UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Estudo das interações isoflavonas e proteínas da soja:
efeitos sobre a digestibilidade e capacidade antioxidante

ANA CRISTINA LOPES BARBOSA

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013651

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Barbosa, Ana Cristina Lopes
B238es Estudo das interações isoflavonas e proteínas da soja: efeitos
sobre a digestibilidade e capacidade antioxidante / Ana Cristina
Lopes Barbosa. -- São Paulo, 2008.
140p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador: Genovese, Maria Inés

1. Soja : Proteína : Ciência dos alimentos 2. Soja : Isoflavona :
Ciência dos alimentos 1. T. II. Genovese, Maria Inés, orientador.

641.35655 CDD

ANA CRISTINA LOPES BARBOSA

Estudo das interações isoflavonas e proteínas da soja:
efeitos sobre a digestibilidade e capacidade antioxidante

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Maria Inés Genovese
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 08 de agosto de 2008.

O tempo é muito lento para os que esperam,
muito rápido para os que têm medo,
muito longo para os que lamentam,
muito curto para os que festejam.
Mas, para os que amam, o tempo é eternidade.

William Shakespeare

Dedico este trabalho
Em especial, aos meus pais Miguel e Elizabeth
que me deram a oportunidade de querer e poder algo mais e
o amor que tive em toda minha vida.
Aos meus irmãos Marcel, Caio, Agda e Junior
pelo incentivo enorme

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente em minha vida, abrindo-me janelas quando portas eram fechadas, dando-me forças para transpor os obstáculos e sabedoria para alcançar os objetivos. Por ser o alicerce da minha vida e a força que muitas vezes me deu ânimo e a coragem de levantar e prosseguir até o fim dessa etapa.

Sinceros agradecimentos aos meus pais, aos meus irmãos, cunhados (Emerson e Lucia) e aos meus avôs (Christovam e Elisa) pela cumplicidade, pelo apoio, pelo conforto, pelo amor e principalmente pela compreensão da minha ausência em alguns momentos do convívio familiar. A presença deles na minha vida, e nos momentos de maior dificuldade, acima de tudo, mostraram o real significado das palavras: coragem e perseverança.

Agradeço a Prof^a Dra. Maria Inés Genovese pela orientação, pelo seu exemplo, incentivo, dedicação, confiança, apoio e amizade. Além da minha admiração por uma grande pesquisadora e mulher.

Agradeço a Cirlene e Daniella pela amizade eterna, amor incondicional, sempre me incentivando e me dando apoio para seguir em frente. Creio que a confiança, respeito e amizade são os melhores presentes que podemos receber.

Agradeço aos meus queridos primos Carol, Chris e Thais que mesmo distante sempre estiveram presente em minha vida.

Agradeço a Meg, Gabi, Mari pela amizade, pela alegria, pelo incentivo, e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço ao Thiago, Diogo, Tati, Ana e Marcela pela amizade, pela alegria, pelas horas de conversa e pelas noites de muitas baladas.

Um especial agradecimento a minha amiga Neuza, conselheira, irmã, e eterno exemplo de mulher batalhadora e brilhante. Que sempre esteve presente nos bons momentos e nos difíceis também, me ajudou em cada fase deste trabalho e me levantou em cada tombo, sempre com uma palavra amiga e um sorriso e abraço acalentador. Seu incentivo foi muito importante em todos esses anos, sou uma grande fã sua (em todos os sentidos, principalmente emocional.....rsrsrsrs).

Agradeço também a minha irmã e querida amiga Marcinha, você é muito especial em minha vida, sempre esteve ao meu lado, me incentivando, dando apoio para seguir em frente, me agüentado mesmo nos meus dias de mau humor (você também Neuza e os demais.....), me contemplando com horas e horas de conversas e trocas de informações e

experiências. E mesmo na época que você estudou fora, nunca estive distante, pois ficávamos horas conversando no skype, noite adentro, que perdíamos a noção do tempo.....

Agradeço a uma doce e maravilhosa pessoa, Mariana, minha estagiária que me ajudou muito nesta fase final da tese, acho que passei um pouco do meu conhecimento e praticidade do laboratório, aprendemos muitas coisas juntas, nos divertimos bastante e como não podia deixar de ser, nos tornamos grandes amigas.

Agradeço a Lúcia e a Márcia pela amizade construída nesses anos de convívio no laboratório, pela ajuda e principalmente pelo carinho.

Agradeço também aos professores do Departamento de Alimentos, Prof^a Beatriz, Prof^a Elizabeth, Prof. Eduardo, Prof. João Roberto, Prof. Franco Lajolo que em algum momento me brindaram com seu auxílio e contribuíram para minha formação.

Agradeço aos meus professores que colaboraram na minha formação acadêmica Marcia, Elizeu, Leonardo, Valdir e Thais, e em especial a Magali que sempre acreditou no meu potencial e foi a primeira a me incentivar nessa jornada e a grande amiga e orientadora Dr. Ana Lúcia do Ital (Campinas), que me encorajou a fazer a pós-graduação.

Há certas pessoas que agradecemos em nossas preces por coisas que apreciamos tanto, mas, por mais que tentemos, às vezes não conseguimos dizer as palavras que expressariam tudo isso. Agradeço de forma muito especial ao Adair, Aderuza, Adriana, Amanda, Any, Cintia, Claudinéia, Débora, Diully, Eliana, Fernanda, Janaína, Jacqueline, João Paulo, Kátia, Lena, Lucile, Malu, Marcela, Maurício, Milana, Paola, Priscila, Renato, Roberta, Silvia, Tânia, pela solidariedade e a amizade, e também pelas discussões que muito contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Ao pessoal da Secretaria de Alimentos e Nutrição Experimental, Mônica, Cléo, Edilson e Tânia, e da Secretaria de Pós-Graduação, Jorge e Elaine, sempre solícitos e gentis.

A CAPES pela bolsa, e à FAPESP pelo suporte financeiro do laboratório.

Sou grata a todos aqueles que de certa forma fizeram parte deste trabalho. Obrigada.

RESUMO

BARBOSA, A.C.L. **Estudo das interações isoflavonas e proteínas da soja: efeitos sobre a digestibilidade e capacidade antioxidante**. 2008. 140 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Embora a soja em grão seja pouco consumida pela população brasileira, seus derivados protéicos são utilizados como ingredientes em diversos alimentos e a tendência é um aumento significativo do seu uso com a aprovação pela FDA e pela ANVISA da alegação funcional referente ao consumo de proteína de soja. Em paralelo, um número crescente de pesquisas sobre as isoflavonas, fitoestrógenos presentes em quantidades significativas na soja, vem demonstrando diversos efeitos benéficos destes compostos, entre os quais a sua ação antioxidante, anticarcinogênica e hipocolesterolêmica. O objetivo foi estudar as interações entre isoflavonas e proteínas da soja, seu efeito na biodisponibilidade *in vitro* e *in vivo* e o status antioxidante das isoflavonas. Os resultados sugerem que a presença da proteína reduz a quantidade e leva a um retardo no tempo de absorção das isoflavonas em relação à administração na forma livre. O efeito sobre a capacidade antioxidante do plasma e sobre a atividade e expressão gênica das enzimas CAT, GPx e SOD divergiu para a suplementação de isoflavonas ou proteínas separadamente ou em associação.

PALAVRAS-CHAVE: Isoflavonas, proteínas da soja, biodisponibilidade, capacidade antioxidante.

ABSTRACT

BARBOSA, A.C.L. **Study of interactions between isoflavones and soy protein: effect on the digestibility and antioxidant capacity.** 2008. 140 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, 2008.

Although soybeans are not commonly consumed by the Brazilian population, soybean products are used as ingredients by the food industry and there is an increased trend in their consumption due to the approval of FDA and ANVISA on the claim regarding the health benefits of soy proteins. Therefore, many studies involving isoflavones, the phytoestrogens found in significant quantities in soybeans, have demonstrated several health benefits of these compounds, such as antioxidant capacity, and anticarcinogenic and hypocholesterolemic effects. The objective of the present study was to evaluate the interaction between isoflavones and soy proteins as well as the effect of this interaction on the *in vitro* and *in vivo* bioavailability of isoflavones and on the antioxidant status. The results indicated that the association with protein decreased the rate and proportion of absorption of isoflavones when compared to the free form. The effect of isoflavones on the plasma antioxidant capacity and on the enzymatic activity and gene expression levels of CAT, GPx and SOD was different when isoflavones were combined with soy protein compared to isoflavones alone.

KEYWORDS: Isoflavones, soy proteins, bioavailability, antioxidant capacity.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Soja	3
2.2. Isoflavonas	5
2.2.1. Absorção e metabolismo das isoflavonas	8
2.3. Radicais livres, espécies reativas do oxigênio, oxidação lipídica	12
2.3.1. Antioxidantes	15
2.3.2. Monitoramento do estresse oxidativo	16
2.3.3. Enzimas antioxidantes	17
2.3.3.1. Superóxido dismutase	17
2.3.3.2. Glutathione peroxidase	18
2.3.3.3. Catalase	20
2.3.4. Capacidade antioxidante das isoflavonas	21
2.4. Proteínas da soja	24
2.4.1. β -conglucina	25
2.4.2. Glicina	26
2.5. Derivados protéicos da soja	28
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Determinação de umidade	33
4.2. Determinação do conteúdo protéico	33
4.3. Determinação de lipídeos	33
4.4. Determinação do teor de cinzas	34
4.5. Determinação de carboidratos totais	34
4.6. Determinação de fibra alimentar total	34
4.7. Determinação de amido	34
4.8. Determinação de açúcares totais	35
4.9. Determinação de açúcares solúveis	35
4.10. Determinação de rafinose e estaquiose	35
4.11. Determinação da atividade inibitória de tripsina	36

4.12. Análise de isoflavonas	37
4.12.1. Extração	37
4.12.2. Extração em fase sólida	37
4.12.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	38
4.13. Determinação de fenólicos totais	38
4.14. Determinação da capacidade antioxidante – seqüestro de radicais livres DPPH•	39
4.15. Determinação da capacidade antioxidante – sistema co-oxidação do β-caroteno/ácido linoléico	40
4.16. Determinação da digestibilidade protéica <i>in vitro</i>	40
4.17. Eletroforese em condições dissociantes (SDS-PAGE)	41
4.18. Quantificação das isoflavonas totais, livres e ligadas às proteínas a partir da farinha desengordurada de soja (FDS)	42
4.19. Solubilização de proteínas e isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja (FDS)	42
4.20. Fracionamento das proteínas (7S e 11S) a partir da farinha desengordurada (FDS) e isolado protéico (IPS) de soja	42
4.21. Quantificação da fração indigerível (FRI)	43
4.22. Estudo de biodisponibilidade das isoflavonas <i>in vivo</i>	44
4.22.1. Material	44
4.22.2. Obtenção do extrato	44
4.22.3. Animais	45
4.22.4. Desenho experimental	45
4.22.5. Preparação e determinação das isoflavonas no material biológico	46
4.22.6. Hidrólise enzimática das isoflavonas no material biológico	47
4.23. Estudo do efeito das isoflavonas sobre o status antioxidante <i>in vivo</i>	47
4.23.1. Material	47
4.23.2. Obtenção do extrato	47
4.23.3. Animais	48
4.23.4. Desenho experimental	48
4.23.5. Extração dos tecidos biológicos	49
4.23.6. Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)	49
4.23.7. Determinação da atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx)	50

4.23.8. Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	50
4.23.9. Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	51
4.23.10. Determinação de grupamentos tióis protéicos e não protéicos	51
4.23.11. Determinação do conteúdo protéico	52
4.23.12. Capacidade antioxidante no plasma	52
4.23.12.1. Determinação da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	52
4.23.13. Determinação de ácido úrico	53
4.23.14. Determinação da hemoglobina (Hb)	54
4.23.15. Extração de RNA	54
4.23.15.1. Transcrição reversa seguida de reação de polimerase em cadeia ("Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction" – RT-PCR)	55
4.23.15.2. <i>Real time</i> RT-PCR	55
4.24. Análise dos resultados	56
5. RESULTADOS	57
5.1. Caracterização dos grãos de soja	57
5.1.1. Composição centesimal, fibra, amido, açúcares solúveis, oligossacarídeos, e atividade inibitória de tripsina do hipocótilo e cotilédone de soja	58
5.1.2. Caracterização dos grãos de soja cozidos	61
5.2. Estudo da interação entre isoflavonas e proteínas da soja	65
5.2.1. Comparação entre farinha desengordurada de soja e isolado protéico de soja	65
5.2.2. Isoflavonas totais, livres e ligadas às proteínas	69
5.2.3. Interação entre isoflavonas e frações 7S e 11S da soja	70
5.2.4. Determinação dos tipos de interações entre isoflavonas e proteínas da soja	76
5.3. Biodisponibilidade das isoflavonas <i>in vitro</i>	82
5.3.1. Efeito da digestão com pepsina sobre a biodisponibilidade das isoflavonas <i>in vitro</i>	82
5.3.2. Efeito da matriz alimentar sobre a biodisponibilidade das isoflavonas <i>in vitro</i>	86
5.4. Estudo de biodisponibilidade das isoflavonas <i>in vivo</i>	87
5.5. Estudo do efeito das isoflavonas sobre o status antioxidante <i>in vivo</i>	99
5.5.1. Crescimento e consumo de ração dos animais	99

5.5.2. Capacidade antioxidante total plasmática	99
5.5.3. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupamentos sulfidríla livres (GSH) de plasma e tecidos biológicos	101
5.5.4. Atividade das enzimas antioxidantes	103
5.5.5. Expressão gênica de enzimas antioxidantes	107
6. CONCLUSÕES	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
8. ANEXOS	140
FICHA DO ALUNO	
CURRICULUM LATTES	
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos do grão de soja	57
TABELA 2	Teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, amido, açúcares totais, sacarose, rafinose, estaquiose, inibidor de tripsina, fibra solúvel e insolúvel de hipocótilo e cotilédone de soja, e contribuição em relação ao grão de soja	59
TABELA 3	Teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos dos grãos de soja cozidos	61
TABELA 4	Teor de isoflavonas, conteúdo de fenólicos totais, atividade inibitória da tripsina, capacidade antioxidante pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico, e pelo método de seqüestro de radicais livres (DPPH•) dos grãos de soja crus e cozidos	62
TABELA 5	Teores de umidade, proteínas e isoflavonas totais do isolado protéico (IPS) e farinha desengordurada (FDS) de soja comercial	65
TABELA 6	Perfil das isoflavonas extraídas a partir do isolado protéico e farinha desengordurada de soja comercial em MeOH 80 %	66
TABELA 7	Perfil das isoflavonas no extrato bruto (EB), na fração solúvel (FS), na fração insolúvel (FI) em TCA 5 % obtidos a partir da FDS	69
TABELA 8	Teor das isoflavonas (mg/100 g) extraídas a partir da farinha desengordurada de soja, isolado protéico de soja comercial e isolado protéico de soja laboratorial e a porcentagem nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FInt)	72
TABELA 9	Solubilização de isoflavonas e proteínas a partir da farinha desengordurada de soja em água, em solução aquosa, solução aquosa pH 4,5 e pH 10, solução de NaCl 0,2 M, solução de SDS 1 % e solução de Triton X-100 1 %	77
TABELA 10	Perfil das isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em solução aquosa, solução aquosa pH 4,5 e pH 10, solução de NaCl 0,2 M, solução de SDS 1 % e solução de Triton X-100 1 %	79
TABELA 11	Teor das isoflavonas livres e associadas presentes na FDS	81
TABELA 12	Digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas e teores de isoflavonas totais (mg/100 g de amostra b.u.) e sua porcentagem nas frações digerida e não-digerida no grão de soja cru, grão cozido, hipocótilo e cotilédone de soja, FDS e IPS	83
TABELA 13	Perfil das isoflavonas do grão de cru e cozido, hipocótilo e cotilédone da soja, farinha desengordurada (FDS) e isolado protéico de soja (IPS) das frações digeridas (FD) e não-digeridas (FND) por pepsina (37 °C/3 h)	85

TABELA 14	Porcentagem da fração indigerível (FRI) solúvel e insolúvel, das isoflavonas nestas frações e proteínas na FRI e na fração digerida a partir dos grãos de soja crus, grãos de soja cozidos, hipocótilo e FDS	86
TABELA 15	Porcentagem de recuperação das isoflavonas livres no plasma e tecidos de ratos após administração por gavagem do extrato EIL	98
TABELA 16	Porcentagem de recuperação das isoflavonas associadas às proteínas no plasma e tecidos de ratos após administração por gavagem do extrato EPI	98
TABELA 17	Conteúdo de compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico de plasma (nmol MDA/mL) e de tecidos (μ mol MDA/g) entre os grupos de animais controle e tratados: grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot	101
TABELA 18	Conteúdo de grupamentos sulfidríla livres total de plasma (mM) e de sulfidríla livres não protéica de eritrócito e tecidos (μ mol GSH/g), expresso em glutathiona reduzida (GSH), entre os grupos controle e tratados: grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot	102
TABELA 19	Dados da programação da amplificação dos DNAs no <i>real-time</i> RT-PCR	108

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Grãos de soja e seus componentes: cotilédone e hipocótilo	4
FIGURA 2	Estrutura geral da isoflavona e do estradiol	6
FIGURA 3	Estruturas das isoflavonas da soja	7
FIGURA 4	Esquema simplificado do metabolismo das agliconas daidzeína e genisteína após a ingestão	9
FIGURA 5	Esquema geral dos principais alvos celulares das EROs	13
FIGURA 6	Representação esquemática das subunidades da glicinina. (a) anel com as 6 subunidades ácidas e básicas intercaladas, (b) dois anéis superpondo um ao outro	27
FIGURA 7	Mecanismo para dissociação da glicinina da soja em subunidades e novamente em peptídeos	27
FIGURA 8	Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) das proteínas solubilizadas a partir do hipocótilo e cotilédone da soja. Poço (1) padrão de peso molecular, (2) hipocótilo de soja, (3) cotilédone de soja e (4) grão de soja	60
FIGURA 9	Cromatograma obtido por CLAE/DAD dos grãos de soja. Solvente A: ácido acético 0,1 % em água; solvente B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila. A fase móvel consistiu em gradiente linear de acetronitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. genistina, 4. malonildaidzina, 5. malonilglicitina, 6. malonilgenistina, 7. daidzeína, 8. gliciteína, 9. genisteína	63
FIGURA 10	Cromatograma obtido por CLAE/DAD dos grãos de soja cozidos. Solvente A: ácido acético 0,1 % em água; solvente B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila. A fase móvel consistiu em gradiente linear de acetronitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. genistina, 4. malonildaidzina, 5. acetildaidzina, 6. malonilgenistina, 7. acetilgenistina, 8. daidzeína, 9. gliciteína, 10. genisteína	63
FIGURA 11	Cromatograma obtido por CLAE/DAD do hipocótilo de soja. Solvente A: ácido acético 0,1 % em água; solvente B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila. A fase móvel consistiu em gradiente linear de acetronitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. genistina, 4. malonildaidzina, 5. malonilglicitina, 6. acetilglicitina, 7. malonilgenistina, 8. daidzeína, 9. gliciteína, 10. genisteína	64
FIGURA 12	Cromatograma obtido por CLAE do isolado protéico de soja comercial. Solvente A: ácido acético 0,1 % em água; solvente B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila. A fase móvel consistiu em gradiente linear de acetronitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. malonildaidzina, 4. genistina, 5. malonilgenistina, 6. daidzeína, 7. gliciteína, 8. genisteína	68

- FIGURA 13 Cromatograma obtido por CLAE da farinha desengordurada de soja. Solvente A: ácido acético 0,1 % em água; solvente B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila. A fase móvel consistiu em gradiente linear de acetonitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. malonildaidzina, 4. malonilglicitina, 5. genistina, 6. acetildaidzina, 7. malonilgenistina, 8. daidzeína, 9. gliciteína, 10. acetilgenistina, 11. genisteína 68
- FIGURA 14 Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) das frações protéicas purificadas a partir da FDS e do IPS. Poço (1) padrão de peso molecular, (2) FDS fração 7S, (3) FDS fração 11S, (4) FDS fração intermediária, (5) IPS fração 11S, (6) IPS fração 7S, (7) IPS fração intermediária 71
- FIGURA 15 Perfil de distribuição das isoflavonas na farinha desengordurada de soja e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FI). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente 73
- FIGURA 16 Perfil de distribuição das formas totais das isoflavonas (daidzeína, gliciteína e genisteína) na farinha desengordurada de soja e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FI) 73
- FIGURA 17 Perfil de distribuição das isoflavonas no isolado protéico de soja comercial e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FI). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente 74
- FIGURA 18 Perfil de distribuição das formas totais das isoflavonas (daidzeína, gliciteína e genisteína) no isolado protéico de soja comercial e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FI) 74
- FIGURA 19 Perfil de distribuição das isoflavonas no isolado protéico de soja laboratorial e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FI). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente 75
- FIGURA 20 Perfil de distribuição das formas totais das isoflavonas (daidzeína, gliciteína e genisteína) no isolado protéico de soja laboratorial e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FI) 75
- FIGURA 21 Cromatogramas obtido por CLAE/DAD de plasma de ratos Wistar macho após administração oral por gavagem dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente. (A) plasma 2 horas após administração do EIL, (B) plasma 2 horas após administração do EPI, (C) plasma tratado com β -glucuronidase-sulfatase 2 horas após administração do EIL e (D) plasma tratado com β -glucuronidase-sulfatase 2 horas após administração do EPI. (E) plasma do grupo controle. Picos identificados: 1. daidzina, 3. genistina, 7. daidzeína, 8. genisteína 88

- FIGURA 22 Cromatogramas obtido por CLAE/DAD de rins de ratos Wistar macho após administração oral por gavagem dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente. (A) rins 2 horas após administração do EIL, (B) rins 2 horas após administração do EPI, (C) rins do grupo controle. Picos identificados: 7. daidzeína, 8. genisteína 89
- FIGURA 23 Cromatogramas obtido por CLAE/DAD de estômago de ratos Wistar macho após administração oral por gavagem dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente. (A) estômago 1 hora após administração no grupo iso e (B) estômago 1 hora após administração no grupo iso+prot, (C) estômago do grupo controle. Picos identificados: 1. daidzina, 2. malonildaidzina, 3. genistina, 4. acetildaidzina, 5. malonilgenistina, 6. acetilgenistina, 7. daidzeína, 8. genisteína 90
- FIGURA 24 Cromatogramas obtido por CLAE/DAD do intestino delgado (ID) de ratos Wistar macho após administração oral por gavagem dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente. (A) ID 2 horas após administração no grupo iso e (B) ID 2 horas após administração no grupo iso+prot, (C) ID do grupo controle. Picos identificados: 1. daidzina, 2. malonildaidzina, 3. genistina, 5. malonilgenistina, 7. daidzeína, 8. genisteína 91
- FIGURA 25 Cromatogramas obtido por CLAE/DAD do intestino grosso (IG) de ratos Wistar macho após administração oral por gavagem dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente. (A) IG 3 horas após administração no grupo iso e (B) IG 3 horas após administração no grupo iso+prot, (C) IG do grupo controle. Picos identificados: 7. daidzeína, 8. genisteína 92
- FIGURA 26 Concentração plasmática de isoflavonas após a administração dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente, a rato Wistar macho. Média $\pm$ desvio padrão (n = 4 ratos) 94
- FIGURA 27 Concentração de isoflavonas nos rins após a administração dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente, a rato Wistar macho. Média $\pm$ desvio padrão (n = 4 ratos) 95
- FIGURA 28 Concentração de isoflavonas no estômago após a administração dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente, a rato Wistar macho. Média $\pm$ desvio padrão (n = 4 ratos) 95
- FIGURA 29 Concentração de isoflavonas no intestino delgado (ID) após a administração dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente, a rato Wistar macho. Média $\pm$ desvio padrão (n = 4 ratos) 96
- FIGURA 30 Concentração de isoflavonas no intestino grosso (IG) após a administração dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente, a rato Wistar macho. Média $\pm$ desvio padrão (n = 4 ratos) 96

FIGURA 31	Curva de crescimento (A) e consumo diário de ração (B) após administração crônica dos extratos EIL, EPI e EP. Média $\pm$ desvio padrão (n = 8 ratos/grupo)	99
FIGURA 32	Capacidade antioxidante total plasmática após a administração crônica dos extratos EIL, EPI e EP.	100
FIGURA 33	Efeito da administração dos extratos EIL, EPI e EP na atividade da catalase (CAT) plasmática, eritrócitos e tecidos	104
FIGURA 34	Efeito da administração dos extratos EIL, EPI e EP na atividade da glutathiona peroxidase (GPx) plasmática, eritrócitos e tecidos.	105
FIGURA 35	Efeito da administração dos extratos EIL, EPI e EP na atividade da superóxido dismutase (SOD) plasmática, eritrócitos e tecidos.	106
FIGURA 36	Eletroforese em gel de agarose com amostras de RNA total do fígado. Foram aplicadas 0,5 μ g de RNA das amostras em quintuplicata. C – controle, iso – grupo iso, iso+prot – grupo iso+prot e prot – grupo prot	107
FIGURA 37	Curvas típicas obtidas em <i>real-time</i> RT-PCR para a determinação da eficiência das amplificações e ponto de fusão (T_m) dos produtos amplificados tanto das amostras de fígado como de rins (grupo controle, grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot). O controle negativo corresponde à curva NTC (<i>no template control</i>). Curvas de quantificação para (A) GAPDH, (B) CAT e (C) GPx. Curvas de fusão para (D) GAPDH, (E) CAT e (F) GPx	109
FIGURA 38	Curvas típicas obtidas em <i>real-time</i> RT-PCR para determinação da eficiência das amplificações e ponto de fusão (T_m) dos produtos amplificados tanto das amostras de fígado como de rins (grupo controle, grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot). O controle negativo corresponde à curva NTC (<i>no template control</i>). Curvas de quantificação para (A) CuZnSOD e (B) MnSOD. Curvas de fusão para (C) CuZnSOD e (D) MnSOD	110
FIGURA 39	Quantificação da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizada pelo gene de referência GAPDH em relação ao controle (grupo controle) para os genes das enzimas antioxidantes (A) CAT, (B) GPx, (C) CuZnSOD e (D) MnSOD pelo <i>real time</i> RT-PCR das amostras de fígado (grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot). Letras diferentes entre os grupos indicam diferença significativa ($p < 0,05$)	111
FIGURA 40	Quantificação da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizada pelo gene de referência GAPDH em relação ao controle (grupo controle) para os genes das enzimas antioxidantes (A) CAT, (B) GPx, (C) CuZnSOD e (D) MnSOD pelo <i>real time</i> RT-PCR das amostras de rins (grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot). Letras diferentes entre os grupos indicam diferença significativa ($p < 0,05$)	112

ABREVIACÕES

AAC – área abaixo da curva

AAPH – 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato

Abs – absorbância

ABTS• – radical 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiozolina)-6-sulfônico

Ac – acetil

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOM – azoximetano

AVC – acidente vascular cerebral

BAPA – benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida

BHT – butilhidroxitolueno

b.s. – base seca

b.u. – base úmida

CAT – catalase

cdNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Ct – *threshold cycle*

CuZnSOD – superóxido dismutase cobre-zinco dependente

DAD – (*Diode Array Detector*) detetor com arranjo de diodo

DEPC – dietil-pirocarbonato

DMBA – 7,12-dimetilbenzantraceno

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – trifosfato deoxinucleosídeo

DPPH• – radical α,α -difeníl- β -picrilhidrazina

DTNB – 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato

EDTA – etileno diamino tetra acético

EIL – extrato de isoflavona livre

EP – extrato protéico

EPI – extrato protéico de isoflavona

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FDA – Food and Drug Administration

FDS – farinha desengordurada de soja

FI – fração insolúvel

FInt – fração intermediária

FRI – fração digerida

FS – fração solúvel

GPx – glutathione peroxidase

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

Hb – hemoglobina

HDL – lipoproteína de alta densidade

HO₂• – radical hidroperoxila

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HPLC – *High-Performance Liquid Chromatographic*

ID – intestino delgado

IG – intestino grosso

IPS – isolado protéico de soja

ISO – isoflavona

kDa – kilo Dalton

KTI-LOX – inibidor de tripsina Kunitz

LDL – lipoproteína de baixa densidade

L• – radical alila

LH – ácido graxo insaturado

LO• – radical alcoxila

LOO• – radical peroxila

LOOH – hidroperóxido

M – malonil

MDA – malonaldeído

MeOH – metanol

MnSOD – superóxido dismutase manganês dependente

NADPH – β-nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato tetrasódio reduzido

NTC – *no template control*

$^1\text{O}^2$ – oxigênio singlet

$\text{O}^{2\cdot-}$ – radical superóxido

ODMA – O-desmetilangolensina

OH• – radical hidroxila

ORAC – capacidade de absorção do radical oxigênio

PA – poliamida

PAGE – (*polyacrylamide gel electrophoresis*) eletroforese em gel de poliacrilamida

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

pI – ponto isoelétrico

PM – peso molecular

PROT – proteína

PTFE – politetrafluoroetileno

RNA – ácido ribonucleico

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR – transcrição reversa seguida da PCR

SDS – dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TEAC – capacidade antioxidante equivalente de Trolox

T_m – ponto de fusão (*melting temperature*)

UA – unidade de atividade

UIT – unidades inibitórias de tripsina

β-ME – beta-mercaptoetanol

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a procura por alimentos derivados de soja tem aumentado nos últimos anos em função dos benefícios à saúde atribuídos ao consumo desta leguminosa. Das substâncias funcionais da soja destacam-se as proteínas e as isoflavonas, estas últimas denominadas de fitoestrógenos (RAWEL *et al.*, 2002). Em 1999, o Food and Drug Administration (FDA), departamento que controla a produção de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos, recomenda o consumo diário de 25 g de proteínas da soja, para o controle dos níveis de colesterol, reduzindo assim, os riscos de doenças cardiovasculares (FDA, 1999).

