glicosídeos observa-se a conversão total de malonil genistina, houve pouca conversão de malonil daidzina e não houve conversão de malonil glicitina.

Na Figura 28b nota-se que o perfil de isoflavonas de soja Tozan possui altos teores de isoflavonas glicosiladas e pouco teor da forma malonil, mostrando a possibilidade da soja ter sido pré-tratada termicamente. Observa-se que a enzima converteu totalmente o teor de daidzina e glicitina, no entanto as formas malonil não sofreram alteração, possivelmente devido à sua forma química dificultar a conversão e também pela quantidade dos mesmos ser pouca em relação as glicosiladas. Como o objetivo do trabalho é verificar a ação da enzima sobre as isoflavonas glicosiladas, a soja Tozan foi então utilizada nos testes subsequentes.

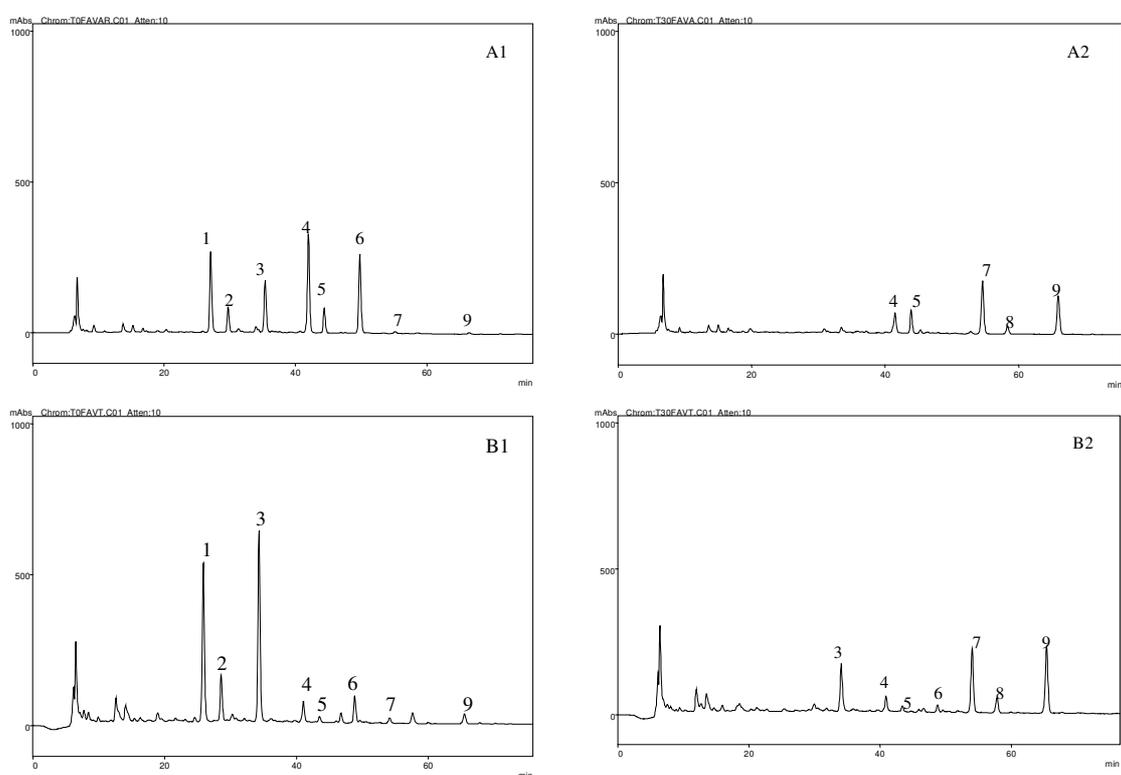


Figura 27: Perfis cromatográficos de isoflavonas de duas variedades de soja reagindo com o extrato bruto de feijão fava. A atividade da enzima foi de 19,3UI/mL. A1: controle do extrato metanólico de soja IAC; A2: reação do extrato metanólico de soja IAC; B1: controle do extrato metanólico de soja Tozan; B2: reação do extrato metanólico de soja Tozan; 1:daidzina; 2:glicitina; 3:genistina; 4:malonil daidzina; 5:malonil glicitina; 6: malonil genistina; 7:daidzeína; 8:gliciteína; 9:genisteína.

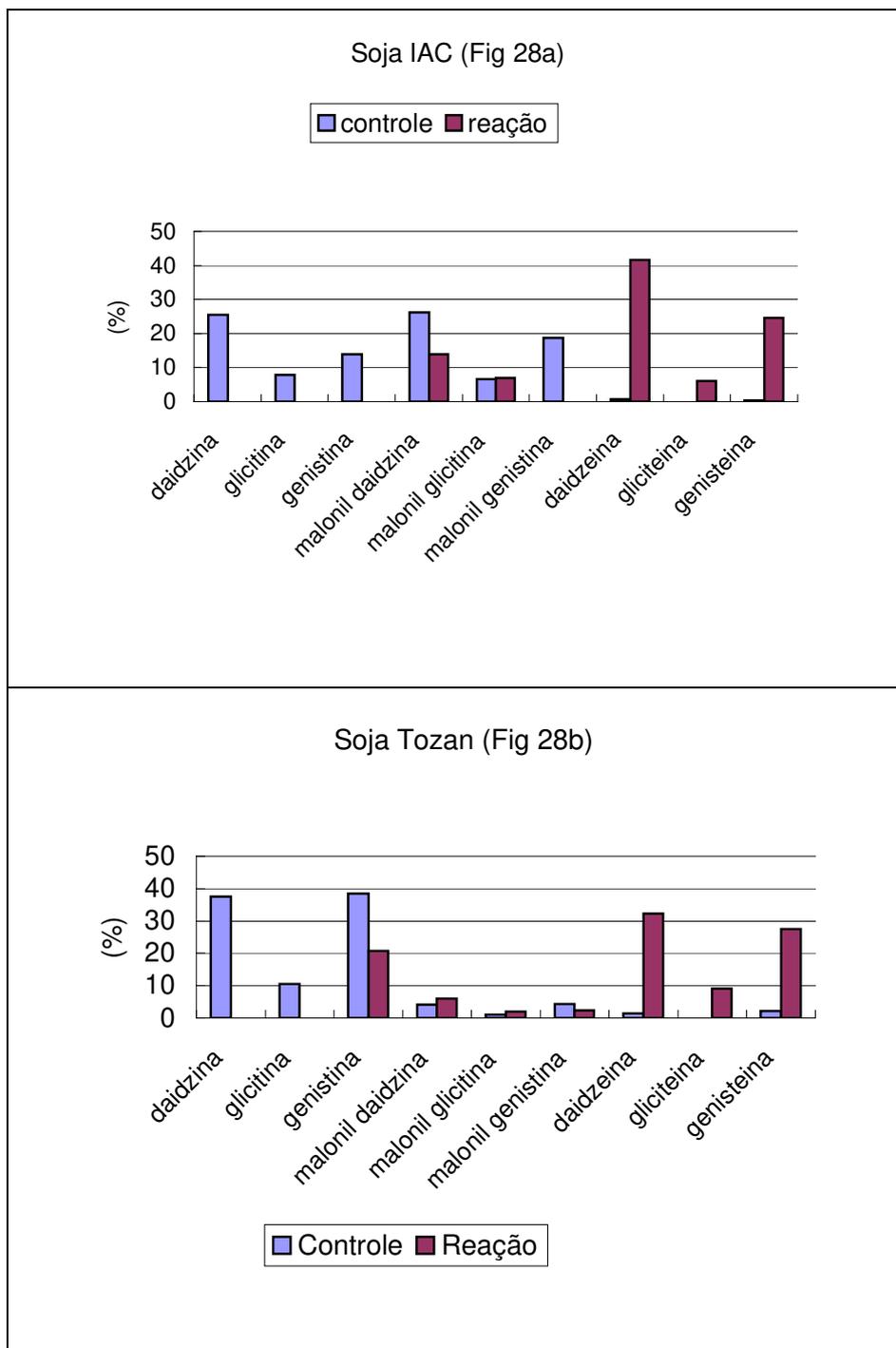


Figura 28: Representação gráfica da conversão de isoflavonas de duas variedades de soja. A reação foi realizada a 40°C por 30 minutos utilizando extrato enzimático bruto de feijão fava (19,3UI/mL) e 100 mg extrato metanólico.

