



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DANILA MARIANE PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
ISOLADO PROTEICO DE SOJA, DO OKARA E DE SEUS HIDROLISADOS**

**CAMPINAS
2017**

DANILA MARIANE PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
ISOLADO PROTEICO DE SOJA, DO OKARA E DE SEUS HIDROLISADOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição, na área de Nutrição Experimental aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Flavia Maria Netto

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA DANILA
MARIANE PEREIRA E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. FLAVIA MARIA NETTO.**

**CAMPINAS
2017**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 130814/2014-8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

P414a Pereira, Danila Mariane, 1988-
Avaliação da capacidade antioxidante e anti-inflamatória do isolado proteico de soja, do okara e de seus hidrolisados / Danila Mariane Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Flávia Maria Netto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Okara. 2. Hidrolisados proteicos. 3. Antioxidantes. 4. Inflamação. I. Netto, Flávia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory capacity of soy protein isolate, okara and hydrolysates

Palavras-chave em inglês:

Okara

Protein hydrolysates

Antioxidants

Inflammation

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Flávia Maria Netto [Orientador]

Juliana Alves Macedo

Patricia Ucelli Simioni

Data de defesa: 27-10-2017

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

Profa. Dra. Flavia Maria Netto
Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP
(presidente da comissão examinadora)

Profa. Dra. Juliana Alves Macedo
Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP
(membro titular da comissão examinadora)

Profa. Dra. Patricia Ucelli Simioni
Faculdade de Americana/FAM
(membro titular da comissão examinadora)

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

A minha família, meu pai, minha mãe e minha irmã, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Flavia Maria Netto, pela orientação, disponibilidade, aprendizado, compreensão e dedicação durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À banca examinadora, Profa. Dra. Juliana Alves Macedo, Profa. Dra. Patricia Ucelli Simioni, Profa. Dra. Cinthia Baú Betim Cazarin, Profa. Dra. Mariana Battaglin Villas Boas Alvaro, pelas sugestões para o meu trabalho.

Às amigas do LBN, Tássia, Maria Elisa, Francielli, Julianny, Natália, Bete, Eliana, por tornarem o dia a dia mais divertido. Obrigada pelos conselhos, apoio e amizade e conhecimentos. Em especial a Fernanda e a Fabiana, que sempre estiveram dispostas a me auxiliarem no andamento do meu trabalho e sempre tiveram um carinho e paciência durante todos os momentos, sem vocês esse trabalho não teria sido concluído. Obrigada a todas vocês!

À Profa. Dra. Juliana Alves Macedo por gentilmente disponibilizar o laboratório para as análises com as células.

Aos professores e funcionários do DEPAN e colegas da pós-graduação, pela colaboração e disponibilidade durante as análises nos laboratórios.

À minha turma de Nutrição 2010, em especial as minhas amigas, Louise, Katia e Giovana, pela união e amizade durante essa jornada. Aos professores que sempre contribuíram para o meu aprendizado, em especial a Profa. Dra. Taciana Davanço e Prof. Dr. Rafael Cadena que me incentivaram a seguir no Mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram e fizeram parte dessa trajetória para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada.

À Universidade Estadual de Campinas, à Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Alimentos e Nutrição por possibilitarem minha formação como Mestra.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

RESUMO

O potencial bioativo de subprodutos agrícolas tem despertado grande interesse, uma vez que seu aproveitamento reduz parte do desperdício e do impacto ambiental, bem como pode ser fonte de ingredientes de maior viabilidade econômica. Okara é o subproduto do processo de produção do extrato hidrossolúvel de soja ou do tofu, composto principalmente por fibras e proteínas, além de outros compostos da soja como isoflavonas, lignanas, fitoesteróis, saponinas, fitatos. Este trabalho teve como objetivos avaliar o potencial antioxidante do okara e do isolado proteico de soja (IPS), assim como a capacidade anti-inflamatória dos hidrolisados de ambas as matrizes. Okara e IPS foram obtidos a partir de grãos de soja de mesmo lote e os hidrolisados com a enzima alcalase. Okara, IPS e os hidrolisados proteicos obtidos destas matrizes foram caracterizados em relação à composição centesimal, perfil eletroforético e potencial antioxidante pelos métodos de FRAP e ORAC, bem como o teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu. O potencial anti-inflamatório dos hidrolisados de okara e IPS obtidos com 15 e 180 min de hidrólise foi avaliado em cultura de células RAW 264,7 e os mediadores inflamatórios avaliados foram o óxido nítrico e TNF- α . A soja, farinha de soja desengordurada (FSD), IPS e okara apresentaram perfil eletroforético (SDS-PAGE) semelhantes. O perfil de massa molecular (SDS-PAGE Tricina) dos hidrolisados de okara mostrou peptídeos com menor massa molecular do que dos hidrolisados de IPS. Entre as amostras analisadas FSD, IPS, okara e seus respectivos hidrolisados – o okara apresentou a menor atividade antioxidante determinada pelos métodos de FRAP e ORAC e teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu. A hidrólise enzimática aumentou o potencial antioxidante do IPS e okara. Os hidrolisados de okara atuaram como agentes inflamatórios, resultando no aumento da produção de óxido nítrico pelas células RAW 264,7, enquanto os hidrolisados do IPS diminuíram a produção de óxido nítrico. Os hidrolisados de okara e de IPS provocaram aumento na produção da citocina TNF- α , atuando, então, como agentes inflamatórios. Outras substâncias presentes nesses hidrolisados de origem não proteica podem ter influenciado esses resultados.

Palavras-chave: okara, hidrolisados proteicos, antioxidantes, inflamação.

ABSTRACT

The bioactive potential of agricultural by-products has aroused great interest, since its use reduces food waste and environmental impact, as well as it can be a source of ingredients of greater economic viability. Okara is a by-product from water-soluble soybean extract or from tofu production; it is composed mainly by fibers, proteins, and other compounds such as soy isoflavones, lignans, phytosterols, saponins, phytates. The aims of this study are to evaluate the antioxidant potential from okara and soy protein isolate (SPI) and its anti-inflammatory capacity of the hydrolysates of both matrices. Okara and SPI were obtained from soybeans and their hydrolysates with alcalase enzyme. Okara, SPI and hydrolysates obtained from these matrices were characterized by chemical composition, electrophoretic profile and antioxidant activity by the FRAP and ORAC methods, as well as the content of Folin-Ciocalteu reducing substances. The anti-inflammatory potential of the okara and SPI hydrolysates obtained at 15 and 180 min was evaluated using RAW 264.7 cell culture and inflammatory mediators evaluated were nitric oxide and TNF- α . Soybean, defatted soy flour (DSF), SPI and okara presented similar electrophoretic profile (SDS-PAGE). The molecular weight profile (Tricine SDS-PAGE) of the okara hydrolysates showed peptides with lower molecular weight than the SPI hydrolysates. Among the samples DSF, SPI, okara and their hydrolysates – the okara showed the lowest antioxidant activity measured by FRAP and ORAC methods and the content of Folin-Ciocalteu reducing substances. Enzymatic hydrolysis of SPI and okara increased antioxidant activity. The okara hydrolysates acted as inflammatory agents, resulting in nitric oxide production by RAW 264.7 cells, while the SPI hydrolysates decreased nitric oxide production. The okara and SPI hydrolysates increased production of TNF- α cytokine, acting as inflammatory agents. Other substances presenting non-protein source hydrolysates may have influenced these results.

Keywords: okara, protein hydrolysates, antioxidants, inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma para obtenção do extrato hidrossolúvel de soja e okara.....	21
Figura 2. Fluxograma geral do experimento	33
Figura 3. Fluxograma da obtenção do okara.	34
Figura 4. Fluxograma obtenção do isolado proteico de soja (IPS).	36
Figura 5. Curva de hidrólise do okara fresco com a enzima alcalase (concentração de substrato 5% (m/m); pH 8,5; E:S 1:100; 60 °C; 180 min).	45
Figura 6. Perfil eletroforético das proteínas da soja, IPS, FSD, okara e dos hidrolisados de okara e dos hidrolisados de IPS. (A) SDS-PAGE em meio redutor (gel de poliacrilamida – 12%). (B) SDS-PAGE Tricina em meio redutor (gel de separação 16,5% T, 3% C).	46
Figura 7. Teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu (SRRFC), atividade antioxidante pelo método de FRAP e atividade antioxidante pelo método de ORAC dos extratos aquosos da farinha de soja desengordurada, isolado proteico de soja e seus hidrolisados e okara e seus hidrolisados.....	48
Figura 8. Efeito do tratamento com hidrolisados proteicos de okara e de IPS com diferentes concentrações (0,25 a 2,0 mg/mL) de proteína solúvel sobre a viabilidade das células RAW 264,7 estimuladas por LPS.	52
Figura 9. Produção de nitrito (μM de nitrito/ $1,5 \times 10^6$ células) em sobrenadantes de células RAW 264.7, com estímulo de LPS (lipopolissacarídeo), tratadas com hidrolisados de isolado proteico de soja ou hidrolisados de okara em concentrações de 1 mg/mL de proteína solúvel e 0,5 mg/mL de proteína solúvel..	53
Figura 10. Produção de TNF- α em sobrenadantes de células RAW 264,7 com estímulo inflamatório de LPS, tratadas com hidrolisados de isolado proteico de soja ou hidrolisados de okara em concentrações de 1 mg/mL de proteína e 0,5 mg/mL de proteína solúvel.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal da farinha de soja integral e do okara	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BBI	Inibidor Bowman Birk
CAT	Catalase
E:S	Relação enzima:substrato
EAG	Equivalente de ácido gálico
EHS	Extrato hidrossolúvel de soja
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FSD	Farinha de soja desengordurada
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GH	Grau de hidrólise
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
H IPS15	Hidrolisado de isolado proteico de soja com 15 minutos de hidrólise
H IPS180	Hidrolisado de isolado proteico de soja com 180 minutos de hidrólise
H IPS75	Hidrolisado de isolado proteico de soja com 75 minutos de hidrólise
H OK15	Hidrolisado de okara com 15 minutos de hidrólise
H OK180	Hidrolisado de okara com 180 minutos de hidrólise
H OK75	Hidrolisado de okara com 75 minutos de hidrólise
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IPS	Isolado proteico de soja
KTI	Inibidor de tripsina Kunitz
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OK	Okara fresco
OPA	Reagente o-ftaldialdeído, do inglês <i>o-phthalaldehyde</i>
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SOD	Superóxido dismutase

SRRFC	Substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu
TE	Equivalente de Trolox
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TMB	Tetrametilbenzidina
SFB	Soro fetal bovino

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Objetivos	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 Revisão Bibliográfica.....	17
3.1 Soja	17
3.1.1 Composição da soja	18
3.1.2 Proteína da soja e seus benefícios	18
3.2 Okara.....	19
3.3 Estresse oxidativo e antioxidantes	22
3.4 Inflamação.....	25
3.4.1 Óxido Nítrico.....	27
3.5 Peptídeos bioativos	28
3.6 Compostos fenólicos	31
4 Material e Métodos.....	32
4.1 Material.....	32
4.2 Métodos.....	32
4.2.1 Obtenção do okara	34
4.2.2 Obtenção do isolado proteico de soja	35
4.2.3 Obtenção dos hidrolisados proteicos	37
4.3 Composição centesimal	38
4.4 Caracterização	38
4.4.1 Perfil eletroforético	38
4.5 Atividade antioxidante	39
4.5.1 Preparo do extrato aquoso	39
4.5.2 Teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu (SRRFC) ...	39
4.5.3 Ensaio de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	40
4.5.4 Ensaio de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	40
4.6 Ensaio de determinação da capacidade anti-inflamatória	41
4.6.1 Ensaio de viabilidade celular	41
4.6.2 Ensaio de produção de mediadores inflamatórios.....	42
4.6.2.1 Dosagem de nitrito	42

4.6.2.2 Determinação do fator de necrose tumoral (TNF- α).....	42
4.7 Análise estatística	43
5 Resultados e Discussão	44
5.1 Obtenção e caracterização do okara, IPS e seus hidrolisados	44
5.2 Atividade antioxidante	48
5.3 Mediadores inflamatórios	51
5.3.1 Viabilidade celular	51
5.3.2 Óxido nítrico	52
5.3.3 Fator de necrose tumoral (TNF- α).....	54
6 Conclusões.....	56
7 Referências Bibliográficas	57

1 Introdução

Inflamação sistêmica e estresse oxidativo são decorrências de várias doenças como obesidade, hipertensão arterial e câncer. Essas desordens são associadas aos níveis mais elevados de proteínas inflamatórias, aumento nos marcadores de estresse oxidativo, e menores concentrações plasmáticas de antioxidantes (FURUKAWA et al., 2004; YESILOVA et al., 2005).

O sistema antioxidante endógeno não é suficiente para neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) do organismo, sendo indispensável a obtenção de antioxidantes a partir da dieta para a resposta apropriada contra a oxidação (CERQUEIRA et al., 2007; ALVES et al., 2010). Entre os agentes antioxidantes encontrados nos alimentos destacam-se as vitaminas C e E, compostos fenólicos, como os flavonoides e ácidos fenólicos, e carotenoides como β -caroteno e licopeno (PEREIRA et al., 2009). Outros compostos, como peptídeos, também são reconhecidos por exercer função antioxidante (SARMADI; ISMAIL, 2010; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

O mecanismo de ação de peptídeos antioxidantes está relacionado com a inativação de EROs, eliminação de radicais livres, quelação de metais de transição pró-oxidantes e na redução de hidroperóxidos (ZHOU et al., 2012).

A soja e seus derivados são conhecidos por suas propriedades benéficas à saúde associadas à presença de fibras, proteínas, ácidos graxos e isoflavonas. Entre os alimentos produzidos a partir da soja, estão o extrato hidrossolúvel, alguns produtos fermentados (SANNI et al., 1992), e o isolado proteico de soja, amplamente utilizado na indústria alimentícia (NISHINARI et al., 2014). A soja e seus derivados podem ser possíveis fontes de obtenção de peptídeos bioativos (BARACÉ et al., 2005; MATEOS-APARICIO et al., 2008).

O extrato hidrossolúvel de soja (EHS) é um extrato aquoso dos grãos de soja, obtido a partir da trituração dos grãos com água e tratamento térmico, que possibilita a extração dos diversos componentes contidos na soja. No entanto, o processo de produção do EHS não é capaz de extrair todo o conteúdo de proteínas e de outros nutrientes presentes e, como resultado, é obtido um subproduto desse processamento de extração, conhecido como okara.

O principal componente do okara é a fibra (54,3%), sendo que a insolúvel está presente em maior quantidade (50,1%) e a solúvel em menor quantidade,

seguido de proteína (33,4%) (MATEOS-APARICIO et al., 2010a). Outros compostos da soja estão presentes no okara entre eles as isoflavonas, lignanas, fitoesteróis, saponinas, fitatos (O'TOOLE, 2004).

Okara, como outros subprodutos agroindustriais, contém diversos compostos de interesse, como por exemplo, fenólicos, peptídeos bioativos e fibras (YOKOMIZO et al., 2002; BARBOSA et al., 2006; MELO et al., 2011). Trabalhos mostraram que hidrolisados do okara apresentam ação antioxidante (O'TOOLE, 1999; YOKOMIZO et al., 2002; LI et al., 2012). No entanto, o potencial anti-inflamatório de hidrolisados do okara ainda não foi investigado. Diante do exposto é que se propõe este trabalho, tendo em vista a importância da utilização do okara no fornecimento de peptídeos com atividades biológicas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante do okara, do IPS e de seus hidrolisados assim como a capacidade anti-inflamatória dos hidrolisados obtidos de ambas as matrizes.

2.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar quimicamente o IPS, o okara e os hidrolisados proteicos obtidos destes produtos.
- Determinar a atividade antioxidante do isolado proteico de soja, do okara e de seus respectivos hidrolisados proteicos.
- Determinar a atividade anti-inflamatória dos hidrolisados proteicos obtidos do isolado proteico de soja e do okara em cultura de células RAW 264,7.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Soja

O cultivo da soja (*Glycine max*) teve início no século XI a. C na China, de onde se espalhou para a Ásia. Foi introduzida nas colônias americanas por volta de 1765, pelo empresário Samuel Bowen (HYMOWITZ; HARLAN, 1983). No Brasil, o grão chegou em 1908, mas apenas em 1970 houve a real expansão da soja no Brasil, com o aumento da indústria de óleo e demanda do mercado internacional (BOWLES; DEMIATE, 2006).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de soja, segundo dados divulgados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com produção de mais de 96 milhões de toneladas de grãos de soja no ano 2015/2016. Grande parte da produção mundial de soja, cerca de 80%, é utilizada na fabricação de óleo (LIMA; ANGNES, 1999; MORETTO; FETT, 1998), entretanto outros produtos também são obtidos, tais como farinha, isolados e concentrados proteicos, extrato hidrossolúvel de soja (EHS) e produtos fermentados (MATEOS-APARICIO et al., 2008).

O EHS teve pouca aceitação no Brasil devido ao sabor e aroma desagradáveis. A ação de enzimas presentes nos grãos de soja nos ácidos graxos poli-insaturados proporciona ao produto final um sabor de “feijão cru” (TORRES-PENARANDA; REITMEIER, 2001). No entanto, o avanço tecnológico permitiu a produção desse produto com melhor qualidade sensorial, o que aumenta sua aceitabilidade (TORRES-PENARANDA; REITMEIER, 2001; CAUS et al., 2008).

Apesar dessa perspectiva, a soja é ainda pouco utilizada na dieta do brasileiro (TASHIMA; CARDELLO, 2003), por isso grande parte da soja é empregada na extração de óleos e seus subprodutos são destinados principalmente à alimentação animal (SILVA et al., 2006), embora seus produtos e seus subprodutos possuam elevado potencial para uso na indústria alimentícia (DURANTI; GIUS, 1997; MELLO FILHO et al., 2004).

