



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

FERNANDA GUILHERME DO PRADO

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DO
GÊNERO *RHIZOPUS SP.* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

**GURUPI - TO
2018**



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

FERNANDA GUILHERME DO PRADO

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DO
GÊNERO *RHIZOPUS SP.* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof^o. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Co-orientador: Prof^a. Dr. Maria Giovana Binder Pagnoncelli.

GURUPI - TO
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

P896a PRADO, FERNANDA GUILHERME.

Avaliação de compostos bioativos produzidos por fungos do gênero *Rhizopus* sp. Por fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos agroindustriais. / FERNANDA GUILHERME PRADO. – Gurupi, TO, 2018.

131 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2018.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol

Coorientador: Maria Giovana Binder Pagnoncelli

1. Soja. 2. Propriedades Bioativas. 3. Compostos Fenólicos. 4. Processos Fermentativos. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



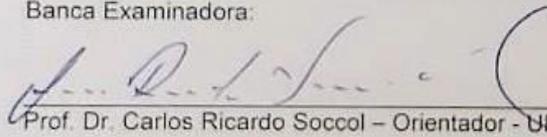
FERNANDA GUILHERME DO PRADO

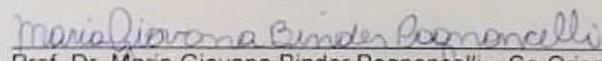
Avaliação de compostos bioativos produzidos por fungos do gênero *Rhizopus* SP. por fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos agroindustriais

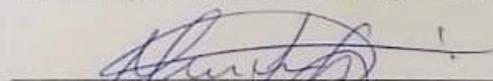
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em 31/08/2018 foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

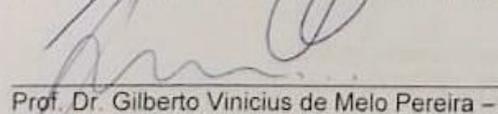
Data da aprovação: 31/08/2018.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol – Orientador - UFPR


Prof. Dr. Maria Giovana Binder Pagnoncelli – Co-Orientadora- UTFPR


Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza – Examinador - UFPR


Prof. Dr. Gilberto Vinicius de Melo Pereira – Examinador - UFPR

Gurupi (TO).
2018.

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO

Sobretudo, a Deus. Primeiramente por ter me dado a privilégio da vida. Por me permitir chegar até aqui. Agradeço assim por todos os obstáculos colocados no caminho, foram eles que me fizeram mais forte e persistente e me tornaram o que sou hoje. Agradeço a Deus por me abençoar todos os dias durante toda essa caminhada. E por dar a nós, simples humanos, uma minúscula parte da sua infinita sabedoria.

A minha família. Aos meus pais, Irineu e Cleusa, devo muito mais do que agradecimentos, devo parte desta conquista a vocês. Obrigada por todo amor incondicional, apoio, incentivo e paciência. Por acreditarem em mim. Aos meus irmão, Giovani e Victória, por não permitirem que a falta de convívio nos fizessem distantes. Vocês são a minha base.

Ao Prof^o. Dr. Carlos Ricardo Soccol pela orientação e confiança para a realização desse trabalho. Pelo interesse em tornar este trabalho o melhor possível e por todos os ensinamentos.

À Prof^a. Dr. Maria Giovana Binder Pagnoncelli, pela co-orientação, pelo constante diálogo, incentivo e apoio e confiança nos momentos difíceis em que alguns resultados não vieram.

Ao Prof^o. Dr. Marcos Lucio Corazza, pela parceria de trabalho. Pela torcida e apoio, e pelos conhecimentos passados.

A Pós doutoranda Valcineide Tanobe e técnica Mityo Miyaoka, pela amizade, diálogo, incentivo e ensinamentos.

À minha amiga, Fabricia Lorrane, companheira de lar. Por esse vínculo que criamos nesse período. Obrigada pelo ombro amigo nos momentos de desespero e vontade de chorar, de ambas. Pelas risadas, saídas, pelas conversas, pelos conselhos e torcida para que tudo dê certo.

Aos amigos de laboratorio, pelos momentos agradáveis, pela companhia, pelas risadas, pelas conversas, pelas ajudas e dicas, pelos momentos de descontração.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio e colaboração em diversos aspectos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, pela oportunidade.

A CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho!

RESUMO

A soja e seus produtos são ricos em isoflavonóides, estes possuem a concentração aumentada após a fermentação microbiana, devido à liberação de fenólicos, através da conversão das formas glicosídicas em agliconas. O processo fermentativo em estado sólido por fungos filamentosos tem sido amplamente empregado como uma estratégia biotecnológica na busca de agregar valores aos produtos e subprodutos agroindustriais, principalmente elevando os teores de compostos bioativos. No presente estudo, foram avaliados o aumento dessas propriedades, como antioxidante e anti-inflamatória em diferentes substratos utilizando linhagens fúngicas do gênero *Rhizopus sp.* As 17 linhagens testadas foram capazes de elevar o potencial antioxidante dos grãos de soja. A fermentação de soja e arroz utilizando o *R. oligosporus* NRRL 2710 resultou em um incremento de 26,5 vezes o potencial antioxidante e 9,33 vezes o teor de compostos fenólicos nos extratos etanólicos, em 72 horas de processo. Além disso, mostraram resposta positiva para a atividade anti-inflamatória, apresentando capacidade de inibição máxima de 70,75% e concentração inibitória de 4,2 mg mL. Os produtos fermentados pelo *R. oligosporus* NRRL 2710 foram submetidos a diferentes processos de extração: Soxhlet com diferentes solventes e supercrítica de CO₂ + etanol (scCO₂ + EtOH), o que permitiu verificar a relação entre a polaridade e o rendimento de extração. As extrações de Soxhlet foram realizadas usando amostras fermentadas secas e úmidas, os maiores valores de rendimento obtidos foram 42,09% e 32,84%, respectivamente. Este tipo de extração permitiu obter valores de atividade antioxidante na concentração inibitória (IC₅₀) de 0,55 e 0,67 g g⁻¹ e compostos fenólicos de 1,30 e 1,05 mg EAG g⁻¹. Diferentes condições foram testadas no processo de extração com fluido comprimido (scCO₂ + EtOH), para estudar a influência da pressão e temperatura no rendimento da extração. Os resultados mostraram que ambas as variáveis influenciam o rendimento do processo. Os extratos deste processo apresentaram um valor de IC₅₀ de 0,17 g g⁻¹, inibindo 94,05% do radical DPPH. Quanto aos compostos fenólicos, estes extratos apresentaram 1,39 mg EAG g⁻¹.

Palavras-chave: soja; propriedades bioativas; compostos fenólicos; processo fermentativo; extração Soxhlet; extração com fluido supercrítico.

ABSTRACT

The soybean and its products are rich in isoflavonoids, these have the increased concentration after the microbial fermentation, due to the release of phenolics, through the conversion of the glycosidic forms into aglycones. The solid state fermentative process by filamentous fungi has been widely used as a biotechnological strategy in the search of aggregating values to agroindustrial products and byproducts, mainly raising the levels of bioactive compounds. In the present study, the increase of these antioxidant and anti-inflammatory properties in different substrates using fungal strains of the genus *Rhizopus sp.* The 17 lines tested were able to raise the antioxidant potential of the soybean grains. The fermentation of soybean and rice using *R. oligosporus* NRRL 2710 resulted in an increase of 26.5 times the antioxidant potential and 9.33 times the content of phenolic compounds in the ethanolic extracts, in 72 hours of process. In addition, they showed a positive response to anti-inflammatory activity, with a maximum inhibitory capacity of 70.75% and an inhibitory concentration of 4.2 mg mL. The products fermented by *R. oligosporus* NRRL 2710 were submitted to different extraction processes: Soxhlet with different solvents and supercritical CO₂ + ethanol (scCO₂ + EtOH), which allowed to verify the relationship between polarity and extraction yield. Soxhlet extractions were performed using dry and wet fermented samples, the highest values of yield obtained were 42.09% and 32.84%, respectively. This type of extraction allowed to obtain values of antioxidant activity at the inhibitory concentration (IC₅₀) of 0.55 and 0.67 g g⁻¹ and phenolic compounds of 1.30 and 1.05 mg GAE g⁻¹. Different conditions were tested in the compressed fluid extraction process (scCO₂ + EtOH) to study the influence of pressure and temperature on extraction yield. The results showed that both variables influence the yield of the process. The extracts from this procedure had an IC₅₀ value of 0.17 g g⁻¹, inhibiting 94.05% of the DPPH radical. As for phenolic compounds, these extracts presented 1.39 mg GAE g⁻¹.

Keywords: soybean; bioactive properties; phenolic compounds; fermentative process; Soxhlet extraction; extraction with supercritical fluid.

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E TEOR DE FENÓIS TOTAIS DE DIFERENTES LINHAGENS DE *RHIZOPUS SP.*

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Atualmente, o Brasil ocupa o posto de segundo maior produtor mundial dessa cultura apresentando na última safra uma produtividade de 3.362 kg/ha, atrás apenas do Estados Unidos que apresentou produtividade de 3.501 kg/ha (EMBRAPA, 2018).

A cultura agrícola desta leguminosa é bastante atrativa no contexto globalizado, uma vez que seus grãos são muito usados pela agroindústria, produção de óleo vegetal e produtos para alimentação humana e animal, indústria química e vem crescendo como uso de fonte alternativa para produção de biocombustível (FREITAS, 2011).

Outra característica considerável é que a soja contém uma variedade de compostos que apresentam atividade biológica comprovada e uma grande quantidade de proteínas, consideradas fontes de peptídeos bioativos. Estudos têm mostrado que a biotransformação da soja, realizada por microrganismos e enzimas, resultam num aumento da atividade antioxidante e na prevenção ou supressão de certos cânceres (FORTES, 2011).

Os antioxidantes consistem em substâncias naturais ou sintéticas que presentes capazes de prevenir ou retardar a deterioração causada pela exposição ao oxigênio, evitando a propagação das reações de oxidação em cadeia (NAMIKI, 1990; SIMIC & JAVANINIC, 1994). Tais substâncias podem ser encontradas no organismo humano e em alimentos (COTINGUIBA, 2013).

Sendo assim, a utilização de antioxidantes atua na prevenção ou redução do desenvolvimento de doenças. Entre os antioxidantes mais pesquisados estão os flavonóides, antioxidantes polifenólicos que podem ser encontrados em verduras, frutas, grãos, sementes e ervas (COSTA et al., 2000). Estes antioxidantes são caracterizados por agirem como anti-inflamatórios, antimicrobianos e apresentarem outras atividades biológicas, tornando produtos que os contém em alimentos funcionais ou nutracêuticos.

O processo inflamatório baseia-se em uma série de eventos relacionados a lesão de tecidos ou infecção. O estudo de substâncias ou moléculas que possuam atividade anti-inflamatória pode ser avaliado pela capacidade de inibir a enzima hialuronidase. Tal enzima possui capacidade de hidrolisar o ácido hialurônico, um polímero viscoso, que geralmente localiza-se no interstício celular relacionado com os processos inflamatórios (BORNSTEIN & SAGE, 2002).

A soja se caracteriza por conter micronutrientes, como as isoflavonas (PILSAKOVA, 2010). Estes compostos têm atraído atenção devido ao fato de possuir capacidade de reduzir os riscos de doenças cardiovasculares e promover a inibição do crescimento de células cancerígenas (VILLARES et al., 2011).

Os efeitos destas isoflavonas são influenciados diretamente pela sua estrutura química (FRITSCHÉ & STEINHART, 1999; VILLARES et al., 2011), a qual é representada por dois anéis fenólicos ligados a um anel heterocíclico, possuindo estrutura e atividade similar ao estrogênio (AGUIAR et al., 2007).

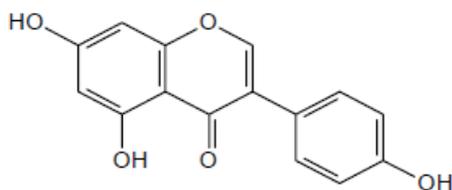


Figura 3. Estrutura química da isoflavona

Fonte: Aguiar et al., (2002).

O grão de soja apresenta três principais isoflavonas que encontradas em quatro diferentes formas, glicosiladas, acetilglicosiladas, malonilglicosiladas e agliconas. De acordo com Eldridge (1982) e Fukutake et al., (1996) as formas glicosiladas são as principais formas, encontradas numa proporção de 50 a 90% das isoflavonas. Porém, estudos indicam que a forma aglicona, embora apresenta menor quantidade na soja, são as que possuem maior atividade biológica (ELDRIDGE, 1982).

Tais isoflavonoídes atuam tanto como agonistas quanto antagonistas do estrógeno, ou mesmo como moduladores dos receptores seletivos de estrógeno (EUGENBIO, 2001; FERRARI & DEMIATE, 2001; BARNES et. al., 2002).

Um grande número de microrganismo, particularmente os fungos, são intensamente estudados por apresentarem capacidade de produzirem grande

quantidade destes compostos durante o seu crescimento sob diferentes substratos, até mesmo em materiais sólidos naturais provindos da agroindústria (JABASINGH, 2010).

No Brasil, grande quantidade de resíduos provenientes de atividades agroindustriais é gerada diariamente. Partes são aproveitadas como ração animal, entretanto, a grande maioria é descartada sem tratamento, resultando na deterioração do meio ambiente e na perda de materiais potencialmente valiosos (MELO et al., 2011).

Por estas razões, aliada ao baixo custo de tais matérias-primas surge o crescente interesse da utilização destes resíduos como substratos em processos biotecnológicos, onde o uso destes resíduos agroindustriais como substrato para cultivo representa um valor adicional para a indústria, indo de encontro com a consciência crescente da conservação ambiental (LOPEZ, 2011).

Nesse contexto o presente capítulo propõe o estudo de substâncias bioativas com ação antioxidante de linhagens de *Rhizopus* sp. provenientes da fermentação utilizando diferentes substratos agroindustriais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi a produção de compostos bioativos com ação antioxidante por processo fermentativo utilizando diferentes linhagens de fungos do gênero *Rhizopus* sp. em diferentes substratos, bem como avaliar o potencial desses fermentados como fonte de matérias primas na indústria farmacêutica e alimentícia.

2.1 Objetivos específicos

- Selecionar linhagens de fungos do gênero *Rhizopus* sp. com potencial para a produção de antioxidantes, mais especificamente as substâncias polifenólicas;
- Produzir aumento de substâncias com ação antioxidante por fermentação a partir de linhagens do gênero *Rhizopus* sp. previamente selecionadas;
- Quantificar a evolução da atividade antioxidante em diferentes tempos de fermentação;

- Avaliar a concentração de compostos fenólicos totais produzidos por fermentação pelas linhagens selecionadas como melhores produtoras de ação antioxidante.
- Avaliar o potencial de anti-inflamatório aumentado após processo fermentativo pela linhagem *Rhizopus sp.* selecionada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microorganismos

Foram utilizadas dezessete cepas de fungos do gênero *Rhizopus spp.*, cujas linhagens foram obtidas de coleções de cultura dos bancos de cepas NRRL (Northern Regional Research Laboratory), U.S. Department of Agriculture, Illinois - USA, e MUCL (Mycothèque de Université Catholique de Louvain), Bélgica e são pertencentes à micoteca do Laboratório do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. A conservação destas cepas foi realizada em tubos inclinados contendo meio sólido de ágar batata dextrose (PDA). As culturas repicadas foram crescidas a 30°C por 5 dias, e após, conservadas a 4°C com repiques contínuos a cada três meses.

3.2 Preparo do inóculo

Os microorganismos foram inoculados em erlenmeyers contendo meio de cultura ágar batata dextrose (PDA) e mantidos em estufa bacteriológica a 30 °C por 5 dias. Após crescimento do micélio e formação dos esporos, adicionou-se água deionizada esterilizada e tween 80 a 0,1% aos erlenmeyers. A superfície do meio foi raspada assepticamente com o auxílio de uma alça de platina. Após a raspagem dos esporos, a suspensão foi transferida para frascos estéreis e realizou-se as contagens em câmara de Neubauer em microscópio óptico (Marca Olympus, modelo CX41RF).

Para a realização da contagem, transferiu-se para a superfície da câmara cerca de 1 mL da solução de esporos, preenchendo o espaço entre a lâmina e a câmara de Neubauer. Foram contadas as células presentes em 13 quadrantes. O volume de cada campo de contagem da câmara é de 10⁻⁴ mL.

3.3 Substratos utilizados e tratamentos

Todos os substratos utilizados neste trabalho foram adquiridos no Mercado Municipal de Curitiba, Paraná. Para os ensaios em que se utilizou uma combinação dos mesmos, adotou-se a proporção 1:1 (m/m). Foram realizadas nesse trabalho fermentações utilizando soja, arroz integral, aveia, trigo e milho. Os grãos de soja foram pré-embebidos em água deionizada para uma prévia hidratação e após 12 horas os mesmos foram descascados. Para os demais grãos, realizou-se um pré-cozimento em água fervente por 5 minutos. Após, foram tratados termicamente sob vapor fluído a 100°C por 15 minutos. O excesso de água foi posteriormente removido e os substratos arrefeceram a temperatura de inoculação de 30°C.

3.4 Seleção de Linhagens de *Rhizopus* spp.

Os substratos tratados termicamente foram inoculados com 10^7 esporos g^{-1} de substrato seco. Inicialmente, utilizou-se os grãos de soja para fermentações no estado sólido com as 17 cepas de fungos *Rhizopus* spp. As fermentações foram conduzidas em bandejas perfuradas a 30°C por 72h. Para verificar a biossíntese de compostos com atividade antioxidante, foi determinada a atividade antioxidante pela medição de eliminação de radicais livres (DPPH). As melhores cepas produtoras de atividade antioxidante foram selecionadas para os ensaios posteriores, com combinação de substrato.