4.3.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

Foi feito um estudo para verificar se a quantidade de substrato utilizado poderia influenciar na taxa de conversão de isoflavonas. Verifica-se pela Figura 29 os perfis cromatográficos em diferentes concentrações do substrato (extrato metanólico de soja Tozan) utilizando a enzima parcialmente purificada de feijão fava (0,2UI/mL) para a conversão de isoflavonas, nesta figura nota-se o aumento gradual das isoflavonas glicosiladas sem aumento proporcional das isoflavonas agliconas. A Figura 30 mostra a curva de conversão de isoflavonas glicosiladas e agliconas em relação a 50, 100, 150 e 200 mg de substrato. Nota-se que a reação contendo 50 mg de substrato teve maiores conversões de glicosilados em agliconas. A reação com 100 mg, 150 mg e 200 mg de substrato apresentou maiores quantidades de genistina e daidzina sem o aumento das respectivas agliconas (genisteína e daidzeína) mostrando que a atividade enzimática utilizada ou o tempo de reação foi insuficiente para a conversão.

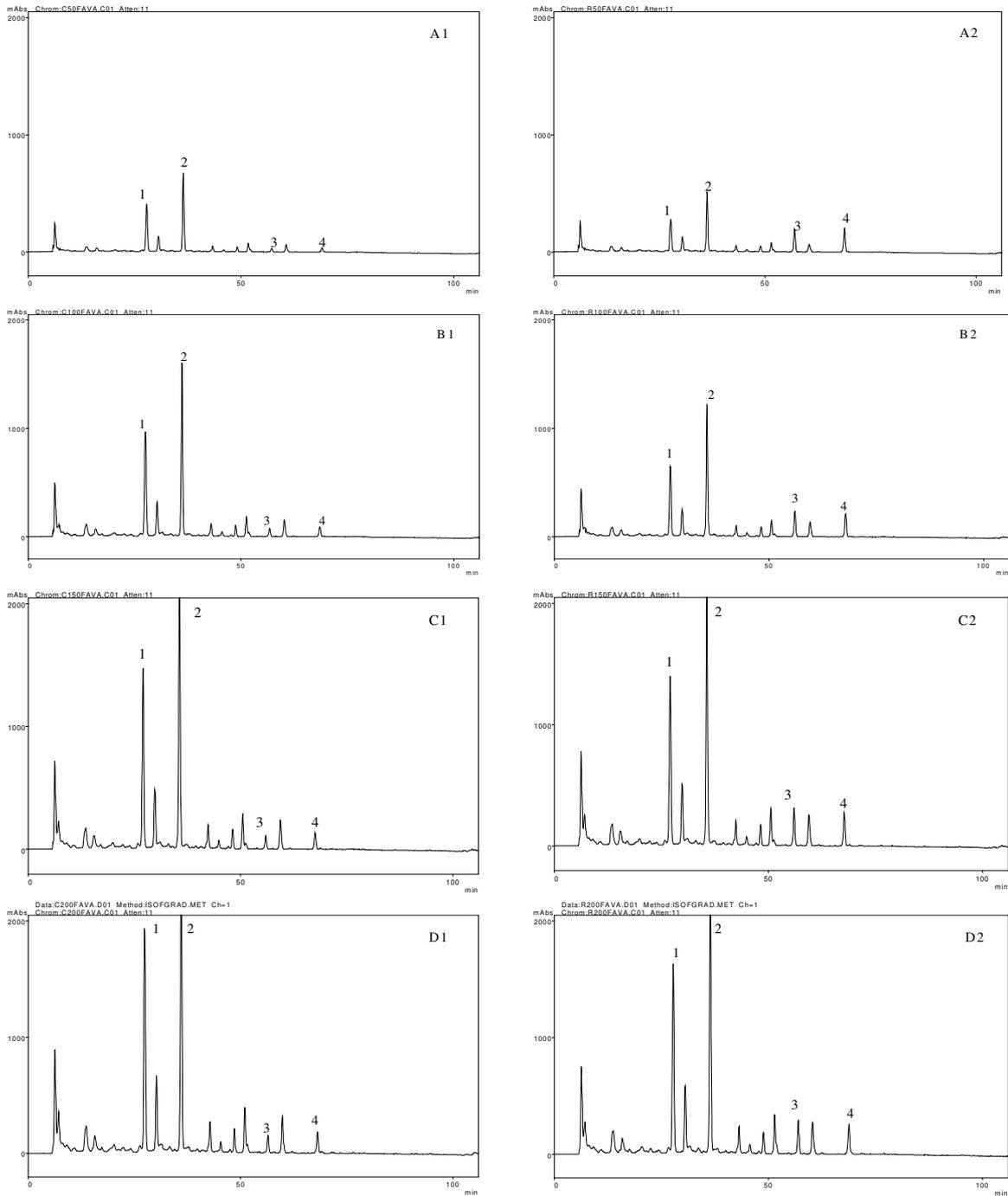


Figura 29: Perfis cromatográficos da conversão de isoflavonas em função da concentração do substrato (extrato metanólico de soja Tozan) reagindo com enzima parcialmente purificada de feijão fava (0,2UI/mL). A1: controle com 50 mg do substrato; A2: reação com 50 mg do substrato; B1: controle com 100 mg do substrato; B2: reação com 100 mg do substrato; C1: controle com 150 mg do substrato; C2: reação com 150 mg do substrato; D1: controle com 200 mg do substrato; D2: reação com 200 mg do substrato; 1:daidzina; 2:genistina; 3: daidzeína; 4: genisteína.

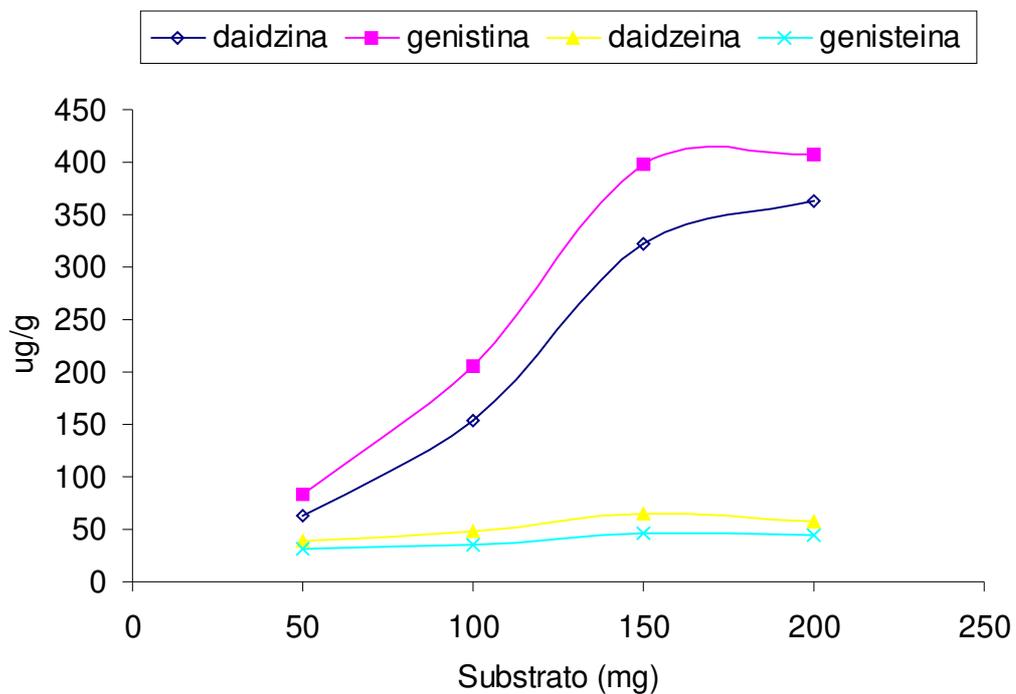


Figura 30: Curvas de conversão de isoflavonas em função da concentração do substrato. O substrato foi o extrato metanólico de soja Tozan. A reação foi realizada a 40°C por 30 minutos utilizando a enzima de feijão fava parcialmente purificada (0,2 UI/mL).

