UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Aproveitamento do farelo de soja no desenvolvimento de meios e processos para a obtenção de produtos proteicos e derivados

Flávia de Faria Caetano

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

*Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas no dia 11 / 05 / 2012. A versão original encontra-se disponível na

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Aproveitamento do farelo de soja no desenvolvimento de meios e processos para a

obtenção de produtos proteicos e derivados

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos

e Cosméticos

Orientado(a): Flávia de Faria Caetano

Orientador(a): Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Caetano, Flávia de Faria

Aproveitamento do farelo de soja no desenvolvimento de meios e processos para a obtenção de produtos proteicos e derivados. Ribeirão Preto, 2012.

165 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Freitas, Osvaldo de.

1. Soja. 2. Hidrolisado 3. Complexo metálico. 4. Viabilidade econômica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávia de Faria Caetano Aproveitamento do farelo de soja no desenvolvimento de meios e processos para a obtenção de produtos proteicos e derivados. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos. Orientador (a): Prof. Dr. Osvaldo de Freitas Aprovado em: Banca Examinadora Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Assinatura:____ Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Assinatura: Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Assinatura: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Carlos Alberto e Fátima, que me apoiaram ao longo de toda minha trajetória e são minha fonte de inspiração. Aos meus irmãos Ciro, Carlos Moisés e César Vicente, por me ensinarem a dividir e a compartilhar.

Ao Rafael, meu amor, pelo carinho e dedicação. Por me ajudar, me apoiar e sempre estar ao meu lado.



por cuidar de mim e firmar meus passos.

Por mostrar o caminho quando tudo parecia perdido.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Osvaldo por toda a amizade e orientação ao longo desses anos. Ensinando com muito carinho, dedicação e paciência. Mostrando que a pesquisa é um complemento da minha vida.

À toda a minha família, por todo o apoio e carinho ao longo desses anos.

Aos amigos da graduação Rafael, Marcela, Marina, Vânia e Rosiane por todo carinho e companheirismo ao longo desses anos.

Às amigas Daina, Drielli e Franciana por me mostrarem que determinação e coragem são o princípio de tudo.

À Mônica pelos longos anos de amizade sincera e por ter me ensinado e ajudado a dar os meus primeiros passos na pesquisa.

À Katyana por toda a amizade, incentivo e ajuda. Por ter me ensinado a ter paciência e a superar as dificuldades.

Às amiga Nathalie, Iahel e Kariane pelos bons momentos com muitas risadas e solidariedade.

Ao José Maria, pela ajuda, boas conversas e cantorias.

Aos colegas de laboratório Roberto, Renê, Thaís, Patrícia e Cláudia pelo bom convívio, boas conversas e risadas.

Às colegas Camila, Cristiane, Maria Paula, Andréa, Mariana (Japa), Mariana (Joelma), Camila Cobayashi.

Ao Rodrigo por toda a ajuda, paciência e pela fundamental colaboração com esse trabalho.

Aos técnicos José Orestes, Jabor, Joana D'Arc, Aurea, Flávia e Maíra por toda a ajuda e colaboração fundamental para a execução desse trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação, especialmente à Eleni e Rosana, por toda a ajuda e paciência.

A todos os funcionários da FCFRP, especialmente ao Sr. Antônio (portaria) e José Luiz (Zé pedreiro), pelas boas palavras e pelo simples *bom dia* que tornaram cada dia mais fácil de ser enfrentado.

À Clarisse Izumi e Hélen por toda a colaboração.

A todos os meus professores que contribuíram para a minha formação e para que esse sonho concretizasse.

À Cooperativa dos Agricultores da Região de Orlândia (CAROL) pela doação do farelo de soja.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que se não veem.

Hebreus 11:1

RESUMO

CAETANO, F.F. Aproveitamento do farelo de soja no desenvolvimento de meios e processos para a obtenção de produtos proteicos e derivados. 2012. 165f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A soja é uma leguminosa amplamente cultivada mundialmente, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial. Seu alto conteúdo proteico e baixo custo são fatores potenciais para o desenvolvimento de produtos tendo como base o isolado proteico de soja ou seus derivados. Neste sentido, a partir do farelo de soja (após extração do óleo) e métodos convencionais de extração foi obtido o concentrado proteico, substrato para o desenvolvimento de hidrolisados enzimáticos parciais de proteína. Para tanto, foram avaliadas endopeptidases (Neutrase® 0,8L, Alcalase® 2,4L e papaína) e exopeptidase (Flavourzyme® 1000L). A partir do hidrolisado foram preparados complexos/quelatos de metal-peptídeo. Em cada etapa foi avaliada a viabilidade econômica do produto gerado. A condição de extração proteica que proporcionou o melhor resultado foi a relação sólido/solvente de 1:30 (m/v), pH 9,0 ajustado com NaOH 4,0 M, com tempo de extração de 45 minutos, seguido de filtração e ajuste do pH para 4,5 com HCl 2,0 M para a precipitação de proteínas. Nestas condições foi obtido rendimento aproximado de 68,6 % de extrato com teor proteico de 84 %. O processo de hidrólise que proporcionou melhor perfil de peptídeos foi obtido com a Alcalase® 2,4L, cuja relação proteína/enzima foi de 7,5 mg:10 μL, com tempo de incubação de 30 minutos em solução de tampão fosfato de sódio 30 mM a 55 °C. Porém, não foi possível a secagem do hidrolisado devido ao teor de glicerol oriundo da enzima. Este inconveniente foi superado com a purificação parcial da mistura enzimática em coluna de Sephadex G25, eluída com tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0), obtendo assim o concentrado enzimático sem prejuízo para a atividade da enzima. O hidrolisado assim obtido representa a proteína em seu conteúdo de aminoácido tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Na preparação dos complexos metálicos de cobre, ferro, zinco e manganês, o ponto de equivalência metal/ligante foi determinado com a utilização de métodos eletroquímicos (voltametria cíclica ou titulação potenciométrica) e a quantificação do metal por absorção atômica revelou uma quantidade de metal ligado de 15,19; 5,55; 3,13 e 2,94 % de manganês, ferro, cobre e zinco respectivamente. A análise econômica mostrou a viabilidade para a produção de complexo de zinco, porém não se descartou a viabilidade dos outros produtos mediante ao ajuste da escala produtiva.

Palavras-chave: soja; hidrolisado; complexos metálicos; viabilidade econômica.

ABSTRACT

CAETANO, F.F. Utilization of soybean meal in the development of means and processes for obtaining protein and derived products. 2012. 165f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The soybean is a legume widely cultivated worldwide, with Brazil being the second largest world producer. Its high protein content and low cost are potential factors for the development of products based on isolated soybean protein or its derived products. In this way, from the soybean meal (after oil extraction) and conventional extraction methods, the protein concentrate was obtained, which is a substrate for the development of partial hydrolysates of protein. For this, were evaluated endopeptidases (Neutrase® 0.8L, Alcalase® 2.4L and papain) and a exopeptidase (Flavourzyme® 1000L). From the hydrolysate were prepared metal-peptide complexes / chelates. At each stage were evaluated the economic feasibility of the generated product. The protein extraction condition which provided the best result was the relationship solid/solvent 1:30 (w/v), pH 9.0 adjusted with 4.0 M NaOH, with extraction time of 45 minutes, followed by filtration and pH adjustment to 4.5 with 2.0 M HCl for proteins precipitation. In these conditions was obtained an income of about 68.6 % of extract with 84% of protein content. The hydrolysis process which provided the best peptides profile was obtained with Alcalase® 2.4L, whose ratio of protein / enzyme was 7.5 mg:10 µL, with incubation time of 30 minutes in a buffer solution of sodium phosphate 30 mM at 55 ° C. However, the drying of the hydrolyzed was not possible due to the glycerol content coming from the enzyme. This drawback was overcome by partial purification of the enzyme mixture on a column of Sephadex G25, eluted with sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0), thus obtaining the enzymatic concentrate without any loss to the enzyme activity. The thus obtained hydrolysate represents the protein in its amino acid content qualitatively and quantitatively. In the preparation of metal complexes of copper, iron, zinc and manganese, the equivalence point metal / ligand was determined using electrochemical methods (cyclic voltammetry or potentiometric titration) and metal quantification by atomic absorption revealed an amount of bounded metal of the 15.19; 5.55; 3.13 e 2.94 % of manganese, iron, copper and zinc respectively. The economic analysis showed the feasibility for the production of zinc complex, but not dismissed the feasibility of using the other products adjusting the scale of production.

Key words: soy; hydrolysate; metal complexes; economic feasibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de <i>extração padrão</i> (Adaptado de L'Hocine, Boye e Arcand (2006))
Figura 2. Representação esquemática do processo com <i>precipitação a quente</i> (Adaptado de L'Hocine, Boye e Arcand (2006))
Figura 3. Representação esquemática do processo de extração com <i>pré-tratamento ácido</i> (Adaptado de L'Hocine, Boye e Arcand (2006))
Figura 4. Disposição dos hidrolisados de soja no gel de eletroforese produzidos nos crescentes tempos de hidrólise.
Figura 5. Reação de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC)
Figura 6. Exemplo dos resultados aleatórios gerados pela Simulação de Monte Carlo para o cálculo da viabilidade econômica do projeto
Figura 7. Fluxos de caixa obtidos para cada período e determinação do VPL50
Figura 8. Distribuição do tamanho de partículas do farelo de soja
Figura 9. Representação esquemática da formação de canalículos na torta durante o processo de filtração (adaptado de Prista, Alves e Morgado (1975))
Figura 10. Curva analítica de tirosina em tampão fosfato 30 mmol/L (pH 7,5) (λ = 280nm). 70
Figura 11. Perfil de hidrólise da proteína de soja com Alcalase® 2,4L com base na absorvância do sobrenadante
Figura 12. Perfil de hidrólise da proteína de soja com Neutrase® 0,8L: com base na absorvância do sobrenadante
Figura 13. Perfil de hidrólise da proteína de soja com Flavourzyme® 1000L: com base na absorvância do sobrenadante
Figura 14. Atividade enzimática da enzima Alcalase® 2,4L
Figura 15. Atividade enzimática da enzima Neutrase® 0,8L
Figura 16. Atividade enzimática da enzima Flavourzyme® 1000L74
Figura 17. Atividade enzimática das Alcalase® 2,4L (líquida) e 1,5 MG (sólida), nas proporções 1:100 e 1:200
Figura 18. Esquematização simplificada do mecanismo de ação de enzimas do tipo endo e exopeptidases (adaptado de DMS, (2009))
Figura 19. Perfil de eluição dos padrões utilizados na calibração da coluna Superdex TM Peptide 10/300 GL, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%
Figura 20. Perfil de eluição da proteína integral e padrões, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%
Figura 21. Perfil de eluição dos hidrolisados preparados com Alcalase® 2,4L, para reação de hidrólise nos tempos de 30 e 60 minutos, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0.1%

Figura 22. Perfil de eluição dos hidrolisados com Neutrase® 0,8L, para reação de hidrólise nos tempos de 30 e 60 minutos, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%
Figura 23. Perfil de eluição dos peptídeos produzidos com adições subsequentes de Alcalase® 2,4L, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%83
Figura 24. Perfil de eluição dos peptídeos produzidos com adições subseqüentes de Neutrase® 0,8L, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%
Figura 25. Perfil de eluição dos peptídeos resultantes da combinação das enzimas Alcalase® 2,4L e papaína, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%
Figura 26. Perfil de eluição dos peptídeos resultantes da combinação das enzimas Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.
Figura 27. Comparação do perfil de eluição da proteína integral, padrões e Alcalase® 2,4L com 30 minutos de reação, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.
Figura 28. Proteína hidrolisada com Alcalase® 2,4L, fração solúvel (A) e fração insolúvel (B). Sendo da esquerda para a direita: proteína integral, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de hidrólise
Figura 29. Proteína hidrolisada com Neutrase® 0,8L, fração solúvel (A) e fração insolúvel (B). Sendo da esquerda para a direita: proteína integral, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de hidrólise
Figura 30. Perfil de eluição da Alcalase® 2,4L em Sephadex G-25 com eluição isocrática e fase móvel constituída por tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0).e determinação da atividade enzimática (determinação do <i>poo</i> l enzimático)
Figura 31. Esquema básico de um voltamograma cíclico, adaptado de Brett e Brett (1996b). 96
Figura 32. Voltamograma obtido para a determinação do ponto de equivalência de ferro com hidrolisado de proteína de soja
Figura 33. Voltamograma obtido para a determinação do ponto de equivalência de zinco com hidrolisado de proteína de soja
Figura 34. Voltamograma obtido para a determinação do ponto de equivalência de manganês com hidrolisado de proteína de soja
Figura 35: Titulação potenciométrica para a determinação do ponto de equivalência do cobre em relação ao hidrolisado de proteína de soja
Figura 36. Distribuição energética dos orbitais <i>d</i> em um campo cristalino octaédrico, adaptado de Atkins et al. (2006)
Figura 37. Espectro de absorção na região UV-visível para o hidrolisado, complexo de cobre e Cloreto de Cobre
Figura 38. Espectro de absorção na região UV-visível para o hidrolisado, complexo de ferro e Cloreto de Ferro
Figura 39. Espectro de absorção na região UV-visível para o hidrolisado, complexo de manganês e Cloreto de Manganês

Figura 40. Espectro de absorção na região UV-visível para o hidrolisado, complexo de zinco e Cloreto de Zinco106
Figura 41. Esquematização do processo produtivo e da distribuição dos equipamentos para produção de proteína de soja (Etapa 1), hidrolisado proteico (Etapa 2) e complexo peptídeomineral (Etapa 3)
Figura 42. Distribuição de frequência cumulativa do VPL para o complexo de zinco118
Figura 43. Distribuição da frequência relativa do VPL para a produção do complexo de zinco

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Volumes utilizados para a reação com enzima na diluição 1:100	27
Tabela 2. Volumes utilizados para a reação com enzima na diluição 1:200	27
Tabela 3. Volumes utilizados para a determinação da atividade enzimática <i>versus</i> tempo a concentração de substrato a 0,75% e diluição enzimática a 1:200.	
Tabela 4. Massa molecular dos padrões utilizados para o ensaio cromatográfico	33
Tabela 5. Gradiente de separação para a eluição dos PTC-aa	40
Tabela 6. Distribuição granulométrica cumulativa do farelo de soja cominuído	54
Tabela 7. Influência da redução do tamanho de partícula na extração da proteína de soja	55
Tabela 8. Influência da temperatura no processo de extração do farelo de soja cominuído	57
Tabela 9. Proteína recuperada após a extração e reextração do farelo de soja cominuído	57
Tabela 10. Efeito da relação farelo/solvente no rendimento extrativo da proteína de soja	59
Tabela 11. Rendimento em massa (g) dos extratos proteicos obtidos a partir de 40g de fa de soja cominuído.	
Tabela 12. Massa (g) de farelo residual da extração proteica	60
Tabela 13. Teor de proteína (%) presente no extrato de soja	62
Tabela 14. Teor de proteína (%) presente no farelo residual da extração proteica	63
Tabela 15. Teor de proteína (%) recuperado em relação à proteína presente no farelo de s	
Tabela 16. Quantidade de proteína (%) remanescente no farelo residual da extração protem relação à proteína presente no farelo de soja	
Tabela 17. Porcentagem de cinza presente nos extratos proteicos	65
Tabela 18. Porcentagem de cinza presente no farelo residual da extração proteica	66
Tabela 19. Porcentagem de umidade presente nos extratos proteicos	67
Tabela 20. Porcentagem de umidade presente no resíduo de farelo residual da extra proteica.	
Tabela 21. Porcentagem de resíduos presentes nos extratos proteicos e farelo residual	68
Tabela 22. Determinação da relação de substrato para enzima na diluição 1:100	69
Tabela 23. Determinação da relação de substrato para enzima na diluição 1:200	69
Tabela 24. Precisão e exatidão para a quantificação da tirosina.	71
Tabela 25. Atividade enzimática específica para a Alcalase® 2,4L nas diferentes etapas processo de purificação parcial	
Tabela 26. Composição em aminoácido do hidrolisado e proteína integral	94
Tabela 27. Tempo de duração e consumo energético de cada etapa	.111
Tabela 28. Custo mensal e anual de matéria-prima	.113
Tabela 29: Custo de mão de obra direta	114

Tabela 30. Correlação simples (Pearson) das variáveis de margem de contribuição (2,	3 e
total) com o VPL.	.120
,	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIOVE Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais

ANEEL Agência Nacional de Energia Elétrica

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AUFS Absorbance Units Full Scale

BCB Banco Central do Brasil

BSA Albumina Sérica Bovina

Ca²⁺ Íon Cálcio

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento

CRF-SP Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo

CuCl₂ Cloreto de Cobre II

DNA Ácido Desoxirribonucléico

DTT Ditiotreitol

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

Fe³⁺ Íon Ferro

FeCl₃ Cloreto de Ferro III

FPLC Fast Protein Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida Rápida de

Proteínas)

HCl Ácido Clorídrico

ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Espectrometria de

Massas com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado)

KCl Cloreto de Potássio

KW Kilo Watts

LDL Lipoproteína de baixa densidade

MC Método de Simulação de Monte Carlo

MnCl₂ Cloreto de Manganês II

NaOH Hidróxido de Sódio

pH Potencial Hidrogeniônico

PITC Fenilisotiocianato

PTC-aa Feniltiocarbamil-aminoácidos

RNA Ácido Ribonucléico

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

TCA Ácido TricloroacéticoTFA Ácido Trifluoroacético

UNICEF The United Nations Children's Fund (Fundo das Nações Unidas para a

Infância)

USDA United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura do

Estados Unidos)

VPL Valor Presente Líquido

ZnCl₂ Cloreto de Zinco II

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\mathbf{C}$	Graus Celsius
®	Marca Registrada
λ	Comprimento de Onda
Σ	Somatório

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELASLISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
LISTA DE SÍMBOLOS	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Soja	5
1.1.1. Proteína de soja	
1.2. Hidrolisados proteicos e complexos	
1.2.1. Metais de interesse nutricional	
1.2.1.1. Cobre	
1.2.1.2. Ferro	
1.2.1.3. Manganês	
1.2.1.4. Zinco	
2. OBJETIVOS	15
	1.
2.1. Objetivo Geral	
2.2. Objetivos Específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Material	18
3.2. Métodos	19
3.2.1. Redução do tamanho de partícula do farelo de soja	19
3.2.2. Determinação da distribuição do tamanho de partícula do farelo de soja	19
3.2.3. Variáveis do processo extrativo	20
3.2.4. Otimização do método extrativo	21
3.2.5. Caracterização dos extratos proteicos e dos resíduos obtidos pós-extração	25
3.2.5.1. Determinação do teor de proteínas (método de Kjeldahl)	25
3.2.5.2. Determinação de cinza	25
3.2.5.3. Determinação da umidade das amostras	25

3.2.5.4. Determinação de carboidratos e outros componentes	26
3.2.6. Ensaios enzimáticos	26
3.2.6.1. Determinação da relação enzima/substrato	26
3.2.6.2. Atividade enzimática	28
3.2.6.2.1. Validação do método de quantificação da tirosina	28
3.2.6.2.2. Determinação da atividade enzimática versus tempo	29
3.2.6.3. Caracterização dos hidrolisados	30
3.2.6.3.1. Preparação dos hidrolisados proteicos	31
3.2.6.3.1.1. Variação do tempo de incubação	31
3.2.6.3.1.2. Combinações variadas de enzimas	31
3.2.6.3.1.3. Adições subsequentes de enzimas	32
3.2.6.3.2. Distribuição do tamanho dos peptídeos	32
3.2.6.4. Quantificação do teor de nitrogênio presente nas frações solúveis e insolúveis do hidrolisado proteico	
3.2.6.5. Eletroforese dos peptídeos derivados da proteína de soja	34
3.2.7. Purificação parcial da enzima Alcalase® 2,4L	35
3.2.7.1. Comparação da atividade enzimática específica da enzima Alcalase® 2,4L nas e de purificação parcial	tapas
3.2.7.1.1. Determinação da atividade enzimática da Alcalase® 2,4L para cada etapa do processo de purificação parcial	36
3.2.8. Preparação do hidrolisado proteico	37
3.2.9.1. Derivação	39
3.2.9.2. Separação dos PTC-aa	39
3.2.9.3. Quantificação dos PTC-aa	40
3.2.10. Preparação dos complexos/quelatos de peptídeo-metal	40
3.2.11. Avaliação espectroscópica da interação peptídeo de soja com metal	42
3.2.12. Quantificação do metal ligado ao hidrolisado proteico de soja	42
3.2.13. Análise da viabilidade econômica do projeto	43
3.2.13.1. Esquematização do processo produtivo	43
3.2.13.2. Estruturação da análise de viabilidade econômica	44
3.2.13.2.1. Custos do projeto	45
3.2.13.2.1.1. Custo de implantação.	45
3.2.13.2.1.2. Custos fixos	45
3.2.13.2.1.3. Custos diretos e custos variáveis de produção	46
3.2.13.2.2. Levantamento dos valores de mercado dos produtos derivados da soja	47
3.2.13.3. Cálculo da viabilidade econômica	47

3.2.13.3.1. Simulação de Monte Carlo	47
3.2.13.3.2. Determinação do Valor Presente Líquido (VPL)	49
3.2.13.3.3. Determinação da correlação entre as variáveis do processo	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Padronização do tamanho de partícula do farelo de soja	53
4.2. Padronização da temperatura de extração	56
4.3. Avaliação da relação massa de farelo/volume do líquido extrator	58
4.4. Métodos extrativos e teor de proteína	59
4.5. Ensaios enzimáticos.	68
4.5.1. Determinação da relação enzima/substrato	68
4.5.2. Validação do método de quantificação de tirosina	70
4.5.3. Avaliação da atividade enzimática	71
4.5.4. Caracterização dos hidrolisados	78
4.5.4.1. Calibração da coluna	78
4.5.4.2. Avaliação do tempo de hidrólise enzimática	80
4.5.4.3. Comparação de adições subsequentes de enzimas	82
4.5.4.4. Combinações variadas de enzimas	84
4.5.5. Eletroforese dos peptídeos	86
4.5.6. Quantificação do teor de nitrogênio presente nas frações solúveis e insolúveis do hidrolisado proteico	88
4.6. Purificação parcial da Alcalase® 2,4L	89
4.7. Comparação da atividade enzimática específica da enzima Alcalase® 2,4L nas etapas seguintes à purificação parcial e obtenção do hidrolisado de soja seco	
4.8. Composição em aminoácidos	93
4.8. Preparação dos complexos peptídeo-metal	95
4.8.1. Determinação da estequiometria peptídeo/metal	95
4.8.2. Avaliação espectroscópica da interação peptídeo de soja com metal e quantificação o metal ligado ao hidrolisado de proteína de soja	
4.9. Avaliação econômica do projeto	108
4.8.1. Esquematização do processo produtivo	109
4.8.2. Determinação dos custos	112
4.8.2.1. Custos de implantação	112
4.8.2.2. Custos Variáveis de Produção	112
4.8.2.3. Custo fixo de produção	114

5. CONCLUSÕES	122
REFERÊNCIAS	125

1. INTRODUÇÃO

egundo a Declaração sobre Segurança Alimentar Mundial, o acesso a alimentos seguros e com características nutricionais adequadas é um direito de todo indivíduo, entretanto, apesar de atualmente a quantidade de alimentos disponíveis no mundo serem suficientes para suprir toda a população, a incidência da fome e da desnutrição ainda é alarmante, constituindo-se a sua erradicação um desafio mundial (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 1992).

O bem estar nutricional é fundamental para o desenvolvimento da sociedade, a promoção e a proteção da saúde dos indivíduos, para isso é necessário utilizar-se do conhecimento científico, humano e tecnológico que detemos como ferramenta no combate à fome e a desnutrição (FAO, 1992).

A má nutrição e a desnutrição têm sido reconhecidas como um relevante problema de saúde em diversos países, sendo um expressivo fator de mortalidade. Apesar da predominância em países mais pobres, a desnutrição está presente tanto em países em desenvolvimentos quanto em países industrializados, manifestando de diferentes formas e intensidade (FAO, 2010).

Embora a proporção de pessoas famintas no mundo tenha caído na pós-crise econômica, a quantidade de indivíduos que sofrem com a fome ainda é considerada alta. Segundo a estimativa da FAO, em 2010 o número de pessoas desnutridas no mundo foi de 925 milhões (195 milhões são crianças que sofrem de má nutrição crônica) (FAO, 2010). No entanto deve-se enfatizar que a distribuição da população desnutrida ao redor do mundo ocorre de maneira marcadamente desigual, concentrando 80% nos países em desenvolvimento, principalmente aqueles que enfrentam períodos de crise prolongada (guerras e desastres naturais). Dois países se destacam nesse cenário, estes são a Índia e China e juntos respondem por 40% dos casos de desnutrição crônica infantil no mundo (FAO, 2010; UNICEF, 2009)

A desnutrição afeta a sobrevivência, o desenvolvimento, aprendizado, crescimento e produtividade no trabalho, proporcionando impacto marcante no desenvolvimento social e econômico de uma nação. A sobrevivência de crianças e mulheres também pode ser afetada, principalmente durante a gravidez e nos primeiros dois anos de vida. Segundo relatório da UNICEF divulgado em 2009, a desnutrição é responsável por mais de um terço dos casos de morte de crianças no mundo. A alimentação deficiente em nutrientes durante a infância pode acarretar em longo prazo, sérios problemas no desenvolvimento cognitivo, crescimento e

aumentar a predisposição a diversos tipos de doenças. No Brasil, a região do semiárido é uma das mais afetadas pela desnutrição infantil (UNICEF, 2005).

Quando falamos em desnutrição, os idosos merecem atenção especial. A partir da década de 1940 o envelhecimento da população brasileira tem ocorrido em grau acelerado e o avanço da idade, principalmente acima de 65 anos, está associado a um aumento do risco de desnutrição, especialmente devido à deficiência proteico-calórica o que pode elevar a susceptibilidade a infecções, reduzir a chance de sobrevida em caso de internações e aumentar a probabilidade de óbito (OTERO et al., 2002).

Pacientes hospitalizados são mais suscetíveis à desnutrição tendo dentre as suas principais causas vômitos e náuseas, disfunções gastrointestinais, absorção reduzida de macro e micro nutrientes e alimentos não disponíveis ou com baixa qualidade nutricional. Pacientes mal nutridos apresentam complicações e taxas de mortalidade três vezes maior e aumento do tempo de internação quando comparados aos pacientes saudáveis, o que leva ao aumento do custo por paciente em até 50% (SAUNDERS; SMITH; STROUD, 2011).

Muitas doenças relacionadas à má nutrição estão intimamente ligadas à deficiência de minerais, dentre os mais comuns o ferro e iodeto e sendo as crianças e mulheres na idade fértil dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento os grupos com maior carência desses nutrientes (LATHAM et al., 2001).

Diversos nutrientes inorgânicos são de extrema importância na manutenção do equilíbrio bioquímico e fisiológico do organismo, pois atuam diretamente nos sistemas enzimáticos, metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, consolidação óssea, atividade neural e muscular, entre outros. Dentre os principais pode-se citar: ferro, iodo, manganês, selênio, cobalto, cobre, cromo e zinco (SAUNDERS; SMITH; STROUD, 2003; KOZLOWSKI et al., 2009; LOBO; TRAMONTE, 2004).

Apesar da carência de mineral ser marcante nos casos de desnutrição, esta não é o único tipo de carência nutricional que pode ocorrer. Idosos pertencem a um grupo que frequentemente sofrem de carência proteica devido à redução da capacidade de absorção de nutrientes e síntese proteica, o que acarreta na perda de massa muscular denominada como sarcopenia. A redução do apetite, muito comum nessa fase, pode agravar ainda mais essa perda de massa muscular e na maioria das vezes levar à desnutrição (ROUSSET; DROIT-VOLET; BOIRIE, 2006; THALACKER-MERCER et al., 2010).

Atletas também estão sujeitos à carência de proteínas e outros nutrientes, o alto consumo energético diário devido aos treinamentos intensos, requer uma dieta extremamente balanceada, assim não é raro estes serem vítimas de carência de diversos nutriente os quais

são essenciais para um bom desempenho e a manutenção da saúde (GARCIN et al., 2009; MANORE, 1999).

Alguns grupos necessitam de uma suplementação proteica diferenciada, pois são incapazes de ingerir ou digerir o alimento em sua forma convencional, enquanto outros possuem necessidade fisiológica especial devido às alterações metabólicas ou erros inatos do metabolismo, tendo como exemplo os portadores de fenilcetonúria, fibrose cística, doença de Crohn, alergia e intolerância a alguns alimentos. Nestes casos, é recomendada a utilização de hidrolisados parciais de proteína para compor dietas específicas e compatíveis com a limitação fisiológica (CLEMENTE, 2000).

A ingestão de proteína integral, parcialmente hidrolisada ou a infusão de misturas de aminoácidos aumenta a concentração sanguínea de aminoácidos e estimula a síntese proteica. A magnitude do estímulo é dependente da dose administrada e do balanço entre componentes nitrogenados e substratos energéticos não nitrogenados (ANTONIONE et al., 2008; WOLFE, 2006).

Apesar da demonstração da eficácia dos suplementos a base de proteínas isoladas ou parcialmente hidrolisadas, o acesso aos suplementos ainda é limitado devido em parte ao elevado custo. Proteínas utilizadas para estas finalidades devem ter composição em aminoácidos equilibrada (alto valor nutricional) e que atendam as necessidades fisiológicas. Dentre as proteínas mais utilizadas têm-se as derivadas do leite como a caseína, principal proteína do leite e as lactoalbumina e lactoglobulina presentes no soro de leite que são consideradas subproduto da industrialização.

Atualmente grande ênfase tem sido dada à utilização de proteínas de origem vegetal, devido à diversidade, abundância e menor custo, quando comparadas as de origem animal. No entanto, normalmente estas proteínas são pobres em alguns aminoácidos tais como os sulfurados, requerendo portando, que sejam adicionados às formulações à base de proteínas de origem vegetal (CLEMENTE, 2000; GILBERT et al., 2011; GRESSLER et al., 2010).

Entre as fontes vegetais aquela que tem demonstrado maior viabilidade para a obtenção de proteínas isoladas é a soja, devido ao seu alto conteúdo proteico, grande produção mundial e tendo o Brasil como o segundo maior produtor mundial (CAVALETT; ORTEGA, 2009; GIBBS et al., 2004).

1.1. **Soja**

A cultura da soja foi introduzida nas Américas inicialmente nos Estados Unidos, sendo utilizada inicialmente como forrageira e somente a partir de 1941 o enfoque passou a ser voltado para a produção de grãos. No Brasil, a soja, proveniente dos Estados Unidos, foi introduzida em 1882 por Gustavo Dutra (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA), 2002).

De origem chinesa sua utilização remonta a períodos superiores a cinco mil anos, sendo um componente fundamental na dieta dessas antigas civilizações. Apesar de sua origem, a soja atualmente cultivada no Brasil, *Glycine max* (L.) *Merrill*, difere da planta original sendo uma cultura domesticada resultante do cruzamento de espécies selvagens (EMBRAPA, 2002).

No Brasil, a partir de sua introdução em 1882, a soja passou a ser submetida a diversos testes para a adaptação e em 1891 o Instituto Agronômico de Campinas (Estado de São Paulo) passou a estudar a adaptação desta leguminosa nas condições climáticas brasileiras, promovendo a distribuição de sementes para os agricultores paulistas a partir de 1900. Nesse mesmo período começaram a surgir as primeiras culturas de soja no sul do país (Rio Grande do Sul), favorecidas pelas condições climáticas semelhantes às encontradas no sul dos Estados Unidos (EMBRAPA, 2002)

A produção de soja no Brasil começou a ganhar importância em meados de 1940, porém foi na década de 60 que, juntamente com programas de incentivo do governo para a produção de trigo, a soja passou a figurar como uma cultura de importância econômica para o país. Já na década de 70, a soja se consolidou como a principal cultura do agronegócio no Brasil. Com a evolução do cultivo no país observou-se uma expansão da cultura para a região Centro-Oeste, sendo esta atualmente a maior região produtora no país (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB), 2009; EMBRAPA, 2002).

Os Estados Unidos é o maior produtor mundial de soja, dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) mostram que a safra de 2010/2011 foi de aproximadamente 90,61 milhões de toneladas, com exportação de 41,91 milhões de toneladas (USDA, 2011). O Brasil, segundo maior produtor, de acordo com levantamento feito pela CONAB (2011) e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (2011), apresentou uma produção de soja para a safra 2010/2011 recorde e em valores de aproximadamente 74,99 milhões de toneladas com um aumento de aproximadamente 9,2% em relação à safra anterior.

Nesse mesmo período o Brasil exportou cerca de aproximadamente 31,85 milhões de toneladas.

A soja pode ser comercializada em grãos ou com a separação do óleo e do farelo. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2011), as cotações médias alcançadas para os valores de soja no primeiro semestre de 2011, baseadas na bolsa de Chicago, foram de 504; 399 e 1261 US\$/tonelada, para a soja em grãos, farelo e o óleo bruto respectivamente.

O farelo de soja, subproduto da indústria de óleo, hoje utilizado principalmente na fabricação de rações tem grande potencial de ser utilizado como matéria prima para a extração de proteínas, as quais desde que obtidas a baixo custo, podem ser utilizadas como plataforma na obtenção de vários derivados e produtos (ABDALLA et al., 2008).

1.1.1. Proteína de soja

A soja é uma leguminosa rica em proteínas de qualidade nutricional adequada, sua composição pode variar de acordo com as condições climáticas, tipo de solo entre outros fatores. As proteínas presentes nos grãos se encontram armazenadas principalmente no corpo proteico do cotilédone e o farelo de soja sem óleo pode conter até aproximadamente 52% de proteínas (MARTINEZ et al., 2011).