3.5 Fermentação em estado sólido (FES)

Os ensaios foram conduzidos em biorreator do tipo bandeja dentro de um dessecador, a fim de se garantir a umidade relativa do ar no ambiente de fermentação. Utilizou-se bandejas perfuradas, mantendo assim a aeração no fundo dos recipientes. As peneiras foram cobertas na parte inferior e superior com papel alumínio perfurado e esterilizado, o que garantia a retenção da solução de esporos e a umidade requerida para crescimento do fungo. Ao fundo do dessecador, foram adicionados 800 mL de água deionizada, que garantia a saturação do ar com umidade.

Os grãos de soja foram pré-embebidos em água deionizada e deixados por 12 horas para serem descascados posteriormente. Quando necessidade de substratos combinados, os grãos de arroz foram pré-cozidos em água fervente por 5 minutos. Os

substratos foram tratados termicamente sob vapor fluído a 100°C por 15 minutos. O excesso de água foi removido.

Após arrefecimento dos substratos, os mesmos foram inoculados com 10^7 esporos g^{-1} de substrato seco. O dessecador foi fechado apenas com papel alumínio perfurado e mantido em estufa bacteriológica (Marca Fanem, modelo Orion 502) a 30°C por 72 horas de fermentação. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

2.7 Extração sólido-líquido

As extrações foram realizadas com base na metodologia descrita por TYUG et al., (2010), com modificações. As amostras foram extraídas seguindo a proporção 1:25 (m/v). Inicialmente pesou-se três (03) gramas de amostra fermentada as quais foram adicionadas em 75 mL álcool 70%. A mistura foi submetida a trituração em liquidificador por 3 minutos, transferida para erlenmeyers de 125 mL e deixadas em agitador do tipo shaker a 120 rpm por 60 minutos e temperatura de 30°C. Os extratos foram centrifugados a 2268xg por 15 minutos, transferidos para frascos estéreis e armazenados à 4°C para posterior análises. Todas as extrações foram feitas em triplicata.

2.8 Métodos analíticos

Abaixo estão descritas as metodologias usadas na determinação de compostos e atividades bioativas resultantes das fermentações. Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.9 Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro*

2.9.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método da inibição do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH)

A capacidade dos extratos fermentados de inibir o radical DPPH foi determinada de acordo com Yu et al., (2016) e Lee et al., (2015). Para a preparação do reagente foram dissolvidos 0,004 g de DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em 100 mL de metanol P. A. Foi utilizado o padrão ácido ascórbico (vitamina C) como controle positivo para este ensaio. Uma solução padrão de ácido ascórbico e diluída nas concentrações de 8 a 40 mg/mL. Para determinar o potencial de inibição, foram utilizados 250 μ l de cada concentração, adicionados a 1000 μ l do reagente de DPPH e incubados na ausência de luz durante 30 minutos à temperatura ambiente. A

absorbância foi medida utilizando-se espectrofotômetro (Marca Wavelength, modelo SP-2000) à 517 nm. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras fermentadas. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Para o controle, foi utilizado a solução sem amostra, apenas com o solvente utilizado na extração (água, etanol, metanol). A porcentagem de eliminação de radicais DPPH foi calculada de acordo com a seguinte equação (BRAND-WILLIANS et al., 1995; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998):

$$\text{Inibição do radical DPPH (\%)} = \left(\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) * 100$$

Onde:

A_{controle} : absorbância do radical DPPH diluído com solvente da amostra (água, etanol ou metanol).

A_{amostra} : absorbância do radical DPPH com o extrato do fermentado.

Os resultados são expressos em concentração de inibição (IC₅₀), ou seja, a quantidade mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH. O índice IC₅₀ é calculado através da equação da reta gerada pelo gráfico, plotado em função das porcentagens encontradas pelas concentrações das diluições.

2.10 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais pelo Método de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos dos extratos fermentados foram determinados seguindo metodologia descrita por Miliauskas et al., (2004), com algumas modificações. Baseia-se em um método espectrofotométrico e colorimétrico em que o reativo Folin-Ciocalteu (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) apresenta mudança de cor de amarelo para azul na presença de compostos fenólicos.

Uma solução padrão de ácido gálico foi preparada para construção da curva de calibração a partir de concentrações que variam de 10 a 100 µg/mL, 0,1 mL de cada diluição foram adicionados a 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%) e mantido em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Em seguida, foram adicionados 0,4 mL de carbonato de potássio (7,5%) e novamente mantido em

repouso por 1 hora em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Marca Wavelength, modelo SP-2000) à 760 nm.

O teor de fenóis foi expresso como equivalente de ácido gálico (GAE) em mg de ácido gálico por 100 g de extrato, obtidos a partir da aplicação da equação da reta gerada pelo gráfico, plotado em função das absorbâncias encontradas pelas concentrações das diluições.

O mesmo procedimento foi realizado com as amostras dos extratos fermentados. Para o branco, foi utilizado a solução sem amostra ou padrão, apenas com água destilada. Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.11 Avaliação da atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase

Para avaliação da atividade anti-inflamatória a partir da inibição da enzima hialuronidase foi utilizado o método *in vitro* de acordo com Reissing (1955), Aronson e Davidson (1967) e Kuppusamy *et al.* (1990).

Foram utilizadas amostras de extrato alcoólico provenientes do processo fermentativo da combinação de substratos e linhagem que apresentaram melhor resultado na avaliação da ação antioxidante pelo método de inibição do radical DPPH. Foram avaliados a atividade anti-inflamatória do tempo 0 e 72 horas de processo nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300 µg/mL.

Para a análise das amostras, foram adicionados 50 µL de cada amostra com diferentes concentrações previamente definidas e 0,5 ml da solução de ácido hialurônico (Sigma-Aldrich) (1,2 mg de ácido hialurônico por mL de solução tampão acetato 0,1 M, pH 3,6, contendo NaCl 0,15 M) nos tubos de reação e controle. Os tubos foram incubados a 37°C por 5 minutos, em seguida foi adicionado 50 µL de enzima hialuronidase (350 unidades da enzima hialuronidase tipo IV - S a partir de testículos de bovino, Sigma-Aldrich®) dissolvida no mesmo tampão de substrato (concentração de 6,5 mg/mL) e incubadas a 37 ° C por 40 min. A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de uma solução de hidróxido de sódio 4M, imediatamente colocou-se 0,1 mL de solução 0,8 M de tetraborato de potássio e incubou-se em banho fervente durante 3 minutos. Após o tempo de incubação adicionou-se 3 mL de p - dimetilaminobenzaldeído (DMAB) (solução a 10 % em ácido

acético glacial contendo 12,5% de ácido clorídrico 10N) e novamente incubado a 37° C durante 20 minutos. Em seguida, as amostras foram medidas em espectrofotômetro (SP-2000 UV Spectrum) em 585 nm. Utilizou-se um controle positivo de dimetilsulfóxido (DMSO) devido à sua capacidade de inibir completamente a enzima hialuronidase. Embora não seja utilizado como agente anti-inflamatório, pode simular uma substância anti-inflamatória eficaz. Também foi utilizado um agente anti-inflamatório natural como controle positivo, extrato comercial de própolis, na mesma concentração dos extratos testados (REISSING et al., 1955; AROSSOS E DAVIDSON, 1967; KUPPUSAMY et al., 1990).

2.12 Análise estatística

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de microrganismos

O consumo de soja fermentada é uma cultura largamente difundida na Ásia, em países como Japão e China. Atualmente, esse consumo tem sido verificado em países do Ocidente, devido à presença de compostos de alto valor nutricional no grão (MEJIA & LUMEN, 2006). Dentre vários alimentos provenientes da fermentação dos grãos de soja, destaca-se o *tempeh*, produzido pela inoculação dos grãos sem casca, com esporos de culturas puras do fungo *Rhizopus sp.* (NOUT & KIERS, 2004).

De acordo com a Resolução RDC nº. 2, de 07 de janeiro de 2002, definem-se compostos bioativos nutrientes e substâncias não-nutrientes, que possuem ação metabólica ou fisiológica específica (BRASIL, 2002). Particular importância tem sido atribuída aqueles que apresentam ação antioxidante, como vitaminas e compostos fenólicos, por apresentarem efeitos na proteção contra o estresse oxidativo de células (DAI & MUMPER, 2010; MALTA et al., 2012; NIKI, 2010).

Uma triagem preliminar com 17 cepas de *Rhizopus sp.*, através de fermentações no estado sólido (FES) utilizando como substrato o grão de soja foi realizada com o objetivo de selecionar as linhagens com melhor potencial antioxidante, com base na

potencial de eliminação do radical DPPH após 72 horas de fermentação. As substâncias antioxidantes presentes nos extratos reagem com o radical estável DPPH e convertendo-o em 2,2-difenil-1-picrilhidrazina. O grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato, de forma que o extrato que exibe alto potencial em seqüestrar radicais livres possui baixo valor de IC₅₀, indicando assim que é necessário pequena quantidade de extrato para inibir a oxidação do radical em 50%. Portanto, quanto menor for o valor de IC₅₀, mais eficiente é o antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Na figura 4 estão apresentados os resultados obtidos em IC₅₀ (mg/mL), o qual é possível observar que todas as linhagens testadas apresentaram potencial antioxidante após processo fermentativo, quando se comparado com o valor encontrado nos grãos de soja *in natura*.

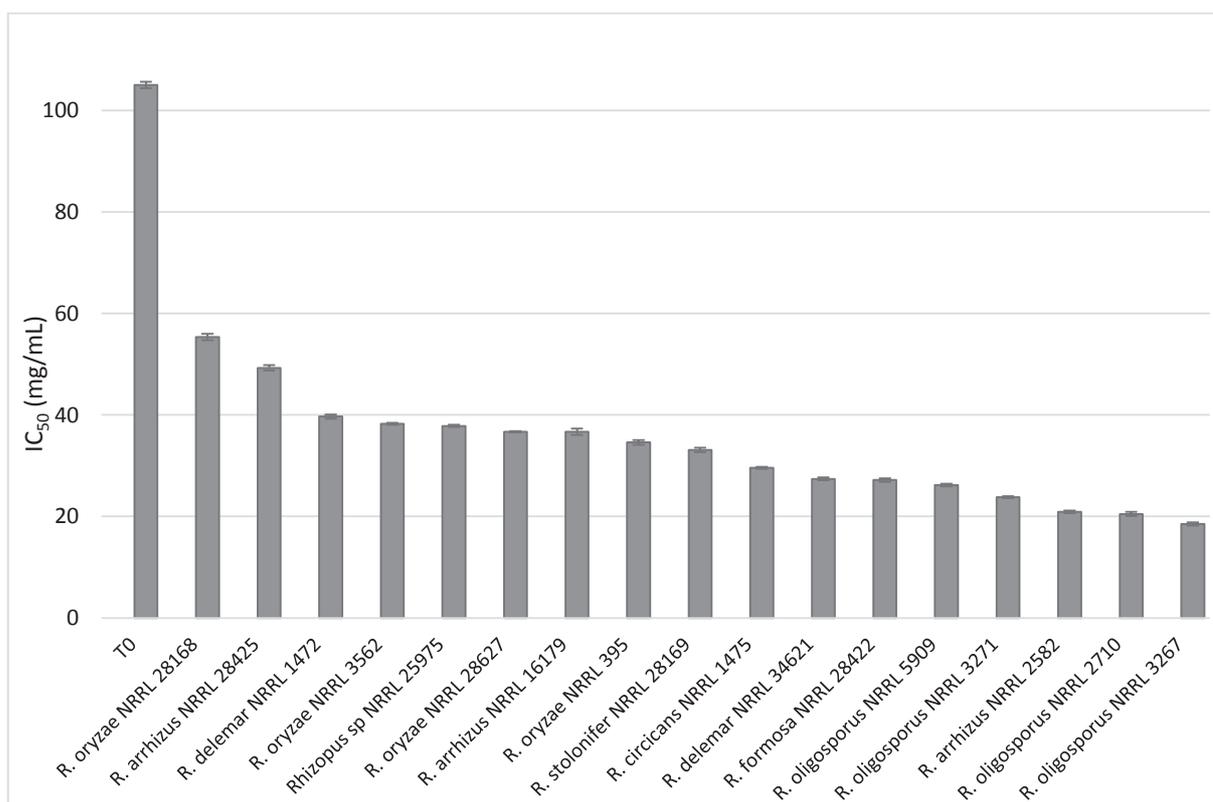


Figura 4. Atividade antioxidante de diferentes cepas conduzidas por FES para seleção de linhagens de *Rhizopus sp.*

T₀ – Soja *in natura*. IC₅₀ FES: resultados obtidos por extração alcoólica.

Após 72 horas de processo fermentativo, os valores de concentração inibitória dos extratos etanólicos apresentaram uma variação entre 55,35 mg/mL e 18,53

mg/mL. Tais valores revelaram que uma quantidade significativamente menor do produto fermentado é necessário para inibir 50% dos radicais livres, comparados com o valor de soja in natura para a mesma função, que apresentou 105,1 mg/mL de concentração inibitória.

Três linhagens apresentaram melhores resultados, que de acordo com dados estatísticos não diferem significativamente ($p>0,05$), sendo *R. arrhizus* NRRL 2582, *R. oligosporus* NRRL 2710 e *R. oligosporus* NRRL 3267, que foram selecionadas para os ensaios seguintes. A tabela 8 revela o potencial de inibição do radical livre DPPH alcançado pelos extratos etanólicos do material fermentado por 72 horas pelas cepas selecionadas e comparado com o material *in natura*, na concentração de 40 mg/mL

Tabela 8. Potencial de inibição do radical livre DPPH de extratos etanólicos provenientes de processo fermentativo de diferentes linhagens do gênero *Rhizopus spp.*

Cepa	Inibição do radical DPPH (%)
T ₀	22,2±0,48 ^b
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	81,2±0,77 ^a
<i>R. oligosporus</i> NRRL 2710	85,7±0,44 ^a
<i>R. oligosporus</i> NRRL 3267	88,1±0,22 ^a

T₀ – Soja *in natura*.

A tabela 8 revela o potencial de inibição do radical livre DPPH alcançado pelos extratos na maior concentração utilizada, 40 mg/mL. Os grãos de soja in natura apresentaram potencial de inibição de 22,2%, o processo fermentativo dos grãos pelas linhagens, permitiu o aumento da inibição do radical em 81,2%, 85,7% e 88,1% por *R. arrhizus* NRRL 2582, *R. oligosporus* NRRL 2710 e *R. oligosporus* NRRL 3267, respectivamente.

Os grãos de soja in natura apresentaram potencial de inibição de 22,2%, o processo fermentativo dos grãos pelas linhagens, permitiu o aumento da inibição do radical em 81,2%, 85,7% e 88,1% por *R. arrhizus* NRRL 2582, *R. oligosporus* NRRL 2710 e *R. oligosporus* NRRL 3267, respectivamente.

O processo fermentativo em estado sólido dos grãos de soja por fungos do gênero *Rhizopus spp.* possibilitou um incremento de até 5,66 vezes na ação antioxidante e 3,96 vezes no potencial de inibição do radical.

3.2 Avaliação da ação antioxidante em fermentação com combinação de substratos.

A partir das linhagens selecionadas descritas no item 3.1 e com o objetivo de avaliar a ação antioxidante após o processo fermentativo utilizando substratos de menor valor comercial, foram realizados estudos de combinação de substratos na proporção de 1:1 dos grãos de soja com arroz integral, aveia, milho e trigo.

Conforme mostrado na tabela 9, os extratos etanólicos obtidos após a fermentação de 72 horas da combinação dos grãos de soja com arroz integral mostrou-se a mais eficiente dentre os cereais utilizados, uma vez que os valores de IC₅₀ alcançados foram semelhantes aos obtidos utilizando-se apenas grãos de soja.

Tabela 9. Valores de IC₅₀ (mg/mL) de extratos etanólicos provenientes de processo fermentativo de 72 horas com combinações de substratos a partir de diferentes linhagens de *Rhizopus sp.*

	T ₀ (Tempo inicial)	<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	<i>R. oligosporus</i> NRRL 2710	<i>R. oligosporus</i> NRRL 3267
SOJA	105,01±0,62 ^e	20,90±0,31 ^a	20,49±0,27 ^a	18,53±0,38 ^a
SOJA + ARROZ	374,5±0,62 ^g	19,2±0,31 ^a	15,6±0,13 ^a	33,7±0,51 ^b
SOJA + AVEIA	180,8±0,39 ^f	63,3±0,16 ^{cd}	69,5±0,84 ^{cd}	131,9±1,15 ^e
SOJA + MILHO	346,2±0,32 ^g	45,7±0,50 ^c	23,3±0,50 ^a	32,93±0,59 ^b
SOJA + TRIGO	166,0±0,97 ^f	52,2±0,50 ^b	54,0±0,93 ^{bc}	76,6±0,31 ^d

T₀ – Combinação de substratos *in natura*.

Analisando a ação antioxidante dos extratos etanólicos dos grãos *in natura*, é possível afirmar que para todos os cereais utilizados o processo fermentativo pelas linhagens resultou no aumento da ação antioxidante.

No entanto, os valores de concentração inibitória (IC₅₀) mais promissores foram de 19,2 mg/mL e 15,6 mg/mL, provenientes da fermentação de grãos de soja e arroz integral pelas linhagens *R. arrhizus* NRRL 2582 e *R. oligosporus* NRRL 2710, respectivamente. O mesmo não é observado pela fermentação dos grãos pela linhagem *R. oligosporus* NRRL 3267. Os dados estatísticos revelam diferença significativa entre linhagens citadas ($p > 0,05$).

A maior capacidade antioxidante apresentada pela combinação com o arroz integral em relação aos demais cereais pode ser explicada devido à maior disponibilidade de nitrogênio prontamente assimilável presente no meio de cultura mediante. Segundo Silva (2004), muitos microrganismos desenvolvem-se em meios

simples, com disponibilidade de carbono, nitrogênio e fósforo e sais minerais necessários.