4.3.3. EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO

Foi feito um estudo para verificar a conversão de isoflavonas em relação ao tempo de reação com a enzima de feijão fava e de *Aspergillus niger*. Em ambos a atividade enzimática foi de 0,05 UI/mL. Na Figura 31 observam-se os perfis cromatográficos das isoflavonas em relação ao tempo de reação (30, 60 e 90 minutos) utilizando enzima parcialmente purificada de feijão fava e *Aspergillus niger*. Na Figura 32, para melhor entendimento, foi feito o cálculo em porcentagem da quantidade de diminuição ou aumento de isoflavonas glicosiladas em agliconas para (a) vegetal e (b) microbiana em relação ao controle. Pela Figura 32a nota-se que quanto maior o tempo de reação, maior a diminuição das isoflavonas glicosiladas e conseqüentemente maior a quantidade das agliconas. A 90 minutos de reação, houve um aumento de aproximadamente 30% na quantidade do teor de genisteína.

A enzima fúngica (Figura 32b) foi mais eficiente para a conversão de isoflavonas. Para a daidzeína, por exemplo, após 30 minutos de reação houve um aumento de 30% permanecendo o mesmo valor após 90 minutos de reação utilizando mesmo valor de atividade enzimática. Em relação à quantidade de genisteína nota-se um aumento de 30% após 30 minutos de reação, e de 40% após 60 e 90 minutos. Como foram utilizados mesmo substrato e mesma atividade enzimática, verifica-se a preferência pela enzima fúngica, pois esta pode converter as isoflavonas num tempo menor e em maior quantidade.

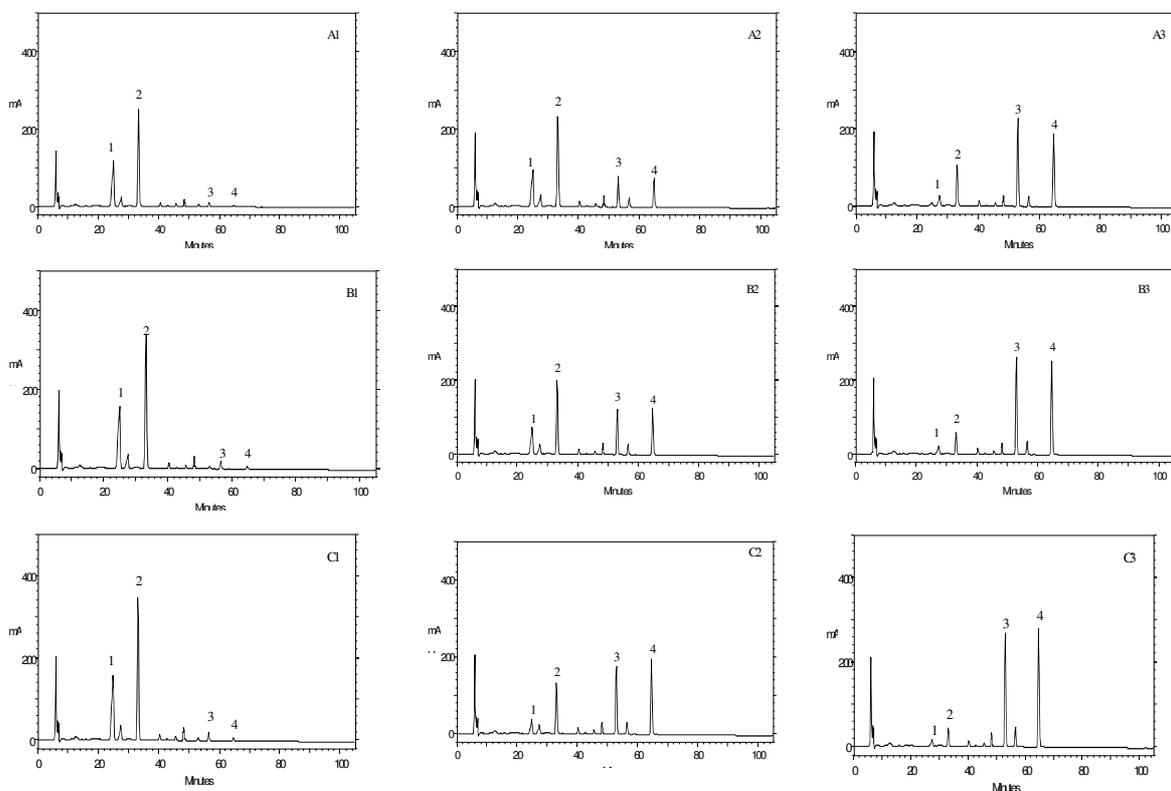


Figura 31: Perfis cromatográficos da conversão de isoflavonas em função do tempo de reação. Foram utilizadas as enzimas parcialmente purificadas de feijão fava e *Aspergillus niger*, ambos com 0,05UI/mL. A1: controle da reação a 30 minutos de incubação; A2: reação da enzima parcialmente purificada de feijão fava; A3: reação da enzima parcialmente purificada de *Aspergillus niger*; B1: controle da reação a 60 minutos de incubação; B2: reação da enzima parcialmente purificada de feijão fava; B3: reação da enzima parcialmente purificada de *Aspergillus niger*; C1: controle da reação a 90 minutos de incubação; C2: reação da enzima parcialmente purificada de feijão fava; C3: reação da enzima parcialmente purificada de *Aspergillus niger*; 1:daidzina; 2:genistina; 3: daidzeína; 4: genisteína.