As propriedades biológicas associadas às isoflavonas causaram um aumento nas pesquisas sobre seu potencial na redução do risco de doenças crônico não transmissíveis. Vários estudos *in vitro*, em modelos animais, em humanos, e epidemiológicos vêm evidenciando os efeitos biológicos das isoflavonas, entre eles, anticarcinogênico, antioxidante, hipocolesterolêmico, e de melhora dos sintomas da menopausa e osteoporose (CASSIDY *et al.*, 2006; CASSIDY, 2006; COOKE, 2006).

Vários estudos demonstraram a capacidade antioxidante exercida pelos flavonóides, principalmente através do seqüestro de várias espécies oxidantes, tais como ânion superóxido, radical hidroxila e radical peroxila (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Alguns estudos indicam que as isoflavonas seriam as responsáveis pelos efeitos clínicos da soja. Entre estes, Crouse *et al.* (1999) demonstraram que a presença de isolado protéico de soja na dieta diminuiu os níveis de LDL-colesterol em seres humanos de forma proporcional ao seu conteúdo de isoflavonas. No entanto, esses efeitos não são observados quando as isoflavonas são administradas na forma pura (SONG *et al.*, 2003), indicando que a matriz protéica é necessária para a sua ação. Outros trabalhos, por sua vez, atribuíram os efeitos hipocolesterolêmicos unicamente às proteínas de soja (McVEIGH *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2003). No entanto, a eficiência do isolamento da proteína e isoflavonas é questionável, o que poderia ser responsável pelos resultados controversos encontrados na literatura.

A presença de teores elevados de isoflavonas nos isolados protéicos de soja seria inesperada devido às condições de processamento utilizadas em sua obtenção. Embora seja esperada a co-extração de isoflavonas e proteínas a partir da farinha desengordurada de soja em solução aquosa, dada a alta

hidrofilicidade das formas glicosiladas, a sua co-precipitação em pH 4,5 indica forte associação com as proteínas (BARBOSA *et al.*, 2006).

No entanto, nos isolados protéicos também são observados teores significativos de agliconas, além das formas glicosiladas (GENOVESE *et al.*, 2007). Parte destas isoflavonas pode estar presente nos isolados protéicos como resultado do processo físico de carreamento, mas resultados anteriores (BARBOSA, 2004) mostraram que interações hidrofóbicas e ligações eletrostáticas estariam envolvidas.

A utilização de derivados protéicos de soja está aumentando e produtos novos vêm sendo desenvolvidos, juntamente com as pesquisas crescentes no campo das isoflavonas, o que justifica a realização de estudos visando uma maior compreensão da ligação entre as proteínas e as isoflavonas, além do estudo sobre a influência desta interação na biodisponibilidade, na capacidade antioxidante *in vitro* e no status antioxidante *in vivo*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Soja

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa cultivada pelos chineses há cerca de cinco mil anos e no início do século XX passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. No entanto, foi introduzida na Europa pelo cientista sueco Engelbert Kaempfer responsável pelo seu nome científico *Glycine max*. No Brasil, o grão chegou em 1908, (mais precisamente na Bahia), porém a expansão agrícola aconteceu nos anos 70 com o interesse crescente da indústria de óleo e da demanda do mercado internacional. Os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais do grão, seguidos pelo Brasil, Argentina e China, responsáveis por aproximadamente 90 % da produção mundial. O Brasil é responsável por 20 % da produção total, sendo que os Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso são os responsáveis por 65 % da produção brasileira (MIURA *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2000; ANDERSON, 1996).

A soja é hoje o alimento que oferece maiores possibilidades para o desenvolvimento de produtos funcionais no Brasil, onde já existem algumas resoluções do Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, especificando que alimentos funcionais não podem ter indicação terapêutica, prometer cura ou prevenção de doenças (BRASIL, 1999).

No Brasil, o Ministério da Saúde publicou uma portaria (MS n.398 de 30 de abril de 1999) que definiu os alimentos funcionais como sendo "todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica" (BRASIL, 1999).

A soja possui em sua composição cerca de 20% de óleo, 35% de carboidratos, 5% de cinzas, 40% de proteínas, incluindo as proteínas bioativas como β -amilase, citocromo c, lectina, lipoxigenase, urease e os inibidores de tripsina, Kunitz e Bowman-Kirk (FRIEDMAN & BRANDON, 2001; ERICKSON, 1995). O grão de soja é dividido em cotilédone e hipocótilo (Figura 1). O cotilédone contém a maior proporção de proteínas e lipídeos da soja. O conteúdo protéico do eixo do hipocótilo é similar ao do cotilédone, porém o teor de lipídeos é quase a metade. Possui ainda metabólitos secundários, como as isoflavonas, também chamadas fitoestrógenos, por se referir a compostos que exercem uma

ação estrogênica fraca. As isoflavonas possuem entre 10^{-4} a 10^{-3} da atividade do 17β -estradiol em base molecular (LIU, 1997).

Figura 1. Grãos de soja e seus componentes: cotilédone e hipocótilo.

O alto conteúdo protéico de bom valor nutricional da soja, aliado ao seu baixo custo de produção e à alta produtividade, justifica o interesse no aumento do seu consumo pela população humana.

As proteínas da soja estão ainda associadas à redução do risco de doenças cardiovasculares através da redução dos níveis de LDL-colesterol sanguíneo. Assim, a partir das evidências científicas, a agência reguladora de medicamentos e alimentos, Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, aprovou a alegação "25 g de proteína de soja como parte de uma dieta baixa em gordura saturada e colesterol, podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares" (FDA, 1999). Da mesma forma, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a alegação: "O consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis" (ANVISA, 2002).

Embora a redução do colesterol pela ação da proteína de soja tenha sido evidenciada em vários estudos, o mecanismo pelo qual esse efeito é alcançado ainda não está totalmente esclarecido (SONG *et al.*, 2003). Vários compostos associados à proteína de soja têm sido implicados na redução do

colesterol, entre eles estão: isoflavonas, ácido fítico, saponinas, fibras e aminoácidos (ERDMAN, 2000).

Para as isoflavonas da soja alguns mecanismos têm sido apontados como responsáveis pela ação hipocolesterolêmica, podendo-se destacar a estimulação da excreção de ácidos biliares, pelo aumento da atividade da 7 α -hidroxilase, enzima chave na conversão do colesterol a ácidos biliares, controlando a principal via de excreção do colesterol (KAWASAKI *et al.*, 2005; KAWASAKI *et al.*, 2004) e efeitos hormonais, com efeito benéfico sobre as concentrações plasmáticas do colesterol atribuído à função estrogênio-símile das isoflavonas. No entanto, como para as proteínas da soja, não existem resultados conclusivos (McCARTY, 2006).

2.2. Isoflavonas

As isoflavonas são substâncias fitoquímicas pertencentes a uma subfamília dos flavonóides encontrados em plantas, e caracterizam-se por apresentar uma estrutura composta por dois anéis benzenos ligados entre si por um anel heterocíclico pirano na posição do carbono 3 (Figura 2) (LIU, 1997; MESSINA, 1999; FARAJ & VASANTHAN, 2004).

As isoflavonas estão presentes em poucas famílias botânicas, em maior quantidade na soja, embora estejam presentes em outras leguminosas, e funcionam como fitoalexinas conferindo às plantas resistência a patógenos, além de proteger contra os raios ultravioletas (KOGAN, 1986). Na soja, as agliconas daidzeína e genisteína têm sido relatadas como os indutores mais comuns à nodulação da raiz por *Bradyrhizobium japonicum* (KOSSLAK *et al.*, 1990).

A estrutura química das isoflavonas agliconas é muito semelhante à do estrógeno 17 β -estradiol (Figura 2), e as características que conferem a similaridade entre esses compostos são a presença do anel fenólico, pré-requisito na ligação ao receptor, o peso molecular semelhante, e a distância equivalente (11,5 Å) entre as hidroxilas 4' e 7 (DIXON & FERREIRA, 2002; SONG *et al.*, 1999; HUTCHINS *et al.*, 1995; CASSIDY *et al.*, 2000).

Figura 2. Estrutura geral das isoflavonas e do estradiol.

A soja possui três isoflavonas, que se apresentam em 4 formas químicas, somando assim 12 isômeros: as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína; os β -glicosídeos daidzina, genistina e glicitina; e os derivados glicosilados acetilados 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina; e glicosilados malonilados 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina (WANG *et al.*, 1998, KUDOU *et al.*, 1991; GRÜN *et al.*, 2001, WANG & MURPHY, 1994a,b) (Figura 3).

Agliconas:

genisteína

daidzeína

gliciteína

Glicosiladas:

 β -glicosídeos

acetilglicosídeos

malonilglicosídeos

Figura 3. Estruturas das isoflavonas da soja.

O teor de isoflavonas nos grãos de soja é variável em função de diferenças genéticas entre as cultivares, além de sofrer influência da temperatura ambiental durante o desenvolvimento dos grãos (WANG & MURPHY, 1994b; TSUKAMOTO *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 2003).

A distribuição dos compostos de isoflavonas nos grãos de soja varia conforme a estrutura da semente. Dependendo da cultivar, as isoflavonas não estão presentes no tegumento da semente ou são detectadas apenas em quantidades-traço (KUDOU *et al.*, 1991; TSUKAMOTO *et al.*, 1995; LIU, 1997). Segundo Tsukamoto *et al.* (1995), o teor de isoflavonas totais é de 5,5 a 6,0 vezes maior no hipocótilo da semente do que nos cotilédones. Porém, 80 a 90% do total de isoflavonas dos grãos de soja estão localizados nos cotilédones, considerando que o hipocótilo corresponde a 2 % do peso seco da semente. Ainda, segundo o autor, a gliciteína e seus conjugados ocorrem somente no hipocótilo.

Wang & Murphy (1994b), trabalhando com diferentes variedades de soja, observaram que malonil genistina constituiu o isômero de isoflavona encontrado em maior concentração nos grãos (25 a 42 %), seguido por genistina, malonil daidzina e daidzina respectivamente, num total que variou entre 83 a 93 % do total de isoflavonas.

A forma de aquecimento empregada durante o processamento dos grãos de soja interfere significativamente na transformação das formas químicas de isoflavonas. Conforme Chien *et al.* (2005) sob aquecimento seco conjugados malonil são convertidos preferencialmente em acetil e sob aquecimento úmido a conversão se dá em β -glicosídeos.

β -glicosídeos e agliconas representam em média 19 e 2 % do total de isoflavonas em grãos de soja (WANG & MURPHY, 1994a). Entretanto, quando submetidos a diferentes processos para obtenção de alimentos derivados de soja, esta proporção pode sofrer alterações.

Assim como o processamento tem influência na distribuição das diferentes isoflavonas, a biodisponibilidade e atividades biológicas mediadas pelas isoflavonas também diferem de acordo com o isômero (SETCHELL & CASSIDY, 1999; ZHANG *et al.*, 1999; CASSIDY *et al.*, 2006).

2.2.1. Absorção e metabolismo das isoflavonas

Embora ainda exista controvérsia sobre a importância das isoflavonas na saúde humana, é fundamental a compreensão e entendimento de como estes

compostos são absorvidos e metabolizados após o consumo. Pesquisas sugerem que as isoflavonas, uma subclasse dos polifenóis, tem melhor absorção que as outras classes dos flavonóides, com o pico de concentração no plasma ($C_{\text{máx}}$) de 2 $\mu\text{mol/L}$ após ingestão de 50 mg (equivalente em aglicona) e média de excreção urinária de 42% para daidzeína e 16% para genisteína (MANACH *et al.*, 2005).

Após a ingestão, as isoflavonas da soja são hidrolisadas pelas glicosidases intestinais (XU *et al.*, 1995; IZUMI *et al.*, 2000), liberando as agliconas, daidzeína, genisteína e gliciteína (Figura 4), que podem ser excretadas ou absorvidas na parte distal do intestino delgado e posteriormente metabolizadas em vários metabólitos específicos. A daidzeína é convertida nos seguintes metabólitos: equol, dehidrodaidzeína e O-desmetilangolensina (ODMA), e a genisteína é convertida nos seguintes metabólitos: dehidrogenisteína, 6'-dehidroxi-ODMA e no composto inativo *p*-etilfenol (KURZER & XU, 1997; SETCHELL *et al.*, 1998; SETCHELL & CASSIDY, 1999). Porém, pouco se conhece sobre o metabolismo da gliciteína, já que ela ocorre numa proporção muito inferior à da genisteína e daidzeína (KULLING *et al.*, 2001). A extensão deste metabolismo é altamente variável entre indivíduos e influenciada pela microbiota e por outros componentes da dieta (CASSIDY *et al.*, 2000).

Figura 4. Esquema simplificado do metabolismo das agliconas daidzeína e genisteína após a ingestão. Fonte: RUIZ-LARREA & RUIZ-SANZ (2007).

A produção do equol é influenciada pela composição da microbiota, tempo de trânsito intestinal e o potencial redox do cólon. A capacidade de converter a daidzeína em equol é observada em cerca de 30-50% dos indivíduos. Ao consumir daidzina observa-se maior produção de equol do que quando se consome daidzeína, e a produção de equol é ainda superior em indivíduos que consomem maior quantidade de carboidratos e fibra dietética alimentar e menor quantidade de lipídeos na dieta (CASSIDY *et al.*, 2006). Desta forma, a dieta que contém gordura diminuiria a capacidade da microbiota de sintetizar equol (ROWLAND *et al.*, 2000). Nessa linha, alguns estudos sugerem que o consumo de altos níveis de carboidratos complexos estimularia a fermentação pelo intestino, podendo resultar em maior quebra de daidzeína em equol (SETCHELL & CASSIDY, 1999). No entanto, investigações sobre a biodisponibilidade de fitoestrógenos e os diferentes tipos de microbiota são ainda necessárias.

A absorção no intestino, possivelmente por difusão passiva não-iônica, e ainda, as isoflavonas e/ou metabólitos são transportados pelo sistema porta-hepático até o fígado, onde esses compostos sofrem a conjugação com o ácido glicurônico e em menor proporção com sulfato pelas enzimas de fase II (UDP-glicuronosiltransferases e sulfotransferases) (KURZER & XU, 1997; SETCHELL *et al.*, 2002).

Assim como os estrógenos endógenos, as isoflavonas podem sofrer uma recirculação enterohepática, onde as isoflavonas conjugadas são desconjugadas no intestino e reabsorvidas ou excretadas pelas fezes (KURZER & XU, 1997).

As isoflavonas estão presentes na urina e no plasma, em geral sob a forma de glicuronídeos conjugados (~ 90%), e apenas 3-5% como sulfatos (ALDERCREUTZ *et al.*, 1995). A eliminação ocorre via renal, principalmente como glicuronídeos conjugados (KULLING *et al.*, 2001).

A frequência do consumo de isoflavonas não mostra efeito na proporção dos glicuronídeos, sulfatados e agliconas da genisteína e daidzeína no plasma e na urina (ZHANG *et al.*, 2003). Porém, estudos em humanos demonstram que a concentração plasmática e urinária de isoflavonas aumenta de acordo com a quantidade consumida, indicando que a absorção ocorre de forma dose-dependente (CASSIDY *et al.*, 2006). Entretanto, a atividade biológica das isoflavonas conjugadas no plasma depende da estrutura química (TURNER *et al.*, 2003).

Cassidy *et al.* (2006) registraram que dentre as isoflavonas as agliconas constituem as formas de isoflavonas biologicamente ativas e mais biodisponíveis.

Izumi *et al.* (2000) observaram que a forma aglicona foi mais rapidamente absorvida que a glicosídica, que é mais hidrofílica e com maior peso molecular, e atribuíram esta diferença ao fato de que as formas glicosiladas precisam ser previamente hidrolisadas para serem absorvidas. Segundo Setchell *et al.* (2001), o pico de concentração de agliconas no plasma de adultos ocorre de 4 a 7 horas após a ingestão, enquanto após a ingestão de β -glicosídeos esse tempo passa a ser de 8 a 11 horas.

Ainda, a biodisponibilidade das isoflavonas pode ser influenciada pela forma de consumo da soja. Os produtos de soja fermentados (missô, natto e tempeh) apresentam como forma principal as agliconas, enquanto os não-fermentados (soja e seus derivados, farinha, isolado protéico, concentrado protéico) apresentam como forma principal os glicosídeos (WANG & MURPHY, 1994a). A hidrólise dos produtos fermentados pode ser devida às β -glicosidases fúngicas (WANG & MURPHY, 1996; NAKAMURA *et al.*, 2000). Assim, Hutchins *et al.* (1995) relataram que os alimentos fermentados apresentavam isoflavonas mais biodisponíveis que os não-fermentados.

Cassidy *et al.* (2006) realizaram estudos em humanos comparando a biodisponibilidade de isoflavonas em três alimentos de soja: extrato de soja aquoso, proteína texturizada de soja (PTS) e tempeh, todos com quantidades equivalentes de isoflavonas totais (0,44 mg de isoflavonas/Kg de massa corpórea). Os pesquisadores observaram que a matriz do alimento (tipo) bem como a distribuição das isoflavonas nesta matriz têm forte influência sobre a biodisponibilidade destes compostos. Quando as isoflavonas ingeridas estavam presentes no extrato aquoso, a absorção destes compostos foi mais rápida que quando ingeridas sob matriz sólida (PTS ou tempeh). Ao comparar os dois alimentos sólidos, PTS e tempeh, os picos de concentração plasmática foram maiores e alcançados mais rapidamente após a ingestão de tempeh, alimento fermentado que, segundo Murphy *et al.* (2002) contém em média 50% de agliconas em relação à massa molar total de isoflavonas.

Outro fator importante é mensurar a quantidade de isoflavonas no alimento ou suplemento no momento do consumo, pois a estocagem influencia a quantidade e estabilidade das isoflavonas no produto final (PINTO *et al.*, 2005). Outro fator é em relação à dieta, já que a fibra quando presente, pode também afetar a biodisponibilidade. A fonte de isoflavonas e a matriz alimentar em que se encontram também demonstraram diferença na biodisponibilidade, como o

leite de soja que apresentou uma rápida taxa de absorção e um pico mais elevado na concentração plasmática do que uma matriz sólida (CASSIDY *et al.*, 2006).

Concentração plasmática de 50-800 ng/mL de isoflavonas foi encontrada em adultos consumidores de alimentos a base de soja contendo aproximadamente 50 mg de isoflavonas/dia. Setchell & Cassidy (1999), em estudos sobre biodisponibilidade das isoflavonas, observaram que quando alimentos à base de soja foram consumidos regularmente, os níveis plasmáticos de isoflavonas podem exceder a concentração fisiológica do estradiol (40 e 80 ng/mL para homens e mulheres, respectivamente).

A eficácia clínica das isoflavonas está supostamente ligada à concentração plasmática, e a relação entre ingestão, metabolismo, absorção e efeito biológico representa uma área de pesquisa em crescimento. A população ocidental tem voltado a sua atenção e um maior interesse nos componentes benéficos da dieta aumentando assim o consumo de soja e seus derivados.

A dose ideal de isoflavonas requerida para se ter efeitos clínicos ainda está para ser estabelecida. Porém, alguns estudos indicam que cerca de 50 mg/dia de agliconas sejam suficientes para se ter efeitos clínicos/biológicos (COTTER, 2003; SOMEKAWA *et al.*, 2001; SETCHELL, 1998; BINGHAM *et al.*, 1998).

2.3. Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e oxidação lipídica

O termo radical livre se refere a átomo ou molécula que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, elétrons presentes individualmente em orbitais atômicos ou moleculares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997). Este termo não é o ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, e como em sua maioria são derivados do metabolismo de O₂, o termo "espécies reativas de oxigênio" (ERO) é melhor empregado (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985).

Entre as principais formas reativas de oxigênio o radical superóxido (O₂⁻) apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o radical hidroxila (OH^{*}) mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de

lesões nas moléculas celulares, o radical hidroperoxila ($\text{HO}_2^\bullet$), que é a forma protonada do radical $\text{O}_2^\bullet$, é mais reativo que este último. O oxigênio singlet $^1\text{O}_2$ é a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétron desemparelhado. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

O oxigênio é um componente essencial para os seres vivos. A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) é inevitável no metabolismo aeróbico do organismo. Nas células, as EROs podem causar a oxidação de lipídeos e proteínas, a quebra na fita de DNA e a modificação nas bases e na modulação da expressão gênica (Figura 5) (LEE *et al.*, 2004).

Figura 5. Esquema geral dos principais alvos celulares das EROs.

A oxidação lipídica é descrita como uma reação em cadeia, via radical livre, com as seguintes etapas: iniciação, propagação e terminação. O mecanismo original de oxidação autocatalítica (autooxidação) dos lipídeos foi proposto por Farmer (1946), citado por Hall III & Cuppett (1997). No entanto,

este modelo foi aprimorado e as etapas da oxidação lipídica por meio da reação em cadeia são apresentadas a seguir:

1. Iniciação

2. Propagação

3. Terminação

Onde:

LH = ácido graxo insaturado

$\text{HO}^\bullet$ = radical hidroxila

$\text{L}^\bullet$ = radical alila

$\text{LO}^\bullet$ = radical alcóxila

$\text{LOO}^\bullet$ = radical peróxila

LOOH = hidroperóxido

Na fase de iniciação ocorre abstração de um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado, que é causado por um agente iniciador, que pode ser: calor, presença de luz, metais, radiações ionizantes (HALL III & CUPPETT, 1997). Em condições aeróbicas, o radical alila formado se combina com o oxigênio muito rapidamente, produzindo o radical peróxila. A reatividade do radical peróxila é muito elevada e suficiente para abstrair outro átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado, formando o hidroperóxido, que na presença de metais como ferro, cobre e manganês pode se decompor e novamente gerar radicais livres, que voltarão à etapa de propagação da reação em cadeia. Quando a concentração de radicais está elevada, inicia-se a ocorrência de

interações entre eles formando compostos não radicais estáveis. Nesta fase, tem-se a terminação do processo oxidativo, que depende de fatores como a composição em ácidos graxos do sistema, concentração de oxigênio e presença de metais (HALL III & CUPPETT, 1997).

Em sistemas biológicos, os ácidos graxos poliinsaturados das membranas são muito vulneráveis ao ataque de radicais livres, os quais desencadearão reações de oxidação na membrana lipoprotéica, denominada peroxidação lipídica, que afetará a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade (HALLIWELL & ARUOMA, 1997).

Nas plantas os cloroplastos, as mitocôndrias e os peroxissomos produzem espécies reativas de oxigênio como subproduto do metabolismo celular. Nos organismos aeróbios, a mitocôndria, que consome mais de 90 % do oxigênio, é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio e de radicais livres. Valores aproximados entre 1 e 5 % do oxigênio consumido pela mitocôndria são reduzidos e convertidos a estas espécies reativas de oxigênio (LEE *et al.*, 2004).

Organismos aeróbicos têm, portanto, desenvolvido uma gama de mecanismos para a neutralização das EROs por meio enzimáticos e não enzimáticos. Integram o mecanismo enzimático a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e a catalase. E dentre os não enzimáticos temos GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolipóico. Além dos antioxidantes não enzimáticos produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o ácido ascórbico, a vitamina E (α -tocoferol), os carotenóides e os flavonóides (DAVEY *et al.*, 2000).

2.3.1. Antioxidantes

Antioxidantes são definidos como substâncias estáveis que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato (HALL III & CUPPETT, 1997).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos: o primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos

poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como a vitamina C, a vitamina E, a vitamina A, os flavonóides e carotenóides são extremamente importante na intercepção dos radicais livres. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta à geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (KAUR & KAPOOR, 2001).

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993).

Os seres humanos estão expostos a uma série de agentes oxidantes: endógenos, via processo de transferência de elétrons que ocorre no metabolismo celular e ainda, atividade das enzimas oxidases, lipoxigenases, peroxidases e etc; e exógenos que incluem ozônio, medicamentos, radiações, tabaco e dieta. Estes agentes podem causar danos oxidativos a biomoléculas (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) que poderiam levar a um grande número de patologias incluindo câncer, cardiopatias e aterosclerose (FRITZ *et al.*, 2003).

Mecanismos de defesa antioxidante do organismo humano, como as enzimas antioxidantes e os antioxidantes presentes nos alimentos estão ligados uns aos outros e equilibram as EROs (LEE *et al.*, 2004). A ingestão de alimentos contendo antioxidantes, considerando-se a recomendação de consumo diário de 3 a 5 porções de hortaliças e 2 a 4 porções de frutas (USDA, 2000), pode contribuir para que os indivíduos reduzam as ações deletérias das EROs (PRATT *et al.*, 1981; FRITZ, *et al.*, 2003). Dessa forma, a identificação de fontes vegetais com alta capacidade antioxidante é de extrema importância.

2.3.2. Monitoramento do estresse oxidativo

O monitoramento do estresse oxidativo pode ser acompanhado através da medida de parâmetros relacionados à peroxidação lipídica, danos em DNA, oxidação de tióis, status antioxidante, como o aumento das enzimas antioxidantes, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996). O controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a sobrevivência no ambiente aeróbico (BARNETT *et al.*, 1995).

A peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares, pode gerar uma série de subprodutos como hidrocarbonetos voláteis (etano, pentano), aldeídos (malonaldeído - MDA), peróxidos, entre outros (HERSHKO, 1989). O MDA é derivado da quebra de ácidos graxos durante a peroxidação lipídica. A medida de MDA no sangue, tecidos ou na urina é a técnica mais utilizada para o monitoramento do dano oxidativo causado pelos radicais livres. O MDA pode ser quantificado através de uma técnica relativamente simples em que se utiliza um reagente chamado TBA (ácido tiobarbitúrico), o qual forma um complexo de coloração rósea. A quantidade de MDA detectada é normalmente expressa em forma de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), e representa um índice bastante geral do nível de estresse oxidativo no sistema em estudo.

Os níveis de tióis oxidados e reduzidos são indicativos do estado redox (estado oxidoreduutivo) da célula, e são monitorados pelos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A atividade de várias enzimas requerem grupamentos tióis na forma reduzida. O principal tiol não protéico é a glutathiona, o qual desempenha papel fundamental na manutenção do estado redox celular e também na defesa antioxidante. Acredita-se que a razão normal da GSH em relação à GSSG seja em torno de 10:1 a 50:1.

As enzimas superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase representam a principal defesa endógena do organismo, e cada uma é responsável por uma ação protetora específica contra as EROs.

2.3.3. Enzimas antioxidantes

2.3.3.1. Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) tem papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, pois atua na remoção do radical superóxido. Antes da sua descoberta, a SOD já havia sido descrita por alguns autores como uma proteína que contém cobre, mas nenhuma atividade catalítica lhe havia sido atribuída (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985).

Existem diferentes tipos de SOD, dependendo do metal que atua como cofator em seu sítio catalítico, mas todas elas agem basicamente de acordo com a mesma reação descrita por McCORD & FRIDOVICH (1969):

A forma que contém cobre e zinco, denominada de superóxido dismutase cobre-zinco dependente (CuZnSOD), é muito estável e parece estar presente em praticamente todas as células eucarióticas (plantas ou animais) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985).

A CuZnSOD tem um peso molecular de 32000 Da, é constituída de duas subunidades protéicas idênticas, com um átomo de cobre e um de zinco em cada uma delas, e é a forma citoplasmática da SOD (FRIDOVICH, 1986).

O cobre participa da reação de dismutação, passando alternadamente por oxidação e redução, conforme exemplo:

A superóxido dismutase dependente do manganês (MnSOD) é uma proteína que tem peso molecular de 40.000 Da e que contém manganês nos sítios ativos. A sua atividade diminui em pH alcalino. A atividade da MnSOD em relação a CuZnSOD depende do tecido e das espécies onde atuam. A remoção do Mn dos sítios ativos causa perda da atividade catalítica, não podendo ser repostado por nenhum íon de transição, pois perde a sua atividade funcional. As seqüências de aminoácidos de todas as MnSOD, em todas as espécies, são parecidas e não estão relacionadas com a CuZnSOD (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Existe ainda a superóxido dismutase mitocondrial em tecidos humanos (BECKMAN *et al.*, 1973), que é similar a MnSOD de procariotos, mas que possui quatro subunidades em vez de duas, e que tem peso molecular por volta de 80.000 Da, possuindo também um átomo de manganês por subunidade (FRIDOVICH, 1978).

2.3.3.2. Glutathione peroxidase

A enzima glutathione peroxidase (GPx) age eliminando os hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985).

A enzima catalisa a oxidação de glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG), usando o peróxido de hidrogênio:

A manutenção de níveis de GSH ocorre pela ação da enzima glutathione reductase (GSSG), novamente em sua forma reduzida (COHEN & HOCHSTEIN, 1963; PAGLIA & VALENTINE, 1967):

Apesar de a GPx ser específica para glutathione como doador de hidrogênio, ela pode aceitar outros peróxidos além do H_2O_2 (BEUTLER *et al.*, 1974; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985), em reação que pode ser esquematizada como:

As células animais contêm dois tipos de glutathione peroxidase, sendo que um deles é selênio dependente, enquanto o outro não.

O primeiro tipo é capaz de reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, além do H_2O_2 . Essa forma possui peso molecular de 81.000 Da, é uma proteína tetramérica e possui um átomo de selênio em cada subunidade (FORSTRON *et al.*, 1978; MEERA KHAN *et al.*, 1984; McBRIDGE *et al.*, 1988).

O segundo tipo, que não depende do selênio, tem peso molecular de 35.000 Da, é dimérico e está apto a reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, menos o H_2O_2 (MEERA KHAN *et al.*, 1984; CIRIOLO *et al.*, 1991).

A GPx tem alta atividade no fígado e eritrócitos, enquanto no cérebro, coração e pulmões sua atividade é moderada e no músculo é bastante reduzida (COHEN & HOCHSTEIN, 1963; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Na maioria dos animais, a enzima dependente de selênio é responsável pela maior parte da atividade da GPx, mas a proporção entre as duas formas varia muito entre as diferentes espécies, bem como de tecido para tecido em uma mesma espécie (MANNERVIK, 1985).

Em ratos, a distribuição da GPx tem sido extensamente estudada e, em hepatócitos, a GPx selênio dependente está localizada principalmente no citosol e na matriz mitocondrial (MANNERVIK, 1985).

2.3.3.3. Catalase

A enzima catalase (CAT) está presente na maioria das células aeróbicas, sendo que em animais se encontra principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético contém, no entanto, pequenas quantidades da enzima (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985; MASTERS & CRANE, 1990).

Em mamíferos, como ratos e camundongos, a maior parte da atividade catalítica da enzima ocorre nos peroxissomos, sendo apenas uma pequena taxa de origem citoplasmática ou reticular (MASTERS & CRANE, 1990).

A catalase possui em sua estrutura o Fe^{3+} , que compõe o grupo prostético heme da proteína, importante para efetuar a reação catalítica (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2004).

O mecanismo de ação da catalase pode ser sumarizado da seguinte forma, segundo CHANCE (1952):

Se não neutralizado, o H_2O_2 interage com cátions de ferro (ou cobre), originando o íon hidroxila (inerte) e o radical livre hidroxila (ativo).

A catalase evita o acúmulo de meta hemoglobina e decompõe o peróxido de hidrogênio, um produto tóxico do metabolismo, em água e oxigênio molecular (CHANCE & OSHINO, 1971; WIEACKER *et al.*, 1980; GAETANI *et al.*, 1989).

Além de seu papel como espécie reativa de oxigênio, e, portanto, causador de estresse oxidativo, o H_2O_2 em excesso causa oxidação da hemoglobina e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de oxigênio, o que pode acarretar infecções, formação de úlceras e até necrose (WIEACKER *et al.*, 1980).

A enzima catalase tem peso molecular de 240.000 Da e apresenta quatro subunidades, cada uma contendo um grupamento (FeIII – protoporfirina) ligado ao seu sítio ativo (KEILEN & HARTREE, 1945; WIEACKER *et al.*, 1980).

2.3.4. Capacidade antioxidante das isoflavonas

O desenvolvimento científico tem levado a diferentes abordagens sobre a relação estabelecida entre dieta e saúde. Uma das mais estimulantes linhas de pesquisa surgiu com a descoberta de um grupo de nutrientes que apresenta efeitos protetores contra a oxidação celular. Os carotenóides e os compostos fenólicos estão entre os antioxidantes mais estudados.

Alguns mecanismos moleculares responsáveis pela capacidade antioxidante têm sido propostos, tais como, capacidade seqüestrante de radicais livres, quelante de metais, inibição de produção de peróxido de hidrogênio e estimulação das enzimas antioxidantes, incluindo a catalase.

A capacidade antioxidante das isoflavonas foi relacionada ao número de grupos hidroxila presente na sua estrutura química. Naim *et al.* (1976) mostraram que a capacidade antioxidante das isoflavonas decresce com a glicosilação ou a substituição do grupo hidroxila pelo grupo metoxila.

Cassidy (2005) e Ungar *et al.* (2003) relataram que a genisteína apresentou capacidade antioxidante superior à da daidzeína, e uma das possíveis causas, seria a presença do terceiro grupo hidroxila na posição C-5. O equol, metabólito intestinal da daidzeína, apresentou capacidade antioxidante superior à da daidzeína, genisteína e suas formas glicosiladas, sugerindo que a ausência da dupla ligação 2,3 com a perda do grupo 4-oxo aumenta a propriedade antioxidante. A capacidade antioxidante mensurada pelo método Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) também mostrou um valor elevado para o equol quando comparado a genisteína e daidzeína (TURNER *et al.*, 2004).

Rüfer *et al.* (2006) relataram, através dos métodos ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e oxidação da LDL *in vitro*, que os metabólitos equol, 3'-hidroxi-genisteína, 8-hidroxi-daidzeína e 6-hidroxi-daidzeína apresentaram capacidade antioxidante superior à da quercetina e ácido ascórbico. Em relação à estrutura/atividade, os autores também observaram a contribuição do grupo 5,7-dehidroxi no anel A, já que a genisteína apresentou capacidade antioxidante superior à da daidzeína.

Alguns autores observaram ainda que a metilação da hidroxila na posição C-4' e a conjugação com glicose ou sulfato na hidroxila na posição C-7 reduzem a capacidade antioxidante das isoflavonas (RÜFER, *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2005; RIMBACH *et al.*, 2004). Lee *et al.* (2004) também relataram a redução da capacidade antioxidante das isoflavonas quando conjugada a glicose (50-100 vezes).

Considerando-se que a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é um importante iniciador da aterogênese (STEINBRECHER *et al.*, 1990), vários autores utilizaram o modelo de oxidação da LDL *in vitro* para verificar o efeito potencial das isoflavonas. A sua capacidade antioxidante foi demonstrada em sistema *in vitro* e observou-se que o equol e a O-desmetilangolensina inibem a oxidação da LDL, em concentrações de 0,1 μ M, prováveis de serem atingidas com o consumo moderado de produtos de soja. A genisteína e a daidzeína também inibiram a oxidação só que em maiores concentrações (1 μ M) (HODGSON *et al.*, 1996).

A capacidade antioxidante foi superior para as formas agliconas do que as glicosídicas, mensurada através do método da redução do radical estável DPPH• e da oxidação da LDL *in vitro* induzida pelo cobre, e ainda a oxidação da LDL *in vitro* teve uma alta correlação com o conteúdo de polifenóis (TAKAHASHI *et al.*, 2005).

O metabolismo intestinal e hepático altera a capacidade antioxidante das isoflavonas. O metabólito 8-OH-daidzeína e o equol apresentaram maior capacidade antioxidante (método de oxidação da LDL *in vitro* induzida pelo cobre) que a daidzeína (12,5 e 2,65 vezes mais, respectivamente), o que sugere que a hidroxilação no fígado aumenta a ação antioxidante (TURNER *et al.*, 2004). Esses mesmos autores observaram uma capacidade antioxidante na seguinte ordem: compostos não metabolizados > 7-monosulfatado > 4'-monosulfatado > desulfatado, independente se o sulfato está conjugado com a genisteína ou daidzeína. A desulfatação na verdade resultou na completa anulação da capacidade antioxidante.

As isoflavonas podem inibir a peroxidação lipídica *in vitro* por ação de seqüestro de radicais livres ou por atuar como agentes quelantes de metais (CASSIDY, 2005). Kurzer & Xu (1997) observaram que farinha desengordurada, concentrado e isolado protéicos de soja apresentaram capacidade antioxidante significativa pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico. Já entre as três agliconas, genisteína apresentou a maior capacidade antioxidante, determinada pelo mesmo sistema (PRATT *et al.*, 1981).

A genisteína também parece causar elevação na atividade das enzimas antioxidantes. Kurzer & Xu (1997) relataram que camundongos alimentados com 250 ppm de genisteína por 30 dias apresentaram aumento de 10-30% na atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione redutase da pele e intestino delgado. Liu *et al.* (2005) também mostraram que alto conteúdo de isoflavonas na dieta (150 a 250 ppm) induziu o

aumento da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase em vários tecidos, em estudo com ratos.

Yen & Lai (2003) observaram que a suplementação com isoflavonas purificadas (daidzeína e genisteína) ou extrato metanólico 80% obtido a partir de alguns produtos de soja, tais como tofu, inibiu a oxidação de espécies de nitrogênio reativo *in vitro* e *in vivo*. A inibição foi correlacionada positivamente com o conteúdo total de isoflavonas nos extratos.

Lee *et al.* (2004) mostraram que produtos de soja processados, tais como tofu, apresentaram 50% da capacidade antioxidante quando comparado à soja crua, o que indicaria que alguns métodos de processamento da soja afetariam a capacidade de seqüestro dos radicais livres. Porém, quando o tofu (contendo 50 ppm de isoflavonas) foi comparado com um extrato de soja (250 ppm de isoflavonas), o tofu apresentou elevada capacidade antioxidante, indicando que deve haver um efeito sinérgico com outros componentes bioquímicos, incluindo as proteínas e outros resíduos que não foram extraídos.

O desenvolvimento de produtos alimentícios com teores apreciáveis de isoflavonas e, portanto capacidade antioxidante, requer o conhecimento do conteúdo presente nos diversos derivados protéicos de soja e o efeito do processamento.

Existem diferentes compostos antioxidantes presentes em tecidos animais e vegetais, tornando difícil a análise de cada um separadamente. Diversas metodologias têm sido desenvolvidas para avaliar a capacidade antioxidante de amostras biológicas e extratos vegetais. Os métodos freqüentes incluem avaliações de danos oxidativos ao DNA e proteínas, avaliações dos níveis de enzimas antioxidantes ou de compostos antioxidantes e a avaliação dos danos oxidativos em lipídeos (FORSBERG, 2001; GRIFFITHS, 2005; CHAILLOU & NAZARENO, 2006; STAJNER *et al.*, 2008).

Muitos métodos químicos são baseados na habilidade seqüestradora de diferentes radicais livres, tais como superóxido, hidroxila, alquila e peroxila e, portanto, inibindo a oxidação de um substrato-alvo. Esta propriedade é monitorada através de um indicador da oxidação que pode ser o desaparecimento do substrato lipídico, aparecimento de produtos de oxidação ou consumo de O₂. O substrato alvo pode ser desde triacilgliceróis puros, óleos comerciais e até o DNA, dependendo da especificidade do estudo (MAYNE, 2003; VILJANEN *et al.*, 2004).

A inibição da oxidação da LDL *in vitro* é bastante utilizada para avaliar a capacidade antioxidante de compostos, tendo como vantagem simular a oxidação da LDL que está relacionada à aterosclerose.

A peroxidação lipídica também é muito usada, e um dos métodos é através da oxidação acoplada do β -caroteno/ácido linoléico, onde a oxidação do ácido linoléico gera os radicais livres que abstrairá o hidrogênio da molécula insaturada do β -caroteno. Como resultado tem-se a perda das suas características cromóforas e a quantificação é pelo grau de inibição da oxidação pelo antioxidante testado.

Outros testes utilizam como princípio a redução de radicais livres estáveis tais como o DPPH• (radical α,α -difetil- β -picrilhidrazina) e radical catiônico ABTS• (2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiozolina)-6-sulfônico), onde na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio observa-se redução dos mesmos e perda de suas características cromóforas.

De qualquer maneira, não existe um método universal para avaliar a capacidade antioxidante já que as metodologias geralmente são pontuais ou avaliam uma única propriedade.

Assim, o uso de diferentes métodos é indicado para mostrar a efetividade de um antioxidante frente às diferentes reações de oxidação.

2.4. Proteínas da soja

A maior parte das proteínas de soja se encontra armazenada nas células do cotilédone dentro de corpos protéicos (WOLF & COWAN, 1971). A maioria destas proteínas é classificada como proteínas de reserva e não possuem funções estruturais ou metabólicas. Durante a germinação, os corpos protéicos se desintegram e as proteínas ali contidas são degradadas e utilizadas como fonte de nitrogênio para a síntese de compostos nitrogenados (DERBYSHIRE *et al.*, 1976).

As proteínas podem ser classificadas quanto à solubilidade, sendo as proteínas da soja classificadas como globulinas, tendo como característica serem solúveis em soluções salinas. Temos dois tipos de globulinas de leguminosas, leguminas e vicilinas, que são conhecidas como glicinina e conglicinina em soja, respectivamente. Esses nomes são aparentemente derivados do gênero da soja, *Glycine* (LIU, 1997).

As proteínas da soja são conhecidas por sua heterogeneidade e foram inicialmente classificadas de acordo com o seu comportamento em ultracentrífuga em tampão fosfato, pH 7,6 e força iônica 0,5.

A análise das proteínas contidas nos corpos protéicos, assim como das proteínas extraídas em água a partir da farinha desengordurada de soja, revela quatro frações conhecidas como 2S, 7S, 11S e 15S, baseado em seus coeficientes de sedimentação ($S_{20,w}$) (WOLF, 1970a; WOLF & COWAN, 1971).

A fração 2S corresponde a 22 % das proteínas extraídas em água e é composta por inibidores de tripsina (P.M. 8.000 a 21.500 Da) e citocromo c (P.M. 12.000 Da). A fração 7S corresponde a 37 % das proteínas extraídas em água e contém hemaglutininas (P.M. 110.000 Da), lipoxigenases (P.M. 102.000 Da), β -amilase (P.M. 61.700 Da) e globulinas 7S (P.M. 180.000 Da a 210.000 Da). A fração 11S corresponde a 31 % das proteínas extraídas em água e é composta pela globulina 11S (P.M. 350.000 Da). A fração 15S corresponde a 11 % das proteínas extraídas em água e seus componentes, não identificados, apresentam peso molecular ao redor de 600.000 Da (WOLF & COWAN, 1971).

Enquanto as frações 7S e 11S representam cerca de 70 % das proteínas extraídas em água, nos corpos protéicos elas correspondem a praticamente sua totalidade (WOLF, 1970b). A fração 11S é conhecida como glicinina e a 7S como conglícina. (LIU, 1997).

2.4.1. β -conglícina

A β -conglícina é uma classe de glicoproteína que apresenta coeficiente de sedimentação ao redor de 7S e com P.M ao redor de 180 KDa (THANH & SHIBASAKI, 1977). É um trímero e têm 3 tipos principais de subunidades (α , α' e β) e uma subunidade menor (γ), com P.M. de 57.000 Da para as subunidades α e α' e 42.000 Da para as subunidades β e γ (THANH & SHIBASAKI, 1977). No entanto, Sathe *et al.* (1987) encontraram para as subunidades os seguintes pesos moleculares: 82.200 Da para α' , 70.600 Da para α , 48.400 Da para β e 46.200 Da para γ . Hu & Esen (1981) obtiveram pesos moleculares de 79.000 Da para α' , 70.000 Da para α e 50.000 Da para β .

As subunidades podem ser separadas por cromatografia de troca iônica, após desnaturação do complexo nativo, ou por dodecilsulfato de sódio (SDS) – gel de eletroforese de poliacrilamida (PAGE).

As subunidades α e α' são muito semelhantes em relação à composição de aminoácidos, sendo que uma única diferença está no maior conteúdo de histidina de α' . Tanto α como α' e β não possuem cisteína e β também não possui metionina. A subunidade β apresenta um conteúdo maior de aminoácidos hidrofóbicos que as subunidades α e α' (THANH & SHIBASAKI, 1977).

A β -conglícinina é heterogênea a respeito das subunidades, sendo encontradas em seis diferentes estruturas dos isômeros: B_1 ($\alpha' \beta \beta$); B_2 ($\alpha \beta \beta$); B_3 ($\alpha \alpha' \beta$); B_4 ($\alpha \alpha \beta$); B_5 ($\alpha \alpha \alpha'$) e B_6 ($\alpha \alpha \alpha$) (THANH & SHIBASAKI, 1978).

A β -conglícinina sofre um complicado fenômeno de associação-dissociação em resposta as mudanças do pH e força iônica. Os seis isômeros são capazes de dimerizar reversivelmente em baixa força iônica ou na região do pH 4,8 a 11. A forma resultante 9S é um superdímero de 2 trímeros um a frente do outro formando um hexâmero (THANH & SHIBASAKI, 1979).

Nos extremos, pH 2,0 ou 12,0, ocorre a dissociação das subunidades α , α' e β também de forma reversível de modo que as 6 estruturas moleculares B_1 a B_6 podem ser reconstituídas por combinação das 3 subunidades em solução de uréia e subsequente diálise contra solução tampão fosfato (THANH & SHIBASAKI, 1979).

Estudos subsequentes identificaram a forma B_0 , contendo três subunidades β com P.M. 126.000 – 137.000 Da (YAMAUCHI *et al.*, 1981; SYKES & GAYLER, 1981). A B_0 -conglícinina não apresenta a conversão 7S-9S típica das β -conglícininas, formando um agregado insolúvel em solução com pH neutro e força iônica 0,1.

2.4.2. Glicinina

A glicinina é a forma purificada da globulina 11S. O modelo aceito da glicinina é um hexâmero com P.M. 360 KDa (IYENGAR & RAVESTEIN, 1981), com doze unidades, sendo seis ácidas (P.M. 34.800 Da) e seis básicas (P.M. 19.600 Da). As subunidades ácidas (A) e básicas (B) se alternam formando anéis com seis subunidades. Os dois anéis (hexâmero) se combinariam superpondo um ao outro através de interações eletrostáticas e/ou pontes de hidrogênio (Figura 6) (BADLEY *et al.*, 1975).

Kitamura *et al.* (1976) propuseram que a globulina consiste em dois monômeros similares, mas não idênticos. O dímero se dissocia em seus monômeros quando está em baixa força iônica ou pH levemente alcalino. Já na presença de uréia ou SDS, a globulina se dissocia reversivelmente em suas subunidades intermediárias e na presença de uréia ou SDS e β -mercaptoetanol, um redutor dissulfeto, ela se dissocia irreversivelmente em suas subunidades (Figura 7).

Figura 7. Mecanismo para dissociação da glicinina da soja em subunidades e novamente em peptídeos.

Em solução ácida e baixa força iônica formam-se duas espécies, uma com velocidades de sedimentação 2S e outra de 5S (SGARBIERI, 1996).

A estrutura quaternária da glicinina é rompida através de calor, altas concentrações de uréia ou detergentes e pH alto ou baixo. Em baixa força iônica (0,01) a glicinina se dissocia parcialmente em componentes 2 a 3S (provavelmente as subunidades "intermediárias") e 7S (meia-molécula de glicinina) (WOLF & COWAN, 1971).

Foi demonstrado também a ocorrência de duas espécies moleculares de glicinina, uma dissociável e outra não-dissociável em suas meias-moléculas em baixa força iônica, sendo que a espécie dissociável se associa reversivelmente em 11S quando em alta força iônica (UTSUMI *et al.*, 1984). A espécie dissociável apresenta mudanças conformacionais devido a mudanças de força iônica enquanto que a não-dissociável permanece estável.

A desnaturação alcalina da glicinina (pH acima de 11,0) parece envolver quebra de alguns grupos dissulfeto mais susceptíveis, com formação de novos grupamentos sulfidríla (DRAPER & CATSIMPOOLAS, 1978).

A desnaturação ácida da glicinina com subsequente dissociação em subunidades, provavelmente devido à repulsão eletrostática entre elas, começa em pH 3,75 e atinge um máximo em pH 2. A desnaturação reversível induzida por uréia 6 M é mais efetiva no desdobramento da glicinina que a desnaturação alcalina. A dissociação e o desdobramento simultâneo das cadeias polipeptídicas da glicinina, provocados pelo tratamento ácido, se tornam menos pronunciados com o aumento de força iônica de 0,01 para 0,5 (LEI & REECK, 1987).

A glicinina é tida como não sendo uma glicoproteína, ao contrário da β -conglucina. No entanto, cerca de 1 % da glicinina se liga à coluna de concanavalina-A agarose e só elui após a aplicação de α -metil-D-manosídeo. Os polipeptídeos básicos parecem não ser glicosilados e cerca da metade dos polipeptídeos ácidos desta glicinina o são (LEI & REECK, 1987).

2.5. Derivados protéicos da soja

A concentração de isoflavonas na soja e seus derivados pode variar muito, pois depende da variedade do grão, solo, clima, local onde foi cultivada e principalmente do tipo de processamento utilizado no preparo dos produtos protéicos (LEE *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2008).

As condições de processamento da soja podem provocar alterações no teor total e no perfil de isoflavonas presentes, assim como nas frações protéicas.

A maioria das isoflavonas na soja e seus derivados protéicos como farinha, isolado protéico, concentrado protéico e proteína texturizada encontra-se na forma esterificada (97-98 %). A distribuição entre essas formas, no entanto, varia de produto para produto (WANG & MURPHY, 1994b).

O termo derivado protéico de soja refere-se aos derivados processados a partir do resíduo resultante da extração do óleo. A farinha de soja é obtida na forma integral ou desengordurada e estas podem ser tostadas ou extrusadas. O processo de desengorduramento não afeta o teor e perfil das isoflavonas (ELDRIDGE & KWOLEK, 1983), porém afeta a solubilidade protéica por provocar desnaturação das proteínas (VISSER & THOMAS, 1987). A utilização de calor na obtenção da farinha tostada ou extrusada causa mudança no perfil das isoflavonas (COWARD *et al.*, 1993). Porém, o calor oferece a vantagem de aumentar o valor nutricional, por inativar fatores antinutricionais, aumentar a digestibilidade protéica, e reduzir o "off-flavor" (VISSER & THOMAS, 1987).

A farinha de soja tostada e extrusada contém um elevado teor de acetilglicosídeos e um decréscimo do teor de malonilglicosídeos, em relação ao grão, devido ao calor seco empregado no processamento que acarreta perda do dióxido de carbono (descarboxilação) dos malonilglicosídeos. Como também, os malonilglicosídeos e acetilglicosídeos são susceptíveis ao calor e facilmente convertidos em β -glicosídeos, mais termoestáveis (FARAJ & VASANTHAN, 2004).

O concentrado protéico de soja é produzido a partir da farinha de soja, e apresenta cerca de 70% de proteínas. Há dois processos para obtenção dos concentrados, extração alcóolica ou em solução aquosa a pH 4,5, podendo ou não ser realizados à quente (ERICKSON, 1995).

Esses tratamentos afetam tanto o conteúdo de isoflavonas, obtendo-se um teor reduzido quando a extração é realizada em solução alcoólica, quanto as propriedades funcionais das proteínas, como por exemplo, na extração com aquecimento brando, onde há uma pequena desnaturação protéica, nota-se um aumento da solubilidade (VISSER & THOMAS, 1987).

Em relação aos isolados protéicos de soja existem várias opções dos parâmetros de processamento, sendo que a tecnologia empregada no processo de obtenção permite o desenvolvimento de funcionalidade específica, otimizada para cada uma das aplicações indicadas, tais como, suplementos alimentares, panificação, produtos não-lácteos, entre outros (AGRAWAL *et al.*, 2004).

O isolado é a forma mais refinada entre os derivados protéicos, contém mais de 90% de proteína, e é preparado a partir do processo de extração aquosa da farinha em pH alcalino, sendo removidas as fibras e após precipitação no

ponto isoelétrico das proteínas, os açúcares (solúveis em água). O precipitado é lavado com água e seco por atomização, resultando no isolado isoelétrico, ou pode ser ainda neutralizado com hidróxido de sódio ou potássio antes da secagem, formando o proteinato de sódio ou potássio. Os proteinatos apresentam a vantagem de uma maior dispersibilidade em água que os isolados isoelétricos, que são insolúveis em água (WOLF, 1970a). Em relação ao perfil, as agliconas apresentam-se em maior concentração que os glicosídeos desesterificados, devido a conversão de conjugados β -glicosídeos em agliconas, numa reação catalisada por enzimas β -glicosidases endógenas da soja ou de origem microbiana (MATSUURA *et al.*, 1989; BARBOSA *et al.*, 2006). Durante hidratação de grãos de soja, β -glicosidases endógenas podem ser ativadas e atuar sobre β -glicosídeos convertendo-os em agliconas (MATSUURA & OBATA, 1993).