Dentre os principais cultivares do Brasil analisados por Vieira e seus colaboradores (1999), o conteúdo total de aminoácidos essenciais variou de 39,5 a 45 g de aminoácidos/100g de proteína, apresentando de 3,2 a 3,8 g/100g de proteína dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína.

A maior parte da proteína de soja (90%) é constituída por proteínas de armazenamento, principalmente as β-conglicininas e glicininas (70%) que apresentam um coeficiente de sedimentação de 7S e 11S respectivamente (FUKUSHIMA, 2004).

A proteína de soja isolada tem sido aplicada extensivamente na indústria alimentícia para o processamento de carnes, bebidas nutricionais, fórmulas voltadas para crianças e suplementos alimentares (CASTRO et al., 2007; POTTER et al., 2007; TSUMURA et al., 2005).

Além do uso da proteína intacta há uma crescente demanda na utilização de hidrolisados proteicos de soja por apresentarem diversas vantagens tecnológicas muitas vezes desejadas no desenvolvimento de um produto. Além dessas vantagens, os hidrolisados levam

a uma melhora da biodisponibilidade da proteína da soja devido a uma melhor solubilidade e ao alto conteúdo de peptídeos do hidrolisado (TSUMURA et al., 2005; ZIEGLER et al., 1998).

1.2. Hidrolisados proteicos e complexos

O interesse na utilização de hidrolisados proteicos pela indústria alimentícia tem crescido a cada ano. As fontes de proteínas são as mais diversas, tais com a caseína e proteína do soro do leite (BIASUTTI et al., 2008), proteínas de origem vegetal como a soja (SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009), carcaças de frango (SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009) e pescado (SANTOS et al., 2009). As proteínas do leite (caseína e concentrado de proteínas do soro de leite) são as mais utilizadas na preparação de hidrolisados, devido ao alto valor nutricional. Hidrolisado oriundos destas proteínas tem ampla aplicação clínica (FREITAS et al., 1993; SALES et al., 1995).

Hidrolisados de proteínas apresentam diversas vantagens tecnológicas tais como: melhoria na solubilidade quando comparados à proteína integral, melhora das propriedades emulsificantes, estabilidade ao aquecimento, maior resistência à precipitação provocada pela alteração do pH e a presença de íons metálicos, além de poderem apresentar peptídeos com atividade biológica (CLEMENTE, 2000; YUST et al., 2010). Também apresentam várias aplicações industriais, dentre elas em produtos cosméticos e de beleza (SECCHI, 2008), alimentos fortificados, dietas enterais específicas e bebidas energéticas (FITZGERALD; O'CUINN, 2006), meios de cultura (MICHIELS et al., 2011) e fertilizantes (ORDÓÑEZ; BENÍTEZ; GONZÁLEZ, 2008). No entanto, deve-se enfatizar que esses hidrolisados, para serem utilizados na nutrição humana e animal, devem preservar a qualidade nutricional da proteína de origem, apresentar palatabilidade compatível com a via de administração e preço adequado ao seu mercado alvo (CAVE; GUILFORD, 2004; HOU et al., 2011).

Os hidrolisados proteicos têm sido amplamente empregados como suporte nutricional para pessoas que apresentam necessidades nutricionais especiais relacionadas a doenças crônicas que implicam na má absorção proteica ou a restrição a alguns tipos de aminoácidos. Dentre estas doenças podem ser citadas: doença de Crohn (WALKER-SMITH, 1997), fenilcetonúria (CARREIRA et al., 2010), fibrose cística, alergia e intolerância a alimentos (CLEMENTE, 2000; KIM et al., 2007a; LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2005).

Quando consideramos o aspecto nutricional, o hidrolisado proteico apresenta como vantagem a redução do tamanho da proteína a peptídeos e aminoácidos, o que pode facilitar a absorção. Essa facilitação da absorção está fundamentada nos mecanismos de absorção de proteína pelo organismo, que ocorre na forma de aminoácidos livres, di e tri peptídeos. Ao longo dos anos, os mecanismos de absorção/transporte de aminoácidos e peptídeos têm sido amplamente estudados e elucidados facilitando uma abordagem terapêutica mais eficiente (CLEMENTE, 2000).

Os principais mecanismos de transporte dos aminoácidos livres são o transporte passivo por difusão simples dependente do gradiente de concentração e hidrofobicidade dos aminoácidos e o transporte passivo por difusão facilitada e mediada por carreadores. Estes sistemas são saturáveis e susceptíveis a competição entre aminoácidos que apresentam semelhanças estruturais como triptofano, histidina e fenilalanina. Já o transporte de di e tri peptídeos é independente do transporte de aminoácidos livres e ocorre via transporte ativo. São relatados alguns mecanismos de transportes como o cotransporte com íons de hidrogênio e com cátions (ex: Ca²⁺). Após a absorção, os peptídeos são reduzidos a aminoácidos por peptidases citosólicas presentes nos enterócitos. Por fim, deve-se enfatizar que, devido às peculiaridades de cada um dos mecanismos relatados os di e tri peptídeos são mais eficientemente absorvidos quando comparados a uma quantidade equivalente de aminoácidos livres, justificando o uso preferencial de di e tri peptídeos em detrimento a aminoácidos livres principalmente em nutrição enteral (ADIBI, 1976; MATTHEWS, 1972; SILK, 1974; SILK; GRIMBLE; REES, 1985; WEBB; MATTHEWS; DIRIENZO, 1992).

A hidrólise de proteínas pode ser realizada por ação de ácidos, álcalis ou enzimas, sendo que os primeiros trabalhos de hidrólise proteica foram realizados com a utilização de álcalis (ex: hidróxido de sódio e de bário) e ácidos (ex: ácido clorídrico e trifluoroacético). O rendimento dos dois processos é dependente do tipo de álcali ou ácido utilizado, a temperatura e tempo de reação, porém a hidrólise alcalina é considerada mais fácil de ser conduzida do que a ácida devido a todo o aparato necessário para a sua realização. Apesar dos dois processos apresentarem altos rendimentos de hidrólise são grandes as desvantagens, pois resultam em produtos de baixa qualidade, podendo formar substâncias tóxicas tais como lisina-alanina e por fim, no caso da hidrólise alcalina levar a racemização (conversão de aminoácidos levógiros (L) em dextrógiros (D)), conversão de aminoácidos (cisteína em cistina) e até mesmo sua destruição (GRIGGS, 1921; TSUGITA; SCHEFFLER, 1982; WARNER, 1941). Já a hidrólise enzimática normalmente é feita em condições brandas de pH (6-8) e de temperatura (40-60 °C), minimizando a ocorrência de reações indesejáveis de

racemização e destruição dos aminoácidos (CHIANG; SHIH; CHU, 1999; CLEMENTE, 2000; SINHA et al., 2007).

O grau de hidrólise está intimamente ligado à especificidade da enzima e, este altera as propriedades de solubilidade, emulsificante e gelificante. O controle do tamanho dos peptídeos é essencial para o uso do hidrolisado para fins dietéticos (FITZGERALD; O'CUINN, 2006; SINHA et al., 2007).

As primeiras enzimas utilizadas para a hidrólise de proteínas foram as proteases pancreáticas de origem animal, todavia as enzimas de origem vegetal, bacteriana e fúngica tem ganhado cada vez maior importância (GUADIX et al., 2000).

Várias enzimas isoladas ou associadas têm sido utilizadas nos processos de hidrólise de proteínas (SINHA et al., 2007), dentre as quais podemos destacar as enzimas papaína, Alcalase®, Neutrase® e Flavourzyme®.

A papaína é uma enzima de origem vegetal extraída do látex do fruto da *Carica Papaya* L., é uma hidrolase pertencente ao subgrupo das peptidases e cliva principalmente ligações internas da proteína (endopeptidase), preferencialmente aminoácidos que possuem grandes cadeias laterais hidrofóbicas na posição S2 (EXPASY, 2011b). É estável em pH entre 5 e 9 e com temperatura de atividade ótima por volta de 65 °C (RAO et al., 1998). A Alcalase®, endopeptidase de origem bacteriana produzida pelo *Bacillus lichenformis*, também é uma hidrolase do subgrupo das peptidases e apresenta preferência hidrolítica para regiões com resíduos não carregados em S1 (EXPASY, 2011a). Apresenta atividade e estabilidade em pH entre 6 e 10 e temperatura entre 50 e 70 °C. A Flavourzyme®, também conhecida como carboxipeptidase I (MEROPS, 2011), é um complexo de endo e exopeptidase, com maior atividade de exopeptidase, produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae*, apresenta uma atividade ótima nos pHs entre 5 e 7 e temperatura ótima em torno de 50 °C (SANTOS et al., 2009). A Neutrase® é uma endopeptidase produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* que apresenta atividade ótima em temperatura entre 45 e 55 °C e entre pH 5,5 e 7,5 (DAMRONGSAKKUL et al., 2008).

Apesar do amplo uso de proteínas de origem animal para a produção de hidrolisados proteicos (MORATO et al., 2000), a produção de hidrolisados a partir de proteínas de origem vegetal tem crescido sistematicamente. A diversidade e abundância de fontes, aliadas ao menor custo têm sido um grande estímulo para novas descobertas, porém tem como fator limitante a quantidade de alguns aminoácidos essenciais (sulfurados), sendo, portanto necessário, a adição destes em formulações à base de hidrolisados proteicos de origem vegetal (AGUIRRE; GARRO; SAVOY DE GIORI, 2008; CLEMENTE, 2000).

Dentre as proteínas vegetais estudadas, o glúten, proteína proveniente do trigo, foi estudado por Kong, Zhou e Qian (2007). A hidrólise aumentou a solubilidade da proteína e a enzima Alcalase® apresentou um melhor desempenho dando origem aos menores peptídeos (menores que 1355 Da). Já Kamnerdpetch et al (2007) estudaram a batata (*Solanum tuberosum*) como fonte de proteína para a produção de hidrolisado. Considerada como resíduo após a extração do amido, a polpa gerada é rica em proteína (74%), com base nisso, os pesquisadores, combinando as enzimas Alcalase® e Flavourzyme® desenvolveram um hidrolisado que apresentou alto grau de hidrólise (44%) e uma grande quantidade de aminoácidos livres devido à ação da exopeptidase Flavourzyme®.

As proteínas da soja, também tem sido alvo de estudos para a produção de hidrolisados, parte deste interesse é devido à grande produção mundial de soja e às ações benéficas atribuídas à proteína e seus peptídeos, como a redução do colesterol plasmático, alteração da atividade do receptor de LDL em hepatócitos e ação antioxidante (OMONI; ALUKO, 2005). A partir dessa diversidade de benefícios associados a proteína de soja, diversos pesquisadores têm estudado a viabilidade de produção de produtos derivados dessa proteína dentre os quais os hidrolisados têm recebido atenção especial.

A produção de hidrolisado de proteína de soja com o uso de pancreatina foi realizada por Netto e Galeazzi (1998), obtendo um grau de hidrólise de 14,5%. Os autores sugeriram que, devido ao reduzido conteúdo de aminoácidos aromáticos, especialmente fenilalanina, o hidrolisado seria adequado para compor dietas para portadores de fenilcetonúria.

Tsumura (2005) obteve hidrolisado de proteína de soja usando as enzimas papaína e Pepsina, a primeira demonstrou maior afinidade para a digestão de β-conglicinina, já a segunda apresentou maior afinidade pela glicinina. Os dois hidrolisados apresentaram um aumento da solubilidade em pH 4,5 (ponto isoelétrico da proteína de soja) e da atividade emulsionante.

Aguirre, Garro e Savoy de Giori (2008) estudaram a produção de hidrolisado de soja com a utilização de diferentes bactérias lácticas, os hidrolisados produzidos apresentaram melhora nas características da proteína (ex: solubilidade) e uma fonte rica em lisina podendo ser utilizado como fonte complementar deste aminoácido em misturas com outras fontes proteicas de cereais.

A partir da produção de hidrolisados de proteína, novas fronteiras têm sido exploradas para a utilização desses compostos. Um grande destaque tem sido dado para a produção de complexos de peptídeos com metais (ex: ferro e manganês) oriundos de sais minerais de interesse nutricional.

A importância dos metais para a manutenção do equilíbrio bioquímico-nutricional é incontestável. No entanto, as bases moleculares envolvidas na homeostase (absorção, distribuição, utilização e eliminação) destes elementos ainda não foram completamente elucidadas. Porém, vários estudos têm demonstrado que a forma de apresentação dos metais tem papel decisivo na biodisponibilidade dos mesmos. Sendo que aqueles naturalmente complexados com proteínas, ferritina (THEIL, 2004), hemoglobina (LAYRISSE et al., 1984) ou preparados a partir de proteínas ou aminoácidos (CREMONESI et al., 1984; FRANZONE et al., 1990) tem demonstrado maior biodisponibilidade e menores efeitos colaterais, quando comparados aos compostos inorgânicos.

Uma das vantagens do uso de metais na forma de complexos é que estes estão menos susceptíveis à interação com fatores antinutricionais (ex: ácido fítico) o que previne a formação de compostos insolúveis e aumenta a disponibilidade do metal para a absorção (ASHMEAD, 2001).

Bao et al (2007) estudaram a complexação de hidrolisados enzimáticos da proteína de soja com íons de cálcio. De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que a complexação ocorre principalmente nos grupos carboxílicos dos aminoácidos ácidos e nos grupos imidazólicos da histidina, sendo dependente do número de aminoácidos dos peptídeos. A carga do aminoácido também foi sugerida como determinante para a formação do complexo.

Resultados promissores foram mostrados na complexação de hidrolisados parciais de proteínas do soro de leite com ferro por Kim et al (2007b), enquanto que Chaud et al (2002) demonstraram que hidrolisados parciais de caseína obtidos por Freitas et al (1993), em condições apropriadas, formam complexos com ferro. Tais complexos apresentaram características físico-químicas que contrastam com aquelas apresentadas pelo sulfato ferroso, ou seja, o complexo formado é estável e insolúvel quando em pH ácido (similar ao do estômago) permanecendo o ferro, na faixa de pH de 2,0 a 7,5, na forma complexada, porém, é solúvel em pH de neutro a alcalino (similar ao entérico). Os autores demonstraram também que a administração do complexo Fe⁺³-peptídeo, por sonda gástrica, em ratos normais após jejum de 18 horas resultou em aumento e manutenção dos níveis séricos de ferro quando comparado à dose equivalente de sulfato ferroso.

A suplementação com Fe³⁺-peptídeo preveniu, em ratos, o desenvolvimento de deficiência de ferro em situação de hipocloridria induzida por omeprazol (CONCEIÇÃO et al., 2001). Preveniu também a deposição hepática de ferro com a administração de altas doses do complexo por um período de 28 dias (MACHADO et al., 2005).

Em estudo prospectivo longitudinal realizado com gestantes (AMBRÓSIO, 1999), a suplementação com o complexo Fe⁺³-peptídeo apresentou maior eficácia quando comparada ao sulfato ferroso, redução dos efeitos colaterais e consequentemente maior adesão ao tratamento.

Garcia-Aranda, Wapnir e Lifshitz (1983) mostraram que a absorção de manganês em ratos Wistar foi três vezes maior para o metal ligado a histidina quando comparados a administração deste sem o ligante. Para Wapnir e Stiel (1986), a administração conjunta de zinco com os aminoácidos triptofano, histidina e prolina levou a um aumento da sua absorção na região do jejuno em camundongos quando comparados ao metal administrado não complexado, os autores acreditam que a formação de complexos dos peptídeos com o zinco foi determinante para o resultado observado nesse estudo.

Os resultados dos autores descritos acima deixam evidente o benefício da utilização de complexos na nutrição e abrem a possibilidade de estender a utilização de complexos para outros metais, que são essenciais para a manutenção do equilíbrio bioquímico-nutricional, tais como o cobre, o manganês e o zinco, visando também a sua maior biodisponibilidade no organismo.

1.2.1. Metais de interesse nutricional

São diversos os metais essenciais para o funcionamento adequado do organismo. Cada um apresenta importante função na homeostase, agindo de maneira sinérgica em diferentes situações. Dentre esses temos os metais cobre, zinco, ferro e manganês com destacado papel.

1.2.1.1. Cobre

O cobre é um elemento essencial para todos os organismos vivos. Nos seres humanos o cobre á absorvido principalmente na região do duodeno e excretado no trato gastrointestinal principalmente via bile, além disso, uma grande parte do cobre eliminado é reabsorvido pelo organismo. A manutenção dos níveis de cobre no organismo é realizada pelo equilíbrio entre sua absorção e eliminação e está ligada ao seu status nutricional (HASSAN; NETCHVOLODOFF; RAUFMAN, 2000; ROMAÑA et al., 2011). O cobre atua principalmente como cofator de diversas enzimas tendo importante desempenho no

crescimento e desenvolvimento infantil, mecanismos de defesa, crescimento ósseo, maturação das células sanguíneas, transporte de ferro e colesterol, metabolismo energético e desenvolvimento cerebral (LINDER et al., 1998; OLIVARES; UAUY, 1996).

A deficiência de cobre é marcante em crianças mal nutridas e também pode estar associada a diversas doenças degenerativas, tais como Alzheimer, doença de Wilson e síndrome de Menkes (KLEVAY, 2008; OLIVARES; UAUY, 1996; ROMAÑA et al., 2011; STRAUSAK et al., 2001).

1.2.1.2. Ferro

O ferro é um dos elementos mais utilizados pelos seres vivos. Sua deficiência afeta aproximadamente 25 % da população mundial, sendo as crianças na fase pré-escolar, mulheres em idade reprodutiva e gestantes as mais afetadas. Estudos apontam uma prevalência de anemia entre 30% e 40% em população de crianças menores de cinco anos e de 55% a 77% em lactentes no Brasil (BRASIL, 2009; UNICEF, 2009).

A deficiência de ferro faz com que as crianças demonstrem-se cansadas, lentas e com o comportamento apático, afetando diretamente o aprendizado na fase escolar. Adultos anêmicos são menos produtivos que os não anêmicos (MONGA et al., 2010; PATTERSON; BROWN; ROBERTS, 1998; TORREJÓN et al., 2004; UNICEF, 2009).

A função mais notória do ferro é participação no transporte de oxigênio quando ligado às proteínas mioglobina e hemoglobina (DISILVESTRO, 2004), além disso, o ferro também está envolvido nos processos de síntese de proteínas, DNA e RNA, regulação da expressão gênica e proliferação celular (GANZ, 2003).

A deficiência de ferro está ligada à baixa qualidade da alimentação, biodisponibilidade do ferro, redução da capacidade absortiva e até mesmo a sua perda excessiva (DENIC; AGARWAL, 2007).

A suplementação com ferro é recomendada como o tratamento mais utilizado para a sua deficiência. No entanto, devido às altas doses de ferro, ocorrem diversos efeitos colaterais o que reduz a adesão de pacientes, principalmente crianças, ao tratamento (MOREIRA-ARAÚJO; ARAÚJO; ARÊAS, 2008; STEPHENSON, 1995).

1.2.1.3. Manganês

O manganês é um metal essencial encontrado em diversos tecidos biológicos e está envolvido em diversos processos fisiológicos importantes como metabolismo de proteína, aminoácidos, lipídeos e carboidratos (ASCHNER et al., 2007).

Apesar de sua importância, o excesso pode causar acúmulo no cérebro na região do striatum, local responsável pelo controle da função motora. Esse acúmulo leva a uma doença neurodegenerativa com sintomas semelhantes à doença de Parkinson denominada Manganismo e também a manifestações semelhantes à Esquizofrenia (GREGER, 1998; QUINTANAR, 2008).

1.2.1.4. Zinco

A importância do zinco para os seres vivos é inquestionável, seu papel é marcante no crescimento e desenvolvimento de seres humanos, assim como no desenvolvimento e funcionamento do cérebro. Além disso, o zinco está envolvido nos processos de proliferação, diferenciação e apoptose das células (KOZLOWSKI et al., 2009; MARET; SANDSTEAD, 2006; TAKEDA; TAMANO, 2009).

A deficiência de zinco pode levar a diversos problemas dentre os quais retardamento no crescimento, deficiência cognitiva e disfunção imunológica são os mais relevantes. A perda do apetite com consequente anorexia também é relatada, assim como problemas relacionados ao aprendizado e a memória (PRASAD et al., 2004; SALGUEIRO et al., 2000; TAKEDA; TAMANO, 2009). A falta de zinco durante a gestação e desenvolvimento pósnatal, leva a sutis alterações no desenvolvimento neurológico do feto e da criança (MERIALDI et al., 2004).

As necessidades de consumo diário de zinco variam de 2 a 3 mg, sendo os cereais e a carne vermelha suas principais fontes (TAKEDA; TAMANO, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Otimização do processo de obtenção e caracterização físico-química de complexos de metais com hidrolisados enzimáticos parciais de proteína de soja.

2.2. Objetivos Específicos

- 1. Obtenção do isolado proteico de soja, a partir do farelo de soja.
- 2. Preparação do hidrolisado enzimático parcial de proteína de soja.
- 3. Caracterização do hidrolisado enzimático parcial de proteína de soja.
- 4. Preparação dos complexos peptídeo-metal (ferro, cobre, manganês e zinco) a partir de hidrolisado parcial.
- 5. Caracterização físico-química dos complexos.
- 6. Análise da viabilidade econômica da produção dos produtos originados a partir do farelo de soja (proteína, hidrolisado e complexos metálicos).



3.1. Material

Farelo de soja sem óleo doado gentilmente pela Cooperativa CAROL (Orlândia-SP). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Métodos

Para uma melhor compreensão, a metodologia foi dividida em duas partes principais: delineamento experimental e viabilidade econômica do projeto.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1. Redução do tamanho de partícula do farelo de soja

O farelo de soja comercial fornecido pela cooperativa CAROL representa o subproduto da extração do óleo. Este apresenta uma distribuição de tamanho de partículas imprópria para a realização de extração da proteína, sendo necessário submetê-lo a processo de cominuição.

Após secagem em estufa de ar circulante a 50 °C durante 24 horas o farelo foi cominuído em moinho de facas (SOLAB – SL 31) e tamisado, obtendo duas frações de farelo cominuído: a) Farelo A com partículas maiores que 150 μ m e, b) Farelo B com partículas menores que 150 μ m.

3.2.2. Determinação da distribuição do tamanho de partícula do farelo de soja

Após a cominuição do farelo de soja, a distribuição do tamanho de partículas da amostra (farelo de soja cominuído sem separação por tamanho de partículas) foi determinada em equipamento LS Particle Size Analyzer, modelo: Beckman Coulter LS 13 320.

3.2.3. Variáveis do processo extrativo

Tamanho de partícula

Para se avaliar a influência do tamanho de partícula no processo extrativo, as amostras farelo A e B foram submetidas ao processo descrito a seguir:

Foram dispersos 0,5 g de cada farelo em 25 mL de solução aquosa de NaOH 0,04 mol/L (pH 10) e mantidas sob agitação por 30 minutos, a 45 °C . Após este período cada dispersão foi centrifugada a 4939g, durante 30 minutos. O sedimento foi descartado e o sobrenadante acidificado com solução HCl 0,1 mol/L até pH 4,5 (precipitação isoelétrica de proteínas), sendo novamente centrifugado a 4939g por 30 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi redisperso em solução de cloreto de sódio 0,2 mol/L, pH 7,0, sob agitação. Após completa dispersão o pH foi ajustado para 7,5, com solução aquosa de NaOH 0,04 mol/L e a dispersão mantida em repouso em câmara fria por uma noite. Após o repouso a dispersão foi centrifugada a 1613*g*, por 20 minutos. Quantificaram-se as proteínas presentes no sobrenadante e sedimento pelo método de Kjeldahl (MILLER e HOUGHTON, 1945).

Temperatura e número de extrações

Foram preparadas duas dispersões contendo 0.5 g de farelo de soja (sem a separação por tamanho de partícula) em 25 mL de solução de NaOH 0.04 mol/L (com ajuste do pH do meio para 10), as dispersões permaneceram sob agitação por uma hora sendo mantidas em temperaturas distintas de 25 e 55 ± 2 °C.

Em seguida, as dispersões foram centrifugadas por 30 minutos a 4939g. Os sobrenadantes foram separados e reservados, enquanto os sedimentos foram submetidos a uma nova extração com 20 mL da solução alcalina, seguindo os mesmos parâmetros empregados na primeira extração. As proteínas presentes no sobrenadante de cada extração e reextração foram quantificadas pelo método de Kjeldahl.

Seguidamente, os sobrenadantes das duas extração foram misturados sendo o pH ajustado até 4,5 (com HCl 0,1 mol/L), sendo essa dispersão centrifugada por 30 minutos a 4939g para a separação da proteína.

O precipitado proteico foi solubilizado em uma solução NaCl 0.2 mol/L, o pH do meio ajustado a $7.3 \pm 0.2 \text{ com}$ solução aquosa NaOH 0.04 mol/L e centrifugado por 20 minutos a 1613g. As frações de proteínas solúvel e insolúvel foram separadas e quantificadas pelo método de Kjeldahl (MILLER e HOUGHTON, 1945).

Relação massa:volume

Para a análise da influência da relação massa (farelo de soja)/volume do líquido extrator no rendimento do processo, realizaram-se quatro experimentos com as diferentes relações: 1:10, 1:20, 1:30 e 1:50 (m/v).

Foram dispersas massas equivalentes de farelo de soja em solução de NaOH 0,02 mol/L mantidas sob agitação por uma hora à temperatura ambiente (25 °C \pm 2). As dispersões foram então centrifugadas a 4939g por 30 minutos. Utilizou o sobrenadante para quantificar o teor de proteína extraída (método de Kjeldahl) e descartou o sedimento.

3.2.4. Otimização do método extrativo

Foram avaliados três métodos extrativos com base no trabalho de L'honine, Boye e Arcand (2006). As figuras a seguir ilustram os processos sendo que as diferenças entre cada um estão marcadas em *itálico* nos fluxogramas apresentados. Os métodos foram denominados: *extração padrão* (figura 1); *extração com precipitação a quente* (figura 2) e *extração com pré-tratamento ácido* (figura 3).

Em todos os métodos de extração foram utilizadas as proporções farelo/líquido extrator de 1:10 e 1:30 (m/v).

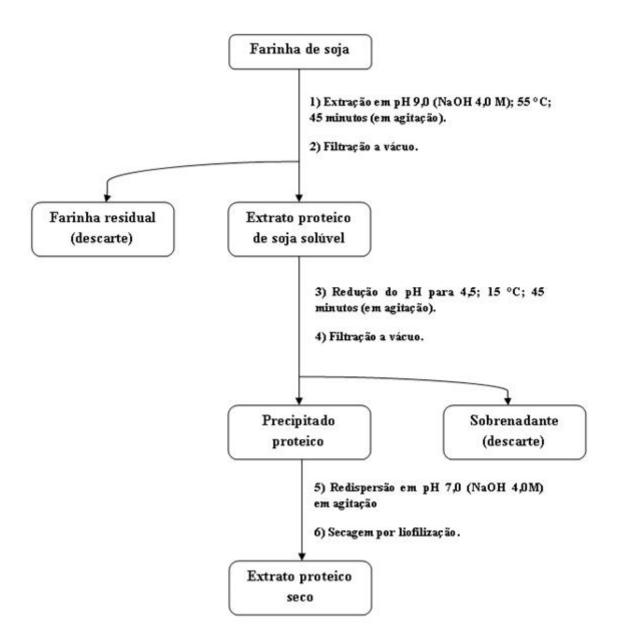


Figura 1. Representação esquemática do processo de *extração padrão* (Adaptado de L'Hocine, Boye e Arcand (2006)).

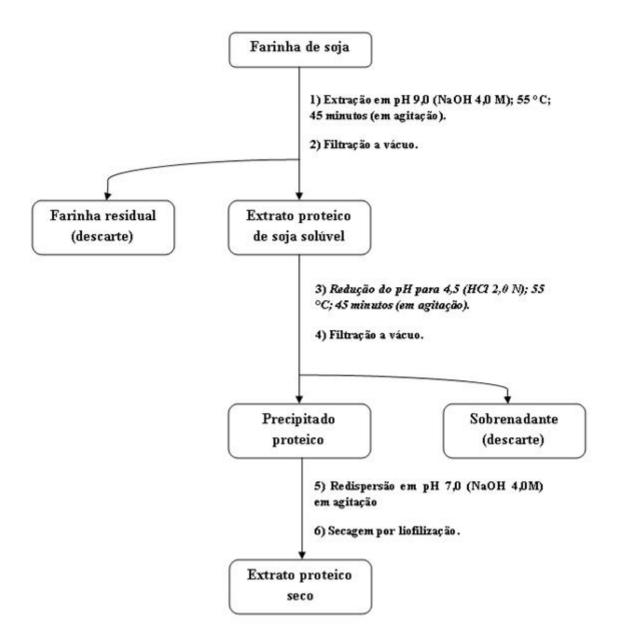


Figura 2. Representação esquemática do processo com *precipitação a quente* (Adaptado de L'Hocine, Boye e Arcand (2006)).

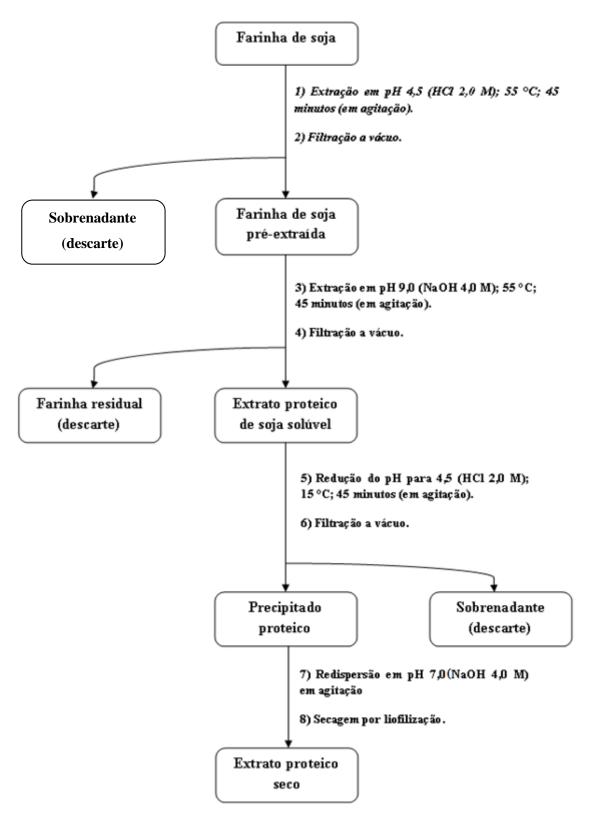


Figura 3. Representação esquemática do processo de extração com *pré-tratamento ácido* (Adaptado de L'Hocine, Boye e Arcand (2006)).

3.2.5. Caracterização dos extratos proteicos e dos resíduos obtidos pós-extração

Os extratos proteicos e o resíduo, após secos, foram caracterizados quanto ao teor de proteínas, cinzas totais e umidade (Análise centesimal), segundo os métodos descritos nos subitens a seguir:

3.2.5.1. Determinação do teor de proteínas (método de Kjeldahl)

Os teores de nitrogênio foram determinados pelo método Kjeldahl (MILLER; HOUGHTON, 1945). Para a conversão do teor de nitrogênio em proteína foi utilizado o fator de correção n x 6,0, específico para a soja, como recomendado por Cecchi (2007a).

3.2.5.2. Determinação de cinza

O teor de cinza foi determinado em triplicata pesando-se 2 g das mostras em cadinhos de porcelana previamente incinerados em mufla a 600 °C por 24 horas. As amostras foram cuidadosamente queimadas em bico de gás e em seguida calcinadas em mufla a temperatura de 600 °C por 24 horas. Após esse período as amostras foram resfriadas até 70 °C em estufa comum, armazenadas em dessecador para o resfriamento até temperatura ambiente e a posterior pesagem para a determinação da quantidade de cinza presentes (CECCHI, 2007b).

3.2.5.3. Determinação da umidade das amostras

Após a secagem por liofilização, as amostras foram separadamente homogeneizadas em gral para desagregar os grumos formados durante o processo de secagem. Em seguida 0,5 g de amostras foram colocadas em analisador de umidade modelo OHAUS, MB45, com fonte de radiação halógena para a determinação da umidade.

Todas as análises foram feitas em triplicata e o conteúdo de umidade foi expresso em porcentagem de umidade relativa à massa inicial do material.

3.2.5.4. Determinação de carboidratos e outros componentes

Não foram feitas as quantificações específicas para carboidratos, gorduras e outros possíveis componentes presentes na amostra. A contribuição centesimal destes componentes foi determinada de forma indireta, ou seja, por subtração da contribuição da proteína, cinzas e umidade em relação à massa inicial.

3.2.6. Ensaios enzimáticos

O extrato proteico padrão (proveniente do método extrativo *padrão*) foi submetido a diversos testes com diferentes enzimas no qual foram analisadas a relação ideal enzima/substrato, diluição enzimática e enzima ou combinações enzimáticas mais adequadas ao processo de hidrólise.

3.2.6.1. Determinação da relação enzima/substrato

A determinação da relação ideal enzima/substrato para as enzimas Alcalase® 2,4L, Neutrase® 0,8L e Flavouzyme® 1000L foi realizada utilizando os parâmetros de pH, temperatura e tempo de incubação já descritos previamente na literatura (DAMRONGSAKKUL et al., 2008; ORDÓÑEZ; BENÍTEZ; GONZÁLEZ, 2008; YUAN; GU; TANG, 2008).

Para o experimento foi utilizado como substrato uma dispersão do extrato proteico obtido pelo método padrão (1:30 m/v) a 1% em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5, sendo que este foi adicionado ao meio reacional obtendo três concentrações finais: 0,25%, 0,5% e 0,75% (m/v). Para a adição das enzimas, foram preparadas soluções estoque a 1:10 (v/v) em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5, as concentrações finais destas na reação foram de 1:100 e 1:200 (v/v). O volume final da reação foi completado para 2 mL com a adição de tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5.