De acordo com Rossi et al. (2001), farelo de arroz e soja são fontes de nutrientes utilizados na suplementação do meio, uma vez que estimulam o crescimento micelial. Além disso, outros pesquisadores relatam que o uso de cereais (como trigo, aveia e milho) fermentados por fungos *Rhizopus oligosporus* e *Aspergillus oryzae* produzem um elevado conteúdo de compostos fenólicos (ZHAO et al., 2014; RAZAK et al., 2015).

Diversos estudos relatam a capacidade de microrganismos fúngicos modularem moléculas antioxidante em cereais como arroz, com *Cordyceps sinensis* (ZHANG et al., 2008) e em trigo com *Aspergillus oryzae* e *A. awamori* (BHANJA et al., 2009). Lee et al. (2008) mostraram que as qualidades nutricionais e as atividades biológicas de diferentes resíduos agroindustriais foram potencializadas por cultivo em estado sólido baseado em fungos filamentosos.

Na tabela 10 pode-se observar o potencial de inibição do radical livre DPPH alcançado pelos extratos etanólicos na concentração de 40 mg/mL de soja adicionada pelos cereais em estudo após 72 horas de fermentação pelos três fungos previamente selecionados. A mistura nas mesmas proporções foi avaliada *in natura*.

Tabela 10. Potencial de inibição (%) do radical livre DPPH de extratos etanólicos provenientes de processo fermentativo de 72 horas com combinação de substratos por diferentes linhagens do gênero *Rhizopus* spp.

	T ₀ (Tempo inicial)	<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	<i>R. oligosporus</i> NRRL 2710	<i>R. oligosporus</i> NRRL 3267
SOJA	22,20±0,48 ^d	81,0±0,77 ^k	85,7±0,44 ^{kl}	88,1±0,22 ^{kl}
SOJA + ARROZ	3,67±1,63 ^a	90,21±0,26 ^{lm}	91,19±0,90 ^m	59,01±1,38 ^h
SOJA + AVEIA	13,725±0,20 ^c	31,99±0,63 ^e	32,62±0,74 ^e	14,68±0,84 ^c
SOJA + MILHO	3,78±1,37 ^a	42,98±0,96 ^g	76,6±1,14 ^j	72,3±0,35 ⁱ
SOJA + TRIGO	9,93±1,61 ^b	75,61±1,35 ^j	36,9±0,82 ^f	3,57±1,48 ^a

T₀ – Combinação de substratos *in natura*.

Os resultados de inibição do radical livre DPPH dos extratos etanólicos obtidos, a partir das combinações de substratos estudadas, apresentaram o mesmo comportamento observado na avaliação do IC₅₀.

A mistura de grãos de soja e arroz integral *in natura* não apresentam potencial de inibição significativa (3,67%), enquanto que, após 72 horas de fermentação dos grãos pelas linhagens selecionadas o potencial de inibição passou para 90,2% e

91,1% para as linhagens *R. arrhizus* NRRL 2582 e *R. oligosporus* NRRL 2710, respectivamente. O mesmo comportamento não foi observado por *R. oligosporus* NRRL 3267, onde está apresentou capacidade de inibir 59,02% dos radicais livres, o que corresponde a uma redução de 1,45% quando fermentada apenas com grãos de soja.

O aumento da atividade antioxidante de extratos provenientes de fermentações à base de soja também foi observado em estudos como de Lee, Hung, Chou (2007). McCue, Horii e Shetty (2003) e Singh et al. (2010).

Os dados revelam que o processo fermentativo dos grãos soja e arroz integral combinados é uma alternativa viável que permite reduzir os custos do processo obtendo valores consideráveis de ação antioxidante. O processo fermentativo mencionado possibilitou um incremento de até 24 vezes na ação antioxidante e 24,84 vezes no potencial de inibição do radical livre.

Os dados estatísticos mostram que as linhagens *R. arrhizus* NRRL 2582 e *R. oligosporus* NRRL 2710 não diferem significativamente ($p > 0,05$). Dessa forma, as próximas etapas realizadas nesse trabalho se deram a partir das mesmas.

3.3 Cinética do processo fermentativo das linhagens selecionadas com ação antioxidante.

3.3.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH

Os radicais livres estão envolvidos em diversas funções no organismo, como sinalização e regulação do crescimento celular. No entanto, seu excesso produz efeitos deletérios, como danos ao DNA, proteínas e organelas citoplasmáticas provocando alterações na estrutura e função celular. Com isso, o organismo atua produzindo substâncias capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos. Quando tal produção pelo organismo é insuficiente, ocorre o estresse oxidativo, que através de várias reações degradativas, leva ao envelhecimento precoce e doenças degenerativas (ALVES et al., 2010).

Neste contexto destacam-se os antioxidantes, compostos que presente em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, retarda ou impede a sua oxidação (HALLIWELL et al., 1995) atuando diretamente na prevenção de tais doenças. Dessa forma, a identificação de fontes vegetais com alta capacidade antioxidante é de extrema importância.

Conforme mencionado anteriormente, o menor valor de IC_{50} está associado à alta capacidade antioxidante (ZHU et al., 2011). O comportamento cinético das linhagens *R. arrhizus* NRRL 2582 e *R. oligosporus* NRRL 2710 foram obtidos a partir do processo fermentativo com os substratos selecionados (soja e arroz) é apresentado na figura 5. A cinética foi verificada durante 120 horas de fermentação, com amostras coletadas a cada 24 horas.

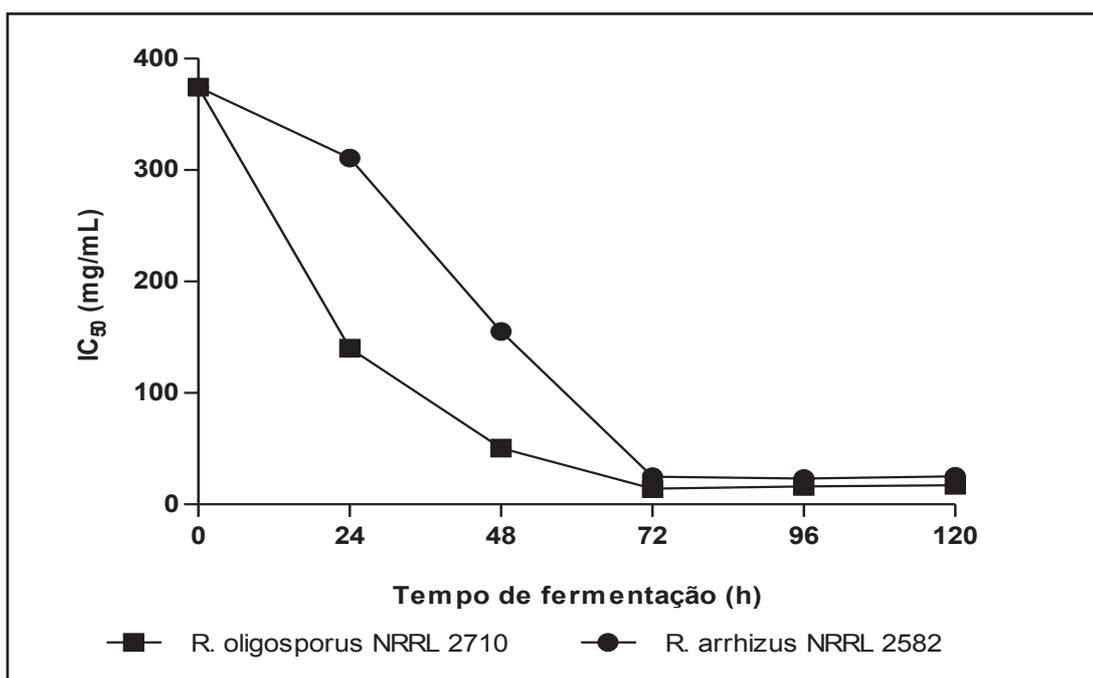


Figura 5. Cinética do potencial antioxidante de extratos etanólicos provenientes da fermentação de soja e fungo durante 120 horas por *R. arrhizus* NRRL 2581 e *R. oligosporus* NRRL 2710.

O potencial máximo de ação antioxidante dos fermentados foi alcançado em 72 horas de processo, onde *R. arrhizus* NRRL 2582 e *R. oligosporus* NRRL 2710 apresentaram concentração inibitória de 24,8 mg/mL e 14,1 mg/mL, respectivamente. No tempo final do processo fermentativo, correspondente a 120 horas, o valor de IC_{50} obtido foi de 25,1 mg/mL e 17,3 mg/mL.

Huang et al. (2008) em fermentado com soja e arroz (sufu) com duração de 16 dias, alcançou em extratos metanólicos um IC_{50} de 19,1 mg/mL e capacidade de eliminação dos radicais livres de 54,7%, representando um aumento de 3,4 vezes em relação ao sufu não fermentado. CHANG et al. (2008) em fermentação de soja por *R.*

oligosporus alcançou no primeiro dia de fermentação um valor de concentração de inibitória (IC₅₀) de 38,31 mg/mL e após 10 dias de fermentação esse valor foi de 18,83 mg/mL (redução de 2,03 vezes). Neste trabalhos, valores semelhantes foram encontrados em apenas 3 dias de fermentação.

A tabela 11 revela o potencial de inibição do radical livre DPPH alcançado pelos extratos em três pontos diferentes da cinética, na concentração máxima de 40 mg/mL. A mistura de grãos de soja e arroz integral *in natura* apresentaram potencial de inibição de 3,67%, o processo fermentativo dos grãos no ponto de 72 horas mostrou um aumento do potencial de inibição dos extratos de 83,22% 3 e 91,47% para as linhagens *R. arrhizus* NRRL 2582 e *R. oligosporus* NRRL 2710.

Tabela 11. Potencial de inibição (%) do radical livre DPPH de extratos álcoolicos dfermentação de 120 horas de grãos de soja e arroz integral por *R. arrhizus* NRRL 2582 e *R. oligosporus* NRRL 2710.

	<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	<i>R. oligosporus</i> NRRL 2710
T₀ (tempo inicial)	3,67 ^a ±1,63	3,67 ^a ±1,63
72 Horas	83,22 ^d ±0,48	91,47 ^e ±0,92
120 Horas	64,51 ^b ±0,29	78,82 ^c ±0,16

T₀ – Combinação de substratos *in natura*.

O comportamento observado para valores de concentração inibitória (IC₅₀) mostrado na figura 5, é também observado no potencial de inibição dos extratos. Ao final processo fermentativo, de 120 horas, os extratos apresentam uma queda no potencial de inibição do radical DPPH. Os extratos resultantes da fermentação pela linhagem para as linhagens *R. arrhizus* NRRL 2582 apresentou 64,51% de inibição e a linhagem *R. oligosporus* NRRL 2710 foi capaz de inibir 78,82% do radical DPPH.

De acordo com Kwak et al. (2007), a ação antioxidante de extratos fermentados pode ser atribuída à presença de fitoquímicos antioxidantes, como fenólicos e isoflavonas.

Os valores obtidos na cinética permitiram concluir que não é necessário um longo tempo de processo para atingir o ponto máximo de ação antioxidante do fermentado, uma vez que observa-se atividade decrescente com o aumento do tempo de cultivo. O mesmo comportamento foi relatado por McCue e Shetty (2003) em estudos com *Rhizopus oligosporus*.

3.2 Quantificação de compostos fenólicos totais

Os compostos polifenólicos, são fitoquímicos comumente encontrados em frutas, legumes e grãos. São pertencentes a um grupo heterogêneo de compostos caracterizados por apresentarem uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes (TROUILLAS et al., 2003).

Inúmeros benefícios para a saúde humana podem ser adquiridos na dieta através de alimentos com teores substantivos de compostos bioativos, uma vez que o consumo destes está associado ao menor risco de desenvolvimento de doenças crônicas.

Nesse contexto, o conteúdo de fenólicos totais dos substratos fermentados pelas linhagens *R. oligosporus* NRRL 2710 e *R. arrhizus* NRRL 2582 utilizando etanol no processo de extração foram avaliados e comparados com os valores presentes no grão *in natura*. O conteúdo fenólico total de todas as amostras testadas foi determinado a partir de uma curva padrão de ácido gálico e expresso em mg EAG/g de amostra fermentada (figura 6).

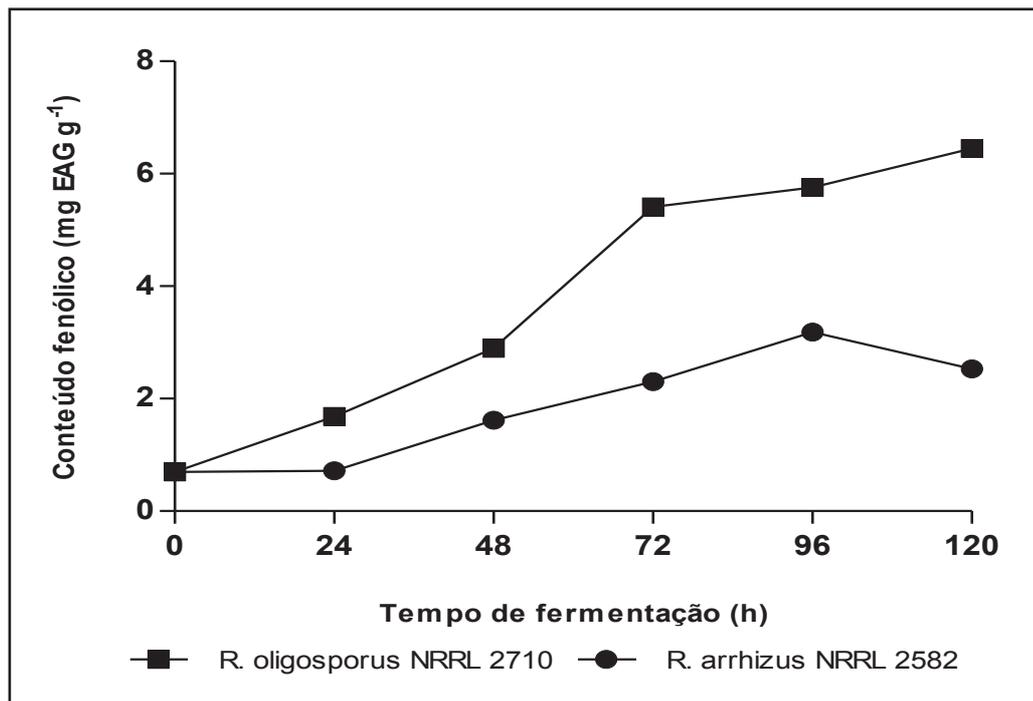


Figura 6. Conteúdo de compostos fenólicos totais (mg EAG g⁻¹) de extratos etanólicos provenientes de processo fermentativo de soja e arroz em 120 horas por *R. arrhizus* NRRL 2582 e *R. oligosporus* NRRL 2710.

Dentre os principais componentes responsáveis pela ação antioxidantes dos produtos de soja destacam-se os compostos fenólicos e flavonóides (ZHANG et al., 2011).

Os teores fenólicos totais dos extratos etanólicos da linhagem *R. oligosporus* NRRL 2710 encontram-se na faixa de 0,69 a 6,44 mg EAG/g, enquanto a linhagem *R. arrhizus* NRRL 2582 apresentou conteúdo fenólico de 0,69 a 2,53 mg EAG/g (figura 6).

Os extratos etanólicos obtidos a partir de fermentação com *R. arrhizus* 2582 apresentaram menores valores de compostos fenólicos, sendo a concentração máxima encontrada em 96 horas (3,18 mg EAG/g), no tempo final do processo correspondente a 120 horas, a concentração de compostos fenólicos alcançada apresentou redução de 1,25%. Em contrapartida, os extratos provenientes da fermentação pela linhagem *R. oligosporus* NRRL 2710 não apresentaram queda no conteúdo de compostos fenólicos, como observado no potencial antioxidante dos extratos.

Os dados estatísticos mostram que as linhagens *R. arrhizus* NRRL 2582 e *R. oligosporus* NRRL 2710 apresentam diferença significativamente ($p > 0,05$). O

processo fermentativo dos grãos pelas linhagens resultou em um incremento de 9,33 vezes no teor de compostos fenólicos.

Singh et al. (2010) em estudos de grãos de soja fermentados por *Trichoderma harzianum* também relataram um total de fenólicos dos extratos significativamente superior após a fermentação dos grãos. KUMAR et al. (2010), encontraram concentrações de fenólicos em cultivares de soja de 0,8 a 5,4 mg/g de soja.

Tais resultados sugerem que maior atividade antioxidante dos produtos fermentados também pode estar relacionada a teores significativamente mais altos de ácidos fenólicos, flavonóides e isoflavonas agliconas com mais grupos hidroxila livres.

Segundo Bhanja et al., (2009) o processo fermentativo dos grãos de soja em estado sólido permite a atuação de fungos filamentosos na mobilização ou formação de compostos fenólicos. A soja abrange compostos fenólicos e isoflavonóides concentrados principalmente na matriz de sementes, o que pode explicar o aumento de tais compostos.

Ajila et al., (2011) afirmam que os compostos fenólicos presentes em extratos associam-se frequentemente com diversas outras biomoléculas, como proteínas, carboidratos, lipídeos, terpenos e outros compostos orgânicos. A solubilidade dos mesmos depende principalmente dos grupos hidroxilas e comprimento da cadeia carbônica. Dessa forma, a escolha do melhor solvente de extração é fundamental na quantificação desses compostos.

3.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase

O processo inflamatório corresponde á resposta imune do organismo contra determinada lesão e infecção (VERNAZA et al., 2012). No presente trabalho, foi avaliado a atividade anti-inflamatória a partir do potencial de inibição da enzima hialuronidase. Tal enzima (HIA) pertence à classe das glicosidases e caracterizam-se pela capacidade de degradação do ácido hialurônico (AH). A enzima atua na matriz extracelular dos tecidos aumentando assim a permeabilidade e facilitando o acesso de patógenos envolvidos em processos inflamatórios (EL-SAFORY et al., 2010; GIRISH & KEMPARAJU, 2007; SGARIGLIA et al., 2013).