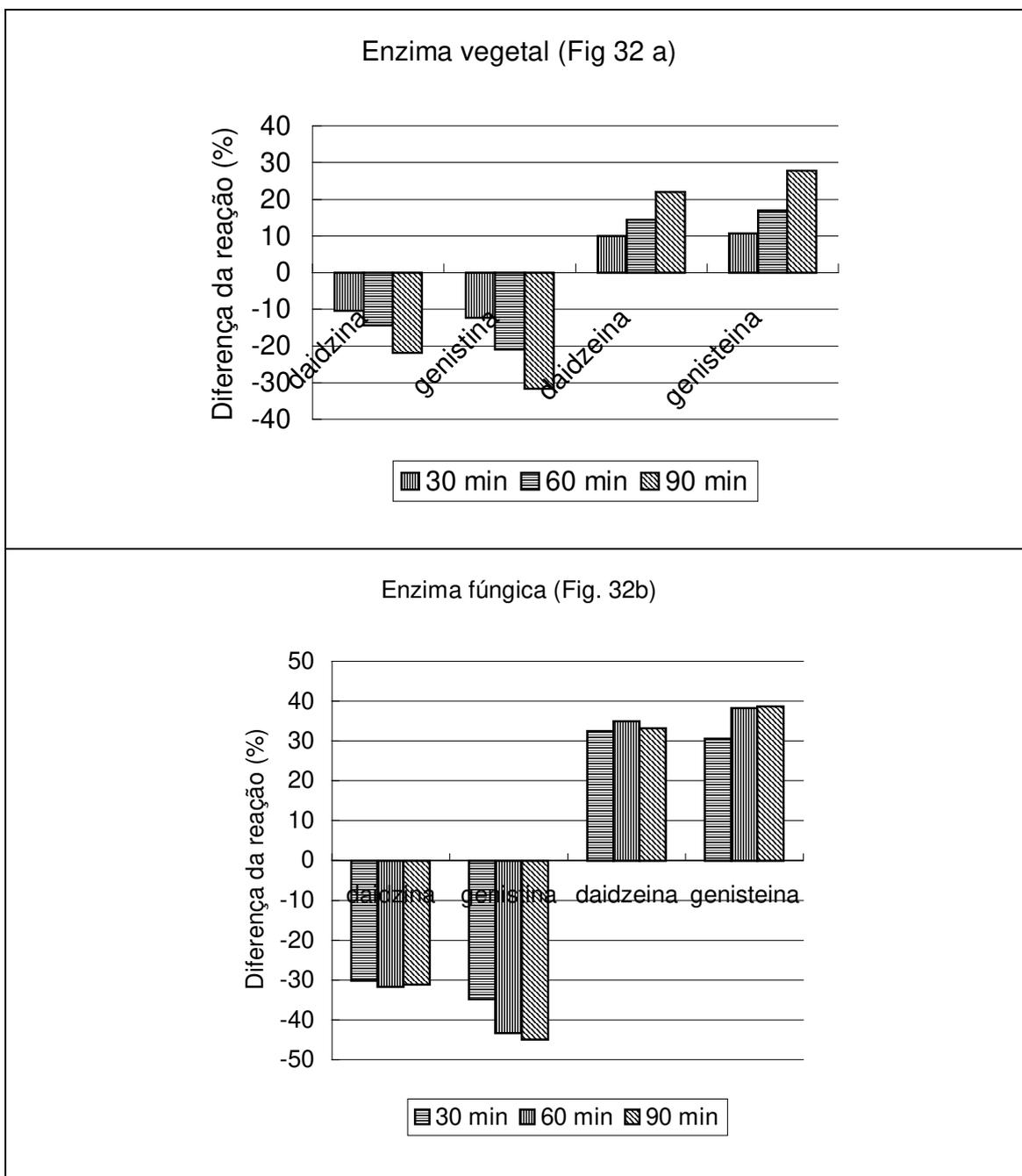


Figura 32: Representação gráfica da conversão de isoflavonas em função do tempo de reação. A reação foi realizada a 40°C em diferentes tempo de reação (30, 60 e 90 minutos) utilizando enzima parcialmente purificada de feijão fava (32a) e de *Aspergillus niger* (32b) ambos com 0,05UI/mL.

4.3.4. COMPARAÇÃO DA CONVERSÃO DAS ISOFLAVONAS UTILIZANDO ENZIMAS BRUTAS E PARCIALMENTE PURIFICADAS

Foi feito um experimento para verificar a eficiência das enzimas brutas e parcialmente purificada de feijão fava e *Aspergillus niger* sobre o extrato metanólicos de soja para a conversão de isoflavonas. A Figura 33 mostra os perfis cromatográficos das isoflavonas utilizando diferentes enzimas e pela Figura 34 pode-se observar a representação gráfica da conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas (%). Nota-se por esta Figura que o extrato bruto de feijão fava pode conter enzimas ou compostos que podem inibir ou dificultar a conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas pois houve um aumento de cerca de 20% de daidzeína e de genisteína em relação ao tempo zero utilizando a mesma atividade enzimática que as outras enzimas. Em relação a enzima parcialmente purificada de feijão fava houve um aumento de 32% na quantidade de genisteína e daidzeína, ou seja, 12% a mais que a enzima bruta. O extrato bruto e a parcialmente purificada de *Aspergillus niger* apresentaram praticamente as mesmas taxas de conversão de daidzeína que foi um aumento de aproximadamente 32% em relação ao tempo zero. Houve uma pequena diferença na quantidade de conversão de genisteína que foi um aumento de 33% e 30% para enzima bruta e parcialmente purificada, respectivamente.

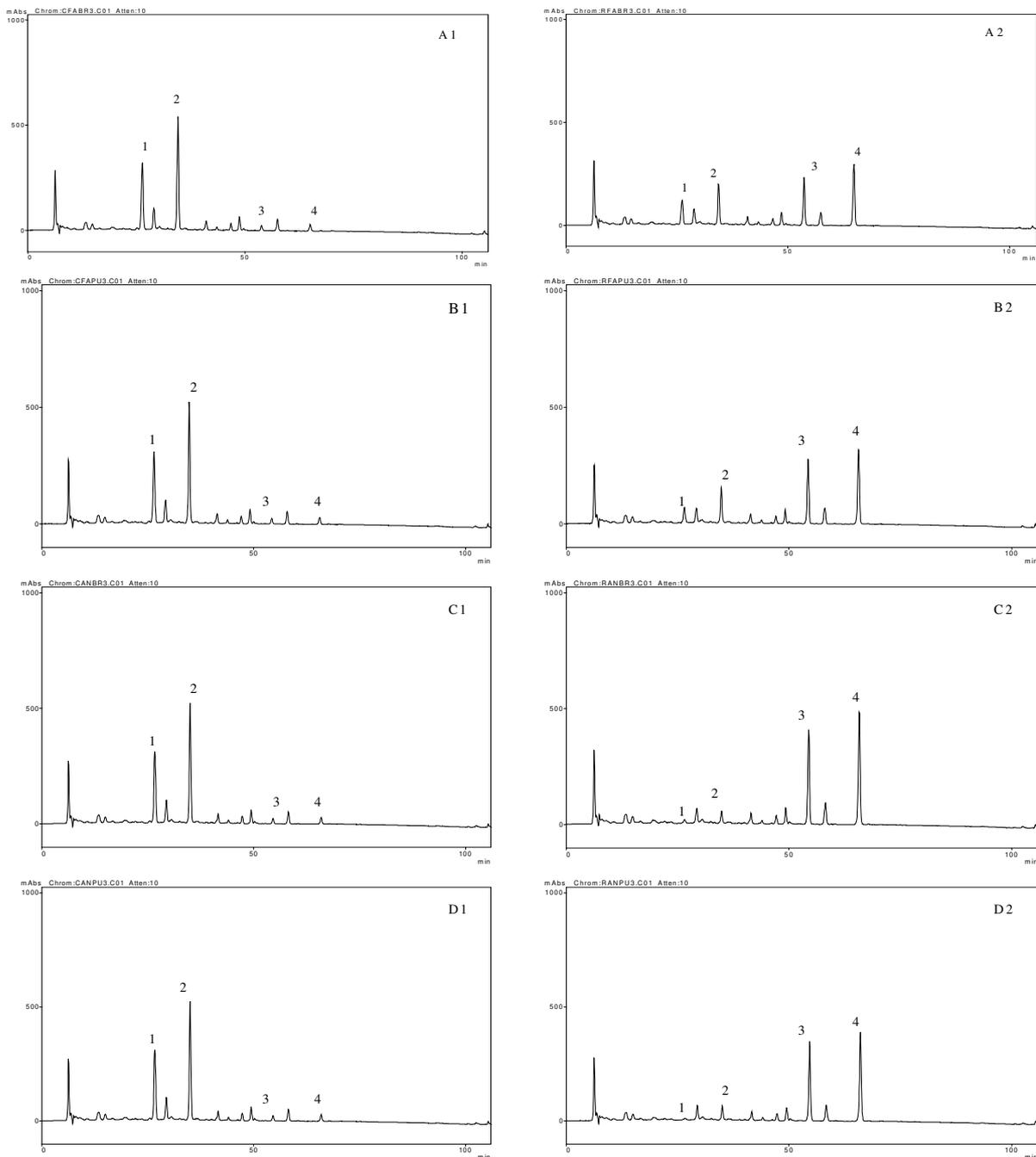


Figura 33: Perfis cromatográficos da conversão de isoflavonas utilizando diferentes enzimas. A1: controle do extrato bruto de feijão fava; A2: reação do extrato bruto de feijão fava; B1: controle da enzima parcialmente purificada de feijão fava; B2: reação da enzima parcialmente purificada de feijão fava; C1: controle do extrato bruto de *Aspergillus niger*; C2: reação do extrato bruto de *Aspergillus niger*; D1: controle da enzima parcialmente purificada de *Aspergillus niger*; D2: reação da enzima parcialmente purificada de *Aspergillus niger*; Todos com atividade enzimática de 0,162 UI/mL; 1:daidzina; 2:genistina; 3: daidzeína; 4: genisteína.