O processamento de secagem do isolado usando-se "spray-drying" leva a uma maior proporção de acetilglicosídeos e decréscimo de malonilglicosídeos, como resultado do aquecimento. Porém isso não se observa quando se utiliza a liofilização (GENOVESE *et al.*, 2007).

Descarboxilação, desesterificação, lavagem com solventes polares e hidrólise alcalina ou enzimática acarretam uma mudança significativa nas formas das isoflavonas nos derivados protéicos de soja (FARAJ & VASANTHAN, 2004). Wang & Murphy (1996) observaram que durante as etapas de processamento na obtenção dos derivados protéicos ocorre perdas das isoflavonas. Na produção do tempeh ocorreu perda das isoflavonas durante o molho da soja (12 %) e no processo de aquecimento 49 % das isoflavonas foram perdidas. Na etapa de coagulação no processamento do tofu perdeu-se 44 % das isoflavonas. Wang & Murphy (1996) relataram também que, na extração alcalina do processamento do IPS perde-se 53 % das isoflavonas, no entanto, Barbosa *et al.* (2006) relataram uma redução de 30 % na perda das isoflavonas durante extração alcalina, utilizando-se água de lavagem acidificada.

Portanto, novas tecnologias de processamento ou modificação nos processos existentes são necessárias para minimizar as perdas e conversões das isoflavonas durante o processamento da soja.

A farinha de soja desengordurada é muito utilizada no enriquecimento protéico de pães, bolachas, tortas e outros tipos de alimentos de confeitaria. Pelas suas características funcionais, o isolado protéico de soja é muito utilizado no processamento de suplementos alimentares (misturas em pó), bebidas prontas para consumo, panificação, produtos cárneos, tais como salsichas,

linguiças, mortadelas, almôndegas, quibes e hambúrgueres; e também são os mais adequados para adição acima de 10 % em produtos cárneos, já que adição de farinha e concentrados protéicos, nesta porcentagem, gera problemas relacionados com a textura e com o aroma dos produtos (KINSELLA, 1979).

Segundo Garcia *et al.* (1998), os concentrados protéicos de soja são extensivamente utilizados pela indústria de produtos cárneos devido as suas propriedades físico-químicas. Sua aplicação melhora a estabilização da emulsão, funciona como extensor reduzindo o encolhimento durante o cozimento, melhora a firmeza, a flexibilidade, a textura e a qualidade nutricional, além do baixo custo quando comparado a proteínas de origem animal.

Já, as proteínas texturizadas de soja são amplamente consumidas como substitutos da carne e pela indústria alimentícia como ingrediente alimentar, uma vez que apresentam textura similar a tecidos musculares, alta capacidade de hidratação e fácil incorporação de sabor e aroma (GENOVESE & LAJOLO, 2002).

Desta maneira, novos produtos alimentícios são gerados através do avanço dos conhecimentos científicos, relacionando dieta e saúde, aliado aos custos da saúde pública e aos interesses econômicos da indústria. Atualmente, existe a preocupação em incorporar ingredientes que possuam propriedades capazes de proporcionar efeitos benéficos à saúde. Assim, a sociedade, o consumidor, a comunidade científica, os órgãos reguladores e a mídia estão demonstrando maior interesse na relação saúde e hábitos alimentares (ARABBI, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Estudo das interações isoflavonas e proteínas da soja e biodisponibilidade *in vivo* e *in vitro* das isoflavonas livres e associadas às proteínas.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterização do grão, grão cozido e hipocótilo e cotilédone de soja em relação ao perfil e biodisponibilidade *in vitro* de isoflavonas.
- Estudo das interações isoflavonas e proteínas da soja em isolado protéico e farinha desengordurada de soja, determinando a ocorrência ou não de interações preferenciais pelas frações 7S e 11S das proteínas.
- Estudo da biodisponibilidade das isoflavonas livres e associadas às proteínas *in vivo* e *in vitro*.
- Avaliação do efeito das isoflavonas livres, das isoflavonas associadas às proteínas e das proteínas de soja isentas de isoflavonas sobre o status antioxidante *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A soja em grão foi obtida no comércio local, e a farinha desengordurada de soja (FDS) e o isolado protéico de soja (IPS) foram obtidos na Exin Internacional Ltda (São Paulo, SP). O hipocótilo e cotilédone foram obtidos manualmente a partir do grão de soja. As amostras foram moídas em moinho Janke & Kunkel A-10 (Ika & Works, Inc., Wilmington, EUA) e passadas em peneira 60 mesh (0,25 mm) previamente à extração. Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico ou grau cromatográfico (HPLC) quando necessário. A poliamida em pó utilizada na extração em fase sólida foi obtida da Macherey-Nagel (Polyamide CC6, no catálogo 815.620). Após o recebimento, a soja e seus derivados foram armazenados no freezer (-18 °C), durante todo o período de estudo.

4.1. Determinação de umidade

A umidade da soja em grão, hipocótilo, cotilédone, farinha desengordurada e isolado protéico de soja foi determinada por dessecação em estufa a 105 °C até peso constante (AOAC, 1995). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2. Determinação do conteúdo protéico

As amostras do grão, hipocótilo e cotilédone de soja tiveram seu conteúdo protéico determinado através do método de micro-Kjeldahl ($N \times 6,25$) (AOAC, 1995). As análises foram realizadas em triplicata.

4.3. Determinação de lipídeos

As amostras do grão, hipocótilo e cotilédone de soja tiveram seu conteúdo lipídico determinado através do método de Soxhlet (AOAC, 1995). Foram pesadas 5 g das amostras seca (obtidas após determinação da umidade) em cartucho de extração. Os cartuchos foram transferidos para tubo extrator e o sistema de Soxhlet montado. Os balões de Soxhlet foram previamente tarados em estufa a 105 °C, e foi adicionado de n-hexano. A extração continua em chapa quente (faixa de ebulição do n-hexano entre 68-70 °C) procedeu por 6 horas.

Após desmontagem do sistema de Soxhlet, os balões tiveram seu solvente evaporado com recuperação do solvente e foram secos em estufa a 105 °C por 1 hora. Os balões foram resfriados em dessecador e pesados. As análises foram realizadas em triplicata.

4.4. Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas das amostras do grão, hipocótilo e cotilédone de soja foi realizada utilizando-se cadinhos de porcelana previamente tarados em estufa a 105 °C (AOAC, 1995). As análises foram realizadas em triplicata.

4.5. Determinação de carboidratos totais

Os carboidratos totais foram calculados por diferença (100g – total de gramas de umidade, proteína, lipídeos e cinzas).

4.6. Determinação de fibra alimentar total

A determinação de fibras solúveis e insolúveis foi realizada de acordo com a metodologia enzimático-gravimétrico modificada de Prosky *et al.* (1992). As análises foram realizadas em triplicata.

4.7. Determinação de amido

Os teores de amido foram determinados enzimaticamente pelo método descrito por Áreas & Lajolo (1981). O amido foi extraído com hidróxido de sódio 0,5 N, precipitado com etanol 80 %, hidrolisado com amiloglicosidase e a glicose liberada determinada pelo sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS, segundo método de BERGMEYER (1974). As análises foram realizadas em triplicata.

4.8. Determinação de açúcares totais

O conteúdo de açúcares totais foi determinado pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). O método baseia-se na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após a desidratação das amostras pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A mudança da cor da solução é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. Em 200 μ L de amostra foram adicionados 200 μ L de solução de fenol 5 % (p/v) em água, mais 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 minutos, a absorbância máxima foi medida no λ de 490 nm contra o branco, em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 (Palo Alto, EUA). A curva de calibração foi obtida utilizando-se padrão contendo 20, 40, 60 e 100 μ moles de glicose. As análises foram realizadas em triplicata.

4.9. Determinação de açúcares solúveis

Os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram extraídos com etanol 80 % a 80 °C por três vezes, os sobrenadantes foram combinados, o etanol evaporado por sistema a vácuo a baixas temperaturas (speed vac) e o volume reconstituído com água. Os açúcares foram quantificados por HPLC por cromatografia de troca iônica utilizando um cromatógrafo da DIONEX modelo DX500 acoplado com detector de pulso amperométrico, modelo ED40. A coluna utilizada foi a CARBOPAC PA 1 (4x250 mm). A eluição dos carboidratos foi realizada com gradiente isocrático de NaOH 18 mM, temperatura isotérmica de 32 °C e fluxo de 1 mL/min. As análises foram realizadas em triplicata.

4.10. Determinação de rafinose e estaquiase

Os oligossacarídeos rafinose e estaquiase foram extraídos e determinados por HPLC segundo Hitz *et al.* (2002). As amostras foram extraídas com etanol 80 % a 80 °C por três vezes e uma última extração com água a 60 °C. Os extratos foram centrifugados a 10000 *g*/10 min/4 °C, reunidos e rotaevaporados até a eliminação total do etanol. As amostras foram ressuspensas em 5 mL de água e uma alíquota de 1 mL foi aplicado em colunas de troca iônica (5 x 1 cm) contendo resinas nas formas aniônica (Dowex 1 x 8 -200) e catiônica (Dowex 50W x 40 - 200).

Os açúcares neutros foram eluídos com 30 volumes de água deionizada, neutralizados com hidróxido de amônia, concentrados até secar por liofilização e solubilizados em 1 mL de água deionizada (18 Ohz). A separação e quantificação foram realizadas por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD), utilizando-se coluna Carbopac PA1 (4 x 250mm), no sistema da Dionex modelo DX-500 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA). A eluição dos carboidratos foi realizada com gradiente isocrático de NaOH 100 mM, temperatura isotérmica de 32 °C e fluxo de 1 mL/min. Foram utilizados padrões sacarose, rafinose e estaquiose da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). As análises foram realizadas em triplicata.

4.11. Determinação da atividade inibitória de tripsina

A atividade inibitória de tripsina foi determinada de acordo com Kakade *et al.* (1969) usando benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPA) como substrato: 0,2 a 1,0 mL das soluções protéicas foram pipetados, em triplicata, e o volume final ajustado para 1,0 mL com água. A cada tubo, previamente acondicionado em banho-maria a 37 °C, adicionou-se 1,0 mL da solução de tripsina (0,05 mg/mL de HCl 0,001N) e 7,0 mL de BAPA (0,3 mg/mL de tampão Tris 50 mM, pH 8,2, contendo CaCl₂ 20 mM), previamente aquecidos a 37 °C. A reação foi interrompida após 10 minutos pela ação adição de 1 mL de ácido acético 30 % e a absorbância lida a 410 nm, em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 (Palo Alto, EUA), contra os brancos nos quais adicionou-se o ácido acético antes do BAPA. Uma unidade de tripsina foi definida arbitrariamente como um aumento de 0,01 unidades de absorbância a 410 nm por 10 mL do meio de reação. Os resultados foram expressos como unidades inibitórias de tripsina (UIT) por mg de amostra, sendo uma unidade inibitória responsável pela inibição de uma unidade de tripsina. As análises foram realizadas em triplicata.

4.12. Análise de isoflavonas

4.12.1. Extração

As amostras foram extraídas com agitador mecânico e barra magnética por 2 horas a 4 °C, na proporção de 1:20 (m/v), com metanol aquoso 80 %, segundo Genovese & Lajolo (2001a,b). Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. Para concentração dos extratos foi utilizado rotaevaporador (Rotavapor® RE 120 – Büchi, Flawil, Suíça), em temperatura de banho de 40 °C. As amostras foram concentradas até eliminação do metanol e transferidas para balão volumétrico. Foi adicionado metanol (grau cromatográfico) para correção do volume, de forma a se obter concentração final de cerca de 80 % de metanol, e os extratos foram então filtrados utilizando-se filtros de polietileno com membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), de 0,45 µm de poro (Millipore Ltd., Bedford, EUA) para posterior análise por CLAE/DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos). As extrações foram realizadas em triplicata.

4.12.2. Extração em fase sólida

Os extratos aquosos foram passados em coluna de 1 g de poliamida (PA) previamente condicionada pela passagem de 20 mL de metanol seguidos por 60 mL de água destilada. A coluna foi então lavada com 20 mL de água destilada e as isoflavonas posteriormente eluídas com 50 mL de metanol:amônia 99,5:0,5, segundo Genovese & Lajolo (2001a). Foi utilizado manifold Visiprep 24 DL da Supelco (Bellefonte, EUA). Os eluatos foram evaporados sob vácuo a 40 °C até atingir o volume de 0,8 mL. As amostras foram transferidas para balão volumétrico e o volume completado com metanol (grau cromatográfico) para 2 mL. As amostras foram então filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana (PTFE) de 0,45 µm de poro para análise por CLAE/DAD.

Os extratos aquosos em pH alcalino (maior que pH 7) tiveram o pH acertado para a neutralidade antes de serem passados pela coluna de poliamida, já que observou-se que não havia ligação dos malonilglicosídeos em pH alcalino.

4.12.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A separação e quantificação das isoflavonas e de suas formas conjugadas foi realizada em coluna C18 Synergi 4 μ Fusion RP (250 x 4,6 mm; 4 μ m) (Phenomenex, EUA) de acordo com o método de Song *et al.* (1998), com algumas modificações. O cromatógrafo líquido utilizado foi o da Hewlett Packard (Palo Alto, EUA) série 1100, equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detetor com arranjo de diodos (DAD), controlado pelo software ChemStation. Alíquotas de 20 μ L foram injetadas em fluxo de 1 mL/min, utilizando solvente A: 0,1 % ácido acético, 5 % de acetonitrila em água e solvente B: 0,1 % ácido acético em acetonitrila. O gradiente linear foi iniciado com 10 % do solvente B, passando para 14 % em 10 minutos, para 17 % em 20 minutos, atingindo 60 % em 30 minutos, mantém 60 % até 33 minutos, decrescendo para 10 % em 35 minutos. A calibração foi realizada com os padrões de daidzeína e genisteína da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA), daidzina e genistina da Apin Chemicals Ltd. (Abingdon, Reino Unido), glicitina e gliciteína da Fujicco Co. Ltd. (Kyoto, Japão), acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina foram obtidos da LC Laboratories (Woburn, EUA) injetados em triplicata, em cinco concentrações diferentes. A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção e dos espectros. As amostras foram injetadas em duplicata. Os resultados foram expressos como mg de isoflavonas (agliconas) por 100 g de amostra (b.u.). As formas das isoflavonas (β -glicosídeos, malonilglicosídeos, acetilglicosídeos e agliconas) foram expressas em % do total (p/p).

4.13. Determinação de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado de acordo com o método de Singleton *et al.* (1999), com algumas modificações descritas a seguir. Alíquotas de 0,25 mL dos extratos metanólicos 80 % foram adicionadas de 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Os tubos foram levados para o banho-maria a 37 °C por 30 minutos para desenvolver a coloração. Solução de catequina (0,2 mg/mL metanol) foi utilizada como padrão. As leituras de absorbância foram realizadas em 750 nm em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 (Palo Alto, EUA). Os

resultados foram expressos como mg de catequina por 100 g de amostra (b.u.). As análises foram realizadas em triplicata.

4.14. Determinação da capacidade antioxidante – seqüestro de radicais livres do DPPH•

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra, segundo descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). A solução de DPPH• (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), ~20 mg/mL em metanol, foi preparada de forma a apresentar absorvância em 517 nm entre 0,6 e 0,7. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, EUA) para uso em comprimento de onda entre 340-800 nm. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 250 µL da solução de DPPH•, 40 µL de metanol para o grupo controle, ou o mesmo volume de extrato para as amostras, adequadamente diluídas. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 20 minutos, no escuro. As leituras das absorvâncias foram realizadas em 517 nm em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). A absorvância das amostras (Am) correlacionada à absorvância do controle (Ac) resulta na porcentagem de seqüestro de radicais livres (% SRL), que pode ser expressa através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ SRL} = \frac{(Ac - Am)}{Ac} \times 100$$

A curva de calibração foi preparada com uma solução de Trolox (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), e os resultados foram expressos em µmoles equivalentes de Trolox/g de amostra (b.u.). As análises foram realizadas em triplicata.

4.15. Determinação da capacidade antioxidante – sistema co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método de descoramento do β -caroteno (MILLER, 1971), com pequenas modificações (HASSIMOTTO *et al.*, 2005). Para o preparo da solução reativa, alíquotas de 20 μ L de uma solução de β -caroteno em clorofórmio (2 mg/mL) foram misturadas com 30 μ L de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 200 μ L de Tween 40. Posteriormente, o clorofórmio foi evaporado até secagem completa, sob nitrogênio. Após evaporação do clorofórmio, foram adicionados aproximadamente 30 mL de água destilada saturada de oxigênio e a mistura foi agitada. A absorbância da solução foi então ajustada com água para 0,6. Para a reação de oxidação, uma alíquota (9 μ L) do extrato foi adicionada a 241 μ L da solução de β -caroteno em placa de microtitulação. As amostras foram então submetidas à auto-oxidação a 45 °C por 3 horas. A absorbância da solução a 470 nm foi medida no tempo zero e em intervalos de 15 minutos usando-se o Microplate Spectrophotometer Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). Para o controle, foi utilizado metanol e BHT. As análises foram realizadas em triplicata. A capacidade antioxidante foi calculada pela porcentagem de inibição relativa ao controle (100% de oxidação) e os resultados expressos como μ moles equivalentes de BHT/g de amostra (b.u.).

4.16. Determinação da digestibilidade protéica *in vitro*

A digestibilidade *in vitro* foi determinada através do nitrogênio (N) liberado no sobrenadante, pelo método de micro-Kjeldahl (AKESON & STAHMANN, 1964). A hidrólise foi realizada a partir de 100 mg de amostra em 10 mL solução HCl 0,1N, adicionado de 4 mg de pepsina EC 3.423.1 obtida da Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA), por 3 horas a 37 °C. A reação foi interrompida adicionando-se TCA, de forma a obter concentração final de 5 %. Os extratos foram centrifugados a 10000 g/10 min/4 °C e do sobrenadante foi retirada alíquota para a determinação da digestibilidade *in vitro* e para a determinação das isoflavonas, segundo o item 4.12. O precipitado foi liofilizado e as isoflavonas foram analisadas segundo o item 4.12. Dois brancos foram preparados, contendo apenas enzima (branco enzima) ou apenas proteína (branco amostra). As análises foram realizadas em triplicata. A correlação entre o nitrogênio total da amostra e o nitrogênio contido no hidrolisado

(sobrenadante), determinados pelo método de micro-Kjeldahl, permite o cálculo de digestibilidade, através da fórmula:

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \frac{N_{\text{digerido}} \times 100}{N_{\text{total}}} = \frac{N_{\text{S.A.}} - N_{\text{S.B.e.}} - N_{\text{S.B.a.}} \times 100}{N_{\text{T}} - N_{\text{Be}}}$$

onde:

$N_{\text{S.A.}}$ = N contido no sobrenadante da amostra

$N_{\text{S.B.e.}}$ = N contido no sobrenadante do branco enzima

$N_{\text{S.B.a.}}$ = N contido no sobrenadante do branco amostra

N_{T} = N total contido na amostra

N_{Be} = N total contido no branco enzima

4.17. Eletroforese em condições dissociantes (SDS-PAGE)

A eletroforese em presença de dodecil sulfato de sódio foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando-se concentração de 12 % de poliacrilamida para o gel de separação. Foram aplicadas de 20 a 80 µg de proteína por poço. As amostras foram preparadas utilizando-se volumes iguais (100 µL) das soluções protéicas e do tampão da amostra contendo 4 % de β-mercaptoetanol e 4 % de SDS, e mantidas em banho-maria fervente durante 2 a 3 minutos. Após o término da corrida (voltagem constante de 200 V, durante 50 minutos), os géis foram revelados com solução metanólica de Coomassie Blue R. Uma solução contendo 10 % de etanol e 7 % de ácido acético foi usada como descorante. Os padrões de peso molecular utilizados foram LMW (Amersham Biosciences), contendo α-lactalbumina (14,4 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), ovoalbumina (43 kDa), albumina de soro bovino (67 kDa) e fosforilase B (94 kDa).

4.18. Quantificação das isoflavonas totais, livres e ligadas às proteínas a partir da farinha desengordurada de soja (FDS)

A FDS foi extraída com agitador mecânico e barra magnética por 1 hora à temperatura ambiente, na proporção de 1:20 (m/v) com NaOH 0,1 M, segundo Carbonaro *et al.* (2000), com algumas modificações. Os extratos foram centrifugados a 10000 g/10 min/ 4 °C e uma alíquota de 10 mL foi separada para posterior análise (extrato bruto), o restante foi precipitado até uma concentração final de TCA 5 % e novamente centrifugado a 10000 g/10 min/ 4 °C. O sobrenadante, denominado fração solúvel (FS), e o precipitado, denominado fração insolúvel (FI) foram analisados em relação ao teor e perfil de isoflavonas, segundo o item 4.12. As extrações foram realizadas em triplicata.

4.19. Solubilização de proteínas e isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja (FDS)

A solubilização de proteínas e isoflavonas da FDS por diversas soluções foi realizada utilizando-se a proporção FDS:solução 1:40 (m/v), sendo a suspensão mantida sob agitação com agitador mecânico e barra magnética durante 1 hora a 4 °C. As soluções testadas foram água, solução aquosa com pH 4,5 e 10, solução de NaCl 0,2 M, solução de SDS 1 %, solução de Triton X-100 1 %. As soluções de SDS e Triton X-100 foram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7. A suspensão foi então centrifugada (10000 g/10 min/4 °C) e o sobrenadante analisado em relação ao teor protéico pelo método de micro-Kjeldahl e teor e perfil das isoflavonas, segundo o item 4.12. As análises foram realizadas em triplicata.

4.20. Fracionamento das proteínas (7S e 11S) a partir da farinha desengordurada (FDS) e isolado protéico (IPS) de soja

As duas principais frações protéicas 7S e 11S foram fracionadas segundo Wu (1999), com algumas modificações. As frações foram obtidas a partir da FDS, IPS comercial e IPS lab. (isolado protéico obtido no nosso laboratório) e sua separação foi verificada através da eletroforese em condições dissociantes (SDS-PAGE). As amostras foram extraídas em solução aquosa pH 7,8 utilizando-se a proporção 1:10 (m/v), sendo a suspensão mantida sob

agitação com agitador mecânico e barra magnética durante 1 hora à temperatura ambiente. A suspensão foi então centrifugada (10000 g/10 min/4 °C), a fração insolúvel foi descartada e o sobrenadante foi adicionado de bissulfito de sódio, pH ajustado a 6,4 e permaneceu a 4 °C/overnight. A suspensão foi então centrifugada (10000 g/10 min a 4 °C), a fração precipitada (glicinina – fração 11S) foi lavada com água gelada e liofilizada. O sobrenadante foi adicionado de NaCl 0,2 M, pH ajustado para 5,0 e agitado por 1 hora, novamente centrifugado a 10000 g/10 min/4 °C, e o precipitado (fração intermediária) foi separado e liofilizado. O sobrenadante foi ajustado para pH 4,8 e novamente centrifugado a 10000 g/10 min/4 °C, e o precipitado (β -conglucina – fração 7S) foi lavado com água gelada e liofilizado. As frações liofilizadas foram armazenadas a -18 °C e posteriormente analisadas em relação ao teor e perfil das isoflavonas, segundo o item 4.12. As extrações foram realizadas em triplicata.

4.21. Quantificação da fração indigerível (FRI)

A fração indigerível foi determinada de acordo com Saura-Calixto *et al.* (2000), com algumas modificações. As amostras foram previamente secas e desengorduradas. Em tubos de ensaio, previamente secos e tarados, foram pesados 300 mg de amostra e adicionados de 8 mL de tampão KCl/HCl 0,1 M pH 1,5. As amostras foram homogeneizadas por 2 minutos utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) e em seguida adicionadas de 0,2 mL de pepsina (30 mg/mL de tampão KCl/HCl 0,1 M pH 1,5). Os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho-maria sob agitação a 40 °C por 1 hora. Após incubação, as amostras foram resfriadas, o pH ajustado para 6,9 e em seguida, foram adicionados 9 mL de tampão trismaleato/NaOH 0,1 M pH 6,9 contendo 5 mg de pancreatina (Sigma P1750) e 120 mg de α -amilase (Sigma A3176). Os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho-maria sob agitação a 37 °C por 16 horas. Após incubação, as amostras foram resfriadas e centrifugadas a 3000 g/15 min. O resíduo foi lavado duas vezes com 10 mL de água e centrifugado novamente. Os sobrenadantes foram combinados e os resíduos reservados. A fração indigerível insolúvel foi calculada gravimetricamente após os resíduos serem secos em estufa a 105 °C por 18 h. A fração indigerível solúvel foi obtida após diálise dos sobrenadantes em membrana de diálise de 12000-14000 MWCO por 48 horas a 37 °C em baldes com água sob agitação magnética. A água de diálise foi trocada em intervalos

aproximados de 3 horas, durante o período de 48 h de diálise. Os dialisados foram colocados em estufa a 105 °C por 36 h. Os teores da fração indigerível solúvel foram calculados gravimetricamente. As FRI solúveis e insolúveis foram analisadas em relação ao teor protéico pelo método de micro-Kjeldahl e teor e perfil das isoflavonas, segundo o item 4.12. As análises foram realizadas em triplicata.

4.22. Estudo de biodisponibilidade das isoflavonas *in vivo*

4.22.1. Material

Foram utilizadas amostras de FDS e IPS fornecidas pela Sadia (Sadia S.A., São Paulo, São Paulo) para obtenção de isoflavonas livres e isoflavonas ligadas às proteínas, respectivamente.

4.22.2. Obtenção do extrato

O extrato de isoflavonas livres (EIL) foi obtido após extração da FDS com agitador mecânico e barra magnética por 2 horas a 4 °C, na proporção de 1:20 (m/v), com metanol aquoso 80 %, segundo Genovese & Lajolo (2001a,b). O extrato obtido foi filtrado a vácuo, e concentrado utilizando-se rotaevaporador (Rotavapor® RE 120 – Büchi, Flawil, Suíça), em temperatura de banho de 40 °C, até eliminação do metanol. Uma alíquota de 50 mL do extrato concentrado foi eluída em coluna de 10 g de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 60 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 50 mL de metanol e 80 mL de água destilada. Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 80 mL água destilada e a eluição das isoflavonas foi realizada com 80 mL de metanol:amônia 99,5:0,5. O fluxo através da coluna foi controlado por meio de manifold (Visiprep 24 DL Supelco, Bellefonte, PA). O eluato foi novamente rotaevaporado até eliminação completa do metanol, restando ao final apenas um extrato aquoso que foi congelado para posterior administração aos ratos. Uma alíquota de 20 µL do extrato foi ressuspensa em 800 µL de metanol (grau cromatográfico) e filtrada utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, USA) de 0,45 µ de poro para a quantificação das isoflavonas por CLAE/DAD (segundo item 4.12.3).

O extrato de isoflavonas contendo proteínas (EPI) foi extraído a partir do IPS com agitador mecânico e barra magnética por 1 hora à temperatura ambiente, na proporção de 1:20 (m/v), em solução aquosa. Os extratos obtidos foram centrifugados a 10000 g/10 min/4 °C, e submetidos ao processo de liofilização para a secagem. A amostra liofilizada foi congelada para posterior administração aos ratos. A quantificação das isoflavonas por CLAE/DAD foi realizada segundo o item 4.12 utilizando-se 100 mg da amostra liofilizada em 5 mL de metanol 80%.