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 7. As amostras apresentaram diferença significativa ao nível de 95% ($p < 0,05$). Os extratos alcoólicos

obtidos do processo fermentativo de 72 horas, mostraram capacidade de inibição máxima de 70,75%, o que representa um aumento de 3,36 vezes quando comparado com o tempo 0, capaz de inibir 21,03% da HIA. Os resultados foram comparados com o controle de dimetilsulfóxido (DMSO), uma vez que este apresenta capacidade de inibir completamente a enzima hialuronidase (HIA).

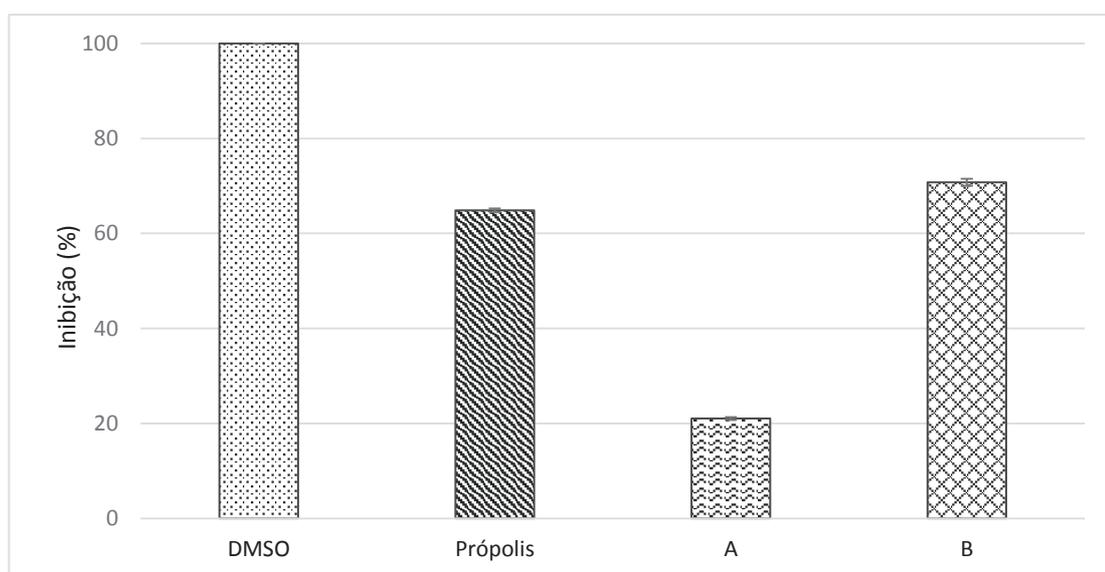


Figura 7. Avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos álcoolícos provenientes de fermentação com grãos de soja e arroz por *R. oligosporus* NRRL 2710, em comparação com diferentes controles positivos. A. Extrato referente ao tempo 0 de processo fermentativo.; B. Extrato referente a 72 horas de processo fermentativo.

Fazendo-se uma comparação entre a capacidade anti-inflamatória do extrato comercial de própolis com os extratos álcoolícos testados, pode-se afirmar que em 72 horas de fermentação dos grãos por pelas linhagens *R. oligosporus* NRRL 2710 este apresenta-se mais eficaz que o controle positivo testado (64,85%).

Vasconcellos (2014) em estudos com isolado proteico de soja utilizando a mesma metodologia descrita neste trabalho, relatou um valor de 70% de atividade anti-inflamatória a uma concentração de 1000 µg/ml. O autor não relatou o valor de IC₅₀.

Para uma melhor compreensão da atividade anti-inflamatória do extrato proveniente de 72 horas de fermentação, foi realizada a análise dose-resposta e a relação foi ajustada por uma função sigmoide para estimar o valor de concentração inibitória (IC₅₀), que corresponde à concentração capaz de induzir 50% enzima

hialuronidase. O extrato foi testado nas concentrações de 1 a 300 µg/mL para definir a melhor concentração inibitória da enzima hialuronidase e, portanto, o processo inflamatório.

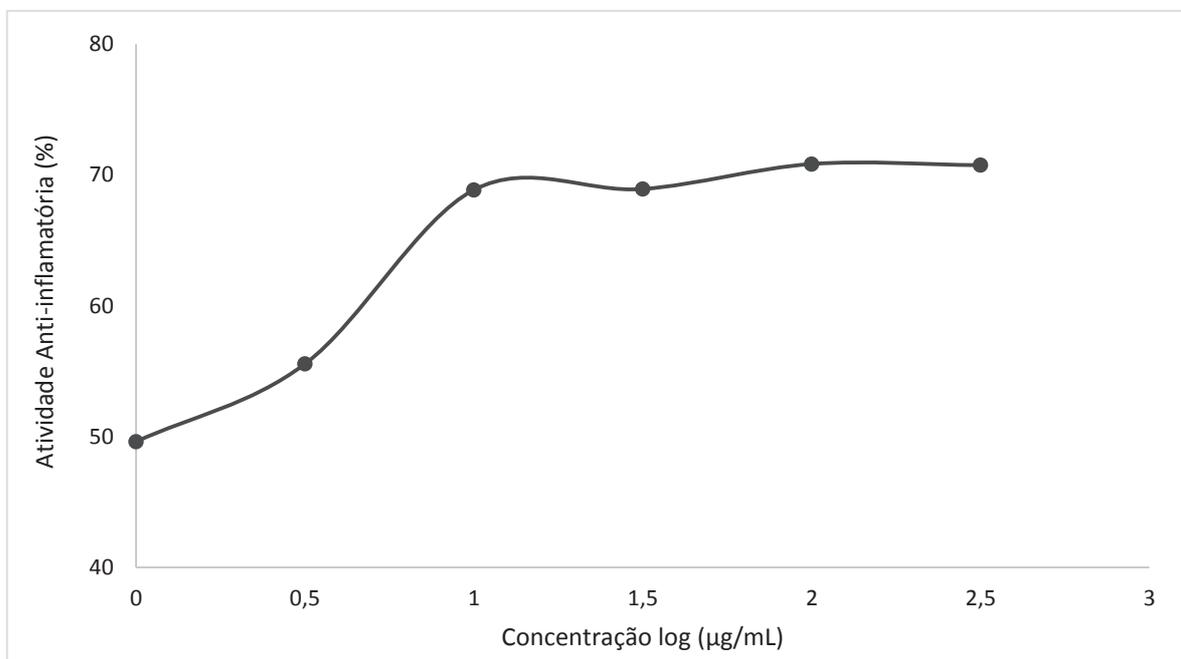


Figura 8. Cuva dose-resposta da atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase de extrato alécoolico proveninete de fermentação de grãos por linhagem de fungo *Rhizopus spp.*

Tal análise permitiu verificar que o valor de concentração ideal para que ocorra essa inibição é de 4,2 mg/mL, em um intervalo de 95% de confiança. Na figura 9 é possível observar o comportamento do extrato em relação a dose-resposta.

Kuppusamy (1990) testou um grupo de 31 flavonoides, frente à enzima hialuronidase testicular bovina. A presença de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do núcleo fundamental dos flavonóides era condição fundamental para o composto apresentar atividade; um grupo ceto na posição 4 e a introdução de hidroxilas em 5, 7 e 4' mostravam aumentar o efeito dos flavonoides. No entanto, a presença de substituintes glicosídicos diminuía o efeito inibitório sobre a enzima testicular bovina. Dessa forma, o autor concluiu que as formas agliconas dos flavonóides são melhores inibidores de hialuronidase que seus derivados glicosilados.

Diante disso, o potencial anti-inflamatório dos extratos testados pode ser associado a presença de compostos fenólicos no mesmo. Uma vez que nos produtos

não fermentados de soja, as isoflavonas predominam-se nas formas glicosídicas (NAIN et al., 1974). O processo fermentativo altera os níveis e formas das isoflavonas, promovendo um aumento nas formas agliconas (FUKUTAKE et al., 1996; WANG & MURPHY, 1994; GEORGETTI et al., 2009).

Sendo assim, a hidrólise de compostos fenólicos conjugados por microorganismos, como mostrado no presente trabalho, pode ser uma alternativa para aumentar a concentração de polifenóis livres e bioatividade dos produtos à base de soja (GEORGETTI et al., 2009). Diversos pesquisadores têm realizado estudos biológicos e farmacológicos de compostos fenólicos (VICENTE, et al, 2014; SCHERER & GODOY, 2014).

6. Conclusão

- Todas as 17 linhagens de *Rhizopus sp.* testadas apresentaram resultados positivos quanto o aumento do potencial antioxidante após fermentação dos substratos.

- Dos substratos testados, a combinação de grãos de soja e arroz integral mostrou-se eficiente para a fermentação em estado sólido por *Rhizopus spp.*, permitindo obter valores de IC₅₀ promissores.

- A concentração inibitória antioxidante (IC₅₀, em mg/mL) das amostras fermentadas apresentou correlação com a produção de compostos fenólicos, uma vez que quanto menor o valor de IC₅₀, maior a concentração de compostos bioativos.

- O estudo mostrou a correlação entre a presença de compostos fenólicos com o potencial anti-inflamatório dos extratos.

- Os estudos de bioatividade indicam que os grãos fermentados por fungos do gênero *Rhizopus sp.* apresentam atividade antioxidante e atividades antiinflamatórias, sugerindo potenciais novas aplicações.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. L. Isoflavona de soja e propriedades biológicas. **B. Ceppa**. v. 20, n. 2, p. 323-334, 2002.

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

ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Critical Review. **Analyst**, v. 125, p. 989-1009, 2000.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in foods: extraction conditions and analysis by HPLC – mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* v. 42, n. 11, p. 2466-2474, 2002.

BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opin. Cell. Biol**, v. 14, n. 3, p. 608- 616, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LebensmWiss u-Technol**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BHANJA, T.; KUMARI, A.; BANERJEE, R. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. **Bioresour. Technol.**, 100, pp. 2861-2866, 2009.

CHANG, T.; DING, T.; WU, C. Metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein by fungi used in the preparation of various fermented soybeans foods. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Toyo, v. 71, 1330-1333, 2007.

CHANG, C.T.; HSU, C.K.; CHOU, S.T.; CHEN, Y.C.; HUANG, F.S.; CHUNG, Y.C.(2008), Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. **Internacional Journal of Food Science & Technology**. 44, 799–806, 2008.

COSTA, R.P.; MENENDEZ,G.; BRICARELLO, L.P.; ELIAS, M.C.; ITO, M. **Óleo de peixe, fitosteróis, soja e antioxidantes: impacto nos lípides e na arterosclerose**. Ver. Sociedade Cardiológica, São Paulo, 2000.

COTINGUIBA, G.; SILVA, J. R.; AZEVEDO, R.R.; ROCHA, T.J.; SANTOS, A.F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, vol. 15, n.3. p. 231-237, 2013.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 10, p.7313-7352, 2010.

DANCIU. C.; BORCAN, F.; BOJIN, F.; ZUPKO, I.; DEHELEAN, C. Effect of the isoflavone genistein on tumor size, metastasis potential and melanization in a B16 mouse model of murine melanoma. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 3, p. 343 – 346, 2013

ELDRIDGE, A.C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein-concentrates, and isolates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 183, p. 90, 1982.

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

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Soja em números (safra 2014/2015), 2015. Disponível em: www.embrapa.br. Acesso em: 06 jan. 2018.

EUGENBIO. **Novo conceito de hormônio feminino**. Disponível em: <<http://www.eugenbio.com>>. Acesso em: 01 jan. 2018.

FERRARI, R.A.; DEMIATE, I.M.; Isoflavonas de soja – uma breve revisão. PUBLICATIO UEPG- **Biological and Health Sciences**. v. 7, n. 1, p 3946, 2001.

FORTES, V. S. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e citotóxica do extrato da soja (*Glycine max*) biotransformada pelo fungo *Aspergillus awamori***. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade Se São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

FRITSCHÉ, S.; STEINHART, H. Occurrence of hormonally active compounds in food: a review. **European Food Research and Technology**, New Yourk, v. 209, p. 153-179, 1999.

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

FRITZ, K. L. et al. The in vivo antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. **Nutr. Res.**, New York, v. 23, n. 4, p. 479-487, 2003.

GEORGETTI, S.R.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R.; FONSECA, M.J.V.; LOPEZ, R.F.V. Evaluation of in vivo efficacy of topical formulations containing soybean extract. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 189 - 196, 2008.

GEORGETTI, S.R.; VICENTINI, F.T.M.C.; YOKOYAMA C.Y.; BORIN M.F.; SPADARO A.C.C.; FONSECA M.J.V. Enhanced in vitro and in vivo antioxidant 314 activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106 459 – 466, 2009.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. ; VICENTINI, F.T.M.D.C. ; BARACAT, M. M.; VERRI-JR., W.A. ; FONSECA, M.J.V. Protective effect of fermented soybean dried extracts against TPA-induced oxidative stress in hairless mice skin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2013, p. 1 – 8, 2013.

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

FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, M.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 457-461, 1996.

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

HUANG, Y. Effects of natto-temph on gene expression of antioxidant enzymes and angiotensin converting enzyme in Wistar Kyoto Rats. Tese de doutorado. **Department Food and Nutrition**, 2008,. China.

HUANG,Y.H.; LAI, Y.J.; CHOU, C. C. Fermentation temperature affects the antioxidant activity of the enzyme-ripened sufu, an oriental traditional fermented product ofsoybean, **Journal of Biociencia and Bioengenier**, 2011.

JABASINGH, S, A.; VALLINACHIYAR, C. Optimization of cellulase production by *Aspergillus nidulans*: application in the biosoftening of cotton fibers. **World Journal Microbiology Biotechnology**, New York, v. 27, p. 85-97, 2010.

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.

LOPEZ, C. F. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, 2011.

LIN, C. H.; WEI, Y. T.; CHOU, C. C. **Enhanced antioxidant activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi**. *Food Microbiology*, v. 23, pp. 628-633, 2006.

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.

KWAK, C.; LEE, M. S.; PARK, C. Higher antioxidant properties of Chungkookjang, a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation. **Nutr. Res.**, 27, pp. 719-727, 2007.

KHAN, A.Q.; KHAN, R.; REHMAN, M.U.; LATEEF, A.; TAHIR, M.; ALI, F.; SULTANA S. Soy isoflavones (daidzein & genistein) inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced cutaneous inflammation via modulation of COX-2 and NF-B in Swiss albino mice. **Toxicology**, v. 302, p. 266 – 274, 2012.

KUPPUSAMY U, KHOO H, DAS N. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. **Biochem Pharmacol**, 40(2):397, 1990.

MALTA, L. G.; GHIRALDINI, F. G.; REIS, R.; OLIVEIRA, M. V.; SILVA, L. B.; PASTORE, G. M. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, Essex, v. 49, n. 1, p. 604-611, 2012.

MCCUE, P.; HORII, A.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by *Rhizopus oligosporus*: role of carbohydrate-cleaving enzymes. **J. Food Biochem.**, pp. 501-514, 2003.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Cienc. Rural**, vol. 41, n. 6, 2011.

MEJIA, E.; LUMEN, B. O. **Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases**. Sexuality, Reproduction and Menopause. v. 4(2), p. 91–95. 2006.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, v. 29, p. 273-300, 1990.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

NOUT, M. J. R.; KIERS, J.L. Tempeh as a functional food. In: **World soybean research conference, 8.; international soybean processing and utilization conference, 4.; Congresso brasileiro de soja, 3.**, Foz do Iguaçu, Londrina: Embrapa Soja, p. 708-713, 2004.

PARK, Y.M.; KANG, M.; MOON, K.I.Y.; PARK, S.H.; KANG M.H.; CHOI, Y.W.. Liposome/Tat complex for facilitating genistein uptake into B16 melanoma cells. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 41, n. 4, p. 205 – 210, 2011.

PILSAKOVA, L.; RIECANSKY, I.; JAGLA, F. The physiological actions of isoflavones phytoestrogens. **Physiological Research**, Prague, v. 59, p. 651-664, 2010.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J Agric Food Chem**, n. 18, v. 53(10), p. 4290-302, 2005.

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

RAZAK, D. L. A.; RASHID, N. Y. A.; JAMALUDDIN, A.; SHARIFUDIN, S. A.; LONG, K. Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, 4, 33–38, 2015.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

ROCKENBACH1, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from Tannat and Ancelota - different varieties of *Vitis vinifera* varieties. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28(Supl.): 238-244, dez. 2008.

ROSSI, I.H.; MONTEIRO, A.C.; MACHADO, J.O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.6, p.887-891, 2001.

SÁNCHEZ-VICENTE, Y.; CABANAS, A.; RENUNCIO, J.A.R.; PANDO, C.C. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol. **Journal Supercritical Fluids**, v.49, p.167–173, 2009.

SCHERER, R., GODOY. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n, 1, p. 41-46, 2014.

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

SILVA, S.M. **Formulação de meios de crescimento para o cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju*, à base de serragem de *Pinus spp.*** 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2004.

SIMIC, G. S.; JOVANOVIC, V. V. **Antioxidant in nutrition**, Annals of the New York Academy, 1994.

SING, H. B.; SINGH, B. N.; SINGH, S. P.; NAUTIYAL, C. S. Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, p. 64444-6453, 2010.

SHUKLA, S.; PARK, J.; KIM, D.; HONG, S-Y.; SUKLEE, J.; KIM, M. Total phenolic content, antioxidant, tyrosinase and α -glucosidase inhibitory activities of water soluble extracts of noble starter culture *Doenjang*, a Korean fermented soybean sauce variety. **Food Control**, v. 59, p. 854-861, 2016.

TROUILLAS , C. CALLISTE , D. ALLAIS , A. SIMON , A. MARFAK , C. DELAGE , J. DUROUX. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. **Food Chem.** , 80 , pp. 399 – 407, 2003.