As tabelas 1 e 2 a seguir mostram os volumes utilizados para cada concentração enzimática e de substrato:

Tabela 1. Volumes utilizados para a reação com enzima na diluição 1:100.

anaição 1.100.					
	Concentração do substrato (%)				
	0,25	0,5	0,75		
	Volume adicionado (mL)				
Tampão fosfato	1,3	0,8	0,3		
30 mmol/L	1,3	0,0	0,3		
Solução estoque	0.2	0.2	0,2		
de enzima	0,2	0,2			
Substrato	0,5	1,0	1,5		

Tabela 2. Volumes utilizados para a reação com enzima na diluição 1:200.

	Concentração do substrato (%)				
	0,25	0,5	0,75		
	Volume adicionado (mL)				
Tampão fosfato	1.4	0,9	0.4		
30 mmol/L	1,4	0,9	0,4		
Solução estoque	0.1	0.1	0.1		
de enzima	0,1	0,1	0,1		
Substrato	0,5	1,0	1,5		

O ensaio foi executado com a adição dos volumes de substrato e tampão conforme descritos nas tabelas 1 e 2 em tubo de ensaio, estes foram agitados em misturador (Vórtex – Genie TM, modelo K-550-G) e colocados em banho maria à 55 °C por cinco minutos para o equilíbrio da temperatura. Em seguida foram adicionadas as soluções estoque de cada uma das enzimas. Os tubos foram novamente agitados e levados em banho maria por 10 minutos e as reações interrompidas com a adição de 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20%.

Após o término da reação as amostras foram centrifugadas a 403g e a absorvância dos sobrenadantes foi determinada a 280 nm em espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU 640. A partir da absorvância, os resultados foram expressos em Unidades de Absorvância/minuto (U/min) para a comparação dos valores.

3.2.6.2. Atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi dividida em duas etapas: a validação do método de quantificação de tirosina e a determinação da atividade enzimática propriamente dita.

3.2.6.2.1. Validação do método de quantificação da tirosina

A curva analítica para a tirosina foi determinada utilizando soluções de tirosina, no intervalo de concentração entre de 10 a 100 μg/mL e as leituras de absorvância foram determinadas no comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU 640.

Os limites de quantificação e detecção foram determinados de acordo com procedimentos preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003a) utilizando-se as fórmulas:

$$LQ = \frac{DP \times 10}{ic}$$
 e $LD = \frac{DP \times 3.3}{ic}$

Onde LQ é o limite de quantificação, LD é o limite de detecção, DP é o desvio padrão da leitura de um número apropriado de amostras do branco (foram utilizadas dez amostras) e ic é a inclinação da curva analítica.

A precisão (dada pelo desvio padrão relativo) e a exatidão foram avaliadas em dias diferentes não consecutivos (interdias) e em um mesmo dia (intradia). Para tanto, foram feitas nove determinações, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta (20, 50 e 90 μg/mL), em triplicata e em três dias não consecutivos. Os valores de precisão e exatidão foram obtidos através das fórmulas:

$$DPR = \frac{DP \times 100}{CMD}$$
 Exatidão = $\frac{CMD}{CT} \times 100$

Onde *DPR* é o desvio padrão relativo, *DP* é o desvio padrão, *CMD* é a concentração média determinada e *CT* é a concentração teórica.

3.2.6.2.2. Determinação da atividade enzimática versus tempo

Após a determinação da relação ideal enzima/substrato determinou-se a atividade enzimática em função do tempo de reação, seguindo o procedimento a seguir:

Uma dispersão do extrato proteico padrão (1:30 m/v) a 1% em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5 foi utilizada como substrato, sendo a concentração final deste no meio de 0,75% (m/v). Para a adição das enzimas, foram preparadas soluções estoque a 1:10 (v/v) em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5, sendo que as concentrações finais destas na reação 1:100 e 1:200 (v/v). O volume final da reação foi completado para 2 mL com a adição de tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5.

O experimento foi realizado com a adição dos volumes de substrato e tampão conforme mostrados na tabela 3, os tubos foram agitados em misturador vórtex e colocados em banho maria à 55 °C por cinco minutos para o equilíbrio da temperatura. Em seguida foram adicionadas as soluções estoque das enzimas. Os tubos foram novamente agitados e mantidos no banho maria por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. As reações foram interrompidas com a adição de 1 mL de solução de TCA a 20% e centrifugadas a 403g por 15 minutos para a determinação das absorvâncias dos sobrenadantes a 280 nm em espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU 640.

Tabela 3. Volumes utilizados para a determinação da atividade enzimática *versus* tempo com a concentração de substrato a 0,75% e diluição enzimática a 1:200.

	Volume adicionado	
	(mL)	
Tampão fosfato 30	0,4	
mmol/L	0,4	
Solução estoque de	0,1	
enzima	0,1	
Substrato	1,5	

Para a diluição enzimática 1:100 foram utilizados 0,2 mL de solução estoque e 0,3 mL de Tampão fosfato 30 mmol/L, mantendo a mesma quantidade de substrato.

A atividade enzimática foi determinada em μg equivalente de tirosina liberada/min e calculada pela equação abaixo:

$$U.A. = (Abs \times V_R)/(t \times V_E \times c)$$

Onde:

U.A.: atividade enzimática (µg tirosina/min);

 V_R : volume de reação (μL);

 V_E : volume de enzima utilizado (μL);

t: tempo de reação;

Abs: absorvância da amostra em 280 nm;

c: coeficiente angular da curva de tirosina.

3.2.6.3. Caracterização dos hidrolisados

A caracterização dos hidrolisados proteicos foi feita inicialmente com a preparação dos hidrolisados como descritos a seguir nos subitens do item 3.2.6.3.1 e posteriormente avaliados quanto ao perfil de peptídeos formados de acordo com o item 3.2.6.3.2.

3.2.6.3.1. Preparação dos hidrolisados proteicos

Os hidrolisados proteicos foram preparados basicamente seguindo três metodologias distintas, com a variação do tempo de incubação das enzimas, combinando as enzimas entre si e com adições sequenciais de uma mesma enzima. Para as reações foram utilizados como parâmetros básicos a temperatura de reação de 55 °C, o substrato uma dispersão do extrato proteico (padrão 1:30) a 1% em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5, sendo sua concentração final na reação de 0,75 % (m/v), em um volume total de reação de 4 mL. A inativação da enzima foi feita com o aquecimento a 95 ± 2 °C por 10 minutos.

Nas reações de hidrólise com a papaína foi necessário, imediatamente antes do inicio da reação, a ativação da enzima em presença de grupos –SH, para isso foi utilizado como ativador o cloridrato de L-cisteína (SIGMA-ALDRICH, 2009).

Assim, para a ativação da papaína foi preparado uma solução a 10 mmol/L de cloridrato de L-cisteína em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5. Nesta solução acrescentou-se o equivalente a 1,0 % em massa de papaína. Após a homogeneização, a solução foi levada em banho maria a 37 °C por 5 minutos para a ativação completa da papaína e esta foi então utilizada para as reações de hidrólise que serão detalhadas nos subitens seguintes.

3.2.6.3.1.1. Variação do tempo de incubação

A proteína de soja foi submetida separadamente à hidrólise com Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L variando-se o tempo de incubação em 30 e 60 minutos, tendo como 1:100 a proporção final de cada enzima no meio. Após o período de hidrólise, as enzimas foram aquecidas para sua inativação, centrifugadas a 403g por 15 minutos e o sobrenadante foi então avaliado em HPLC quanto ao perfil dos peptídeos formados (metodologia descrita no item 3.2.6.3.2).

3.2.6.3.1.2. Combinações variadas de enzimas

Experimentos de hidrólise foram realizados utilizando os pares de enzimas: Alcalase® 2,4L + Neutrase® 0,8L; papaína + Alcalase® 2,4L (mantendo a proporção enzima/meio reacional em 1:100 (m/v ou v/v). O tempo de reação enzimática foi 30 minutos com a

primeira enzima, decorrido este tempo a enzima foi inativada por aquecimento do meio de reação a 95 °C por 10 minutos. Após arrefecimento foi adicionado a segunda enzima e manteve-se a reação por mais 30 minutos, seguido de inativação da enzima aquecendo-se o meio a 95 °C por 10 minutos. O caldo de hidrólise foi centrifugado a 403g por 15 minutos sendo o sedimento e o sobrenadante separados. A determinação do perfil dos peptídeos formados foi realizada em HPLC conforme será descrito no item 3.2.6.3.2.

3.2.6.3.1.3. Adições subsequentes de enzimas

Para esse experimento foram utilizadas as enzimas Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L. Partindo-se de uma solução estoque de enzima a 1:5 (v/v), 200 μL de enzima foram adicionados a cada 30 minutos, totalizando o tempo máximo de reação em 90 minutos. Para essa análise comparou-se o perfil dos peptídeos formados para uma, duas ou três adições subsequentes de enzima. Após o término da reação as enzimas foram submetidas ao aquecimento a 95 °C para sua inativação, centrifugadas a 403g por 15 minutos e então avaliadas em HPLC para a determinação do perfil dos peptídeos formados conforme será descritos no item 3,2,6,3,2.

3.2.6.3.2. Distribuição do tamanho dos peptídeos

A distribuição do tamanho dos peptídeos formados após a hidrólise foi estimada em um sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), utilizando a coluna Superdex TM Peptide 10/300 GL (volume da coluna: 24 mL), com eluição isocrática em fase móvel composta por Acetonitrila 30% e ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. O volume total de injeção foi de 200 μL, as amostras foram eluídas com fluxo de 0,5 mL/min e detectadas no comprimento de onda de 214 nm com escala de leitura das amostras de 0,5 AUFS (*Absorbance Units Full Scale*).

Para esse procedimento foi utilizado o equipamento de FPLC Pharmacia LKB-LCC 2252, composto por: bombas A e B Pharmacia pump 2248, detector Pharmacia LKB-VWM 2141 e registrador Pharmacia LKB-REC 102.

Conforme descrito por Smyth e Fitzgerald (1997), a coluna foi previamente padronizada com albumina de soro bovino (BSA) como marcador do volume de exclusão e uma sequencia de peptídeos e aminoácidos com massa molecular crescente como descritos na tabela 4.

Tabela 4. Massa molecular dos padrões utilizados para o ensaio cromatográfico.

Padrões	Massa molecular	Concentração da	Volume	
		solução estoque	utilizado	
	(Da)		(μL)	
BSA	66.776	65	7	
Trasylol	6.512	1	25	
Angiotensina II	1.046	1	15	
Leu-Encefalina	556	1	25	
(Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)	330	1	25	
Met-Ala	220	1	73	
Fenilalanina	165	5,4	5	

3.2.6.4. Quantificação do teor de nitrogênio presente nas frações solúveis e insolúveis do hidrolisado proteico

Para a determinação do teor de nitrogênio livre nas frações solúveis e insolúveis do hidrolisado proteico preparou-se uma dispersão do extrato proteico padrão (1:30) a 5% (m/v) submetendo-o à hidrólise com Alcalase® 2,4L, mantendo a relação de 0,75% de substrato para a diluição enzimática de 1:100 (v/v), em tampão fosfato 30 mmol/L pH 7,5, por 30 minutos a 55 ± 1°C, em agitação a 400 rpm (agitador mecânico Heidolph, modelo RZR1 (Alemanha)). Durante a reação, o pH do meio foi monitorado e mantido constante em 7,5 com a adição de NaOH 2,0 mol/L. A reação foi interrompida por aquecimento durante 15 minutos a 95 ± 2 °C. O hidrolisado foi centrifugado a 630g por 15 minutos, o precipitado obtido e o sobrenadante foram separados e secos por liofilização (liofilizador Edwards do Brasil). A dosagem de nitrogênio livre foi determinada pelo método Kjeldahl (MILLER; HOUGHTON, 1945).

3.2.6.5. Eletroforese dos peptídeos derivados da proteína de soja

Para uma avaliação do perfil dos hidrolisados formados ao longo do tempo de reação com as enzimas Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L foram feitas eletroforeses com amostras de peptídeos obtidos nos tempos 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos de reação de hidrólise enzimática, sendo as amostras dispostas no gel de eletroforese como indicado na figura 4.

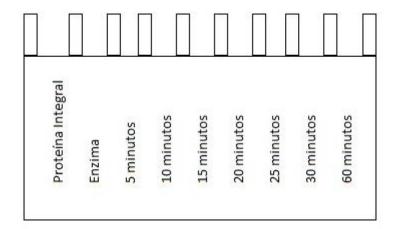


Figura 4. Disposição dos hidrolisados de soja no gel de eletroforese produzidos nos crescentes tempos de hidrólise.

Para a preparação dos peptídeos foram utilizados 3 mL de solução a 1% (m/v) de extrato proteico padrão, 400 μ L de solução de enzima (diluição 1:10 v/v) e 600 μ L de tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,5.

O término da reação foi efetuado com o aquecimento das amostras a 90 ± 2 °C durante 10 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 900g durante 10 minutos e separados precipitados de sobrenadante para a avaliação do perfil de peptídeos solúveis e insolúveis formados.

Na eletroforese os hidrolisados foram submetidos a gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio de acordo com Laemmli (1970). Inicialmente os hidrolisados foram fervidos por 5 minutos na presença do tampão da amostra contendo 0,1mol/L Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,1mol/L DTT e 0,001mol/L azul de bromofenol. O gel de corrida foi preparado a 12% e o gel de empilhamento a 4%.

Após a corrida, o gel foi corado com Comassie Blue R-250 segundo o protocolo descrito por See e Jackowski (1989) e após 4 horas em solução corante as amostras foram

deixadas em solução descorante de etanol a 12,5% e ácido acético a 7,5% por 48 horas para a revelação das bandas.

3.2.7. Purificação parcial da enzima Alcalase® 2,4L

O processo de purificação parcial da Alcalase® 2,4L foi realizado por cromatografia de exclusão em coluna de 100 cm altura por 2,5 cm de diâmetro, tendo como fase estacionária resina do tipo Sephadex G-25 e fase móvel tampão acetato de sódio 50 mmol/L (pH 5,0). Foram coletados 95 frações na razão de 5 mL/8 minutos (volume total de aproximadamente 475 mL).

Após a coleta, foram determinadas as atividades enzimáticas das frações ímpares e também realizadas as leituras diretas da absorvância das mesmas frações em 280 nm para a determinação da região de eluição da proteína e verificação da coincidência das regiões de *pool* de proteína e enzima.

A atividade enzimática das frações foi determinada utilizando como substrato 2 mL de uma dispersão de caseína em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5. Foram adicionados 400 μL de cada fração ímpar selecionada. O volume final da reação foi completado para 200 μL com a adição de tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5. A reação enzimática foi mantida em banho maria a 55 °C por 30 minutos e interrompida com a adição de 1,25 mL de TCA 10%. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 403*g* por 15 minutos para a determinação das absorvâncias dos sobrenadantes a 280 nm em espectrofotômetro.

3.2.7.1. Comparação da atividade enzimática específica da enzima Alcalase® 2,4L nas etapas de purificação parcial

Com a determinação da fração correspondente ao *pool* enzimático, 5 mL desse *pool* foram separados para a determinação da atividade enzimática específica da Alcalase® 2,4L pós-cromatografia sendo o volume restante liofilizado.

As atividades enzimáticas específicas da enzima Alcalase® 2,4L foram avaliadas nas três etapas do processo de purificação parcial: enzima bruta (com o glicerol), purificado

parcial enzimático pós-cromatografia (*pool* enzimático) e purificado parcial enzimático pós-cromatografia liofilizado (*pool* enzimático liofilizado).

O cálculo da atividade enzimática específica foi realizado pela razão da atividade enzimática por massa total de proteína quantificada em cada etapa. A determinação da atividade enzimática e a quantificação de proteínas foram realizadas como descrito a seguir.

3.2.7.1.1. Determinação da atividade enzimática da Alcalase® 2,4L para cada etapa do processo de purificação parcial

A atividade enzimática da Alcalase® 2,4L para cada etapa foi determinada com a padronização de tempos de reação de hidrólise em 5, 10 e 15 minutos, em banho maria a temperatura de 55 °C e centrifugando cada amostra a 900g por 10 minutos após a interrupção da reação com TCA a 10%.

As reações foram realizadas com as quantidades de amostra descritas a seguir:

Enzima bruta (com glicerol)

Foram utilizados 10 μ L de solução de enzima (1:10 v/v); 590 μ L tampão fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,5), 2 mL de caseína a 1% e 1,2 mL de TCA 10%.

Purificado parcial enzimático pós-cromatografia

Foram utilizados10 μL de solução do *pool* enzimático; 590 μL tampão fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,5), 2 mL de caseína a 1% e 1,2 mL de TCA 10%.

Purificado parcial enzimático pós-cromatografia liofilizado

Foram utilizados 50 μL de solução do liofilizado (1mg/mL); 550 μL tampão fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,5), 2 mL de caseína a 1% e 1,2 mL de TCA 10%.

Quantificação de proteínas totais

A quantificação das proteínas totais presente em cada etapa foi determinada pelo método de Folin (LOWRY et al., 1951) utilizando-se o mesmo volume de solução de enzima empregada para a determinação de atividade enzimática específica das respectivas etapas de purificação parcial.

A validação do método para a quantificação de proteína foi realizada com soro albumina bovina (BSA). Partindo-se de uma solução estoque de BSA a 1 mg/mL, a curva analítica para a BSA foi determinada no intervalo de volumes crescentes de 10 a 100 μL da solução estoque da proteína e as leituras das absorvâncias foram determinadas no comprimento de onda de 660 nm em espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU 640. A precisão e a exatidão foram avaliadas de acordo com as normas preconizadas pela ANVISA (2003a) como já detalhadas anteriormente no item 3.2.6.2.1.

3.2.8. Preparação do hidrolisado proteico

A preparação do hidrolisado proteico, foi realizada utilizando o purificado parcial enzimático pós-cromatografia. Para isso foi preparada uma dispersão do extrato proteico padrão (1:30 m/v) a 5% m/v, sendo que o meio dispersante da proteína era constituído pelo volume obtido com do *pool* enzimático completado com água deionizada até o volume final. Para a preparação do hidrolisado em maior quantidade foi mantida a mesma relação de massa de proteína e volume de enzima como padronizados anteriormente (0,75% m/v – proteína e 1:100 v/v enzima).

A dispersão da proteína + enzima foi mantida sob agitação mecânica constante e sua temperatura foi elevada rapidamente a 55 °C em banho maria. Após o equilíbrio da temperatura, a reação foi mantida constantemente em pH 7,5 por 45 minutos. A reação foi encerrada com o aquecimento da dispersão a 95 \pm 2 °C durante 15 minutos e a dispersão foi seca por liofilização ou em *spray dryer* após o resfriamento.

3.2.9. Composição em aminoácidos

A composição dos aminoácidos totais do hidrolisado de soja produzido com Alcalase® 2,4L e da proteína integral foi determinada nas amostras pela hidrólise com HCl 6,0 mol/L contendo fenol 0,01 %, ponto de ebulição constante a 110 °C, por 22 horas. As amostras hidrolisadas foram secas em evaporador rotatório (SpeedVac), ressuspendidas em água MilliQ, centrifugadas a 600g e novamente ressuspendidas em 1,0 mL de água Milli-Q. Alíquotas de 50 μL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de ensaio, secas e submetidas à reação de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC) (figura 5). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag, Waters, 3,9 x 150 mm) com monitoração no comprimento de onda em 254 nm. A quantificação da amostra foi baseada na área de cada pico de aminoácido, tomando-se como referência a área do pico do padrão de aminoácidos com concentração conhecida, sendo que o padrão foi derivado nas mesmas condições e, ao mesmo tempo, que as amostras (BIDLINGMEYER; COHEN; TARVIN, 1984).

Fenilisotiocianato (PITC)

$$PH 8-10$$

Figura 5. Reação de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC).

As amostras foram analisadas seguindo as etapas descritas a seguir:

3.2.9.1. Derivação

Cada tubo de amostra seca foi alcalinizado com 20 μL de uma mistura metanol:água:TEA (trietilamina) na proporção de 2:2:1 (v:v:v) (Metanol, Pierce, grau cromatográfico; TEA, Pierce, grau seqüencial, e água Milli-Q), agitado e seco por 15 minutos à 50°C, em concentrador rotatório Speed-Vac.

Em seguida, adicionou-se a cada tubo da amostra 20 μL do reagente de derivação metanol:água:TEA:PITC na proporção de 7:1:1:1 (v:v:v:v) (PITC, Pierce), agitou e deixou reagir por 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, o excesso do reagente foi removido em concentrador rotatório Speed-Vac por uma hora à temperatura ambiente (etapa crítica, pois elimina o material que absorve no UV, o qual poderá interferir na detecção dos PTC-aa por absorver em 254 nm). A amostra após derivada e seca permanece estável por até três dias, quando mantida à -20°C (DUPONT et al., 1989).

Este procedimento de derivação foi realizado também com a mistura de aminoácidos padrões da Pierce, no qual 20 µL de solução a 125 nmol/mL foi derivada para a quantificação da amostra.

3.2.9.2. Separação dos PTC-aa

A amostra e o padrão, após derivados e secos, foram ressuspendidos em 250 μL e 500 μL, respectivamente, de tampão de amostra: acetato de sódio 0,14 mol/L (Pierce) com 0,06 % de TEA (v/v), pH 7,5, contendo 5 % de acetonitrila (v/v), e 20 μL foram injetados na coluna. O padrão de aminoácidos possui 100 pmol de cada aminoácido em 20 μL aplicado.

Os solventes utilizados para a separação dos aminoácidos foram: solvente A- acetato de sódio 0,14 mol/L com 0,06 % de TEA, pH 5,7 (filtrado em membrana 0,45μm) e solvente B- acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v). Os aminoácidos foram separados segundo o protocolo de separação desenvolvido por Bidlingmeyer, Cohen e Tarvin (1984). Utilizou-se para este tipo de separação uma coluna C18 Pico-Tag Waters com dimensões de 3,9 x 150mm. A cromatografia foi desenvolvida à temperatura constante de 38,0±0,1 °C, em equipamento CM4000 da Laboratory Data Control (Milton Roy Co.), com sistema de bombas binárias; espectrofotômetro com comprimento de onda fixo em 254 nm e célula de fluxo contínuo de 10 μL. Os dados foram coletados em um computador com o programa

ThermoChrom III da Thermo Separation Products. Um gradiente crescente de acetonitrila foi utilizado para esta separação como mostrado na tabela 5 (ATHERTON, 1989), com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A existência de um tempo de equilíbrio de 10 minutos em 5% de solvente B logo após a limpeza da coluna com 100% do solvente B é crítico para haver reprodutibilidade dos tempos de eluição dos PTC-aa.

Tabela 5. Gradiente de separação para a eluição dos PTC-aa.					
Tempo		Fluxo	Tempo		Fluxo
(min)	%B	(mL.min ⁻¹)	(min)	%B	(mL.min ⁻¹)
0,0	10	1,0	10,0	54	1,0
2,2	15	1,0	11,5	100	1,0
2,5	17	1,0	12,0	100	1,0
3,0	21	1,0	12,3	100	1,5
5,5	26	1,0	17,0	100	1,0
6,0	35	1,0	17,5	10	1,0
6,5	36	1,0	27,5	10	1,0
8,0	42	1,0			

3.2.9.3. Quantificação dos PTC-aa

O método utilizado apresenta um coeficiente de variação entre duplicatas ≤10 % (critério de confiança do método). A curva dose-resposta do padrão apresenta uma relação linear entre a área do pico e a quantidade de aminoácidos derivados na faixa de 25 a 2500 pmol de cada aminoácido aplicado na coluna (dados não mostrados).

3.2.10. Preparação dos complexos/quelatos de peptídeo-metal

Para a preparação dos complexos/quelatos foram utilizados os cloretos de ferro (FeCl₃), manganês (MnCl₂), zinco (ZnCl₂) e cobre (CuCl₂).

O processo de preparação dos complexos foi dividido em duas etapas: determinação do ponto de equivalência metal/peptídeo e preparação do complexo/quelato propriamente dito.

A determinação do ponto de equivalência dos metais com os peptídeos foi realizada empregando-se duas metodologias distintas: voltametria cíclica e titulação potenciométrica, sendo que dependendo da característica e do comportamento do metal em solução foi utilizada a metodologia considerada mais adequada.

Para a determinação do ponto de equivalência dos metais ferro, zinco e manganês utilizou-se a técnica de voltametria cíclica. Para sua execução foram utilizados os eletrodos de prata (Ag/ AgCl _(s) /KCl _(sat)) como referência, platina como auxiliar e carbono vítreo como eletrodo de trabalho (área de superfície de aproximadamente 0,07 cm²).

O eletrodo de carbono vítreo foi polido antes cada leitura com uma suspensão de alumina 1 µm. Após o polimento, o eletrodo foi sonicado por 30 s em água deionizada para a eliminação de partículas ou substâncias adsorvida durante o polimento.

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos utilizando o potenciostato Bioanalytical System (BAS) modelo CV27.

O experimento foi conduzido em uma célula de vidro contendo 3 mL da solução do metal a 5 mmol/L em KCl 0,1 mol/L. A determinação do ponto de equivalência metal/hidrolisado foi monitorada com adições consecutivas da dispersão do hidrolisado proteico a 10 e 2,5 % (m/v) até o total desaparecimento ou estabilização da corrente de pico catódico do Fe³⁺ para Fe²⁺ e Zn²⁺ para Zn⁺. No caso do Mn foi seguida a corrente de pico anódico.

Para o cobre, a determinação do ponto de equivalência foi feita a partir da titulação potenciométrica em medidor de pH com eletrodo de vidro, na qual foram titulados volumes crescentes de solução de CuCl₂ 25 mmol/L em uma dispersão de hidrolisado a 2,5 % (m/v) até a estabilização dos valores de potencial lidos. A determinação da relação ideal de cobre/hidrolisado foi dada pela derivada da curva obtida no gráfico de potencial *versus* volume de solução de cobre titulada.

Após a determinação do ponto de equivalência e consequentemente da relação ideal de massa de metal/hidrolisado, a preparação do complexo foi realizada com a mistura da dispersão de hidrolisado de soja com a solução de metal nas concentrações determinadas pelo ponto de equivalência, mantendo-se a dispersão em agitação por 60 minutos e por fim as secando as dispersões por liofilização.

3.2.11. Avaliação espectroscópica da interação peptídeo de soja com metal

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível das amostras em pó foram obtidos através do espectrômetro Cary 5G utilizando uma esfera de integração. Os espectros foram coletados no intervalo de 200 a 800 nm, em intervalos de 0,5 nm e tempo de integração de 1 s, utilizando sulfato de bário como padrão de reflectância.

3.2.12. Quantificação do metal ligado ao hidrolisado proteico de soja

Duas técnicas distintas foram utilizadas para a quantificação do metal ligado ao hidrolisado: espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para os metais ferro, manganês e zinco e absorção atômica para o cobre.

Para o ICP-MS as amostras foram previamente diluídas em solução de ácido nítrico a 1 % para então serem quantificadas. Já na absorção atômica a amostra foi calcinada em mufla a 600 °C por 24 horas com posterior solubilização com HNO₃ e HCl na relação 1:4 (v/v) em aquecimento e diluída em água deionizada para a posterior quantificação.

VIABILIDADE ECONÔMICA DO PROJETO

3.2.13. Análise da viabilidade econômica do projeto

A determinação da viabilidade econômica do processo de produção dos derivados do farelo de soja (proteína, hidrolisado proteico e complexo peptídeo-metal) consistiu basicamente em duas etapas: esquematização do processo produtivo e estruturação da análise de viabilidade econômica.

3.2.13.1. Esquematização do processo produtivo

O processo de produção foi definido baseado nos experimentos realizados em laboratório. Para o dimensionamento do processo foi estipulada uma produção diária de cada produto e feita a seleção dos equipamentos de acordo com a capacidade necessária para o volume de produção estipulado. Com base no volume de produção e dimensão dos equipamentos foram estipulados área física, mão de obra e outros parâmetros relacionados à produção como descritos a seguir.

Equipamentos

Os equipamentos foram selecionados de acordo com a capacidade produtiva e adequação ao processo. Para isso foram realizadas pesquisas com diversas empresas e após a avaliação criteriosa de cada equipamento selecionou-se o mais adequado.

Área física

A área física foi estipulada considerando-a um barração anexo a uma empresa já existente. Foi calculada tanto com base na dimensão e disposição dos equipamentos selecionados, quanto para facilitar o livre fluxo da mão de obra e materiais empregados.

Mão de obra

A mão de obra empregada no processo produtivo foi baseada no volume de produção e nas atribuições técnicas específicas necessárias para cada profissional. Optando por dois funcionários sendo um de nível básico (auxiliar de produção) e um farmacêutico com responsabilidade técnica.

Matéria-prima e embalagem

As matérias-primas foram selecionadas mantendo as mesmas características e padrão de qualidade das utilizadas para o desenvolvimento dos produtos em laboratório. As embalagens foram selecionadas de acordo com as características adequadas aos produtos a serem veiculados nelas.

Tempo de processo e consumo energético

O tempo de processo foi estipulado baseado nos experimentos realizados em laboratório e nas informações técnicas fornecidas pelo fabricante. O cálculo do consumo de energia elétrica para cada equipamento foi determinado com base na potência (KW) do equipamento e tempo de cada processo.

3.2.13.2. Estruturação da análise de viabilidade econômica

A viabilidade econômica foi determinada em duas etapas, sendo que inicialmente todos os custos de produção foram determinados para então ser realizado o cálculo da viabilidade econômica propriamente dita.

3.2.13.2.1. Custos do projeto

3.2.13.2.1.1. Custo de implantação

O custo de implantação do projeto foi definido como o custo da infraestrutura necessária para a produção, sendo nesse projeto esse custo relacionado aos equipamentos como detalhado a seguir:

Equipamentos

A seleção dos equipamentos foi realizada de acordo com a capacidade produtiva e adequações ao processo. Quando mais de um equipamento foi considerado adequado ao mesmo processo, o valor utilizado para os cálculos foi a média dos valores fornecidos pelos fabricantes.

3.2.13.2.1.2. Custos fixos

Custos fixos são aqueles existentes independentemente do nível de produção, ou seja, seu valor não varia com o volume de produto produzido (MARTINS, 2006a). Neste trabalho os custos fixos foram:

Aluguel

Após dimensionar a área física adequada ao processo produtivo, o valor do aluguel foi estipulado a partir da média dos valores obtidos para o m² fornecidos por imobiliárias (referentes ao primeiro semestre de 2011), para terrenos industriais na região de Ribeirão Preto.

Depreciação

Para esse estudo a depreciação corresponde à redução do valor dos equipamentos utilizados no processo produtivo devido ao desgaste pelo uso, ação da natureza ou obsolescência (SCHMIDT; SANTOS, 2011)

A taxa de depreciação de um bem é fixada em função do prazo que é esperada a utilização econômica do bem e o seu valor residual ao final desta. Esses valores são fornecidos pela instrução normativa SRF n° 162 a qual fixa o tempo de vida útil de um bem e a taxa anual de depreciação, para uma jornada diária de 8 horas de trabalho. Para os equipamentos utilizados nesse estudo, o tempo de vida útil estipulado pela SRF n°162 é de dez anos com uma taxa de depreciação de 10 % ao ano (BRASIL, 2011).

3.2.13.2.1.3. Custos diretos e custos variáveis de produção

Os custos diretos são aqueles diretamente ligados à produção. Nesse trabalho, os custos diretos também podem ser classificados como custos variáveis visto que sofrem variação de acordo com o volume de produção (MARTINS, 2006a). Estes custos foram:

Mão de obra direta

O custo da mão de obra empregada, para o nível técnico e nível com responsabilidade técnica, foi estipulado com base nos dados fornecidos pelo Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo (CRF-SP, 2011) e por valores fornecidos por indústrias farmacêuticas na Região de Ribeirão Preto.

Matéria-prima e embalagem

As matérias-primas e embalagens foram orçadas diretamente com o fabricante ou com empresas representantes. Para o farelo de soja, o preço foi estipulado com base nos últimos 5 anos (janeiro/2007 a julho/2011) pelos dados fornecidos pela Associação Brasileira das

Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2011) para a cotação média em São Paulo. Para as embalagens foi estipulado um preço médio baseado nos valores obtidos com fabricantes.

Consumo de energia dos equipamentos

O cálculo do consumo de energia para cada equipamento foi determinado com base na potência (KW) do equipamento e tempo de cada processo. Sendo o valor em Reais (R\$) calculado com base nos valores médio do KWh dos últimos nove anos no Estado de São Paulo determinados pela Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL, 2011).

3.2.13.2.2. Levantamento dos valores de mercado dos produtos derivados da soja

Foram realizadas pesquisas orçamentárias dos produtos disponíveis no mercado com as mesmas especificações ou similares aos produzidos neste trabalho (valores referentes ao primeiro semestre de 2011).

3.2.13.3. Cálculo da viabilidade econômica

A viabilidade do projeto foi determinada utilizando os métodos de Valor Presente Líquido (VPL) e simulação de Monte Carlo para um período de 60 meses (cinco anos). Os cálculos foram realizados como descritos a seguir:

3.2.13.3.1. Simulação de Monte Carlo

O método de Simulação de Monte Carlo utilizado foi baseado no trabalho de Esteves (2010). Pela simulação foi possível avaliar o impacto de possíveis flutuações dos diversos custos do projeto (ex: custo de matéria-prima) no resultado do VPL (BRIGHAM; GAPENSKI; EHRAHRDT, 2001).

Inicialmente determinaram-se todos os custos de produção com os seus respectivos valores médios e desvio padrão da media (baseados em diversas cotações e valores

Material e Métodos

48

históricos). Para os custos os quais não foi possível determinar-se um valor médio, a variação

foi determinada em 10 % para mais e para menos do valor obtido.

Em seguida os custos fixos e variáveis, a receita e a margem de contribuição (MC)

foram esquematizados em uma planilha, no programa Microsoft Office Excel 2007, que gerou

como resultado o fluxo de caixa para o período (figura 6).