4.22.3. Animais

Para o estudo de biodisponibilidade das isoflavonas em ratos, foram utilizados 51 ratos machos Wistar da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, de peso aproximado entre 180 e 200 g. Os animais foram mantidos no biotério, em gaiolas de polipropileno, contendo maravalha previamente esterilizada e com tampas de aço inoxidável, em temperatura e umidade controlada (23 ± 2 °C e 75 % umidade relativa), em foto período artificial (ciclos claro/escuro) de 12/12 horas, com ração padrão e água *ad libitum*. Na noite anterior ao experimento, os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em 12 caixas de 4 animais (sendo distribuídos em 2 grupos: ao grupo iso foi administrado EIL e ao grupo iso + prot foi administrado EPI), mais o grupo controle com 3 animais (foi administrado água) e mantidos em jejum por 8 horas com acesso a água *ad libitum*.

Todos os experimentos com animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e encontra-se sob Protocolo nº109 de 10/07/2006.

4.22.4. Desenho experimental

O extrato de isoflavonas livres e isoflavonas contendo proteínas obtido em 4.22.2 foi dissolvido em água e administrado aos animais por gavagem na concentração de 2,5 mg de isoflavonas/200 g peso do animal, com exceção do grupo controle ao qual foi administrado água. Após a gavagem, os animais foram devolvidos às gaiolas providas de água, sem a ração.

Os ratos foram anestesiados com o cloridrato de cetamina: xilazina (2:1). O cloridrato de cetamina (Dopalen, Vetbrands), na dose de 0,1 mL/100 g de peso corpóreo, associado à xilazina (Rompum, Bayer), na dose de

0,05 mL/100 g, foram aplicados via intraperitoneal. Os animais foram sacrificados após 30 minutos, 1, 2, 3, 6 e 8 horas após a administração do extrato (n=4 para cada tempo). O sangue foi coletado através da artéria abdominal em tubo à vácuo com EDTA (3 mL). Os rins, fígado, estômago, intestino delgado e intestino grosso também foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

4.22.5. Preparação e determinação das isoflavonas no material biológico

A) Sangue. O sangue coletado foi centrifugado a 2000 g/ 15 min/4 °C e o plasma separado foi congelado a -80 °C. A determinação das isoflavonas no plasma foi realizada segundo Piskula *et al.* (1999), com algumas modificações. Uma alíquota do plasma (1,5 mL) foi eluída em coluna de 0,5 g de Supelclean C-18 (Supelco, Bellefond, PA, USA), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technolog) e pré-condicionada pela passagem de 5 mL de metanol e 10 mL de água destilada. Após a aplicação do plasma, a coluna foi lavada com 10 mL de água destilada e a eluição das isoflavonas foi realizada com 15 mL de metanol:amônia 99,5:0,5. Os eluatos assim obtidos foram concentrados a 50 µL em rotaevaporador a 40 °C sob vácuo e adicionados de 250 µL de metanol (grau cromatográfico) para quantificação por CLAE/DAD (segundo item 4.12.3).

A área abaixo da curva de concentração vs tempo (AAC_{0-8h}) das isoflavonas no plasma foi calculada utilizando o programa ORIGIN 6.0 do Windows-based Data Analysis (Microsoft Corporation, EUA).

B) Estômago, rins, fígado, intestino delgado e intestino grosso. Os órgãos foram pesados e liofilizados. O tecido inteiro foi homogeneizado por 2 minutos utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em banho de gelo, sendo utilizado 50 mL de metanol 80 % na extração do fígado e 25 mL de metanol 80 % para os outros tecidos. O extrato assim obtido foi posteriormente centrifugado a 10000 g/10 min/4 °C e o resíduo re-extraído nas mesmas condições. Juntou-se o sobrenadante das duas extrações e concentrou-se em rotaevaporador a 40 °C até a remoção do metanol. Uma alíquota da amostra concentrada foi eluída em coluna de 0,5 g de Supelclean C18, como descrito anteriormente no item 4.22.5-A. Os eluatos foram rotaevaporados a 40 °C sob vácuo até 200 µL e adicionados de 800 µL de metanol (grau cromatográfico) para quantificação por CLAE/DAD (segundo item 4.12.3).

4.22.6. Hidrólise enzimática das isoflavonas no material biológico

As isoflavonas no plasma, rins, fígado e intestino grosso foram determinadas após hidrólise enzimática dos conjugados com β -glucuronidase-sulfatase EC 3.1.6.1 (Sigma Chemicals Co., St. Louis, E.U.A.), segundo Taylor *et al.* (2005), com algumas modificações. As amostras metanólicas obtidas no item 4.22.5 A e B foram transferidas para eppendorf e secas sob fluxo de nitrogênio. O frasco seco foi adicionado de 300 μ L de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5 e sonicado por 10 minutos. Adicionou-se então 50 μ L da enzima β -glucuronidase-sulfatase, e incubou-se por 30 minutos a 37 °C. O extrato foi eluído em coluna de 0,2 g de Supelclean C-18 (Supelco, Bellefond, PA, USA), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology) e pré-condicionada pela passagem de 5 mL de metanol e 10 mL de água destilada. Após a aplicação do extrato, a coluna foi lavada com 10 mL de água destilada e a eluição das isoflavonas foi realizada com 15 mL de metanol:amônia 99,5:0,5. Os eluatos assim obtidos foram concentrados a 50 μ L em rotaevaporador a 40 °C sob vácuo e adicionados de 250 μ L de metanol (grau cromatográfico) para quantificação por CLAE/DAD (segundo item 4.12.3).

4.23. Estudo do efeito das isoflavonas sobre o status antioxidante *in vivo*

4.23.1. Material

Foram utilizadas amostras de FDS para obtenção de isoflavonas livres e IPS para obtenção de isoflavonas ligadas às proteínas e extrato protéico isento de isoflavonas.

4.23.2. Obtenção do extrato

Os extratos de isoflavonas livres (EIL) e o protéico contendo isoflavonas (EPI) foram obtidos segundo item 4.22.2.

O extrato protéico isento de isoflavonas (EP) foi obtido a partir do EPI liofilizado (item 4.22.2). As isoflavonas liofilizadas foram extraídas em MeOH 80 % com agitador mecânico e barra magnética por 2 horas a 4 °C, na

proporção de 1:20 (m/v). Os extratos foram centrifugados a 10000 g/10 min/4 °C e o resíduo re-extraído nas mesmas condições. O extrato agora foi filtrado a vácuo e o papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para a placa de petri e submetido ao processo de liofilização para a secagem. A amostra liofilizada foi removida do papel de filtro e congelada até a administração aos ratos. A quantificação das isoflavonas por CLAE/DAD foi realizada segundo o item 4.12 utilizando-se 100 mg da amostra liofilizada em 5 mL de metanol 80%.

4.23.3. Animais

Os animais utilizados foram ratos machos Wistar da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (no máximo quatro ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável e contendo maravalha previamente esterilizada, a qual foi trocada duas vezes por semana. Os ratos foram adquiridos pesando entre 50-65 g, estes receberam *ad libitum*, durante todo o experimento, água destilada e ração padrão peletizada e permaneceram ainda sob temperatura e umidade controlada (23 ± 2 °C e 75 % umidade relativa), em foto período artificial (ciclos claro/escuro) de 12/12 horas.

Todos os experimentos com animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e encontra-se sob Protocolo nº109 de 10/07/2006.

4.23.4. Desenho experimental

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos (8 ratos por grupo). Grupo controle: aos quais foi administrada diariamente água por gavagem; Grupo iso: os quais receberam diariamente por gavagem extrato de isoflavonas livres (EIL) diluído em água deionizada (1,0 mg/200 g peso corpóreo); Grupo iso+prot: os quais receberam diariamente por gavagem extrato protéico contendo isoflavonas (EPI) dissolvido em água deionizada (1,0 mg/200 g peso corpóreo); Grupo prot: os quais receberam diariamente por gavagem extrato protéico isento de isoflavonas (EP) diluído em água deionizada (1,56 g proteína/200 g peso corpóreo, a mesma quantidade ingerida pelo grupo iso+prot). O experimento foi iniciado após uma semana de climatização dos animais nas gaiolas, e os animais foram tratados durante 30 dias. O consumo de

ração e o peso corpóreo foram determinados diariamente. Anterior ao sacrifício, os animais foram mantidos em jejum de 8 h com acesso a água *ad libitum*.

Os ratos foram anestesiados com o cloridrato de cetamina: xilazina (2:1). O cloridrato de cetamina (Dopalen, Vetbrands), na dose de 0,1 mL/100 g de peso corpóreo, associado à xilazina (Rompum, Bayer), na dose de 0,05 mL/100 g, foram aplicados via intraperitoneal. O sangue foi coletado através da artéria abdominal em tubo a vácuo com EDTA (3 mL). O sangue coletado foi imediatamente refrigerado em banho de gelo e centrifugado a 2000 g/15 min/4 °C e o plasma separado foi congelado a -80 °C. A seguir foram coletados cérebro, fígado, baço e rins, os quais foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

4.23.5. Extração dos tecidos biológicos

Os tecidos congelados foram primeiramente pulverizados em graal com nitrogênio líquido. A seguir, foram extraídos na proporção de 1:5 (m/v) em tampão fosfato 50 mM pH 7,4 e homogeneizados por 2 minutos utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça), em banho de gelo. O extrato assim obtido foi posteriormente centrifugado a 10000 g/10 min/4 °C, e o sobrenadante utilizado para as análises posteriores. As análises foram realizadas em duplicata.

4.23.6. Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da catalase (EC 1.11.1.6) foi determinada no plasma, no eritrócito e no homogenato dos tecidos de acordo com Aebi (1984). Os reagentes utilizados foram tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 30 mM. O meio de reação foi composto de 640 µL de tampão fosfato, 20 µL da amostra, previamente diluída, e a reação foi iniciada com a adição de 340 µL de peróxido de hidrogênio. Fez-se a leitura da absorbância a 230 nm em espectrofotômetro em intervalos de 15 segundos durante 240 segundos, sendo a primeira leitura após 30 segundos. Durante as leituras, as cubetas foram mantidas em banho a 37 °C. ($\epsilon_{\text{catalase}_{230}} = 0,071 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O resultado foi expresso em unidade de atividade (UA)/min/g proteína (para as amostras de eritrócitos, o resultado foi expresso em concentração de hemoglobina). As análises foram realizadas em duplicata.

4.23.7. Determinação da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx (EC 1.11.1.9) foi determinada no plasma, no eritrócito e no homogenato dos tecidos de acordo com Wendel (1981), utilizando o peróxido de tercbutila como substrato da reação, ocorrendo a oxidação da GSH pela GPx gerando GSSG, que é convertido em GSH pela glutathiona redutase, consumindo nessa reação uma molécula de NADPH, a qual é acompanhada em espectrofotômetro a 340 nm. O meio de reação foi composto por tampão Tris HCl 0,1 M EDTA 0,5 mM pH 8,0; glutathiona redutase (0,1 U/mL) glutathiona reduzida (GSSH) e NADPH. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de tercbutila 0,5 mM. Fez-se a leitura da absorbância a 340 nm em espectrofotômetro em intervalos de 60 segundos durante 450 segundos, sendo a primeira leitura após 30 segundos. Durante as leituras, as cubetas foram mantidas em banho a 37 °C. (ϵ NADPH = $6,22 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O resultado foi expresso em UA/min/g proteína (para as amostras de eritrócitos, o resultado foi expresso em concentração de hemoglobina). As análises foram realizadas em duplicata.

4.23.8. Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada no plasma, no eritrócito e no homogenato dos tecidos de acordo com Flohe & Otting (1984), que utiliza no meio de reação tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8, EDTA 1 mM, KCN 200 μM , a xantina 500 μM , a xantina oxidase e o citocromo C. Nesta reação a enzima xantina oxidase atua sobre a xantina gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$. Esse ânion age sobre o citocromo C, reduzindo o Fe^{3+} a Fe^{2+} , o que pode ser visualizado espectrofotometricamente a 550 nm, que é o comprimento de onda relativo ao pico de Abs do citocromo C – Fe^{2+} . A SOD captura o $\text{O}_2^{\bullet-}$, inibe a formação de Fe^{2+} , podendo ser acompanhada na curva. Essa curva foi iniciada com a adição de xantina oxidase. Fez-se a leitura da absorbância a 550 nm em espectrofotômetro em intervalos de 60 segundos durante 450 segundos, sendo a primeira leitura após 30 segundos. Durante as leituras, as cubetas foram mantidas em banho a 37 °C. O resultado foi expresso em UA/min/mg proteína (para as amostras de eritrócitos, o resultado foi expresso em concentração de hemoglobina). As análises foram realizadas em duplicata.

4.23.9. Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação foi realizada de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979), com algumas modificações. Este método avalia o nível de peroxidação lipídica, que se baseia na análise dos produtos finais da peroxidação, exemplo o malonaldeído (MDA), que reagem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS). Cada molécula de MDA reage com duas moléculas de TBARS, gerando um composto de cor vermelha, que pode ser detectado em espectrofotômetro.

Foi tomado 0,1 mL de plasma ou homogenato dos tecidos e adicionados 0,1 mL de SDS (8,1 %), 0,75 mL de solução de ácido acético (20 %) pH 3,5 (ajustado com NaOH) e 0,75 mL de TBA (0,8 %). O volume da mistura reativa foi ajustado para 2 mL com água deionizada e então, aquecida em banho-maria a 95 °C por 1 hora. Após resfriamento em água corrente, 1,5 mL de n-butanol foram acrescentados e agitados vigorosamente em vórtex. Em seguida, o material foi centrifugado a 2000 g por 10 minutos, a camada orgânica (superior) foi removida e sua absorbância foi medida a 532 nm em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 (Palo Alto, EUA). O malonaldeído (MDA) foi usado como padrão externo, e o nível de peróxidos lipídicos foi expresso como μmol de MDA/g de proteína, e para o plasma, como μmol de MDA/mL de plasma. A análise foi realizada em triplicada.

4.23.10. Determinação de grupamentos tióis protéicos e não protéicos

Os grupamentos tióis total (protéico e não-protéico), incluindo glutathione, foram determinados no plasma de acordo com o método descrito por Hu (1994), com algumas modificações, e os grupamentos tióis não-protéico, incluindo a glutathione, foi determinado no eritrócito e no homogenato dos tecidos de acordo com o método descrito por Boyne & Ellman (1972), com algumas modificações. O eritrócito e homogenato dos tecidos foram precipitados com 20 % de TCA (ácido tricloroacético), agitados no vórtex e centrifugados a 10000 g/2 min/4 °C. O sobrenadante foi separado e utilizado para as análises. A análise ocorreu adicionando-se 100 μL de plasma ou amostra não-protéica, 800 μL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 8,0 e 50 μL de DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato). O branco continha 800 μL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 8,0 e 50 μL de DTNB. Os tubos foram homogeneizados no vórtex e deixados

em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas a 412 nm em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 (Palo Alto, EUA), acertando o zero com o branco. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol GSH/g}$, e para o plasma, como mM GSH. As análises foram realizadas em triplicada.

4.23.11. Determinação do conteúdo protéico

O teor protéico foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), usando-se albumina de soro bovino (Sigma Chemicals Co., St. Louis, E.U.A) como padrão. As análises foram realizadas em triplicada.

4.23.12. Capacidade antioxidante no plasma

A Capacidade antioxidante do plasma foi determinada utilizando-se dois métodos: método de ORAC e método DPPH• (item 4.14).

4.23.12.1. Determinação da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).

Utilizou-se a metodologia descrita por Dávalos *et al.* (2004), adaptada para leitura em cubetas individuais. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4 e o volume final da mistura foi de 2 mL. Neste ensaio, 200 μL de amostra foram misturados a 1200 μL de uma solução de fluoresceína (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) a 70 nM e incubados a uma temperatura constante de 37 °C por 15 minutos antes da adição de 600 μL da solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH, Wako Chemicals Inc., Richmond, EUA) a 24 mM, que dá início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nm_{ex} / 525 nm_{em}) foi verificada a cada 10 minutos durante 80 minutos em cubeta de quartzo. O tampão fosfato também foi usado para zerar o equipamento. Como controle da reação, adicionou-se 200 μL de metanol à solução de fluoresceína.

O cálculo da perda de fluorescência da fluoresceína, ou área abaixo da curva (AAC), foi efetuado com o auxílio da seguinte fórmula:

$$AAC = 1 + f_1/f_0 + \dots f_i/f_0 + \dots + f_{80}/f_0$$

onde, f_0 é representado pela fluorescência obtida no tempo 0 e f_i a fluorescência obtida nos tempos intermediários entre 0 e 80 minutos.

Os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox, utilizando-se curva padrão de Trolox, realizada a cada ensaio, nas concentrações de 0,4 a 4,8 μ M. A área da perda de fluorescência de uma amostra foi calculada subtraindo-se a área correspondente à do controle. A determinação de fluorescência foi realizada utilizando-se espectrofotômetro de fluorescência, marca HITACHI (Tóquio, Japão) modelo F-3010.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores foram expressos como μ mol equivalentes de Trolox/mL de plasma.

4.23.13 Determinação de ácido úrico

O ácido úrico foi determinado no soro dos animais através do método enzimático colorimétrico, utilizando-se ácido úrico Liquiform kit, de acordo com o protocolo do fabricante (Labtest). No presente método, o ácido úrico da amostra sofre a ação da uricase, na presença de oxigênio e água, produzindo alantoína, gás carbônico e peróxido de hidrogênio; este, em presença de um reagente fenólico (ácido 2-hidroxi-3,5-diclorobenzenico) e de 4-aminofenazona, sofre a ação da peroxidase produzindo um composto violáceo (quinonimina) com máximo de absorção em 520 nm. A determinação foi realizada como a seguir:

	BRANCO	TESTE	PADRÃO
AMOSTRA	-	0,02 mL	-
PADRÃO	-	-	0,02 mL
REAG. ENZIMÁTICO	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

O branco continha 20 μ L de água e 1 mL do reagente enzimático. Os tubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. As absorbâncias foram lidas a 520 nm em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 (Palo Alto, EUA), acertando o zero com o branco. Os resultados foram expressos em mg/dl de soro. As análises foram realizadas em triplicata.

4.23.14. Determinação da hemoglobina (Hb)

A hemoglobina foi determinada em lisado de eritrócitos de acordo com Drabkin & Austin (1935). O sangue refrigerado foi centrifugado a 3000 g/15 min/ 4 °C, e o plasma foi retirado e estocado a -18 °C. A camada de leucócitos foi retirada cuidadosamente e os eritrócitos foram lavados três vezes com NaCl 0,87 % gelado, sendo centrifugados a 2000 g/15 min/ 4 °C a cada lavagem. A determinação foi realizada como a seguir:

	BRANCO	TESTE	PADRÃO
AMOSTRA	-	20 µL	-
PADRÃO	-	-	20 µL
LIQUÍDO DE DRABKIN	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL

O branco continha 20 µL de água e 5 mL do líquido de Drabkin. Os tubos foram homogeneizados no vórtex e deixados em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas a 540 nm em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 (Palo Alto, EUA), acertando o zero com o branco. Os resultados foram expressos em g/dl. As análises foram realizadas em triplicata.

4.23.15. Extração de RNA

O RNA total dos tecidos foi extraído utilizando-se TRIzol® (Invitrogen, Rockville, MD, EUA), baseado no método de Chomczynski & Sacchi (1987), de acordo com o protocolo do fabricante. Os tecidos congelados foram pesados (~100 mg), adicionados de 1 mL de TRIzol, e homogeneizados por 1 minuto utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça), em banho de gelo. Os extratos assim obtidos foram transferidos para tubos eppendorf e incubados por 5 min/30 °C. Os tubos foram adicionados de 200 µL de clorofórmio, agitados vagarosamente por 15 segundos e incubados por 3 min/30 °C. As amostras foram centrifugadas a 11000 g/15 min/4 °C, e a fase aquosa foi transferida para outro tubo. Ao RNA total obtido foram acrescentados 500 µL de isopropanol e incubado overnight a -20 °C. O passo seguinte foi centrifugar novamente a 11000 g/15 min/4 °C, remover o sobrenadante e secar o precipitado por 10 minutos com o tubo invertido sob a bancada a temperatura ambiente. O corpo de fundo ("pellet") foi lavado com 500 µL de etanol 70 % e

centrifugou-se a 11000 g/15 min/4 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e os tubos foram vertidos sobre a bancada até secar o pellet de RNA total. O precipitado foi dissolvido em água destilada deionizada estéril tratada com DEPC (dietil-pirocarbonato) num volume de 200 µL. A quantificação do RNA, segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001), foi aferida para cada amostra por leitura da absorbância em espectrofotômetro na razão 260/280 nm e calculado pela fórmula: OD x diluição x 40 / 1000 (onde 40 µg/mL de RNA a 260 nm possui valor igual a 1). A análise da qualidade de RNA foi realizada com base na razão 260/280 nm, considerando valores de amostra pura entre 1,8 e 2,0. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 % contendo o corante SYBR® safe DNA gel, realizada a 80 V por 15 minutos, e foi utilizado 0,5 µg de RNA para cada amostra. As extrações foram realizadas em quintuplicata.

4.23.15.1. Transcrição reversa seguida de reação de polimerase em cadeia ("Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction" – RT-PCR)

As sondas cDNA fita simples foram sintetizadas a partir do RNA através da técnica de transcrição reversa utilizando-se o kit de síntese de cDNA (Improm-II™ Reverse Transcription System, Promega, Madison, WI, USA). Em tubos de eppendorf foi adicionado 4 µL de RNA (0,5 µg) e 1 µL do primer mix para cada reação, transferidos para bloco aquecedor a 70 °C/5 minutos, e resfriados rapidamente em banho de gelo. Em seguida foram adicionados 15 µL para cada tubo da seguinte mistura: tampão ImProm-II, MgCl₂, dNTP mix (trifosfato deoxinucleosídeo), transcriptase reversa e água livre de RNase, segundo as instruções do fabricante. As amostras foram conduzidas ao termociclador Gene Amp (PCR System 2400, Applied Biosystems) e incubadas a 25 °C/5 min, 42 °C/60 min, 70 °C/15 min e 4 °C/10 min. Os cDNAs obtidos foram armazenados em freezer a -20 °C até o uso.

4.23.15.2. Real-time RT-PCR

A análise dos níveis de RNAm para CAT, SOD e GPx foi realizada com iniciadores desenhados para detectar os produtos dos genes previamente descritos (KIM et al., 1993; JONES et al., 1995; NAKASHIMA et al., 1989; HO & HOWARD, 1992), e comparados no bando de dados GeneBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os oligonucleotídeos para MnSOD

foram 5'- GAC CTG CCT TAC GAC TAT G-3' e 5'- TAC TTC TCC TCG GTG ACG-3' (195 pb); para CuZnSOD 5'-CCA GCG GAT GAA GAG AGG -3' e 5'-CCA ATC ACA CCA CAA GCC-3' (167 pb); para GPx, 5'-GTC CAC CGT GTA TGC CTT C-3' e 5'-CTC TTC ATT CTT GCC ATT CTC C-3' (333 pb); e para CAT 5'-AAT GCC GTC CGA TTC TCC-3' e 5'-CCA GTT ACC ATC TTC AGT GTA G -3' (135 pb). O *real-time* PCR foi realizado utilizando-se o kit comercial Platinum® SYBR Green qPCR SuperMix-UDG da Invitrogen (Rockville, MD, EUA), segundo protocolo do fabricante, em equipamento ROTOR GENE 3000 (Corbett Research, Mortlake, Austrália). A detecção do produto foi realizada com a detecção de fluorescência em tempo real produzida a partir do produto do *real-time* RT-PCR, onde há a incorporação do corante fluorescente SYBR Green I nas duplas fitas de DNA recém sintetizadas com a concomitante medida da fluorescência emitida pelas mesmas. A análise quantitativa da expressão relativa dos RNAm foi calculada usando-se o método comparativo Ct ("Cycle threshold") e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (5'-GTT GCC ATC AAC GAC CCC TTC-3' e 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT GTC-3', 155 pb) foi utilizada como gene constitutivo. As condições de amplificação foram: 95 °C/10 min seguidos de 40 ciclos de 95 °C/10 s, 60 °C/15 s e 72 °C/20 s.

4.24. Análise dos resultados

Os resultados referentes ao hipocótilo e cotilédone foram analisados através da comparação das médias e desvios-padrões dos valores obtidos para as triplicatas de extração pelo teste não paramétrico *t* de Student.

Para a análise estatística dos resultados, tanto dos experimentos *in vivo* como *in vitro*, foi utilizado o programa Statistica versão 5.0 da StatSoft (Tulsa, EUA). A comparação das médias foi realizada por análise de variância (One-way ANOVA) e *Tukey post hoc test* foi utilizado para a comparação entre os tratamentos ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos grãos de soja

Os grãos de soja foram caracterizados em relação aos teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos totais (calculados por diferença) (Tabela 1). Os teores de umidade, lipídeos e cinzas corresponderam aos valores normalmente encontrados para a soja em grão (FAO/WHO, 1992; TBCA-USP, 1998). Já o valor encontrado para as proteínas foi um pouco inferior.

Tabela 1. Teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos dos grãos de soja.

(%)	grão de soja	padrão	
		FAO/WHO*	TBCA-USP**
Umidade	9,4 ± 0,2	-	9,7
Proteínas	34 ± 2	40	40,5
Lipídeos	21 ± 1	20	22,1
Cinzas	4,9 ± 0,3	4,9	5,6
Carboidratos	30,7	35	22,1

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Os carboidratos foram calculados por diferença 100 - (umidade + proteínas + lipídeos + cinzas). * FAO/WHO (1992) **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA-USP, 1998).

O grão de soja apresenta 90 % de cotilédono, 2 % de hipocótilo e 8 % de cascas (LIU, 1997).

Os lipídeos e proteínas são responsáveis por cerca de 60 % do peso da semente e os carboidratos por 35 %. O amido aparece com teor muito reduzido. Isto reflete diretamente no valor econômico dos carboidratos, que é considerado baixo se comparado com os lipídeos e proteínas. O principal uso dos carboidratos da soja é para a alimentação animal, contribuindo para a ingestão calórica.

Os carboidratos insolúveis são celulose, hemicelulose e lignina, encontrados na casca do grão, constituindo as fibras que auxiliam a digestão dos alimentos e ajudam a prevenir a incidência de câncer do colón. O conteúdo de fibras também contribui para a redução do colesterol e triacilgliceróis, além de possuir atividade mecânica na formação do bolo fecal, propriedade esta

relacionada à sua porção insolúvel (REDONDO-CUENCA *et al.*, 2006). A sacarose é o principal açúcar solúvel presente nos grãos de soja e representa cerca de 5 % do total de carboidratos. Os outros açúcares são os oligossacarídeos estaquiose (3,8 %) e rafinose (1,2 %), que devido à complexidade das suas moléculas são de difícil digestão, causando flatulência. A rafinose e a estaquiose são responsáveis em grande parte pela intolerância à soja exibida por certos indivíduos. A soja ainda apresenta alguns compostos antinutricionais, característicos das leguminosas, tais como inibidores de proteases (tripsina e quimiotripsina), fitohemaglutininas (lectinas), ácido fítico (hexafosfato éster de inositol ou um ciclitol) que quando hidrolisado pela β -galactosidase produz galactose e também pode provocar flatulência, saponinas, compostos fenólicos e isoflavonóides (fator estrogênico).

Os inibidores de proteases são proteínas que têm a capacidade de inibir as atividades de enzimas como a tripsina, quimiotripsina e a carboxipeptidase, e o baixo valor nutricional da soja está associado a sua presença (LIU, 1997).