3.1.1 Composição da soja

A composição do grão sofre variações com as condições de plantio e solo. O grão pode conter entre 35% e 45% de proteína, 30% a 34% de carboidrato, 18% a 25% de lipídios (HYMOWITZ; HARLAN, 1983). Também apresenta em sua composição 5% minerais, incluindo potássio, cálcio, magnésio, fósforo, ferro e cobre (O'TOOLE, 1999). Outros componentes presentes na soja, como as enzimas lipoxigenases, constituem aproximadamente 1% do total de proteínas na soja e são responsáveis pelo "*beany flavor*" dos grãos de soja (ESTEVES; MONTEIRO, 2001; SILVA et al., 2001). A soja também possui compostos fenólicos, as isoflavonas, sendo que daidzeína, genisteína e gliciteína estão em maior proporção e podem contribuir para a prevenção de neoplasias, doenças cardiovasculares, osteoporose e principalmente na redução dos sintomas relacionados à menopausa (DUNCAN et al., 2003).

3.1.2 Proteína da soja e seus benefícios

As globulinas correspondem a aproximadamente 90% do total de proteínas na soja, são insolúveis em água, porém, são solúveis em soluções salinas diluídas em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico e são sensíveis ao tratamento térmico (WOLF, 1970; DURANTI; GIUS, 1997).

As proteínas da soja podem ser classificadas de acordo com o coeficiente de sedimentação, como 15S, 11S, 7S e 2S, sendo S a unidade Svedberg (BROOKS; MORR, 1985).

As frações glicinina (11S) e β -conglucina (7S) representam 31-44% e 37-39%, respectivamente, da proteína total (BROOKS; MORR, 1985; DURANTI; GIUS, 1997; ZHANG et al., 2002). As proteínas que compõem a fração 7S não contêm cisteína e, conseqüentemente, não possuem ligações dissulfeto (DURANTI; GIUS, 1997). A fração 15S corresponde a cerca de 10% do total de proteínas (BROOKS; MORR, 1985; DURANTI; GIUS, 1997) enquanto a fração 2S é composta por inibidores de tripsina e por proteínas biologicamente ativas e constitui aproximadamente 20% do total proteico. Os inibidores de tripsina afetam a digestibilidade das proteínas, sendo o inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e o inibidor

Bowman Birk (BBI) os mais conhecidos (KONAREV et al., 2002). Estudos *in vivo* têm demonstrado que estes inibidores têm atuação na inibição da carcinogênese em cólon, esôfago, fígado, pulmão (LOSSO, 2008; FERREIDUNIAN et al., 2014).

Estudos mostram que o baixo risco de doenças coronarianas em países Asiáticos tem relação com o consumo de soja (NAGATA et al., 1998; SACKS et al., 2006), em especial ao consumo da fração proteica (DURANTI et al., 2004; PAK et al., 2005). A FDA (*Food and Drug Administration*), em 1999, publicou a recomendação de ingestão da proteína de soja com o objetivo da prevenção de doenças cardiovasculares, indicando que o consumo de 25 g de proteína de soja por dia, reduziria o colesterol total e LDL-colesterol (FDA, 1999). Essa recomendação também foi seguida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil (ANVISA, 1999). No entanto, esses efeitos dependem do nível e da duração da ingestão de proteína de soja, além do gênero e concentração plasmática inicial de lipídios do indivíduo (ZHAN; HO, 2005).

Peptídeos obtidos das proteínas da soja apresentam ação antioxidante, ação anti-hipertensiva, anti-inflamatória, hipocolesterolêmico e anticâncer (SINGH et al., 2014).

3.2 Okara

Em todo o mundo são geradas milhões de toneladas de resíduos agroindustriais. Parte deles é aproveitada como ração animal, no entanto, a maior parte é descartada, causando grande impacto ao meio ambiente. Além disso, a disposição desses resíduos representam custos para a indústria (MATEOS-APARICIO et al., 2010a). Muitos destes resíduos são fontes de proteína de boa qualidade e de compostos bioativos, de tal forma que seu uso como ingrediente no desenvolvimento de novos produtos tem despertado interesse das indústrias alimentícias.

A recuperação de componentes bioativos a partir de subprodutos agrícolas tornou-se uma importante área de pesquisa (GALANAKIS, 2012). Diversos compostos bioativos, como compostos fenólicos, peptídeos e fibras, são encontrados em diferentes subprodutos agroindustriais tais como bagaços de uva, goiaba, em subprodutos das indústrias de grãos como soja, ervilha, feijão

(YOKOMIZO et al., 2002; MELLO FILHO et al., 2004; MATEOS-APARICIO et al., 2010a).

O EHS, um dos produtos derivados da soja, é o extrato aquoso dos grãos de soja obtido a partir da trituração dos grãos com água e tratamento térmico, que possibilita a extração dos diversos componentes presentes na soja. No processo de produção é obtido um subproduto conhecido como okara. A sua principal destinação é a alimentação animal ou o descarte (PINTO; CASTRO, 2008). Okara, devido ao seu custo mais baixo do que o do farelo de soja tem sido usado na alimentação de bovinos, suínos, caprinos, peixes (WONG; TANG, 1996) e frango (YANG; GU, 1997) como substituição de parte do farelo de soja.

Grandes quantidades de okara são produzidas anualmente, principalmente em países com elevado consumo de soja. Na China são produzidas cerca de 2.800.000, no Japão 800.000 toneladas e 310.0000 toneladas na Coreia (MUROYAMA et al., 2006; AHN et al., 2010; LI et al., 2012).

O EHS e conseqüentemente seu subproduto, o okara, podem ser obtidos por diferentes procedimentos. No processo conhecido como Chinês, ocorre primeiramente a separação do extrato hidrossolúvel de soja do okara, seguido por tratamento térmico. No procedimento Japonês o tratamento térmico é realizado antes da separação do extrato hidrossolúvel de soja e okara (CHANG; LIU, 2012), como mostrado na (Figura 1).

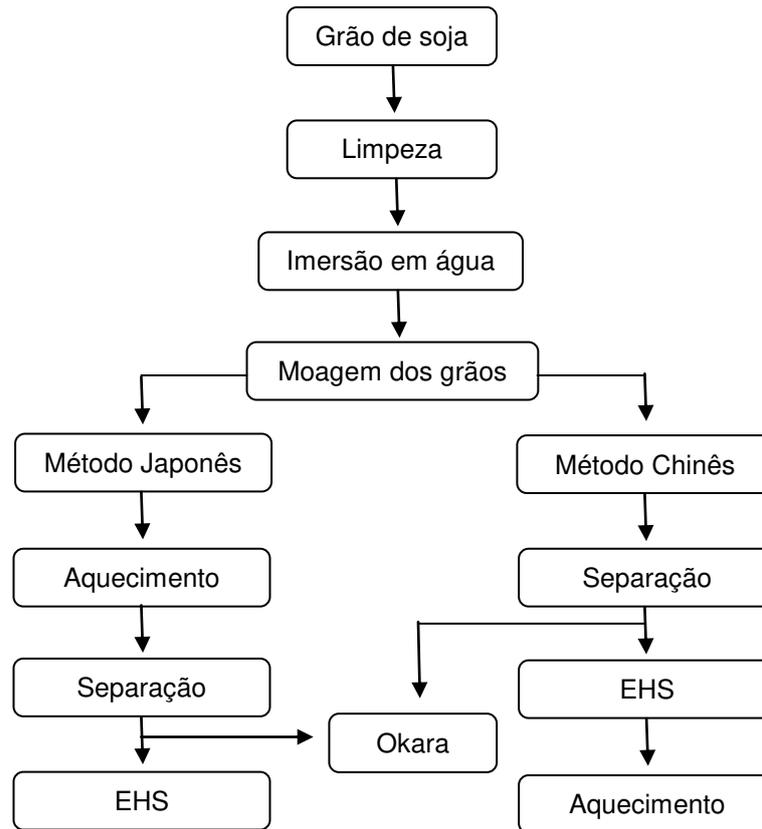


Figura 1. Fluxograma para obtenção do extrato hidrossolúvel de soja e okara. Fonte: adaptado de (LI et al., 2012).

Aproximadamente 1,1 kg de okara fresco é produzido a partir de cada 1,0 kg de soja utilizada para o processamento do extrato hidrossolúvel de soja (O'TOOLE, 2004). A deterioração desse resíduo é muito rápida devido à sua alta atividade de água (NOGUCHI, 1987). Portanto, okara fresco deve ser seco logo após a sua obtenção para facilitar manuseio e transporte (LI et al., 2012).

O principal componente do okara é a fibra (54,3%), sendo que a insolúvel está presente em maior quantidade (50,1%) que a fibra solúvel (4,2%). Contém ainda teores consideráveis de proteína (33,4%) e quantidades significativas de lipídeos (8,5%), sendo o ácido linoleico o mais abundante (54,1%), seguido por ácido oléico (20,4%), ácido palmítico (12,3%), ácido linolênico (8,8%) e ácido esteárico (4,7%). Os carboidratos presentes no okara são arabinose (1%), glicose (0,2%), galactose (0,2%), frutose (0,1%), estaquiose e rafinose (1,4%) e sacarose (0,6%) (MATEOS-APARICIO et al., 2010a). Possui ainda outros nutrientes que

incluem vitaminas como riboflavina, tiamina e niacina e minerais, como cálcio, fosfato, zinco, ferro, cobre e magnésio (O'TOOLE, 2004).

Outros compostos da soja também presentes no okara são as isoflavonas (genisteína e daidzeína), lignanas, fitoesteróis, saponinas, fitatos, que possuem funções fisiológicas e terapêuticas, como atividade antioxidante, prevenção de doenças cardiovasculares (HEAD, 2001).

A extração da proteína do okara pode ser feita em pH alcalino, resultando em produto com propriedades funcionais e qualidade nutricional semelhante às do isolado de soja comercial (MA et al., 1997). Em hidrolisados proteicos de okara foram identificados peptídeos com atividade antioxidante semelhante à da carnosina (YOKOMIZO et al., 2002).

O okara tem sido utilizado para substituir parcialmente a farinha de trigo, farinha de soja, e outros ingredientes na produção de alimentos para aumentar o valor nutricional de pães, macarrão e doces (LI et al., 2012). Tortilhas de milho que foram produzidas com 10% de okara apresentaram aumento do teor de lisina e de triptofano, que são aminoácidos limitantes no milho (O'TOOLE, 2004). As características físico-química de pães com adição de 5% de okara na formulação mostraram aumento expressivo do teor protéico e de fibras no alimento (BOWLES; DEMIATE, 2006). Em um trabalho realizado no Brasil, os autores elaboraram um biscoito sabor chocolate com o okara e verificaram que houve aceitação entre crianças em idade pré-escolar (CAVALHEIRO et al., 2001).

O okara possui alguns componentes com efeitos antinutricionais, se consumidos em grandes quantidades, como por exemplo, o ácido fítico, que pode reduzir a disponibilidade de ferro no organismo (MATSUO, 1996; O'TOOLE, 1999).

3.3 Estresse oxidativo e antioxidantes

A partir da cadeia respiratória na mitocôndria são produzidos produtos altamente reativos de vida curta, com capacidade de causar danos expressivos aos tecidos biológicos, os chamados EROs, que incluem o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). Os radicais superóxido e hidroxila têm um elétron livre na sua órbita externa e são oxidantes altamente reativos. O peróxido de hidrogênio é tóxico para as células e causa maior produção de radicais

livres, principalmente quando reage com metais de transição reduzidos. A geração de EROs pode ser por via endógena a partir da respiração celular, pela reação de Fenton, pela resposta imune ou por estímulos exógenas como exposição à luz ultravioleta, poluentes atmosféricos, entre outros (WICKENS, 2001).

Em concentrações baixas, as EROs exercem efeitos benéficos no organismo, pois estão envolvidas em diversas funções fisiológicas como defesa contra agentes infecciosos e na sinalização celular (VALKO et al., 2007; ALVES et al., 2010). Entretanto, quando há desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade do sistema de defesa antioxidante em neutralizá-lo, o resultado é a ocorrência do estresse oxidativo (VALKO et al., 2007). O excesso de EROs faz com que aumente a probabilidade de oxidação de macromoléculas (lipídios, ácidos nucléicos, carboidratos e proteínas), podendo levar à danos celulares e afetar a homeostase (LOBO et al., 2010).

O estresse oxidativo tem sido associado à neoplasias, obesidade e doenças cardiovasculares, inflamatórias, neurodegenerativas, entre outras (RAHMAN, 2007; LOBO et al., 2010; LÜ et al., 2010).

Um antioxidante foi definido como uma substância que, presente em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, retarda ou impede a sua oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). Posteriormente os mesmos autores o definiram como uma substância que atrasa evita ou remove o dano oxidativo em uma molécula-alvo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Moller e Loft (2006) definiram de forma mais ampla o termo antioxidante: qualquer substância que impede a oxidação de biomoléculas, diretamente ou indiretamente por eliminação de espécies reativas de oxigênio regulando os sistemas de defesa antioxidante ou de reparo de DNA.

Os antioxidantes promovem a interceptação das EROs geradas por fontes endógenas ou exógenas, impedindo a ação nos lipídios, proteínas, duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados e nas bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O sistema antioxidante pode ser classificado em endógeno e exógeno. O sistema antioxidante endógeno é composto por enzimas que impedem a formação ou neutralizam as EROs: glutathiona peroxidase (GPx), que doa dois elétrons para reduzir os peróxidos; catalase (CAT), que converte peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio; a superóxido dismutase (SOD) que converte ânions superóxido

e peróxido de hidrogênio (RAHMAN, 2007); e a glutathiona redutase (GR) que reduz a glutathiona da sua forma oxidada para a sua reduzida, para que esta continue a neutralizar as EROs (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Ressalta-se que nutrientes provenientes da dieta como zinco e selênio são importantes cofatores de enzimas como a SOD e GPx , respectivamente (OLIN et al., 1995; RAYMAN, 2000).

Os componentes celulares não são protegidos integralmente pelos antioxidantes endógenos, sendo indispensável a obtenção de antioxidantes a partir da dieta para a defesa apropriada contra a oxidação (CERQUEIRA et al., 2007; ALVES et al., 2010). Entre os agentes antioxidantes encontrados nos alimentos destacam-se vitaminas C e E, compostos fenólicos, como os flavonoides e ácidos fenólicos, carotenoides como o β -caroteno e licopeno e peptídeos (PEREIRA et al., 2009; SARMADI; ISMAIL, 2010).

Há fortes evidências epidemiológicas de inúmeros benefícios dos antioxidantes presentes nos alimentos (CERQUEIRA et al., 2007) tais como o papel da vitamina E na prevenção das doenças cardiovasculares (PRYOR, 2000), os carotenoides com atuação anticancerígena (EL-AGAMEY et al., 2004; SHARONI et al., 2004) e a vitamina C na proteção de danos causados pela irradiação ultravioleta (CATANI et al., 2001), entre outros. Diversos estudos destacam as funções dos antioxidantes na proteção contra o estresse oxidativo (CATANI et al., 2001; SARADA et al., 2002; EL-AGAMEY et al., 2004; KOJO, 2004; SHARONI et al., 2004; MPHAAHLELE et al., 2014; WANG et al., 2015).

Existem várias metodologias para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, com diferentes mecanismos e substâncias geradoras de radical. Não há um único método que pode determinar a capacidade antioxidante de amostras por mais de um mecanismo e por isso, é necessária a utilização de mais de um método para conhecer o potencial antioxidante (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Dentre os mais utilizados estão os métodos da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), potencial antioxidante reativo total (TRAP), poder antioxidante de redução de íons ferro (FRAP), e a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC). Estes métodos se baseiam na transferência de elétrons (SET), reação de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) entre um oxidante e uma espécie reativa (OU et al., 2002).

3.4 Inflamação

A inflamação é o conjunto de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas em resposta aos estímulos agressivos, que podem ser agentes químicos (metais pesados, ácidos), agentes físicos (calor e frio, eletricidade, radiações, traumas e atritos), biológicos (vírus, endotoxinas bacterianas, fungos). Sua principal função é a eliminação do estímulo inflamatório ou reparação de danos, retomando o estado de homeostase do organismo (HERSH et al., 1998; BARTON, 2008).

Na fase aguda, que é logo após a agressão, há aumento de fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, com migração de leucócitos na lesão. Quando não há reparação da lesão ou quando o estímulo não cessa, a inflamação crônica pode suceder a inflamação aguda, no entanto a fase crônica pode se manifestar sem o aparecimento da inflamação aguda anteriormente (CONE, 2001; KUMAR et al., 2010).

A inflamação crônica tem duração prolongada (semanas a meses) e está associada à infiltração de células que incluem linfócitos e macrófagos, destruição tecidual, a proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) e fibrose (KUMAR et al., 2010). A inflamação crônica pode ter início com a exposição prolongada aos agentes potencialmente tóxicos ou em doenças como a artrite reumatoide, aterosclerose, câncer, doença de Alzheimer (KUMAR et al., 2010; RIBEIRO et al., 2015).

A inflamação relacionada à doenças como obesidade, diabetes mellitus tipo 2, é chamada de inflamação crônica de baixo grau. Esta inflamação de baixo grau difere da inflamação clássica, na medida em que não há sintomas típicos do processo inflamatório, como edema, dor, rubor e perda de função, mas é semelhante na medida em que compartilha os distúrbios gerados por mediadores típicos de inflamação. Nos estados pró-inflamatórios relacionados à obesidade, a hipertrofia dos adipócitos leva ao aumento da produção de adipocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1, TNF- α (HOTAMISLIGIL, 2006; CASTRO et al., 2017).