A margem de contribuição foi determinada pela diferença entre a receita gerada (preço

médio de venda multiplicado pela produção no período) e o custo variável de produção

(MARTINS, 2006b), sendo que quando um produto foi dependente da produção de um

anterior (ex: complexos são dependentes da produção do hidrolisado) a margem de

contribuição do produto de partida (ex: hidrolisado) foi incluída no cálculo da margem de

contribuição do produto derivado (ex: complexo), sendo determinada assim uma margem de

contribuição total (MCT).

A margem de contribuição pode ser calculada genericamente pela fórmula a seguir:

MC = R - (MP + En + Eb + MO)

Onde:

MC: margem de contribuição

R: receita gerada pelo produto

MP: custo de matéria-prima

En: custo de energia elétrica consumida no processo

Eb: custo de embalagem

MO: mão de obra direta

A partir desses valores foi gerado com o uso da simulação de Monte Carlo um

conjunto de números pseudoaleatórios para cada parâmetro, variando entre o intervalo do

desvio padrão dos valores médios ou em 10 % como o proposto dando a origem a mil

resultados de fluxo de caixa (figura 6).

Experimento	Equipamentos	Receita	MP - Farelo	Outras M.P. E1	Energia E1	Depreciação	Embalagem	MC1	MOD	Aluguel	Resultado
1	182.891,37	50.417,28	434,94	912,20	4.836,70	18.289,14	397,18	25.547,12	47.864,69	6.652,50	-28.970,07
2	182.891,37	50.404,97	434,95	911,07	4.836,73	18.289,14	397,28	25.535,80	47.864,69	6.663,05	-28.991,94
3	182.891,37	50.402,42	434,90	926,52	4.836,79	18.289,14	397,21	25.517,86	47.864,69	6.668,77	-29.015,60
4	182.891,37	50.427,25	434,92	900,70	4.836,76	18.289,14	397,32	25.568,41	47.864,69	6.678,75	-28.975,03
5	182.891,37	50.429,13	434,84	906,52	4.836,74	18.289,14	397,34	25.564,55	47.864,69	6.657,53	-28.957,67
6	182.891,37	50.406,98	434,82	920,27	4.836,75	18.289,14	397,49	25.528,51	47.864,69	6.648,79	-28.984,97
7	182.891,37	50.396,22	435,00	925,39	4.836,72	18.289,14	397,40	25.512,57	47.864,69	6.662,73	-29.014,85
8	182.891,37	50.405,53	434,78	910,56	4.836,74	18.289,14	397,17	25.537,14	47.864,69	6.655,93	-28.983,48
9	182.891,37	50.405,33	434,87	927,77	4.836,79	18.289,14	397,42	25.519,34	47.864,69	6.657,82	-29.003,17
10	182.891,37	50.378,64	434,84	912,83	4.836,77	18.289,14	397,24	25.507,82	47.864,69	6.635,55	-28.992,42
11	182.891,37	50.409,65	434,88	945,01	4.836,74	18.289,14	396,88	25.507,00	47.864,69	6.649,25	-29.006,94
12	182.891,37	50.401,88	434,78	916,62	4.836,75	18.289,14	397,39	25.527,20	47.864,69	6.638,38	-28.975,87
13	182.891,37	50.419,42	434,95	924,01	4.836,79	18.289,14	397,29	25.537,24	47.864,69	6.662,79	-28.990,24
14	182.891,37	50.397,12	434,96	914,48	4.836,70	18.289,14	397,29	25.524,55	47.864,69	6.641,60	-28.981,74
15	182.891,37	50.388,57	434,95	908,11	4.836,76	18.289,14	397,09	25.522,52	47.864,69	6.665,67	-29.007,84
16	182.891,37	50.402,14	434,94	913,80	4.836,69	18.289,14	397,27	25.530,30	47.864,69	6.654,49	-28.988,88
17	182.891,37	50.409,20	434,90	913,06	4.836,77	18.289,14	397,41	25.537,92	47.864,69	6.644,08	-28.970,85
18	182.891,37	50.419,94	435,06	922,97	4.836,67	18.289,14	397,40	25.538,70	47.864,69	6.658,31	-28.984,30
19	182.891,37	50.407,57	434,94	906,31	4.836,73	18.289,14	397,33	25.543,12	47.864,69	6.650,55	-28.972,12
20	182.891,37	50.375,89	435,00	926,39	4.836,72	18.289,14	397,03	25.491,61	47.864,69	6.638,62	-29.011,70
21	182.891,37	50.396,57	434,92	922,72	4.836,73	18.289,14	397,59	25.515,47	47.864,69	6.650,24	-28.999,46
22	182.891,37	50.398,95	435,01	901,36	4.836,69	18.289,14	397,21	25.539,54	47.864,69	6.659,31	-28.984,46
23	182.891,37	50.396,94	434,80	887,06	4.836,74	18.289,14	397,43	25.551,77	47.864,69	6.640,98	-28.953,90
24	182.891,37	50.412,19	434,66	926,83	4.836,68	18.289,14	397,51	25.527,37	47.864,69	6.665,70	-29.003,02

Figura 6. Exemplo dos resultados aleatórios gerados pela Simulação de Monte Carlo para o cálculo da viabilidade econômica do projeto.

A partir destes resultados foram calculados uma distribuição de valores de VPLs.

3.2.13.3.2. Determinação do Valor Presente Líquido (VPL)

A distribuição de VPLs foi calculada somente para aqueles produtos os quais os resultados da simulação de Monte Carlo apresentaram pelo menos uma faixa de resultados positivos. O VPL foi de terminado para um período de 60 meses.

Após a obtenção dos resultados do fluxo de caixa o VPL foi calculado pelo valor presente dos fluxos futuros de caixa (valor obtido dos fluxos de caixa descontado de uma taxa de juros, sendo utilizada a taxa Selic para esse estudo) subtraído do valor presente do custo do investimento, com o uso do programa Microsoft Office Excel 2007 (ROSS; WESTERFIELD; JAFFE, 2002a) de acordo com a fórmula a seguir.

$$VPL = -C_0 + \sum_{i=1}^{T} \frac{C_i}{(1+r)^i}$$

Onde:

C₀: Fluxo inicial (negativo, pois, representa uma aplicação);

i: quantidade de tempo;

T: Duração total do projeto;

r: Custo do capital ou taxa de desconto do projeto (Taxa Selic);

C_i: Fluxo de caixa no período.

Para a determinação da distribuição do VPL para o período de 60 meses foram geradas cinco simulações de resultados de fluxo de caixa através da simulação de Monte Carlo correspondendo a um período de 12 meses cada (um ano). Cada resultado gerado foi utilizado para o cálculo do VPL correspondente como mostrado na figura 7 a seguir.

Resultado - Ano 1	Resultado - Ano 2	Resultado - Ano 3	Resultado - Ano 4	Resultado - Ano 5	VPL
86749	76303	80233	81534	79036	139249
87361	76855	77954	81060	81256	141130
85491	77103	81484	82630	79283	154825
88126	76039	81710	78758	80670	146015
88022	79207	80253	82103	79241	146470
88276	77655	78656	82250	82865	144138
88069	76753	81413	83504	78634	152703
85606	76161	76874	78900	79807	141067
86943	74797	79780	80103	80413	148289
82501	75253	78699	82423	81598	141930
87484	78007	79440	81207	82270	144728
81767	79643	78684	78692	81507	150256
85804	74337	78515	81344	82774	139715
88323	76348	77917	83257	81317	148933
88474	75633	81474	80136	79290	141257
84971	73023	82491	80684	83776	138963
84386	75706	81453	81810	80908	138366
87269	76732	82675	77684	80174	147378
88441	78402	77685	82910	80305	147576
82257	77592	79757	83578	79554	137298
85144	77696	79450	78055	78677	136544

Figura 7. Fluxos de caixa obtidos para cada período e determinação do VPL.

Os resultados obtidos para os VPLs foram utilizados para a construção de um gráfico do tipo histograma com o auxílio do programa SPSS – Statistic Data Editor, o qual apresentou uma faixa de distribuição (frequência e frequência cumulativa) de VPL, onde a região na qual

o gráfico apresentou resultados positivos indicou a probabilidade em porcentagem de sucesso do projeto, já a região de VPL negativo foi considerada a probabilidade de insucesso do projeto (ROSS; WESTERFIELD; JAFFE, 2002b).

3.2.13.3.3. Determinação da correlação entre as variáveis do processo

Após a determinação do VPL foi avaliada a correlação (grau de associação) entre as variáveis do processo de obtenção do complexo de zinco com o auxílio do programa SPSS – Statistic Data Editor. Nessa análise utilizou-se o método de Pearson (correlação bivariada).

O método de Pearson foi empregado para o cálculo da correlação entre as variáveis VPL com a margem de contribuição 2 (MC) (correspondente aos custos relacionados à produção do hidrolisado), MC 3 (produção do complexo) e MC total (MCT - somatória das margens de contribuição).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Padronização do tamanho de partícula do farelo de soja

O tamanho de partícula é um dos fatores determinantes na eficiência do processo extrativo, a redução do tamanho das partículas aumenta a superfície de contato matéria-prima/solvente refletindo num melhor rendimento da extração (NORIEGA et al., 2005). No caso de matéria prima de origem vegetal, a divisão desta em partículas de tamanhos reduzidos, leva à laceração dos tecidos vegetais facilitando a hidratação, permeação do solvente no interior das células e dissolução de seus componentes com reflexo positivo na redução do tempo de extração e na eficiência do processo (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1975).

Em nosso estudo, utilizamos como fonte de proteína o farelo comercial de soja. Este apresenta tamanhos de partículas grandes e de formato irregulares, portanto, inadequados para uma extração proteica mais efetiva. Assim o primeiro procedimento foi cominuí-lo para obtenção de partículas de tamanhos menores e mais regulares.

A cominuição do farelo de soja levou à redução dos tamanhos das partículas. Esse farelo cominuído apresentou ampla faixa de distribuição de diâmetro de partícula, todavia é evidente a concentração da maioria das partículas na faixa de 200 a 1200 μm com diâmetro médio de 468,9 μm (figura 8).

A tabela 6 apresenta a distribuição granulométrica cumulativa do farelo de soja cominuído e indica que 50% dos grânulos apresentam diâmetro médio inferior a 497,7 μm.

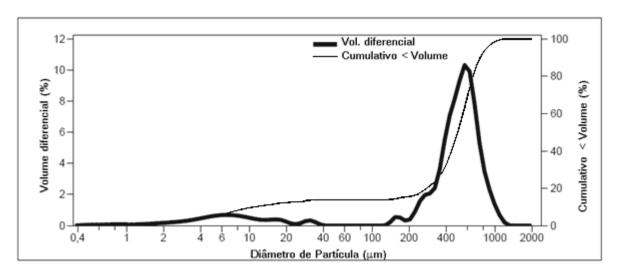


Figura 8. Distribuição do tamanho de partículas do farelo de soja.

Tabela 6. Distribuição granulométrica cumulativa do farelo de soja cominuído.

Porcentagem da	Diâmetro da partícula
amostra	(µm)
< 10 %	10,88
< 25 %	341,7
< 50 %	497,7
< 75 %	630,9
< 90 %	762
< 100 %	1377

A partir da determinação da distribuição granulométrica, uma amostra do farelo de soja cominuído foi tamisada em malha de 100 mesh, cuja abertura de malha corresponde a 150 μm, obtendo assim duas frações, uma com partículas superior a 150 μm, denominada de farelo A e outra igual ou inferior a 150 μm denominada de farelo B. As duas amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração como descritos no item 3.2.3.

O farelo B proporcionou o maior rendimento no processo extrativo (251,26 mg de proteína/g de farelo), sendo 13,2% superior ao rendimento obtido com o farelo A (tabela 7). O resultado apresentado na tabela 7 mostra que a diferença do rendimento ocorreu principalmente devido a melhor extração das proteínas consideradas menos solúveis em pH 7,5. A amostra com tamanhos de partículas menores apresenta uma maior superfície de contato entre a partícula e o solvente, facilitando a permeação do solvente no tecido vegetal e

como consequência uma maior solubilização de compostos considerados menos solúveis (NORIEGA et al., 2005). No caso do farelo B esse processo é evidente visto que a redução das partículas levou a uma maior extração das proteínas menos solúveis presentes na soja.

Tabela 7. Influência da redução do tamanho de partícula na extração

da proteína de soja.

au proteina at soja.		
Proteína	Farelo A	Farelo B
Flotenia	(mg/g farelo)	(mg/g farelo)
Total	221,94	251,26
*Solúvel	211,84	191,58
**Insolúvel	10,10	59,68

*Proteínas solúveis em pH 7,5; **Proteína insolúveis em pH 7,5.

Farelo A: partículas maiores que 150 µm; Farelo B: partículas menores que 150 µm.

Apesar da relativa melhora no rendimento de extração do farelo B em relação ao farelo A, a redução do tamanho das partículas dificultou o processo de filtração, sendo essa dificuldade também relatada por Green e Perry (2008).

O processo de filtração baseia-se na separação da fração sólida em suspensão por intermédio de uma membrana porosa, onde a grande maioria do fluído atravessa a membrana enquanto que a maior parte das partículas sólidas contidas na mistura fica retida. Vários fatores influenciam a eficiência da filtração, dentre os quais o tipo de particulado (orgânico ou inorgânico), temperatura da amostra a ser filtrada (viscosidade do meio), característica das partículas sólidas quando submetidas à pressão (rígidas, semicompressíveis e compressíveis) e diâmetro médio das partículas (GREEN; PERRY, 2008).

A filtração normalmente leva a formação de uma camada denominada torta ou bolo sobre a superfície do elemento filtrante, esta também acaba funcionando como elemento filtrante. No entanto, para que a filtração seja eficiente é necessário que entre as partículas se formem pequenos poros (canalículos) que permitam a permeação do líquido através da camada filtrante como ilustrado na figura 9 (GREEN; PERRY, 2008; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1975).

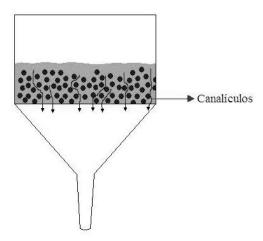


Figura 9. Representação esquemática da formação de canalículos na torta durante o processo de filtração (adaptado de Prista, Alves e Morgado (1975)).

A presença de partículas muito pequenas leva a formação de uma torta compacta e pouco porosa, podendo ser ainda mais compacta se o material sólido a ser filtrado apresenta características semicompressíveis como o farelo de soja, o que dificulta a passagem do fluído pela torta e a filtração, assim o farelo B, que contém somente partículas menores que 150 μm, não foi considerada o mais adequada para o processo, visto que a maior concentração de partículas muito pequenas dificulta ainda mais a filtração da dispersão.

A filtração do farelo cominuído sem a separação por tamanho de partículas mostrou ser menos trabalhosa, pois proporcionou torta menos compacta. Assim, apesar da perda no rendimento de extração, optamos dar continuidade aos experimentos utilizando-se desta farelo de soja devido a menor dificuldade na filtração.

4.2. Padronização da temperatura de extração

A temperatura durante o processo extrativo também é um parâmetro que influencia no rendimento, pois dependendo da temperatura do meio, a solubilidade do composto a ser extraído pode aumentar ou diminuir. Na maioria das vezes, o aumento da temperatura, até certo limite, favorece a solubilidade de diversos compostos e consequentemente melhora o rendimento da extração (OLIVEIRA; GÓMEZ, 2005; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1975).

Nesse trabalho foi avaliada a influência da temperatura na extração da proteína de soja, sendo escolhidas as temperaturas de 25° e 55 °C. Durante o experimento, o farelo de soja

foi submetido a duas extrações consecutivas onde também foi avaliada a influência do número de extrações para o rendimento final do processo.

De acordo com os resultados mostrados na tabela 8 o processo de extração conduzido a 55 °C apresentou rendimento aproximadamente 12 % maior do que a 25 °C, no entanto, quando a reextração é realizada a quantidade total de proteína extraída praticamente se iguala, reduzindo a diferença para 3 %. Esses resultados deixam evidente a influência da temperatura no rendimento desse processo, visto que a temperatura mais alta aumentou a solubilidade da proteína no líquido extrator e consequentemente apresentou um melhor rendimento logo na primeira extração. No caso da extração a 25 °C a reextração exerceu um maior impacto no rendimento final, sendo mais um indicativo que essa temperatura limita a solubilidade da proteína da soja.

Tabela 8. Influência da temperatura no processo de extração do farelo de soja cominuído.

	Proteína (mg)/farelo (g)				
	25 °C	55°C			
Extração	258,95	289,47			
Reextração	52,26	31,16			
Total	311,21	320,63			

Após a mistura do sobrenadante da extração e reextração as proteínas foram precipitadas com a redução do pH do meio até o ponto isoelétrico (pH 4,5), os resultados da tabela 9 mostram que a quantidade de proteína que permanece solúvel e portanto é perdida no processo é praticamente equivalente para as duas temperaturas.

Considerando somente a primeira extração, o processo conduzido a 55 °C foi considerado mais eficiente e, definido como processo padrão com etapa única de extração.

Tabela 9. Proteína recuperada após a extração e reextração do farelo de soja cominuído.

•	Proteína (n	ng)/farelo (g)			
-	25 °C 55°C				
Sobrenadante					
(descarte)	41,02	43,39			
Proteína recuperada	240,24	259,09			

4.3. Avaliação da relação massa de farelo/volume do líquido extrator

A determinação da relação ideal massa/volume do líquido extrator é essencial para a não saturação do meio receptor fazendo com que a extração da substância desejada seja feita da maneira mais eficiente possível. A extração por maceração é predominantemente regida pelas leis da difusão de substâncias de um meio com maior concentração (nesse caso o farelo de soja) para um meio com menor concentração (no caso o solvente/solução aquosa de NaOH).

A diferença de gradiente é primordial para que haja um fluxo com menor impedimento possível da substância desejada em direção ao solvente. Isso pode ser realizado de duas formas distintas: a troca sequencial do solvente (reextração) ou a utilização de uma quantidade de solvente que evite a sua saturação (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1975).

Os resultados apresentados na tabela 10 mostram que a quantidade de proteína extraída aumenta com o aumento da quantidade do solvente, resultados similares foram relatado por Neves, Lourenço e Silva (1998), que observaram um aumento progressivo de proteína extraída de outra leguminosa (lentilha) com o aumento do volume do solvente. Em nosso trabalho o rendimento do processo extrativo, utilizando uma relação farelo/solvente de 1:30 (m/v) foi aproximadamente 3 vezes maior que o obtido com a relação 1:10 (m/v). Esses resultados sugerem que até a relação de 1:20 (m/v) a quantidade de solvente foi limitante na extração devido ao equilíbrio entre a concentração de proteína no farelo e no solvente, condição que impediu a continuidade da migração das proteínas do farelo em direção ao solvente.

Até a relação 1:30 (m/v) houve um evidente aumento da quantidade de proteína extraída, com a adição de mais solvente (1:50 m/v) não houve alteração relevante no rendimento da extração, ou seja, a relação 1:30 de farelo/solvente foi a ideal para a extração pois não leva à restrição da migração das proteínas em direção ao solvente e ao mesmo tempo otimiza a quantidade de solvente utilizada.

Relação	Proteína extraída/
Massa/Volume	farelo (mg/g)
1:10	86,04
1:20	156,3
1:30	257,26
1:50	267,15

Tabela 10. Efeito da relação farelo/solvente no rendimento extrativo da proteína de soia

4.4. Métodos extrativos e teor de proteína

Com base nos experimentos anteriores, foram estabelecidos os parâmetros para dar continuidade ao trabalho. A temperatura do processo extrativo foi fixada em 55 ± 2 °C; tempo de extração 45 minutos; pH 9,0; relação de farelo/volume de solução extrativa de 1:10 e 1:30 (m/v).

A fim de se evitar a formação de uma grande quantidade de sais, optou-se por trabalhar com o pH 9,0, um pouco abaixo do utilizado nos experimentos preliminares, porém ainda considerado ótimo para o rendimento extrativo.

Ainda decidiu-se por trabalhar com duas relações de farelo/solvente com o objetivo de avaliar não somente a quantidade de proteína extraída, mas também a influência da diluição na composição do extrato.

Baseando-se no trabalho de L'Hocine, Boye e Arcand (2006), foram realizados três métodos de extração, descritos nas figuras 1, 2 e 3. Para facilitar a identificação, os métodos foram denominados *extração padrão* (figura 1); *extração com precipitação a quente* (figura 2) e *extração com pré-tratamento ácido* (figura 3).

Para cada processo extrativo e relação farelo/solvente foi necessário realizar várias repetições dos experimentos, pois houve uma grande dificuldade na padronização da etapa de filtração pós-extração o que poderia implicar diretamente no rendimento final (massa bruta de extrato obtida).

Todos os experimentos foram feitos em triplicata, utilizando de 40g de farelo de soja, com teor proteico de 43,26 % e 6,64 % de cinza. Após as extrações o teor de proteína foi determinado no extrato proteico e no farelo residual

O rendimento bruto em massa para os três métodos variou entre 8 e 15 g como mostrado na tabela 11.

Tabela 11. Rendimento em massa (g) dos extratos proteicos obtidos a partir de 40g de farelo de soja cominuído.

	Massa de extrato (g)					
Método	Extrato	Extrato	Extrato	Média	Desvio	
Extrativo	1	2	3	Media	Padrão	
Á quente 1:10*	13,43	12,67	12,38	12,83	0,54	
Á quente 1:30	14,79	12,71	12,58	13,36	1,24	
Ácida 1:10**	9,08	8,99	8,61	8,89	0,25	
Ácida 1:30	9,10	8,06	8,48	8,55	0,52	
Padrão 1:10***	15,32	12,36	12,33	13,34	1,72	
Padrão 1:30	15,52	13,96	12,88	14,12	1,33	

^{*}Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

Já a massa de farelo de soja residual está apresentada na tabela 12 a seguir.

Tabela 12. Massa (g) de farelo residual da extração proteica.

N Farelo	Aassa de re	esíduo (g)						
Egralo		Massa de resíduo (g)						
raieio	Farelo	Farelo	M (1) -	Desvio				
1	2	3	Media	Padrão				
14,05	15,23	14,88	14,72	0,61				
12,69	13,72	13,46	13,29	0,53				
14,13	13,40	13,19	13,57	0,49				
11,98	14,28	12,63	12,96	1,18				
13,94	16,07	15,15	15,05	1,07				
12,21	13,31	13,27	12,93	0,62				
	1 14,05 12,69 14,13 11,98 13,94	1 2 14,05 15,23 12,69 13,72 14,13 13,40 11,98 14,28 13,94 16,07	1 2 3 14,05 15,23 14,88 12,69 13,72 13,46 14,13 13,40 13,19 11,98 14,28 12,63 13,94 16,07 15,15	1 2 3 Média 14,05 15,23 14,88 14,72 12,69 13,72 13,46 13,29 14,13 13,40 13,19 13,57 11,98 14,28 12,63 12,96 13,94 16,07 15,15 15,05				

^{*}Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

Os resultados mostrados na tabela 11, revelam que apesar da dificuldade em padronizar o processo extrativo, principalmente na etapa de filtração, as triplicatas

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C.

^{**}Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C. *Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

apresentaram valores bem próximos e com um pequeno desvio padrão entre as massas obtidas, o que é consequência da boa reprodutibilidade dos processos.

Quando comparamos a quantidade de extrato bruto para cada um dos três métodos de extração o método padrão foi aquele que apresentou uma média mais alta de rendimento em massa bruta (principalmente a proporção 1:30 (m/v)), para os farelos residuais os valores médios ficaram bem próximos excetuando-se os provenientes da extração padrão e com precipitação a quente, ambas na relação 1:10 (m/v) que apresentaram valores um pouco acima da média.

Ao realizarmos a somatória do extrato proteico com seu respectivo farelo residual é notada uma diferença de aproximadamente 15 g a menos em relação à massa de farelo inicial (40 g). Como a extração da proteína consiste na sua solubilização para a extração do interior do tecido vegetal e a sua posterior precipitação no ponto isoelétrico (pH 4,5), todas essas etapas implicam em perdas, ao longo da extração, de diversos componentes incluindo as proteínas que possam ainda apresentarem-se solúveis em pH 4,5 e que por sua vez são descartadas junto ao sobrenadante.

Dando continuidade na avaliação dos extratos e do farelo residual, a determinação do teor de proteína presente em ambos para cada um dos três métodos foi realizada empregandose o método de Kjeldahl (MILLER; HOUGHTON, 1945). Os resultados obtidos para os extratos, apresentados na tabela 13, mostram que para os métodos de extração padrão e precipitação a quente, a relação 1:30 (m/v) apresentou um maior teor de proteína quando comparados à 1:10 (m/v), comprovando novamente a influência do volume de solvente no rendimento da extração. No entanto, o método de extração com pré-tratamento ácido não apresentou diferença real entre as duas relações. Tal resultado já era esperado visto que o pré-tratamento ácido logo no início de todo o processo possivelmente é responsável pela extração de vários compostos, incluindo algumas proteínas, diminuindo a chance de saturação do solvente durante a extração em pH alcalino mesmo quando em menor volume (relação 1:10).

40014 201 1001 40 P	1 (, o) P			5,4	
Método	Extrato	Extrato	Extrato	MALL	Desvio
Extrativo	1	2	3	Média	Padrão
Á quente 1:10*	86,1	76,4	87,4	83,3	6,0
Á quente 1:30	78,5	87,3	92,1	85,9	6,8
Ácida 1:10**	80,1	87,9	93,0	87,0	6,5
Ácida 1:30	83,9	84,9	91,6	86,8	4,1
Padrão 1:10***	80,7	77,1	80,1	79,3	1,9
Padrão 1:30	87.0	79.8	85.1	84.0	3.7

Tabela 13. Teor de proteína (%) presente no extrato de soja.

Os resultados da tabela 13 também mostram que independentemente do método extrativo, os teores de proteína foram acima de 75 %, sendo concordantes com os resultados apresentados por L'Hocine, Boye a Arcand (2006). Como o teor proteico ficou acima de 70 % os extratos podem ser classificados como concentrado proteico de soja (ALIBHAI et al., 2006).

Já a quantificação das proteínas presentes no farelo residual, mostrada na tabela 14, não mostrou grande diferença entre os métodos utilizados. Os resultados obtidos levam a concluir que uma determinada fração da proteína dificilmente será removida com a alteração de parâmetros básicos da extração (temperatura, pH, volume de solvente etc.), sendo necessário a utilização de outras técnicas para uma melhor extração. A extração incompleta pode ser explicada pela possível ocorrência de interações de algumas proteínas com compostos constituintes do tecido vegetal, tal como a celulose, o que dificulta a sua extração completa (CAPOBIANGO et al., 2006). A adição de enzimas do tipo carboidrases poderia ter um efeito benéfico durante a extração, porém esse efeito também seria limitado com constatado por Fisher et al. (2001).

^{***}Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C.

^{**}Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

	% Proteína					
Método	Farelo	Farelo	Farelo		Desvio	
Extrativo	1	2	3	Média	Padrão	
Á quente 1:10*	40,1	36,2	45,7	40,7	4,8	
Á quente 1:30	36,6	37,6	42,1	38,8	2,9	
Ácida 1:10**	41,3	44,8	48,0	44,7	3,3	
Ácida 1:30	39,5	46,0	43,1	42,9	3,3	
Padrão 1:10***	45,1	37,7	42,6	41,8	3,7	
Padrão 1:30	43,4	34,9	37,9	38,8	4,3	

Tabela 14. Teor de proteína (%) presente no farelo residual da extração proteica.

Quando se realizou a comparação da massa de proteína presente no extrato e no farelo residual em relação à massa inicial de proteína presente no farelo de soja (43,26 %) os resultados se mostraram concordantes com os já obtidos anteriormente. Os valores mostrados na tabela 15 revelam que apesar de um conteúdo proteico mais alto do extrato proveniente da extração com pré-tratamento ácido, a quantidade total de proteína extraída foi marcadamente inferior quando comparada aos outros métodos, o que foi determinante para a exclusão deste como o método para a obtenção do extrato proteico de soja.

Tabela 15. Teor de proteína (%) recuperado em relação à proteína presente no farelo de soja.

Método	Extrato	Extrato	Extrato		Desvio
Extrativo	1	2	3	Média	Padrão
Á quente 1:10*	66,9	55,9	62,5	61,8	5,5
Á quente 1:30	67,1	64,1	66,9	66,0	1,7
Ácida 1:10**	42,0	45,7	46,3	44,6	2,3
Ácida 1:30	44,1	39,6	44,9	42,9	2,9
Padrão 1:10***	71,4	55,1	57,0	61,2	8,9
Padrão 1:30	78,1	64,4	63,3	68,6	8,2

^{***}Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

^{***}Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C.

^{**}Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C.

^{**}Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

Ainda analisando a tabela 15, vemos que os métodos de extração padrão e com precipitação a quente apresentaram uma maior quantidade de proteína extraída para a relação de 1:30 farelo de soja/solvente e um teor de proteínas praticamente equivalente (tabela 13), assim sendo necessário basear-se em outro critério, que não o de rendimento de extração, para a escolha do melhor método extrativo.

A tabela 16, apresenta a quantidade de proteína retida no farelo residual em relação à proteína inicial presente no farelo de soja, como já discutido anteriormente, há uma quantidade praticamente fixa de proteínas, que independentemente do método extrativo utilizado, dificilmente será removida sem o uso de outro artifício (ex: enzima).

Tabela 16. Quantidade de proteína (%) remanescente no farelo residual da extração proteica em relação à proteína presente no farelo de soja.

	% Proteína					
Método	Farelo	Farelo	Farelo		Desvio	
Extrativo	1	2	3	Média	Padrão	
Á quente 1:10*	32,5	31,9	39,3	34,6	4,1	
Á quente 1:30	26,9	29,8	32,8	29,8	2,9	
Ácida 1:10**	33,7	34,7	36,6	35,0	1,5	
Ácida 1:30	27,3	38,0	31,4	32,2	5,4	
Padrão 1:10***	36,3	35,0	37,3	36,2	1,1	
Padrão 1:30	30,6	26,9	29,1	28,9	1,9	

Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

Uma observação relevante que deve ser feita é que após a precipitação da proteína no método de extração padrão, esta rapidamente sedimentou, o que facilitou e reduziu o tempo de espera para a filtração, enquanto que na extração com precipitação a quente a sedimentação foi mais lenta, o que implicando em maior tempo de espera para filtração. Essa diferença no tempo de processamento foi um determinante para a escolha do método de extração padrão na relação 1:30 farelo de soja/solvente como o mais adequado para a continuação deste trabalho.

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C.

^{**}Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

Teor de cinza

Após a determinação do teor proteico e rendimento de extração o próximo passo foi determinar a quantidade de cinza presente no extrato e no farelo residual. O teor de cinzas no farelo de soja integral foi de 6,64%, valor um pouco acima dos 5 % encontrados por Silva et al. (2006), sendo os principais constituintes dessa cinza: potássio, cálcio, fósforo e manganês (VIEIRA; CABRAL; PAULA, 1999).

Para a determinação de cinzas em cereais a quantidade recomendada de amostra varia de 3 a 5 g dependendo da característica do material (CECCHI, 2007a), todavia, para esse trabalho foi utilizada uma quantidade menor de amostra (2 g). Esta massa foi escolhida devido ao grande volume ocupado nos cadinhos pelos extratos e farelo residual visto que estes foram secos por liofilização. Após todo o processo para a obtenção das cinzas, os valores obtidos das triplicatas foram muito próximos (tabelas 17 e 18), sendo assim a quantidade de amostra considerada apropriada.

Tabela 17. Porcentagem de cinza presente nos extratos proteicos.

% Cinza							
Método	Extrato	Extrato	Extrato		Desvio		
Extrativo	1	2	3	Média	Padrão		
Á quente 1:10*	4,12	5,16	4,69	4,65	0,52		
Á quente 1:30	3,36	3,31	3,36	3,34	0,03		
Ácida 1:10**	4,16	4,28	3,83	4,09	0,23		
Ácida 1:30	2,41	3,58	3,18	3,06	0,60		
Padrão 1:10***	6,22	5,38	5,96	5,85	0,43		
Padrão 1:30	4,10	4,53	3,91	4,18	0,32		

^{**}Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C.

Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

% Cinza Método Farelo Farelo Farelo 1 2 3 Extrativo Média Desvio Padrão $\acute{\rm A}$ quente 1:10 * 5,16 0,48 5,66 4,69 5,17 Á quente 1:30 4,32 3,36 3,66 0,57 3,31 Ácida 1:10** 3,23 4,28 3,83 3,78 0,52 Ácida 1:30 3,29 3,18 3,35 0,21 3,58 Padrão 1:10*** 5,55 5,96 0,30 5,38 5,63 Padrão 1:30 4,55 4,53 3,91 4,33 0,36

Tabela 18. Porcentagem de cinza presente no farelo residual da extração proteica.

Inicialmente acreditava-se que devido a utilização de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) e consequente formação de sal durante a extração, o teor de cinza nos extratos poderia ser maior do que no farelo de soja, porém isso não ocorreu (tabela 17), podendo atribuir essa redução à etapa final de filtração e eliminação dos saís inorgânicos solúveis.

Teor de umidade

O teor de umidade residual apresentado nas tabelas 19 e 20 mostra valores entre 5 e 6,5%.

^{**}Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C.

^{**}Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

Umidade %

Tabela 19. Porcentagem de umidade presente nos extratos proteicos.

Cimaade //							
Método	Extrato	Extrato	Extrato				
Extrativo	1	2	3	Média	Desvio Padrão		
Á quente 1:10*	4,50	5,40	6,72	5,54	1,12		
Á quente 1:30	4,25	5,81	6,23	5,43	1,04		
Ácida 1:10**	5,22	5,86	7,31	6,13	1,07		
Ácida 1:30	5,10	5,73	6,72	5,85	0,82		
Padrão 1:10***	3,89	5,54	5,79	5,07	1,04		
Padrão 1:30	4,80	6,72	7,34	6,28	1,33		

^{*}Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

Tabela 20. Porcentagem de umidade presente no resíduo de farelo residual da extração proteica.