5.1.1. Composição centesimal, fibra, amido, açúcares solúveis, oligossacarídeos, e atividade inibitória de tripsina do hipocótilo e cotilédone de soja

Caracterizou-se isoladamente o hipocótilo e o cotilédone de soja para quantificar os teores dos compostos analisados em cada parte e a sua relação com os teores do grão de soja.

O cotilédone correspondeu a 97 % enquanto o hipocótilo correspondeu a 3 % do peso do grão de soja descascado. A casca não foi analisada separadamente neste estudo pelo seu baixo conteúdo de compostos bioativos. O hipocótilo e o cotilédone de soja foram caracterizados em relação aos teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, fibra, amido, açúcares totais, oligossacarídeos e atividade inibitória de tripsina (Tabela 2).

Tabela 2. Teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, amido, açúcares totais, sacarose, rafinose, estaquiose, inibidor de tripsina, fibra solúvel e insolúvel de hipocótilo e cotilédone de soja em base úmida (b.u.), e contribuição em relação ao grão de soja.

	hipocótilo	cotilédone	g/100 g de soja	
			hipocótilo	cotilédone
Umidade (g/100 g)	9,3 ± 0,1 ^a	9,6 ± 0,3 ^a	0,3	9,3
Proteínas (g/100 g)	33 ± 1 ^a	35 ± 1 ^a	0,99	34
Lipídeos (g/100 g)	10,4 ± 0,3 ^b	22,0 ± 0,7 ^a	0,3	21
Cinzas (g/100 g)	4,4 ± 0,5 ^b	5,2 ± 0,4 ^a	0,1	5,0
Amido (g/100 g)	0,14 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,03 ^a	0,004	0,18
Açúcares totais (mg/100 g)	773 ± 6 ^a	545 ± 5 ^b	2,3	52,9
Sacarose (mg/100 g)	23 ± 3 ^b	30 ± 1 ^a	0,07	2,9
Rafinose (mg/100 g)	18 ± 3 ^a	16 ± 2 ^a	0,5	16
Estaquiose (mg/100 g)	131 ± 6 ^a	71 ± 3 ^b	3,9	69
Inibidor tripsina (TUI/mg)	33 ± 1 ^a	35 ± 2 ^a	0,99	34
Fibra solúvel (g/100 g)	1,2 ± 0,2 ^b	28,2 ± 0,1 ^a	0,04	27
insolúvel (g/100 g)	13,5 ± 0,4 ^a	4,1 ± 0,3 ^b	0,4	4

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

Observa-se que não houve diferença no teor de umidade, proteína e amido entre o hipocótilo e o cotilédone de soja. O cotilédone apresentou maior conteúdo de cinzas e o dobro do teor de lipídeos em relação ao hipocótilo. Já o hipocótilo teve um maior teor de fibra insolúvel enquanto o cotilédone teve um maior teor de fibra solúvel (Tabela 2). O consumo de fibras solúveis proporciona efeitos benéficos como a redução dos níveis séricos de colesterol e glicose. As fibras insolúveis auxiliam nas funções gastrointestinais pelo aumento da massa fecal e alteração da sensação de saciedade, agindo positivamente na diminuição do risco de câncer de cólon (MESSINA *et al.*, 1999).

O hipocótilo de soja apresentou um maior conteúdo de açúcares totais do que o cotilédone da soja, sendo que a sacarose correspondeu a 3-5 % do

total de açúcares solúveis tanto para o hipocótilo como para o cotilédone de soja (Tabela 2).

Em relação aos oligossacarídeos, o hipocótilo de soja apresentou elevado conteúdo de estaquiose, sendo que o teor de rafinose não apresentou diferença significativa entre o hipocótilo e o cotilédone de soja.

A atividade inibitória de tripsina não apresentou diferença entre o hipocótilo e o cotilédone de soja (~ 34 TUI/mg de amostra). Genovese & Lajolo (1998) reportaram para farinha desengordurada de soja uma atividade inibitória de tripsina de 41 TUI/mg de amostra, um valor um pouco maior, já que se trata de um produto desengordurado.

Considerando-se a proporção do hipocótilo e do cotilédone em relação aos teores presentes no grão, observa-se uma baixa participação do hipocótilo.

Os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE 12 %) das proteínas solubilizadas em água a partir do grão, hipocótilo e cotilédone de soja são apresentados na Figura 8. O cotilédone apresenta o perfil característico das proteínas de reserva, 7S com as subunidades α , α' e β e 11S com as subunidades ácidas e básicas, e dentre as subunidades ácidas podemos notar a banda A4 (um polipeptídeo com PM ao redor de 45 KDa), condizente com a função de reserva do cotilédone. O hipocótilo apresenta um perfil com uma variedade maior de bandas, e uma das principais funções é conduzir água e nutrientes, visto que o hipocótilo é um caule embrionário que conecta a radícula com o cotilédone (MODESTO & SIQUEIRA, 1981).

Figura 8. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12 %) das proteínas solubilizadas a partir do hipocótilo e cotilédone da soja. Poço (1) padrão de peso molecular, (2) hipocótilo de soja, (3) cotilédone de soja e (4) grão de soja.

5.1.2. Caracterização dos grãos de soja cozidos

Nesta etapa caracterizou-se os grãos de soja cozidos além de se observar o efeito do tratamento térmico nos compostos bioativos e capacidade antioxidante. Os grãos foram submetidos à cocção (110 °C/40 min), seguido de secagem em estufa a 40 °C ventilada.

O processamento do alimento pode proporcionar mudanças no seu teor de nutrientes e, conseqüentemente, na sua qualidade nutricional. No processamento da soja, a etapa de imersão dos grãos na água visando ao seu amaciamento é necessária, e o tratamento térmico adequado da soja aumenta a digestibilidade de sua proteína, bem como inativa os inibidores de proteases e outros fatores antinutricionais (PAN, 2003).

A Tabela 3 apresenta o teor de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos totais (calculados por diferença) dos grãos de soja cozidos.

Tabela 3. Teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos dos grãos de soja cozidos (b.s.).

(%)	grão cozido
Umidade	2 ± 1
Proteínas	29 ± 2
Lipídeos	26 ± 3
Cinzas	3,9 ± 0,3
Carboidratos	39,1

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Os carboidratos foram calculados por diferença 100 - (umidade + proteínas + lipídeos + cinzas).

Os grãos de soja cozidos não apresentaram diferença no teor de lipídeos e cinzas em relação ao grão de soja cru. Já para as proteínas houve uma redução de 15 % em seu teor, sugerindo que as proteínas podem ter sido carregadas pela água de cocção.

Segundo Gall *et al.* (1983), o cozimento pode alterar os valores de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas dos alimentos em decorrência da incorporação do meio de cocção e das perdas de nutrientes à água.

A Tabela 4 apresenta o teor de isoflavonas, conteúdo de fenólicos totais, atividade inibitória de tripsina, capacidade antioxidante pelo método de

co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e pelo método de seqüestro de radicais livres (DPPH•) dos grãos de soja crus e cozidos.

Tabela 4. Teor de isoflavonas, conteúdo de fenólicos totais, atividade inibitória de tripsina, capacidade antioxidante pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico, e pelo método de seqüestro de radicais livres (DPPH•) dos grãos de soja crus e cozidos.

	grão cru	grão cozido
Fenólicos totais (mg/100 g b.s.)	277 $\pm$ 6 ^a	147 $\pm$ 1 ^b
Isoflavonas (mg/100 g b.s.)*	75 $\pm$ 1 ^a	57 $\pm$ 1 ^b
β -caroteno (μ moles BHT/g b.s.)	0,82 $\pm$ 0,01 ^a	0,55 $\pm$ 0,01 ^b
DPPH• (μ moles eq. Trolox/g b.s.)	5,6 $\pm$ 0,3 ^a	3,3 $\pm$ 0,3 ^b
Inibidor tripsina (TUI/mg b.s.)	47 $\pm$ 4 ^a	0,9 $\pm$ 0,1 ^b

*O teor de isoflavonas totais foi expresso como agliconas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,05).

Os grãos de soja crus apresentaram maior teor de isoflavonas, fenólicos totais e atividade inibitória de tripsina, e o cozimento (110 °C/40 min) levou a diminuição desses teores e inativação total dos inibidores de tripsina (Tabela 6).

A cocção de alimentos protéicos é importante no sentido de minimizar os fatores antinutricionais presentes. Liu (1997) relatou que o aquecimento úmido foi capaz de destruir os inibidores de tripsina bem como as lectinas da soja. Porém, esse processamento acarretou na diminuição do teor de isoflavonas para os grãos de soja cozidos, onde ocorreria uma pequena perda de isoflavonas, muito provavelmente na água de cozimento.

A capacidade antioxidante foi maior para os grãos de soja crus tanto para o método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico quanto para o método de seqüestro de radicais livres (DPPH•) do que os grãos cozidos, provavelmente associada ao menor conteúdo dos compostos fenólicos.

As Figuras 9, 10 e 11 apresentam os cromatogramas das amostras de grãos de soja crus, cozidos e do hypocótilo de soja.

Figura 9. Cromatograma obtido por CLAE/DAD dos grãos de soja crus. Solvente A: ácido acético 0,1 % em água; solvente B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila. Fase móvel consistiu em gradiente linear de acetonitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. genistina, 4. malonildaidzina, 5. malonilglicitina, 6. malonilgenistina, 7. daidzeína, 8. gliciteína, 9. genisteína.

Figura 10. Cromatograma obtido por CLAE/DAD dos grãos de soja cozidos. Solvente A: ácido acético 0,1 % em água; solvente B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila. A fase móvel consistiu em gradiente linear de acetonitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. genistina, 4. malonildaidzina, 5. acetildaidzina, 6. malonilgenistina, 7. acetilgenistina, 8. daidzeína, 9. gliciteína, 10. genisteína.

Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE/DAD do hipocótilo de soja. Solvente A: ácido acético 0,1 % em água; solvente B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila. Fase móvel consistiu em gradiente linear de acetonitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. genistina, 4. malonildaidzina, 5. malonilglicitina, 6. acetilglicitina, 7. malonilgenistina, 8. daidzeína, 9. gliciteína, 10. genisteína.

O cromatograma obtido por CLAE/DAD dos grãos de soja crus mostrou a predominância dos β -glicosídeos e malonilglicosídeos (Figura 9). O perfil para os grãos de soja cozidos apresentou drástica diminuição dos malonilglicosídeos com aumento dos β -glicosídeos, agliconas e formação dos acetilglicosídeos, pela ação do calor (Figura 10). O calor úmido provoca a desesterificação dos malonilglicosídeos para os β -glicosídeos, e como etapa intermediária a formação dos acetilglicosídeos (COWARD *et al.*, 1998; KUDOU *et al.*, 1991). E a etapa do molho do grão de soja durante o processamento resultou na ação das β -glicosidases endógenas da soja que hidrolisam os β -glicosídeos transformando-os em agliconas (BARBOSA *et al.*, 2006).

Lee *et al.* (2004) estudaram 17 cultivares diferentes de grãos de soja e observaram predominância de malonilglicosídeos e β -glicosídeos. Lee *et al.* (2008) estudaram 322 variedades de grãos de soja coreanos e dividiram em 3 grupos separados por tamanho (pequeno, médio e grande) e observaram predominância de malonilglicosídeos e β -glicosídeos para os três tamanhos de

grão de soja analisados. Genovese *et al.* (2005) relataram que os β -glicosídeos (50-59 %) foram a forma predominante seguido pelos malonilglicosídeos (28-39 % do total) nas 14 diferentes variedades de grãos de soja brasileiros analisados.

O hipocótilo de soja apresentou um perfil cromatográfico com predominância da gliciteína total e baixa porcentagem de genisteína total (Figura 11). Eldridge & Kwolek (1983) relataram que no hipocótilo encontram-se basicamente daidzina e glicitina, enquanto que no cotilédone há 20 vezes mais genistina que no hipocótilo. Genovese *et al.* (2007) analisaram o hipocótilo de soja e observaram uma predominância de gliciteína e daidzeína, com uma redução de 68 % de genisteína em relação à FDS.

5.2. Estudo da interação entre isoflavonas e proteínas da soja

5.2.1. Comparação entre farinha desengordurada de soja e isolado protéico de soja

Para estudar possíveis interações entre proteínas e isoflavonas, utilizou-se um isolado protéico (IPS) e uma farinha desengordurada de soja (FDS) comerciais, cujos teores de umidade, proteínas e isoflavonas são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Teores de umidade, proteínas e isoflavonas totais do isolado protéico (IPS) e farinha desengordurada (FDS) de soja comercial.

	IPS	FDS
Umidade (g/100 g b.u.)	3,5 $\pm$ 0,1	10,5 $\pm$ 0,5
Proteínas (g/100 g b.u.)	94 $\pm$ 4	49,5 $\pm$ 0,7
Isoflavonas totais (mg/100 g b.u.)*	136 $\pm$ 4	216 $\pm$ 3

*O teor de isoflavonas totais foi expresso como agliconas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3).

Os teores de umidade e proteínas do IPS e FDS corresponderam aos valores estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de máximo de 6 % e 9 % de umidade e mínimo de 88 % e 50 % de proteínas, respectivamente para o IPS e FDS (ANVISA, 2005). O IPS apresentou um alto

teor de isoflavonas (136 mg/100 g) quando comparado aos IPS obtidos por BARBOSA *et al.* (2006) (90-95 mg/100 g). Genovese *et al.* (2007) encontraram um teor de 88 a 164 mg/100 g nos isolados protéicos comerciais analisados. A FDS apresentou um teor de 216 mg/100 g, o que está de acordo com a faixa de 120 a 340 mg/100 g relatada por Genovese *et al.* (2007).

A Tabela 6 apresenta o perfil de distribuição das isoflavonas (% de β -glicosídeos, % de malonilglicosídeos, % de acetilglicosídeos, e % de agliconas), e a porcentagem total das três isoflavonas presentes (daidzeína, genisteína e gliciteína) observados no IPS e na FDS, extraídas com MeOH 80 %.

Tabela 6. Perfil das isoflavonas extraídas a partir do isolado protéico e farinha desengordurada de soja comercial em MeOH 80 %.

(%)*	IPS	FDS
β -glicosídeos	$22,0 \pm 0,2$	$50,4 \pm 0,4$
Malonilglicosídeos	$37,0 \pm 0,1$	40 ± 1
Acetilglicosídeos	$4,1 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,2$
Agliconas	$36,8 \pm 0,4$	$5,8 \pm 0,3$
<i>Daidzeína total</i>	34 ± 2	38 ± 1
<i>Gliciteína total</i>	4 ± 1	5 ± 1
<i>Genisteína total</i>	62 ± 1	57 ± 2

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=3). *As formas das isoflavonas (conjugados ou agliconas) foram expressas em % do total (p/p). A porcentagem total de cada aglicona representa a soma das formas livres e conjugadas, expressas como agliconas, em relação ao total (p/p).

O IPS comercial analisado apresentou um alto conteúdo de agliconas e de malonilglicosídeos (Tabela 6), assim como os IPS I a IV obtidos neste laboratório (BARBOSA *et al.*, 2006). Barbosa *et al.* (2006) também relataram que das isoflavonas presentes, a mais abundante foi a genisteína.

Os resultados estão de acordo com Genovese & Lajolo (2001a) que encontraram no IPS, extraído por 2 horas em MeOH 80 %, quantidades maiores de agliconas e malonilglicosídeos e menores de acetilglicosídeos e β -glicosídeos, e uma semelhança muito grande com os resultados aqui obtidos em relação à porcentagem das três isoflavonas presentes.

Wang & Murphy (1994a) encontraram um perfil de isoflavonas muito diversificado em três IPS obtidos de fontes comerciais diferentes. O IPS-A tinha um alto conteúdo de agliconas (41 %) e porcentagem igual de malonilglicosídeos e β -glicosídeos (ao redor de 27 %), os IPS-B e C apresentaram baixo conteúdo de agliconas (7 %) e de malonilglicosídeos (ao redor de 15 %), porém alto conteúdo de β -glicosídeos (44 % e 58 %, respectivamente para IPS-B e C) e de acetilglicosídeos (34 % e 20 %, respectivamente para IPS-B e C). O alto conteúdo de acetilglicosídeos pode ser devido à utilização da farinha tostada de soja como matéria-prima na obtenção do IPS ou alta temperatura na secagem do IPS ("spray-drying"), segundo os próprios autores.

Os malonilglicosídeos e os β -glicosídeos foram os conjugados encontrados em maior proporção na FDS comercial. Os resultados estão de acordo com Barbosa *et al.* (2006) e Genovese *et al.* (2007), que encontraram na soja e na FDS uma quantidade maior de malonilglicosídeos e β -glicosídeos e quantidades bem menores de agliconas e acetilglicosídeos.

Kudou *et al.* (1991) observaram uma grande quantidade de malonilglicosídeos no grão de soja e, posteriormente, Barnes *et al.* (1994) e Coward *et al.* (1998) relataram que a porcentagem das isoflavonas conjugadas da soja não muda em relação à FDS.

O cromatograma obtido por CLAE/DAD do IPS comercial mostrou que os maiores picos correspondem exatamente às agliconas e aos malonilglicosídeos, sendo que os três picos finais corresponderam as três agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína), e os picos 3 e 5 a malonilglicitina e malonilgenistina, respectivamente (Figura 12).

Através do cromatograma obtido por CLAE/DAD foram detectados os seguintes compostos na FDS: daidzina, glicitina, malonildaizina, malonilglicitina, genistina, acetildaizina, malonilgenistina, daidzeína, gliciteína, acetilgenistina e genisteína (Figura 13). No trabalho de Genovese & Lajolo (2001a) não foram detectadas as formas malonilglicitina e gliciteína na farinha desengordurada, e Simonne *et al.* (2000) não detectaram as formas gliciteína, acetildaizina e daidzeína na variedade de soja Hutcheson. A diferença nos resultados se deve, provavelmente, às baixas concentrações dessas formas.

Em seguida à caracterização realizou-se a quantificação das isoflavonas totais, livres e ligadas às proteínas a partir da FDS

Figura 12. Cromatograma obtido por CLAE/DAD do isolado protéico de soja comercial. Solvente A: ácido acético 0,1 % em água; solvente B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila. A fase móvel consistiu em gradiente linear de acetonitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. malonildaidzina, 4. genistina, 5. malonilgenistina, 6. daidzeína, 7. gliciteína, 8. genisteína.

Figura 13. Cromatograma obtido por CLAE/DAD da farinha desengordurada de soja. Solvente A: ácido acético 0,1 % em água; solvente B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila. A fase móvel consistiu em gradiente linear de acetonitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. malonildaidzina, 4. malonilglicitina, 5. genistina, 6. acetildaidzina, 7. malonilgenistina, 8. daidzeína, 9. gliciteína, 10. acetilgenistina, 11. genisteína.

5.2.2. Isoflavonas totais, livres e ligadas às proteínas

O extrato bruto (EB) foi obtido a partir da FDS em NaOH 0,1 M na proporção de 1:20 (m/v), e 95 % das proteínas do grão foram extraídas nessas condições. O extrato foi posteriormente precipitado com TCA até concentração final de 5 % e após centrifugação o sobrenadante, denominado fração solúvel (FS), e o precipitado, denominado fração insolúvel (FI) foram analisados em relação ao teor e perfil de isoflavonas.

O extrato bruto apresentou um teor de isoflavonas correspondente a 130 mg/100 g de FDS. Destes, 72 % estão presentes na fração solúvel em TCA e 28 % na fração insolúvel em TCA, ou seja, associadas às proteínas. O extrato bruto, fração solúvel e insolúvel apresentaram 35, 2 e 33 g de proteínas/100 g de FDS (b.u.), respectivamente.

A Tabela 7 apresenta o perfil de distribuição das isoflavonas (% de β -glicosídeos, % de malonilglicosídeos, % de acetilglicosídeos, e % de agliconas), e a porcentagem total das três isoflavonas presentes (daidzeína, genisteína e gliciteína) do extrato bruto, fração solúvel e insolúvel.

Tabela 7. Perfil das isoflavonas no extrato bruto (EB), na fração solúvel (FS), na fração insolúvel (FI) em TCA 5 % obtidos a partir da FDS.

(%)*	EB	FS	FI
β -glicosídeos	94 ± 1^a	93 ± 1^a	90 ± 2^a
M-glicosídeos	n.d.	$4,8 \pm 0,1$	n.d.
Ac-glicosídeos	n.d.	n.d.	n.d.
Agliconas	6 ± 1^b	2 ± 1^c	10 ± 2^a
<i>Daidzeína total</i>	35 ± 1^b	40 ± 1^a	29 ± 1^c
<i>Gliciteína total</i>	6 ± 1^a	7 ± 1^a	5 ± 1^a
<i>Genisteína total</i>	59 ± 1^b	53 ± 1^c	66 ± 1^a

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). *As formas das isoflavonas (conjugados ou agliconas) foram expressas em % do total (p/p). A porcentagem total de cada aglicona representa a soma das formas livres e conjugadas, expressas como agliconas, em relação ao total (p/p). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente. n.d. não detectado

Na Tabela 7 observa-se que foram detectados quase exclusivamente os β -glicosídeos (~90 %) no extrato bruto, fração solúvel e insolúvel. Os acetilglicosídeos não foram detectados em nenhuma fração e as agliconas se apresentaram em maior porcentagem (10 %) na fração insolúvel. A fração insolúvel apresentou uma maior proporção de derivados de genisteína (66 %) em relação à FS e FDS. O extrato bruto e a fração solúvel apresentaram perfil de isoflavonas totais (genisteína, gliciteína e daidzeína) semelhante entre si e à FDS.

Os resultados aqui obtidos confirmam os resultados de Barbosa *et al.* (2006), que observaram que cerca de 16-23 % das isoflavonas totais co-precipitavam com as proteínas de reserva da soja em pH 4,5, e 70-78 % ficavam solúveis no soro ácido. Além disso, essa fração associada às proteínas do isolado protéico também se caracteriza por elevada concentração de genisteína e agliconas, o que faz sentido, pois tanto a genisteína é mais apolar que a daidzeína e a gliciteína, como seus derivados em relação aos de daidzeína e gliciteína.

5.2.3. Interação entre isoflavonas e frações 7S e 11S da soja

O estudo da interação entre isoflavonas e proteínas foi realizado através da purificação das frações protéicas da soja da farinha desengordurada e do isolado protéico de soja, e as isoflavonas foram analisadas por CLAE/DAD em cada fração separadamente. Foram utilizados dois isolados protéicos de soja, um comercial (IPS com.), e outro obtido em nosso laboratório (IPS lab.).

A Figura 14 apresenta o resultado da purificação das frações protéicas da soja, 7S, 11S e fração intermediária (FInt), respectivamente, da farinha desengordurada e isolado protéico de soja.

O fracionamento das proteínas da soja baseado na sua diferença de solubilidade é o principal método utilizado para a análise bioquímica e das características nutricionais (BROOKS & MORR, 1985; THANH & SHIBASAKI, 1976). As frações foram separadas com êxito e sem interferentes, conforme verificado através de SDS-PAGE (Figura 14), com bandas bem distintas da fração 7S constituída das subunidades α , α' e β , e da fração 11S constituída das subunidades ácidas e básicas e dentre as subunidades ácidas pode-se notar a banda A4, um polipeptídeo com PM ao redor de 45 KDa.

Figura 14. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) das frações protéicas purificadas a partir da FDS e do IPS. Poço (1) padrão de peso molecular, (2) FDS fração 7S, (3) FDS fração 11S, (4) FDS fração intermediária, (5) IPS fração 11S, (6) IPS fração 7S, (7) IPS fração intermediária.

A Tabela 8 apresenta o teor das isoflavonas da farinha desengordurada de soja, isolado protéico de soja comercial e isolado protéico de soja laboratorial e a porcentagem nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária, respectivamente.

Tabela 8. Teor das isoflavonas (mg/100 g) extraídas a partir da farinha desengordurada de soja, isolado protéico de soja comercial e isolado protéico de soja laboratorial e a porcentagem nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FInt).

amostras	isoflavonas (mg/100 g)	% de isoflavonas		
		7S	11S	FInt
FDS	216 ± 3	3	7	11
IPS com	118 ± 1	1	9	6
IPS lab	77 ± 5	2	9	12

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

Somando-se as porcentagens de isoflavonas associada a cada fração, observa-se resultado semelhante aos resultados anteriores (28 % das isoflavonas na fração insolúvel em TCA) e segundo Barbosa *et al.* (2006) cerca de 16-23 % das isoflavonas totais co-precipitadas com as proteínas de reserva da soja em pH 4,5.

A Tabela 8 mostra que há uma maior concentração de isoflavonas na fração 11S em relação à fração 7S. Este resultado está de acordo com Rickert *et al.* (2004) que relataram uma certa preferência das isoflavonas pela fração protéica 11S, com um conteúdo de isoflavonas 2 vezes maior para a fração 11S que para a fração 7S da FDS.

As Figuras a seguir apresentam o perfil das isoflavonas presentes na farinha desengordurada, isolado protéico de soja comercial e isolado protéico de soja laboratorial (extraídos em MeOH 80 %) e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FInt), respectivamente.

Figura 15. Perfil de distribuição das isoflavonas na farinha desengordurada de soja e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FInt). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

Figura 16. Perfil de distribuição das formas totais das isoflavonas (daidzeína, gliciteína e genisteína) na farinha desengordurada de soja e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FInt).

Figura 17. Perfil de distribuição das isoflavonas no isolado protéico de soja comercial e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FInt). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

Figura 18. Perfil de distribuição das formas totais das isoflavonas (daidzeína, gliciteína e genisteína) no isolado protéico de soja comercial e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FInt).

Figura 19. Perfil de distribuição das isoflavonas no isolado protéico de soja laboratorial e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FInt). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

Figura 20. Perfil de distribuição das formas totais das isoflavonas (daidzeína, gliciteína e genisteína) no isolado protéico de soja laboratorial e nas suas respectivas frações protéicas purificadas, 7S, 11S e fração intermediária (FInt).

Em relação ao perfil das isoflavonas, de um modo geral, houve uma drástica diminuição dos β -glicosídeos e malonilglicosídeos e um aumento das agliconas nas frações 7S, 11S e FInt da FDS, IPS com. e lab. em relação à FDS, IPS com. e lab. extraídos com MeOH 80 %.

Pode-se observar que os β -glicosídeos tiveram uma diminuição (40-49 %) com um elevado aumento das agliconas (450-778 %) nas frações 7S, 11S e FI da FDS em relação à FDS em extrato metanólico (Figura 15).

Os β -glicosídeos apresentaram uma diminuição (17-57 %) com aumento das agliconas (66-118 %) nas frações 7S, 11S e FInt do IPS com. em relação ao IPS com. em extrato metanólico (Figura 17) e no IPS lab. uma diminuição (15-48 %) com um menor aumento das agliconas (18-78 %) nas frações 7S, 11S, FInt em relação ao IPS lab. em extrato metanólico (Figura 19).

Em relação à porcentagem total das três isoflavonas presentes (daidzeína, genisteína e gliciteína) a genisteína foi a principal isoflavona presente tanto na FDS, IPS com. e lab. em extrato metanólico como nas suas respectivas frações protéicas (Figuras 16, 18 e 20, respectivamente). Contudo as frações protéicas 7S, 11S e FInt da FDS, IPS com. e lab. apresentaram um aumento de 6-28 % para a genisteína.

Estes resultados demonstraram uma interação isoflavonas e proteínas de reserva, preferencial com a subunidade 11S da FDS e IPS; e, entre as isoflavonas, os derivados da genisteína e as agliconas, que são mais apolares, interagem preferencialmente com as proteínas, indicando predominância de interações hidrofóbicas.