VASCONCELLOS, F. C. **Produção e caracterização de um isolado proteico de soja, avaliação das atividades biológicas antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória das proteínas glicinina e β - conglucina e produção de um fitocosmético.** Dissertação (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014

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

VICENTE, S.J.V., et al. Stability of phenolic compounds and antioxidant capacity in regular and decaffeinated coffee, **Brazilian Archives of Biology and Technology.**, v. 57, n. 1, p. 110-118, 2014.

VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; GARCIA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; MARTINEZ, J. A. Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 4, p. 27-38, 2011.

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

WANG, D.; WANG, L.; ZHU, F.; ZHU, J.; CHEN, X. D.; ZOU, L.; SAITO, M.; LI, L. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of

douche (a traditional Chinese salt-fermented soybean food), **Food Chemistry** 107 (4), 1421–1428, 2008.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 1, p. 41-48, 2006.

ZHAO, Y.; DU, S. -K.; WANG, W.; CAI, M. In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes. **Food Chem.**, 152, 462–466, 2014.

ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; YANG, C. Y.; ZHANG, Y. **Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 Chinese black soybean (*Glycine Max* L. Merr.) varieties**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, pp. 5935 – 5944, 2011.

ZHANG, Z.; LEI, Z.; LU, Y.; LU, Z.; CHEN, Y. Chemical composition and bioactivity changes in stale rice after fermentation with *Cordyceps sinensis*. **J. Biosci. Bioeng.**, 106, pp. 188-193, 2008.

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

CAPITULO 3: EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE PRODUTO FERMENTADO POR *RHIZOPUS SP.* À BASE DE SOJA UTILIZANDO-SE DIFERENTES TÉCNICAS.

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos fenólicos consistem em compostos antioxidantes naturais comumente encontrados em plantas e alimentos de origem vegetal. Grande atenção é dada a estes compostos devido ao seu alto papel na saúde humana (DAI E MUMPER, 2010). A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa de grão reconhecida com valor nutricional e alto potencial nutraceutico (ADEYEMO & ONILUDE, 2013). Esses grãos são caracterizados por altos níveis de propriedades bioativas (CHOI, KIM, JUNG, & BAE, 2015), incluindo antioxidantes fenólicos (ZHANG et al., 2010), atividade estrogênica,

imunomoduladores (SETCHELL et al., 2011) e anticarcinogênicos (ABERNATHY et al., 2015).

Assim, na busca e interesse na presença de antioxidantes efetivos em recursos naturais, os produtos de soja têm sido objeto de atenção de pesquisadores e desenvolvedores de produtos devido à crescente evidência de contribuições de compostos funcionais em uma variedade de propriedades benéficas para a saúde (KAJDZANOSKA et al., 2011).

Os compostos fenólicos são um grupo amplo e diversificado de fitoquímicos, capazes de eliminar numerosos radicais (ALBISHI et al., 2013, BENAVENTE-GARCIYA et al., 2000; SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015; WANG et al., 2016). Segundo Guan-Lin et al. (2018), a alta ingestão de alimentos ricos nesses compostos reduz significativamente o risco de inúmeras doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares.

As tecnologias extrativas para a obtenção desses extratos desempenham um papel importante, uma vez que o processo de extração pode levar a mudanças na composição do extrato, levando à perda do potencial biológico. Além disso, a escolha é baseada em um conjunto de fatores, dentre eles, rendimento, qualidade do produto, tempo de operação e custo (MESOMO, 2013).

Embora existam vários estudos na literatura sobre substâncias bioativas derivadas da soja (PANANUN et al., 2012; DUROVIC et al., 2018), não há um estudo abrangente sobre o efeito de diferentes métodos e condições na extração dos mesmos.

Métodos de extração convencionais, como extração de Soxhlet, são comumente usados para obter óleo de biomassa; no entanto, podem ser prejudiciais ao meio ambiente devido às grandes quantidades de solventes orgânicos utilizados, tornando-se restritivas porque são potencialmente prejudiciais e caras. Além disso, podemos mencionar os longos tempos de processamento, baixa seletividade, baixos rendimentos de extração e baixa qualidade dos extratos, causados quando componentes termicamente sensíveis são degradados devido às altas temperaturas utilizadas (DANLAMIN et al., 2014).

Pesquisas recentes em tecnologias de extração têm focado principalmente em técnicas eficientes e inovadoras para o processamento de materiais vegetais como uma alternativa ecológica para obter e purificar compostos bioativos, como a extração

com fluidos supercríticos (CHEN et al., 2014; CONG-CONG et al., 2017). No presente trabalho, o uso de dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) aparece como uma alternativa considerada como um conceito "verde" inerte, não tóxico, permitindo a extração a baixas temperaturas e pressões relativamente baixas. Também tem a vantagem de ser capaz de fornecer maior rendimento, minimizar o tempo de processamento e reduzir o consumo de energia e solventes (SIN et al., 2014; ATTARD et al., 2015; ATTARD et al., 2018).

A extração supercrítica é notável, pois permite a extração de extratos de alta qualidade, minimizando os danos ao meio ambiente devido à ausência de solvente no produto final (HERRERO et al., 2010). No entanto, a solubilidade de moléculas de cadeia longa e compostos polares elevados em CO₂ supercrítico é limitada (SOLTANI & MAZLOUMI, 2017), mas esta é uma desvantagem que pode ser resolvida usando um co-solvente diferente ou configuração de processo como solvente de técnica de gás expandido (RUCKENSTEIN & SHULGIN, 2001). A adição de pequenas quantidades de solvente orgânico aumenta a solubilidade de compostos polares em um fenômeno conhecido como efeito de arrastamento, melhorando tanto a seletividade quanto o rendimento de extração de compostos de matrizes de plantas (SANTOS et al., 2017; GUEDES et al., 2018).

A fermentação de uma matriz vegetal por fungos filamentosos é uma estratégia biotecnológica capaz de induzir a melhoria das propriedades biológicas e bioatividades dos substratos, como maiores rendimentos de processos e melhores características do produto, como aumento da presença de enzimas, ácidos orgânicos e compostos bioativos (DANG et al., 2015). Os grãos de soja apresentam compostos fenólicos e isoflavonóides concentrados principalmente na matriz de sementes, durante o processo de fermentação, os fungos são reconhecidos por sua capacidade de produzir enzimas que atuam degradando a parede celular, atuando na mobilização de compostos polifenólicos (BHANJA et al., 2009; HARIKESH et al., 2010).

Até onde sabemos, não há nenhum relatório sobre a extração de óleo de uma biotransformada/fermentada e suas avaliações de atividades biológicas. Combinando o fato de que os antioxidantes têm sido considerados os principais componentes de saúde esperados pelos consumidores em produtos alimentícios, devido aos seus benefícios na prevenção de muitas doenças crônicas causadas por processos oxidativos celulares.

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito de diferentes métodos de extração, incluindo Soxhlet com diferentes solventes e técnicas de scCO₂ + EtOH, para obtenção de extratos com alta atividade antioxidante a partir da soja biotransformada pelo fungo *Rhizopus oligosporus*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi avaliar os rendimentos de extração comparando extração de Soxhlet com diferentes solventes orgânicos e extração supercrítica de CO₂ + etanol (scCO₂ + EtOH) de fermentados de soja biotransformados pelos fungos do gênero *Rhizopus sp.*, bem como a presença de bioativos, como potenciais compostos antioxidantes e fenólicos

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o rendimento de extração Soxhlet a partir de matéria-prima úmida e seca;
- Verificar a relação entre a polaridade e o rendimento de extração de Soxhlet entre diferentes solventes orgânicos;
- Avaliar diferentes condições no processo de extração com fluido comprimido (scCO₂ + EtOH);
- Avaliar a presença de bioativos com ação antioxidante dos extratos provenientes ambas técnicas de extração;
- Avaliar a concentração de compostos fenólicos totais dos extratos;
- Avaliar a estabilidade oxidativa dos extratos obtidos por scCO₂ + EtOH.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

O processo de fermentação foi conduzido por um fungo do gênero *Rhizopus spp.*, cuja linhagem foi obtida de coleções de cultura dos bancos de cepas NRRL (Northern Regional Research Laboratory), U.S. Department of Agriculture, Illinois -

USA, e MUCL (Mycothèque de Université Catholique de Louvain), Bélgica e são pertencentes à micoteca do Laboratório do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. A conservação desta cepa foi realizada em tubos inclinados contendo meio sólido de ágar batata dextrose (PDA). A cultura repicada foi crescida a 30°C por 5 dias, e após, conservada a 4°C com repiques contínuos a cada três meses.

3.2 Fermentação no estado sólido

Os ensaios foram conduzidos em biorreator do tipo bandeja dentro de um dessecador, a fim de se garantir a umidade relativa do ar no ambiente de fermentação. Utilizou-se bandejas perfuradas, mantendo assim a aeração no fundo dos recipientes. As peneiras foram cobertas na parte inferior e superior com papel alumínio perfurado e esterilizado, o que garantia a retenção da solução de esporos e a umidade requerida para crescimento do fungo. Ao fundo do dessecador, foram adicionados 800 mL de água deionizada, que garantia a saturação do ar com umidade.

Os grãos de soja foram pré-embebidos em água deionizada e deixados por 12 horas para serem descascados posteriormente. Quando necessidade de substratos combinados, os grãos de arroz foram pré-cozidos em água fervente por 5 minutos. Os substratos foram tratados termicamente sob vapor fluido a 100°C por 15 minutos. O excesso de água foi removido.

Após arrefecimento dos substratos, os mesmos foram inoculados com 10^7 esporos g^{-1} de substrato seco. O dessecador foi fechado apenas com papel alumínio perfurado e mantido em estufa bacteriológica (Marca Fanem, modelo Orion 502) a 30°C por 72 horas de fermentação. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

2.3 Processo de secagem

As amostras foram submetidas ao processo de secagem em estufa com circulação de ar a 50°C por 72 horas, após foi verificada a umidade residual das mesmas.

2.4 Teor de umidade

A umidade das amostras foi verificada por meio do equipamento Balance Infrared Moisture (Bel Engineering). As análises foram feitas em triplicata.

2.5 Extração com solvente orgânico

A extração foi realizada em equipamento Soxhlet descrita por AOAC (1999), utilizando uma razão de 1:40 (m/v). Sete solventes com diferentes polaridades foram testados para avaliar o rendimento de extração e a capacidade de extração de compostos bioativos. Os testes foram realizados em triplicata para cada solvente com duração de 6 horas de extração. Todos os solventes utilizados neste estudo foram de grau analítico. No final da extração, o solvente foi removido com um evaporador rotativo (RV 10 digital, Ika, Wilmington, EUA). As operações de extração foram realizadas em triplicata sob condições idênticas e, ao final, os frascos foram pesados em balança analítica para cálculo do rendimento. O rendimento de extração (% em peso) foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{\text{massa extraída (g)}}{\text{massa de amostra utilizada (g)}} \right) \times 100$$

2.6 Extração com fluido supercrítico

O processo de extração supercrítico foi realizado em um extrator em batelada (80 cm³ de volume interno, L = 0,16 m, 2.5 = 2,52 x 10⁻² m) e encamisado para controle de temperatura. O extrator de alta pressão é conectado a um banho ultra-aquecido e tem uma válvula de agulha para controle de fluxo na saída. O sistema também consiste de uma bomba de seringa de alta pressão (ISCO, modelo 500D, Lincoln, NE 68504, EUA), uma bomba de deslocamento positivo e sensores de pressão e temperatura e transdutores.

O etanol foi utilizado na extração do gás solvente líquido (GLX), denominado scCO₂ + EtOH, na tentativa de aumentar os rendimentos da extração e aumentar as taxas de extração. As extrações seguiram a proporção de 1: 1 (m / v) de matéria-prima e etanol. Um pré-tratamento da matéria-prima foi realizado, mantendo-a no solvente por um período de 60 minutos. Após a amostra foi adicionada ao extrator e mantida em um período de confinamento no extrator por 60 minutos.

A extração foi realizada com base em um delineamento experimental fatorial 2² simples com um ponto central, com o objetivo de avaliar os efeitos da pressão e temperatura no rendimento de extração. O solvente foi bombeado a um caudal constante de 2,0 ± 0,2 cm³/min.

O extrato ceroso foi coletado em um recipiente de vidro âmbar e seu peso foi determinado em intervalos de tempo de extração. Os rendimentos foram calculados como a razão entre a massa extraída e o peso inicial da matéria-prima utilizada.

2.7 Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro*

2.7.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método da inibição do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH)

A capacidade dos extratos fermentados de inibir o radical DPPH foi determinada de acordo com de acordo com Yu et al., (2016) e Lee et al., (2015). Para a preparação do reagente foram dissolvidos 0,004 g de DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em 100 mL de metanol P. A. Foi utilizado o padrão ácido ascórbico (vitamina C) como controle positivo para este ensaio. Uma solução padrão de ácido ascórbico e diluída nas concentrações de 8 a 40 mg/mL. Para determinar o potencial de inibição, foram utilizados 250 µl de cada concentração, adicionados a 1000 µl do reagente de DPPH e incubados na ausência de luz durante 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida utilizando-se espectrofotômetro (Marca Wavelength, modelo SP-2000) à 517 nm. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras fermentadas. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Para o controle, foi utilizado a solução sem amostra, apenas com o solvente utilizado na extração (água, etanol, metanol). A porcentagem de eliminação de radicais DPPH foi calculada de acordo com a seguinte equação (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998):

$$\text{Inibição do radical DPPH (\%)} = \left(\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) * 100$$

Onde:

A_{controle} : absorbância do radical DPPH diluindo com solvente da amostra (água, etanol ou metanol).

A_{amostra} : absorbância do radical DPPH com o extrato do fermentado.

Os resultados são expressos em concentração de inibição (IC₅₀), ou seja, a quantidade mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a

concentração inicial do radical livre DPPH. O índice IC50 é calculado através da equação da reta gerada pelo gráfico, plotado em função das porcentagens encontradas pelas concentrações das diluições.

2.7.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do sequestro do radical livre ABTS (2, 2 – azinobis - 3- etil – benzotiazolina – 6- ácido sulfônico)

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método do ABTS, adaptado da metodologia descrita por Re et al., (1999). O reagente foi preparado a partir de uma mistura de 5 mL de ABTS 7mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com 88 µL de persulfato de potássio 140 mM. A solução foi incubada em ausência de luz, durante 16 horas em temperatura ambiente antes de ser utilizada nas análises. Previamente ao uso, 1 mL da solução reserva foi diluída em aproximadamente 50 mL de etanol P. A. (Alphatec, 99,8%) até apresentar uma absorbância de 0,700 nm.

Foi preparada uma curva padrão utilizando-se o ácido Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a partir de uma solução estoque (2 mM) em concentrações que variam de 100 a 1000 µM. Em ausência de luz e temperatura ambiente, 10 µL de cada diluição da solução padrão foram adicionados em 500 µL da solução de ABTS. A mistura foi agitada e mantida em repouso durante 6 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Marca *Wavelength*, modelo *SP-2000*) à 734 nm.

O mesmo procedimento foi realizado com as amostras fermentadas. Todas as análises foram feitas em triplicata. Para o controle, foi utilizado a solução sem amostra ou padrão, apenas com água destilada.

Os valores foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), obtidos a partir da aplicação da equação da reta gerada pelo gráfico, plotado em função das absorbâncias encontradas pelas concentrações das diluições.

2.8 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais por Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos dos extratos fermentados foram determinados seguindo metodologia descrita por Miliauskas et al., (2004), com algumas modificações. Baseia-se em um método espectrofotométrico e colorimétrico em que o reativo Folin-Ciocalteu (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) apresenta mudança de cor de amarelo para azul na presença de compostos fenólicos.

Uma solução padrão de ácido gálico foi preparada para construção da curva de calibração a partir de concentrações que variam de 10 a 100 µg/mL, 0,1 mL de cada diluição foram adicionados a 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%) e mantido em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Em seguida, foram adicionados 0,4 mL de carbonato de potássio (7,5%) e novamente mantido em repouso por 1 hora em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Marca Wavelength, modelo SP-2000) à 760 nm.

O teor de fenóis foi expresso como equivalente de ácido gálico (GAE) em mg de ácido gálico por 100 g de extrato, obtidos a partir da aplicação da equação da reta gerada pelo gráfico, plotado em função das absorbâncias encontradas pelas concentrações das diluições.

O mesmo procedimento foi realizado com as amostras dos extratos fermentados. Para o branco, foi utilizado a solução sem amostra ou padrão, apenas com água destilada. Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.9 Determinação da estabilidade oxidativa

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um equipamento do modelo Thermogravimetric Analyzer modelo TGA 4000, marca Perkin-Elmer. O intervalo de temperatura explorado foi de 30 °C a 800 °C e a razão de aquecimento de 10°C min⁻¹. Foi utilizada uma atmosfera dinâmica de ar sintético a uma vazão de 50 mL min⁻¹. Utilizou-se no equipamento painéis de cerâmica e massas iniciais das amostras variando de 8 a 10 mg, aproximadamente.

2.10 Análise estatística

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extrações

Para a identificação de compostos bioativos em fontes naturais é necessária a realizar a extração com solventes de diferentes polaridades. As pesquisas enfocam essas extrações com o objetivo de realizar a comparação entre os resultados obtidos e encontrar o melhor solvente para uma dada matriz.

As extrações foram realizadas com amostras secas e inteiras (sem secagem) permitindo uma comparação de rendimento entre ambas. Inicialmente, extrações utilizando amostras secas foram realizadas em Soxhlet utilizando diferentes solventes orgânicos. A Tabela 1 mostra os rendimentos de extração obtidos com diferentes solventes, bem como o índice de polaridade desses solventes (BYERS, 2003). O rendimento foi calculado a partir da massa de óleo obtida pela massa utilizada no início da extração em base seca.

Os resultados de rendimento variaram entre $15.56 \pm 4.02\%$ e 42.09 ± 7.96 para os extratos de Soxhlet com as amostras secas, e de $14,20 \pm 2,82$ para $32,84 \pm 3,70$ para todas as amostras sem secagem.