Diversos estudos investigam novas alternativas de uso de compostos bioativos numa tentativa de reduzir esse quadro inflamatório. Os modelos *in vitro* têm sido utilizados para estudo inicial da possível ação de compostos bioativos. Um dos modelos para estudo *in vitro* do processo inflamatório é a indução de mediadores inflamatórios em macrófagos. Os principais mediadores inflamatórios

são fatores de crescimento, citocinas, mediadores lipídicos, enzimas proteolíticas (MANTOVANI; SICA, 2010; BAAY et al., 2011), além do óxido nítrico que é um radical livre e sua produção pode causar danos celulares relacionados a inflamação (TORRE et al., 2002; PACHER et al., 2007). Os macrófagos desempenham papel fundamental na iniciação, manutenção e resolução de inflamação (MANTOVANI; SICA, 2010). O macrófago pode ser ativado por lipopolissacarídeos (LPS) e interferon- γ (IFN- γ). O LPS é um componente presente nas paredes celulares de bactérias gram-negativas e é um dos mais poderosos ativadores de macrófagos, promovendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (NICHOLAS et al., 2007), como fator de necrose tumoral (TNF- α), prostaglandina E₂ (PGE₂), interleucina-6 (IL-6) (MANTOVANI; SICA, 2010).

As citocinas são mediadores da resposta imune produzidos principalmente por células do sistema imunológico que regulam as funções de diversas células. Seus efeitos incluem a indução de proliferação celular, quimiotaxia, apoptose e diferenciação celular (MATSUDA; HATTORI, 2006).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória secretada principalmente por monócitos e macrófagos. No entanto uma ampla variedade de células pode produzir TNF- α , incluindo linfócitos T e B, células natural killers (NK), neutrófilos, células endoteliais, células muscular lisas e cardíacas, fibroblastos e osteoclastos (BRADLEY, 2008).

O TNF- α , geralmente, não é detectável em indivíduos saudáveis, porém os níveis séricos elevados no soro e em tecidos são encontrados em condições inflamatórias e de infecção (NÜRNBERGER et al., 1995). É um dos mediadores mais potentes na resposta inflamatória, sua meia-vida plasmática é de aproximadamente 20 minutos, o necessário para originar mudanças metabólicas e hemodinâmicas importantes e estimular a secreção de outras citocinas (OLIVEIRA et al., 2011). Esta citocina tem potencial de estimular a coagulação, a liberação de moléculas de adesão, Prostaglandina E₂ (PGE₂), fator de ativação plaquetária, glicocorticoides, e tem influência na apoptose celular (CURFS et al., 1997; RAEBURN et al., 2002). Por outro lado, TNF- α , quando liberado em resposta à sepse, causa choque, coagulação intravascular disseminada e falência de múltiplos órgãos (GRAY; BLOCH, 2012).

3.4.1 Óxido Nítrico

A molécula do óxido nítrico possui um elétron desemparelhado e reage com oxigênio, metais de transição como ferro, cobalto, manganês ou cobre e também com o radical superóxido (KIECHELE et al., 1993). Quando diluído, possui meia vida de 10 segundos, oxidando-se rapidamente a nitrito e nitrato (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Suas funções são complexas e contraditórias, podendo ser benéfica ou potencialmente tóxica ao organismo humano de acordo com sua concentração ou tipo celular em que está presente (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

O óxido nítrico é produzido em vários tipos de células, como macrófagos e neutrófilos (UDENIGWE et al., 2009). A produção de óxido nítrico ocorre por meio da família de enzimas óxido nítrico sintetase (NOS) (HILL et al., 2010). As três isoformas de enzimas óxido nítrico sintetase geram óxido nítrico e são encontradas em diferentes células (HILL et al., 2010). A atividade da NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e da NOS endotelial (eNOS ou NOS3) é regulada pelo nível de Ca^{2+} intracelular.

A terceira óxido nítrico sintetase é a iNOS (macNOS ou NOS2) que é Ca^{2+} dependente e normalmente expressa em macrófagos, neutrófilos, células inflamatórias e células glia. A atividade da iNOS é induzida por uma série de estímulos como: IL-1, TNF- α , produtos de bactérias como LPS, assim a iNOS promove a conversão de L-arginina e O_2 em L-citrulina e óxido nítrico (RIBEIRO et al., 2015). O óxido nítrico se difunde para o seu local de ação e ali estimula a guanilato ciclase para produzir monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), este por sua vez modifica a ativação de proteínas quinases, canais de íons (RIBEIRO et al., 2015).

O óxido nítrico tem diversas ações biológicas, podendo ter efeitos fisiológicos de forma aguda ou de longo prazo na função celular. O óxido nítrico gerado pela NOS neuronal tem efeitos na regulação da transmissão sináptica, regulação da pressão sanguínea (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). A NOS endotelial gera óxido nítrico que promove vasodilatação, vasoproteção, atuando na prevenção da aterosclerose (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). A produção de óxido nítrico pela iNOS está relacionada com processos degenerativos celulares incluindo dano tecidual relacionado com inflamação (AMES et al., 1993; LIU et al., 2002;

TORRE et al., 2002; PACHER et al., 2007). Por isso, a supressão celular de produção de óxido nítrico por meio da iNOS pode constituir um passo no tratamento de doenças inflamatórias (LIU et al., 2002).

3.5 Peptídeos bioativos

Alguns peptídeos podem ter impacto positivo nas funções do corpo e, portanto, são conhecidos como peptídeos bioativos (SINGH et al., 2014). Os peptídeos bioativos podem desempenhar funções benéficas na saúde, incluindo atividade antioxidante (HE et al., 2013), anti-hipertensiva (QUIST et al., 2009), anticâncer (JOUNG et al., 2012), anti-obesidade (VAUGHN et al., 2008) anti-inflamatória (OSEGUERA-TOLEDO et al., 2011), entre outras.

Apesar do leite e seus derivados serem as fontes mais conhecidas, os peptídeos bioativos também são obtidos de outras fontes animais e vegetais como ovo, peixe, ostra, arroz, trigo, cevada e milho e soja (MATSUI et al., 1993; LI et al., 2002; YOSHIKAWA et al., 2003).

Vários estudos têm sido realizados para investigar as propriedades antioxidantes de hidrolisados e peptídeos de fontes vegetais como amendoim (HWANG et al., 2010), farelo de arroz (REVILLA et al., 2009), farelo de glúten de milho (LI et al., 2008), inhame (NAGAI et al., 2007), os resíduos de proteínas de algas (SHEIH et al., 2009) e proteína de trigo sarraceno (TANG et al., 2009); além de fontes animais como gema de ovo (SAKANAKA; TACHIBANA, 2006), caseína (SUETSUNA et al., 2000), entre outros. Estudos relacionam a atuação desses peptídeos como inibidores da peroxidação lipídica (WU et al., 2003; MOURE et al., 2006; QIAN et al., 2008), sequestrantes de radicais livres (RAJAPAKSE et al., 2005; MOURE et al., 2006; QIAN et al., 2008) e quelantes de metais de transição (RAJAPAKSE et al., 2005).

Propriedades antioxidantes dos peptídeos estão relacionadas à sua composição, estrutura, e hidrofobicidade (CHEN et al., 1998). A atividade antioxidante também pode ser influenciada pelas condições empregadas para isolar proteínas, o grau de hidrólise e o tipo de protease utilizada (PEÑA-RAMOS; XIONG, 2002; GIBBS et al., 2004), a estrutura do peptídeo e concentração do peptídeo (SAITO et al., 2003). A posição dos aminoácidos na sequência peptídica

desempenha um papel importante na atividade antioxidante dos peptídeos (SARMADI; ISMAIL, 2010). Saito et al. (2003) relataram que uma mudança na sequência de aminoácidos nos peptídeos resulta em diferentes atividades antioxidantes. Yokomizo et al. (2002) isolaram quatro peptídeos do hidrolisado proteico de okara com maior atividade antioxidante. Todos os peptídeos eram di ou tripeptídeo e possuíam um aminoácido aromático na extremidade C-terminal. Os autores concluíram que a sequência aminoacídica de um peptídeo é importante para a atividade antioxidante e não somente a presença de determinado aminoácido.

Vários aminoácidos como histidina, metionina e lisina são reconhecidos por serem antioxidantes (SINGH et al., 2014), assim como peptídeos que contêm prolina em sua composição (KITTS; WEILER, 2003). Os aminoácidos aromáticos, fenilalanina (OVERVELD, VAN et al., 2000), tirosina, triptofano (SINGH et al., 2014) possuem elevada atividade antioxidante. A atividade antioxidante desses aminoácidos com resíduos aromáticos é devida à capacidade de doar prótons (SARMADI; ISMAIL, 2010). Muitos desses aminoácidos com potencial antioxidante podem estar no interior da proteína, onde eles estariam inacessíveis às EROs (ELIAS et al., 2008). Durante a hidrólise enzimática, a proteína é clivada em peptídeos menores e os grupos funcionais presentes nas regiões hidrofóbicas são expostos com o consequente aumento na disponibilidade desses aminoácidos que são fundamentais para exercer bioatividade (DÍAZ; DECKER, 2004; ELIAS et al., 2008; POWER et al., 2013).

A hidrólise enzimática, portanto, é a técnica mais utilizada para obtenção de peptídeos bioativos (TAKAMATSU, 2006). Para a produção de hidrolisados pode-se utilizar enzimas tais como pepsina, bromelina, tripsina, quimiotripsina, papaína e alcalase, entre outras, isoladamente ou combinadas (CLEMENTE, 2000; AGYEI; DANQUAH, 2011).

A especificidade da protease influencia as características dos hidrolisados resultantes (POWER et al., 2013). A especificidade da protease pode afetar o tamanho, a composição de aminoácidos e a sua sequência, que por sua vez influencia a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos (CHEN et al., 1995; JEON et al., 1999; WU et al., 2003). Peña-Ramos e Xiong (2002) relataram que a utilização de diferentes enzimas para a produção de hidrolisados de proteína de soja isolada resultou na formação de uma mistura de peptídeos com diferentes tamanhos e, conseqüentemente, com diferente atividade antioxidante.

A alcalase, uma endopeptidase produzida pelo micro-organismo *Bacillus licheniformis*, possui especificidade ampla (YANG et al., 2011) e cliva preferencialmente ligações peptídicas com o lado carboxil dos aminoácidos metionina, ácido glutâmico, leucina, tirosina, lisina e glutamina (ADAMSON; REYNOLDS, 1996). Esta enzima tem sido usada para produção de hidrolisados proteicos com aplicações na indústria e também atua na geração de peptídeos bioativos (ZHU et al., 2006).

Embora os principais estudos realizados com peptídeos bioativos sejam principalmente sobre os efeitos antioxidante e anti-hipertensivo. O interesse na avaliação do efeito anti-inflamatório dos peptídeos tem crescido nos últimos anos. Os resultados desses trabalhos tem mostrado que alguns peptídeos têm funções específicas, porém também podem exibir propriedades multifuncionais, como por exemplo, atividade antioxidante e anti-inflamatória, entre outras (SINGH et al., 2014).

Um exemplo é o peptídeo Lunasina, encontrado principalmente na soja, composto por 43 resíduos de aminoácidos e com massa molecular de 5,5 kDa. Possui ação anti-câncer, atividade antioxidante, ação anti-inflamatória e ação hipocolesterolêmica (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2009; SINGH et al., 2014; LULE et al., 2015). No estudo de Hernández-Ledesma et al. (2009), os autores demonstraram que o peptídeo Lunasina diminuiu a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 e também reduziu significativamente a produção de EROs em macrófagos. O tratamento da farinha de soja germinada com alcalase resultou na formação de hidrolisados proteicos com ação antioxidante e na diminuição na produção de mediadores inflamatórios (VERNAZA et al., 2012).

Apesar das potenciais propriedades bioativas, ainda há escassez de informação sobre os mecanismos moleculares de ação desses peptídeos anti-inflamatórios (MAJUMDER et al., 2013). Geralmente, os peptídeos com ação anti-inflamatória inibem ou suprimem a expressão de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, além de reduzir a expressão da COX-2 (MAJUMDER et al., 2016). No entanto com uma mudança em sua estrutura ou composição de aminoácidos, os peptídeos podem exibir ação completamente diferente, o que implica em uma maior complexidade na compreensão de seu alvo de ação (MAJUMDER et al., 2016).

3.6 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos que contêm ao menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila (OZDAL et al., 2013). Estes compostos, que são produtos do metabolismo secundário de plantas (NACZK; SHAHIDI, 2004), contribuem para a resistência mecânica das paredes das células vegetais e desempenha papel regulador do crescimento das plantas (KAMISAKA et al., 1990; LEWIS; YAMAMOTO, 1990; BAUCHER et al., 1998; NACZK; SHAHIDI, 2004).

As classes dos compostos fenólicos são os ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (KARAKAYA, 2004; OZDAL et al., 2013). Os compostos fenólicos se tornaram foco de interesse de pesquisas devido aos seus potenciais efeitos benéficos para a saúde, como redução do risco de câncer, doenças cardiovasculares (PAPADOPOULOU; FRAZIER, 2004; KURIYAMA et al., 2006; MURSU et al., 2008; CHEN et al., 2011; WENG; YEN, 2012), devido ao seu potencial antioxidante (WANG et al., 2015) e anti-inflamatório (EVANS et al., 2006; BEARA et al., 2012; ZIMMER et al., 2012; RIBEIRO et al., 2015).

A atuação dos compostos fenólicos como antioxidantes se dá por meio da doação de hidrogênio e/ou elétrons (ARORA et al., 1998; HEIM et al., 2002), quelação de metais (FERRALI et al., 1997), na ativação de enzimas antioxidantes (HAVSTEEN, 2002). A capacidade antioxidante destes compostos é atribuída ao poder redutor do grupo aromático que faz com que os intermediários formados a partir dessa reação sejam relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura desses compostos (CERQUEIRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2009).

Os principais compostos fenólicos presentes na soja são as isoflavonas, pertencentes à classe dos flavonoides, sendo que a daidzeína, a genisteína e a gliciteína estão em maior proporção e podem ter atuação particularmente nas neoplasias, doenças cardiovasculares, osteoporose e principalmente no alívio dos sintomas relacionados à menopausa (HOLDER et al., 1999; DUNCAN et al., 2003).

4 Material e Métodos

4.1 Material

Os grãos de soja utilizados foram da variedade Foscarin 31 (lote: IA 31/2013), adquiridos no Instituto Agronômico de Campinas (IAC). A enzima alcalase foi adquirida da Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Foram utilizados kit ELISA de quantificação de TNF- α da R&D (San Diego, CA, EUA), LPS (*E. coli* Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Os reagentes utilizados foram: acrilamida, tris base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA); β -mercaptoetanol (Merck, Hohenbrunn, Alemanha); tricina, dodecil sulfato de sódio (SDS), Coomassie Brilliant Blue G250, Folin-Ciocalteu, ácido gálico, trolox, TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride), fluoresceína (Synth, São Paulo, Brasil). Os demais reagentes utilizados foram de grau de analítico.

4.2 Métodos

O fluxograma geral com as principais etapas do experimento está mostrado na Figura 2. A partir dos grãos de soja foram obtidos e caracterizados FSD, IPS e okara. Os hidrolisados com alcalase foram obtidos do IPS e okara sob as mesmas condições. A atividade antioxidante da FSD, do okara, IPS e hidrolisados foram avaliadas por FRAP e ORAC e também as SRRFC. Os mediadores inflamatórios avaliados foram TNF- α e óxido nítrico.

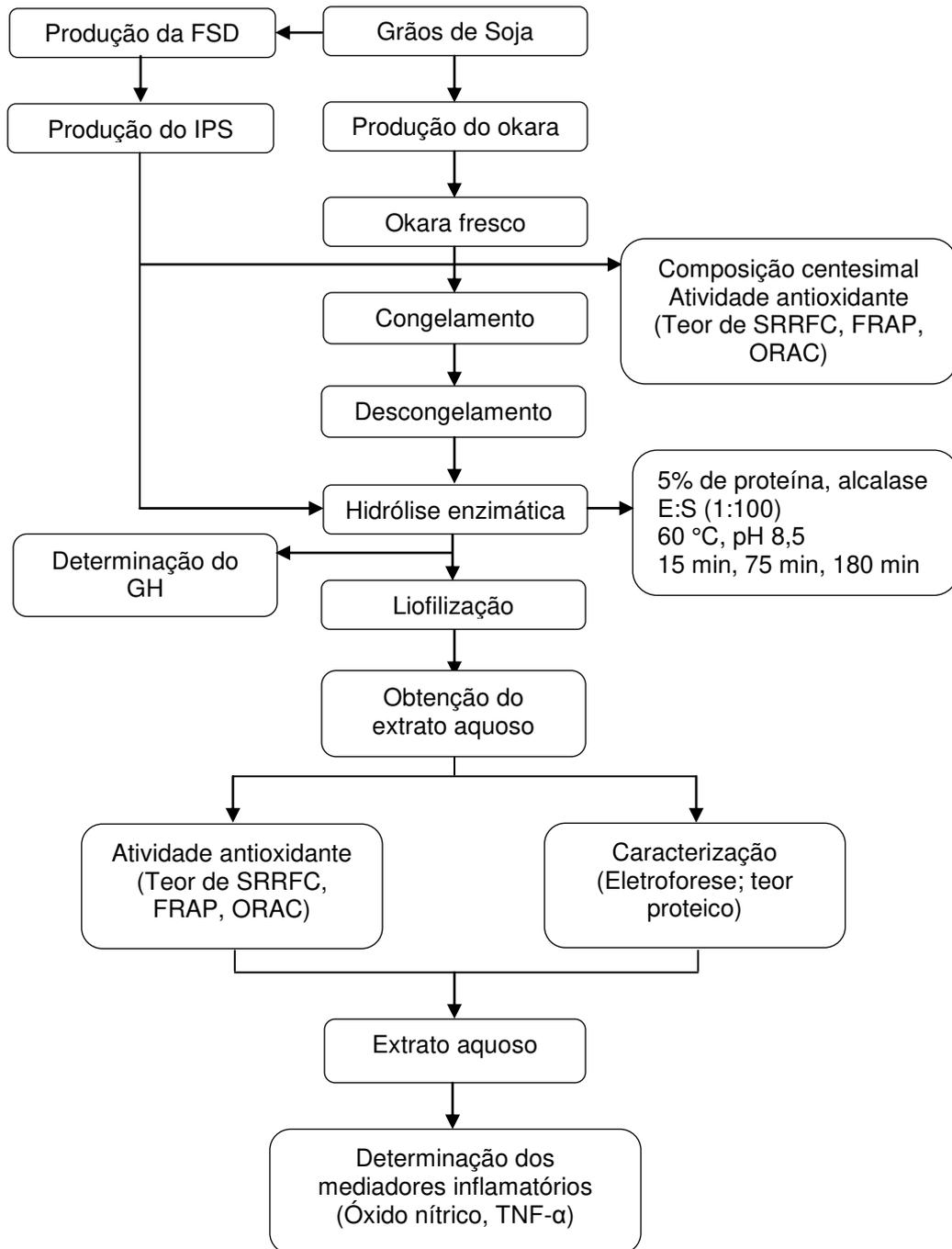


Figura 2. Fluxograma geral do experimento. FSD (farinha de soja desengordurada); IPS (isolado proteico de soja); E:S (relação enzima substrato); FRAP (ferric reducing antioxidant power); GH (grau de hidrólise); ORAC (oxygen radical absorbance capacity); SRRFC (substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu); TNF- α (fator de necrose tumoral).