		Umidade %				
Método	Farelo	Farelo	Farelo		Desvio	
Extrativo	1	2	3	Média	Padrão	
Á quente 1:10*	4,26	5,40	6,72	5,46	1,23	
Á quente 1:30	5,13	5,81	6,23	5,72	0,56	
Ácida 1:10**	4,65	5,86	7,31	5,94	1,33	
Ácida 1:30	4,86	5,73	6,72	5,77	0,93	
Padrão 1:10***	4,18	5,54	5,79	5,17	0,87	
Padrão 1:30	5,15	6,72	7,34	6,40	1,13	

^{***}Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

Outros componentes da amostra

Não foram realizadas dosagens específicas para carboidratos e gorduras, estes foram estimados pela diferença entre a massa de extrato obtido e a contribuição percentual da proteína, cinzas e umidade. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 21.

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C.

^{**}Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C.

^{**}Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

% média de resíduo Método Extrativo Farelo Extrato Á quente 1:10* 54,1 12,0 Á quente 1:30 57,5 10,7 Ácida 1:10** 8,9 51,5 Ácida 1:30 53,8 10,1 Padrão 1:10*** 52,5 14,8 Padrão 1:30 56,9 11,8

Tabela 21. Porcentagem de resíduos presentes nos extratos proteicos e farelo residual.

4.5. Ensaios enzimáticos

Após padronização do método extrativo iniciou-se a etapa de seleção de enzima e dos parâmetros adequados para a hidrólise proteica (relação enzima/substrato e tempo de hidrólise).

4.5.1. Determinação da relação enzima/substrato

Inicialmente avaliou-se a relação ideal entre enzima e proteína de soja (extrato de soja). Como descritos no item 3.2.6.1 foram utilizadas duas diluições das enzimas Alcalase® 2,4L, Neutrase® 0,8L e Flavourzyme® 1000L (1:100 e 1:200) e três concentrações de substrato (proteína de soja) 0,25; 0,5 e 0,75% (m/v).

Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 22 e 23:

^{***}Extração padrão: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 15 °C.

^{*}Extração com precipitação a quente: extração em pH 9,0, a 55 °C e precipitação em pH 4,5 a 55 °C.

^{**}Extração com pré-tratamento ácido: pré-extração em pH 4,5 a 55 °C e posterior extração padrão.

Tabela 22. Determinação da relação de substrato para enzima na diluição 1:100.

-	Unidades de absorvância/minuto					
-	Concentração de substrato (%)					
Enzima	0,25	0,5	0,75			
Alcalase® 2,4L	4,04	6,95	12,50			
Neutrase® 0,8L	2,30	3,64	6,94			
Flavourzyme® 1000L	1,29	4,43	0,79			

Reação conduzida em tampão fosfato 30 mmol/L e pH 7,5 a 55 °C por 10 min.

Tabela 23. Determinação da relação de substrato para enzima na diluição 1:200.

_	Unidades de absorvância/minuto					
_	Concentração de substrato (%)					
Enzima	0,25	0,5	0,75			
Alcalase® 2,4L	6,74	13,58	21,58			
Neutrase® 0,8L	3,80	6,22	8,80			
Flavourzyme® 1000L	3,43	3,69	3,01			

Reação conduzida em tampão fosfato 30 mmol/L e pH 7,5 a 55 °C por 10 min.

Comparando os resultados apresentados nas tabelas 22 e 23 é evidente que 0,75 % de concentração de substrato é adequada para a Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L, pois foi observado que o aumento da concentração de substrato no meio levou ao aumento das unidades de absorvância/minuto. No caso da Flavourzyme® 1000L o resultado se mostrou oposto, contudo, durante a realização do experimento, notou a não precipitação total do material proteico mesmo após a adição de TCA e centrifugação, mesmo no branco, o que provavelmente causou uma interferência nas leituras das amostras.

Por fim, de acordo com as condições experimentais, consideramos que a solução contendo o substrato a 0,75% foi a mais apropriada, sendo esta a utilizada nas etapas seguintes.

4.5.2. Validação do método de quantificação de tirosina

Para a quantificação do equivalente em tirosina liberado ao longo da reação enzimática, inicialmente foi realizada a validação do método de quantificação.

A curva analítica, obtida para a tirosina, apresentada na figura 10 mostra linearidade entre as concentrações de 10 e 100 μ g/mL com um R² de 0,9997 e equação da reta representada por y = 0,0069x + 0,0018, onde y corresponde à absorvância em 280 nm e x à concentração de tirosina em μ g/mL.

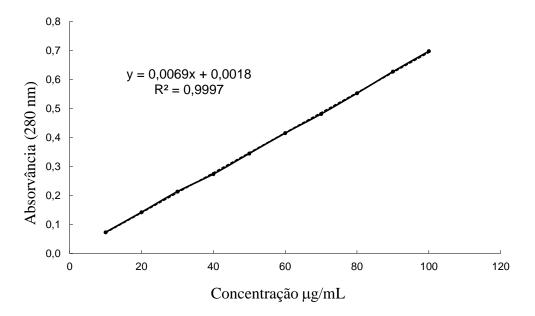


Figura 10. Curva analítica de tirosina em tampão fosfato 30 mmol/L (pH 7,5) (λ = 280nm).

Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), determinados conforme descrito no item 3.2.6.2.1, foram 0,58 µg/mL e 0,19 µg/mL respectivamente.

O método foi preciso, apresentando um desvio padrão relativo máximo de 4,18 % nas três concentrações avaliadas (baixa, média e alta), tanto para as medidas feitas intradias quanto interdias; também apresentou boa exatidão, com valores entre 97,61 e 100,76% nas determinações intradias e 98,75 e 98,90% nas interdias (tabela 24).

	Precisão (%)			Exatidão (%)			_	
Concentração	Intradias		Interdias	Intradias			Interdias	
$(\mu g/mL)$	Dia 1	Dia 2	Dia 3	merdias	Dia 1	Dia 2	Dia 3	interdias
20	4,18	1,07	1,96	1,77	100,76	97,88	97,61	98,75
50	2,12	0,76	0,20	0,95	99,95	98,44	98,22	98,87
90	1,16	0,60	0,20	0,64	99,21	98,18	99,32	98,90

Tabela 24. Precisão e exatidão para a quantificação da tirosina.

4.5.3. Avaliação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi avaliada com base no equivalente de tirosina liberada (µg tirosina/min).

Para os parâmetros de pH e temperatura foram utilizadas informações da literatura presentes nos trabalhos de Guadix et al. (2000), Yuan, Gu e Tang (2008), Ordóñes et al. (2008) e Damrongsakkul et al. (2008). Estes trabalhos relataram como condições ótimas, temperatura de 55 °C e pH 7,5 \pm 2, para a hidrólise proteica com as enzimas utilizadas em nosso trabalho.

Inicialmente avaliou-se o efeito da diluição da enzima na hidrólise da proteína de soja ao longo do tempo, obtendo os resultados apresentados nas figuras 11, 12 e 13.

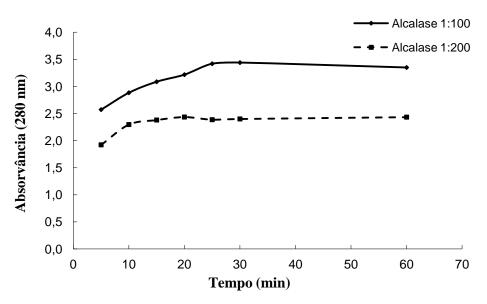


Figura 11. Perfil de hidrólise da proteína de soja com Alcalase® 2,4L com base na absorvância do sobrenadante.

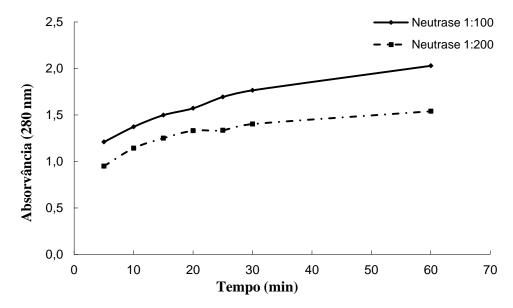


Figura 12. Perfil de hidrólise da proteína de soja com Neutrase® 0,8L: com base na absorvância do sobrenadante.

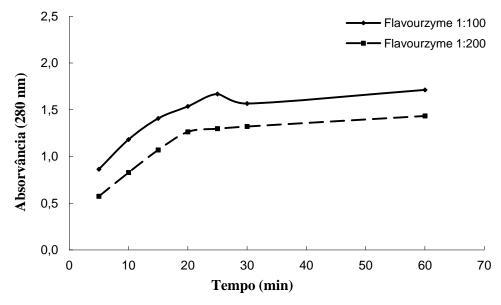


Figura 13. Perfil de hidrólise da proteína de soja com Flavourzyme® 1000L: com base na absorvância do sobrenadante.

Quando analisamos cada enzima os resultados mostraram perfis similares de hidrólise, contudo a quantidade de proteína hidrolisada mostrou ser dependente da concentração de enzima. O aumento da concentração enzimática levou uma maior hidrólise de proteína quando comparados os mesmos tempos de incubação, deixando evidente que a relação ideal proteína:enzima é de 7,5 mg de proteína:10 µl de enzima (diluição final de 0,75% de substrato e 1:100 de enzima no meio reacional).

Nota-se também que até 30 minutos de reação, para a diluição enzimática maior (1:200), a quantidade de proteína hidrolisada aumenta com o tempo, todavia a partir de 30

minutos observa-se uma estabilização desses valores, ocorrendo uma mudança somente para as soluções enzimáticas mais concentradas (1:100). Tal comportamento somente não foi observado para a enzima Alcalase® 2,4L.

As figuras 12 e 13 (Neutrase® 0,8L e Flavourzyme® 1000L respectivamente) mostram que para essas duas enzimas o tempo de 30 minutos é insuficiente para a hidrólise, visto que a curva é ascendente até 60 minutos.

A partir desses dados, a atividade enzimática em equivalentes de tirosina (µg tirosina liberada/tempo (minutos)) foi determinada para todas as enzimas, incluindo a comparação de dois tipos de Alcalase® 2,4L (líquida) e 1,5MG (sólida). Os resultados obtidos foram plotados em gráficos e apresentados nas figuras 14, 15 e 16.

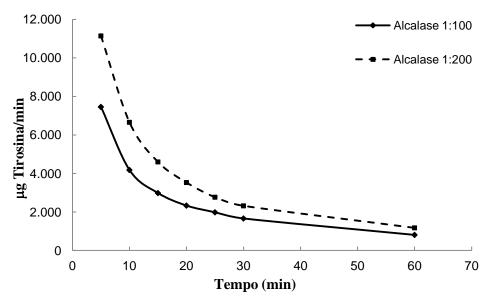


Figura 14. Atividade enzimática da enzima Alcalase® 2,4L.

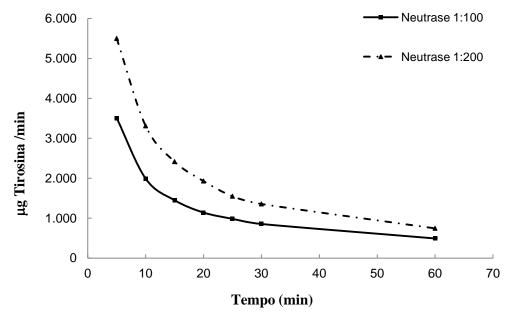


Figura 15. Atividade enzimática da enzima Neutrase® 0,8L.

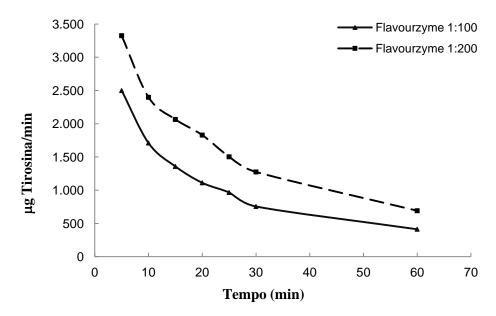


Figura 16. Atividade enzimática da enzima Flavourzyme® 1000L.

Os gráficos apresentados com as atividades enzimáticas mostraram um comportamento diferente do esperado. Esperava-se que para a mesma enzima, independente da concentração utilizada, as duas curvas de atividade enzimática obtidas ficassem sobrepostas, visto que as condições do meio de reação, tais como pH e temperatura, foram mantidas constantes e não houve a limitação da quantidade de substrato no meio. No entanto esse não foi o comportamento observado, sugerindo a presença de alguma substância inibidora da ação enzimática no meio de incubação.

Uma possibilidade seria a ação do inibidor de tripsina presente na soja, porém, considerando que a sua concentração fosse mantida constante, o aumento da quantidade de enzima no meio levaria a um aumento da atividade enzimática, o que não foi observado.

As enzimas proteolíticas, quando dispersas em meio líquido, como as utilizadas nesse estudo, podem perder sua atividade, seja por reação com outras substâncias do meio, precipitação ou autólise entre as enzimas presentes. Para a preservação da atividade da enzima, diversos recursos têm sido empregados visando a sua estabilização, dentre estes a utilização de íons de cálcio (tripsina), redução do pH (tripsina e plasmina) e diversos outros inibidores reversíveis das enzimas (ANDERSSON; AGELAND, 2009).

As proteases representam um grupo de enzimas de imenso interesse nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de materiais de limpeza. A utilização dessas enzimas é de extrema importância para a melhora do desempenho dos seus produtos e adequação às características desejadas pelo consumidor. Estas enzimas estão presentes em sabões líquidos, em barra e pó, soluções oftálmicas para a limpeza e conservação de lentes corretivas e na fabricação de diversos componentes da indústria alimentícia (ex: hidrolisados proteicos). Para tal, há uma grande preocupação na manutenção da atividade da enzima em níveis satisfatórios, seja quando já presente nos produtos ou na enzima como um produto propriamente dito. Assim, a indústria tem direcionado seus esforços para o desenvolvimento de uma gama de substâncias que atuem como inibidores reversíveis dessas enzimas. Estas substâncias podem ser derivados de ácidos aromáticos e polióis (ASGHARIAN; QUINTANA; HONG, 1999), propileno glicol, glicerol, ácidos carboxílicos de cadeia curta (LENOIR, 2011), ácidos borônico (ex: ácido borônico fenila formila 4) e borínico (NIELSEN, 2007; SEUFER-WASSERTHAL et al., 1994; SIMPELKAMP; BRYAN JONES, 1992).

Os resultados apresentados nas figuras 14, 15 e 16 juntamente com as informações encontradas na literatura nos levaram a concluir que o meio líquido em que é comercializada a enzima, possui algum inibidor reversível da atividade enzimática, e a ação é em função da sua concentração no meio reacional.

Tal conclusão mostra ser a mais adequada, visto que a sua maior diluição levou a uma melhora na atividade enzimática, ou seja, a diluição do inibidor e consequente melhora do desempenho da enzima na hidrólise da proteína.

Apesar da diluição maior da enzima melhorar a atividade enzimática desta, quando se considera a quantidade total de proteína hidrolisada (figuras 11, 12 e 13) fica claro que a maior concentração enzimática é a mais adequada para a realização da hidrólise da proteína de soja.

A enzima Alcalase® é comercializada na forma sólida e líquida, assim utilizamos duas Alcalase® (2,4L e 1,5MG), mantendo-se a mesma diluição no meio e comparamos a atividade enzimática das duas (figura 17).

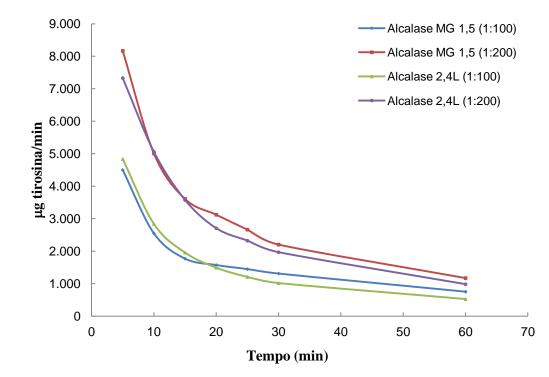


Figura 17. Atividade enzimática das Alcalase® 2,4L (líquida) e 1,5 MG (sólida), nas proporções 1:100 e 1:200.

O comportamento foi similar ao já observado anteriormente para as outras enzimas, ou seja, a enzima mais diluída apresentou uma maior atividade. Assim acredita-se que a enzima comercializada em forma sólida também contenha alguma substância estabilizadora, na realidade acredita-se que esta apresente composição semelhante à enzima em meio líquido, sendo apresentada na forma sólida com o auxílio de um adjuvante de secagem.

Com base na análise de todos os resultados apresentados concluiu-se que a Alcalase® 2,4L é a enzima mais eficiente, seguida da Neutrase® 0,8L e por último a Flavourzyme® 1000L. Esse desempenho da Flavourzyme® 1000L já era esperado baseado no tipo de clivagem que esta enzima realiza. A Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L são endopeptidases, enquanto que a Flavourzyme® 1000L é uma mistura de exo e endopeptidases, com uma prevalência de ação como exopeptidase, clivando preferencialmente nas extremidades da cadeia peptídica liberando aminoácidos livres. Assim a limitação de sítios disponíveis para a hidrólise com a Flavourzyme® 1000L é muito maior do que para as outras duas enzimas,

fazendo com que sua atividade enzimática desta seja menor. A figura 18 ilustra de maneira simplificada o mecanismo de ação das endo e exopeptidases.

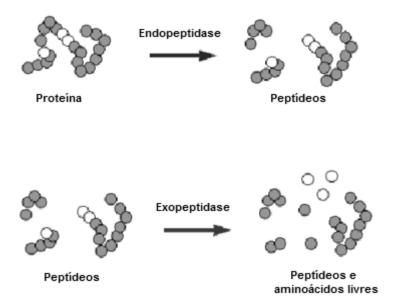


Figura 18. Esquematização simplificada do mecanismo de ação de enzimas do tipo endo e exopeptidases (adaptado de DMS, (2009)).

Os aminoácidos conferem sabor aos alimentos que podem ser umami, ácido, doce e amargo. O sabor amargo ocorre devido a presença de isoleucina, valina, histidina, fenilalanina, tirosina, arginina, leucina e metionina na forma livre (AJINOMOTO, 2009), sendo esses compostos indesejáveis na composição dos alimentos. A presença de aminoácidos livres e com um gosto desagradável proveniente da ação da Flavourzyme® 1000L na preparação do hidrolisado proteico é fator limitante, quando se pretende sua utilização por via oral.

Do ponto de vista nutricional e considerando o processo natural de digestão e absorção de proteínas, estas são hidrolisadas em aminoácidos e pequenos peptídeos no trato gastrintestinal para então serem absorvidas.

No processo de absorção estão envolvidos mecanismos de difusão e cotransporte. O principal mecanismo de absorção de aminoácidos na forma livre (aa) é o transporte passivo por difusão simples, sendo mais acentuado quanto maior seu caráter hidrofóbico e diretamente proporcional ao gradiente de concentração. É um sistema saturável, possui velocidade específica para cada aminoácido (dependente de afinidade deste pelo carreador) e moléculas com estruturas semelhantes competem, entre si, pelo mesmo carreador. O transporte de tri e dipeptídeos ocorre principalmente por mecanismos de transporte ativo como o cotransporte, é

independente do transporte de aminoácidos livres e há uma baixa afinidade por peptídeos maiores (acima de 4 resíduos de aminoácidos) (ADIBI, 1976; FRENHANI; BURINI, 1999; MATTHEWS, 1972; SILK, 1974; SILK; GRIMBLE; REES, 1985; TARLOW et al., 1972; WEBB; MATTHEWS; DIRIENZO, 1992).

Assim, utilização da Flavourzyme® 1000L para a preparação de hidrolisado foi descartada, pois além de apresentar um poder de hidrólise limitado, as características do hidrolisado formado foram consideradas insatisfatórias tanto do ponto de vista nutricional quanto do sensorial.

4.5.4. Caracterização dos hidrolisados

4.5.4.1. Calibração da coluna

Após uma avaliação criteriosa das enzimas, a Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L foram escolhidas para dar continuidade ao trabalho. Nessa etapa a papaína também foi empregada em alguns experimentos somente para a comparação com as outras enzimas.

A influência do tempo na reação de hidrólise, a eficiência da combinação e de adições subsequentes de enzimas foram avaliadas de acordo com o perfil dos peptídeos formados.

Inicialmente foi feita a calibração da coluna utilizando como padrões proteína, peptídeos e aminoácido com massa molecular distintas, obtendo o cromatograma mostrado na figura 19.

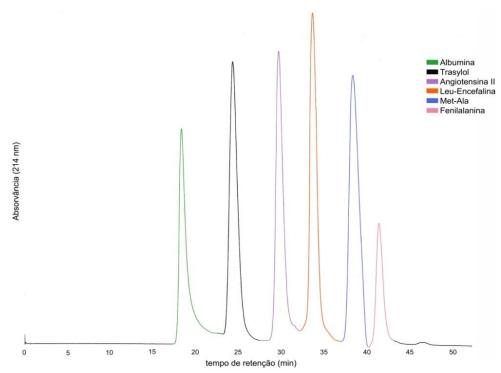


Figura 19. Perfil de eluição dos padrões utilizados na calibração da coluna Superdex $^{\rm TM}$ Peptide 10/300 GL, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.

Como pode se observar na figura 19 os padrões deram origem a um cromatograma com boa resolução, apresentando tempos de eluição distintos para cada padrão, sem a sobreposição de picos e com uma boa distribuição dos compostos ao longo de todo o tempo de eluição da coluna (48 minutos).

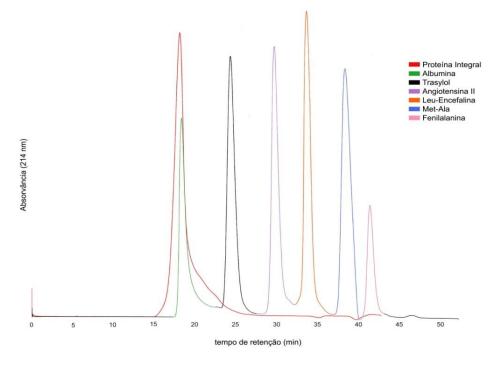


Figura 20. Perfil de eluição da proteína integral e padrões, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.

Logo após a padronização da coluna foi realizada uma corrida com a proteína de soja para a visualização do tempo de retenção da proteína integral na coluna e a verificação da presença de possíveis peptídeos menores na amostra. O cromatograma apresentado na figura 20 mostra o tempo de retenção da proteína de soja integral. Pelo cromatograma, fica evidente que a proteína de soja apresenta uma massa molecular elevada, eluindo junto ao volume morto da coluna, com tempo de retenção similar a albumina e sem revelar a presença de peptídeos menores na amostra.

4.5.4.2. Avaliação do tempo de hidrólise enzimática

Após a calibração da coluna cromatográfica, as amostras dos hidrolisados foram submetidas para análise em *FPLC*. Inicialmente avaliou-se o perfil dos peptídeos obtidos pela Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L nos tempos de 30 e 60 minutos de reação de hidrólise. Os cromatogramas obtidos estão apresentados nas figuras 21 e 22.

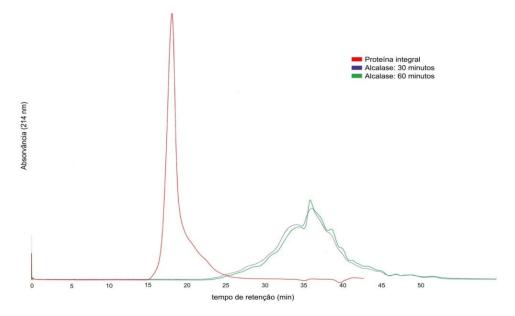


Figura 21. Perfil de eluição dos hidrolisados preparados com Alcalase® 2,4L, para reação de hidrólise nos tempos de 30 e 60 minutos, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.

Como apresentado na figura 21, a Alcalase® 2,4L, para ambos os tempos de hidrólise, levou a formação de peptídeos com tamanhos entre 1046 Da (angiotensina II) e 220 Da (Met-Ala), apresentando uma maior concentração de peptídeos no tempo de eluição equivalente ao pentapeptídeo Leu-Encefalina (556 Da) e o dipeptídeo Met-Ala (220 Da), ou seja, com base no perfil de eluição, a maioria dos peptídeos formados possuem entre 2 e 4 resíduos de

aminoácidos. Resultados similares foram obtidos por Kong et al. (2008), que obtiveram hidrolisados de proteína de soja com uma grande quantidade de peptídeos menores que 1000 Da utilizando a Alcalase® 2,4L.

Não houve diferença relevante entre os dois perfis cromatográficos (30 e 60 minutos) corroborando com os resultados apresentados na figura 11, que mostram para ambas as diluições enzimáticas, praticamente uma estabilização da quantidade de proteína hidrolisada após 30 minutos de hidrólise. Resultados similares foram descritos por Yuan, Gu e Tang (2008) que avaliaram a hidrólise com Alcalase® 2,4L na proteína de *Momordica charantia L*. e observaram que nos primeiros 30 minutos de reação o grau de hidrólise subiu rapidamente, após esse tempo continuou observando um aumento, porém de uma maneira menos acentuada. Já Kong et al. (2008) ao realizarem a hidrólise da proteína de soja com diversas enzimas, incluindo a Alcalase® 2,4L, observaram um acelerado grau de hidrólise nos primeiros 15 minutos de reação com um decréscimo da velocidade nos tempos posteriores. A desaceleração desse processo pode ser devido tanto a redução de sítios disponíveis para a hidrólise quanto ao equilíbrio de hidrólise de proteína e formação de peptídeos (KONG et al., 2008; YUAN; GU; TANG, 2008).

Apesar de um pequeno aumento na hidrólise da proteína para 60 minutos de reação, uma mudança não tão expressiva no perfil dos peptídeos formados não justifica o dobro de tempo no processo, sendo considerado que com o tempo de 30 minutos de reação o perfil dos peptídeos formados é adequado para a preparação dos complexos.

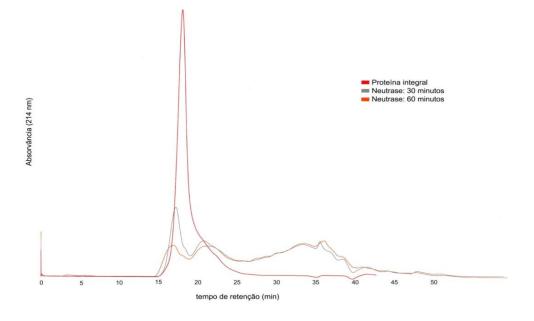


Figura 22. Perfil de eluição dos hidrolisados com Neutrase® 0,8L, para reação de hidrólise nos tempos de 30 e 60 minutos, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.

A hidrólise da proteína com a Neutrase® 0,8L (figura 22) levou a formação de uma mistura de peptídeos com uma maior distribuição de tamanho quando comparado a Alcalase® 2,4L, independentemente do tempo de incubação. O cromatograma também mostra a presença de um pico correspondente à proteína intacta, no entanto, foi observada uma redução desse pico com o aumento do tempo de hidrólise. Esses resultados corroboram com os apresentados na figura 12, os quais mostram que independentemente da diluição enzimática utilizada, houve um aumento em equivalentes de tirosina mesmo após 30 minutos de reação. A maior dependência da Neutrase® 0,8L em relação ao tempo também foi notada por Tsou et al. (2010) quando estes realizaram hidrólise com proteína de soja e observaram um aumento progressivo do grau de hidrólise até 6 horas.

Comparando os resultados obtidos, a Alcalase® 2,4L apresentou um melhor resultado em relação ao perfil de peptídeos formados, pois estes ficaram com uma distribuição de tamanho mais restrita e de tamanhos mais adequados para a absorção no organismo quando comparados aos peptídeos formados com a Neutrase® 0,8L.

4.5.4.3. Comparação de adições subsequentes de enzimas

Os resultados apresentados nas figuras 14 e 15 mostram a atividade enzimática da Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L respectivamente ao longo do tempo onde pode se visto uma queda acentuada da atividade até 30 minutos de reação e posteriormente uma estabilização com tendência a zero. Esse comportamento pode ser devido a um decréscimo das ligações peptídicas disponíveis para a hidrólise, redução da atividade da enzima ou inibição causada pelo produto (DAMRONGSAKKUL et al., 2008; GUÉRARD et al., 2001).

Se causada pela redução da atividade enzimática, a adição sequencial de enzima ao meio proporcionaria aumento da hidrólise das proteínas e a possível redução de tamanho dos peptídeos. Para verificar essa possibilidade foram preparadas amostras de hidrolisados com Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L com adições subsequentes das enzimas a cada 30 minutos (totalizando 90 minutos) e avaliou-se a influência dessas adições no perfil dos peptídeos obtidos (figuras 23 e 24).

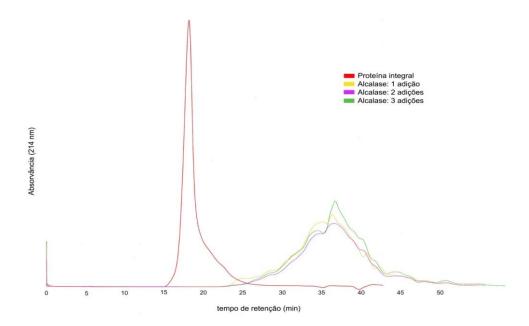


Figura 23. Perfil de eluição dos peptídeos produzidos com adições subseqüentes de Alcalase® 2,4L, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.

Os resultados apresentados na figura 23 mostram que, para a Alcalase® 2,4L, a adição extra de enzima aumenta levemente a quantidade de peptídeos com massa molecular na faixa de 556 a 220 Da. O cromatograma mostra que a adição de mais enzima proporcionou aumento não expressivo do pico na região entre os tempos de eluição de 35 e 40 minutos.

Isto sugere que com a primeira adição da enzima a maioria das ligações peptídicas disponíveis para a hidrólise com a Alcalase® 2,4L, tais como regiões com os aminoácidos Glu, Met, Leu, Tyr, Lys e Gln na posição P₁ (ADAMSON; REYNOLDS, 1996), são hidrolisados rapidamente, sendo que outras regiões as quais a enzima apresenta menor especificidade sofrem a hidrólise mais lentamente e estas podem ser clivadas com a adição de mais enzima ao meio. No entanto, este pequeno aumento na quantidade de peptídeos menores não justifica o uso de uma maior quantidade de enzima.

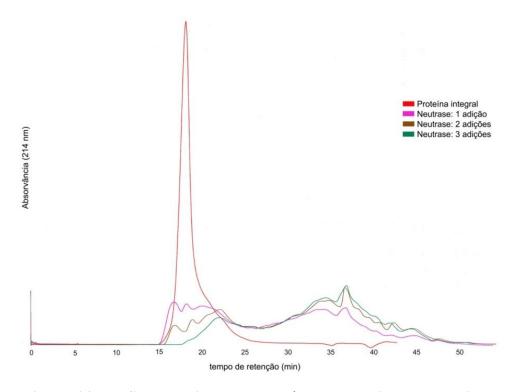


Figura 24. Perfil de eluição dos peptídeos produzidos com adições subseqüentes de Neutrase® 0,8L, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.

Para a Neutrase® 0,8L (figura 24), a adição subsequente de enzima apresentou um efeito maior quando comparados a Alcalase® 2,4L. Com a terceira adição de enzima, o pico correspondente a proteína intacta, praticamente é eliminado. No entanto, a redução da quantidade de proteínas e peptídeos maiores observada entre a primeira e a segunda adição é semelhante à redução observada com uma única adição para os tempos de reação de 30 e 60 minutos (figura 22). Esse comportamento deixa evidente que a redução do tamanho dos peptídeos para a Neutrase® 0,8L é mais dependente do tempo (velocidade menor de reação) e não da quantidade de enzima no meio, o que acaba por não justificar adições extras de enzima.

4.5.4.4. Combinações variadas de enzimas

As enzimas foram combinadas para se avaliar uma possível ação sinérgica na hidrólise da proteína. Foram combinadas Alcalase® 2,4L com papaína e Alcalase® 2,4L com Neutrase® 0,8L sendo que o impacto da ordem de adição para a Neutrase® 0,8L e Alcalase® 2,4L também foi avaliado (figuras 25 e 26).

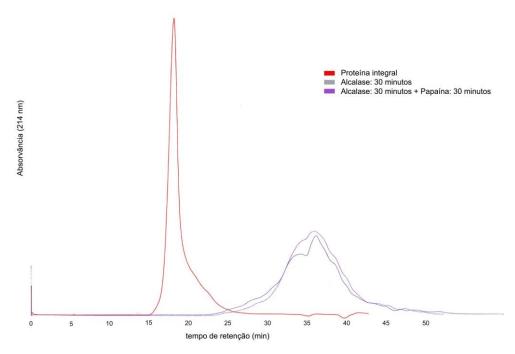


Figura 25. Perfil de eluição dos peptídeos resultantes da combinação das enzimas Alcalase® 2,4L e papaína, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.

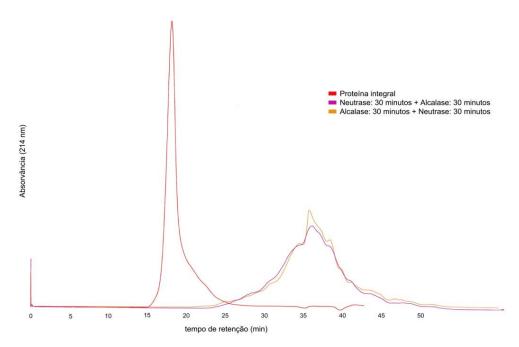


Figura 26. Perfil de eluição dos peptídeos resultantes da combinação das enzimas Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.