Tabela 12. Resultados em rendimento (%) do processo de extração de Soxhlet com grãos de soja fermentados secos e inteiros (sem secagem) utilizando-se diferentes solventes.

Solventes	T (°C)	Polaridade	Rendimento (%)	
			Amostra seca	Amostra úmida
Hexano	68,0	0,0	$15,56 \pm 4,02^c$	-
Éter de Petróleo	34,61	0,1	$29,05 \pm 0,51^a$	-
Acetato de Etila	77,5	4,3	$32,04 \pm 2,14^{ab}$	-
Acetona	56,0	5,4	$34,07 \pm 0,677^{ab}$	$19,76 \pm 1,05^{ab}$
Etanol	78,5	5,2	$40,41 \pm 4,10^b$	$25,48 \pm 4,25^{bc}$
Metanol	64,7	6,6	$42,09 \pm 7,96^b$	$32,84 \pm 3,70^c$
Água	100,0	1,0	$23,66 \pm 4,32^a$	$14,20 \pm 2,82^a$

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

A relação entre a polaridade e o rendimento obtido pode ser verificada, de modo que os solventes com maior polaridade resultaram em um maior rendimento de extração, sugerindo que os compostos presentes na matriz vegetal apresentam polaridade intermediária a alta.

O metanol utilizado no processo de extração apresentou maior percentual de rendimento (42,09%) entre os solventes testados, seguido pelo etanol (40,41%). Dados estatísticos mostram que esses valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Em contraste, solventes não polares, incluindo n-hexano e éter de petróleo, resultaram em rendimentos variando de $15,56 \pm 4,02$ a $29,05 \pm 0,51$, valores inferiores aos dos solventes polares.

Segundo Almeida et al., 2012, o rendimento de extração deriva das diferentes interações entre o soluto e o solvente. Dagostin et al., 2015, afirmam que o resultado é devido à natureza polar destes solventes, capaz de solubilizar não apenas o óleo presente na matriz, mas também a água e outros componentes polares. Valdez et al., (2011) em estudos com solventes polares e não polares, relataram uma influência da polaridade dos mesmos no rendimento de extração e composição dos extratos obtidos.

Pode-se observar que o processo de secagem permitiu o aumento da extração de óleo das amostras e conseqüentemente levar a maiores rendimentos. Comparando os valores de rendimento de extração obtidos por ambas as amostras (matérias-primas secas e inteiras fermentadas), a extração de amostras secas resultou em um aumento de até 1,72 vezes usando acetona e 1,35 vezes quando o solvente usado foi etanol.

O teor de umidade também é um dos fatores que influenciam a eficiência de um processo de extração, uma vez que afeta a extração de óleo em matérias-primas oleaginosas (SINGH et al., 2002). Segundo Tango et al. (2004), o processo de secagem facilita o contato entre o solvente e o soluto a ser extraído, resultando em maiores rendimentos.

Neste trabalho, as extrações foram realizadas com a matéria-prima submetida a grãos de soja fermentados e secos e sem secagem, em que o teor de umidade residual foi de 23% e 73,5%, respectivamente. Os resultados obtidos corroboram com os resultados apresentados por Santos et al., (2013), onde o processo de secagem das amostras resultou em um aumento de 6,89% na extração. Outros autores relataram a otimização da extração com menor teor de umidade em estudos com sementes de girassol e uva (PIGHINELLI et al., 2009; MENEZES et al., 2014). O processo de secagem do presente estudo resultou em um aumento de 14,34% no rendimento da extração.

O processo fermentativo da matéria-prima permitiu um aumento de 1,68 vezes utilizando a acetona como solvente de extração e 1,50 usando etanol, fazendo-se a comparação do rendimento de extração da matéria-prima fermentada e não fermentada por ambos os solventes mencionados anteriormente (acetona e etanol). Estes resultados sugerem que o processo de fermentação por cepas do gênero *Rhizopus sp.* altera o teor lipídico da soja influenciando diretamente os rendimentos.

A partir dos resultados obtidos na extração de Soxhlet com diferentes solventes, observa-se que o etanol apresentou extrações com resultados estatisticamente semelhantes aos obtidos com metanol (maiores rendimentos para os solventes testados), portanto este foi selecionado como o solvente orgânico a ser utilizado juntamente com CO₂ supercrítico para a extração com solventes comprimidos, devido às características favoráveis do etanol como alternativa limpa e renovável, menor custo, melhor solubilidade de vários compostos devido ao aumento das forças químicas além de permitir uma maior absorção pela matriz sólida, facilitando o transporte do soluto dos poros intersticiais para a superfície da matriz (HOLLENDER et al., 1997).

Neste trabalho, as extrações foram realizadas utilizando-se uma técnica de solvente líquido expandido a gás em um processo de extração semi-descontínua, utilizando CO₂ supercrítico como gás expensor e etanol como solvente líquido, denominado scCO₂ + EtOH. Os processos que utilizam fluídos pressurizados sob condições supercríticas para obtenção de extratos de fontes vegetais têm sido destacados, uma vez que permitem obter novos produtos com características de interesse além de apresentar outras vantagens como flexibilidade, devido à possibilidade de ajuste contínuo de solventes e seletividade de solvente, evitar o uso de solventes poluentes, a degradação térmica e a decomposição de compostos lábeis, requerir tempos de extração mais curtos, o processo ocorrer na ausência de luz e oxigênio, impedindo assim a ocorrência de reações de oxidação (DEL VALLE & AGUILERA, 1999).

Para avaliar a influência da umidade na extração utilizando scCO₂ + EtOH, testes preliminares foram realizados em condições fixas (25 MPa e 80 °C) tanto para amostras fermentadas secas quanto amostras sem secagem. As curvas de extração para estas são apresentadas na Figura 9, onde pode ser observado o efeito significativo sobre a cinética da extração da água presente na matéria-prima. Portanto,

para extrações posteriores, optou-se por utilizar as amostras secas para realizar a extração com solventes comprimidos ($\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$). Outro teste preliminar realizado foi o pré-tratamento da matéria-prima (grãos fermentados de soja) com o solvente orgânico (etanol) para promover o contato prévio entre o solvente e matéria-prima antes do contato com a scCO_2 no processo de extração. Depois de alguns testes preliminares foi definido 60 minutos de contato foi suficiente para garantir uma condição adequada para este pré-tratamento. Além disso, tal contato solvente – matéria-prima pode alterar a matriz por inchamento, facilitando assim o transporte de analitos para a superfície da matriz (GÖTZ et al., 1995). Assim como observado para os resultados obtidos pela extração de Soxhlet, o processo de secagem das amostras influenciou positivamente o rendimento das extrações utilizando $\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$, resultando em um aumento de 2,14 vezes no procedimento realizado com amostras secas.

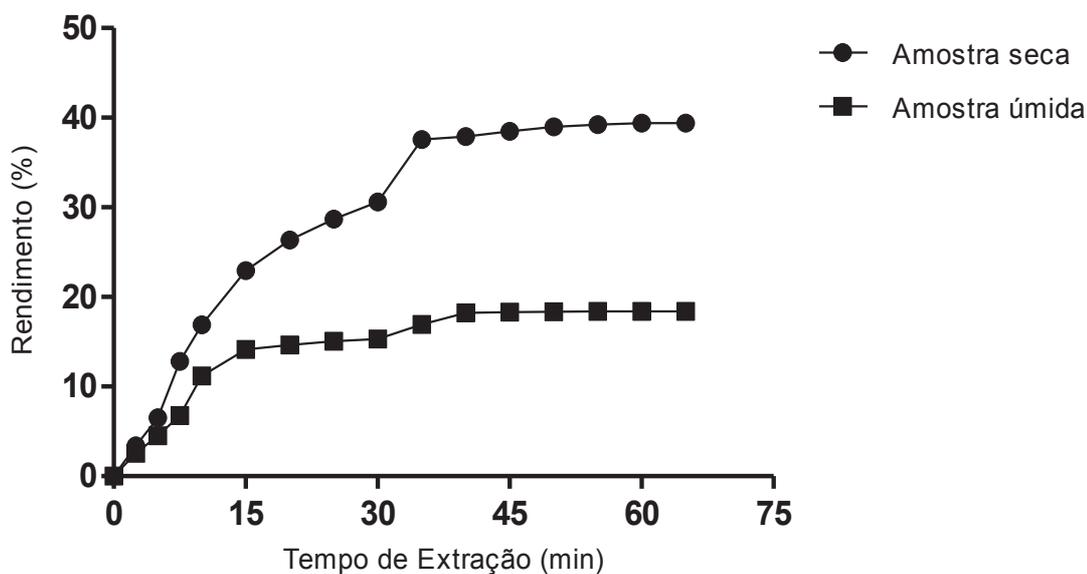


Figura 9. Cinética da extração de soja fermentada seca e úmida com $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ a uma temperatura constante de $80\text{ }^\circ\text{C}$ e pressão de 25 Mpa expresso em base seca.

Com o objetivo de estudar o efeito da temperatura e pressão nas extrações de soja fermentada utilizando o fluido comprimido como solvente ($\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$), foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com dois pontos centrais para verificar a influência da variação dos parâmetros, conforme apresentado na tabela 13. Nesta tabela, o rendimento de extração obtido em um tempo de extração fixo também é

apresentado. Observa-se que o rendimento de extração apresentou variações a uma temperatura fixa e alta pressão.

Tabela 13. Condições experimentais e resultados de rendimento de extração por scCO₂ + EtOH de soja fermentada.

Corrida	Solvente	P (MPa)	T (°C)	Tempo (min)	Rendimento de extração (%)
1	CO ₂ + EtOH	15 (-1)	80 (+1)	75	27,56
2	CO ₂ + EtOH	15 (-1)	40 (+1)	75	30,81
3	CO ₂ + EtOH	25 (+1)	80 (-1)	75	42,87
4	CO ₂ + EtOH	25 (+1)	40 (-1)	75	30,65
5	CO ₂ + EtOH	20 (0)	60 (0)	75	29,32

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

A Figura 3 apresenta as curvas de extração obtidas para a extração de soja seca fermentada com scCO₂ + EtOH em diferentes condições de temperatura e pressão. Pode-se observar que, dentre todas as condições testadas, a condição mais eficiente foi obtida em níveis mais altos de temperatura (80 °C) e pressão (25 MPa), uma vez que permitiu maiores valores de rendimento (ou seja, 42,87%). Os valores obtidos em diferentes condições apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Por outro lado, o menor rendimento (27,56%) foi observado com menor pressão (15 MPa) e maior temperatura (80 °C). Assim, o menor rendimento provavelmente resulta da baixa solubilidade do extrato e também das baixas taxas de transferência de massa durante a extração (MESOMO et al., 2012; LINSTROM & MALLARD, 2011).

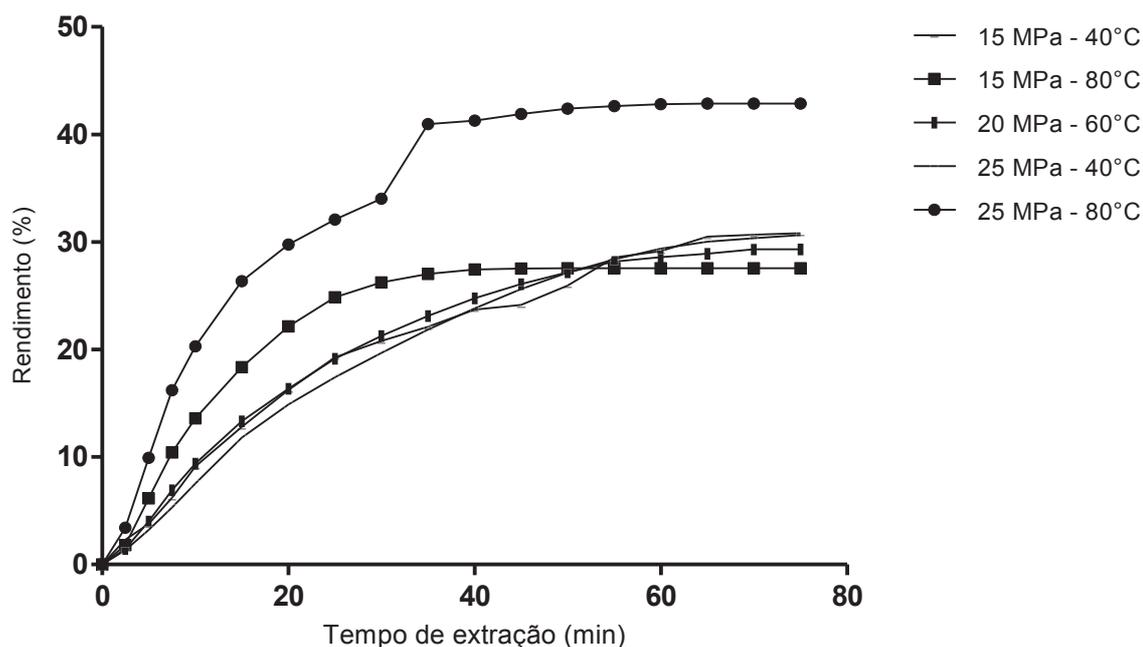


Figura 10. Curva de rendimentos de extração por scCO₂ + EtOH de soja seca fermentada em diferentes tempos.

A relação entre pressão e temperatura nas extrações com CO₂+ EtOH como solvente, indicam que ambas variáveis tiveram efeito sobre o rendimento do processo. Uma comparação entre as corridas 1 e 3 (tabela 2), sugerem que a mudança da pressão a uma temperatura fixa resultou em um aumento no rendimento de 15,31%. Já a variação de temperatura a uma pressão fixa de 25 MPa aumentou o rendimento em 12,22%.

A relação etanol - matéria-prima utilizada para as extrações com scCO₂ + EtOH foi fixada, assim como o tempo de pré-tratamento e o tempo de confinamento. Esses parâmetros foram fixados devido ao objetivo do trabalho de avaliar a viabilidade técnica deste tipo de extração.

Segundo Carreri et al. (2001) e Michielin et al., (2009) o resultado obtido pela variação de temperatura a uma pressão fixa é explicado pelo efeito complexo que a pressão e a temperatura exercem sobre a solubilidade de um soluto em um fluido supercrítico. A adição de etanol aumenta a polaridade da mistura de solventes (scCO₂ + EtOH) favorecendo a recuperação da molécula polar e, assim, mostrando um efeito positivo e significativo no rendimento da extração (JESSOP & SUBRAMANIAM, 2007).

O uso de tecnologia supercrítica foi muito eficiente neste trabalho, uma vez que os valores de extração obtidos com etanol e metanol na extração de Soxhlet são similares ao maior rendimento obtido nas extrações $scCO_2 + EtOH$. O que permite uma redução da carga de solvente orgânico de alta polaridade e tempos de processo mais curtos.

Analisando as curvas de extração (Figura 10), observou-se alta taxa de extração em até 30 minutos do processo e rápida redução na taxa de extração nos minutos subsequentes, reduzindo o tempo em 12 vezes quando comparado com a extração de Soxhlet, que necessita de altos de tempos de extração para avaliar a influência da polaridade do solvente.

Além disso, as extrações com $scCO_2$ são caracterizadas pelo uso de solventes não tóxicos (GRAS) e baixa temperatura de extração. É assim considerado um processo verde, rápido e permite processos contínuos de extração sem a demanda de calor pela evaporação do solvente (Lapkin et al., 2006; Martinez-Correa et al., 2017).

Comportamento semelhante foi relatado por outros autores para diferentes matrizes sólidas (MICHIELI et al., 2005; MICHIELIN et al., 2009; MESOMO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2018).

4.2 Potencial antioxidante dos extratos

O poder antioxidante de um extrato pode ser atribuído ao seu conteúdo de compostos fenólicos. Estes são incluídos na categoria de inibidores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da auto oxidação dos lipídios. Além captura de radicais livres, esses compostos atuam como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI et al., 1995).

O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado a partir da capacidade de eliminação do radical DPPH e expressos em concentração inibitória (IC_{50}). o menor valor de IC_{50} está associado à alta capacidade antioxidante (ZHU et al., 2011). Os valores obtidos mostram o maior potencial antioxidante de extratos provenientes das amostras secas.

Tabela 14. Resultados da atividade antioxidante expressa na concentração inibitória (IC_{50}) dos óleos obtidos por extração com Soxhlet e fluido supercrítico.

IC_{50} (g g⁻¹)

Extracção	Solventes	Amostra seca	Amostra úmida
Soxhlet	Hexano	2,91±0,47 ^a	-
	Éter de Petróleo	1,75±1,65 ^e	-
	Acetato de Etila	2,93±0,84 ^a	-
	Acetona	0,79±0,27 ^c	1,50±0,07 ^c
	Etanol	1,57±1,20 ^d	1,16±0,50 ^d
	Metanol	1,82±0,76 ^f	0,78±0,75 ^b
	Água	0,55±0,84 ^b	0,67±0,79 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Como mostrado na tabela 3, o extrato com maior potencial antioxidante foi obtido com água, para ambas as amostras. Os valores de concentração inibitória variam de 0,55 g g⁻¹ a 2,91 g g⁻¹ para amostras secas e 0,67 g g⁻¹ a 1,50 g g⁻¹ para amostras úmidas. Dados estatísticos mostram que esses valores diferem significativamente ($p > 0,05$).

De acordo com Apak et al., (2007), tal fato ocorre devido o radical DPPH apresentar inacessibilidade estérica para moléculas grandes, como é o caso da maioria dos compostos lipídicos.

O potencial antioxidante dos extratos proveniente das extrações por fluido supercrítico também foi medido. Os resultados obtidos estão apresentados em concentração inibitória (IC₅₀), quantidade necessária para eliminar 50% dos radicais livres, e em capacidade equivalente ao radical trolox (TEAC).