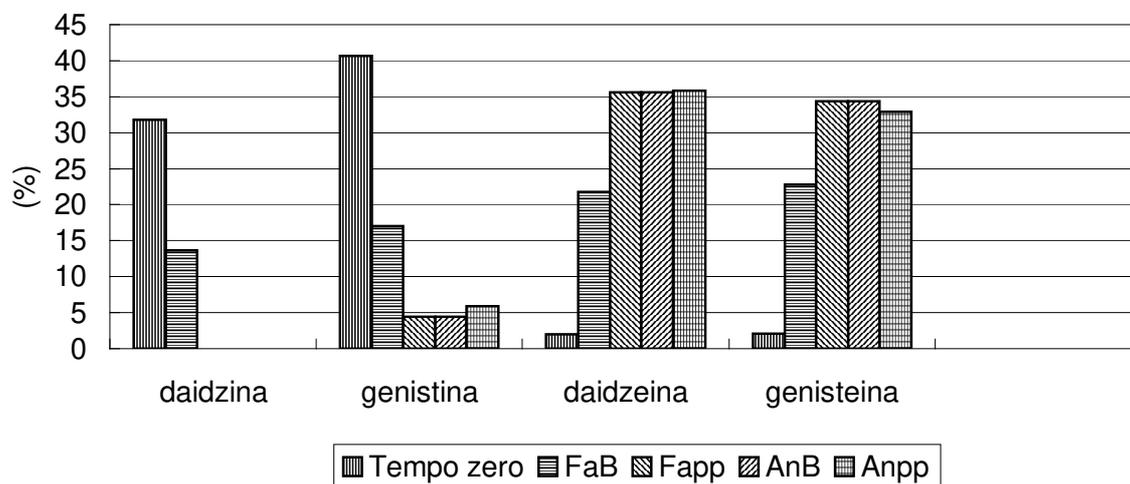


Figura 34: Representação gráfica da conversão de isoflavonas utilizando diferentes enzimas. A reação foi realizada a 40°C por 30 minutos onde: FaB (extrato bruto de feijão fava), Fapp (enzima parcialmente purificada de feijão fava), AnB (extrato bruto de *Aspergillus niger*) e Anpp (enzima parcialmente purificada de *Aspergillus niger*) todos com 0,16UI/mL.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O extrato bruto de feijão fava tem atividade enzimática de β -glicosidase superior as amostras de leguminosas: soja, feijão, tremoço, e outros. Tendo o feijão fava 44 vezes mais atividade enzimática que a variedade de soja analisada utilizando pNPG com substrato.

Pela caracterização bioquímica de β -glicosidase para feijão fava univariável encontrou-se como ótimo pH 5,5 a 60°C e pelo planejamento estatístico uma faixa em pH 4,5 a 6,4 quando temperatura de incubação for de 45°C a 60°C.

O extrato bruto de feijão fava mostrou-se termoestável a 40°C e a 50°C por 4 horas e também se mostrou estável a uma faixa ampla de pH entre 5,0 a 9,0 podendo ser utilizado durante o processamento de alimentos.

A β -glicosidase de feijão fava foi purificada 4 vezes com 77,05% de recuperação e atividade específica de 0,18 U/mg de proteína. Apresentando na eletroforese SDS-PAGE 5 bandas de proteínas.

A fermentação semi-sólida mostrou-se mais eficiente que a fermentação submersa na obtenção da atividade enzimática maior de β -glicosidase para os fungos analisados: *Aspergillus oryzae* ATCC 22786, *Aspergillus oryzae* (solo), *Aspergillus niger* (solo) e *Aspergillus awamori* NRRL 3112.

O fungo *Aspergillus niger* apresentou maior atividade enzimática de β -glicosidase que os outros fungos analisados. E foi selecionado para as etapas posteriores.

O extrato bruto de *Aspergillus niger* apresentou como ótimo em pH 5,0 a 60°C e pelo planejamento estatístico, observa-se que a enzima possui a faixa ótima em pH abaixo de 5,0 quanto a temperatura de incubação for superior a 62°C. Mostrou-se

termoestável a temperatura de 40°C a 55°C e estável em pH entre 4,0 a 9,0, podendo ser utilizado em processamento de alimentos.

A β -glicosidase microbiana de *A. niger* foi purificada 14 vezes com 2,2% de recuperação e atividade específica de 17 U/mg de proteína. Apresentando 4 bandas de proteínas na eletroforese SDS-PAGE.

Pela análise dos extratos metanólicos de soja por CLAE reagindo enzimaticamente com o extrato bruto e enzima parcialmente purificada de: *Phaseolus lunatus* e *Aspergillus niger*, podem converter as isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas. O que mostra a importância do uso da enzima β -glicosidase para aumentar a biodisponibilidade de agliconas e conseqüentemente a eficiência na prevenção de doenças crônicas.

O perfil cromatográfico das isoflavonas pode variar com a variedade ou espécie de soja.

O tipo de substrato, a quantidade de substrato, tempo de reação, tipo de enzima e quantidade de enzima pode influenciar na conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Testar outras linhagens microbianas para verificar se as mesmas produzem β -glicosidase.

Purificar a β -glicosidase de feijão fava e de *Aspergillus niger* até obter apenas uma banda de proteína. E testar as mesmas na conversão enzimática das isoflavonas.

Otimizar a conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas, encontrando os parâmetros de quantidade de substrato, tempo de reação, tipo e quantidade de enzima.

Desenvolver produtos utilizando as isoflavonas agliconas (genisteína e daidzeína) hidrolisada pela β -glicosidase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, D.S.P. Isoflavonas na aterosclerose experimental. **In: Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, 2002, Campinas, SP. CD-ROM do IV Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages. Campinas: UNICAMP, 2002.

ADLERCREUTZ, H.; HONJO, H.; HIGASHI, A.; FOTSIS, T.; HAMALAINEN, E.; HASEGAWA, T.; OGAWA, H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, Baltimore, v.54, p.1093-1100, 1991.

ADLERCREUTZ, H.; MOUSAVI, Y.; CLARK, J.; HOCKERSTEDT, K.; HAMALAINEN, E.; HASEGAWA, T.; WAHALA, K.; MAKELA, T.; HASE, T. Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. **Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology**, Oxford, v.41, p.331-337, 1992.

ADLERCREUTZ, H.; BANNWART, C.; WAHALA, K.; MAKELA, T.; BRUNOW, G.; HASE, T.; AROSEMENA, P.J.; KELLIS JR, J.T.; VICKERY, L.E. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. **Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology**, Oxford, v.44, p.147-153, 1993.

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

ALAIS, C.; LINDEN, G. **Food Biochemistry**, 1^a ed. England, Ellis Horwood Limited, 1991.

ANDERSON, R.L.; WOLF, W.J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybeans processing. **Journal of Nutrition**, v.125, p.581S-588S, 1995.

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

ARAMENDIA, M.A.; GARCIA, I.; LAFONT, F.; MARINAS, J.M. Determination of isoflavones using capillary electrophoresis in combination with electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.707, p.327-333, 1995.