O resultado apresentado na figura 25 mostra que a adição da papaína após 30 minutos de incubação com Alcalase® 2,4L não alterou o perfil dos peptídeos formados, a mesma colocação pode ser feita para a hidrólise com Alcalase® 2,4L e Neutrase® 0,8L como mostra

a figura 26. O perfil de peptídeos formados ficou muito semelhante ao obtido somente com Alcalase® 2,4L.

Após todas as comparações e análises realizadas com as diversas enzimas, concluiu-se que o uso da Alcalase® 2,4L, em uma única adição e tempo de incubação de 30 minutos seja adequado para a produção do hidrolisado de proteína de soja e estes para a preparação de complexos com metais. A figura 27 apresenta o perfil dos peptídeos obtidos com a Alcalase® 2,4L (tempo de reação: 30 minutos) comparados aos padrões utilizados e a proteína de soja integral.

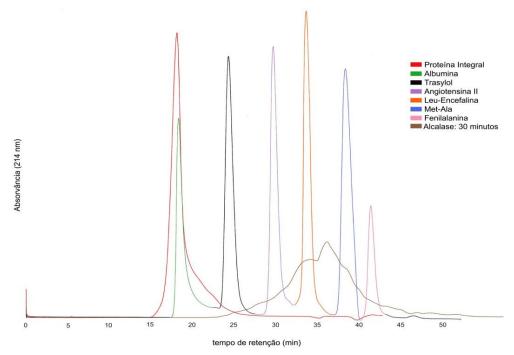


Figura 27. Comparação do perfil de eluição da proteína integral, padrões e Alcalase® 2,4L com 30 minutos de reação, em sistema de FPLC e fase móvel composta por Acetonitrila 30% e TFA 0,1%.

4.5.5. Eletroforese dos peptídeos

Como uma análise complementar à cromatografia, foi realizada a eletroforese dos hidrolisados obtidos com a Alcalase® 2,4L e a Neutrase® 0,8L. A eletroforese também permitiu monitorar a alteração do perfil dos peptídeos ao longo do tempo, visto que foram feitas eletroforese com peptídeos formados nos tempos de 0 a 30 minutos com intervalos de 5 minutos de reação.

A eletroforese realizada com o hidrolisado de soja apresentou resultado similar ao observado anteriormente na cromatografia. Como pode ser observado nas figuras 28 e 29 a

Alcalase® 2,4L apresentou um desempenho melhor quando comparado à Neutrase® 0,8L. Logo nos primeiros tempos de hidrólise, pode se observar que praticamente já não é mais possível visualizar banda de peptídeos. Vestígios de bandas de peptídeos (fração insolúvel) somente são vista nos quinze minutos iniciais

O fato de se observar uma pequena quantidade de peptídeos nos géis de eletroforese é mais um indicativo do alto poder de hidrólise da Alcalase® 2,4L sobre a proteína de soja, visto que pequenos peptídeos saem facilmente do gel durante a corrida ou durante o processo para a revelação dos géis.

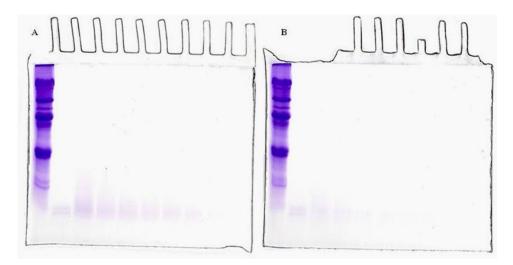


Figura 28. Proteína hidrolisada com Alcalase® 2,4L, fração solúvel (A) e fração insolúvel (B). Sendo da esquerda para a direita: proteína integral, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de hidrólise.

Já para a Neutrase® 0,8L (figura 29) a redução das frações de alto peso molecular da proteína foi visível logo nos primeiros cinco minutos de hidrólise, no entanto houve pouca alteração do perfil dos peptídeos após os primeiros cinco minutos de reação. O mesmo comportamento foi observado para as frações solúvel e insolúvel dos hidrolisados.

O resultado observado na eletroforese é condizente com os resultados obtidos com a análise cromatográfica dos peptídeos, para ambos os resultados a Neutrase® 0,8L mostrou uma menor velocidade de reação para a hidrólise da proteína de soja quando comparada a Alcalase® 2,4L, o que reforça ainda mais a escolha da Alcalase® 2,4L para a preparação dos hidrolisados.

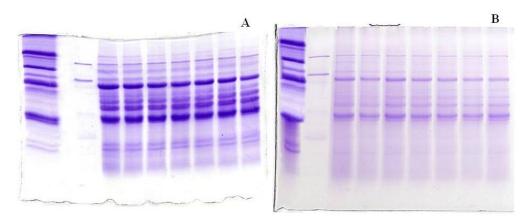


Figura 29. Proteína hidrolisada com Neutrase® 0,8L, fração solúvel (A) e fração insolúvel (B). Sendo da esquerda para a direita: proteína integral, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de hidrólise.

4.5.6. Quantificação do teor de nitrogênio presente nas frações solúveis e insolúveis do hidrolisado proteico

Para a obtenção de hidrolisado em maior quantidade foi preparada uma dispersão a 5% (m/v) de proteína e adicionada uma quantidade de enzima equivalente à relação de 0,75% substrato/diluição enzimática de 1:100 (v/v).

Exemplo:

Volume final de dispersão: 5 mL

0,75% de substrato ----- 50
$$\mu$$
L de enzima
5 % de substrato ----- x μ L de enzima
=> x = 333,3 μ L de enzima

A concentração final de 5% de substrato na dispersão foi baseada no trabalho de Kong e seus colaboradores (2008), que em reações de hidrólise com a Alcalase® 2,4L notou redução do grau de hidrólise na proteína de soja para concentrações de substrato acima de 5%, tal comportamento também foi observado por Schmidt e Salas-Mellado (2009) na hidrólise de proteína de frango.

A redução do grau de hidrólise com o aumento da concentração do substrato pode ocorrer devido à elevação da viscosidade do meio que dificulta o acesso da enzima ao substrato, inibição não competitiva motivada pela ligação de uma molécula de substrato

próximo ao sítio ativo da enzima agindo como uma barreira física para a ligação de outra molécula no sítio ativo ou em decorrência do aumento da quantidade do peptídeo inibidor de protease presente na soja (KUMAR et al., 2002; KUNITZ, 1947; SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009).

Após a hidrólise da proteína de soja, a amostra foi seca pelo processo de liofilização. O hidrolisado insolúvel seco apresentou característica esponjosa e altamente higroscópica, a parte solúvel ficou com a aparência de sólido viscoso, sendo difícil sua remoção do frasco. Segundo o fornecedor (NOVOZYMES), as enzimas são veiculadas em glicerol, explicando a aparência dos hidrolisados após a liofilização principalmente na fração solúvel.

Assim, só foi possível determinar a massa total dos hidrolisados insolúveis. A determinação da quantidade de proteínas foi realizada somente para esta fração e por diferença e com base nos dados obtidos anteriormente na quantificação de proteínas presente no extrato padrão 1:30 (m/v), determinou-se o equivalente em proteína na fração solúvel.

Como o extrato utilizado apresenta aproximadamente 83,9% em proteínas, em 5 g de extrato temos 4,19 g de proteínas. No precipitado a quantidade de proteína foi de 0,61 g, totalizando uma quantidade de hidrolisados solúveis de 3,88 g sugerindo uma eficiência de hidrólise de 77,6%.

Na tentativa de se obter um hidrolisado de proteína com características físicas mais apropriadas para sua utilização, foi necessário realizar purificação parcial da enzima, visando a remoção parcial ou total do glicerol do meio, onde está contida a enzima.

4.6. Purificação parcial da Alcalase® 2,4L

A purificação parcial da enzima Alcalase® 2,4L foi necessária, pois a presença do glicerol no meio inviabiliza o processo de secagem, além de possível interferência na complexação com os metais.

A primeira tentativa foi a separação da enzima do meio, por precipitação com etanol ou sulfato de amônio (resultados não mostrados), no entanto este método não foi eficiente devido à alta concentração de glicerol. A alta viscosidade do meio devido ao glicerol também inviabilizou o processo de filtração.

A utilização de cromatografia de exclusão pareceu viável visto que além de separar substâncias pela diferença de tamanho e abranger uma ampla faixa de massa molecular, é uma técnica simples, com a utilização de condições amenas (ex: pH e temperatura) o que é

importante para a manutenção da atividade enzimática (ROTHSCHILD, 2006). Além disso, para a separação da enzima do meio com glicerol esta técnica pareceu adequada visto que o glicerol, devido ao seu menor tamanho provavelmente seria eliminado separadamente da enzima.

Foi avaliado o desempenho de dois tipos de resina Sephadex G-50 e a G-25. As resinas do tipo Sephadex são diferenciadas pela letra G seguida de um número que está relacionado à capacidade de absorção de água em mL de 1 g de resina multiplicado por 10, isso indica que as partículas ficam maiores quanto maior esse valor e que por sua vez acabam separando somente partículas maiores (ROTHSCHILD, 2006).

Inicialmente a resina escolhida para o processo de purificação parcial foi a Sephadex G-50, os resultados obtidos (não mostrados) revelaram uma grande retenção da proteína na coluna, o que é condizente com as características dessa resina, que separa moléculas de tamanhos maiores quando comparadas à Sephadex G-25 (HEALTHCARE, 2011).

Como a resina Sephadex G-50 não foi eficaz para a separação da enzima foi realizado o teste com a resina Sephadex G-25, que apresenta características que permitem separar partículas menores (HEALTHCARE, 2011). A G-25, por apresentar tamanho menor de seus poros, poderia levar a uma menor retenção da enzima permitindo eluição em menor volume (*pool*) e separadamente do glicerol, apresentando um resultado mais eficiente quando comparada a G-50.

Após o término da eluição da Alcalase® 2,4L na coluna, a leitura direta de cada tubo coletado e a determinação da atividade enzimática em cada um mostraram que a resina Sephadex G-25 foi mais eficiente para a separação e concentração da enzima ao apresentar a formação de uma região de *pool* tal como mostra a figura 30.

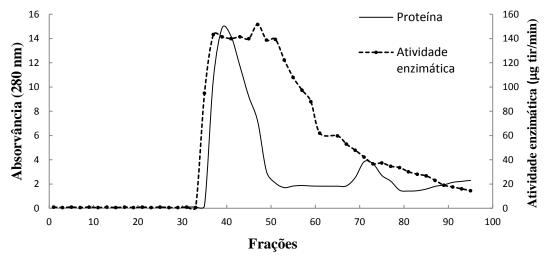


Figura 30. Perfil de eluição da Alcalase® 2,4L em Sephadex G-25 com eluição isocrática e fase móvel constituída por tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0).e determinação da atividade enzimática (determinação do *pool* enzimático).

Como podemos observar na figura 30, a região onde há uma concentração de proteínas é coincidente com a região com atividade enzimática, sendo possível recuperar a atividade enzimática fazendo um *pool* das frações entre 35 e 65. Em virtude desse resultado, esse intervalo de frações foi o escolhido para a determinação da atividade enzimática a cada etapa seguinte ao processo de purificação parcial.

4.7. Comparação da atividade enzimática específica da enzima Alcalase® 2,4L nas etapas seguintes à purificação parcial e obtenção do hidrolisado de soja seco

Após a obtenção do *pool* enzimático na cromatografia, a próxima etapa consistiu em realizar a avaliação da atividade específica da enzima a cada etapa após o processo de purificação parcial. Para isso realizou-se a avaliação em três etapas distintas: a enzima como fornecida pelo fabricante, *pool* enzimático pós-cromatografia e por último, a enzima pós-liofilização. A atividade enzimática específica da enzima fornecida pelo fabricante foi determinada para servir como base de comparação para as outras análises.

Para cada etapa foram feitas a avaliação da atividade enzimática e a quantificação do teor de proteínas totais na mesma amostra. Assim a razão da atividade enzimática pela quantidade total de proteína forneceria a atividade enzimática específica.

Apesar de a atividade enzimática específica ter sido calculada para três tempos de reação de hidrólise (5, 10 e 15 minutos), o tempo escolhido para a comparação entre as etapas foi de 5 minutos, pois nesse tempo o substrato está em condição saturante. A tabela 25 apresenta os resultados da atividade enzimática específica, obtidos para o tempo de 5 minutos de hidrólise.

Tabela 25. Atividade enzimática específica para a Alcalase® 2,4L nas diferentes etapas do processo de purificação parcial.

	Atividade enzimática específic		
Enzima	UA/μg proteína		
Bruta	172,73		
Pós-cromatografia	228,14		
Liofilizada	62,42		

Bruta: enzima fornecida pelo fabricante.

Pós-cromatografia: pool enzimático obtido após purificação parcial em cromatografia de exclusão.

Liofilizada: enzima resultante da purificação parcial em cromatografia de exclusão liofilizada.

Como pode se observar pelos resultados mostrados na tabela 25 cada processo realizado com a enzima teve um impacto sobre a atividade enzimática específica. A passagem da enzima bruta pela coluna leva a um aumento da atividade enzimática específica. A melhora deste desempenho é creditada principalmente pela separação eficiente da enzima do glicerol e de outros possíveis inibidores da enzima ou interferentes da reação de hidrólise que possam estar presentes no meio juntamente com a Alcalase® 2,4L (SEUFER-WASSERTHAL et al., 1994).

A liofilização do *pool* teve como objetivo facilitar o armazenamento e manter a estabilidade da enzima. Entretanto, a atividade enzimática específica pós-liofilização foi reduzida em relação às obtidas nas etapas anteriores. Lembrando que a atividade enzimática foi determinada imediatamente após a retirada da enzima do liofilizador, o seu armazenamento sob resfriamento ou até mesmo o congelamento provavelmente levaria a uma perda ainda maior da atividade específica do que a observada. A grande perda de atividade da enzima liofilizada foi a razão para se descartar sua utilização para a obtenção do hidrolisado, no entanto, permitiu observar que o processo cromatográfico foi eficiente na separação do glicerol do *pool* enzimático, visto que foi possível obter um pó seco.

Com o descarte do uso da enzima liofilizada, a escolha ficou entre a enzima bruta (com glicerol) e pós-cromatografia. Apesar de o processo cromatográfico ser lento, este

possibilitou a eliminação do glicerol e obtenção de concentrado enzimático com maior atividade específica quando comparada a enzima bruta, justificando o emprego dessa técnica ao longo do processo para a obtenção do hidrolisado proteico de soja.

Com o término da etapa da purificação parcial da enzima, deu-se início a produção do hidrolisado proteico.

A dispersão da proteína foi novamente realizada na concentração de 5% (m/v) devido às razões já apresentadas no item 4.5.6. Foi realizado o aquecimento rápido da dispersão, já com a enzima, até a temperatura de reação, para evitar uma perda progressiva da sua atividade antes de alcançar as condições ótimas de temperatura e pH para a sua ação, aproveitando ao máximo o potencial de ação da enzima.

O hidrolisado após liofilização apresentou-se como sólido seco (pó), diferente do obtido em testes anteriores com a enzima no seu estado bruto (com glicerol), cuja aparência era de sólido viscoso.

A determinação do teor de proteínas realizado pelo método de Kjeldahl foi de 74,11%, a diminuição desse teor em relação à proteína inicial deve-se ao pequeno aumento da massa após a produção do hidrolisado, que pode ser explicada por uma maior umidade e sal na amostra.

4.8. Composição em aminoácidos

Após a preparação do hidrolisado proteico de soja, foram avaliadas sua composição em aminoácidos e da proteína integral de soja. Os resultados obtidos e apresentados na tabela 26 foram expressos em mg aminoácido/g amostra.

Tabela 26. Composição em aminoácido do hidrolisado e proteína integral.

-	mg aminoácido/g amostra		
Aminoácidos	Proteína Integral	Hidrolisado	
Aspartato	$109,5 \pm 1,6$	$105,34 \pm 2,1$	
Alanina	$35,5 \pm 0,3$	$41,8 \pm 0,1$	
Arginina	50.8 ± 0.1	$47,9 \pm 0,2$	
Cisteína	$4,3 \pm 0,2$	$1,6 \pm 2,3$	
Fenilalanina	$60,6 \pm 0,1$	$57,\!4\pm0,\!3$	
Glicina	$43,2 \pm 0,4$	$48,\!16\pm0,\!8$	
Ác. Glutâmico	$208,9 \pm 0,4$	$196,9 \pm 1,2$	
Histidina	$28,6 \pm 0,1$	$29,2 \pm 1,4$	
Isoleucina	$51,5 \pm 0,2$	$48,5\pm0,1$	
Leucina	$82,9 \pm 0,6$	$81,4 \pm 4,0$	
Lisina	78,5	$76,0\pm0,9$	
Metionina	$17,5 \pm 0,3$	$18,0\pm0,4$	
Prolina	$64,2 \pm 0,7$	$67,4 \pm 3,3$	
Serina	47.8 ± 0.2	$50,6 \pm 1,2$	
Treonina	$31,8 \pm 0,2$	$35,3 \pm 0,4$	
Tirosina	$36,2 \pm 0,1$	$40,0\pm0,2$	
Valina	$48,1\pm0,2$	$54,3 \pm 0,4$	

Os resultados mostraram que o hidrolisado proteico é uma representação quali e quantitativa da proteína de soja (extrato proteico de soja), ou seja, não houve alteração no perfil e na quantidade dos aminoácidos da proteína após a hidrólise com a Alcalase® 2,4L. A pequena alteração observada entre as amostras está dentro da variação aceita para o método utilizado. Somente para a cisteína nota-se uma queda na quantidade presente no hidrolisado, no entanto, tal redução já era esperada sendo uma limitação do método utilizado.

4.8. Preparação dos complexos peptídeo-metal

4.8.1. Determinação da estequiometria peptídeo/metal

A partir do hidrolisado, foram preparados os complexos com os metais zinco, ferro, manganês e cobre. Para isso foram utilizados seus cloretos ZnCl₂, FeCl₃, MnCl₂ e CuCl₂, que são considerados os mais reativos para a complexação (UEDA; GOUT; MORGANTI, 2003).

O complexo metal-peptídeo é facilmente obtido pela adição do sal do metal à solução contendo o peptídeo, em pH adequado. A capacidade de proteínas e íons metálicos se ligarem é amplamente verificada, sendo característica de diversas proteínas, dentre as quais a mais conhecida é a hemoglobina (BOUGLÉ; BOUHALLAB, 2006).

Ligações entre peptídeos e metais ocorrem de maneira espontânea, sendo os principais sítios de ligação/interação o nitrogênio terminal, amídico, carbonilas e carboxilas e resíduos com anéis aromáticos (interações hidrofóbicas) (KOZLOWSKI et al., 1999; UEDA; GOUT; MORGANTI, 2003; UEDA et al., 1987).

Um dos desafios para a preparação de complexos de peptídeos e/ou aminoácidos com metais é a dificuldade em determinar-se a estequiometria desses elementos (relação ideal), e para isso diversos métodos como titulação potenciométrica, reação colorimétrica entre outros tem sido utilizados na tentativa de se determinar o ponto de equivalência metal/peptídeo (BRETT; BRETT, 1996a; CHAUD et al., 2002).

Em um trabalho realizado anteriormente por Franzan (2006) a voltametria cíclica mostrou eficiência na determinação da presença de metais livres em solução após o processo de complexação. Assim, em nosso estudo, quando cabível, a determinação do ponto de equivalência metais/peptídeos foi realizada com a utilização da técnica de voltametria cíclica.

A voltametria cíclica é uma das técnicas eletroquímicas mais difundidas, sendo utilizada para elucidar mecanismos de reações, identificar espécies em solução e estimar velocidade de reações. Reações de oxidação e redução, estimuladas pela aplicação de um potencial variável com o tempo a uma determinada velocidade, fornecem importantes informações sobre o analito eletroativo devido a reações de oxidação e redução deste. A variação do potencial é observada dentro de um intervalo de potenciais, partindo de um determinado valor inicial, atingindo um valor final, onde ocorre a inversão da varredura retornando ao valor inicial. A varredura fornece dois picos que determinam os parâmetros de

potenciais e correntes de pico catódico e anódico (BRETT; BRETT, 1996b; GIRAULT, 2004). A figura 31 apresenta um esquema básico de um voltamograma cíclico.

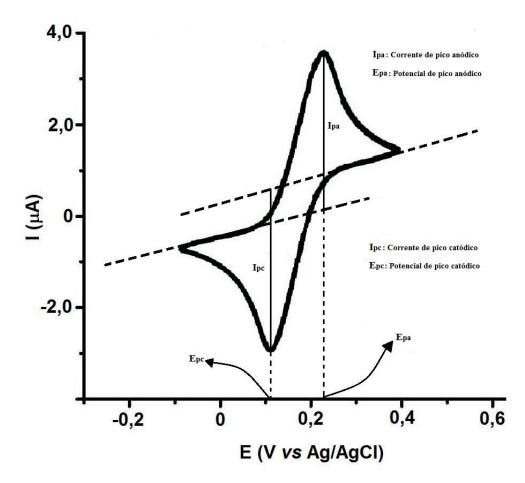


Figura 31. Esquema básico de um voltamograma cíclico, adaptado de Brett e Brett (1996b).

Pelo potencial de pico (E_p) obtêm-se a informação que auxilia na identificação do metal em solução, uma vez que esse valor é característico para cada metal, já com a corrente de pico (I_p) é possível se obter uma informação semiquantitativa do metal em solução.

Para este trabalho a determinação da estequiometria (ponto de equivalência) foi realizada com base na presença e intensidade da corrente de pico fornecida pelo voltamograma.

A estequiometria da reação foi avaliada de maneira diferente ao realizado por Franzan (2006). A determinação foi feita pela adição consecutiva da dispersão do hidrolisado à solução com o metal até não ser mais possível visualizar a corrente de pico enquanto que no trabalho de Franzan (2006) a mistura era previamente preparada em diversas relações metal/hidrolisado para então verificar a possível presença de metal livre com o uso da voltametria.

A utilização da voltametria para essa finalidade se mostrou adequada, visto que o método apresentou uma boa reprodutibilidade para todos os experimentos realizados. Os voltamogramas obtidos para o ferro, zinco e manganês estão apresentados nas figuras 32, 33 e 34 respectivamente.

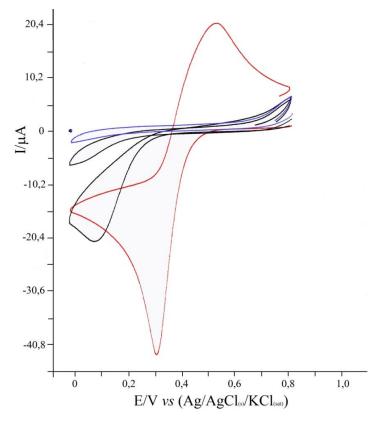


Figura 32. Voltamograma obtido para a determinação do ponto de equivalência de ferro com hidrolisado de proteína de soja.

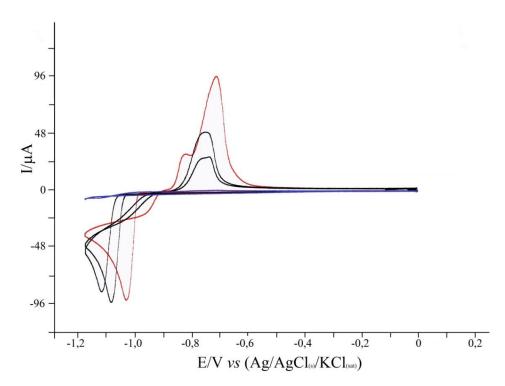


Figura 33. Voltamograma obtido para a determinação do ponto de equivalência de zinco com hidrolisado de proteína de soja.

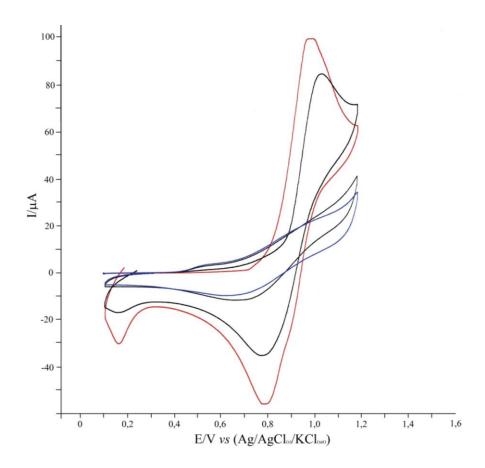


Figura 34. Voltamograma obtido para a determinação do ponto de equivalência de manganês com hidrolisado de proteína de soja.

Ao longo da execução dos experimentos, ficou evidente que a adição de hidrolisado à célula com a solução contendo o metal (Fe³⁺/Fe²⁺, Zn²⁺/Zn⁺ e Mn²⁺/Mn⁴⁺) levou a redução gradativa da corrente de pico relativa ao processo redox (corrente de pico catódica para o ferro e zinco e anódica para o manganês). Quando o metal se ligou ao hidrolisado verificou-se uma mudança no potencial redox até o momento onde não foi mais possível notar a presença dos picos anódicos ou catódicos referentes ao metal, indicando que o ponto de equivalência metal/ligante foi atingido.

No entanto, cada metal apresentou uma resposta característica à adição do hidrolisado, ou seja, a variação da intensidade do pico foi diferente para cada metal para um mesmo volume de adição de hidrolisado de proteína de soja.

Deve-se enfatizar que após atingir o ponto de equilíbrio, uma medida era realizada logo a seguir da adição do hidrolisado e outra medida 30 minutos após esta última para a confirmação do final da reação. Também foi feita a adição de maior quantidade de hidrolisado após atingir o ponto de equivalência para confirmação do resultado.

O manganês apresentou uma maior resposta à adição do hidrolisado seguido do ferro e por último o zinco. A diferença de comportamento notada para cada metal está relacionada às diferentes afinidades entre os metais e o hidrolisado. A ligação do metal com o hidrolisado é marcada pela característica elétron doadora dos grupos presentes nos peptídeos juntamente com a simetria de coordenação do metal, sendo que a força de ligação depende das características da proteína/hidrolisado e do metal (UEDA; GOUT; MORGANTI, 2003).

O entendimento da diferença de afinidade entre os peptídeos e os metais é complexo, sendo que diversas teorias explicam parcialmente e de maneira complementar esses diferentes comportamentos. A formação do complexo pode ser explicada baseada no princípio de ácido e base de Lewis, na qual a base age como doador de par de elétrons (no nosso caso os peptídeos) enquanto que o ácido age como o aceptor de par de elétrons, por apresentar um orbital vago no qual o par de elétrons pode ser acomodado (no nosso caso o metal) (HUHEEY; KEITER; KEITER, 1993). Quando o ácido de Lewis é um metal, este normalmente se liga a vários ligantes simultaneamente visto que são polivalentes.

Já a estabilidade da ligação ácido/base foi descrita por Pearson (1968a), que explicou diferentes afinidades entre ácidos e bases estabelecendo o conceito de ácidos e bases duros, que apresentam como característica serem menores e pouco polarizáveis e ácidos e bases moles sendo maiores e mais polarizáveis. Quanto mais similar for o caráter do ácido e da base utilizados, mais estável será a ligação entre eles (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009; PEARSON, 1968b).

Para as proteínas e hidrolisados, as bases consideradas duras são as que contêm como ligante oxigênio (ex: carboxilatos), nitrogênio alifático (ex: glutamina) e aminoácidos fosforilados. Já os ligantes considerados moles são os resíduos que contém enxofre (cisteína), havendo também as bases classificadas como intermediárias que são as que contêm nitrogênio aromático (triptofano). Para os metais o Mn²⁺, Fe³⁺, Al³⁺ estão entre os classificados como ácidos duros, já nos intermediários temos dentre vários o Zn²⁺, Cu²⁺e Fe²⁺, e entre os moles temos o Cu⁺, Ag⁺ e Au⁺ (PEARSON, 1968a).

Os resultados mostram que o manganês seguido do ferro apresentam uma maior interação com o hidrolisado, uma vez que necessitaram de uma menor quantidade de hidrolisado para atingirem o ponto de equilíbrio. Baseado no princípio proposto por Pearson (1968a) acredita-se que haja uma maior quantidade de peptídeos cujos tipos de aminoácidos a disposição favoreçam a interação com esses metais de maneira mais estável (SULKOWSKI, 1989).

A proteína de soja possui quantidade de resíduos de histidina acima daquela preconizada pela FAO (PIRES et al., 2006), o que pode ser considerado relevante e favorável ao se avaliar a interação com o ferro, desde que apresente uma distribuição espacial adequada e que esteja disponível para a interação com o metal (ARNOLD, 1991).

Para o ferro a confirmação do ponto de equivalência metal/peptídeo, após o desaparecimento da corrente de pico catódica do voltamograma, foi realizada com a adição de 3 gotas de tiocianato de potássio 1,0 mol/L ao sobrenadante da dispersão. Foi observada uma cor levemente alaranjada no sobrenadante, indicando que apenas uma quantidade residual de ferro reagiu com o tiocianato de potássio. Essa mudança de coloração pode ter ocorrido devido a presença de pequena quantidade de ferro livre não detectado ou ao deslocamento do ferro complexado fracamente com os resíduos mais solúveis de peptídeos.

O zinco apresentou um rendimento menor de reação, pois foi necessária uma maior quantidade de hidrolisado para consumir o metal livre no meio. Além disso, o comportamento do zinco, observado pelos voltamogramas obtidos, foi diferente dos outros metais. Após a adição de um volume determinado da dispersão de hidrolisado ao meio, o primeiro voltamograma obtido apresentava uma corrente de pico determinada, no entanto, após 15 minutos de agitação, um novo voltamograma, apresentava uma corrente de pico maior do que obtido anteriormente, sugerindo uma instabilidade na ligação peptídeos/metal.

Pela voltametria realizada com o zinco, ao contrário dos outros dois metais, não foi possível se observar o ponto de equivalência da reação com o total desaparecimento do pico de corrente catódica, fato que se pode observar na figura 33, em que o último voltamograma

apresentado em azul mostra ainda uma pequena inversão no lado esquerdo (pico catódico), indicando que ainda há zinco livre no meio e a amplificação da escala do aparelho mostrou ainda a formação de um voltamograma com o perfil muito semelhante ao notado no início da adição do hidrolisado. A contínua adição de hidrolisado após esse ponto não mudou o perfil do voltamograma obtido o que nos leva a sugerir que o sistema entrou em equilíbrio e que a ligação do zinco ao hidrolisado é mais instável quando comparada aos metais ferro e manganês.

Algo interessante durante o experimento foi a formação de precipitado provavelmente do complexo recém-formado, observado após as primeiras adições do hidrolisado ao meio. Acredita-se que tal comportamento minimizou uma possível interferência do metal complexado nas leituras seguintes.

A utilização do método de voltametria cíclica na tentativa de se determinar a estequiometria entre o metal/hidrolisado mostrou-se satisfatória para o nosso objetivo. O comportamento observado ao longo do experimento, no qual a adição do hidrolisado provocou uma redução das correntes de pico de uma maneira direta (principalmente para o manganês e o ferro), foi um indicativo de que o método pode ser utilizado para estimar o ponto de equivalência metal/hidrolisado.

Para o cobre, a determinação da estequiometria metal/hidrolisado foi realizada utilizando-se o método de titulação potenciométrica, visto que a voltametria cíclica não mostrou ser o método mais adequado para esse metal devido às suas reações redox concomitantes. A liberação de H⁺ no meio devido à formação do complexo de peptídeos com o metal permite o monitoramento da alteração do potencial e a determinação do ponto de equivalência cobre/hidrolisado, devido a uma abrupta mudança no potencial coincidente com o fim da reação (PANIAGO; CARVALHO, HARRYS, 2003; 1988; SUYAMA et al., 2001). O ponto de equivalência foi determinado graficamente obtido a partir do comportamento da primeira derivada em função da curva de titulação. Nesse gráfico, o ponto de equivalência corresponde ao topo do pico obtido no gráfico da primeira derivada.

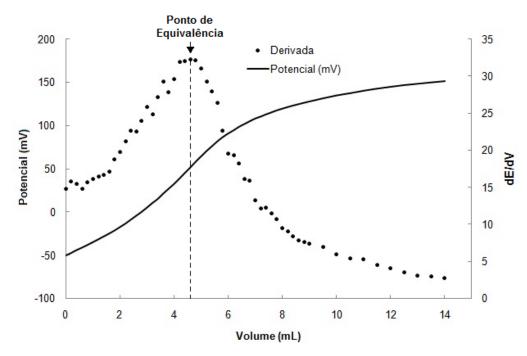


Figura 35: Titulação potenciométrica para a determinação do ponto de equivalência do cobre em relação ao hidrolisado de proteína de soja.

Com os resultados observados no gráfico apresentado na figura 35 foi possível obter o ponto de equivalência entre o cobre e o hidrolisado. Esse resultado prévio mostrou que o cobre apresentou uma maior afinidade pelo hidrolisado quando comparado ao zinco, porém inferior ao manganês e ao ferro.

Para a confirmação dos resultados obtidos foram realizadas mais duas caracterizações: a determinação da quantidade de cada metal ligado ao hidrolisado pelo método de absorção atômica e ICP-MS, enquanto que a confirmação da interação do metal com o hidrolisado foi obtida através da obtenção de espectros de absorção na região do ultravioleta-visível.

4.8.2. Avaliação espectroscópica da interação peptídeo de soja com metal e quantificação de metal ligado ao hidrolisado de proteína de soja

Para a avaliação da interação dos peptídeos presentes no hidrolisado com os metais estudados foram obtidos espectros na região do ultravioleta-visível. Inicialmente essa caracterização seria feita por espectroscopia vibracional na região do infravermelho como utilizado por Franzan (2006), no entanto os espectros obtidos para todos os metais, não mostraram diferenças reais quando comparados ao espectro do hidrolisado. As bandas ficaram muito semelhantes e tornou-se praticamente imperceptível observar modificações no perfil ou

no deslocamento das bandas, comportamento que seria um indicativo da complexação. A complexidade da amostra (contendo peptídeos com até nove resíduos de aminoácidos) leva a uma sobreposição de vários modos de vibração nas regiões do espectro onde poderia se observar interações metal/peptídeo causada pelo grande número dessas interações e de peptídeos entre si.