4.2.1 Obtenção do okara

O okara foi obtido de acordo com a metodologia de obtenção do extrato hidrossolúvel de soja da Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja (UNISOJA), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara, SP (BENEDETTI; FALCÃO, 2003; MAIA et al., 2006). As etapas da obtenção do okara estão mostradas no fluxograma da Figura 3.

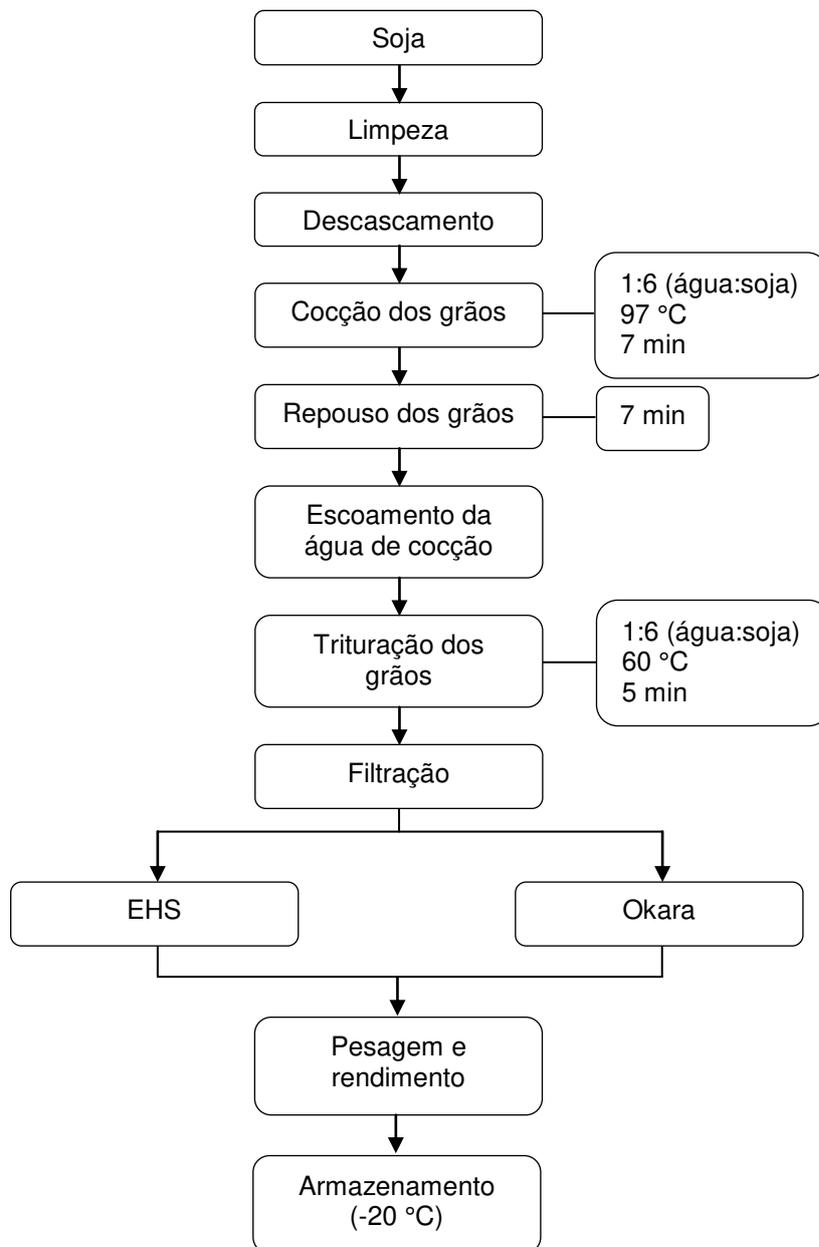


Figura 3. Fluxograma da obtenção do okara. EHS (extrato hidrossolúvel de soja).

Os grãos foram pesados, lavados em água corrente e descascados manualmente. A seguir foram submetidos ao tratamento térmico, na proporção 1:6 (soja:água), por 7 min/97 °C; o aquecimento foi desligado e os grãos permaneceram por mais sete minutos na água de cozimento. Os grãos foram então escorridos e ao atingirem temperatura ambiente, foram pesados para cálculo da absorção da água. A soja cozida foi então triturada em liquidificador industrial (Skymssen, Brusque, SC, Brasil) por 5 minutos, com adição de água a 60 °C, na mesma proporção usada para o cozimento dos grãos. O material foi filtrado utilizando-se tecido sintético com prensagens manuais para a separação do extrato hidrossolúvel de soja do okara. O EHS e okara foram pesados e posteriormente congelados a -20 °C.

4.2.2 Obtenção do isolado proteico de soja

Para o preparo da farinha de soja desengordurada (FSD), os grãos de soja foram moídos em moinho de laboratório (modelo MA630/1, Marconi®), peneirados em peneira de 60 *mesh* (abertura de 0,250 mm). A farinha de soja obtida foi desengordurada com hexano na proporção 1:10 (farinha de soja:solvente) e a mistura foi revolvida a cada 30 min por 6 h, em temperatura ambiente. Ao final de cada dia, o solvente foi descartado e a farinha permaneceu *overnight* em capela para evaporação do solvente remanescente. O procedimento descrito foi repetido por quatro dias, obtendo-se a farinha de soja desengordurada (FSD).

O isolado proteico de soja (IPS) foi preparado a partir da FSD, segundo método de Petruccelli e Añón (1995), com adaptações. Primeiramente, 100 g de FSD foram suspensas em 1 L de água deionizada e o pH foi ajustado em 8,0 com adição de NaOH 2 mol L⁻¹. A mistura permaneceu sob agitação por 2 h em temperatura ambiente. A suspensão obtida foi centrifugada (10.415 x *g* por 30 min a 4 °C). O sobrenadante foi retirado e um novo volume de água deionizada igual ao inicial foi adicionado, o pH foi ajustado em 8,0 com adição de NaOH 2 mol L⁻¹, e permaneceu sob agitação por 2 h em temperatura ambiente e centrifugada (10.415 x *g* por 30 min a 4 °C). O sobrenadante foi misturado ao sobrenadante da extração anterior e o pH ajustado em 4,5 com HCl 1 mol L⁻¹ e permaneceu sob agitação por 10 min em temperatura ambiente. A proteína precipitada foi separada por centrifugação (5.858 x *g* por 15 min a 4 °C), lavada com água acidificada e

centrifugada ($5.858 \times g$ por 5 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$), ao precipitado foi adicionado um volume de água deionizada e o pH ajustado a 7,0 com $\text{NaOH } 2 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente foi liofilizada e armazenada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até sua utilização. A Figura 4 mostra as etapas para o preparo do IPS.

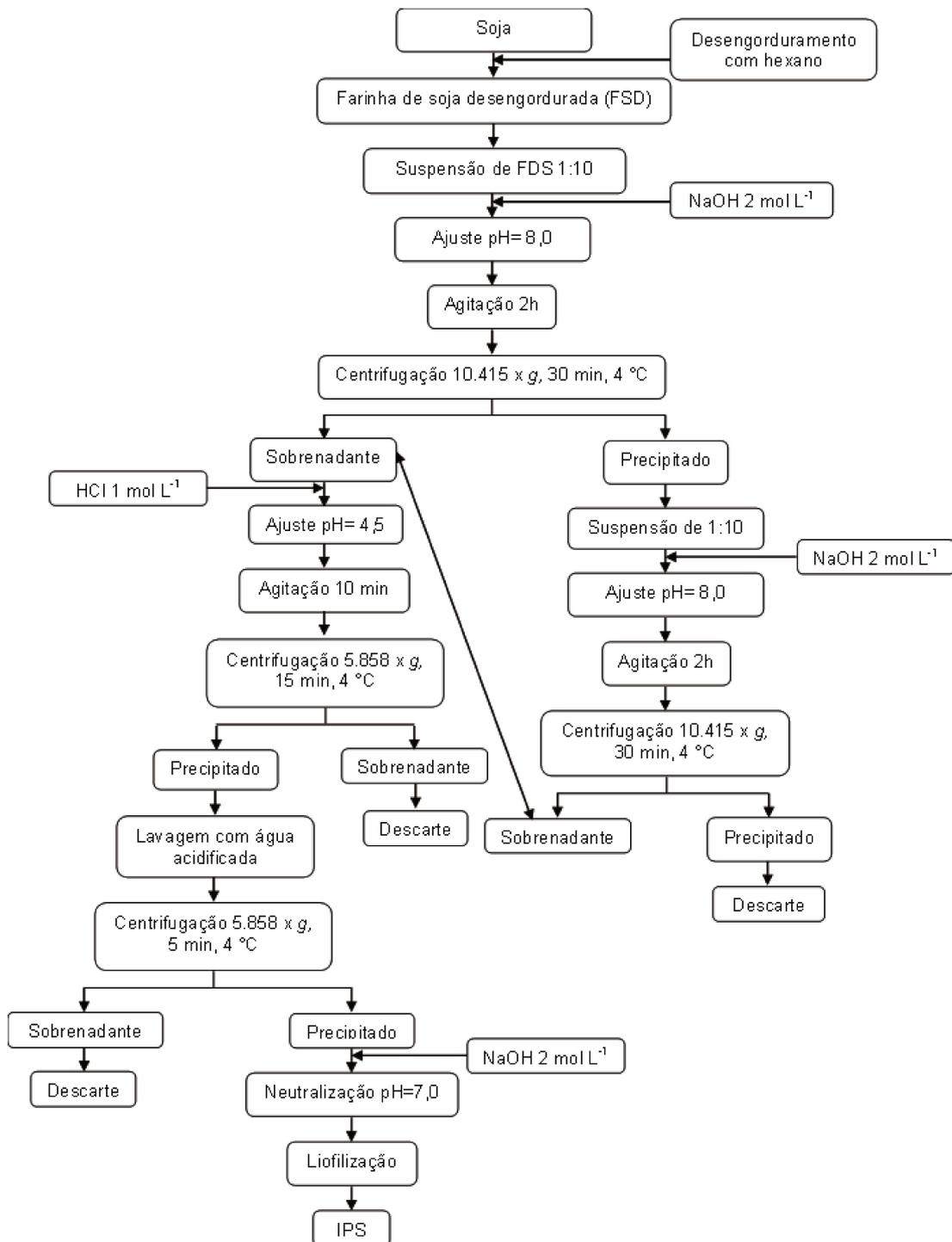


Figura 4. Fluxograma obtenção do isolado proteico de soja (IPS).

4.2.3 Obtenção dos hidrolisados proteicos

Os hidrolisados do okara e IPS foram obtidos com a enzima alcalase. A reação de hidrólise foi realizada em reator acoplado em banho termostático sob agitação. Okara ou IPS foi disperso em água deionizada (5% de proteína, m/v), relação enzima:substrato (E:S) de 1:100 (m/m), 60 °C, pH inicial 8,5, ajustado com Na_2CO_3 1 mol L^{-1} . A hidrólise foi interrompida após 15, 75 e 180 min reação. Ao final da reação, a massa reacional foi aquecida a 90 °C por 10 min para inativação da enzima. Os hidrolisados foram resfriados, congelados e liofilizados e armazenados a -20 °C até sua utilização. A seleção das condições de hidrólise foi baseada em testes preliminares realizados e nas condições ótimas da enzima utilizada.

A determinação do grau de hidrólise foi realizada com o reagente OPA (o-ftaldialdeído), segundo o método descrito por Nielsen et al. (2001). Em tubo de ensaio foram adicionados 3 mL da solução do reagente OPA (3,81 g de tetraborato decaidratado, 100 mg de dodecil sulfato de sódio, 88 mg de ditiotreitol em 80 mL água destilada e 80 mg de o-ftaldialdeído em 2 mL de etanol) e 400 μL de solução da amostra, padrão ou água (branco). Os tubos foram agitados em *vortex* por 5 segundos e transferidos para cubetas e, após exatos 2 min, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 340 nm. Foi preparada uma solução 0,1 mg/mL de serina para o padrão. Para o branco foi utilizado água destilada. A análise foi realizada em quadruplicata. O grau de hidrólise foi determinado segundo as equações abaixo:

$$\text{Serina-NH}_2 = (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) / (\text{Abs}_{\text{padrão}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) * 0,9516 * V * 100 / (X * P) \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: X: massa da amostra em g; P: % de proteína total da amostra; V: volume da solução em L.

$$H = (\text{Serina-NH}_2 - \beta) / \alpha \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: β : 0,342; α : 0,970, constantes para a proteína de soja (ADLER-NISSEN, 1986).

$$\text{GH} (\%) = h / h_{\text{tot}} * 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde: GH (%) = grau de hidrólise; h = número de ligações peptídicas clivadas durante a hidrólise; h_{tot} = número total de ligações peptídicas no substrato proteico - 7,8 para proteínas da soja (ADLER-NISSEN, 1986).

4.3 Composição centesimal

O teor de proteína foi determinado pelo método de micro Kjeldahl, utilizando o fator de conversão de 6,25 (AOAC, 1997). Teor de cinzas e a umidade foram determinados segundo a AOAC (1997), e o de lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer (1959). O teor de carboidratos totais foi obtido por cálculo de diferença.

4.4 Caracterização

4.4.1 Perfil eletroforético

Os perfis de distribuição de massa molecular da FSD, IPS e okara foram determinados por eletroforese em sistema SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Foram utilizados gel de separação (12% T e 4% C) e gel de empilhamento (4% T e 2,67% C). As amostras foram diluídas em tampão redutor (62,5 mmol Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0,1% azul de bromofenol), aquecidos a 95 °C por 10 min. Foram aplicadas alíquotas de 10 μ L da solução das amostras contendo 0,4% de proteína. Após a corrida, o gel foi corado em 0,1% Comassie Blue G250 e descorado com várias lavagens e solução ácido acético/metanol/água (1:4:5).

Os perfis de distribuição de massa molecular dos hidrolisados de okara e IPS foram determinados em sistema SDS-PAGE-Tricina (SCHÄGGGER; JAGOW, 1987). Foram utilizados géis de poliacrilamida de diferentes concentrações: gel de separação (14,6% T e 3% C), gel espaçador (10% T e 3% C) e gel de empilhamento (4% T e 3% C). As amostras foram diluídas em tampão redutor (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 10% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0,1%, azul de bromofenol aquecidos a 95°C por 4 min. Após as corridas, os géis foram fixados por 1 hora em solução metanol/ácido acético/ água (5:1:4) e corados em Coomassie Brilliant Blue

G250 (0,04% em 10% de ácido acético) e posteriormente descorados em 10% de ácido acético.

4.5 Atividade antioxidante

4.5.1 Preparo do extrato aquoso

Para obtenção do extrato aquoso, 100 mg de amostra (hidrolisados de okara, hidrolisados de IPS ou IPS) ou 500 mg (FSD ou okara) foram dispersos em 10 mL de água deionizada. Após 30 min de agitação em temperatura ambiente, o material foi centrifugado ($10.015 \times g$ por 20 min a 4°C) em centrífuga RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA). O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro comum e o volume foi completado em balão volumétrico (10 mL) com água deionizada. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar e congelados até sua utilização. O teor de proteína de todos os extratos aquosos foi determinado pelo método de micro Kjeldahl, utilizando o fator de conversão de 6,25. Os extratos foram preparados em triplicata.

4.5.2 Teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu (SRRFC)

A determinação do teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu foi realizada de acordo com Medina (2011). Em microtubo de 1,5 mL foram adicionados 50 μL de extrato aquoso da amostra ou padrão ou água deionizada (branco), 450 μL de água deionizada, 50 μL de reagente de Folin-Ciocalteu, 500 μL Na_2CO_3 (7 %) e mais 200 μL de água deionizada. A mistura foi agitada em vórtex e permaneceu em repouso por 90 min. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek®, Vermont, EUA) em 765 nm. A curva padrão foi feita com ácido gálico nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/mg de proteína solúvel.