ARAÚJO, J.M.A.; CARLOS, J.C.S.; SEDYAMA, C.S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de β -glucosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.137-141, mai./ago., 1997.

ARDITI, T.; MEREDITH, T.; FLOWERMAN, P. Renewed interest in soy isoflavones and saponins, **Cereal Foods World**, v. 45, n.9, p.414-417, 2000.

ATKINSON, C.; SKOR, H.E.; FITZGIBBONS, E.D; SCHOLES, D.; CHEN, C.; WÄHÄLÄ K.; SCHWARTZ, S.M.; LAMPE, J.W. Overnight urinary isoflavone excretion in a population of women living in the United States, and its relationship to isoflavone intake. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.11, p.253-260, mar., 2002.

AURORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.356, n.2, p.133-141, aug., 1998.

AUSTWICK, P.K.C. Pathogenicity of *Aspergillus* species, p.821-826, 1965.

BANERJEE, U.C. Immobilized b-glucosidase from *Curvularia lunata*. **Folia Microbiology**, v.37, n.4, p.256-260, 1992.

BARNES, S.; COWARD, L.; KIRK, M. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.2466-2474, 1994.

BARNES, S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer, **Journal of Nutrition**, v.125, p. 777S-783S, 1995.

BARNES, S.; COWARD, L.; KIRK, M.; SFAKIANOS, J. HPLC-mass spectrometry analysis of isoflavones. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v.217, p.254-262, 1998.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, E.R. **Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Campinas – SP: Editora da Unicamp, 2001.

BENNETT, J.E.; Aspergillosis, Tradução: P. Beeson, W. McDermott, and J. Wyngaarden 15ª edição, **Cecil textbook of medicine**, W.B.Saunders, Philadelphia, 1979, p.546-547.

BENNETT, J.W.; Molds, manufacturing and molecular genetics, Tradução: W.E. Timberlake, **Molecular genetics of filamentous fungi**. Alan R. Liss Inc., NY, 1985.

CARRÃO-PANIZZI, M.C. **Isoflavonóides em soja (*Glycine max (L.) Merrill*): Variabilidade genética e ambiental de cultivares e efeitos no processamento do extrato solúvel**. Londrina - PR, 1996. Tese (Doutor em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDINGNON, J.R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.5, p.873-878, mai. 2000.

CASSIDY, A.; BINGHAM, S.; SETCHELL, K. Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soya bean products,

British Journal of Nutrition, v.64, p.587-601, 1995 (Citado por Kerckhoffs et al., 2002).

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

COGHLAN, A. Cancer killer, a hormone in soya beans starves tumour cells to death. **New Scientist**, v.14, 14 March 1998 (Citado por Harborne e Williams, 2000).

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural Chemistry**, v.41, n.11, p.1961-1967, 1993.

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **Journal of Agricultural Chemistry**, v.68 (suppl.), p.1486S-1491S, 1998.

CROUSE, J.R.; MORGAN, T.; TERRY, J.G.; ELLIS, J.; VITOLINS, M.; BURKE, G.L. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins, **Arch. International Medicine**, v.159, p.2070-2076, 1999 (Citado por Kerckhoffs et al., 2002).

EBATA, J.; FUKUDA, K.; HIRAI, K.; MURATA, K. **Nippon Nogeikagaku Kaisha** v.46, p.323-329, 1972.

EDWARDS, J.H.; ALZUBAIDY, T.S. medical aspects, 1977.

ELDRIDGE, A.C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates, and isolates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.30, p.353-355, 1982.

ELDRIDGE, A.; KWOLEK, W. Soybean isoflavones: Effects of environment and variety on composition. . **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.31, n.2, p.394-396, 1983.

EPA (Agência de Proteção Ambiental) proposta 40 CFR parte 700 seção 5(h)(4) do artigo de controle de substancias toxicas (TSCA) Registro federal (59 FR 45526), Disponível em: [wysiwyg://21/http://www.epa.gov/opptintr/biotech/fra/fd006.htm](http://www.epa.gov/opptintr/biotech/fra/fd006.htm) September 1, 1994. Acesso em: 17 Jan. 2003.

ERICKSON, et al. Coleção de fava (*Phaseolus lunatus*) do Banco de Germoplasma de hortaliças de Viçosa, **In: VII Reunião anual da Sociedade de oleicultura do Brasil**. 1967 (Citado por Vieira, 1989).

ERIKSEN, E.F.; COLVARD, D.S.; BERG, N.J. et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells, **Science**, v.241, p.84-86, 1988 (Citado por Setchell, 1998).

ESAKI, H.; ONOZAKI, H.; MORIMITSU, Y.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Potent antioxidative isoflavones isolated from soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.4, p.740-746, 1998.

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

ESAKI, H.; KAWAKISHI, S.; MORIMITSU, Y.; OSAWA, T. New potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in fermented japanese soybean products. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.63, n.9, p.1637-1639, 1999b.

ESEN, A. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays L.*) β -glucosidase. **Plant-Physiology**, v.98, n.1, p.174-182, 1992.

FDA Isoflavone research. **U.S. Food and Drug Administration**. Federal Register: v. 64, n.206, october26, 1999.

FINKELSTEIN, D.B.; et al.; Protein secretion in *Aspergillus niger*. Tradução: C.L. Hershberger, S. Queener, G. Hegeman, **Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1989.

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

GARRETT, S.D.; LEE, H.A.; FRIAR, P.M.K.; MORGAN, M.R.A. Validation of novel estrogen receptor-based microtitration plate assay for the determination of phytoestrogens in soy-based foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.4106-4111, 1999 (Citado por Merken e Beecher, 2000).

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.1, p.86-93, jan.-abr., 2001.

GERARDI, C.; BLANDO, F.; SANTINO, A.; ZACHEO, G. Purification and characterization of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. **Plant Science** v.160, p.795-805, 2001.

GOODMAN-GRUEN, D.; KRITZ-SILVERSTEIN, D. Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. **Journal of Nutrition**, v.131, p.1202-1206, 2001.

GOYAL, K.; SELVAKUMAR, P.; HAYASHI, K. Characterization of a thermostable β -glucosidase (BglB) from *Thermotoga maritime* showing transglycosylation activity. **Journal of Molecular Catalysis, B: Enzymatic** v.15, p.45-53, 2001.

GRÄBNITZ, F.; STAUDENBAUER, W.L. Characterization of 2 beta-glucosidase genes from *Clostridium thermocellum*. **Biotechnology Letters**, v.10, n.2, p.73-78, Feb.1988.

GRAHAM, T.L. A rapid, high-resolution high performance liquid chromatography profiling procedure for plant and microbial aromatic secondary metabolites, **Plant Physiology**, v.95, p.584-593, 1991(Citado por Merken e Beecher, 2000).

GRIFFITH, A.P.; COLLISON, M.W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.913, p.397-413, 2001.

GYÖRGY, P.; MURATA, K.; IKEHARA, H. Antioxidants isolated from fermented soybeans (Tempeh), **Nature**, v.203, p.870, 1964

HA, E.Y.W.; MORR, C.V.; SEO, A.; Isoflavone aglucones and volatile organic compounds in soybeans. Effects of soaking treatments. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.2, p.414-417,1992.

HAMMERSCHMIDT, P.A.; PRATT, D.E.; Phenolic antioxidants of dried soybeans, **Journal of Food Science**, v.43, p.556-559, 1978.

HARBORNE, J.R.B.; WILLIAMS, C.A. Review: Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

HARTMANN-SCHREIER, J.; SCHREIER, P. Purification and partial characterization of β -glucosidase from papaya fruit, **Phytochemistry**, v.25, n.10, p.2271-2274, 1986.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p.422-427, 1972.

HEINONEN, S.; WÄHÄLÄ, K.; ADLERCREUT, H. Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds, **Analytical Biochemistry**, v.274, p.211-219, 1999.