A impossibilidade de se utilizar essa técnica para identificar os sítios de interação do metal com os peptídeos, fez com que optássemos por demonstrar a formação de complexos entre os metais e os peptídeos do hidrolisado usando outra técnica. Para isso foram obtidos os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível no intuito de verificar a formação ou não do complexo, baseado na mudança de cor observada nos complexos quando comparados aos sais dos metais.

A mudança de cor observada nos complexos metálicos pode ser explicada com base na teoria do campo cristalino, inicialmente utilizada para estudar as estruturas cristalinas de sólidos iônicos, e posteriormente empregada para estudos das ligações eletrostáticas em compostos de coordenação (complexos). Segundo essa teoria, a ligação de um ligante carregado negativamente ou possuindo uma carga parcial negativa de um dipolo elétrico, exerce uma força de repulsão nos elétrons presentes nos orbitais d do metal, causando a separação desses orbitais em dois grupos de diferentes níveis de energia (na simetria octaédrica: e_g : maior energia; t_{2g} : menor energia; na simetria tetraédrica: t_2 : maior energia; e: menor energia) como apresentado na figura 36 (ATKINS et al., 2006).

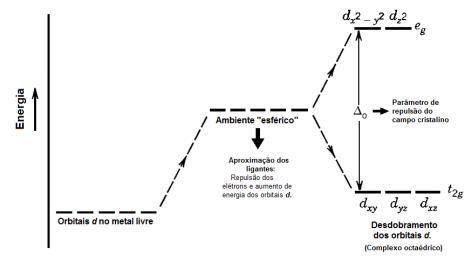


Figura 36. Distribuição energética dos orbitais d em um campo cristalino octaédrico, adaptado de Atkins et al. (2006).

Assim os elétrons do metal se distribuem nos orbitais dos níveis e_g e t_{2g} de acordo com as características dos ligantes (campo forte ou campo fraco) e do preenchimento do orbital d do metal, o que acarreta em complexos de spin alto ou spin baixo. Essas características irão determinar a diferença energética entre os níveis e_g e t_{2g} dos orbitais e também o emparelhamento ou não dos elétrons nesses (ATKINS et al., 2006; HUHEEY; KEITER; KEITER, 1993b).

As diferenças de energia e na distribuição eletrônica dos elétrons nos orbitais d são responsáveis pela ampla gama de cores característica dos complexos metálicos. Quando a luz incide sobre esses complexos, com a absorção de radiação eletromagnética ocorrem excitações eletrônicas e transições entre elétrons de diferentes níveis energéticos localizados nos orbitais d. Cada tipo de complexo absorve energia em um comprimento de onda específico, e a cor que visualizamos (transmitida) é a cor complementar à cor absorvida (GUSHIKEM, 2005; HUHEEY; KEITER; KEITER, 1993b).

A diferença de cor entre o hidrolisado, o sal de metal e o complexo é um grande indicativo da formação do complexo e isso pode ser observado pela mudança do comprimento de onda de absorção na região do UV-visível para cada composto como apresentado nas figuras 37, 38, 39 e 40.

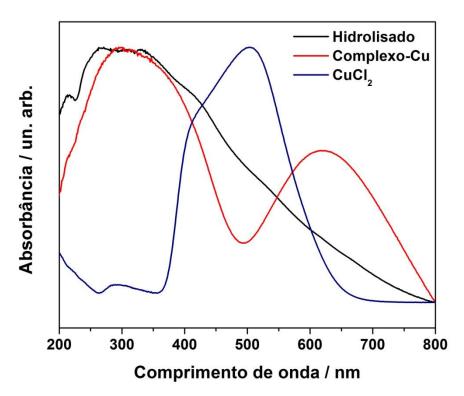


Figura 37. Espectro de absorção na região UV-visível para o hidrolisado, complexo de cobre e Cloreto de Cobre.

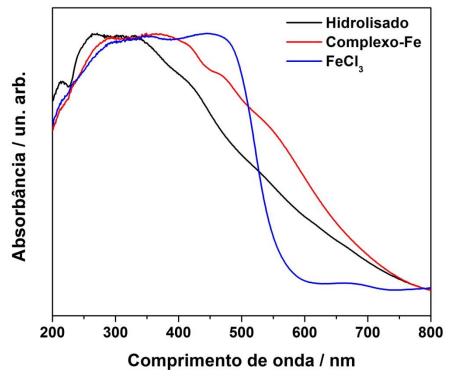


Figura 38. Espectro de absorção na região UV-visível para o hidrolisado, complexo de ferro e Cloreto de Ferro.

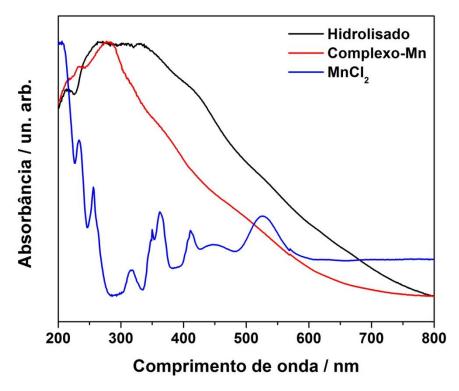


Figura 39. Espectro de absorção na região UV-visível para o hidrolisado, complexo de manganês e Cloreto de Manganês.

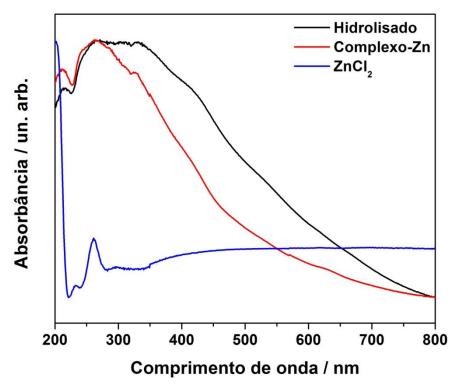


Figura 40. Espectro de absorção na região UV-visível para o hidrolisado, complexo de zinco e Cloreto de Zinco.

Como pode se observar nos espectros apresentados os complexos dos metais cobre, ferro, manganês e zinco apresentaram uma grande diferença nos seus espectros quando comparados ao seu sal e ao hidrolisado. Tal comportamento é um indicativo da formação de complexos entre os metais com os peptídeos do hidrolisado.

É possível observar nos espectros que a banda de absorção do hidrolisado apresenta um deslocamento em comparação aos complexos metálicos. Nos complexos formados entre o hidrolisado e os metais cobre, manganês e zinco a banda de absorção referente aos grupos orgânicos do hidrolisado se desloca para menores comprimentos de onda, indicando que há um aumento de energia entre as transições responsáveis por tal absorção, sugerindo a complexação. No entanto o complexo de ferro apresenta banda de absorção deslocada para maiores comprimentos de onda, devido à combinação da banda atribuída ao íon Fe³⁺ e ás bandas referentes ao hidrolisado.

Em relação ao cobre, quando comparamos os espectros referentes ao complexo e ao sal metálico nota-se que a banda atribuída à transição do íon Cu^{2^+} se desloca de 500 nm para próximo a 630 nm. Isto se deve a mudança do ambiente químico ao redor do íon metálico, ocasionada pela interação com o hidrolisado alterando o desdobramento dos orbitais d e consequentemente a energia da transição, indicando a formação do complexo.

Na figura 39 o espectro de absorção do complexo de manganês não mostra transições eletrônicas referentes ao metal, pois estas bandas são de baixa intensidade. Este mesmo comportamento é observado para o complexo de zinco, porém para o zinco não é possível observar bandas de absorção referentes ao metal, visto que o orbital d é totalmente preenchido.

Embora não forneça informações detalhadas a respeito do modo de coordenação e sobre quais grupos do hidrolisado interagem especificamente com os íons metálicos, a técnica de absorção de luz no UV-visível possibilitou avaliar a formação dos complexos.

Já a quantificação de cada metal complexado revelou 15,19 % de manganês ligado, 5,55 % de ferro, 2,94% de zinco e 3,13 % de cobre, resultado que corrobora com o comportamento observado nas medidas potenciométricas realizadas anteriormente (voltametria e titulação potenciométrica).

VIABILIDADE ECONÔMICA DO PROJETO

4.9. Avaliação econômica do projeto

O Brasil tem despontado como uma das novas economias de países emergentes. O crescimento econômico, evidenciado pelo crescimento do produto interno bruto (PIB) e a estabilidade econômica observados nos últimos anos são os principais fatores para o destaque do Brasil entre as economias mundiais emergentes (BANCO CENTRAL DO BRASIL (BCB), 2011).

O crescimento da exportação brasileira observado nos últimos anos tem como base principalmente matérias-primas tais como os produtos agropecuários (ex: soja e açúcar) e minérios (ex: ferro), genericamente denominados *commodities*, em detrimentos aos produtos de média e alta tecnologia os quais o Brasil vem perdendo destaque na exportação nos últimos 5 anos (INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA), 2011). Esse desequilíbrio tem levado a uma perda de competitividade do Brasil frente a outros países emergentes (BCB, 2011).

A dependência da economia Brasileira em relação à exportação de *commodities* é preocupante devido ao possível não desenvolvimento de setores mais inovadores e que empregam tecnologia mais avançada, sendo necessários esforços para a mudança desse perfil. Para sanar essa deficiência, o governo brasileiro tem incentivado a inovação e o desenvolvimento tecnológico através de mecanismos de fomentos via órgãos públicos como a FINEP e FAPESP (Estado de São Paulo) ou leis como a nº 11.196 (Lei do Bem) (BRASIL, 2011; FAPESP, 2011; FINEP, 2011; IPEA, 2011; MCTI, 2011).

A estimulação da inovação e desenvolvimento tecnológico também pode ser efetuada com o empenho de setores tradicionais da economia (ex: agrícola) em desenvolver e produzir produtos inovadores, consequentemente de maior valor agregado, com a aplicação de recursos próprios à pesquisa e inovação. A utilização de órgãos de fomento, que estimulem tanto a inovação direta na indústria quanto à parcerias entre empresa e universidade promovendo a inserção de uma política inovadora no meio industrial também é uma opção (BRASIL, 2011; IPEA, 2011; MARQUES, 2011).

A parceria entre empresa e universidade tem sido amplamente discutida. A transferência de tecnologia entre os dois setores pode ocorrer com a troca de informações e

qualificação de recursos humanos fornecendo suporte à pesquisa, pesquisa cooperativa, transferência de conhecimento e transferência de tecnologia (ARBIX, 2010; SANTORO; CHAKRABARTI, 2002; SEGATTO-MENDES; SBRAGIA, 2002).

O processo de cooperação universidade-empresa tem como os seus principais facilitadores os incentivos financeiros e fiscais fornecidos pelo governo, na contramão tem-se a burocracia das universidades como a principal desvantagem. Assim, para facilitar tais parcerias as universidades brasileiras, espelhadas em ações de outros países (ex: Estados Unidos da América (EUA)), tem criado mecanismos que visam a aproximação desses dois setores ao incentivar o patenteamento e a criação de agências de inovação atuantes dentro das universidades (SANTANA; PORTO, 2009; SEGATTO-MENDES; SBRAGIA, 2002).

Para uma interação sadia e promissora entre empresa e universidade, o bom funcionamento dessas agências intermediadoras deve ser imprescindível, com gestores capacitados e o conhecimento do que ocorre dentro e fora da academia (PLONSKI, 1999). É necessário também um sistema que auxilie a mensuração do retorno das tecnologias licenciadas (INOVA, 2009).

São diversas as metodologias disponíveis para a mensuração do retorno das tecnologias, sendo que todas apresentam suas vantagens e desvantagens, e a escolha de uma ou um conjunto de metodologias para esses cálculos é realizada pela melhor adequação ao tipo de informação desejada ao final. Nesse trabalho, foram escolhidos os métodos de Valor Presente Líquido do Projeto (VPL) e a análise de sensibilidade através do método de Monte Carlo para avaliação da viabilidade econômica da produção dos produtos derivados do farelo de soja desenvolvidos.

4.8.1. Esquematização do processo produtivo

O processo de produção foi esquematizado para uma produção máxima diária de acordo com a capacidade de cada equipamento: 5 Kg de proteína de soja, 1 Kg para o hidrolisado de proteína de soja e os complexos derivados da produção de 1 Kg do hidrolisado. Assim os equipamentos foram selecionados de acordo com a capacidade produtiva e a adequação ao processo a ser empregado, sendo esquematizados como mostrados na figura 41.

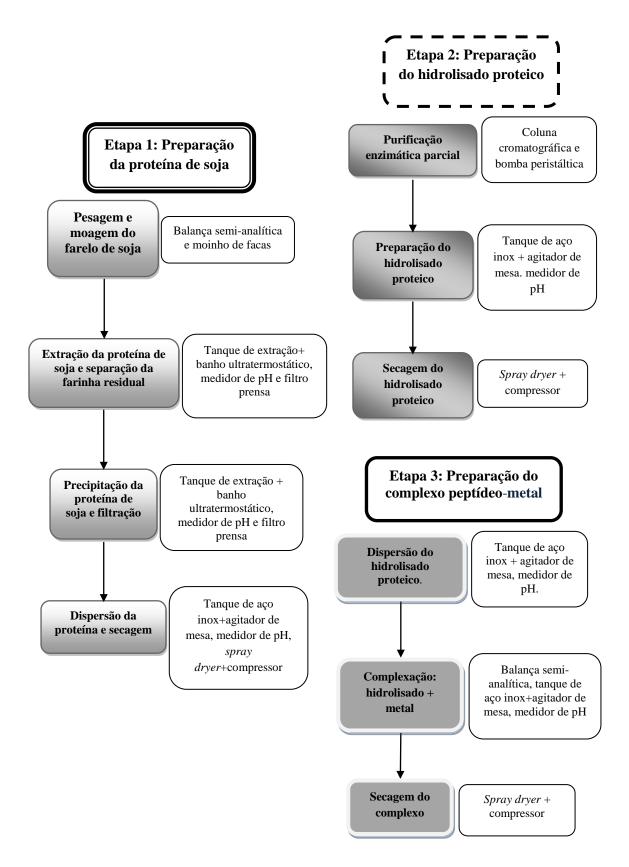


Figura 41. Esquematização do processo produtivo e da distribuição dos equipamentos para produção de proteína de soja (Etapa 1), hidrolisado proteíco (Etapa 2) e complexo peptídeo-mineral (Etapa 3).

Na figura 41, pode- se observar que em diferentes etapas o mesmo equipamento foi empregado (ex: *Spray dryer*). A utilização do mesmo equipamento em etapas distintas justifica-se tanto pela sua adequação a mais de um processo quanto a produção ser sequencial não interferindo um processo no outro. O tempo de processo de cada etapa foi baseado no tempo utilizado em laboratório considerando os intervalos para a limpeza e preparação dos equipamentos para a próxima etapa. O consumo médio de energia de cada etapa foi determinado pelo tempo de funcionamento de cada equipamento multiplicado pela sua potência como mostrados na tabela 27.

Tabela 27. Tempo de duração e consumo energético de cada etapa.

	Tempo de	Consumo energético
	produção (horas)	total (KW)
Etapa 1	7	88,6
Etapa 2	11,5	71,74
Etapa 3	4	68,98

Etapa 1: volume de produção diário de 5 Kg.

Etapa 2: volume de produção diário de 1Kg.

Etapa 3: volume de produção diário de 1 Kg para cada complexo.

Os tempos de produção apresentados na tabela 27 referem-se à obtenção do produto seco, no entanto, deve-se enfatizar que quando um produto é utilizado como matéria-prima na etapa seguinte a secagem intermediária é excluída, reduzindo o tempo do processo total.

Para a produção, foi estipulada uma a área de 50 m², sendo considerada suficiente para a acomodação de todos os equipamentos e fluxo livre e seguro dos trabalhadores, matéria-prima e produtos. Nesse trabalho foi considerada a produção de novos produtos em uma empresa já estruturada, sendo assim não foram consideradas as áreas e recursos de outros departamentos.

Para a mão de obra foi considerada a utilização de um responsável técnico com nível superior, com a função de supervisionar o processo produtivo e assegurar a garantia da qualidade e boas práticas de fabricação dos produtos e um técnico de nível básico em farmácia para execução e auxilio durante todo o processo produtivo e embalagem dos produtos (ANVISA, 2003b). O quadro reduzido de funcionários foi considerado adequado devido à pequena produção diária.

As matérias-primas foram selecionadas de fornecedores qualificados, mantendo as características e o padrão de qualidade das utilizadas no desenvolvimento dos produtos em

laboratório. A quantidade utilizada em cada processo foi calculada pela extrapolação dos valores utilizados nos experimentos em laboratório. As embalagens para os produtos foram selecionadas de acordo com a sua capacidade (0,5 Kg), características dos produtos e que garantissem a manutenção da qualidade dos produtos durante todo o tempo de prateleira (ex: livre de umidade) (ANVISA, 2003b).

4.8.2. Determinação dos custos

Os custos relacionados à produção foram determinados com a consulta aos fornecedores, para as matérias-primas e equipamentos, sempre respeitando a qualidade e adequação ao processo.

4.8.2.1. Custos de implantação

Os custos para a implantação do projeto correspondem aos equipamentos necessários para a produção. Os custos totais de equipamento orçados foram R\$ 283.215,39, sendo que estes se referem aos equipamentos necessários para a produção de todos os produtos propostos. Dentre todos os equipamentos, o de maior custo é o *Spray Dryer* (R\$ 145.000,00) sendo este necessário para a obtenção de toda a linha de produtos propostos (proteína, soja e complexos metálicos). Nesses custos também foi incluída a resina Sephadex G-25 que apesar de não ser um equipamento propriamente dito é parte constituinte do mesmo (coluna cromatográfica) tendo um valor estipulado, para a quantidade utilizada, em R\$ 67.927,38.

4.8.2.2. Custos Variáveis de Produção

Os custos variáveis de produção são aqueles que variam de acordo com o volume de produção. Dentre esses custos temos as matérias-primas e reagentes, mão de obra diretamente ligada à produção e o consumo de energia dos equipamentos (MARTINS, 2006a).

O preço do farelo de soja, matéria-prima de partida dos produtos derivados, foi estipulado pelo preço médio das suas cotações nos últimos 5 anos no Estado de São Paulo (ABIOVE, 2011). Já para os reagentes foram realizadas cotações com diversos fornecedores e

fabricantes, obtendo um preço médio dos valores obtidos. Para os reagentes os quais não foi possível obter um preço médio, foi estipulada uma variação de 10% (para mais e para menos) no preço, o que é uma limitação do método, visto que para cálculos é importante que os valores utilizados sejam os reais de cada produto para que os resultados do cálculo da viabilidade econômica sejam mais confiáveis.

Os resultados obtidos para o custo médio de uma produção mensal e anual estão apresentados na tabela 28.

Tabela 28. Custo mensal e anual de matéria-prima.

		Custo mensal	Custo anual
	Produtos	(R\$)	(R\$)
Etapa 1	Proteína de soja	112,44	1.349,25
Etapa 2	Hidrolisado de soja	7.256,83	87.081,96
	Complexo de manganês	5.857,82	70.293,84
Etapa 3	Complexo de ferro	7.655,84	91.870,02
	Complexo de zinco	7052,10	84.625,15
	Complexo de cobre	7635,13	91.621,54

Etapa 1: volume de produção diário de 5 Kg.

Etapa 2: volume de produção diário de 1Kg.

Etapa 3: volume de produção diário de 1 Kg para cada complexo.

Ao analisarmos a tabela 28, nota-se que o custo aumenta substancialmente da etapa 1 para a etapa 2. A elevação desse custo deve-se principalmente ao custo referente a enzima Alcalase® 2,4L, esta é um produto exclusivo do seu fabricante e a sua comercialização é realizada somente através de um representante comercial exclusivo o que dificultou a obtenção de diferentes preços e até mesmo a obtenção de um preço mais próximo do real para uma produção em maior escala. A etapa 3 foi subdividida em quatro subetapas referentes aos quatro possíveis produtos (complexos de cobre, ferro, zinco e manganês). A diferença de custo observada entre os complexos ocorre pelos preços distintos dos sais metálicos, assim como às quantidades utilizadas de cada sal devido a cada rendimento de complexação.

O custo da mão de obra utilizada foi determinado com base nos pisos salariais fornecidos pelo CRF-SP (2011) e em dados fornecidos por uma indústria farmacêutica da região de Ribeirão Preto, no entanto, deve-se esclarecer que não há um piso salarial definido para farmacêuticos atuantes na indústria, assim o valor empregado para os cálculos de viabilidade foi estipulado tendo por base os dados obtidos. O custo total da mão de obra

apresentado na tabela 29 inclui salário, décimo terceiro e todos os outros encargos relacionados à mão de obra.

Tabela 29: Custo de mão de obra direta.

	Custo mensal	Custo anual
Mão de obra	(R\$)	(R\$)
Auxiliar de produção	1.450,88	17.410,54
Responsável técnico	2.934,36	35.212,32
Total	4.385,25	52.622,86

Já o consumo energético foi calculado com base no consumo dos equipamentos multiplicado pela média de preço do KWh nos últimos 9 anos na região Sudeste (ANEEL, 2011), totalizando um valor médio mensal de R\$ 1.059,00.

4.8.2.3. Custo fixo de produção

O aluguel é considerado um custo fixo de produção visto que é um custo existente independentemente da produção.

O aluguel da área necessária para a acomodação de toda a estrutura produtiva foi obtido com a pesquisa do preço do m² de galpões industriais na região de Ribeirão Preto, sendo obtido um valor médio de R\$ 11,09/m², totalizando um aluguel médio de R\$ 554,50/mês.

A depreciação, também considerada um custo fixo de produção, é calculada com base na Instrução normativa SRF n° 162, sendo estipulado que para equipamentos a depreciação é de 10 % ao ano considerando um tempo de vida útil de dez anos. A utilização desse parâmetro como base de cálculo para a depreciação nesse projeto pode ser considerada uma limitação, visto que pode não refletir a depreciação real do equipamento ao longo do tempo. No entanto essa base de cálculo é utilizada por ser padronizada para o cálculo do imposto de renda.

4.8.3. Levantamento dos valores de mercado dos produtos

Para se determinar o valor dos produtos elaborados a partir do farelo de soja (proteína, hidrolisado de soja e complexo metálico) foram feitas pesquisas de produtos iguais disponíveis no mercado. Para os produtos os quais não foram encontrados produtos iguais disponíveis foram selecionados aqueles com características semelhantes aos produtos propostos nesse trabalho. O valor de mercado de cada produto proposto foi baseado na média dos valores dos produtos cotados no mercado.

Para a proteína de soja, foi realizada uma pesquisa de preço com os produtos que além de serem adequados para o consumo humano apresentassem teor proteico semelhante ao produto obtido nesse trabalho.

Quanto ao hidrolisado proteico de soja, houve uma maior restrição quanto à pesquisa de preço, pois não encontramos no mercado o produto hidrolisado de proteína de soja para o consumo humano. Assim, devido a semelhança tomamos com base o preço da peptona de soja (hidrolisado de soja utilizado em meio de cultura) que possui características semelhantes ao hidrolisado produzido nesse trabalho.

A pesquisa de mercado para a estipulação de preço dos complexos metálicos foi realizada com base nos produtos semelhantes já disponíveis. Para a seleção de produtos semelhantes foi levado em consideração o tipo de metal presente no complexo/quelato independente da quantidade de metal presente no produto.

4.8.4. Determinação da viabilidade econômica do projeto

O planejamento estratégico de um negócio é de extrema importância para aumentar a chance de sucesso e envolve um conjunto de técnicas na busca de se estabelecer parâmetros da sua viabilidade.

Nesse trabalho, para a determinação da viabilidade econômica do projeto associou-se os métodos do VPL e simulação de Monte Carlo. Sendo a escolha desses dois métodos baseada na complementaridade dos resultados fornecidos para a avaliação da viabilidade econômica, possibilitando a obtenção de um resultado mais completo.

O VPL de um investimento é a soma a valor presente dos fluxos futuros de caixa de um investimento descontando o custo inicial do projeto (ex: custo de equipamentos). Sendo o fluxo de caixa uma ferramenta gerencial que informa a movimentação financeira de um dado período (entradas e saídas em valor monetário) (ROSS; WESTERFIELD; JAFFE, 2002a).

O método do VPL é amplamente utilizado para avaliar a viabilidade da implantação de um projeto, Areda (2009) em seu estudo farmacoeconômico aplicou o método do VPL para avaliação da viabilidade de implantação de farmácia semi-industrial para a produção de medicamentos em hospital de grande porte da rede pública.

Para resultado de VPL positivo, o projeto é considerado viável, no entanto para VPL negativo o projeto não é viável.

O método do VPL, sendo um método determinístico, apresenta a limitação ao não considerar as possíveis variações dos custos ao longo do tempo e as incertezas do mercado tão comuns nos dias atuais (SANTOS; PAMPLONA, 2005). Assim a utilização de um método que considera algumas incertezas do mercado, como uma possível variação dos preços dos custos, torna a análise da viabilidade econômica de um projeto mais completa e confiável. Dentre as metodologias mais empregadas temos a Simulação de Monte Carlo.

O Método de Simulação de Monte Carlo envolve a utilização de números randomizados (pseudoaleatórios) e a probabilidade para a resolução de problemas (GUJARATI, 2002).

A simulação é uma tentativa de replicação de uma situação real onde os resultados gerados sejam o mais próximo possível da realidade e tem por base dados históricos. Cada uma das simulações geradas representa uma situação real do projeto proposto. O conjunto dessas simulações gera diversos cenários onde é possível obter uma distribuição com o percentual de sucesso e insucesso servindo assim, como uma ferramenta na tomada de decisão (CARDOSO; AMARAL, 2000; ESTEVES, 2010).

A associação dos dois métodos (VPL e Monte Carlo) para a determinação da viabilidade foi realizada por possibilitar não somente a obtenção de um único VPL, o que daria a indicação de um único resultado (viável ou não) considerando os parâmetros no tempo presente, mas uma distribuição de VPLs, fornecendo como resultado a probabilidade de sucesso e insucesso do projeto, obtida a partir de uma distribuição de possíveis resultados de fluxo de caixa obtidos através da Simulação de Monte Carlo. A associação desses métodos forneceu a possibilidade de considerar as possíveis variações do mercado e tomar uma decisão mais segura quanto à implantação ou não do projeto.

Para a determinação do VPL de um projeto é importante enfatizar que a taxa de desconto (juros) utilizada para os cálculos deve ser adequada ao risco do projeto. Para esse trabalho utilizamos a taxa Selic, no entanto deve-se enfatizar que essa taxa considera um risco

pequeno o que pode não ser condizente para a implantação do projeto, sendo que para cálculos mais próximos do real é necessário considerar uma taxa mais adequada ao risco que o projeto oferece.

Inicialmente foram calculados os fluxos de caixas de cada produto para o período de 12 meses. Para a determinação dos custos foram considerados a maior capacidade produtiva possível para cada produto, ou seja, para a proteína de soja foram considerados a produção de 5 Kg diários, 1 Kg de hidrolisado proteico e para cada complexo a produção de 1Kg diário devido às limitações tecnológicas.

Deve-se enfatizar que para os cálculos de viabilidade, os produtos considerados como matéria-prima foram o farelo de soja para a produção da proteína, a proteína para a produção do hidrolisado e para a produção do complexo a matéria-prima de partida foi a proteína de soja, pois não foi encontrado hidrolisado de soja disponível no mercado para a preparação de complexos (somente vendidos como peptona) o que vinculou a produção dos complexos à produção do hidrolisado.

Para a determinação da produção de todos os produtos em série seria necessário um ajuste no modelo proposto, o que foi descartado para esse projeto devido ao aumento da complexidade dos cálculos. No entanto fica claro que para um trabalho mais aprofundado esse ajuste seria válido e forneceria resultados mais satisfatórios.

Para o cálculo dos fluxos de caixa dos produtos, alguns critérios foram tomados quanto aos custos, ou seja, alguns custos foram proporcionais ao tempo de uso do equipamento.

Assim, para o cálculo dos fluxos de caixa da produção de cada um dos complexos de peptídeo-metal os custos de mão de obra direta, aluguel, equipamentos e depreciação foram considerados a metade do valor integral, baseado no tempo de produção (aproximadamente 4 horas) de cada complexo. Essa consideração foi feita supondo que a empresa utilizaria dessa estrutura para outras funções quando estas não estivessem sento utilizadas para o fim proposto nesse trabalho evitando assim a ociosidade. Para os a proteína de soja e o hidrolisado não foram feitas as mesmas considerações visto que a estrutura envolvida seria utilizada integralmente durante um dia de produção.

Inicialmente foi determinada uma distribuição de fluxos de caixa para cada produto utilizando a simulação de Monte Carlo. Os fluxos de caixa correspondentes às produções de proteína de soja, hidrolisado de soja e complexos de cobre, ferro e manganês apresentaram todos os resultados da simulação negativos, ou seja, o retorno financeiro gerado pela receita, não é suficiente para suprir os custos relacionados à produção de cada um desse produto. No

entanto para o complexo de zinco todos os resultados de fluxo de caixa da simulação se mostraram positivos, mostrando que a receita gerada pelo produto é maior do que os custos relacionados a sua produção.

Como os resultados dos fluxos de caixa para todos os produtos, excetuando o complexo de zinco, deram negativos, o cálculo do VPL só foi realizado para este composto de acordo com o descrito no item 3.2.13.3, visto que não faria sentido calcular o VPL para resultados de fluxos de caixa já negativos.

Os resultados para o zinco mostraram uma distribuição de VPL positiva para todos os resultados simulados (não apresentando resultados de VPL negativo), indicando 100% de viabilidade da produção como mostrados no gráfico de frequência acumulada. Pelo histograma não é possível verificar faixa de resultados negativos, caso isso tivesse ocorrido, seria a faixa de probabilidade de insucesso da produção (figura 42).

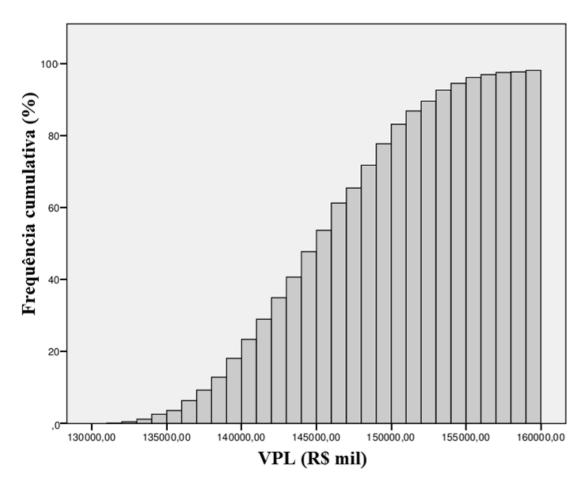


Figura 42. Distribuição de frequência cumulativa do VPL para o complexo de zinco.

Também, pelo histograma da figura 43 pode-se observar que o VPL com maior probabilidade de ocorrência (entre 70 e 75 %) se encontra na faixa de R\$ 144 mil e R\$ 146 mil, com valor mínimo de R\$ 130 mil.

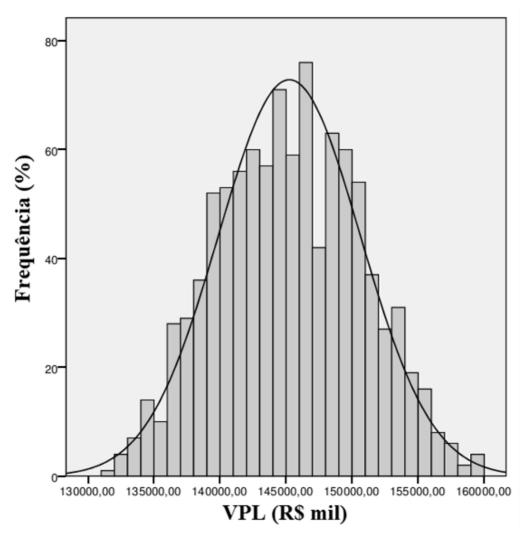


Figura 43. Distribuição da frequência relativa do VPL para a produção do complexo de zinco.

A correlação é a teoria que estuda a intensidade da relação ou dependência entre duas variáveis fornecendo informação sobre se há uma relação entre, por exemplo, duas variáveis (GUJARATI, 2002).

Assim, com a viabilidade determinada foi avaliada qual a relação e grau de associação (correlação) das variáveis receita, margem de contribuição (MC) 2, 3 e total (MCT) no VPL, sendo todos os valores utilizados correspondentes aos totais para um ano de produção.

A MC 2 (receitas menos os custos de matéria-prima, consumos de energia elétrica e embalagem) é a contribuição correspondente à produção do hidrolisado no fluxo de caixa do

complexo, MC 3 é a margem de contribuição relativa a própria produção do complexo e MCT é a somatória das duas.

A relação entre as variáveis foi determinada com base no método de correlação de Pearson (correlação simples) que basicamente define o grau de associação entre duas. Esse coeficiente varia entre -1 e 1 onde o sinal indica a variação positiva ou negativa da relação entre as variáveis e o valor indica a intensidade dessa relação (FIGUEIREDO FILHO; SILVA JÚNIOR, 1999; GUJARATI, 2002).

Como apresentado na tabela 30, as correlações simples das variáveis receita e margens de contribuição 3 e total com o VPL mostraram resultados positivos e significativos, ou seja, quando essas variáveis aumentam o VPL também aumenta, porém com valores próximos a 0,016 (16 %), o que pode se considerar a uma baixa correlação.

Tabela 30. Correlação simples (Pearson) das variáveis de margem de contribuição (2, 3 e total) com o VPL.

Variáveis	Correlação com VPL
Receita	0,163
MC 3	0,167
MC 2	-0,002
MCT	0,167

Deve-se enfatizar que apesar de uma maior correlação entre algumas variáveis, não é possível se estabelecer uma relação causa-efeito entre as elas visto que na determinação do grau de associação desconsideram-se outras variáveis que também poderiam influenciar nesse resultado.