4.5.3 Ensaio de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

O ensaio de FRAP foi realizado segundo a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996). Em microtubo de 1,5 mL foram adicionados 30 µL do extrato aquoso da amostra, padrão ou água (branco), 90 µL de água deionizada e 900 µL de reagente FRAP (450 µL de 0,3 mol/L de tampão acetato, pH 3,6; 225 µL de solução 10 mmol TPTZ em 40 mmol HCl e 225 µL de solução de 20 mmol FeCl₃). Após agitação em vórtex, 200 µL por poço foram transferidos para microplaca de 96 poços. A placa foi incubada a 37 °C em leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek®, Vermont, EUA) por 30 min e a absorbância foi medida a 595 nm. Foi feita uma curva padrão de Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) com as concentrações de 100, 200, 400, 800, 1200 e 1600 µmol/L. Os resultados foram apresentados em µmol Trolox® equivalente (TE)/g de proteína solúvel. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.5.4 Ensaio de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

O ensaio de ORAC foi realizado de acordo com Ou et al. (2002) com adaptações de Dávalos et al. (2004). Em microplaca de 96 poços, foram adicionados 20 µL do extrato aquoso da amostra, padrão, ou tampão fosfato de potássio (pH 7,4); em seguida foram adicionados 120 µL de fluoresceína em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) e 60 µL de AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato) em tampão fosfato de potássio (pH 7,4). A leitura da fluorescência foi realizada a em leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek®, Vermont, EUA) por 80 min a cada 1 minuto, a 37 °C com filtro de excitação 485 nm e emissão 520 nm. A curva padrão feita com Trolox® e tampão fosfato de potássio (pH 7,4) com as concentrações de 25, 50, 100, 300, 500 e 800 µmol/L. Os valores de AUC (área abaixo da curva) foram substituídos na equação da reta obtida pela curva padrão de Trolox e os valores expressos em µmol Trolox equivalente (TE)/g de proteína solúvel. O ensaio foi realizado em triplicata para cada extrato.

4.6 Ensaio de determinação da capacidade anti-inflamatória

Os ensaios para determinação dos mediadores inflamatórios foram realizados com os hidrolisados de okara e de IPS obtidos no tempo 15 min e 180 min de hidrólise. Para o ensaio inflamatório utilizou-se modelo de cultura de células da linhagem de macrófagos de murinos RAW 264,7 gentilmente cedidas pela Professora Dra. Wirla Tamashiro (IB-UNICAMP). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Compostos Bioativos (DEPAN–FEA).

As células RAW 264,7 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 1% de penicilina, 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C em 5% de CO₂/95% de ar.

4.6.1 Ensaio de viabilidade celular

Para análise da viabilidade celular, foi utilizado o método brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). Este ensaio é usado para medir a viabilidade celular. MTT consiste em um sal de tetrazólio amarelo, solúvel em água. Nas mitocôndrias o anel é reduzido formando cristais de formazan de coloração roxa que são insolúveis em água (SLATER et al., 1963; MOSMANN, 1983).

As células foram adicionadas em placas de 96 poços na concentração $1,0 \times 10^5$ por poço. Após incubação de 24 h a 37 °C em 5% de CO₂/95% de ar, o sobrenadante foi retirado e adicionados 100 µL de amostra previamente diluída em meio RPMI-1640 completo nas concentrações 2; 1; 0,5 e 0,25 mg/mL de proteína. A placa foi incubada novamente por 18 h a 37 °C em 5% de CO₂/95% de ar, e adicionou-se 10 µL de MTT por poço (5 mg/mL). A placa foi incubada por 4 h a 37 °C em 5% de CO₂/95% de ar, o sobrenadante foi retirado e 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados em cada poço. A leitura de absorbância foi realizada a 550 nm em leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek®, Vermont, EUA). O resultado foi expresso em porcentagem de células viáveis em comparação ao controle (células cultivadas em meio RPMI-1640 completo sem amostra).

4.6.2 Ensaio de produção de mediadores inflamatórios

O estímulo inflamatório utilizado foi lipopolissacarídeo (LPS) na concentração 100 ng/poço. As células foram semeadas na concentração de 4×10^5 células por poço em placas de 24 poços. Após 24 h de incubação a 37 °C em 5% de CO₂/95% de ar, o meio foi removido e as células receberam meio adicionado de amostra, meio adicionado de estímulo ou meio adicionado de estímulo e amostra. As amostras foram adicionadas nas concentrações de 1 mg/mL ou 0,5 mg/mL de proteína, definidas com base nos resultados de viabilidade celular. Os sobrenadantes foram coletados após 24 h de incubação e armazenados a -80 °C para quantificação da produção de mediadores inflamatórios. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

4.6.2.1 Dosagem de nitrito

A determinação da concentração de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos foi feita por meio da reação de Griess (GREEN et al., 1982). Em placa de 96 poços foram adicionados 50 µL de amostra e 50 µL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de H₃PO₄ e 0,1% de N-1-(naftil) etilenodiamina-diHCl em água destilada). A leitura de absorbância foi realizada a 540 nm em leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek®, Vermont, EUA). Para a construção da curva padrão de nitrito foram utilizadas concentrações de 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 µmol/L de nitrito. Os resultados foram expressos em concentração de µM de nitrito/ $1,5 \times 10^6$ células.

4.6.2.2 Determinação do fator de necrose tumoral (TNF-α)

Os níveis de TNF-α foram quantificados por kit ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), seguindo as instruções do fabricante R&D (San Diego, CA, EUA). Para o ensaio de TNF-α, a placa foi sensibilizada com o anticorpo de captura durante 18 h a 4 °C. Posteriormente, a placa foi lavada com solução de PBS 0,05% Tween-20 por 3 vezes. Para o bloqueio, utilizou-se solução de bloqueio (PBS SFB

5%) por uma hora em temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente e foram adicionadas as amostras e padrão aos poços e a placa foi incubada por duas horas em temperatura ambiente.

Após a incubação da placa, o anticorpo de detecção foi adicionado e após mais uma hora, a placa foi lavada e em seguida foi adicionada a enzima peroxidase (SAv-HRP). Após 30 min, a placa foi lavada e 50 µL de solução do substrato tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionada aos poços após 30 min de incubação em ambiente escuro a reação foi interrompida com 50 µL de solução de ácido sulfúrico (1N). Os dados quantitativos foram obtidos pela medida da absorbância a 540 nm em leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek®, Winooski, EUA). A concentração da citocina foi determinada por comparação com uma curva padrão utilizando concentrações de 10,9 a 700 pg/mL de TNF-α. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.7 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0. Os resultados de atividade antioxidante foram analisados por ANOVA e teste Tukey. O teste de *Dunnnett* foi utilizado para análise dos resultados dos mediadores inflamatórios. Essa análise consiste em comparações múltiplas onde apenas um tratamento serve de referência (controle), que no presente trabalho foram as células tratadas somente com estímulo inflamatório. O nível de confiança para ambas as avaliações foi de 95% ($p < 0,05$).

5 Resultados e Discussão

5.1 Obtenção e caracterização do okara, IPS e seus hidrolisados

O rendimento do processo de obtenção do EHS foi em média de 4,3 L/kg de soja e 2,1 kg de okara/kg de soja, o que está na faixa relatado por outros autores (TASHIMA; CARDELLO, 2003; O'TOOLE, 2004; MAIA et al., 2006). Esses valores podem sofrer variação de acordo com o método utilizado para obtenção do EHS. A umidade, $74,9 \pm 0,5\%$, está de acordo com reportado na literatura, em torno de 80% (STANOJEVIC et al., 2013).

A composição centesimal da farinha integral de soja e do okara está apresentada na Tabela 1. No okara, os carboidratos são o principal componente, 66,4%, sendo que 80% correspondem à fração de fibra insolúvel e 20 % às fibras solúveis (MATEOS-APARICIO et al., 2010a). O teor de proteína está de acordo com o observado por Li et al. (2012), entre 15,2% a 33,4% e abaixo do relatado por Stanojevic et al. (2014), de 27,4% a 32,1% (em base seca). A composição do okara pode sofrer variações dependendo da soja utilizada, do processamento para obtenção do EHS e quantidade de água extraída neste processo (VONG; LIU, 2016).

O IPS, obtido a partir da farinha de soja desengordurada apresentou teor de proteína menor do que descrito na literatura. Lui et al. (2003) e Takeiti et al. (2004) obtiveram IPS com 95,2% e 96,9% de proteína. A diferença entre os valores obtidos no presente estudo e os encontrados na literatura provavelmente deve-se ao tipo de processo de obtenção dos isolados, bem como a farinha de soja utilizada.

Tabela 1. Composição centesimal da farinha de soja integral e do okara (base seca)

Composição (%)	Farinha de Soja Integral	Okara	Isolado proteico de soja
Proteínas*	37,2 \pm 0,5	22,7 \pm 0,7	83,9 \pm 0,4
Lipídeos	23,4 \pm 0,7	9,5 \pm 0,8	Nd
Cinzas	4,8 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	Nd
Carboidratos**	34,6	66,4	Nd

*N% x 6,25

** Calculado por diferença

Nd: não determinado

Média \pm desvio padrão de 3 replicatas

A Figura 5 mostra a curva de hidrólise do okara fresco com alcalase. É possível notar aumento no GH com o aumento no tempo de hidrólise. O mesmo comportamento foi observado no trabalho de Kong e Xiong (2006) para hidrólise de zeína utilizando alcalase. A partir desta curva foram definidos os tempos de 15, 75 e 180 min de hidrólise para obtenção dos hidrolisados com diferentes GH. Nestes tempos de hidrólise, os hidrolisados apresentaram 5,7, 12,0 e 18,3%, respectivamente, sendo considerados, então, com baixo grau, médio e alto grau de hidrólise.

A hidrólise do IPS foi realizada nas mesmas condições utilizadas para o okara. A obtenção dos hidrolisados de IPS teve como objetivo a utilização de uma matriz constituída majoritariamente por proteínas.

No decorrer do texto serão utilizadas as seguintes siglas para os hidrolisados: hidrolisado de isolado proteico de soja com 15 min de hidrólise (H IPS15), hidrolisado de isolado proteico de soja com 75 min de hidrólise (H IPS75), hidrolisado de isolado proteico de soja com 180 min de hidrólise (H IPS180). Para os hidrolisados de okara foram definidas as siglas: hidrolisado de okara com 15 min de hidrólise (H OK15), hidrolisado de okara com 75 min de hidrólise (H OK75), hidrolisado de okara com 180 min de hidrólise (H OK180).

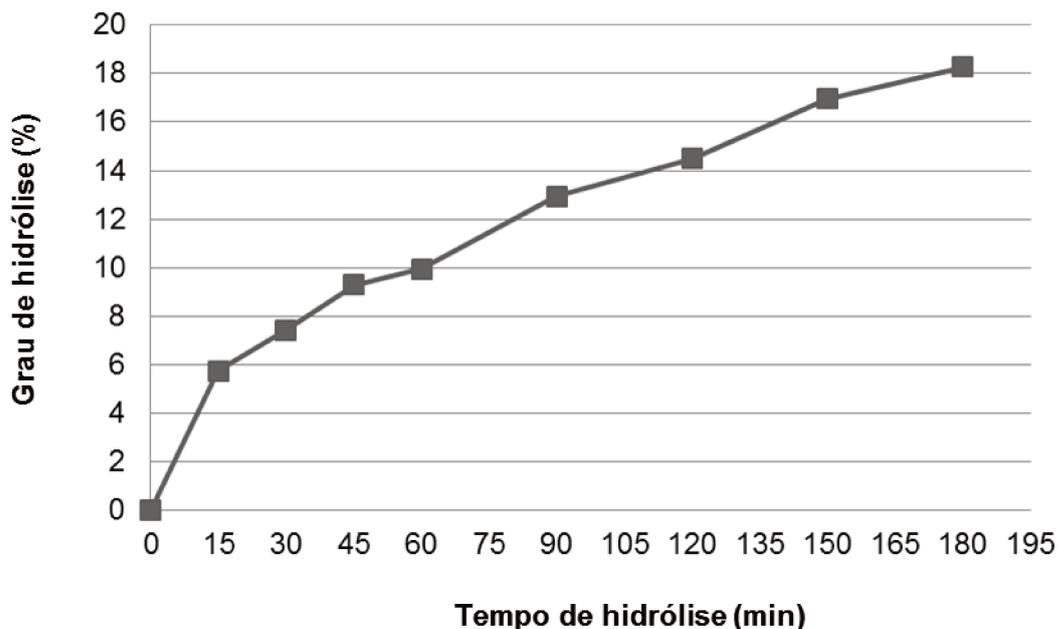


Figura 5. Curva de hidrólise do okara fresco com a enzima alcalase (concentração de substrato 5% (m/m); pH 8,5; E:S 1:100; 60 °C; 180 min).

A FSD, IPS e okara apresentaram perfis eletroforéticos (SDS-PAGE) semelhantes (Figura 6 A). As três subunidades da globulina 7S, α (67 kDa), α' (71 kDa) e β (50 kDa) (NISHINARI et al., 2014) estão presentes em todas as amostras. A banda com massa molecular de 33 kDa corresponde à lectina, a fração de 20 kDa corresponde aos inibidores de tripsina Kunitz (KTI) (KOSHIYAMA et al., 1981; NISHINARI et al., 2014) e a subunidade da globulina 11S, o polipeptídeo ácido de 35 kDa (NISHINARI et al., 2014).

O perfil eletroforético dos hidrolisados de okara e de IPS foi avaliado em sistema SDS-PAGE Tricina e estão apresentados na Figura 6 B. Nos perfis das amostras dos hidrolisados de okara (colunas 1, 2 e 3) observa-se uma banda entre 3,5 e 6,5 kDa. No perfil do H OK15 (Figura 6 B, coluna 1) nota-se algumas bandas de maior massa molecular mais visíveis que não estão nos H OK75 e H OK180 (Figura 6 B, colunas 2 e 3), o que sugere que com o aumento do tempo de hidrólise esses peptídeos foram hidrolisados em peptídeos de menor massa molecular.

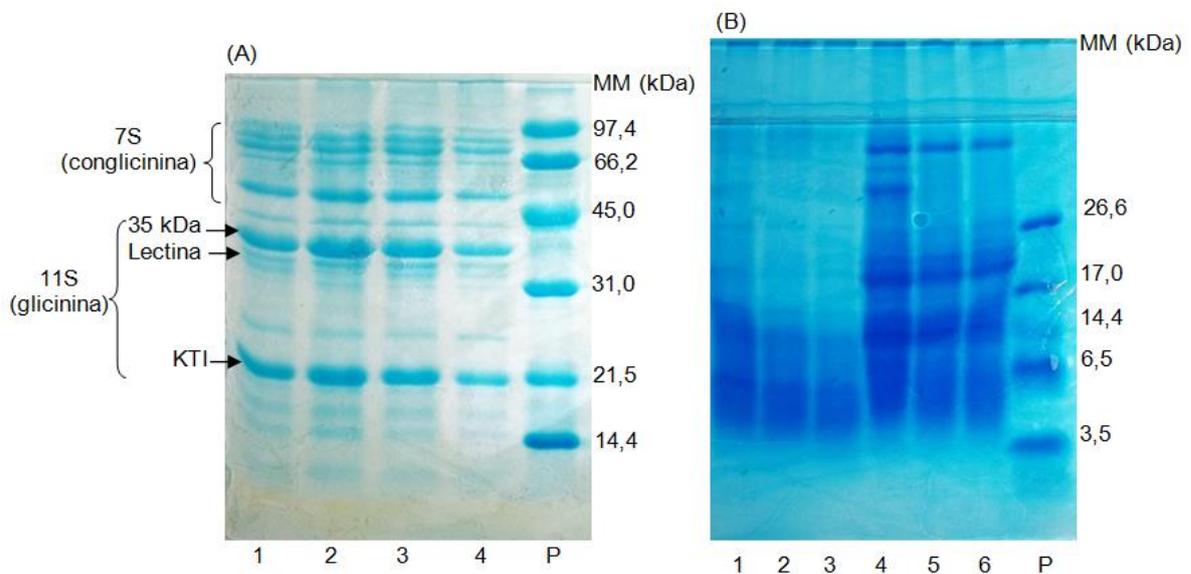


Figura 6. Perfil eletroforético das proteínas da soja, IPS, FSD, okara e dos hidrolisados de okara e dos hidrolisados de IPS. (A) SDS-PAGE em meio redutor (gel de poliacrilamida – 12%): 1- Soja; 2- IPS (isolado proteico de soja); 3- FSD (farinha de soja desengordurada); 4- okara; P- padrão de MM (14,4 a 97,4 kDa). (B) SDS-PAGE Tricina em meio redutor (gel de separação 16,5% T, 3% C): 1- H OK15 (hidrolisado de okara 15 min); 2- H OK75 (hidrolisado de okara 75 min); 3- H OK180 (hidrolisado de okara 180 min); 4- H IPS15 (hidrolisado de IPS 15 min); 5- H IPS75 (hidrolisado de IPS 75 min); 6- H IPS180 (hidrolisado de IPS 180 min); P- padrão de MM (3,5 – 26,6 kDa).

Os hidrolisados de IPS apresentaram algumas bandas com massa molecular maior que 26 kDa, possivelmente o polipeptídeo ácido (35 kDa) subunidade da fração 11S, que não está presente nos hidrolisados do okara (Figura 6 B, colunas 1, 2 e 3). Algumas bandas com massa molecular maior que 26 kDa estão presentes no H IPS15 e estão ausentes nos H IPS75 e H IPS180, sugerindo que após 15 min de hidrólise essa fração foi clivada em peptídeos com baixa massa molecular. Contudo, ainda observa-se a presença de bandas entre 17,0 e 26,6 kDa nos três hidrolisados de IPS, possivelmente referente aos inibidores de tripsina Kunitz, que se mostraram resistentes ao tratamento enzimático com alcalase.

5.2 Atividade antioxidante

Os resultados das SRRFC e da atividade antioxidante, determinados pelos métodos FRAP e ORAC, estão apresentados na Figura 7.