5.2.4. Determinação dos tipos de interações entre isoflavonas e proteínas da soja

Através desta análise objetivou-se estudar os tipos de interações entre isoflavonas e proteínas da soja na FDS e o quanto das isoflavonas estariam livres ou associadas às proteínas.

A partir dos dados anteriores obtidos por Barbosa (2004) mostrando a capacidade de diferentes meios extratores de solubilizar isoflavonas e proteínas a partir do IPS, foram selecionados seis meios extratores para utilizar com a FDS: solução aquosa, solução aquosa pH 4,5 e pH 10, solução de NaCl 0,2 M, solução de SDS 1 % e solução de Triton X-100 1 %. Os resultados anteriores, para o IPS, mostraram que apesar de que em pH isoelétrico não ocorrer solubilização das proteínas tem-se a solubilização de 30-45% das isoflavonas,

fração que foi considerada como isoflavonas livres. Nos pH básicos, a maior solubilização protéica acompanha a maior solubilização das isoflavonas, em pH 10 a totalidade das isoflavonas é solubilizada. A solução salina 0,05 M solubiliza a mesma quantidade de isoflavonas em relação ao extrato aquoso, porém quando se aumenta a molaridade da solução salina diminui a solubilidade das proteínas e diminui também a solubilização das isoflavonas, porém há um aumento das formas malonilglicosídeos e diminuição das agliconas, indicando interações eletrostáticas. E em relação aos detergentes, a solução de SDS não extrai todas as isoflavonas, pois os malonilglicosídeos não foram extraídos; e a solução de Triton solubiliza 100 % das isoflavonas e apenas 35 % das proteínas.

Tabela 9. Solubilização de isoflavonas e proteínas a partir da farinha desengordurada de soja em solução aquosa, solução aquosa pH 4,5 e pH 10, solução de NaCl 0,2 M, solução de SDS 1 % e solução de Triton X-100 1 %.

	Isoflavonas solúveis (%)	Proteínas solúveis (%)	Razão isoflavona total/ aglicona	Razão genisteína total/daidzeína total	Isoflavonas/ proteínas solúveis (mg isofl/100 g prot)
H ₂ O	96	65,7	22,8	1,4	317
pH 4,5	64	7,7	17,8	1,0	1792
pH 10	100	82,1	14,8	1,4	264
NaCl 0,2 M	87	70,7	20,24	1,2	266
SDS 1 %	37	100,1	5,0	1,0	80
Triton 1 %	105	91,8	15,0	1,5	247
FDS	216 mg/ 100 g	49,5 g/ 100 g	16,5	1,4	436

Para a FDS, os resultados mostraram maior solubilidade protéica em solução de Triton 1 % e solução de SDS 1 % (~100%). As isoflavonas, por outro lado, foram completamente solubilizadas em solução aquosa a pH 10 e solução de Triton X-100 1 %. Na região do pH isoelétrico, onde há precipitação das proteínas observou-se redução significativa na solubilização das isoflavonas (Tabela 9).

Na solução de NaCl 0,2 M as proteínas apresentaram valores altos de solubilidade, e as isoflavonas foram também solubilizadas, acompanhando esse

aumento, o mesmo ocorre para as soluções de Triton 1 % e solução aquosa pH 10.

Em relação aos detergentes, pode-se observar que o detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) apresentou efeito diverso do obtido com o detergente não-iônico Triton. A solução de SDS 1 % solubilizou cerca de 100 % das proteínas, porém apenas 37 % das isoflavonas foram solubilizadas, menos da metade dos valores obtidos em água. A solução de Triton 1 %, por sua vez, solubilizou também uma alta quantidade de proteínas, cerca de 92 %, e as isoflavonas acompanharam a solubilização (105 %).

A razão entre o teor de isoflavonas e o de proteínas solúveis apresentada na Tabela 9 mostra que o maior valor (1792 mg isoflavonas/100 g proteínas) é devido à baixa % de proteínas solúveis no pH 4,5. O menor valor correspondeu à solução de SDS 1 %, que solubilizou uma grande quantidade de proteínas e apenas cerca de 37 % das isoflavonas totais.

Na Tabela 9 são também apresentadas as proporções entre as formas totais de genisteína e daidzeína extraídas pelas diferentes soluções. Pode-se observar que estas variaram de 1,0 a 1,5, com a mesma proporção entre genisteína e daidzeína nos extratos em pH isoeletrico e na solução de SDS 1 % (razão 1,0), e nos outros extratos a quantidade de genisteína foi uma vez e meia a quantidade de daidzeína. O que ocorreria seria uma maior interação entre os derivados de genisteína e as proteínas, explicando assim, o fato de que soluções que propiciam maior solubilização de proteínas também resultam em maior extração de genisteína. Como observado através de CLAE/DAD em fase reversa, em que a genisteína é mais apolar que a daidzeína e a gliciteína, como seus derivados (malonil, acetil e β -glicosídeos) em relação aos de daidzeína e gliciteína.

A Tabela 10 apresenta o perfil de distribuição das isoflavonas (% de β -glicosídeos, % de malonilglicosídeos, % de acetilglicosídeos, e % de agliconas), e a porcentagem total das três isoflavonas presentes (daidzeína, genisteína e gliciteína) da farinha desengordurada de soja em solução aquosa, solução aquosa pH 4,5 e pH 10, solução de NaCl 0,2 M, solução de SDS 1 % e solução de Triton X-100 1 %.

Tabela 10. Perfil das isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em solução aquosa, solução aquosa pH 4,5 e pH 10, solução de NaCl 0,2 M, solução de SDS 1 % e solução de Triton X-100 1 %.

%	H ₂ O	pH 4,5	pH 10	NaCl 0,2M	Triton 1%	SDS 1%
β-glicosídeos	29,7 ± 0,2 ^c	34,7 ± 0,3 ^b	28,7 ± 0,1 ^c	27 ± 1 ^c	29,4 ± 0,1 ^c	78 ± 1 ^a
M-glicosídeos	63,5 ± 0,3 ^b	61,8 ± 0,3 ^c	64,0 ± 0,1 ^b	67 ± 1 ^a	63,3 ± 0,1 ^b	n.d.
Ac-glicosídeos	0,4 ± 0,1 ^c	1,0 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,1 ^c	0,5 ± 0,1 ^c	0,6 ± 0,1 ^c	1,9 ± 0,2 ^a
Agliconas	4,4 ± 1,1 ^c	2,5 ± 0,5 ^d	6,7 ± 0,1 ^b	5,0 ± 0,1 ^c	6,7 ± 0,1 ^b	20,2 ± 0,8 ^a
<i>Daidzeína total</i>	38,8 ± 0,6 ^d	43,8 ± 0,8 ^b	38,6 ± 0,2 ^d	41,6 ± 0,7 ^c	36,9 ± 0,1 ^e	45,3 ± 0,5 ^a
<i>Gliciteína total</i>	6,6 ± 0,2 ^b	11,0 ± 0,8 ^a	6,9 ± 0,3 ^b	7,1 ± 0,1 ^b	6,2 ± 0,5 ^b	9,7 ± 0,5 ^a
<i>Genisteína total</i>	54,6 ± 0,4 ^b	45,2 ± 0,5 ^d	54,5 ± 0,5 ^b	51,3 ± 0,8 ^c	56,8 ± 0,5 ^a	44,4 ± 0,2 ^d

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,05). As formas das isoflavonas (conjugados ou agliconas) foram expressas em % do total (p/p). A porcentagem total de cada aglicona representa a soma das formas livres e conjugadas, expressas como agliconas, em relação ao total (p/p). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente. n.d. não detectado

No extrato aquoso pH 4,5 observou-se uma diminuição das agliconas com aumento proporcional dos β-glicosídeos, indicando que as agliconas são pouco solúveis no pH 4,5, em relação à quantidade solúvel em água e em extrato metanólico (43 e 58 %, respectivamente). Esses resultados sugerem que a solubilização das agliconas estaria mais associada à solubilização protéica.

Pode-se observar que a proporção de β-glicosídeos (27 % do total) solubilizados em solução salina não se diferenciou em relação ao extrato aquoso. No entanto, os malonilglicosídeos apresentaram um leve aumento (~5 %) em relação ao extrato aquoso, enquanto que não houve diferença entre as agliconas. Esses resultados sugerem que os malonilglicosídeos estariam associados às proteínas através de interações eletrostáticas com os aminoácidos básicos. Esse dado é mais evidenciado em solução de NaCl 0,2 M do IPS (BARBOSA, 2004).

O detergente aniônico SDS é capaz de solubilizar todas as isoflavonas exceto malonilglicosídeos, provavelmente, devido a sua carga aniônica, causando uma repulsão do radical carbonila dos malonilglicosídeos. Assim, os 63 % das isoflavonas que não foram solubilizadas em solução de SDS são supostamente a % dos malonilglicosídeos solubilizados em solução Triton 1 %.

Os detergentes são utilizados para desfazer as interações hidrofóbicas entre proteínas-proteínas ou proteínas-lipídeos. Dessa forma, o papel do SDS é modificar a estrutura terciária, causando a desnaturação protéica (HJELMELAND & CHRAMBACH, 1981). O Triton, que é um detergente neutro, não induz alteração conformacional nas proteínas, é ineficiente em quebrar as interações proteínas-proteínas e conserva a estrutura quaternária na maior parte das proteínas, mesmo na presença de concentrações elevadas do detergente (ROCHA, 1999). Isso explicaria a razão do Triton extrair eficientemente tanto proteínas e isoflavonas, enquanto o SDS, devido a sua carga, extrai eficientemente proteínas, porém não extrai as isoflavonas na forma de malonilglicosídeos.

A genisteína apresentou-se em maior concentração nos extratos analisados, exceto no extrato de SDS 1 % onde se observa uma pequena diminuição da genisteína total, com aumento da gliciteína e daidzeína, pois neste meio extrator não há a solubilização da malonilgenistina, que é a principal isoflavona. O mesmo foi observado na solução aquosa pH 4,5, porém aqui o que ocorre é diminuição da genisteína e seus derivados com a precipitação protéica, como anteriormente mencionado.

A Tabela 11 apresenta os teores de isoflavonas livres que estariam presentes na FDS. Considerou-se como isoflavonas livres aquelas solubilizadas em pH 4,5, isoflavonas totais aquelas solubilizadas em solução de Triton X-100 1 % e as ligadas ou associadas foram calculadas a partir das isoflavonas solubilizadas nas soluções de NaCl 0,2 M e SDS 1 %.

Tabela 11. Teor das isoflavonas livres e associadas às proteínas presentes na farinha desengordurada de soja (FDS).

solução extratora	isoflavonas	β -glicosídeos (%)	malonilglicosídeos (%)	agliconas (%)
pH 4,5	livres	22	40	2
Triton 1%	livres	22	40	2
	associadas	9	27	5
	total	31	67	7
NaCl 0,2 M	livres	22	40	2
	associadas	2	19	2
	total	24	59	4
SDS 1 %	livres	22	0	2
	associadas	7	0	6
	total	29	0	8

Foram consideradas como isoflavonas livres as isoflavonas solubilizadas a partir da FDS em pH 4,5. As isoflavonas totais corresponderam às solubilizadas em solução de Triton X-100 1 %.

Os dados obtidos mostram que cerca de 64 % das isoflavonas presentes na FDS estão livres, já que não dependem da solubilização protéica para serem solubilizadas (Tabela 11). Os outros 36 % corresponderiam às isoflavonas ligadas às proteínas e às isoflavonas insolúveis na região do pH isoeletrico.

Observa-se ainda que dos 64 % das isoflavonas livres, 93 % das formas glicosiladas permanecem solúveis em pH 4,5, e entre as isoflavonas associadas às proteínas, cerca de 6 % seriam agliconas associadas, através de interações hidrofóbicas.

Esses resultados refletiriam o que ocorre no grão, ou seja, ao consumir o grão de soja cozido teríamos isoflavonas presentes de duas maneiras, livres e associadas às proteínas. As isoflavonas livres estariam aptas a serem rapidamente absorvidas e metabolizadas, enquanto as associadas às proteínas dependeriam da hidrólise protéica prévia para sua absorção. Estudos anteriores mostram que as isoflavonas agliconas já poderiam ser absorvidas no estômago, mas não os glicosídeos, similar ao observado para a quercetina (PISKULA *et al.*, 1999; CRESPIY *et al.*, 2002). No entanto, de acordo com nossos resultados, as isoflavonas livres estariam principalmente na forma de glicosídeos.

Esses dados confirmam novamente os resultados anteriores das análises da interação isoflavonas ligadas às proteínas com 28 % das isoflavonas na fração insolúvel em TCA e cerca de 25 % das isoflavonas ligadas às frações protéicas 7S, 11S e FI, com certa preferência pela fração 11S.

5.3. Biodisponibilidade das isoflavonas *in vitro*

5.3.1. Efeito da digestão com pepsina sobre a biodisponibilidade das isoflavonas *in vitro*

Confirmadas as associações entre isoflavonas e proteínas da soja, objetivou-se determinar se a proteólise causaria a liberação das isoflavonas, de forma a possibilitar sua absorção a partir do trato gastrointestinal.

A determinação da digestibilidade *in vitro* das proteínas da soja para o grão cru, grão cozido, hipocótilo e cotilédone de soja, FDS e IPS foi realizada utilizando-se a enzima pepsina (37 °C/3 h). Os resultados foram expressos como % de N liberado no sobrenadante em relação ao N total, determinados através do método de micro-Kjeldahl. A caseína foi usada como referência.

Após a digestão, as isoflavonas foram analisadas nas frações digerida (sobrenadante) e não-digerida (precipitado) através da extração em fase sólida e cromatografia líquida.

Na Tabela 12 pode-se observar que o valor da digestibilidade para o grão de soja cru, hipocótilo e cotilédone foi em torno de 70 %, enquanto que houve um aumento de 30 % na digestibilidade para o grão cozido, FDS e IPS. A digestibilidade está relacionada às alterações estruturais das proteínas, e o tratamento térmico é um processo utilizado para aumentar a digestibilidade das leguminosas, visto que atua na inativação dos inibidores de tripsina e causa a desnaturação protéica, facilitando a ação das proteases.

Tabela 12. Digestibilidade *in vitro* das proteínas e teores de isoflavonas totais (mg/100 g de amostra b.u.) e sua porcentagem nas frações digerida e não-digerida no grão de soja cru, grão cozido, hipocótilo e cotilédone de soja, FDS e IPS.

	Digestibilidade protéica (%)	Isoflavonas totais (mg/g)*	Isoflavonas FD (%)	Isoflavonas FND (%)
caseína	83 ± 1	-	-	-
grão cru	71 ± 1	0,98	86	14
grão cozido	90 ± 2	0,57	85	15
hipocótilo	72 ± 1	6,56	81	19
cotilédone	71 ± 1	1,28	90	10
FDS	89 ± 1	3,43	90	10
IPS	90 ± 1	1,18	86	14

*O teor de isoflavonas totais foi expresso como agliconas. Os resultados estão expressos como média (n = 3). FD fração digerida. FND fração não-digerida.

A digestibilidade é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos. Trata-se de um determinante da qualidade protéica da dieta. Quando certas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes ou transformada em produtos do metabolismo pelos microorganismos do intestino grosso (SGARBIERI, 1987).

De acordo com os resultados aqui obtidos, Pires *et al.* (2006) relataram digestibilidade protéica para a soja convencional de 71,76 %, não diferindo da soja isenta de inibidor de tripsina Kunitz e lipoxigenases (KTI-LOX-), que apresentou 74,26 % de digestibilidade. Isto sugere que a eliminação genética deste inibidor não levou a um aumento significativo na digestibilidade protéica. Já Monteiro *et al.* (2003) encontraram maior valor de digestibilidade para variedade de soja convencional (86,36 %) e para a soja isenta KTI-LOX- (90,59 %).

A análise de isoflavonas para o grão de soja cru e cozido, hipocótilo e cotilédone de soja, FDS e IPS após a digestão das proteínas mostrou que 81-90 % das isoflavonas estão presentes na fração digerida e apenas aproximadamente 15 % permaneceu ainda na fração em TCA 5 %, ligada talvez a alguns peptídeos maiores (Tabela 12).

A Tabela 13 mostra o perfil das isoflavonas do grão de soja cru e cozido, hipocótilo e cotilédone de soja, FDS e IPS das frações digeridas e não-digeridas no ensaio de digestibilidade *in vitro* das proteínas.

Observa-se basicamente um aumento de isoflavonas na forma de agliconas associadas à fração não digerida, sugerindo predominância de interações hidrofóbicas, já que a solubilização das agliconas está mais associada à solubilização protéica (BARBOSA, 2004).

A fração não-digerida do grão teve uma diminuição tanto dos β -glicosídeos (25 %) e malonilglicosídeos (16 %), no grão cozido os β -glicosídeos não sofreram alteração e os malonilglicosídeos não foram detectados após digestão. O hipocótilo de soja teve uma diminuição de 22 % dos β -glicosídeos e aumento de 13 % dos malonilglicosídeos na fração não-digerida e o cotilédone de soja teve apenas uma queda de 38 % dos β -glicosídeos. A fração não-digerida da FDS apresentou uma diminuição apenas dos malonilglicosídeos (38 %), sendo que os β -glicosídeos não sofreram alteração, e o IPS apresentou uma diminuição drástica dos β -glicosídeos (74 %).

Em relação às isoflavonas totais (genisteína, gliciteína e daidzeína) observa-se que não houve diferença significativa nas frações digeridas e não-digeridas para os produtos analisados. A genisteína apresentou-se em maior concentração para todas as amostras analisadas tanto na fração digerida como na fração não-digerida, exceto para o hipocótilo da soja que apresentou maior porcentagem de gliciteína para a fração digerida e não-digerida, o que corresponde a sua composição (Figura 11).

Os resultados demonstraram que a maioria das isoflavonas está presente na fração digerida após digestão *in vitro* com pepsina, e a fração não-digerida apresentou um elevado teor de agliconas. As isoflavonas preferencialmente associadas às proteínas seriam as agliconas e essas interações seriam hidrofóbicas. Esses dados confirmam os resultados anteriores com 28 % das isoflavonas na fração insolúvel em TCA e cerca de 25 % das isoflavonas ligadas às frações protéicas 7S, 11S e FI, com preferência pela fração 11S.

Ainda, as isoflavonas presentes na fração digerida estão em sua maioria na forma de glicosídeos, confirmando os nossos resultados referentes aos tipos de interação, mostrando que as isoflavonas livres estariam principalmente na forma de glicosídeos.

Tabela 13. Perfil das isoflavonas do grão de cru e cozido, hipocótilo e cotilédono da soja, farinha desengordurada (FDS) e isolado protéico de soja (IPS) das frações digeridas (FD) e não-digeridas (FND) por pepsina (37 °C/3 h).

	grão cru				grão cozido				hipocótilo				cotilédono				FDS				IPS			
	(%)*	FD	FND		FD	FND		FD	FND	FD	FND	FD	FND	FD	FND	FD	FND	FD	FND	FD	FND			
β-glicosídeos		51 ± 2 ^b	38 ± 4 ^d		64 ± 2 ^a	61 ± 5 ^a		49 ± 1 ^c	38 ± 2 ^d		53 ± 5 ^b	33 ± 2 ^d		53 ± 4 ^a	55 ± 2 ^a		35 ± 4 ^b	9 ± 2 ^d						
M glicosídeos		43 ± 5 ^a	36 ± 3 ^b		15 ± 1 ^c	n.d.		46 ± 3 ^a	52 ± 3 ^a		38 ± 2 ^b	36 ± 3 ^b		39 ± 5 ^b	24 ± 3 ^d		19 ± 3 ^d	26 ± 3 ^d						
Ac glicosídeos		0,8 ± 0,1 ^a	1 ± 1 ^a		2 ± 1 ^a	n.d.		2 ± 1 ^a	2 ± 1 ^a		0,9 ± 0,2 ^a	1 ± 1 ^a		0,8 ± 0,2 ^t	1 ± 1 ^b		1 ± 1 ^b	5 ± 1 ^a						
Agliconas		5 ± 2 ^{d,e}	25 ± 5 ^b		19 ± 1 ^c	39 ± 2 ^a		3 ± 1 ^e	9 ± 3 ^d		8 ± 1 ^d	30 ± 2 ^b		7,2 ± 0,8 ^e	20 ± 4 ^d		45 ± 5 ^c	59 ± 2 ^b						
Daidzeína total		32 ± 1 ^b	30 ± 2 ^b		27 ± 1 ^{b,c}	31 ± 2 ^b		30 ± 1 ^b	26 ± 1 ^c		38 ± 3 ^a	34 ± 2 ^{a,b}		32 ± 1 ^b	29 ± 3 ^b		24 ± 1 ^c	20 ± 1 ^c						
Gliciteína total		7 ± 1 ^b	8 ± 1 ^b		8 ± 1 ^b	4 ± 1 ^c		44 ± 1 ^a	41 ± 1 ^a		3 ± 1 ^c	3 ± 1 ^c		3 ± 1 ^c	6 ± 1 ^b		4 ± 1 ^{b,c}	10 ± 2 ^b						
Genisteína total		61 ± 1 ^a	62 ± 2 ^a		64 ± 1 ^a	65 ± 3 ^a		26 ± 1 ^c	33 ± 2 ^b		59 ± 3 ^a	63 ± 3 ^a		65 ± 2 ^b	65 ± 2 ^b		72 ± 1 ^a	70 ± 2 ^a						

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). *As formas das isoflavonas (conjugados ou agliconas) foram expressas em % do total (p/p). A porcentagem total de cada aglicona representa a soma das formas livres e conjugadas, expressas como agliconas, em relação ao total (p/p). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

5.3.2. Efeito da matriz alimentar sobre a biodisponibilidade das isoflavonas *in vitro*

O estudo da biodisponibilidade *in vitro* foi realizado simulando-se o processo digestivo que ocorre no trato gastrointestinal, e determinando-se as eventuais isoflavonas associadas à fração não digerida da soja. A fração indigerível (FRI) da dieta é composta, em sua maior parte, de amido resistente, fibra alimentar, proteína resistente, polifenóis, entre outros componentes associados (SAURA-CALIXTO *et al.*, 2000). As FRI são divididas em solúveis e insolúveis.

A Tabela 14 apresenta a porcentagem da fração indigerível solúvel e insolúvel e teor de isoflavonas nestas frações e proteínas na FRI e na fração digerida a partir dos grãos de soja crus, grãos de soja cozidos, hipocótilo e FDS.

Tabela 14. Porcentagem da fração indigerível (FRI) solúvel e insolúvel, das isoflavonas nestas frações e proteínas na FRI e na fração digerida a partir dos grãos de soja crus, grãos de soja cozidos, hipocótilo e FDS.

	grão cru	grão cozido	hipocótilo	FDS
FRI				
solúvel (%)	18	14	13	18
insolúvel (%)	29	32	34	31
Proteínas				
FRI (%)	42	36	55	41
fração digerida (%)	58	64	45	59
Isoflavonas				
FRI solúvel (%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FRI insolúvel (%)	25	25	13	6

O teor de isoflavonas totais foi expresso como agliconas. n.d. não detectado. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3).

A FDS, hipocótilo, grão de soja cru e cozido apresentaram a FRI correspondendo em média a 47 % do total (Tabela 14), e a maior porcentagem da FRI na forma insolúvel.

As proteínas não-digeríveis corresponderam a 36-55 % da FRI para os produtos analisados, e o grão cozido teve um aumento de 10 % das proteínas na fração digerida em relação ao grão de soja cru.

As isoflavonas associadas à fração indigerível corresponderam a uma porcentagem baixa do conteúdo total (6-25 %), sendo detectadas apenas na fração insolúvel (Tabela 14) e apenas as agliconas estão presentes, como determinado por CLAE/DAD.

As isoflavonas corresponderam entre 6 a 25 % do total na fração indigerível insolúvel e 75 a 94 % do total nas proteínas digeridas para os produtos analisados.

Estes resultados confirmam os dados anteriores mostrando que em torno de 25 a 30 % das isoflavonas estão associadas às proteínas e mostram a importância das interações com as agliconas, que seriam as formas menos biodisponíveis em decorrência desta interação.

5.4. Estudo de biodisponibilidade das isoflavonas *in vivo*

A absorção das isoflavonas foi avaliada através de ensaios com ratos Wistar macho por administração oral do extrato de isoflavonas livres (EIL) ao grupo iso e extrato protéico contendo isoflavonas (EPI) para o grupo iso+prot. O EPI foi obtido a partir do IPS, onde na etapa de precipitação na obtenção do IPS só as isoflavonas ligadas às proteínas permanecem presentes, pois as isoflavonas livres foram descartadas juntamente com o sobrenadante. Os ratos foram sacrificados nos tempos de 30 min, 1, 2, 3, 6, e 8 horas, após administração por gavagem dos extratos. O sangue, rins, estômago, fígado, intestino delgado e intestino grosso foram coletados para a análise das isoflavonas por CLAE/DAD.

A Figura 21 apresenta os cromatogramas obtidos por CLAE/DAD de plasma de rato após 2 horas da administração oral dos extratos EIL e EPI (Figuras 21A e 21B, respectivamente), juntamente com os cromatogramas de plasma de rato após hidrólise enzimática com β -glucuronidase-sulfatase (Figura 21C e 21D, respectivamente). Nenhuma isoflavona foi detectada no plasma dos ratos controle (Figura 21E).

As Figuras 22, 23, 24 e 25 apresentam os cromatogramas dos rins, estômago, ID e IG de rato (respectivamente) após 2 horas da administração oral dos extratos EIL e EPI (Figuras A e B, respectivamente). Não foram detectadas isoflavonas no plasma dos ratos controle (Figura C).

Figura 21. Cromatogramas obtido por CLAE/DAD de plasma de ratos Wistar macho após administração oral por gavagem dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente. (A) plasma 2 horas após administração do EIL, (B) plasma 2 horas após administração do EPI, (C) plasma tratado com β -glucuronidase-sulfatase 2 horas após administração do EIL e (D) plasma tratado com β -glucuronidase-sulfatase 2 horas após administração do EPI. (E) plasma do grupo controle. Picos identificados: 1. daidzina, 3. genistina, 7. daidzeína, 8. genisteína.

Figura 22. Cromatogramas obtido por CLAE/DAD de rins de ratos Wistar macho após administração oral por gavagem dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente. (A) rins 2 horas após administração do EIL, (B) rins 2 horas após administração do EPI, (C) rins do grupo controle. Picos identificados: 7. daidzeína, 8. genisteína.

Figura 23. Cromatogramas obtido por CLAE/DAD de estômago de ratos Wistar macho após administração oral por gavagem dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente. (A) estômago 1 hora após administração no grupo iso e (B) estômago 1 hora após administração no grupo iso+prot, (C) estômago do grupo controle. Picos identificados: 1. daidzina, 2. malonildaidzina, 3. genistina, 4. acetildaidzina, 5. malonilgenistina, 6. acetilgenistina, 7. daidzeína, 8. genisteína.

Figura 24. Cromatogramas obtido por CLAE/DAD do intestino delgado (ID) de ratos Wistar macho após administração oral por gavagem dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente. (A) ID 2 horas após administração no grupo iso e (B) ID 2 horas após administração no grupo iso+prot, (C) ID do grupo controle. Picos identificados: 1. daidzina, 2. malonildaizina, 3. genistina, 5. malonilgenistina, 7. daidzeína, 8. genisteína.

Figura 25. Cromatogramas obtido por CLAE/DAD do intestino grosso (IG) de ratos Wistar macho após administração oral por gavagem dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente. (A) IG 3 horas após administração no grupo iso e (B) IG 3 horas após administração no grupo iso+prot, (C) IG do grupo controle. Picos identificados: 7. daidzeína, 8. genisteína.