Tabela 15. Potencial antioxidante de extratos de soja obtidos por extração com fluido supercrítico em diferentes condições

Extração	Solvente	Condição	Atividade Antioxidante	
			IC ₅₀ (g g ⁻¹)	µm Trolox g ⁻¹
Fluído Supercrítico	CO ₂ + EtOH	15 MPa - 40°C	0.28±0.73 ^c	976,74±0.01 ^d
		15 MPa - 80°C	0.34±1.25 ^d	848,59±0.02 ^a
		25 MPa - 40°C	0.18±2.31 ^b	903,41±0.01 ^c
		25 MPa - 80°C	0.17±0.79 ^a	984,89±0.01 ^e
		20 MPa - 60°C	0.34±1.20 ^d	884,89±0.01 ^b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

De acordo com os valores reportados na tabela 15, a maior atividade antioxidante, correspondente a um IC₅₀ de 0,17 g g⁻¹ e 984 µm Trolox g⁻¹ foi

apresentada por extratos sob condições de alta temperatura (80 °C) e pressão (25 MPa). Tais extratos foram capazes de inibir 94,09% do radical DPPH. Os valores apresentados diferem significativamente dos demais ($p < 0,05$).

Os resultados da tabela 15 mostram que os menores valores de potencial antioxidante ($0,34 \text{ g g}^{-1}$) foram obtidos para os ensaios em que as condições utilizadas eram de 15 Mpa e 80°C e 20 Mpa e 60°C. Os mesmos apresentavam um valor antioxidante de 848.59 e 884.90 $\mu\text{m Trolox g}^{-1}$, respectivamente, e apresentaram potencial para inibição do radical DPPH de 89%. Ambos os resultados não mostraram diferença significativa ($p < 0,05$).

Segundo Benelli et al., (2010), tal comportamento aleatório pode estar associado a diferentes compostos extraídos em cada conjunto de condições experimentais, refletindo em variações no potencial antioxidante. Comparando-se os tipos de extração utilizados, a extração com $\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$ mostrou-se uma técnica viável, uma vez que permitiu a extração de extratos cerosos de maior qualidade quando comparado aos extratos obtidos por extração com solvente orgânico. Os extratos obtidos por $\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$ apresentaram potencial antioxidante 3,23 vezes maior. Além disso, é um processo que elimina o uso excessivo de solventes tóxicos, como o metanol.

4.3 Teor de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos encontrados nos extratos são frequentemente associados a outras biomoléculas, como proteínas, carboidratos, lipídios, terpenos, clorofila e outros compostos orgânicos (AJILA et al., 2011). Os ácidos fenólicos são compostos antioxidantes naturais encontrados em plantas e alimentos vegetais, recebendo uma tremenda atenção devido a seus papéis na saúde humana (D'ARCHIVIO et al., 2007; DAI & MUMPER, 2010).

A soja (*Glycine max L.*) é cada vez mais reconhecida como uma fonte de compostos polifenólicos, entre os quais os ácidos fenólicos são particularmente interessantes por apresentarem papéis protetores contra o câncer e doenças cardíacas (Kajdzanoska et al., 2011).

Os valores de compostos fenólicos em extração Soxlet encontrados variam de $0,13 \text{ mg EAG g}^{-1}$ a $1,30 \text{ mg EAG g}^{-1}$ de amostras secas e $0,38 \text{ mg EAG g}^{-1}$ a $1,0 \text{ mg EAG g}^{-1}$ para extrações de amostras úmidas, variando de acordo com o solvente utilizado (Tabela 16). O uso de água como solvente foi capaz de extrair quantidade significativamente maior de compostos fenólicos em ambas as amostras ($p \leq 0,05$)

comparada com os outros solventes. Solventes de baixa polaridade, como hexano (1,46 mg EAG g⁻¹), éter de petróleo (4,25 mg EAG g⁻¹) e acetato de etila (5,76 mg EAG g⁻¹) apresentaram menor eficiência na extração de tais compostos com amostras seca, bem como acetona (3,89 mg EGA g⁻¹) na extração com amostra úmida.

Tabela 16. Compostos fenólicos (mg GAE g⁻¹) obtidos por extração Soxhlet com amostra seca e amostra úmida utilizando diferentes solventes.

Solvente	Compostos fenólicos (mg EAG g ⁻¹)	
	Amostra seca	Amostra úmida
Hexano	0,13±0,02 ^a	-
Éter de Petróleo	0,42±0,02 ^b	-
Acetato de Etila	0,58±0,11 ^d	-
Acetona	0,98±0,03 ^e	0,38±0,05 ^a
Etanol	0,96±0,023 ^f	0,88±0,04 ^c
Metanol	0,46±0,06 ^c	0,69±0,06 ^b
Água	1,30±0,03 ^g	1,05±0,01

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (p > 0,05).

Segundo Naczki e Shahidi (2004), a metodologia de determinação de fenóis totais não quantifica somente os grupos fenólicos presentes no extrato, mas as proteínas que são extraíveis pelo sistema de solventes utilizados. De forma geral, tais compostos caracterizam-se como polares. Contudo, alguns destes apresentam uma ampla faixa de polaridade, podendo também ser solubilizados por CO₂ supercrítico (ZIAKOVA & BRANDSTETEROVA, 2002).

A tabela 17, mostra os valores de fenólicos totais obtidos nas extrações por fluido supercrítico para todas as condições testadas. Os valores obtidos variam de 1,15 a 1,39 mg EAG g⁻¹. Os valores mostraram diferença estatística (p > 0,05).

Tabela 17. Compostos fenólicos (mg EAG g⁻¹) obtidos por extração de fluido supercrítico em diferentes condições

Extração	Condição	Compostos fenólicos (mg EAG g ⁻¹)
Fluído supercrítico	15 MPa - 40°C	1,22±0,075 ^a
	15 MPa - 80°C	1,15±0,01 ^{ab}
	25 MPa - 40°C	1,24±0,01 ^a
	25 MPa - 80°C	1,39±0,009 ^c
	20 MPa - 60°C	1,05±0,02 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (p > 0,05).

Observa-se que a condição mais eficiente na extração de tais compostos foi a de elevada pressão e temperatura (1,39 mg EAG g⁻¹). O mesmo comportamento foi

observado quanto ao potencial antioxidante das amostras. Outros estudos demonstram esta correlação entre conteúdo de substâncias fenólicas e atividade antioxidante (Campos et al., 2014; Veber et al., 2015).

Existem uma série de sistemas de extração e solventes descritos na literatura para serem empregados na recuperação desses compostos. No entanto, não existe um sistema adequado para o isolamento de todos ou classe específica de compostos fenólicos naturais.

4.4 Estabilidade oxidativa

A termogravimetria permitiu avaliar a estabilidade térmica das amostras sob atmosfera de ar sintético e temperatura controlada. Na Figura 11 são apresentadas as curvas TG das seis amostras analisadas.

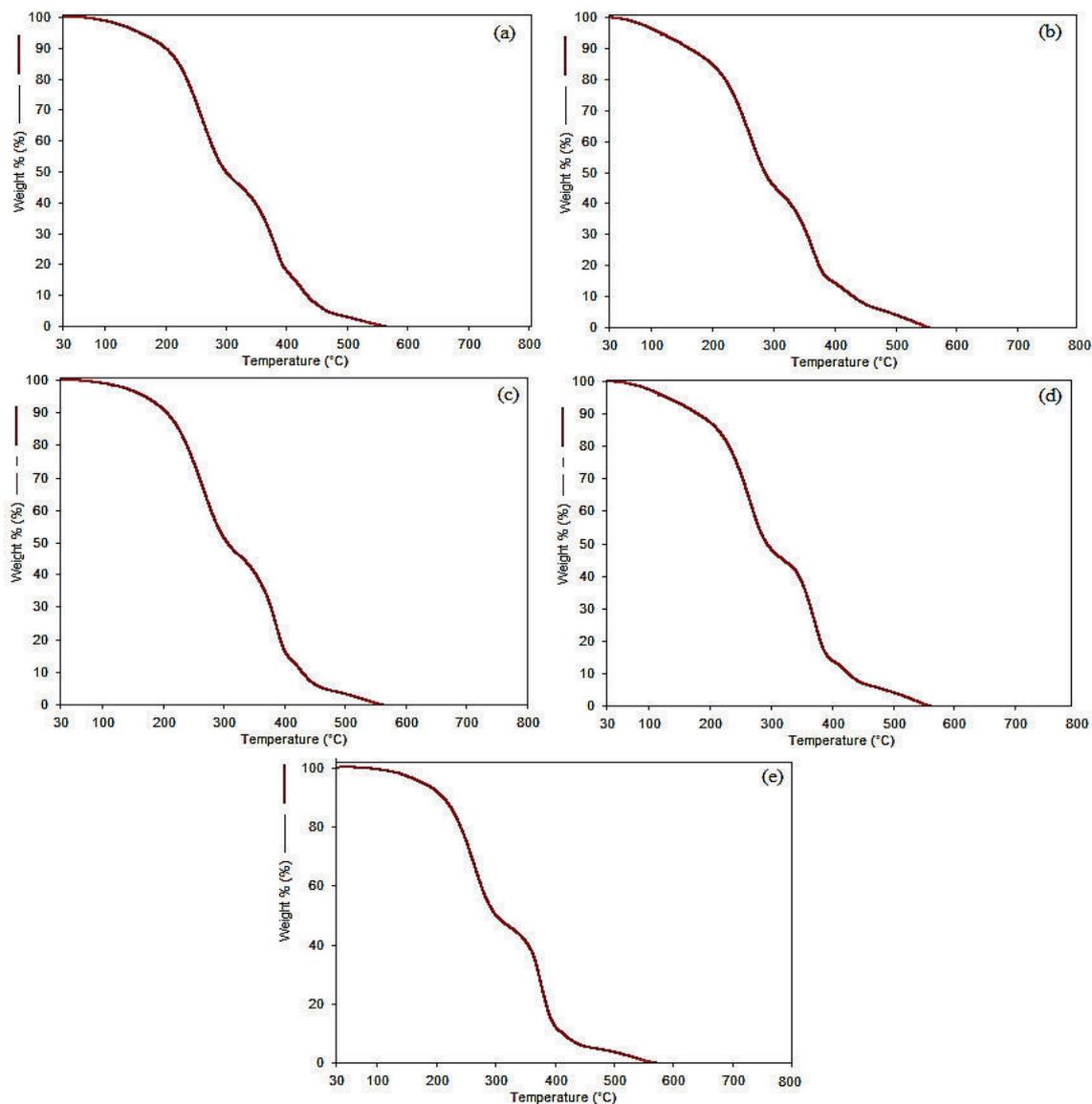


Figura 11. Curva TG na atmosfera de ar sintético das amostras extraídas por SCCO₂ + EtOH sob diferentes condições de temperatura e pressão. a) 15 MPa - 40 ° C; (b) 15 MPa - 80 ° C; (c) 25 MPa - 40; (d) 25 MPa - 80 ° C; (e) 20 MPa - 60 ° C.

As curvas termogravimétricas dos óleos apresentaram perfis semelhantes com perda de massa (93.0 a 98.7%) em cinco a mais etapas, entre 145 a 540 °C, relativas à volatilização e/ou decomposição do óleo. As curvas indicam uma decomposição progressiva do óleo. Observa-se, no intervalo de temperaturas de 30 °C até a temperatura de início da primeira etapa de perda de massa, ocorre uma perda de massa contínua e de pequena intensidade. Tal perda corresponde a pequenas porcentagens, provavelmente devido à volatilização de resíduos de etanol remanescente da extração dos óleos e ácidos graxos livres presentes em pequenas

quantidades em amostras lipídicas do óleo de soja, tais como os ácidos palmítico, palmitoleico e esteárico (Garcia et al, 2004).

5. Conclusão

- O rendimento de extração por solventes orgânicos é significativamente afetado por suas polaridades.
- O uso de solventes com maior polaridade resultou em melhores rendimentos, apresentando também maior teor de potencial antioxidante e extraiu compostos fenólicos.
- Houve boa correlação entre o teor total de fenólicos e a capacidade antioxidante dos extratos.
- A extração por fluido supercrítico mostrou que o aumento da pressão a uma temperatura fixa resultou em um aumento na eficiência de extração, sendo a mais eficiente a alta pressão e temperatura.
- O pico de remoção mais alto do extrato de soja ocorre durante os primeiros 30 minutos do processo, e durante esse período a taxa de extração aumenta quase linearmente devido à transferência de massa facilitada pela extração da superfície das partículas. Após este período, a quantidade de extrato obtido é constante, mostrando que longos períodos de extração não são necessários para a extração máxima do extrato.
- A extração com scCO₂ + EtOH permitiu uma melhora significativa no rendimento das extrações, demonstrando a viabilidade técnica do processo, permitindo a obtenção de moléculas de alto potencial bioativo e a redução da carga de solventes utilizada.

REFERÊNCIAS

ADEYEMO, S. M., & ONILUDE, A. A. Enzymatic reduction of anti-nutritional factors in fermenting soybeans by *Lactobacillus plantarum* isolates from fermenting cereals. *Nigerian Food Journal*, 31, 84–90, 2013.

ABERNATHY, L., FOUNTAIN, M., ROTHSTEIN, S., DAVID, J., YUNKER, C., ROKOWSKI, J., HILLMAN, G. Soy isoflavones promote radioprotection of normal

lung tissue by inhibition of radiation-induced activation of macrophages and neutrophils. *Journal of Thoracic Oncology*, 10, 1703–1712, 2015.

T. ALBISHI, J.A. JOHN, A.S. AL-KHALIFA, F. SHAHIDI. **Phenolic content and antioxidant activities of selected potato varieties and their processing by-products**. *J. Funct. Foods*, 5, pp. 590-600, 2013.

ANAGNOSTOPOULOU, M. A.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V. P.; ASSIMOPOULOU, A. N. BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 1, p.19-25, 2006.

APELBLAT A, ZAHAROSKIN T, WISNIAK J, KORNGOLD E. Extraction of oleic acid from soybean oil and jojoba oil – Phase diagrams. **J. Am. Oil Chem.** 73: 239-244, 1996.

ALMEIDA, P. P., MEZZOMO, N., FERREIRA, S. R. S. Extraction of *Menthaspicata* L. volatile compounds: evaluation of process parameters and extract composition. **Food and Bioprocess Technology**, 5, 548–559, 2012.

ALAMDARI, D. H.; GHAYOUR-MOBARHAN, M.; TAVALLAIE, S.; PARIZADEH, M. R.; MOOHEBATI, M.; GHAFoori, F.; KAZEMI-BAJESTANI, S.; MOHAMMAD, R.; PALETAS, K.; PEGIOU, T.; KOLIAKOS, G. Prooxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. **Clin. Biochem.**, 41 (6), pp. 375–380, 2008.

AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO, J. R. Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* – liberation and extraction of phenolic antioxidants. **Food Chemistry, London**, v. 126, n. 3, p. 1071-1080, 2011.

ATTARD, T.M.; BAINIER, C.; REINUD, M.; LANOT, A.; MCQUEEN-MAISON, S.; CAÇA, A. Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and Cannabidiol (CBD) from hemp wastes. **Ind. Crops Prod**, v. 112, p. 38-46, 2018.

ATTARD, T. M.; MCELROY, C. R.; REZENDE, C. R.; POLIKARPOV, I.; CLARK, J. H.; HUNT. A. J. Sugarcane waste as a valuable source of lipophilic molecules. **Ind. Crops Prod.**, 76, pp. 95-103, 2015.

BATISTA E, MONNERAT S, KATO K, STRAGEVITCH L, MEIRELLES AJA . Liquid-liquid equilibrium for systems of canola oil, oleic acid and short-chain alcohols. **J. Chem. Eng. Data** 44: 1360-1364, 1999.

BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. 2010. **Handbook of essencial oils: science, technology and applications**. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/61792728/Handbook-of-Essential-Oils-ScienceTechnology-and-Applications>>. Acesso em 06 de Junho de 2018.

BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA, A. JR.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. **Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition**. **J. Supercritical Fluids**, 55 pp. 132-141, 2010.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chem.**, 68 pp. 457-462, 2000.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ. J.**, 5 (1), pp. 9–19, 2012.

BRUM , A. A.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. B. A. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Quím Nova** , v. 32, pp. 849 – 854, 2009.

CAETANO, N. S.; SILVAA, V. F. M.; MATA, T. M. Valorization of coffee grounds for biodiesel production. **Chemical Engineering Transactions**, pp. 267-272, 2012.

CAMPOS, R. et al. Multivariate analysis between the phytochemical features and antioxidant properties of the stems of *Bauhinia glabra* jacq. (FABACEAE). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.8, p.151-155, 2014

CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; ANKLAM, E.; TREOBALD, A.; VON HOLST, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic

determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach. **J. Chromatography A**, 912, pp. 61-71, 2001.

CASTRO, M.D.L. de; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.2383–2389, 2010.

CONG-CONG, X.; BING, W.; YI-QIONG, P.; JIAN-SHENG, T.; TONG, Z. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chin. J. Nat. Med.**, 15, 10, 2017.

CHEN, X.R.; LUO, Y.J.; QI, B.; WAN, Y. W. Simultaneous extraction of oil and soy isoflavones from soy sauce residue using ultrasonic-assisted two-phase solvent extraction technology. *Sep. Purif. Technol.*, 128, pp. 72-79, 2014.

CORREA, M.; MESOMO, M. C.; PIANOSKI, K. E.; TORRES, Y. R.; CORAZZA, M. L. Extraction of inflorescences of *Musa paradisiaca* L. using supercritical CO₂ and compressed propane. **J. Supercrit. Fluids**, 113, pp. 128-135, 2016.

D'Archivio, M.; Filesi, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann. Ist. Super. Sanita.**, 43, pp. 348-361, 2007.

DAGOSTIN, J. L. A; CARPINE, D.; CORAZZA, M. L. Extraction of soybean oil using ethanol and mixtures with alkyl esters (biodiesel) as co-solvent: Kinetics and thermodynamics. **Industrial Crops and Products**, v. 4, p. 67-95, 2015.