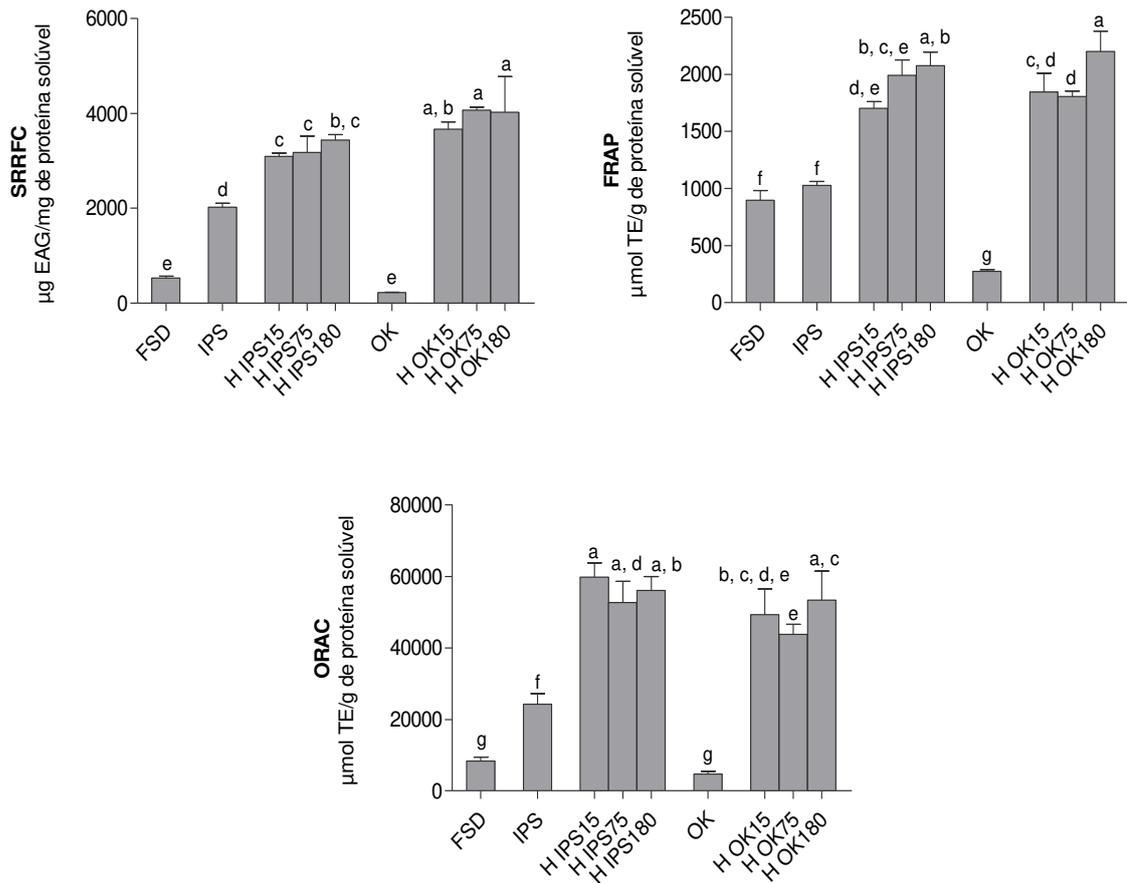


Figura 7. Teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu (SRRFC), atividade antioxidante pelo método de FRAP e atividade antioxidante pelo método de ORAC dos extratos aquosos da farinha de soja desengordurada, isolado proteico de soja e seus hidrolisados e okara e seus hidrolisados.

EAG (equivalente de ácido gálico); TE (equivalentes de Trolox); FSD (farinha de soja desengordurada); IPS (isolado proteico de soja); H IPS15 (hidrolisado de isolado proteico de soja de 15 min); H IPS75 (hidrolisado de isolado proteico de soja de 75 min); H IPS180 (hidrolisado de isolado proteico de soja de 180 min); OK (okara); H OK15 (hidrolisado de okara de 15 min); H OK75 (hidrolisado de okara de 75 min); H OK180 (hidrolisado de okara de 180 min). Os resultados são médias de 3 replicatas, com 3 repetições. Letras diferentes mostram que existe diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras acima das colunas indicam desvio padrão.

Em relação às SRRFC (Figura 7), o IPS apresentou teor 3 vezes maior que a FSD. O okara foi a amostra que apresentou o menor teor de SRRFC, cerca de 10 vezes menos do valor apresentado pelo IPS. Essas diferenças podem ser relacionadas aos componentes de cada matriz. O IPS é constituído majoritariamente por proteínas que podem reagir como reagente de Folin- Ciocalteu. O reagente Folin-Ciocalteu reage com compostos fenólicos e com outros compostos como açúcares, ácido ascórbico, alanina, tirosina, fenilalanina, histidina, triptofano, entre outros (PRIOR et al., 2005; MEDINA, 2011). No okara, a matriz é constituída principalmente por fibras, que podem ter dificultado a liberação de substâncias que reagem com o reagente Folin-Ciocalteu.

A hidrólise do okara e do IPS com alcalase resultou em aumento das SRRRF em cerca de 60% para o IPS e em até 17 vezes para o okara, resultando em valores superiores ao IPS ($p < 0,05$). O aumento no tempo de hidrólise não promoveu aumento significativo nas SRRFC nos hidrolisados de IPS e nos hidrolisados de okara. Com a hidrólise, tanto para o okara como para o IPS, houve liberação de peptídeos pela ação da alcalase, aumentando as SRRFC. No entanto, para o okara, a reação de hidrólise, realizada a 60°C em pH levemente alcalino, pode ter liberado compostos não proteicos presentes no okara mas ausentes no IPS, tais como açúcares. Arabinose, glicose, galactose, frutose, estaquiose, rafinose, são açúcares presentes no okara (MATEOS-APARICIO et al., 2010a).

Em relação à atividade antioxidante determinada pelo método de FRAP (Figura 7), a FSD e o IPS não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), mas apresentaram valores 3 vezes superiores ao okara ($p < 0,05$). A hidrólise tanto do okara como do IPS resultaram em aumento do valor de FRAP. Para o IPS promoveu aumento na atividade antioxidante de 2 vezes enquanto que para o okara esse aumento foi de 7 vezes em relação às respectivas matrizes intactas.

A atividade antioxidante aumentou significativamente nos hidrolisados de IPS e de okara com o aumento no tempo de hidrólise de 15 para 180 min. O aumento foi de 20% para ambas as matrizes. Isso mostra que o aumento do GH de 5,7% para 18,3% refletiu no aumento da atividade antioxidante desses hidrolisados. No entanto o aumento de 15 para 75 min não foi suficiente para aumentar a atividade antioxidante nos hidrolisados.

Em alguns estudos, o aumento do GH de hidrolisados proteicos resultou no aumento da atividade antioxidante (RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2008;

THEODORE et al., 2008). No entanto, outros estudos relatam diminuição na atividade antioxidante com o aumento do GH (THEODORE et al., 2008; SUN et al., 2011). Isso se deve à liberação de aminoácidos livres, que possuem menor poder antioxidante que peptídeos (ØSTDAL et al., 1999; RIVAL et al., 2001; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2005; SAKANAKA et al., 2005).

A capacidade antioxidante de hidrolisados depende de vários fatores como massa molecular dos peptídeos liberados durante a hidrólise, sua composição aminoacídica e hidrofobicidade (SARMADI; ISMAIL, 2010). As condições empregadas na hidrólise bem como a enzima utilizada também afetam a atividade antioxidante de hidrolisados proteicos (PEÑA-RAMOS; XIONG, 2003; JUN et al., 2004).

As fibras solúveis também devem ser consideradas na atividade antioxidante do okara e seus hidrolisados. No estudo de Mateos-Aparicio et al. (2010b), frações de polissacarídeos solúveis do okara mostraram poder antioxidante pelo método de FRAP, no entanto os autores ressaltam que as proteínas residuais contidas nessa fração devem ser consideradas na atividade antioxidante.

Em relação à atividade antioxidante avaliada pelo método de ORAC (Figura 7), o IPS mostrou valor 3 vezes superior ao da FSD e 5 vezes em relação ao okara. A hidrólise com alcalase dobrou a atividade antioxidante do IPS enquanto para o okara houve aumento de 10 vezes em relação à matriz intacta. O aumento no tempo de hidrólise do IPS não levou a aumento significativo da atividade antioxidante nos hidrolisados de IPS determinada pelo método de ORAC.

O aumento no tempo de hidrólise resultou no aumento de 20% da atividade antioxidante somente entre o H OK75 e o H OK180. No estudo de Yokomizo et al. (2002) com hidrolisados de okara com diferentes enzimas, os autores verificaram que houve aumento da atividade antioxidante contra a peroxidação do ácido linoleico em sistema aquoso a pH 7,0, com o aumento no tempo de hidrólise, para as diferentes proteases utilizadas.

De forma geral, o okara apresentou a menor atividade antioxidante dentre as amostras estudadas. Em um estudo anterior o okara apresentou menor atividade antioxidante em comparação com outros subprodutos da indústria alimentícia (AMIN; MUKHRIZAH, 2006). Este resultado deve-se possivelmente ao tipo de matriz. No okara há interação entre compostos antioxidantes e as fibras, que perfazem mais de 50% de sua composição, o que afeta a liberação e atividade desses compostos

(PARADA; AGUILERA, 2007; PORRINI; RISO, 2008). No entanto, o processo de hidrólise do okara aumentou significativamente sua atividade antioxidante determinada tanto por FRAP como por ORAC. Para o IPS, este mesmo processo teve menor impacto. No processo de hidrólise, além da liberação de peptídeos pela ação alcalase, a amostra é submetida à agitação contínua a 60 °C, podendo resultar, no caso do okara, na liberação de outros compostos, como as isoflavonas, aumentando a atividade antioxidante.

Durante a produção do EHS, 18% das isoflavonas da soja são retidas no okara (JACKSON et al., 2002). Wu et al. (2010) e Yang et al. (2013) relataram que a solubilidade da genisteína e daidzeína aumentou com a elevação da temperatura. Dessa forma, as condições empregadas na produção dos hidrolisados poderiam favorecer a solubilidade dessas isoflavonas, o que pode ter refletido na maior atividade antioxidante dos hidrolisados de okara.

As isoflavonas são menos solúveis em água do que em solventes ligeiramente menos polares (XU et al., 2006; WU et al., 2010). Jankowiaki et al. (2014), relataram que a extração de isoflavonas no okara é menor quando utilizado água como solvente do que a extração com diferentes concentrações de etanol.

5.3 Mediadores inflamatórios

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória foram escolhidos os hidrolisados de okara e IPS obtidos com maior e menor tempo de hidrólise, 15 e 180 min. Estas amostras foram escolhidas considerando-se que estes hidrolisados apresentam maiores diferenças em relação ao perfil de massa molecular dos peptídeos que os compõem, observados no perfil eletroforético (Figura 6 B, página 46).

5.3.1 Viabilidade celular

Os resultados do ensaio de viabilidade celular estão apresentados na Figura 8. Este ensaio foi realizado para avaliar o possível efeito citotóxico das amostras em concentrações variando de 0,25 a 2,0 mg de proteína solúvel/mL. Para

todas as amostras, nas diferentes concentrações, 70% das células permaneceram viáveis, demonstrando que os produtos proteicos de soja não foram tóxicos às células e que os efeitos na produção de mediadores inflamatórios não se devem à redução da viabilidade celular (Figura 8). A partir destes resultados, foram escolhidas as concentrações intermediárias de 0,5 e 1,0 mg/mL para estudo da produção de mediadores inflamatórios em células RAW 264,7.

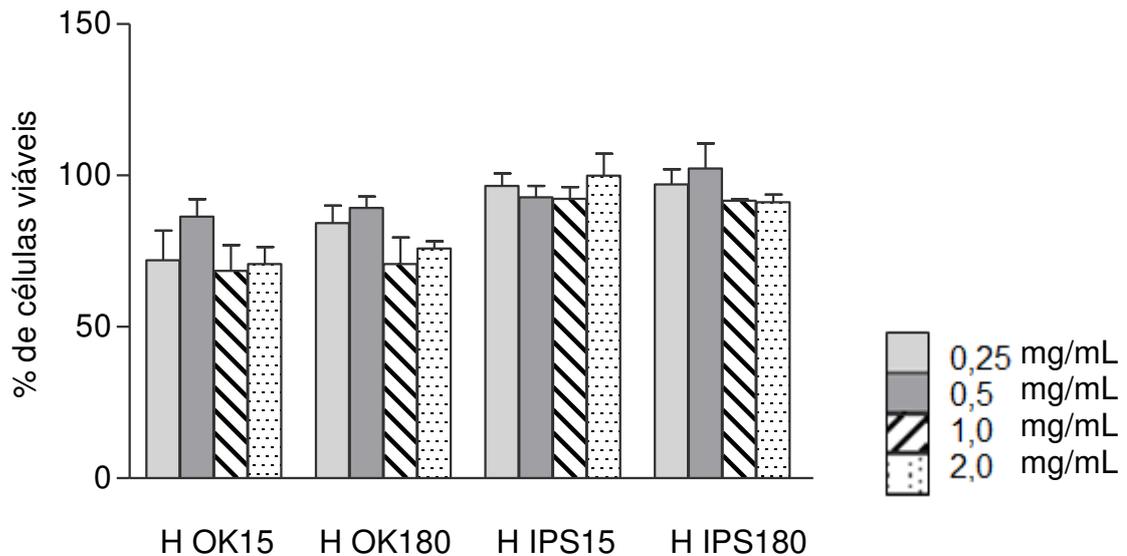


Figura 8. Efeito do tratamento com hidrolisados proteicos de okara e de IPS com diferentes concentrações (0,25 a 2,0 mg/mL) de proteína solúvel sobre a viabilidade das células RAW 264,7 estimuladas por LPS. Os dados representam médias de quadruplicata. As barras acima das colunas indicam desvio padrão. H OK15 (hidrolisado de okara 15 min); H OK180 (hidrolisado de okara 180 min); H IPS15 (hidrolisado de IPS 15 min); H IPS180 (hidrolisado de IPS 180 min).

5.3.2 Óxido nítrico

O óxido nítrico é sintetizado a partir da óxido nítrico sintetase. Óxido nítrico é um radical livre e desempenha papel importante na regulação da função imune, neurotransmissão, regulação da apoptose nas células, entre outras (CHUNG et al., 2001). A produção de óxido nítrico foi determinada indiretamente pela quantificação de nitrito presente nos sobrenadantes das células RAW 264,7 e os resultados estão apresentados na Figura 9. O tratamento com H IPS15 nas

concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL foi capaz de reduzir em até 30% a produção de óxido nítrico em células RAW 264,7 estimuladas com LPS.

As células tratadas com o H IPS180 inibiu a liberação de óxido nítrico somente na concentração de 1,0 mg/mL. Possivelmente no H IPS180 compostos com ação anti-inflamatória estão em menor concentração, pois podem ter sido transformados em outros de menor massa molecular. No estudo de Oseguera-Toledo et al. (2011), os autores relataram que hidrolisados de feijão produzidos com alcalase com 10 a 20 minutos de hidrólise, não foram tão potentes na inibição da produção de óxido nítrico quanto os hidrolisados com 180 minutos de hidrólise.

Outros trabalhos com proteínas de origem vegetal relatam resultados positivos na redução de atividade inflamatória. Millán-Linares et al. (2014) produziram dois hidrolisados de proteína de tremço com uma combinação de duas enzimas Izyme AL, com 1 h de hidrólise, seguida da hidrólise com alcalase por 15 min, e outro hidrolisado somente com alcalase com 15 min de hidrólise. Ambos hidrolisados inibiram em 50% a produção de óxido nítrico em macrófagos.

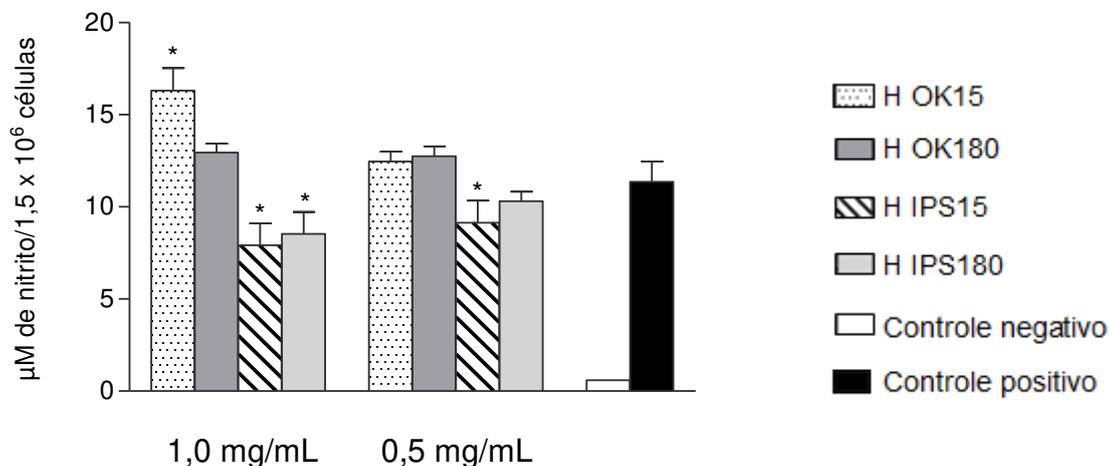


Figura 9. Produção de nitrito (μM de nitrito/ $1,5 \times 10^6$ células) em sobrenadantes de células RAW 264.7, com estímulo de LPS (lipopolissacarídeo), tratadas com hidrolisados de isolado proteico de soja ou hidrolisados de okara em concentrações de 1 mg/mL de proteína solúvel e 0,5 mg/mL de proteína solúvel. Resultados são médias de quadruplicatas. Asterisco indica diferença estatística entre as células tratadas com os hidrolisados e controle positivo, de acordo com teste de Dunnett ($p < 0,05$). As barras acima das colunas indicam desvio padrão. H OK15 (hidrolisado de okara 15 min); H OK180 (hidrolisado de okara 180 min); H IPS15 (hidrolisado de IPS 15 min); H IPS180 (hidrolisado de IPS 180 min).

Por outro lado, o tratamento com os hidrolisados de okara não inibiu a liberação de óxido nítrico. As células tratadas com H OK15 na concentração de 1,0 mg/mL induziram uma liberação maior de óxido nítrico que as células com estímulo de LPS. Como as proteínas presentes no okara e no IPS são as mesmas, possivelmente outros compostos de origem não proteica presentes nos extratos dos hidrolisados de okara liberados pelas condições de temperatura e pH durante a hidrólise podem ter provocado este efeito.