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

HO, S.C.; WOO, J.L.F.; LEUNG, S.S.F.; SHAM, A.L.K.; LAM, T.H.; JANUS, E.D.; Intake of soy products is associated with better plasma lipid profiles in the Hong Kong Chinese population, **Journal of Nutrition**, v.130, p.2590-2593, 2000.

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

HOWES, J.B.; SULLIVAN, D.; LAI, N.; NESTEL, P.; POMEROY, S.; WEST, L.; EDEN, J.A.; HOWES, L.G. The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on the lipoprotein profiles of post menopausal women with mild to moderate hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis**, v.152, p.143-147, 2000.

HSIEH, M.C.; GRAHAM, T.L. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates, **Phytochemistry**, v.58, p.995-1005, 2001.

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

HUR, H.; LAY-JR, J.O.; BEGER, R.D.; FREEEMAN, J.P.; RAFII, F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiology*, v.174, p.422-428, 2000.

HUTABARAT, L.S.; MULHOLLAND, M.; GREENFIELD, H. Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soya bean. **Journal of Chromatography A**, v.795, p.377-382, 1998.

HUTABARAT, L.S.; GREENFIELD, H.; MULHOLLAND, M. Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybeans products from Australia and Indonesia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.43-58, 2001.

HUTCHINS, A.M.; SLAVIN, JL; LAMPE, JW.; Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. **Journal American Diet Association**. v.95, p.545-551, 1995.

IKEDA, R.; OHTA, N.; WATANABE, T.; Changes of isoflavones at various stages of fermentation in defatted soybeans, **Journal Japanese Society of Food Science and Technology - Nippon Shokuhin**, v.42, n.5, p.322-327, 1995.

ITOH-NASHIDA T., HIRAIWA M., UDA Y. Purification and properties of β -D-glucosidase (linamarase) from the butter bean, *Phaseolus lunatus*. **Journal of Biochemistry**, v.101, p.847-854, 1987.

IZUMI, T.; PISKULA, M.K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **Journal of Nutrition**, v.130, p.1695-1699, 2000.

KERCKHOFFS, D.A.J.M.; BROUNS, F.; HORNSTRA, G.; MENSINK, R.P. Effects on the human serum lipoprotein profile of β -glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. **Journal of Nutrition**, v.132, p.2494-2505, 2002.

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

KING, R.A.; BROADBENT, J.L.; HEAD, R.J.; Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. **Journal of Nutrition**, v.126, p.176-182, 1996.

KING, R.A.; Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.68 (suppl.), p.1496S-1499S, 1998.

KINOSHITA, E.; OZAWA, Y.; AISHIMA, T. Novel tartaric acid isoflavone derivatives that play key roles in differentiating Japanese soy sauces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.3753-3759, 1997 (Citado por Merken e Beecher, 2000).

KIYOSAWA, I.; MATSUYAMA, J.; ARAI, C.; SETOGUCHI, T.; Suppressive effects of the methanol extracts from soybean products on SOS response of *Salmonella typhimurium* induced by mutagens and their contents of isoflavones, **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v.42, n.10, p.835-842, 1995.

KOMM, B.S.; TEPENING, C.M.; BENZ, D.J. et al. Estrogen binding, receptor mRNA, and biological response in osteoblast-like osteocarcinoma cells, **Science**, v.241, p.81-84, 1988 (Citado por Setchell, 1998).

KONNO, H.; YAMASAKI, Y.; KATOH, K. A β -glucosidase associated with cell walls from cell suspension cultures of carrot, **Phytochemistry**, v.43, n.6, p.1157-1161, 1996.

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; AMBROSANO, G.M.B.; MURATA, R.M.; YATSUDA, R.; IKEGAMI, M.; ALENCAR, S.M.; PARK, Y.K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Current Microbiology**, v.41, n.3, p.192-196, 2000.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agriculture, Biology and Chemistry**. v.55, n.9, p.2227-2233, 1991.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.15, p.685-689, 1970.

LECAS, M.; GUNATA, Z.Y.; SAPIS, J.C.; BAYONOVE, C.L. Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape, **Phytochemistry**, v.30, n.2, p.451-454, 1991.

LICHTENSTEIN, A.H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1589-1592, 1998.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.C.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S.A. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. **Analytical Biochemistry**, v.264, p.1-7, 1998.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S.A.; Daidzein and genistein content of vegetables. **British Journal of Nutrition**, v.84, p.717-725, 2000a.

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

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

LYMAR, E.S.; LI, B.; RENGANATHAN, V. Purification and characterization of a cellulose-binding β -glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.8, p.2976-2980, aug. 1995.

MACKIE, **Hilgardia**, v.15, p.1 – 29, 1943 (Citado por Vieira, 1989).

MATSUDA, S.; MIYAZAKI, T.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA, N.; UEDA, S. Hydrolysis of isoflavones in soybean cooked syrup by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* IFO 3425. **Journal of Fermentation Bioengineering**. v.74, n.5, p.301-304, 1992.

MATSUDA, S.; NORIMOTO, F.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R., TERAMOTO, Y.; OHTA, N.; UEDA, S. Solubilization of a novel isoflavone glycoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v.77, n.4, p.439-441, 1994.

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

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

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

MAZUR, W.M.; DUKE, J.A.; WÄHÄLÄ, K.; RASKU, S.; ADLERCREUTZ, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **Nutritional Biochemistry**, v.9, p.193-200, 1998.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n.3, p. 577-599, 2000.

MESSINA, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European Journal of Cancer**, v. 36, p-S71-S77, 2000.

MIYAZAWA, M.; SAKANO, K.; NAKAMURA, S.; KOSAKA, H.; Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1346-1349,1999.

MURPHY, P.A. Phytoestrogen content of processed soybean products. **Food Technology**, v.36, n.1, p.60-64, 1982.

MURPHY, P.A.; SONG, T.; BUSEMAN, G.; BARUA, K. Isoflavones in soy-based infant formulas. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v.45, p.4635-4638, 1997.

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

NAIM, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; BIRK, Y.; BONDI, A. Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.22, n.5, p.806-810, 1974.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; BONDI, A.; BIRK,Y. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.24, n.6, p.1174-1177, 1976.

OHTA, A.; NAKATSUGI, S.; WATANABE, K.; KAWAMORI, T.; ISHIKAWA, F.; MOROTOMI, M.; SUGIE, S.; TODA, T.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. inhibitory effects of *Bifidobacterium*-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial contribution of its component isoflavones, **Carcinogenesis**, v.21, n.5, p.937-941, 2000.

OHTA, A.; UEHARA, M.; SAKAI, K.; TAKASAKI, M.; ADLERCREUTZ, H.; MOROHASHI, T.; ISHIMI, Y. A combination of dietary fructooligosaccharides and isoflavone conjugates increases femoral bone mineral density and equol production in ovariectomized mice, **Journal of Nutrition**, v.132, p.2048-2054, 2002.

ONOZAWA, M.; FUKUDA, K.; OHTANI, M.; AKAZA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line. **Journal of Clinical Oncology**, v.28, p.360-363, 1998.

PANDJAITAN, N.; HETTIARACHCHY, N.; JU, Z.Y. Enrichment of genistein in soy protein concentrate with β -glucosidase. **Journal of Food Science**, v.65, n.3, p.403-407, 2000a.

PANDJAITAN, N.; HETTIARACHCHY, N.; JU, Z.Y.; CRANDALL, P.; SNELLER, C.; DOMBEK, D. Enrichment of genistein in soy protein concentrate with hydrocolloids and β -glucosidase. **Food Chemistry and Toxicology**, v.65, n.4, p.591-595, 2000b.