Não foi realizada a correlação de outras variáveis (*inputs*) que poderiam ser utilizadas tais como matéria-prima, mão de obra direta etc. No entanto é evidente que a utilização desses outros *inputs* forneceriam um resultado mais abrangente e com maiores informações, sendo que para um estudo mais aprofundado seria necessário esse tipo de abordagem.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a associação dos dois métodos levou a um resultado mais confiável ao considerar possíveis variações dos custos ao longo do tempo estipulado para o cálculo do VPL, no entanto, mesmo considerando uma variação para cada custo envolvido, a análise de viabilidade econômica nos mostrou que a produção, excetuando-se para o complexo de zinco, não é viável.

A análise mais criteriosa dos resultados mostrou que quando avaliamos a viabilidade do projeto, o dimensionamento do processo produtivo (equipamentos e escala de produção) é essencial para a otimização do processo e consequente retorno financeiro, pois o aumento de escala possibilita o acesso a matérias-primas com menores preços e uma maior diluição dos custos fixos, como o aluguel e mão de obra direta, o que poderia fornecer cenários mais promissores para a produção dos outros produtos propostos nesse trabalho.

Uma das grandes dificuldades foi a obtenção de orçamento dos equipamentos para a produção em uma escala maior. No caso do aumento de produção, para todas as etapas seria necessário um novo dimensionamento dos equipamentos e uma parceria com uma empresa fabricante disposta a realizar toda a parte de desenho dos equipamentos e o fornecimento do orçamento, o que não foi possível de se conseguir. Mesmo para os equipamentos de pequeno porte, a partir do momento onde era revelado o objetivo da pesquisa orçamentária (projeto de pesquisa), alguns dos fabricantes recusaram o fornecimento do orçamento requisitado, o que restringiu ainda mais as opções para o levantamento de custo do projeto.

Assim como para o aumento da escala produtiva é necessário toda a reestruturação de equipamentos, para a matéria-prima também deve ser feita uma adequação quanto à quantidade comprada. No entanto para alguns itens não houve alternativa a não ser a cotação desses produtos (ex: Alcalase® 2,4L e resina Sephadex G-25) por meio de terceiros (representantes exclusivos), o que aumentou muito o custo final do produto, assim como impossibilitou se determinar o aumento de escala de produção visto que não nos foi fornecido os valores para volumes de compra maiores.

Apesar dos resultados desfavoráveis acredita-se que com o ajuste do volume de produção os outros produtos poderiam ser viáveis economicamente. Deixando em aberto essa sugestão como possibilidades futuras para desdobramentos desse trabalho.

Os resultados aqui mostrados sugerem um caminho para a agregação de valor a um produto de baixo valor agregado como o farelo de soja, assim como apresenta ferramentas para a avaliação da viabilidade de projetos executados em laboratórios de pesquisa. No entanto, para um melhor resultado, há diversas barreiras como o conhecimento prévio de áreas que muitas das vezes não são familiares ao pesquisador e o acesso a informações relevantes do projeto que são determinantes para um melhor resultado.

5. CONCLUSÕES

A padronização dos processos extrativos se mostrou dificultosa em escala laboratorial. A dificuldade na execução de algumas etapas dos processos, tais como a filtração, impossibilitou de se obter um resultado com melhor reprodutibilidade. Optou-se pela utilização do extrato padrão 1:30 (m/v) devido as maiores facilidades na execução do processo e bom rendimento.

Os ensaios enzimáticos revelaram que a enzima Alcalase® 2,4L apresentou um melhor rendimento de hidrólise quando comparados às outras enzimas (Neutrase® 0,8L e Flavourzyme® 1000L), em menor diluição enzimática (1:100) a uma concentração de 0,75 % de substrato no meio, ou seja uma relação de 7,5 mg de proteína de soja:10 µl de enzima.

A análise do perfil de peptídeos formados quanto a sua distribuição de tamanho, comprovou o melhor desempenho da enzima Alcalase® 2,4L em relação às demais enzimas. Os resultados mostraram que a associação de enzimas ou novas adições não são relevantes para a mudança do perfil do peptídeo quando comparados ao uso exclusivo da Alcalase® 2,4L. Também ficou evidente que 30 minutos de reação de hidrólise são suficientes para a formação de um perfil de peptídeos adequados para a composição do hidrolisado.

A hidrólise com a Alcalase® 2,4L não alterou o padrão de aminoácidos do hidrolisado quando comparados à proteína de partida.

A remoção do glicerol contido no meio contendo a enzima, utilizando-se do método de cromatografia de exclusão, não reduziu a atividade da enzima e contribuiu para a melhora das características físicas do hidrolisado proteico de soja.

Na preparação dos complexos de peptídeos com os metais ferro, manganês, cobre e zinco a utilização dos métodos de voltametria cíclica e titulação potenciométrica mostrou ser reprodutível e eficiente para a determinação da estequiometria de reação. Sendo que a maior ou menor afinidade do metal pelo hidrolisado deveu-se às diferentes características intrínsecas de cada metal, o que refletiu diretamente na quantidade de cada metal ligado. Os resultados mostraram o teor de metal ligado de 15,19% para o manganês, 5,55% para o ferro, 3,13% para o cobre e 2,94% para o zinco.

A obtenção dos espectros na região do UV-visível comprovou a formação dos complexos metálicos. No entanto, a técnica de absorção na região do UV-Vis possibilita avaliar a formação do complexo, porém não fornece informações a respeito do modo de coordenação e quais grupamentos do hidrolisado interagem com o metal. Para isso outras técnicas poderão ser utilizadas, como por exemplo, espectroscopia vibracional Raman.

A análise da viabilidade econômica mostrou, para o volume de produção sugerido, a não viabilidade de produção dos produtos propostos excetuando-se uma probabilidade de viabilidade de 100% para o complexo de zinco.

A dificuldade ao acesso a informações sobre o custo de equipamentos e matériasprimas dificultou a projeção para uma maior escala de produção afetando diretamente os resultados da viabilidade econômica do projeto.

Apesar dos resultados desfavoráveis de viabilidade econômica, acredita-se que mediante ajustes de produção o projeto possa apresentar uma maior viabilidade comparada aos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 260-268, 2008.

ABIOVE. Complexo soja - evolução das cotações médias. Disponível em: http://www.abiove.com.br/cotacoes_br.html. Acesso em: 17 jul. 2011.

ADAMSON, N. J.; REYNOLDS, E. C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using Alcalase®: Determination of enzyme specificity. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, n. 3, p. 202-207, 1996.

ADIBI, S. A. Intestinal phase of protein assimilation in man. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 29, n. 2, p. 202-215, 1976.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (ANEEL). Tarifas médias por classe de consumo.

Oisponível

om: http://rad.aneel.gov.br/reportserverSAD?%2fSAD_REPORTS%2fSAMP_TarifaMedCConsumoRegiao&rs:Command=Render. Acesso em: 6 out. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução-RE n° 899 de 29 de março de 2003. Brasília, DF, 29 mar. 2003a. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word#%27. Acesso em: 16 mar. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC n° 210 - Regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamentos. Brasília, DF, 2003b.

AGUIRRE, L.; GARRO, M. S.; SAVOY DE GIORI, G. Enzymatic hydrolysis of soybean protein using lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 4, p. 976-982, 2008.

AJINOMOTO. Alimentos e os aminoácidos. Disponível em: http://www.ajinomoto.com.br/enciclopedia/food.html>. Acesso em: 20 out. 2009.

ALIBHAI, Z. et al. Production of soy protein concentrates/isolates: traditional and membrane technologies. **Desalination**, Amsterdam, v. 191, n. 1/3, p. 351-358, 2006.

AMBRÓSIO, V. L. S. **Avaliação do complexo ferro-peptídeo como fonte alternativa de fornecimento de ferro para gestantes**. 1999. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

ANDERSSON, L.-O.; AGELAND, H. **Stabilized protease composition**. US. 2009/0136474 A1, 28 maio 2009.

ANTONIONE, R. et al. Whey protein ingestion enhances postprandial anabolism during short-term bed rest in young men. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 138, n. 11, p. 2212-2216, 2008.

ARBIX, G. Caminhos cruzados: rumo a uma estratégia de desenvolvimento baseada na inovação. **Novos Estudos - CEBRAP**, n. 87, p. 13-33, 2010.

AREDA, C. A. Estratégia de estudo farmacoeconômico para avaliação da viabilidade de produção de medicamentos em hospital de porte especial. 2009. 176 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

ARNOLD, F. H. Metal-Affinity separations: a new dimension in protein processing. **Nat Biotech**, New York, v. 9, n. 2, p. 151-156, 1991.

ASCHNER, M. et al. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 221, n. 2, p. 131-147, 2007.

ASGHARIAN, B.; QUINTANA, R. P.; HONG, B.-S. Liquid enzyme compositions containing aromatic acid derivatives and methods of use. US. 005919313A, 6 jul. 1999.

ASHMEAD, H. D. The absorption and metabolism of iron amino acid chelate. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 51, n. 1, p. 13-21, 2001.

ATHERTON, D. Successful PTC amino acid analysis at the picomol level. In: HUGLY, T. E. **Techniques in protein chemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. cap. 27, p. 273-283.

ATKINS, P. et al. *d*-Metal Complexes: eletronic structure and spectra. In: ______. **Inorganic chemistry**. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2006. cap. 19, p. 459-490.

BANCO CENTAL DO BRASIL (BCB). Indicadores Econômicos Consolidados. Disponível em: http://www.bcb.gov.br/?INDECO. Acesso em: 27 set 2011.

BAO, X. L. et al. Calcium-binding ability of soy protein hydrolysates. **Chinese Chemical Letters**, Beijing, v. 18, n. 9, p. 1115-1118, 2007.

BIASUTTI, E. A. R. et al. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, p. 51-60, 2008.

BIDLINGMEYER, B. A.; COHEN, S. A.; TARVIN, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 336, n. 1, p. 93-104, 1984.

BOUGLÉ, D.; BOUHALLAB, S. Mineral-Binding proteins and peptides and bioavailability os trace elements. In: MINE, Y.; SHAHIDI, F. **Nutraceutical proteins and peptides in health and disease**. Canada: Taylor and Francis, 2006. cap. 3, p. 29-40.

BRASIL, P. Mercadante afirma que Brasil não pode se acomodar como exportador de *commodities*. Disponível em: http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2011/06/28/mercadante-afirma-que-brasil-nao-pode-se-acomodar-como-exportador-de-commodities. Acesso em: 26 set. 2011.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Lei do bem - capítulo III. Disponível em: http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/8586.html. Acesso em: 12 ago. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pesquisa nacional de demografia e saúde da criança e da mulher**. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Receita Federal. Perguntas e respostas pessoa jurídica. Brasília, DF, 2011.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1288-1296, 2009.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. Técnica de voltametria cíclica e varrimento linear. In:
______. Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações. 3. ed. Coimbra: Almedina, 1996b. cap. 9, p. 191-217.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. Sensores potenciométricos. In: ______. Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações. 3. ed. Coimbra: Almedina, 1996a. cap. 13, p. 315-337.

BRIGHAM, E. F.; GAPENSKI, L. C.; EHRAHRDT, M. C. **Administração financeira:** teoria e prática. 9. ed. São Paulo: Atlas, 2001.

CAPOBIANGO, M. et al. Extração química e enzimática das proteínas do fubá de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 884-890, 2006.

CARDOSO, D.; AMARAL, H. F. O uso da simulação de Monte Carlo na elaboração do fluxo de caixa empresarial: uma proposta para quantificação das incertezas ambientais. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO – ENEGEP, XX., 2000, São Paulo. **Anais...** SãoPaulo: ABEPRO, 2000. 1 CD-ROM.

CARREIRA, R. L. et al. Efeito de parâmetros hidrolíticos na obtenção de hidrolisados proteicos de farinha de trigo com baixo teor de fenilalanina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 152-157, 2010.

CASTRO, F. et al. Determination of soybean proteins in commercial heat-processed meat products prepared with chicken, beef or complex mixtures of meats from different species. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 2, p. 468-476, 2007.

CAVALETT, O.; ORTEGA, E. Emergy, nutrients balance, and economic assessment of soybean production and industrialization in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 17, n. 8, p. 762-771, 2009.

CAVE, N. J.; GUILFORD, W. G. A method for in vitro evaluation of protein hydrolysates for potential inclusion in veterinary diets. **Research in Veterinary Science**, London, v. 77, n. 3, p. 231-238, 2004.

CECCHI, H. M. Cinza e conteúdo mineral. In: CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 2007b. cap. 5, p. 49-59.

CECCHI, H. M. Nitrogênio e conteúdo protéico. In: CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos** e práticos em análise de alimentos. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 2007a. cap. 6, p. 60-70.

CHAUD, M. V. et al. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 4, p. 871-877, 2002.

CHIANG, W. D.; SHIH, C. J.; CHU, Y. H. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. **Food Chemistry**, London, v. 65, n. 2, p. 189-194, 1999.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Brasília, DF, 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Brasília, DF, 2011.

CONCEIÇÃO, E. C. et al. Iron supplementation prevents the development of iron deficiency in rats with omeprazole-induced hypochlorhydria. **Nutrition Research**, New York, v. 21, n. 8, p. 1201-1208, 2001.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO (CRF-SP). Piso profissional por área de atuação. Disponível em: http://www.crfsp.org.br/piso-salarial.html. Acesso em: 19 jun. 2011.

CREMONESI, P. et al. Iron derivatives of modified milk protein. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, Aulendorf, v. 34, n. 9, p. 948-952, 1984.

DAMRONGSAKKUL, S. et al. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and Neutrase®. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Washington, v. 14, n. 2, p. 202-206, 2008.

DENIC, S.; AGARWAL, M. M. Nutritional iron deficiency: an evolutionary perspective. **Nutrition**, Los Angeles, v. 23, n. 7/8, p. 603-614, 2007.

DISILVESTRO, R. A. Iron. In: HANDBOOK of minerals as nutritional supplements. CRCnetBASE. 2004. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1201/9780203489673.ch4. Acesso em: 11 jul. 2011.

DMS. Pet Food Enzymes - Application Sheets. Disponível em: http://www.dsm.com/en_US/html/dnpus/an_enzymatic_appl.htm>. Acesso em: 7 out. 2009.

DUPONT, D. R. et al. A comprehensive approach to amino acid analysis. In: HUGLY, T. E. **Techniques in protein chemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. cap. 28, p. 284-294.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Tecnologias** de produção de soja - região central do Brasil 2003. Londrina, 2002.

ESTEVES, R. A. Análise de sensibilidade do estudo de viabilidade na produção de medicamentos em hospital de porte especial. 2010. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

EXPASY. Alcalase®. Disponível em: < http://www.expasy.org/enzyme/3.4.21.62. Acesso em: 23 jun. 2011a.

EXPASY. Papain. Disponível em: http://www.expasy.org/enzyme/3.4.22.2. Acesso em: 24 jun. 2011b.

FIGUEIREDO FILHO, D., SILVA JUNIOR, J. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, América do Norte, v. 18, n. 1, p. 115-146, jan. 2010. Disponível em: http://www.politicahoje.ufpe.br/index.php/politica/article/view/6. Acesso em: 08 nov. 2011.

FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS (FINEP). O que é a FINEP? Disponível em: http://www.finep.gov.br/o_que_e_a_finep/a_empresa.asp>. Acesso em: 26 set. 2011.

FISCHER, M. et al. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4463-4469, 2001.

FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n. 2, p. 234-237, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **World declaration on nutrition.** Roma, 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The state of food isecurity in the world. Roma, 2010.

FRANZAN, R. **Preparação e caracterização físico-química de complexos de hidrolisados parciais de proteína com minerais**. 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

FRANZONE, J. S. et al. Synthesis of a new antianaemic iron lysozyme glutarate complex and pharmacological studies in animals. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, Aulendorf, v. 40, n. 9, p. 987-993, 1990.

FREITAS, O. et al. Characterization of protein hydrolyzates prepared for enteral nutrition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, n. 9, p. 1432-1438, 1993.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R. C. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. Controle e implicações na dietoterapia humana. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 36, p. 227-237, 1999.

FUKUSHIMA, D. Soy proteins. In: YADA, R. Y. **Protein in food processing**. Cambridge: CRC Press, 2004. cap. 6, p. 123-145.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP). A instituição. Disponível em: http://www.fapesp.br/2>. Acesso em: 10 ago. 2011.

GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, Washington, v. 102, n. 3, p. 783-788, 2003.

GARCIA-ARANDA, J. A.; WAPNIR, R. A.; LIFSHITZ, F. In vivo intestinal absorption of manganese in the rat. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 113, n. 12, p. 2601-2607, 1983.

GARCIN, M. et al. Athletes' dietary intake was closer to French RDA's than those of young sedentary counterparts. **Nutrition Research**, New York, v. 29, n. 10, p. 736-742, 2009.

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

GILBERT, J. A. et al. Effect of proteins from different sources on body composition. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, Amsterdam, v. 21, n. 0, p. B16-B31, 2011.

GIRAULT, H. H. Cyclic voltammetry. In: _____. **Analytical and physical electrochemistry**. New York: EFPL Press, 2004. cap. 10, p. 375-409.

GREEN, D. W.; PERRY, R. H. **Perry's chemical engineers' handbook**. 8th ed. New York: The McGraw-Hill, 2008.

GREGER, J. L. Dietary standards for manganese: overlap between nutritional and toxicological studies. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, n. 2, p. 368S-371S, 1998.

GRESSLER, V. et al. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. **Food Chemistry**, London, v. 120, n. 2, p. 585-590, 2010.

GRIGGS, M. A. The alkaline hydrolysis of casein. **Journal of Industrial & Engineering Chemistry**, Washington, v. 13, n. 11, p. 1027-1028, 1921.

GUADIX, A. et al. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 41, n. 1, p. 79-89, 2000.

GUÉRARD, F. et al. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (Thunnus albacares) wastes using Alcalase®. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 11, n. 4/6, p. 1051-1059, 2001.

GUJARATI, D. N. Econometria básica. 3. ed. São Paulo: Makron Books, 2002.

GUSHIKEM, Y. Espectros eletrônicos de alguns complexos de geometria octaédrica de Ni²⁺: uma introdução prática à teoria do campo cristalino no curso de graduação. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. p. 153-156, 2005.

HARRYS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2003.

HASSAN, H. A.; NETCHVOLODOFF, C.; RAUFMAN, J.-P. Zinc-induced copper deficiency in a coin swallower. **The American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 95, n. 10, p. 2975-2977, 2000.

HEALTHCARE, G. Sephadex. Disponível em: http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=6844. Acesso em: 24 ago. 2011.

HOSTETLER, C. E.; KINCAID, R. L.; MIRANDO, M. A. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. **The Veterinary Journal**, London, v. 166, n. 2, p. 125-139, 2003.

HOU, H. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of Alaska pollock frame for preparing protein hydrolysates with low-bitterness. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 44, n. 2, p. 421-428, 2011.

HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A.; KEITER, R. L. Acid-Base chemistry. In: _____. Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity. 4th ed. New York: Harper Collins College Publishers, 1993a. cap. 9, p. 318-344.

HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A.; KEITER, R. L. Coordination chemistry: bonding, spectra and magnetism. In: ______. **Inorganic chemistry:** principles of structure and reactivity. 4th ed. New York: Harper Collins College Publishers, 1993b. cap. 11, p. 301-459.

INOVA. Especialista inglês revela que dificuldades britânicas para transferência de conhecimento se assemelham às do Brasil. 2009. Disponível em: http://www.inovacao.rei.unicamp.br/report/noticias/index.php?cod=486. Acesso em: 23 set. 2011.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). **Radar:** tecnologia, produção e comércio exterior. Brasília, DF, 2011.

KAMNERDPETCH, C. et al. An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 4, p. 508-514, 2007.

KIM, S. B. et al. Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 9, p. 4043-4050, 2007a.

KIM, S. B. et al. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 6, p. 625-631, 2007b.

KLEVAY, L. M. Alzheimer's disease as copper deficiency. **Medical Hypotheses**, New York, v. 70, n. 4, p. 802-807, 2008.

KONG, X. et al. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, n. 18, p. 8873-8879, 2008.

KONG, X.; ZHOU, H.; QIAN, H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. **Food Chemistry**, London, v. 102, n. 3, p. 759-763, 2007.

KOZLOWSKI, H. et al. Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 253, n. 21-22, p. 2665-2685, 2009.

KOZLOWSKI, H. et al. Specific structure-stability relations in metallopeptides. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 184, n. 1, p. 319-346, 1999.

KUMAR, R. et al. Adhesives and plastics based on soy protein products. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 155-172, 2002.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **The Journal of General Physiology**, New York, v. 30, n. 4, p. 291-310, 1947.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LATHAM, M. C. et al. Micronutrient dietary supplements - A new fourth approach. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 51, n. 1, p. 37-41, 2001. Supplement.

LAYRISSE, M. et al. Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 114, n. 1, p. 217-223, 1984.

LENOIR, P. M. Enzyme stabilization. US. 7.928.052 B2, 19 abr. 2011.

L'HOCINE, L.; BOYE, J. I.; ARCAND, Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 3, p. C137-C145, 2006.

LINDER, M. C. et al. Copper transport. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 67, n. 5, p. 965S-971S, 1998.

LOBO, A. S.; TRAMONTE, V. L. C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, p. 107-113, 2004.

LOPES, D. C. F.; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C. Use of activated carbon for removing phenylalanine from reconstituted skim milk powder hydrolysates. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 5, p. 447-453, 2005.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACHADO, A. A. et al. Iron deposition in rats liver and spleen were lower when the mineral was suplied as a derivative of casein hydrolysate in place of iron sulfate. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 111-116, 2005.

MANORE, M. M. Nutritional needs of the female athlete. Clinics in Sports Medicine, Philadelphia, v. 18, n. 3, p. 549-563, 1999.

MARET, W.; SANDSTEAD, H. H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 20, n. 1, p. 3-18, 2006.

MARQUES, F. Avanços e desafios. **Pesquisa FAPESP**, v. 185, p. 26-33, 2011.

MARTINEZ, A. P. C. et al. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. **Ciência** e **Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, p. 23-30, 2011.

MARTINS, E. Algumas classificações e nomenclaturas de custos. In: _____. Contabilidade de custos. 9. ed. São Paulo: Atlas, 2006a. cap. 4, p. 44-52.

MARTINS, E. Custo fixo, lucro e margem de contribuição. In: _____. Contabilidade de custos. 9. ed. São Paulo: Atlas, 2006b. cap. 15, p. 175-186.

MATTHEWS, D. M. Intestinal absorption of amino acids and peptides. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 31, n. 2, p. 171-177, 1972.

MERIALDI, M. et al. Randomized controlled trial of prenatal zinc supplementation and the development of fetal heart rate. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 190, n. 4, p. 1106-1112, 2004.

MEROPS. Flavourzyme®. Disponível em: http://merops.sanger.ac.uk/cgibin/pepsum?mid=S10.016. Acesso em: 23 jun. 2011.

MICHIELS, J. F. et al. Characterization of beneficial and detrimental effects of a soy peptone, as an additive for CHO cell cultivation. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 3, p. 671-681, 2011.

MILLER, L.; HOUGHTON, J. A. The micro-kjeldahl determination of the nitrogen content of amino acids and proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 159, n. 2, p. 373-383, 1945.

MONGA, M. et al. Effect of iron deficiency anemia on visual evoked potential of growing children. **Brain and Development**, Tokyo, v. 32, n. 3, p. 213-216, 2010.

MORATO, A. F. et al. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 13, n. 5, p. 843-857, 2000.

MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R.; ARAÚJO, M. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Fortified food made by the extrusion of a mixture of chickpea, corn and bovine lung controls iron-deficiency anaemia in preschool children. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 1, p. 158-164, 2008.

NETTO, F. M.; GALEAZZI, M. A. M. Production and characterization of enzymatic hydrolysate from soy protein isolate. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 31, n. 7/8, p. 624-631, 1998.

NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J.; SILVA, M. A. D. Características de solubilidade da fração protéica de semente de lentilha LENTILHA (Lens Culinaris MEDIK), var. Precoz. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 9, n. 1, p. 89-101, 1998.

NIELSEN, H. P. **Stabilization of concentrated liquid enzyme additives**. US. 2007/0060493 A1, 15 mar. 2007.

NORIEGA, P. et al. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4-nerolidilcatecol de Pothomorphe umbellata (L). Miq. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. p. 261-269, 2005.

OLIVARES, M.; UAUY, R. Copper as an essential nutrient. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 63, n. 5, p. 791S-796S, 1996.

OLIVEIRA, A. M.; GÓMEZ, R. J. H. C. Otimização da extração de proteínas da levedura Saccharomyces cerevisiae. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 521-534, 2005.

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. **Nutrition Reviews**, New York, v. 63, n. 8, p. 272-283, 2005.

ORDÓÑEZ, C.; BENÍTEZ, C.; GONZÁLEZ, J. L. Amino acid production from a sunflower wholemeal protein concentrate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 11, p. 4749-4754, 2008.

OTERO, U. B. et al. Mortalidade por desnutrição em idosos, região Sudeste do Brasil, 1980-1997. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. p. 141-148, 2002.

PANIAGO, E. B.; CARVALHO, S. Determinação de constantes de formação de complexos metálicos em soluções aquosas através de medidas de concentração hidrogeniônica. **Química Nova**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 405-411, 1988.

PATTERSON, A. J.; BROWN, W. J.; ROBERTS, D. C. K. Development, prevention and treatment of iron deficiency in women. **Nutrition Research**, New York, v. 18, n. 3, p. 489-502, 1998.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: fundamental principles. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 45, n. 9, p. 581-null, 1968a.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part II: underlying theories. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 45, n. 10, p. 643-null, 1968b.

PIRES, C. V. et al. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 179-187, 2006.

PLONSKI, G. A. Cooperação univesidade-empresa: um desafio gerencial complexo. **Revista de Administração**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 5-12, 1999.

POTTER, R. M. et al. Characteristics of wild blueberry-soy beverages. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 40, n. 5, p. 807-814, 2007.

PRASAD, A. S. et al. Antioxidant effect of zinc in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 37, n. 8, p. 1182-1190, 2004.

- PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galénica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975.
- QUINTANAR, L. Manganese neurotoxicity: a bioinorganic chemist's perspective. **Inorganica Chimica Acta**, Lausanne, v. 361, n. 4, p. 875-884, 2008.
- RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- ROMAÑA, D. L. et al. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 25, n. 1, p. 3-13, 2011.
- ROSS, S. A.; WESTERFIELD, R. W.; JAFFE, J. F. Alguns critérios alternativos de investimentos. In: ______. **Administração financeira**. São Paulo: Atlas, 2002b. cap. 6, p. 126-143.
- ROSS, S. A.; WESTERFIELD, R. W.; JAFFE, J. F. Valor presente líquido. In: _____. **Administração financeira**. São Paulo: Atlas, 2002a. cap. 4, p. 73-94.
- ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora UNICAMP, 2006. cap. 6, p. 139-166.
- ROUSSET, S.; DROIT-VOLET, S.; BOIRIE, Y. Change in protein intake in elderly french people living at home after a nutritional information program targeting protein consumption. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 106, n. 2, p. 253-261, 2006.
- SALES, M. G. et al. Casein, hydrolyzed casein, and amino acids that simulate casein produce the same extent of mucosal adaptation to massive bowel resection in adult rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 1, p. 87-92, 1995.
- SALGUEIRO, M. J. et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutrition Research**, New York, v. 20, n. 5, p. 737-755, 2000.
- SANTANA, É. E. D. P.; PORTO, G. S. E agora, o que fazer com essa tecnologia? Um estudo multicaso sobre as possibilidades de transferência de tecnologia na USP-RP. **Revista de Administração Contemporânea**, Curitiba, v. 13, p. 410-429, 2009.
- SANTORO, M. D.; CHAKRABARTI, A. K. Firm size and technology centrality in industry—university interactions. **Research Policy**, Amsterdam, v. 31, n. 7, p. 1163-1180, 2002.
- SANTOS, E. M.; PAMPLONA, E. D. O. Teoria das opções reais: uma atraente opção no processo de análise de investimentos. **Revista de Administração da USP**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 1-41, 2005.

SANTOS, S. D. A. D. et al. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 72-77, 2009.

SAUNDERS, J.; SMITH, T.; STROUD, M. Malnutrition and undernutrition. **Medicine**, Abingdon, v. 39, n. 1, p. 45-50, 2011.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas Alcalase® e Flavourzyme® no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1144-1150, 2009.

SCHMIDT, P.; SANTOS, J. L. D. Contabilidade societária. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2011.

SECCHI, G. Role of protein in cosmetics. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 26, n. 4, p. 321-325, 2008.

SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: CREIGTON, T. E. **Protein structure a pratical aproach**. New York: Oxford University, 1989. cap. 1, p. 1-19.

SEGATTO-MENDES, A. P.; SBRAGIA, R. O processo de cooperação universidade-empresa em universidades brasileiras. **Revista de Administração**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 58-71, 2002.

SEUFER-WASSERTHAL, P. et al. Probing the specificity of the S1 binding site of subtilisin Carlsberg with boronic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 35-48, 1994.

SIGMA-ALDRICH. Papain. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/papain.html. Acesso em: 25 jul. 2009.

SILK, D. B. A.; GRIMBLE, G. K.; REES, R. G. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 44, n. 1, p. 63-72, 1985.

SILK, D. B. Progress report. Peptide absorption in man. **Gut**, London, v. 15, n. 6, p. 494-501, 1974.

SILVA, M. S. et al. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 571-576, 2006.

SIMPELKAMP, J.; JONES, J.B. Borinic acid inhibitors as probes of the factors involved in binding at the active sites of subtilisin carlsberg and [alpha]-chymotrypsin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 2, n. 11, p. 1391-1394, 1992.

SINHA, R. et al. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 4, p. 1484-1491, 2007.

SMYTH, M.; FITZGERALD, R. J. Characterisation of a new chromatography matrix for peptide molecular mass determination. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 8/9, p. 571-577, 1997.

STEPHENSON, L. S. Possible new developments in community control of iron-deficiency anemia. **Nutrition Reviews**, New York, v. 53, n. 2, p. 23-30, 1995.

STRAUSAK, D. et al. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 55, n. 2, p. 175-185, 2001.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. **BioEssays**, Cambridge,v. 10, n. 5, p. 170-175, 1989.

SUYAMA, E. et al. Uma abordagem robusta de cálculo aplicada a um sistema potenciométrico de medida de concentrações hidrogeniônicas em soluções aquosas. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 5-9, 2001.

TAKEDA, A.; TAMANO, H. Insight into zinc signaling from dietary zinc deficiency. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 33-44, 2009.

TARLOW, M. J. et al. Absorption of amino acids and peptides in a child with a variant of hartnup disease and coexistent coeliac disease. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 47, n. 255, p. 798-803, 1972.

THALACKER-MERCER, A. E. et al. The skeletal muscle transcript profile reflects accommodative responses to inadequate protein intake in younger and older males. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 21, n. 11, p. 1076-1082, 2010.

THEIL, E. C. Iron, ferritin, and nutrition. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 24, n. 1, p. 327-343, 2004.

TORREJÓN, C. S. et al. Zinc and iron nutrition in Chilean children fed fortified milk provided by the complementary national food program. **Nutrition**, Tarrytown, v. 20, n. 2, p. 177-180, 2004.

TSOU, M.-J. et al. The effect of limited hydrolysis with Neutrase® and ultrafiltration on the anti-adipogenic activity of soy protein. **Process Biochemistry**, London, v. 45, n. 2, p. 217-222, 2010.

TSUGITA, A.; SCHEFFLER, J.-J. A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 124, n. 3, p. 585-588, 1982.

TSUMURA, K. et al. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 3, p. 255-261, 2005.

UEDA, E. K. M.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 988, n. 1, p. 1-23, 2003.

UEDA, J. et al. Copper(II) complexes of l-histidylglycyl-l-histidylglycine and l-histidyl-l-histidylglycylglycine: coordination mode of histidyl residues. **Inorganica Chimica Acta**, Lausanne, v. 135, n. 1, p. 43-46, 1987.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). **Situação da infância brasileira:** o direito à sobrevivência e ao desenvolvimento. Brasília, DF, 2005.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). **Tracking progress on child and maternal nutrition:** a survival and development priority. New York, 2009.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Oilseeds:** world markets and trade. Washington, 2011.

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. D. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, p. 1277-1283, 1999.

WALKER-SMITH, J. A. Therapy of Crohn's disease in childhood. **Bailliére's Clinical Gastroenterology**, London, v. 11, n. 3, p. 593-610, 1997.

WAPNIR, R. A.; STIEL, L. Zinc intestinal absorption in rats: specificity of amino acids as ligands. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 116, n. 11, p. 2171-2179, 1986.

WARNER, R. C. The alkaline hydrolysis of egg albumin. **The Journal of Biological Chemistry**, San Francisco, v. 142, p. 741-756, 1941.

WEBB, K. E., JR.; MATTHEWS, J. C.; DIRIENZO, D. B. Peptide absorption: a review of current concepts and future perspectives. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 10, p. 3248-3257, 1992.

WOLFE, R. R. Optimal nutrition, exercise, and hormonal therapy promote muscle anabolism in the elderly. **Journal of the American College of Surgeons**, Chicago, v. 202, n. 1, p. 176-180, 2006.

YUAN, X.; GU, X.; TANG, J. Optimization of the production of Momordica charantia L. Var. abbreviata Ser. protein hydrolysates with hypoglycemic effect using Alcalase®. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 2, p. 340-344, 2008.

YUST, M. D. M. et al. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase®. **Food Chemistry**, London, v. 122, n. 4, p. 1212-1217, 2010.

ZIEGLER, F. et al. Pharmacokinetic assessment of an oligopeptide-based enteral formula in abdominal surgery patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 67, n. 1, p. 124-128, 1998.