DANG, L. A. R.; NUR, Y. A. R.; ANISAH, J. S. A.; SHARIFUDIN, K. L.; Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 4, 1, 33-38, 2015.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, 15, pp. 7313-7352, 2010.

DANLAMI, J.M.; ARSAD, A.; ZAINI, M.A.A.; SULAIMAN, H. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Rev. Chem. Eng.**, 30, pp. 605-626, 2014.

DA PORTO, C.; NATOLINO, A. Supercritical fluid extraction of polyphenols from grape seed (*Vitis vinifera*): study on process variables and kinetics. **J. Supercrit. Fluids**, 130 (2017), pp. 239-245.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2441-2469, 2006.

DEL-VALLE, J. M.; AGUILERA, J. M. Revision: Extracción con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos. **Food Science and Technology International**, v. 5, n. 1, p. 1-24, 1999.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: biological activity and active metabolites. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 7, p. 1671-1701, 2011.

DE SOUZA, A. R. C.; GUEDES, A. R.; RODRIGUEZ, J. M. F.; BOMBARDELLI, M. C. M.; CORAZZA, M. L. Extraction of *Arctium Lappa* leaves using supercritical CO₂ + ethanol: Kinetics, chemical composition, and bioactivity assessments. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, p. 137-146, 2018.

DEVALARAJA, S.; JAIN, S.; YADAV, H. Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 7, p. 1856-1865, 2011.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMINGUÉZ, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2441-2469, 2006.

ĐUROVIĆ, S.; NIKOLIĆ, B.; LUKOVIĆ, N.; JOVANOVIĆ, J.; STEFANOVIĆ, A.; ŠEKULJICA, N.; MIJIN, D.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, J. The impact of high-power ultrasound and microwave on the phenolic acid profile and antioxidant activity of the extract from yellow soybean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 223-231, 2018.

EFHYMIOPOULOS, I.; HELLIER, P.; LADOMMATOS, N.; RUSSO-PROFILI, A.; EVELEIGH, A.; ALIEV, A.; KAY, A.; MILLS-LAMPTEY, B. Influence of solvent selection and extraction temperature on yield and composition of lipids extracted from spent coffee grounds. **Industrial Crops and Products**, v. 119, p. 49-56, 2018.

GO, J.; KIM, J. E.; KWAK, E. M.; KOH, E. K.; SONG, S. H.; SUNG, J. E. Neuroprotective effects of fermented soybean products (Cheonggukjang) manufactured by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383 on trimethyltin-induced cognitive defects mice. **Nutritional Neuroscience**, 19 (6) (2016), pp. 247-259.

GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares**. 1 Edição d, Edição do Autor, São Paulo (1983).

GÖTZ, G. K. E.; WOLF, M. IN: GRIMALT, J. O.; DORRONSORO, C. (Eds.), Organic Geochemistry: Developments and Applications to Energy, Climate, **Environment and Human History**, A.I.G.O.A., Donostia-San Sebastian, p. 780, 1995.

GUAN-LIN, C.; SONG-GEN, C.; YI, X.; NAN, L. F. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 30 flowers. **Industrial Crops and Products**, 111, 430-445, 2018.

GUEDES, A. R.; REDER, A.; DE SOUZA, C.; ZANOELO, E. F.; CORAZZA, M. L. The journal of supercritical fluids extraction of citronella grass solutes with supercritical CO₂, compressed propane and ethanol as cosolvent: kinetics modeling and total phenolic assessment. **J. Supercrit. Fluids**, 137, pp. 16-22, 2018.

GRIESHOP, C. M.; FAHE JR., G. C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 5, p. 2669-2673, 2001.

HAMINIUK C. W.I., PLATA-OVIEDO M. S. V., GUEDES A. R., STAFUSSA A. P., BONA E., CARPES S. T. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **Journal of Food Science and Technology**, v.46, p. 1529-1537, 2011.

HARIKESH, B. S.; SINGH, N.; SATYENDRA, P.; CHANDRA, S. N.; Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. **Bioresource Technology**, 101, 6444-6453, 2010.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal the Chromatography A**, v. 1217, p. 2495-2511, 2010.

HOLLENDER, J.; SHNEINE, J.; DOTT, W.; HEINZEL, W.; HAGEMANN, H. W.; GÖTZ, G. K. E. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. **J. Chromatogr. A**, 776, pp. 233-243, 1997.

JESSOP, P. G.; SUBRAMANIAM, B. **Gas-Expanded Liquids**. pp. 2666-2694, 2007.

JUNG, C. H.; SEOG, H; CHOI, I; PARK, M. W.; CHO, H. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 36, n. 3, p. 266-274, 2006.

KAJDZANOSKA, M.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M. Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. **J. Agric. Food Chem.**, 59, pp. 5272-5278, 2011.

KIM, D.J.; JEONG, Y. J.; KWON, J. H.; MOON, K.D.; KIM, H.J.; JEON, M.S. Beneficial effect of Chungkukjang on regulating blood glucose and pancreatic β -Cell functions in C75BL/KsJ-*db/db* mice. **Journal of Medicinal Food**, 11 (2), pp. 215-22, 2008.

KNEZ, Z.; HABULIN, M. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, p. 29-42, 2002.

KUK MS, TETLOW R, DOWD MK. Cotton seed extraction with mixture of acetone and hexane. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 82: 609-612, 2005.

KO, H.; LEE, J. Y.; JANG, M. G.; SONG, H.; KIM, S. J. Seasonal variations in the phenolic compounds and antioxidant activity of *Sasa quelpaertensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 506–512, 2018.

KWAK, C. S.; LEE, M. S.; PARQUE, S. C. Higher antioxidant properties of Chungkookjang, a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation. **Nutrition Research**, pp. 719-727, 2007.

KWON, D. Y.; HONG, S. M.; AHN, I. S.; KIM, M. J.; YANG, H. J.; PARK, S. Isoflavonoids and peptides from meju, long-term fermented soybeans, increase insulin sensitivity and exert insulinotropic effects in vitro. **Nutrition**, 27 (2), pp. 244-252, 2011.

LAPKIN, A. A.; PLUCINSKI, P. K.; CUTLER, M. Comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin. **J. Nat. Prod.**, 69 ,pp. 1653-1664, 2006.

LIN, C. H.; CHOU, C. C. Suppression on the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide by the methanol extracts of soybean koji prepared with various filamentous fungi. **International Journal of Food Microbiology**, 110 (1), pp. 19-23, 2006.

MANIC MS, NAJDANOVIC-VISAK V, DA PONTE MN, VISAK ZP. Extractio of free fatty acids from soybean oil using ionic liquids or polyethyleneglycols. **AIChE J.** 57: 1344-1355, 2011.

MATTOS, G. **Extração e quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides de eugenia pyriformiscambess usando diferentes solventes**. Trabalho de conclusão de curso. Campo Mourão, 2013.

MARTINEZ-CORREA, H.; BITENCOURT, R.; KAYANO, A. C.; MAGALHAES, P. M.; COSTA, F. T.; CABRAL, F. Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO₂, ethanol and water. **Industrial Crops and Products**. v. 95, p. 535-542, 2017.

MENEZES, M.L.; MEDEIRO, J.; KAJIHARA, K. Y.; SAKAMOTO, M. S. C.; Barro, S. T. D.;Pereira, N. C. **Estudo do processo de extração por soxhlet do oleo de semente de uva (study of the extraction process by Soxhlet method of grape seed oil)**. XLII Congr Bras De Eng Agríc, pp. 1-8, 2014.

MESOMO, M.C.; SCHEER, A. de P.; PEREZ, E.; NDIAYE, P.M.; CORAZZA, M.L. Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v.71, p.102– 109, 2012.

MICHIELIN, E. M.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, 100, pp. 6615-6623, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L. F. V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **J. Supercritical Fluids**, 33, pp. 131-138, 2005.

MIRA, N. V. M.; BARROS, R.M.C.; SCHIOCCHET, M.A.; NOLDIN, J.A.; LANFER-MARQUEZ, U.M. **Extraction, analysis and distribution of phenolic acids in pigmented and non-pigmented genotypes of rice (*Oryza sativa* L.)**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, pp. 994-1002, 2008.

MORAIS, Álvaro A. C.; SILVA, Alcino L. **Soja: suas aplicações**. São Paulo: Medsi, 1996.

MOHSEN-NIA M, NABAVI HR, MODARRESS H. Liquid-liquid equilibrium for system corn oil plus oleic acid plus ethanol plus water. **Phys. Chem. Liq.** 45: 623-629, 2007.

MOKTAN, B.; SAHA, J.; SARKAR, P. K. Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to cinema. **Food Research International**, 41 (6), pp. 586-593, 2008.

NESSA, F.; ISMAIL, Z.; MOHAMED; N.; HARIS, M.R.H.M. Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumeabalsamifera* DC leaves. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 2, p. 243-252, 2004.

OLIVEIRA, A. C. de.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

PIGHINELLI, A.L.M.; PARK, T K.J.; RAUEN, A.M.; OLIVEIRA, R. A. **Otimização da prensagem de grãos de girassol e sua caracterização (optimization of sunflower grain pressing and characterization)**. Rev Bras De Eng Agríc e Ambient, 13 (2009), pp. 63-67.

PRONYK, C.; MAZZA, G. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. **Journal of Food Engineering**, 95, 215-226, 2009.

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. **Food Science and Technology International**, London, v. 8, n. 5, p. 269-284, 2002.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.38, p.146–166, 2006

ROSSETO, R. E.; SANTOS, R. F.; BASSEGIO, D.; SECCO, D.; SOUZA, S. N. M.; CHAVES, L. I. **Efeito da secagem na extração de óleos em plantas com potencial energético (drying effect on oil extraction of in plants with potential energy)**. Acta Iguazu, v. 1, pp. 72-80, 2012.

RUCKENSTEIN, E.; SHULGIN, I. Entrainer effect in supercritical mixtures. **Fluid Phase Equilib.**, 180, pp. 345-359 2001.

SAHENA, F. Z Aidul, I. S. M.; JINAP, S.; KARIM, A. A.; ABBAS, K. A.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p.240–253, 2009.

SANTOS, R. M.; OLIVEIRA, H. M. N.; OLIVEIRA, E. J.; AZEVEDO, S. H. G.; JESUS, A. A.; MEDEIROS, M.; DARIVA, C.; SOUSA, E. M. B. D. The journal of supercritical fluids supercritical fluid extraction of Rumex acetosa L. roots: yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. **J. Supercrit. Fluids**, 122, pp. 1-9, 2017.

SETCHELL, K. D. R., BROWN, N. M., ZHAO, X., LINDLEY, S. L., HEUBI, J. E., KING, E. C., Et al. Soy isoflavone phase II metabolism differs between rodents and

humans: Implications for the effect on breast cancer risk. **American Journal of Clinical Nutrition**, 94, 1284–1294, 2011.

SHAHID, F. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Lancaster: **Technomic Publishing Company**, Inc. p. 321, 1995.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects—A review. **J. Funct. Foods**, 18 (Part B), pp. 820-897, 2015.

SHIN, S. K.; KWON, J. K.; JEONG, Y.; JEON, S. M.; CHOI, J. Y. Supplementation of Cheonggukjang and red Ginseng Cheonggukjang can improve plasma lipid profile and fasting blood glucose concentration in subjects with impaired fasting glucose. **Journal of Medicinal Food**, 14 (1–2), pp. 108-113, 2011.

SHIN, J. R.; LEE, J. S.; YONG, I. C.; KIM, Y. W.; LEE, H. W. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. **Process Biochemistry**, 44 (4), pp. 490-493, 2009.

SILVA, D. C. N.; BRESCIANI, L. F. V.; DALAGNOL, R. L.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S.; Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: process parameters and composition profiles. **Food and Bioproducts Processing**, 87, pp. 317-326, 2009.

SIN, E.H.K; MARRIOTT, R.; HUNT, A. J.; CLARK, J. H. Identification, quantification and Chrastil modelling of wheat straw wax extraction using supercritical carbon dioxide. **C. R. Chim.**, 17 , 293-300, 2014

SINGH, H. B.; SINGH, B. N.; SINGH, S. P.; NAUTIYAL, C. S. Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. **Bioresource Technology**, 101 (16), pp. 6444-6453, 2010.

SINKO, P. J. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, 5. Ed. Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins**, 2006.

SOLTANI, S.; MAZLOUMI, S. H. A new empirical model to correlate solute solubility in supercritical carbon dioxide in presence of co-solvent. **Chem. Eng. Res. Des.**, 125, pp. 79-87, 2017.

SU, C. L.; CHEN, F. N.; WON, S. J. Involvement of apoptosis and autophagy in reducing mouse hepatoma ML-1 cell growth in inbred BALB/c mice by bacterial fermented soybean products. **Food and Chemical Toxicology**, 49 (1), pp. 17-24, 2011.

SU, C. L.; CHEN, F. N.; Wang, B. J.; SHEU, S.; WON, S. J. Supernatant of bacterial fermented soybean induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma Hep 3B cells via activation of caspase 8 and mitochondria. **Food and Chemical Toxicology**, 45 (2), pp. 303-314, 2007.

SANTOS, R. F.; FORNASARI, C. H.; BASSEGIO, D.; SOUZA, S. N. M.; SECCO, D. Optimization of oil extraction from high energetic potential plants performed through drying and solvent extraction methods. **Afr J Biotechnol**, v. 12, pp. 6761-6765, 2013.

SHAHID, F. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications. Lancaster: **Technomic Publishing Company**, Inc. p. 321, 1995

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects—A review. **J. Funct. Foods**, 18 (Part B), pp. 820-897, 2015.

SIMÕES, C. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Ed. Universidade-UFRGS e Ed. Da UFSC. Porto Alegre e Florianópolis, p. 821, 1999.

STEFFANI, E. **Modelagem Matemática do Processo de Extração Supercrítica de Óleo Essencial de Ho-Sho (Cinnamomum camphora Nees & Eberm var. linaloolifera Fujita) Utilizando CO₂**. 92 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SINGH, K. K.; WIESENBORN, D. P.; TOSTENSON, K.; KANGAS, N. Influence of moisture content and cooking on screw pressing of crambe seed. **J Am Oil Chem Soc**, v. 79, pp. 165-170, 2002.

SILVA, F. A.; BORGES, F.; GUIMARÃES, C.; LIMA, J. L. F. C.; MATOS, C.; REIS S. Phenolic acids and derivatives studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. **J. Agricultural and Food Chemistry**, 48, pp. 2122-2126, 2000.

SOUZA-SARTORI, J. A. de; SCALISE, C.; BAPTISTA, A. S.; LIMA, R. B.; AGUIAR, C. L. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com capacidade antioxidante total. **Biosci. J.**, v. 29, p. 297-307, 2013.

SPARKS, D.; HERNANDEZ, R.; ZAPPI, M.; BLACKWELL, D.; FLEMING, T. Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane. **Am. Oil Chem. Soc.**, 83, pp. 885-891, 2006.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo (Physical and chemical characterization of avocado fruit aiming to their potential for oil extraction). **Rev Bras De Frutic**, v. 26, pp. 17-23, 2004.

TEIXEIRA, L. G.; GHAZANI, S. M.; CORAZZA, M. L.; MARANGONI, A. G.; RIBANI, R. H. Assessment of subcritical propane, supercritical CO₂ and Soxhlet extraction of oil from sapucaia (*Lecythis pisonis*) nuts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 122-132, 2018.

PALMA, M.; TAYLOR, L. T. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 5044-5048, 1999.

PANANUN, T.; Montalbo-Lomboy, M.; Noomhorm, A.; Grewell, D.; Lamsal, B. High-power ultrasonication-assisted extraction of soybean isoflavones and effect of toasting. **LWT – Food Sci. Technol.**, 47, pp. 199-20, 2012.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 340-372, 2010.

PICHAJ, E.; KRIT, S. Optimization of solid-to-solvent ratio and time for oil extraction process from spent coffee grounds using response surface methodology. **ARPN J. Eng. Appl. Sci.**, 10, pp. 7049-7052, 2015.

VALDEZ, P. J.; DICKINSON, J. G.; SAVAGE, P. C. Characterization of product fractions from hydrothermal liquefaction of *Nannochloropsis* and the influence of solvents. **Energy Fuel**, v. 25, pp. 3235-3243, 2011.

VEBER, J. et al. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista brasileira plantas medicinais**, v.17, n.2, p.267-273, 2015.

WAN, P. J.; PAKARINEN DR, HRON RJ, RICHARD OL, CONKERTON EJ. Alternative hydrocarbon solvents for cottonseed extraction. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 72: 653-659, 1995.

WANG, Y.; ZHANG, X.; CHEN, G.; YU, J.; YANG, L.; GAO, Y. Antioxidant property and their free, soluble conjugate and insoluble-bound phenolic contents in selected beans. **J. Funct. Foods**, 24, pp. 359-372, 2016.

WENNERSTEN, R. Extraction of organic compounds. Chap 9. In: In: RYDBERG, J.; MUSIKAS, C.; CHOPPIN, G. R. **Principles and practices of solvent extraction**. New York: Marcel Dekker, p. 115-356, 1992.

YOUNG, V. R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **Journal American Dietetic Association**, v. 91, n. 7, p. 828-835, 1991.

ZIAKOVA, A.; BRANSSTETEROVÁ, E.; MATTUSCH, J.; WENRICH, R. Detection of Antioxidative Activity of Plant Extracts at the DNA-Modified Screen-Printed Electrode. **Sensors**, 2(1), 1-10, 2002.

ZHANG, M.W.; ZHANG, R.F.; ZHANG, F.X.; LIU, R.H. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, pp. 7580-7587, 2010.

ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; YANG, C. Y.; ZHANG, Y .
Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 Chinese black
soybean (*Glycine Max* L. Merr.) varieties. **Journal of Agricultural and Food
Chemistry** , v. 59 , pp. 5935 – 5944, 2011.

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