PANDJAITAN, N.; HETTIARACHCHY, N.; JU, Z.Y. CRANDALL, P.; SNELLER, C.; DOMBEK, D. Evaluation of genistin and genistein contents in soybean varieties and soy protein concentrate prepared with 3 basic methods. **Journal Chemistry and Toxicology**, v.65, n.3, p.399-402, 2000c.

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

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; NERY, I.A.; AGUIAR, C.L.; SATO, H.H.; Extraction of isoflavones from defatted soy flour by ethanol and conversion of glucoside isoflavones to aglycones by fungal β -glucosidase, **In: IFT Annual Meeting**, 2001, new Orleans, Anais. New Orleans: IFT, 2001b. p.164.

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

PETERSON, G.; BARNES, S.; Genistein and Biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer-cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. **The Prostate**, New York, v.22, p.335-345,1993.

PETERSON, J.; DWYER, J. An informatics approach to flavonoid database development. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, p.441-454, 2000.

PERSKY, V.; HORN, L.V.; Epidemiology of soy and câncer: perspectives and directions. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, p.709S-712S, 1995.

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

PÍSLEWSKA, M.; BEDNAREK, P.; STOBIECKI, M.; ZIELÍNSKA, M.; WOJTASZEK, P. Cell wall-associated isoflavonoids and β -glucosidase activity in *Lupinus albus* plants responding to environmental stimuli. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.29-40, 2002.

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

POTTER, S.M.; BAUM, J.A.; TENG, H.; STILLMAN, R.J.; SHAY, N.F.; ERDMAN, J.W.JR. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.1375S-1379S, 1998 (Citado por Kerckhoffs et al., 2002).

POWELL, E.E.; KROON, P.A. Low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in human mononuclear leukocytes is regulated coordinately and parallels gene expression in human liver,

Journal Clinical Investigation, v.93, p.2168-2174, 1994 (Citado por Kerckhoffs et al., 2002).

PRATT, D.E.; BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products, **Journal of Food Science**, v.44, p.1720-1722, 1979.

RAPPER, K.B.; FENNELL, D.I., **The genus *Aspergillus***, Ed. Williams and Wilkins Company, Baltimore, MD, 1965.

RICHELLE, M.; PRIDMORE-MERTEN, S.; BODENSTAB, S.; ENSLEN, M.; OFFORD, E.A. Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by β -glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women, **Journal of Nutrition**, v.132, p.2587-2592, 2002.

SANDERS, T.A.B.; DEAN, T.S.; GRAINGER D.; MILLER, G.J.; WISEMAN, H. moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extracted soy protein increase HDL but do not influence transforming growth factor β_1 concentrations and hemostatic risk factors for coronary heart disease in healthy subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.373-377, 2002.

SATTERFIELD, M.; BLACK, D.M.; BRODBELT, J.S. Detection of the isoflavone aglycones genistein and daidzein in urine using solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.759, p.33-41, 2001.

SCHWEIGERER, L.; CHRISTELEIT, K.; FLEISCHMANN, G.; ADLERCREUTZ, H.; WAHALA, K.; HASE, T.; SCHWAB, M.; LUDWIG, R.; FOTSIS, T.; Identification in human urine of a natural growth inhibitor for cells derived from solid pediatric tumours. **European Journal Clinical Investigation**, Osney Mead, v.22, p.260-264, 1992.

SETCHELL, K.D.R.; Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.68 (suppl.), p.1333S-1346S, 1998.

SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B.E.; BRASHEAR, W.T.; KIRSCHNER, A.S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J.E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements, **Journal of Nutrition**, v.131, p.1362S-1375S, 2001.

SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W.T.; WOLFE, B.E.; KIRSCHNER, A.S.; HEUBI, J.E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.447-453, 2002.

SILVA, R.; **Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de Humicol sp 179-5 e aplicação destas enzimas**, Campinas – SP,

1992. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, R.; YIM, D.K.; PARK, Y.K. Application of thermostable xylanases from *Hemicola sp* for pulp improvement. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.77, n.1, p.109-111, 1994.

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

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R.N.; GRECO, E.; MANENTI, I.; PIFFERI, P.G. A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilized by inclusion in chitosan gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.80-89, 2002.

STEELLE, V.E.; PEREIRA, M.A.; SIGMAN, C.C.; KELLOFF, G.J. Cancer chemopreventive agent development strategies for genistein. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, p.713S-716S, 1995.

SUE, M.; ISHIHARA, A.; IWAMURA, H. Purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside β -glucosidase from wheat (*Triticum aestivum L.*) seedlings, **Planta**, v.210, n.3, p.432-438, 2000.

TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; MASAKI, H.; UOZUMI, T.; Purification and characterization of cellulases from *Humicola grisea*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.60, n.1, p.77-82, 1996.

TAKATSUKA, N.; NAGATA, C.; KURISU, Y.; INABA, S.; KAWAKAMI, N.; SHIMIZU, H. Hypocholesterolemic effect of soymilk supplementation with usual diet in premenopausal normolipidemic Japanese women. **Preventive Medicine**, v.31, p.308-314, 2000.

TEIXEIRA, S.R.; POTTER, S.M.; WEIGEL, R.; HANNUM, S.; ERDMAN, J.W.JR.; HASLER, C.M. Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 weeks on blood lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.1077-1084, 2000.

TRAON-MASSON, M.P.; PELLERIN, P. Purification and characterization of two β -glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.374-382, 1998.

TSUNODA, N.; POMEROY, S.; NESTEL, P. Absorption in humans of isoflavones from soy and red clover is similar. **Journal of Nutrition**, v.132, p.2199-2201, 2002.

UEHARA, M.; OHTA, A.; SAKAI, K.; SUZUKI, K.; WATANABE, S.; ADLERCREUTZ, H. Dietary fructooligosaccharides modify intestinal bioavailability of a single dose of genistina and daidzeína and affect their urinary

excretion and kinetics in blood of rats. **Journal of Nutrition**, v.131, p.787-795, 2001.

UESUGI, T.; FUKUI, Y.; YAMORI, Y. Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal Japanese women: a four-week study. **Journal of the American College of Nutrition**, v.21, n.2, p.97-102, 2002.

USDA (Departamento de Agricultura do Estados Unidos), Disponível em: http://www.rcwconsultores.com.br/radarsoja/soj_ban_2A04.htm. Out. 2001. Acesso em: 10 Out. 2002.

VIEIRA, C.; **Cultura do feijão**, Viçosa, 1978 (Citado por Vieira, 1989).

VIEIRA, R.F.; Comparação entre o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e outros feijões dos gêneros *Phaseolus* e *Vigna*, Viçosa, Junho 1989.

VINES, G.; **Cancer. Is soya the solution?** London, New Scientist, v.143, n.1933, p.14-15,1994.

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

YAMAKOSHI, J.; PISKULA, M.K.; IZUMI, T.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA,

S.; OBATA, A.; KIKUCHI, M. Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. **Journal of Nutrition**, v.130, p.1887-1893, 2000.

WANG, H.; KUAN, S.S.; FRANCIS, O.J.; WARE, G.M.; CARMAN, A.S. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.185-190, 1990 (Citado por Merken e Beecher, 2000).

WANG , H.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1666-1673, 1994.

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

WANG, H.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.2377-2383, 1996.

WARD, O.P.; **Fermentation Biotechnology**, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1989.

WASHBURN, S.; BURKE, G.L.; MORGAN, T; ANTHONY, M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. **Menopause**, v.6, p.7-13, 1999 (Citado por Kerckhoffs et al., 2002).

WILLIAMS, J.P.; JORDAN, S.E.; BARNES, S.; BLAIR, H.C. Tyrosine kinase effects on avian osteoclastic acid transport, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.68 (suppl), p.1369S-1374S, 1998.

ZHANG, Y.; WANG, G-J.; SONG, T.T.; MURPHY, P.A.; HENDRICH, S. Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. **Journal of Nutrition**, v.129, p.957-962, 1999.