5.3.3 Fator de necrose tumoral (TNF- α)

Os resultados da produção do TNF- α estão apresentados na Figura 10. Os hidrolisados de okara assim como os de IPS na concentração de 1,0 mg/mL provocaram aumento na produção dessa citocina, sugerindo que atuaram como possível agente inflamatório. As amostras podem conter compostos não proteicos que possuem ação inflamatória e induzem aumento na produção de TNF- α .

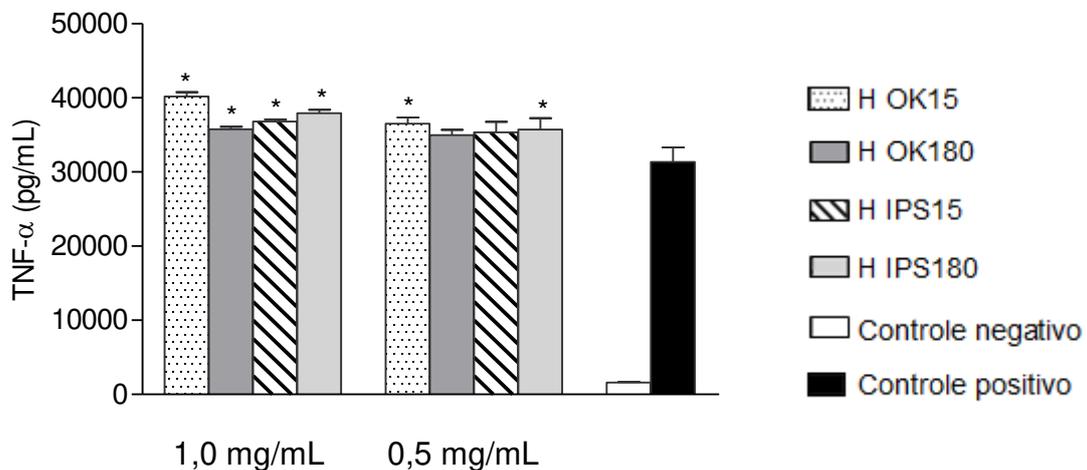


Figura 10. Produção de TNF- α em sobrenadantes de células RAW 264,7 com estímulo inflamatório de LPS, tratadas com hidrolisados de isolado proteico de soja ou hidrolisados de okara em concentrações de 1 mg/mL de proteína e 0,5 mg/mL de proteína solúvel. Resultados em médias de quadruplicatas. Asterisco indica diferença estatística entre as células tratadas com os hidrolisados e controle positivo, de acordo com teste de Dunnett ($p < 0,05$). As barras acima das colunas indicam desvio padrão. H OK15 (hidrolisado de okara 15 min); H OK180 (hidrolisado de okara 180 min); H IPS15 (hidrolisado de IPS 15 min); H IPS180 (hidrolisado de IPS 180 min).

De forma geral, hidrolisados de okara e de IPS apresentaram atividade antioxidante. Os hidrolisados de IPS apresentaram atividade inibitória da produção de óxido nítrico, porém não foram capazes de inibir a produção de TNF- α . A ação da alcalase, enzima de ampla especificidade, pode ter gerado peptídeos destituídos de atividade anti-inflamatória. Possivelmente as características que fazem com que estes peptídeos atuem como antioxidantes, não são as mesmas que fazem com que eles atuem como anti-inflamatórios.

Assim como para a atividade antioxidante algumas características dos peptídeos influenciam na sua bioatividade, o mesmo acontece para os peptídeos com função anti-inflamatória. A diminuição de marcadores inflamatórios por hidrolisados de proteína depende do perfil peptídico, sequência aminoacídica, bem como a concentração do peptídeo (MARTINEZ-VILLALUENGA et al., 2009). A atividade anti-inflamatória dos peptídeos também está relacionada com a massa molecular. Kong et al. (2008) atribuíram a atividade anti-inflamatória de hidrolisados proteicos de soja à presença de peptídeos de menor massa molecular e carga positiva. Posteriormente, Mejia e Dia (2009) sugeriram que moléculas de menor massa molecular podem ter acesso mais fácil à célula, exercendo uma atividade anti-inflamatória mais potente. Possivelmente, um dos motivos pelos quais os hidrolisados de soja obtidos neste estudo não apresentaram capacidade anti-inflamatória pode ser a predominância de peptídeos de maior massa molecular, conforme observado na Figura 6 B (página 46).

No perfil eletroforético dos hidrolisados de okara (Figura 6 B, página 46, colunas 1, 2 e 3), nota-se uma banda com massa molecular semelhante à do peptídeo lunasina. Este peptídeo, de 5,5 kDa possui atividade antioxidante e anti-inflamatória atribuída às suas estruturas secundárias e terciárias (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2009; MEJIA; DIA, 2009). Embora o perfil eletroforético dos hidrolisados apresente uma banda que poderia ser o peptídeo lunasina, a ausência de atividade anti-inflamatória dos hidrolisados não reforça a hipótese da presença deste peptídeo bioativo nos hidrolisados.

Além disso, durante a hidrólise da proteína, outros compostos liberados pelas condições de hidrólise, 60 °C e pH levemente alcalino, podem ter contribuído para ausência de atividade anti-inflamatória.

6 Conclusões

O IPS mostrou maior atividade antioxidante que o okara. A hidrólise do okara e do IPS com alcalase levou ao aumento no teor de SRRFC e na atividade antioxidante determinada pelos métodos de FRAP e de ORAC. Este aumento foi proporcionalmente superior para o okara que para o IPS, possivelmente devido ao seu menor teor proteico.

Os hidrolisados de IPS obtidos com 15 min de hidrólise enzimática inibiram a produção de óxido nítrico tanto utilizando 0,5 como 1,0 mg/mL de proteína. Entretanto o hidrolisado de IPS com 180 min de hidrólise inibiu a produção de óxido nítrico somente na concentração de 1,0 mg/mL.

A produção de TNF- α pelas células foi aumentada pelo tratamento com os hidrolisados avaliados. Compostos não proteicos podem ter induzido a produção desta citocina nas células RAW 264,7.

Os hidrolisados de okara não foram capazes de inibir a produção de mediadores inflamatórios em células RAW 264,7. Possivelmente, a presença de compostos não proteicos liberados da matriz durante a hidrólise com alcalase podem ter sido responsáveis pelas diferenças da atividade.

Novos estudos com o okara devem ser realizados para maiores esclarecimentos sobre suas bioatividades e os seus componentes associados.

7 Referências Bibliográficas

AOAC. Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**, 1997.

ADAMSON, N. J.; REYNOLDS, E. C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 19, n. 95, p. 202–207, 1996.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. London, UK: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

AGYEI, D.; DANQUAH, M. K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. **Biotechnol. Adv.**, v. 29, n. 3, p. 272–277, 2011.

AHN, S. H.; OH, S. C.; CHOI, I.; et al. Environmentally friendly wood preservatives formulated with enzymatic-hydrolyzed okara, copper and/or boron salts. **J Hazard Mater.**, v. 178, n. 1-3, p. 604–611, 2010.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, n. 17, p. 7915–7922, 1993.

AMIN, I.; MUKHRIZAH, O. Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing. **J. Sci. Food Agric.**, v. 86, n. 5, p. 778–784, 2006.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Bio. Med.**, v. 24, n. 9, p. 1355–1363, 1998.

BAAY, M.; BROUWER, A.; PAUWELS, P.; PEETERS, M.; LARDON, F. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2011, p. 1–12, 2011.

BARAĆ, M. B.; STANOJEVIĆ, S. P.; PEŠIĆ, M. B. Biologically active components of soybeans and soy protein products - a review. **Acta Periodica Technologica**, , n. 36, p. 155–168, 2005.

BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 4, p. 921–926, 2006.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 2, p. 413–420, 2008.

BAUCHER, M.; MONTIES, B.; MONTAGU, M. VAN; BOERJAN, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Crit. Rev. Plant Sci**, v. 17, n. 2, p. 125–197, 1998.

BEARA, I. N.; LESJAK, M. M.; ORCIC, D. Z.; et al. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. **Food Sci. Technol.**, v. 47, n. 1, p. 64–70, 2012.

BENEDETTI, A. C. E. P.; FALCÃO, D. P. Monitoramento da qualidade higiênico-sanitária no processamento do “leite” de soja na UNISOJA, Araraquara, SP. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, n. supl, p. 200–205, 2003.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. Caracterização físico-química de Okara e aplicação em pães do tipo francês. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 3, p. 652–659, 2006.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J. Pathol.**, v. 214, n. 2, p. 149–160, 2008.

BROOKS, J. R.; MORR, C. V. Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature. **JAACS**, v. 62, n. 9, p. 1347–1354, 1985.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CASTRO, A. M.; MACEDO-DE LA CONCHA, L. E.; PANTOJA-MELÉNDEZ, C. A. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. **Rev. Med. Gen. Méx.**, v. 80, n. 2, p. 101–105, 2017.

CATANI, M. V.; ROSSI, A.; COSTANZO, A.; et al. Induction of gene expression via activator protein-1 in the ascorbate protection against UV-induced damage. **Biochem. J.**, v. 356, n. 1, p. 77–85, 2001.

CAUS, S.; CZAIKOSKI, K.; GOMES, G. V. DE L.; CÓRDOVA, K. R. V. Obtenção de bebidas a base de extrato hidrossolúvel de soja com polpa de frutas. **Rev. Cienc. Exatas Nat.**, v. 10, n. 1, p. 115–131, 2008.

CAVALHEIRO, S. F. L.; TININIS, C. R. C. S.; TAVANO, O. L.; et al. Biscoito sabor chocolate com resíduo de soja, “okara”: teste afetivo com crianças em idade pré-escolar. **Alim. Nutr.**, v. 12, p. 151–162, 2001.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. DE; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos:

controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.

CHANG, S. K. C.; LIU, Z. Soymilk and Tofu Manufacturing. **Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology**. p.139–161, 2012.

CHEN, D.; WAN, S. B.; YANG, H.; et al. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. **Adv. Clin. Chem.**, v. 53, p. 155–177, 2011.

CHEN, H.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; FUJIMOTO, K.; NOKIHARA, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **J. Agr. Food Chem.**, v. 46, n. 1, p. 49053, 1998.

CHEN, H.-M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-conglycinin. **J. Agr. Food Chem.**, v. 43, n. 3, p. 574–578, 1995.

CHUNG, H.-T.; PAE, H.-O.; CHOI, B.-M.; BILLIAR, T. R.; KIM, Y.-M. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, v. 282, n. 5, p. 1075–1079, 2001.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 11, n. 7, p. 254–262, 2000.

CONE, J. B. Inflammation. **Am. J. Surg.**, v. 182, n. 6, p. 558–562, 2001.

CURFS, J. H. A. J.; MEIS, F. F. G. M.; HOOGKAMP-KORSTANJE, A. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 742–780, 1997.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. **J. Agr. Food Chem.**, v. 52, n. 1, p. 48–54, 2004.

DÍAZ, M.; DECKER, E. A. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. **J. Agr. Food Chem.**, v. 52, n. 26, p. 8208–8213, 2004.

DUNCAN, A. M.; PHIPPS, W. R.; KURZER, M. S. Phyto-oestrogens. **Best Pract. Res. Cl. En.**, v. 17, n. 2, p. 253–271, 2003.

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Res.**, v. 53, n. 1-3, p. 31–45, 1997.

DURANTI, M.; LOVATI, M. R.; DANI, V.; et al. The a' subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver b-VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. **J. Nutr.**, v. 134, n. 6, p. 1334–1339, 2004.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 430, n. 1, p. 37–48, 2004.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 48, n. 5, p. 430–441, 2008.

ESTEVEZ, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Rev. Nutr.**, v. 14, n. 1, p. 43–52, 2001.

EVANS, D. A.; HIRSCH, J. B.; DUSHENKOV, S. Phenolics, inflammation and nutrigenomics. **J. Sci. Food Agric.**, v. 86, n. 15, p. 2503–2509, 2006.

FEREIDUNIAN, A.; SADEGHALVAD, M.; OSCOIE, M. O.; MOSTAFAIE, A. Soybean Bowman-Birk protease inhibitor (BBI): identification of the mechanisms of BBI suppressive effect on growth of two adenocarcinoma cell lines: AGS and HT29. **Arch. Med. Res.**, v. 45, n. 6, p. 455–461, 2014.

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CACIOTTI, B.; et al. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron

chelating activity. **FEBS Lett.**, v. 416, n. 2, p. 123–129, 1997.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur. Heart J.**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 2004.

GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 26, n. 2, p. 68–87, 2012.

GIBBS, B. F.; ZOUGMAN, A.; MASSE, R.; MULLIGAN, C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Res. Int.**, v. 37, n. 2, p. 123–131, 2004.

GRAY, S. M.; BLOCH, M. H. Systematic review of proinflammatory cytokines in obsessive-compulsive disorder. **Curr. Psychiatry Rep.**, v. 14, n. 3, p. 220–228, 2012.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; et al. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [¹⁵N]Nitrate in Biological Fluids. **Anal. Biochem.**, v. 138, n. 1, p. 131–138, 1982.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Bio. Med.**, v. 18, n. 1, p. 125–126, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine.** 4th ed. Oxford, UK: Clarendon Press, 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol Ther.**, v. 96, n. 2-3, p. 67–202, 2002.

HE, R.; GIRGIH, A. T.; MALOMO, S. A.; JU, X.; ALUKO, R. E. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. **J. Funct. Foods**, v. 5, n. 1, p. 219–227, 2013.

HEAD, K. A. Isoflavones and other soy constituents in human health and disease. **Alt. Med. Rev.**, v. 3, n. 1, p. 433–450, 2001.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 2002.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; AMIGO, L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **J. Agr. Food Chem.**, v. 53, n. 3, p. 588–593, 2005.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; HSIEH, C.-C.; LUMEN, B. O. DE. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264 . 7 macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 390, n. 3, p. 803–808, 2009.

HERSH, D.; WEISS, J.; ZYCHLINSKY, A. How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, n. 1, p. 43–48, 1998.

HILL, B. G.; DRANKA, B. P.; BAILEY, S. M.; LANCASTER, J. R.; DARLEY-USMAR, V. M. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal question in nitric oxide biological. **J. Bio. Chem.**, v. 285, n. 26, p. 19699–19704, 2010.

HOLDER, C. L.; CHURCHWELL, M. I.; DOERGE, D. R. Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS. **J. Agr. Food Chem.**, v. 47, n. 9, p. 3764–3770, 1999.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 14, p. 860–867, 2006.

HWANG, J.-Y.; SHYU, Y.-S.; WANG, Y.-T.; HSU, C.-K. Antioxidative properties of protein hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esperase. **Food Sci. Technol.**, v. 43, n. 2, p. 285–290, 2010.

HYMOWITZ, T.; HARLAN, J. R. Introduction of soybean to North America by Samuel Bowen in 1765. **Econ. Bot.**, v. 37, n. 4, p. 371–379, 1983.

JACKSON, C. C.; DINI, J. P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H. P. V; FAULKNER, H. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochem.**, v. 37, n. 10, p. 1117–1123, 2002.

JANKOWIAK, L.; TRIFUNOVIC, O.; BOOM, R. M.; GOOT, A. J. VAN DER. The potential of crude okara for isoflavone production. **J. Food Eng.**, v. 124, p. 166–172, 2014.

JEON, Y.-J.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. **Proc. Biochem.**, v. 35, n. 5, p. 471–478, 1999.

JOUNG, H.; KIM, Y.; HWANG, J.; et al. Purification of a Novel Anticancer Peptide from Enzymatic Hydrolysate of *Mytilus coruscus*. , v. 22, p. 1381–1387, 2012.

JUN, S.-Y.; PARK, P.-J.; JUNG, W.-K.; KIM, S.-K. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **Eur. Food Res. Technol**, v. 219, n. 1, p. 20–26, 2004.

KAMISAKA, S.; TAKEDA, S.; TAKAHASHI, K.; SHIBATA, K. Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena coleoptiles* - their relationships to mechanical properties of the cell wall. **Physiol. Plant.**, v. 78, n. 1, p. 1–7, 1990.

KARAKAYA, S. Bioavailability of Phenolic Compounds. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 44, n. 6, p. 453–464, 2004.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources - applications of bioprocess used in isolation and recovery. **Curr. Pharm. Des.**, v. 9, n. 16, p. 1309–1323, 2003.

KOJO, S. Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, n. 8, p. 1041–1064, 2004.

KONAREV, A. V; ANISIMOVA, I. N.; GAVRILOVA, V. A.; et al. Serine proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties. **Phytochemistry**, v. 59, n. 3, p. 279–291, 2002.

KONG, B.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. **J. Agr. Food Chem.**, v. 54, n. 16, p. 6059–6068, 2006.

KONG, X.; GUO, M.; HUA, Y.; CAO, D.; ZHANG, C. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. **Bioresource Technol.**, v. 99, n. 18, p. 8873–8879, 2008.

KOSHIYAMA, I.; KIKUCHI, M.; FUKUSHIMA, D. 2S globulins of soybean seeds. 2. Physicochemical and biological properties of protease inhibitors in 2S globulins. **J. Agr. Food Chem.**, v. 29, n. 2, p. 340–343, 1981.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran. Patologia - bases patológicas das doenças**. 8 ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KURIYAMA, S.; SHIMAZU, T.; OHMORI, K.; et al. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan - the Ohsaki study. **JAMA**, v. 296, n. 10, p. 1255–1265, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annu. Rev Plant Physiol.**, v. 41, p. 455–496, 1990.

LI, B.; QIAO, M.; LU, F. Composition, nutrition, and utilization of Okara (Soybean Residue). **Food Rev. Int.**, v. 28, n. 3, p. 231–252, 2012.

LI, C.-H.; MATSUI, T.; MATSUMOTO, K.; YAMASAKI, R.; KAWASAKI, T. Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. **J. Peptide Sci.**, v. 8, n. 6, p. 267–274, 2002.

LI, X.; HAN, L.; CHEN, L. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **J. Sci. Food Agric.**, v. 88, n. 9, p. 1660–1666, 2008.

LIU, B.; GAO, H.-M.; WANG, J.-Y.; et al. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 331, p. 318–331, 2002.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacogn Rev.**, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.

LOSSO, J. N. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 48, n. 1, p. 94–118, 2008.

LÜ, J.-M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHE, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010.

LUI, M. C. Y.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados proteicos de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 206–212, 2003.

LULE, V. K.; GARG, S.; POPHALY, S. D.; TOMAR, S. K. Potential health benefits of

Lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide. **J. Food Sci.**, v. 80, n. 3, p. 485–494, 2015.

MA, C.; LIU, W.; KWOKB, K. C.; KWOKB, F. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara)*. **Food Res. Int.**, v. 29, n. 8, p. 799–805, 1997.

MAIA, M. J. L.; ROSSI, E. A.; CARVALHO, M. R. B. DE. Qualidade e rendimento do “leite” de soja da Unidade de Produção de Derivados da soja - UNISOJA - FCF-Ar/UNESP. **Alim. Nutr.**, v. 17, n. 1, p. 65–72, 2006.

MAJUMDER, K.; CHAKRABARTI, S.; DAVIDGE, S. T.; WU, J. Structure and activity study of egg protein ovotransferrin derived peptides (IRW and IQW) on endothelial inflammatory response and oxidative stress. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, n. 9, p. 2120–2129, 2013.

MAJUMDER, K.; MINE, Y.; WU, J. The potential of food protein-derived anti-inflammatory peptides against various chronic inflammatory diseases. **J. Sci. Food Agric.**, v. 96, n. 7, p. 2303–2311, 2016.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, n. 2, p. 231–237, 2010.

MATEOS-APARICIO, I.; MATEOS-PEINADO, C.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. **Carbohydr. Polym.**, v. 82, n. 2, p. 245–250, 2010b.

MATEOS-APARICIO, I.; REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. J.; ZAPATA-REVILLA, M. A. Soybean, a promising health source. **Nutr. Hosp.**, v. 23, n. 4, p. 305–312, 2008.

MATEOS-APARICIO, I.; REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M.-J.; ZAPATA-REVILLA, M.-A. Pea pod , broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 43, n. 9, p. 1467–1470, 2010a.

MATSUDA, N.; HATTORI, Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 101, n. 3, p. 189–198, 2006.

MATSUI, T.; MATSUFUJI, H.; SEKI, E.; et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from Sardine muscle. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 57, n. 6, p. 922–925, 1993.

MATSUO, M. Acceleration of sterol excretion, little meteorism, and less inhibition of iron absorption by Okara Koji, a new foodstuff, in rats. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 60, n. 4, p. 571–574, 1996.

MEDINA, M. B. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 5, p. 1565–1571, 2011.

MEJIA, E. G. DE; DIA, V. P. Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF- κ B pathway in the macrophage. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2388–2398, 2009.

MELLO FILHO, O. L. DE; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A.; REIS, M. S. Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. **Pesq. Agropc. Bras.**, v. 39, n. 5, p. 445–450, 2004.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; et al. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Cienc. Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088–1093, 2011.

MILLÁN-LINARES, M. DEL C.; BERMÚDEZ, B.; YUST, M. DEL M.; MILLÁN, F.; PEDROCHE, J. Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1- derived macrophages. **J. Funct. Foods**, v. 8, n. 1, p. 224–233, 2014.

MOLLER, P.; LOFT, S. Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. **Free Radical Bio. Med.**, v. 41, n. 3, p. 388–415, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

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

MPHAHLELE, R. R.; STANDER, M. A.; FAWOLE, O. A.; OPARA, U. L. Effect of fruit maturity and growing location on the postharvest content of flavonoids, phenolics acids, vitamin C and antioxidant activity of pomegranate juice (cv. Wonderful). **Sci. Hortic.**, v. 179, p. 36–45, 2014.

MUROYAMA, K.; ATSUMI, R.; ANDOH, A. Effect of Pretreatment on Lactic Acid Fermentation of Bean Curd Refuse with Simultaneous Saccharification. **Stud. Surf. Sci. Catal.**, v. 159, p. 133–136, 2006.

MURSU, J.; VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; et al. Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. **Br J Nutr.**, v. 100, n. 4, p. 890–895, 2008.

NAGZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr. A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95–111, 2004.

NAGAI, T.; SUZUKI, N.; TANOUE, Y.; KAI, N.; NAGASHIMA, T. Antioxidant and antihypertensive activities of autolysate and enzymatic hydrolysates from yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) ichyoimo tubers. **J. Food. Agric. Environ.**, v. 5, n. 3-5, p. 64–68, 2007.

NAGATA, C.; TAKATSUKA, N.; KURISU, Y.; SHIMIZU, H. Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy product in Japanese men and women. **J. Nutr.**, v. 128, n. 2, p. 209–213, 1998.

NICHOLAS, C.; BATRA, S.; VARGO, M. A.; et al. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. **J. Immunol.**, v. 179, n. 10, p. 7121–7127, 2007.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved Method for determining food protein degree of hydrolysis. **J. Food Sci.**, v. 66, n. 5, p. 642–646, 2001.

NISHINARI, K.; FANG, Y.; GUO, S.; PHILLIPS, G. O. Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification. **Food hydrocolloids**, v. 39, p. 301–318, 2014.

NOGUCHI, A. Method for the preparation of textured soybean draft. **Food Sci. Technol.**, p. 1987, 1987.

NÜRNBERGER, W.; PLATONOV, A.; STANNIGEL, H.; et al. Definition of a new score for severity of generalized *Escherichia coli* meningitis infection. **Eur. J. Pediatr.**, v. 154, n. 11, p. 896–900, 1995.

O'TOOLE, D. K. Characteristics and use of Okara, the soybean residue from soy milk production - a review. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 2, p. 363–371, 1999.

O'TOOLE, D. K. Soybean - Soymilk, Tofu, and Okara. In: C. Wrigley (Ed.); **Encyclopedia of Grain Science**. v. 2, p.186–195, 2004. Elsevier.

OLIN, K. L.; GOLUB, M. S.; GERSHWIN, M. E.; et al. Extracellular superoxide dismutase activity is affected dietary zinc intake in nonhuman primate and rodent. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 61, n. 1, p. 1263–1267, 1995.

OLIVEIRA, C. M. DE; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 61, n. 2, p. 260–265, 2011.

OSEGUERA-TOLEDO, M. E.; MEJIA, E. G. DE; DIA, V. P.; AMAYA-LLANO, S. L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-

induced macrophages through suppression of NF-kB pathways. **Food Chem.**, v. 127, n. 3, p. 1175–1185, 2011.

ØSTDAL, H.; ANDERSEN, H. J.; DAVIES, M. J. Formation of long-lived radicals in proteins by radical transfer from heme enzymes - a common process? **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 362, n. 1, p. 105–112, 1999.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **J. Agr. Food Chem.**, v. 50, n. 11, p. 3122–3128, 2002.

OVERVELD, F. W. P. C. VAN; HAENEN, G. R. M. M.; RHEMREV, J.; VERMEIDEN, J. P.; BAST, A. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chem. Biol. Interact.**, v. 127, n. 2, p. 151–161, 2000.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein – phenolic interactions and associated changes. **Food Res. Int.**, v. 51, n. 2, p. 954–970, 2013.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 2007.

PAK, V. V.; KOO, M. S.; KASYMOVA, T. D.; KWON, D. Y. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity. **Chem. Nat. Compd.**, v. 41, n. 6, p. 585–588, 2005.

PAPADOPOULOU, A.; FRAZIER, R. A. Characterization of protein -polyphenol interactions. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 15, n. 3-4, p. 186–190, 2004.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **J. Food Sci.**, v. 72, n. 2, p. 21–32, 2007.

PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. **J. Food Sci.**, v. 67, n. 8, p. 2952–2956, 2002.

PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. **Meat Sci.**, v. 64, n. 3, p. 259–263, 2003.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire**, v. 34, n. 3, p. 231–247, 2009.

PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M. C. Thermal aggregation of soy protein isolates. **J. Agr. Food Chem.**, v. 43, n. 12, p. 3035–3041, 1995.

PINTO, D. D. DE J.; CASTRO, P. DE S. Estudo preliminar da secagem do okara (resíduo do extrato aquoso de soja) para inativação dos fatores antinutricionais e conservação. **Braz. J. Food Technol**, p. 125–131, 2008.

PORRINI, M.; RISO, P. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: a critical appraisal. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 18, n. 10, p. 647–650, 2008.

POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino Acids**, v. 44, n. 3, p. 797–820, 2013.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agr. Food Chem.**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

PRYOR, W. A. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. **Free Radical Bio. Med.**, v. 28, n. 1, p. 141–164, 2000.

QIAN, Z.-J.; JUNG, W.-K.; KIM, S.-K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 6, p. 1690–1698, 2008.

QUIST, E. E.; PHILLIPS, R. D.; SAALIA, F. K. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of proteolytic digests of peanut (*Arachis hypogaea* L.) flour. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 42, n. 3, p. 694–699, 2009.

RAEBURN, C. D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K. A.; ARYA, J.; HARKEN, A. H. Cytokines for surgeons. **Am. J. Surg.**, v. 183, n. 3, p. 268–273, 2002.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: a comparative study of five enzymes. **J. Agr. Food Chem.**, v. 56, n. 4, p. 1434–1441, 2008.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clin. Interv. Aging**, v. 2, n. 2, p. 219–236, 2007.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W.-K.; JE, J.-Y.; KIM, S.-K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Res. Int.**, v. 38, n. 2, p. 175–182, 2005.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, n. 9225, p. 233–241, 2000.

REVILLA, E.; MARIA, C. S.; E, M.; et al. Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. **Food Res. Int.**, v. 42, n. 3, p. 387–393, 2009.

RIBEIRO, D.; FREITAS, M.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. Proinflammatory pathways: the modulation by flavonoids. **Med. Res. Rev.**, v. 35, n. 5, p. 877–936, 2015.

RIVAL, S. G.; FORNAROLI, S.; BOERIU, C. G.; WICHERS, H. J. Caseins and casein hydrolysates. 1. lipoxygenase inhibitory properties. **J. Agr. Food Chem.**, v. 49, n. 1, p. 287–294, 2001.

SACKS, F. M.; LICHTENSTEIN, A.; HORN, L. VAN; et al. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health. **Circulation**, v. 113, n. 7, p. 1034–1045, 2006.

SAITO, K.; JIN, D.-H.; OGAWA, T.; et al. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. **J. Agr. Food Chem.**, v. 51, n. 12,

p. 3668–3674, 2003.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. **Food Chem.**, v. 95, n. 2, p. 243–249, 2006.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L. R. Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. **J. Agr. Food Chem.**, v. 53, n. 2, p. 464–468, 2005.

SARADA, S. K. S.; SAIRAM, M.; DIPTI, P.; et al. Role of selenium in reducing hypoxia-induced oxidative stress: an in vivo study. **Biomed. Pharmacother**, v. 56, n. 4, p. 173–178, 2002.

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

SCHÄGGER, H.; JAGOW, G. VON. Tricine-Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987.

SHARONI, Y.; DANILENKO, M.; DUBI, N.; BEN-DOR, A.; LEVY, J. Carotenoids and transcription. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 430, n. 1, p. 89–96, 2004.

SHEIH, I.-C.; WU, T.-K.; FANG, T. J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technol.**, v. 100, n. 13, p. 3419–3425, 2009.

SILVA, M. D. DA; OLIVEIRA, M. G. DE A.; LANNA, A. C. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a Diaphorte Phaseolorum f. sp. Meridionalis, agente causal do cancro-da-haste. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 13, n. 3, p. 316–328, 2001.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V; OLIVEIRA, R. B. DE; LEITE, O. D. S. M.

Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 3, p. 571–576, 2006.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171–179, 2014.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 77, n. 8, p. 383–393, 1963.

STANOJEVIĆ, S. P.; BARAC, M. B.; PEŠIĆ, M. B.; et al. Mineral elements, lipoxygenase activity, and antioxidant capacity of okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk. **J. Agr. Food Chem.**, v. 62, n. 32, p. 9017–9023, 2014.

STANOJEVIC, S. P.; BARAC, M. B.; PESIC, M. B.; JANKOVIC, V. S.; VUCELIC-RADOVIC, B. V. Bioactive proteins and energy value of okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk. **J. Agr. Food Chem.**, v. 61, n. 38, p. 9210–9219, 2013.

SUETSUNA, K.; UKEDA, H.; OCHI, H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. **J. Nutr. Biochem.**, v. 11, n. 3, p. 128–131, 2000.

SUN, Q.; LUO, Y.; SHEN, H.; HU, X. Effects of pH, temperature and enzyme to substrate ration on the antioxidant activity of porcine hemoglobin hydrolysate prepared with pepsin. **J. Food Biochem.**, v. 35, n. 1, p. 44–61, 2011.

TAKAMATSU, K. Soy peptides as functional food material. **Soy in Health and Disease Prevention**. p.235–249, 2006. Taylor& Francis Group.

TAKEITI, C. Y.; SOUZA, A. S.; NETTO, F. M. Influência do tratamento térmico nas propriedades de solubilidade e de emulsificação de isolados proteicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos. **Braz. J. Food Technol**, v. 7, n. 1, p. 87–101, 2004.

TANG, C.-H.; PENG, J.; ZHEN, D.-W.; CHEN, Z. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. **Food Chem.**, v. 115, n. 2, p. 672–678, 2009.

TASHIMA, E. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Perfil sensorial de extrato hidrossolúvel de soja (Glicine Max L. Merrill) comercial adoçado com sacarose e com sucralose. **B. Ceppa**, v. 21, n. 2, p. 409–428, 2003.

THEODORE, A. E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. **J. Agr. Food Chem.**, v. 56, n. 16, p. 7459–7466, 2008.

TORRE, D.; PUGLIESE, A.; SPERANZA, F. Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, n. 5, p. 273–280, 2002.

TORRES-PENARANDA, A. V.; REITMEIER, C. A. Sensory descriptive analysis of soymilk. **J. Food Sci.**, v. 66, n. 2, p. 352–356, 2001.

UDENIGWE, C. C.; LU, Y.-L.; HAN, C.-H.; HOU, W.-C.; ALUKO, R. E. Flaxseed protein-derived peptide fractions: antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. **Food Chem.**, v. 116, n. 1, p. 277–284, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAUGHN, N.; RIZZO, A.; DOANE, D.; BEVERLY, J. L.; MEJIA, E. G. DE. Intracerebroventricular administration of soy protein hydrolysates reduces body weight without affecting food intake in rats. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 63, n. 1, p. 41–46, 2008.

VERNAZA, M. G.; DIA, V. P.; MEJIA, E. G. DE; CHANG, Y. K. Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours.

Food Chem., v. 134, n. 4, p. 2217–2225, 2012.

VONG, W. C.; LIU, S.-Q. Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 52, p. 139–147, 2016.

WANG, W.; GUO, J.; ZHANG, J.; et al. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. **Food Chem.**, v. 171, p. 40–49, 2015.

WENG, C.-J.; YEN, G.-C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. **Cancer Treat. Rev.**, v. 38, n. 1, p. 76–87, 2012.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Resp. Physiol.**, v. 128, n. 3, p. 379–391, 2001.

WOLF, W. J. Soybean Proteins: their functional, chemical, and physical properties. **J. Agr. Food Chem.**, v. 18, n. 6, p. 969–976, 1970.

WU, H.-C.; CHEN, H.-M.; SHIAU, C.-Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Res. Int.**, v. 36, n. 9-10, p. 949–957, 2003.

WU, J.-G.; GE, J.; ZHANG, Y.-P.; YU, Y.; ZHANG, X.-Y. Solubility of genistein in water, methanol, ethanol, propan-2-ol, 1-butanol, and ethyl acetate from (280 to 333) K. **J. Chem. Eng. Data**, v. 55, n. 11, p. 5286–5288, 2010.

XU, L.; XING, J.; WEI, S.; ZHANG, Y.; LONG, R. Artificial neural network prediction of retained austenite content and impact toughness of high-vanadium high-speed steel (HVHSS). **Mater. Sci. Eng. A**, v. 433, n. 1-2, p. 251–256, 2006.

YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z.; JIANG, Y. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. **Food Chem.**, v. 124, n. 2, p. 551–555, 2011.

YANG, G.-D.; HUANG, Y.-R.; NAN, G.-J.; et al. Solubility of daidzein in the binary system of ethanol and water. **J. Mol. L.**, v. 180, p. 160–163, 2013.

YESILOVA, Z.; YAMAN, H.; OKENLI, C.; OZCAN, A. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 100, n. 4, p. 850–855, 2005.

YOKOMIZO, A.; AKENAKA, Y.; TAKENAKA, T. Antioxidative activity of peptides prepared from okara protein. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 8, n. 4, p. 357–359, 2002.

YOSHIKAWA, M.; TAKAHASHI, M.; YANG, S. Delta opioid peptides derived from plant proteins. **Curr. Pharm. Des.**, v. 9, n. 16, p. 1325–1330, 2003.

ZHAN, S.; HO, S. C. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, n. 2, p. 397–408, 2005.

ZHANG, G.-Y.; HAYASHI, Y.; MATSUMOTO, S.; MATSUMURA, Y.; MORI, T. Molecular species of glycinin in some soybean cultivars. **Phytochemistry**, v. 60, n. 7, p. 675–681, 2002.

ZHOU, D.-Y.; ZHU, B.-W.; QIAO, L.; et al. Food and bioproducts processing in vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ito) viscera. **Food Bioprod. Proces.**, v. 90, n. 2, p. 148–154, 2012.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Proc. Biochem.**, v. 41, n. 6, p. 1296–1302, 2006.

ZIMMER, A. R.; LEONARDI, B.; MIRON, D.; et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. **J. Ethnopharmacol.**, v. 139, n. 1, p. 228–233, 2012.