Podemos observar que sem hidrólise não foi possível detectar as isoflavonas nas concentrações e metodologia utilizada.

As isoflavonas hidrolisadas foram detectadas no plasma na forma glicosilada (daidzina e genistina) e na forma aglicona (daidzeína e genisteína), tanto para os ratos do grupo iso como para os ratos do grupo iso+prot (Figura 21C e D). Nos rins foram detectadas apenas as agliconas (daidzeína e genisteína), tanto para os ratos do grupo iso como para os ratos do grupo iso+prot (Figura 22 A e B).

No estômago podemos observar tanto as isoflavonas glicosiladas (daidzina e genistina) e agliconas (daidzeína e genisteína) como as formas maloniladas (malonildaizina e malonilgenistina) e acetiladas (acetildaizina e acetilgenistina) para ambos os grupos, iso e iso+prot (Figura 23 A e B). No ID foram detectadas as isoflavonas glicosiladas (daidzina e genistina), agliconas (daidzeína e genisteína) e as formas maloniladas (malonildaizina e malonilgenistina) para ambos os grupos, iso e iso+prot (Figura 24 A e B). No IG foram detectadas apenas as isoflavonas na forma de agliconas (daidzeína e genisteína) (Figura 25 A e B).

Nosso resultados estão de acordo com Andlauer *et al* (2000) que observaram que após digestão *in vitro* do tofu foram identificadas as formas maloniladas, β -glicosiladas e agliconas, sugerindo que nem a ação enzimática e nem do pH ácido hidrolisam os malonil e β -glicosídeos. Porém, após análise da perfusão com intestino delgado isolado, as formas maloniladas não foram detectadas nem no plasma e nem no efluente intestinal, e os β -glicosídeos decresceram com o aumento das agliconas tanto no plasma como no efluente intestinal, sugerindo assim que ocorre previamente hidrólise dessas formas por enzimas localizadas na membrana de borda em escova, liberando as formas agliconas.

A concentração plasmática máxima foi de 2 horas após administração oral do EIL para o grupo iso, e para o grupo iso+prot foi de 3 horas após administração oral do EPI (Figura 26). King (1998) e Piskula (2000) observaram uma concentração plasmática máxima em 2 horas após administração oral por gavagem de agliconas (daidzeína e genisteína) a ratos Wistar. Steensma *et al*. (2006) reportaram uma concentração plasmática máxima de 2 e 5 horas após administração oral por gavagem de genistina e extrato protéico de soja com isoflavonas, respectivamente, a ratos Wistar.

Utilizando a regra trapezoidal para calcular a área abaixo da curva de concentração vs tempo (AAC_{0-8h}) das isoflavonas no plasma, obteve-se um AAC

de 1,591 ug.h/mL para o grupo iso e de 1,172 ug.h/mL para o grupo iso+prot. Assim, podemos observar uma redução na quantidade e um retardo no tempo de absorção das isoflavonas para o grupo iso+prot.

Nos rins as isoflavonas foram detectadas nos tempos de 30 min, 1, 2, e 3 horas, tanto para o grupo iso como para o grupo iso+prot, porém para o grupo iso+prot que também foram detectadas isoflavonas nos tempos de 6 e 8 horas (Figura 27). A concentração máxima para ambos os grupos foi observada no tempo de 30 minutos após administração oral dos extratos EIL e EPI. Porém o grupo iso+prot apresentou um segundo pico na concentração de isoflavonas após 3 h e manteve o platô até 8 h após administração do EPI, o que poderia estar associado à absorção mais lenta observado para este grupo.

Não foram detectadas isoflavonas no fígado nos tempos analisados.

Figura 26. Concentração plasmática de isoflavonas após a administração dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente, a rato Wistar macho. Média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$ ratos).

Figura 27. Concentração de isoflavonas nos rins após a administração dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente, a rato Wistar macho. Média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$ ratos).

As Figuras 28, 29 e 30 apresentam as curvas de concentração de isoflavonas no estômago, intestino delgado e intestino grosso, após administração oral.

Figura 28. Concentração de isoflavonas no estômago após a administração dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente, a rato Wistar macho. Média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$ ratos).

Figura 29. Concentração de isoflavonas no intestino delgado (ID) após a administração dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente, a rato Wistar macho. Média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$ ratos).

Figura 30. Concentração de isoflavonas no intestino grosso (IG) após a administração dos extratos EIL e EPI para o grupo iso e iso+prot, respectivamente, a rato Wistar macho. Média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$ ratos).

No estômago a concentração máxima de isoflavonas foi alcançada 30 minutos após administração oral dos extratos EIL e EPI para ambos os grupos (Figura 28). A concentração das isoflavonas no estômago foi maior para o grupo iso do que para o grupo iso+prot. O grupo iso apresentou um rápido declínio na concentração de isoflavonas até 3 h e continuou a diminuir numa velocidade mais baixa até 8 h após administração. Porém a velocidade de esvaziamento gástrico foi mais lenta para o grupo iso+prot.

A concentração de isoflavonas no intestino delgado chegou ao máximo no tempo entre 1 e 2 h após administração oral do extrato EIL para o grupo iso (Figura 29). Já o grupo iso+prot apresentou um platô na concentração de isoflavonas entre 30 minutos e 3 h após administração oral do EPI, e após 2 h a concentração de isoflavonas foi maior para este grupo e continuou elevada e com menor queda do que o grupo iso.

No intestino grosso, as isoflavonas foram detectadas após 3 h da administração oral de ambos os extratos (Figura 30). Para o grupo iso tivemos um pico máximo após 3 h, e a seguir uma queda até 6 h mantendo-se num mesmo patamar até 8 h. Já para o grupo iso+prot tivemos um pico após 6 h, e a seguir uma queda até 8 h que chega até a mesma concentração do grupo das isoflavonas livres. Esse pico retardado coincide com a menor velocidade do esvaziamento gástrico deste grupo.

Como pode ser observado na Tabela 15, a maior porcentagem de recuperação das isoflavonas livres no plasma e tecidos ocorre 30 minutos após a administração, correspondendo a 75 % do total administrado. A recuperação diminui sucessivamente a partir de 30 min o que indica que as isoflavonas podem ter sido progressivamente destruídas no intestino delgado e intestino grosso, visto que a concentração plasmática e renal é baixa. Por outro lado, a maior porcentagem de recuperação das isoflavonas ligadas às proteínas no plasma e tecidos também ocorre 30 minutos após administração, porém a recuperação é bem maior (98 % do total administrado). A recuperação diminui sucessivamente a partir de 30 min só que numa proporção bem menor, mantendo ainda as taxas altas (Tabela 16).

Tabela 15. Porcentagem de recuperação das isoflavonas livres no plasma e tecidos de ratos após administração por gavagem do extrato EIL.

tempo (h)	recuperação de isoflavonas (%)					total
	plasma	rins	estômago	ID*	IG**	
0,5	0,01	4,40	67,08	3,76	0,00	75,25
1	0,02	3,20	49,36	9,8	0,00	62,38
2	0,02	3,08	24,68	10,44	0,00	38,22
3	0,02	3,48	3,68	2,60	10,88	20,66
6	0,00	0,00	1,68	1,00	1,80	4,48
8	0,00	0,00	0,24	0,56	2,00	2,80

* ID - intestino delgado; ** IG - intestino grosso

Tabela 16. Porcentagem de recuperação das isoflavonas associadas às proteínas no plasma e tecidos de ratos após administração por gavagem do extrato EPI.

tempo (h)	recuperação de isoflavonas (%)					total
	plasma	rins	estômago	ID*	IG**	
0,5	0,02	8,27	79,27	10,47	0,00	98,03
1	0,02	4,93	54,60	12,33	0,00	71,88
2	0,03	4,13	42,33	12,87	0,00	59,36
3	0,03	7,47	16,07	11,13	4,33	39,03
6	0,00	7,93	4,07	2,80	8,33	23,13
8	0,00	7,80	1,40	2,27	4,20	15,67

* ID - intestino delgado; ** IG - intestino grosso

5.5. Estudo do efeito das isoflavonas sobre o status antioxidante *in vivo*

5.5.1. Crescimento e consumo de ração dos animais

Ao final de 30 dias de tratamento, os animais controle e tratados apresentaram peso final similar, de 255 ± 16 g para o grupo Controle, de 259 ± 19 g para o grupo iso, de 261 ± 10 g para o grupo iso+prot e de 261 ± 10 g para o grupo prot (Figura 31 A). Da mesma maneira, não se observou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o consumo de ração diário entre todos os tratamentos (Figura 31 B). Nota-se ainda, que conforme os animais foram crescendo houve um aumento no consumo de ração, e nos dias que ocorreu aumento de consumo de ração, todos os grupos comeram mais, o mesmo aconteceu para os dias de queda. Também não se observou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para as taxas de ácido úrico no soro dos animais.

Figura 31. Curva de crescimento (A) e consumo diário de ração (B), após administração crônica dos extratos EIL, EPI e EP. Média $\pm$ desvio padrão ($n = 8$ ratos/grupo).

5.5.2. Capacidade antioxidante total plasmática

A capacidade antioxidante total plasmática foi avaliada pelo método de ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) e seqüestro de radicais DPPH• (Figura 32). No método de seqüestro de radicais DPPH• não se observou

alteração na capacidade antioxidante do plasma entre o grupo controle ($0,030 \pm 0,008 \mu\text{mol Eq. Trolox/mL}$) e os tratamentos com iso+prot e prot. Entretanto, observou-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$), na capacidade antioxidante para grupo tratado com o iso ($0,047 \pm 0,009 \mu\text{mol Eq. Trolox/mL}$). Quando avaliado pelo método ORAC, observou-se que entre os animais controle e prot (11 ± 2 e $12 \pm 1 \mu\text{mol Eq. Trolox/mL}$, respectivamente) não houve diferença significativa, já o controle em relação aos tratados com iso ($45 \pm 4 \mu\text{mol Eq. Trolox/mL}$) e iso+prot ($26 \pm 1 \mu\text{mol Eq. Trolox/mL}$) observou-se um aumento de aproximadamente 4 e 2 vezes no valor de capacidade antioxidante, respectivamente.

Pode-se observar que os valores de capacidade antioxidante são diferentes entre os dois métodos, sendo superiores para o método ORAC. Isto provavelmente ocorre uma vez que é utilizado plasma total quando avaliado pelo método ORAC (meio aquoso), enquanto que o método DPPH• (meio metanólico) requer uma prévia desproteinização do plasma. Assim, no valor de capacidade antioxidante avaliado por ORAC inclui-se também a contribuição das proteínas.

Assim esses resultados sugerem que as isoflavonas estão atuando no aumento da capacidade antioxidante do plasma e que as proteínas não tiveram um papel efetivo na capacidade antioxidante no plasma.

Figura 32. Capacidade antioxidante total plasmática após a administração crônica dos extratos EIL, EPI e EP. Média $\pm$ desvio padrão ($n = 8$ ratos/grupo). Letras diferentes entre os grupos na metodologia analisada indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.5.3. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupamentos sulfidril livres (GSH) de plasma e tecidos biológicos

A concentração basal de TBARS no plasma e demais tecidos, expressa como malonaldeído (MDA), foi avaliada pelo método TBARS e expressa o índice de peroxidação lipídica (Tabela 17).

De acordo com os resultados da Tabela 17, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos controle e tratados com iso, iso+prot e prot nos valores de MDA no plasma, fígado, rins e cérebro aqui analisados. Wang *et al.* (2008) mostraram que houve redução significativa dos níveis de MDA dos grupos tratados com extrato fermentado de isoflavonas em relação ao controle no fígado e rins de ratos Wistar, alimentados com uma dieta rica em colesterol.

Estes dados demonstram que a suplementação com iso, iso+prot e prot, não afetou de maneira positiva na redução do stress oxidativo nos diversos tecidos, quando se está analisando o estado basal do organismo.

Tabela 17. Conteúdo de compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico de plasma (nmol MDA/mL) e de tecidos (μ mol MDA/g) entre os grupos de animais controle e tratados: grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot.

	controle	iso	iso+prot	prot
Plasma	14 $\pm$ 1 ^a	15 $\pm$ 3 ^a	16 $\pm$ 3 ^a	14 $\pm$ 2 ^a
Eritrócito*	-	-	-	-
Fígado	0,24 $\pm$ 0,10 ^a	0,24 $\pm$ 0,10 ^a	0,13 $\pm$ 0,05 ^a	0,16 $\pm$ 0,04 ^a
Rins	0,06 $\pm$ 0,01 ^a	0,06 $\pm$ 0,03 ^a	0,06 $\pm$ 0,03 ^a	0,06 $\pm$ 0,03 ^a
Baço*	-	-	-	-
Cérebro	0,04 $\pm$ 0,01 ^a	0,04 $\pm$ 0,01 ^a	0,04 $\pm$ 0,01 ^a	0,03 $\pm$ 0,01 ^a

*não determinado devido à interferência da hemoglobina. Média $\pm$ DP (n=8 ratos/grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre tratamentos (p<0,05).

A Tabela 18 apresenta as concentrações de grupamentos sulfidril livres (GSHT) total (protéico e não protéico) do plasma e de grupamentos sulfidril livres não protéicos, expressas como glutathiona reduzida (GSH), de eritrócito, fígado, rins, baço e cérebro dos grupos controle, iso, iso+prot e prot.

Tabela 18. Conteúdo de grupamentos sulfidríla livres total de plasma (mM) e de sulfidríla livres não protéica de eritrócito e tecidos ($\mu\text{mol GSH/g}$), expresso em glutathiona reduzida (GSH), entre os grupos controle e tratados: grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot.

	controle	iso	iso+prot	prot
Plasma	$0,31 \pm 0,05^b$	$0,33 \pm 0,10^b$	$0,50 \pm 0,08^a$	$0,43 \pm 0,06^a$
Eritrócito	202 ± 8^b	237 ± 10^a	245 ± 9^a	249 ± 14^a
Fígado	892 ± 55^b	1063 ± 81^a	190 ± 43^d	266 ± 54^c
Rins	408 ± 36^b	520 ± 20^a	557 ± 31^a	592 ± 29^a
Baço	59 ± 8^c	74 ± 9^b	75 ± 10^b	84 ± 11^a
Cérebro	402 ± 32^a	422 ± 34^a	388 ± 30^a	397 ± 34^a

Média $\pm$ DP (n=8 ratos/grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre tratamentos ($p < 0,05$).

De maneira geral, com exceção do cérebro, a administração crônica dos extratos elevou os níveis de GSH do plasma, eritrócito, rins e baço.

No eritrócito, rins e baço, os grupos iso, iso+prot e prot foram os que apresentaram uma elevação significativa de GSH em relação ao controle. O aumento foi em torno de 21 % para os grupos tratados em relação ao controle para o eritrócito. Tanto nos rins como no baço, o grupo prot apresentou um aumento de GSH em torno de 43 % quando comparado ao controle.

No cérebro não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o controle para o teor de GSH.

No plasma, o grupo iso não apresentou diferença significativa do controle, e ao mesmo tempo houve um aumento de 61 % e 40 % nos níveis de GSHT, para os grupos iso+prot e prot, respectivamente.

Por outro lado, o fígado apresentou redução significativa ($p < 0,05$) nos teores de GSH, tanto no grupo iso+prot (80 %) e prot (70 %), enquanto o grupo iso apresentou uma elevação de 20 % em relação ao grupo controle.

A GSH é um tripeptídeo composto de aminoácidos não essenciais, descrita como um importante agente antioxidante que apresenta um importante papel na proteção de células a danos oxidativos. É um importante marcador da saúde celular e sua queda é indicativa de lesão oxidante. Seu déficit acarreta diminuição da resistência às drogas e radiações e da capacidade de reversão de

tumores (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985). A GSH reduz peróxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) via reação catalisada pela glutathione peroxidase (GPx); atua como seqüestrante de radicais hidroxila e oxigênio singlet; além de reduzir diretamente o radical tocoferol ou de maneira indireta pela redução do ácido desidroascórbico, portanto, prevenindo a reação radicalar em cadeia e a peroxidação lipídica. A GSH oxidada é novamente reduzida pela glutathione reductase.

O motivo pela qual foi observado um alto decréscimo nos níveis de GSH do fígado ainda é desconhecido. No entanto, de modo geral, todos os extratos mostraram efeitos positivos sobre a concentração de GSH em sangue e tecidos.

5.5.4. Atividade das enzimas antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como ânion superóxido, radical hidroxila e H_2O_2 estão envolvidas no processo de injúria de tecidos biológicos. As células de mamíferos apresentam um complexo sistema para detoxificar a ERO produzida em consequência do metabolismo aeróbio normal. Um dos componentes essenciais deste sistema inclui as enzimas antioxidantes que trabalham em conjunto para a remoção da ERO. Dentre estas enzimas incluem a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD). De maneira geral, os ânions superóxido são rapidamente convertidos a H_2O_2 pela SOD, enquanto que as enzimas CAT e GPx protegem as células contra o potencial tóxico do H_2O_2 convertendo-o a água e oxigênio.

A Figura 33 apresenta a atividade catalítica da enzima CAT. Esta enzima está presente na maioria das células aeróbicas, sendo que em animais se encontra principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético contêm, no entanto, pequenas quantidades da enzima (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Figura 33. Efeito da administração dos extratos EIL, EPI e EP na atividade da catalase (CAT) plasmática, eritrócitos e tecidos. Média $\pm$ DP (n=8 ratos/grupo). Letras diferentes entre os grupos no tecido analisado indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

No plasma, os grupos iso e prot apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na atividade CAT plasmática de 1,5 e 1,3 vezes, respectivamente.

No eritrócito podemos observar que o grupo iso+prot e prot tiveram uma elevação de 25 % e 14 %, respectivamente, na atividade da CAT.

A atividade da CAT foi super elevada no fígado em relação aos outros tecidos e o grupo iso apresentou um diminuição de 8 % e o grupo prot um aumento de 22 % em relação ao controle.

Nos demais tecidos não foi observado nenhuma alteração na atividade CAT entre os tratamentos e o controle. Neste caso, sugere-se que o aumento da atividade CAT deve-se a uma interação entre a isoflavonas e a enzima, o que não ocorre nos tecidos provavelmente devido à baixa concentração.

A Figura 34 apresenta a atividade catalítica da enzima GPx. A GPx é a principal enzima na regulação intracelular do estado redox. Ela é uma enzima

ligada ao selênio e reduz efetivamente peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica a água e alcoóis lipídicos, respectivamente.

Figura 34. Efeito da administração dos extratos EIL, EPI e EP na atividade da glutathiona peroxidase (GPx) plasmática, eritrócitos e tecidos. Média $\pm$ DP (n=8 ratos/grupo). Letras diferentes entre os grupos no tecido analisado indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A GPx apresentou alta atividade no fígado, rins, e baço, moderada atividade para o cérebro e baixa atividade no plasma e eritrócito. Estes resultados estão de acordo com Halliwell & Gutteridge (1989) que relataram alta atividade no fígado, rins e eritrócito, moderada atividade no coração, pulmão e cérebro, e baixa atividade nos músculos.

A atividade da GPx plasmática apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de 25 % para o grupo iso+prot em relação ao grupo controle.

No eritrócito e rins podemos observar que no grupo iso houve um aumento de 80 % e 16 %, respectivamente, na atividade da GPx.

No cérebro e rins, o grupo iso+prot apresentou uma elevação de 14 % e 11 %, respectivamente, na atividade da GPx.

Nos demais tecidos (fígado e baço) não foi observado nenhuma alteração na atividade GPx entre os tratamentos e o controle.

A Figura 35 apresenta a atividade catalítica da enzima SOD. A superóxido dismutase (SOD) tem papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, pois atua na remoção do radical superóxido. Existem diferentes tipos de SOD, dependendo do metal que atua como cofator em seu sítio catalítico, sendo elas a CuZnSOD e MnSOD (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). A atividade SOD total expressa os valores de atividade das duas enzimas.

Figura 35. Efeito da administração dos extratos EIL, EPI e EP na atividade da superóxido dismutase (SOD) plasmática, eritrócitos e tecidos. Média $\pm$ DP (n=8 ratos/grupo). Letras diferentes entre os grupos no tecido analisado indicam diferença significativa (p<0,05).

A atividade SOD total no eritrócito apresentou aumento significativo, entre 81 % e 45 %, entre os tratamentos e o grupo controle (Figura 22).

No cérebro, a atividade SOD apresentou uma elevação em torno de 20 % para os grupos iso+prot e prot.

No fígado e nos rins foi observado uma diminuição de 81 % e 15 %, respectivamente, na atividade SOD no grupo iso em relação ao grupo controle.

No plasma e no baço não foi observada nenhuma alteração na atividade SOD entre os tratamentos e o controle.

5.5.5. Expressão gênica de enzimas antioxidantes

Uma vez que o aumento e/ou redução na atividade catalítica das enzimas antioxidantes observados entre os diferentes grupos e tecidos pode ser decorrente da influência da suplementação de isoflavonas ou isoflavonas ligadas às proteínas sobre a expressão gênica nos diferentes níveis, foi realizada a amplificação dos genes das enzimas antioxidantes, a *real-time* RT-PCR, no fígado e nos rins que apresentaram as maiores variações nas atividades enzimáticas em relação ao grupo Controle. Os eritrócitos não puderam ser avaliados em decorrência da indisponibilidade da amostra. O gene GAPDH é um gene constitutivo e utilizado para a normalização dos dados.

Foram feitas extrações de RNA total e a qualidade e quantificação dos RNA foram verificadas por eletroforese das amostras em gel de agarose, observando-se a presença e a intensidade de bandas correspondentes às frações 28S e 18S dos RNA ribossomais (Figura 36).

Figura 36. Eletroforese em gel de agarose com amostras de RNA total do fígado. Foram aplicadas 0,5 µg de RNA das amostras em quintuplicata. C – controle, Iso – grupo iso, I+P – grupo iso+prot e Prot – grupo prot.

Os *primers* descritos na metodologia foram digitados no GeneBank e a partir dele encontramos a temperatura de amplificação, que para todas as enzimas CAT, GPx, MnSOD, CuZnSOD e GAPDH, foi de 60 °C. A temperatura de fusão ou T_m , utilizada para detectar possível co-amplificação do DNA que possibilita a distinção entre diferentes produtos amplificados na reação, a presença de amplificação no controle negativo e a formação de dímeros de *primers*.

A quantificação dos níveis de expressão de um gene por *real-time* RT-PCR foi baseada na razão de um gene alvo por um gene constitutivo, chamada de expressão relativa. O cálculo se baseia na determinação de um valor para o limiar da detecção ou *threshold cycle* (Ct), cujo conceito representa a base da exatidão e reprodutibilidade da quantificação por *real-time* RT-PCR. O valor da fluorescência em Ct é definido como o ponto em que o sinal da detecção assume valores superiores ao ruído de fundo da reação, o que ocorre durante a fase de amplificação exponencial (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Utilizando-se o termociclador com a programação de acordo com a Tabela 19, foram obtidas as curvas para determinação da eficiência das amplificações para cada um dos genes das enzimas analisadas. Para cada análise foi realizado um controle negativo, o qual continha todos os reagentes exceto o cDNA, chamado de *no template control* (NTC).

As Figuras 37 e 38 apresentam os resultados das curvas típicas obtidas em *real-time* RT-PCR para a determinação da eficiência e especificidade das amplificações e ponto de fusão dos produtos amplificados tanto das amostras de fígado como de rins (grupo controle, grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot).

Tabela 19. Dados da programação da amplificação dos DNAs no *real-time* RT-PCR.

ciclo	função	temperatura	tempo
1	ativação da enzima	50 °C	2 min
1	ativação da Taq e inativação da enzima	95 °C	2 min
40	desnaturação das duplas fitas	95 °C	10 s
	pareamento dos <i>primers</i>	60 °C	15 s
	extensão das fitas	72 °C	20 s
1	curva de fusão dos produtos amplificados	72 a 99 °C

Figura 37. Curvas típicas obtidas em *real-time* RT-PCR para a determinação da eficiência das amplificações e ponto de fusão (T_m) dos produtos amplificados tanto das amostras de fígado como de rins (grupo controle, grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot). O controle negativo corresponde à curva NTC (*no template control*). Curvas de quantificação para (A) GAPDH, (B) CAT e (C) GPx. Curvas de fusão para (D) GAPDH, (E) CAT e (F) GPx.

Figura 38. Curvas típicas obtidas em *real-time* RT-PCR para a determinação da eficiência das amplificações e ponto de fusão (T_m) dos produtos amplificados tanto das amostras de fígado como de rins (grupo controle, grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot). O controle negativo corresponde à curva NTC (*no template control*). Curvas de quantificação para (A) CuZnSOD e (B) MnSOD. Curvas de fusão para (C) CuZnSOD e (D) MnSOD.

Para a quantificação da expressão relativa usamos o modelo matemático $\Delta\Delta C_t$ descrito pela Applied Biosystems (User Bulletin #2, P/N 4303859B), segundo Livak & Schmittgen (2001). Neste modelo, representado como $2^{-\Delta\Delta C_t}$, os dados informam o aumento da expressão de um gene, normalizado por um gene constitutivo e relativo ao controle, neste caso ao grupo controle.

Neste modelo, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{tratado} - Ct_{ref})_{amostras} - (Ct_{tratado} - Ct_{ref})_{controle}$. O gene de referência é o gene constitutivo. A eficiência da amplificação neste caso, foi admitida como sendo igual a 2, ou seja, pressupõe-se que as condições de reação foram adequadamente otimizadas.

Nas Figuras 39 e 40 são apresentados os resultados obtidos por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para os genes das enzimas CAT, GPx, CuZnSOD e MnSOD dos dados normalizados através da razão enzima/GAPDH.

Figura 39. Quantificação da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizada pelo gene de referência GAPDH em relação ao controle (grupo controle) para os genes das enzimas antioxidantes (A) CAT, (B) GPx, (C) CuZnSOD e (D) MnSOD pelo *real time* RT-PCR das amostras de fígado (grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot). Letras diferentes entre os grupos indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 40. Quantificação da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizada pelo gene de referência GAPDH em relação ao controle (grupo controle) para os genes das enzimas antioxidantes (A) CAT, (B) GPx, (C) CuZnSOD e (D) MnSOD pelo *real time* RT-PCR das amostras de rins (grupo iso, grupo iso+prot e grupo prot). Letras diferentes entre os grupos indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os níveis de RNAm da CAT no fígado mostraram-se aumentados (1,2 x) para o grupo prot e não foi evidenciada diferença entre os níveis de RNAm para os grupos iso e grupo iso+prot (0,8x) em relação ao controle. Para a CuZnSOD no fígado o RNAm mostrou-se mais expresso para o grupo prot (1,2x) e menos expresso para o grupo iso (0,6x) em relação ao controle (Figura 39). Estes

resultados estão de acordo com o aumento da atividade catalítica observada anteriormente (Figuras 33 e 35, respectivamente).

Os níveis de RNAm da GPx e MnSOD no fígado mostraram-se menores (0,3-0,6x) para todos os grupos analisados em relação ao controle (Figura 39).

Semelhante aos nossos resultados, Tachibana *et al.* (2005) observaram que a suplementação com IPS durante 8 semanas causou um aumento na expressão de 6 genes envolvidos no mecanismo antioxidante, com aumento superior a 1,5x, porém nenhum destes genes correspondentes as 3 enzimas aqui avaliadas.

Para o rim, pode-se observar um aumento na expressão de RNAm da CAT e GPx para o grupo iso (3,5x) e grupo iso+prot (2,8x e 3,8x, respectivamente) (Figura 40). Porém, estes resultados não foram observados para a atividade catalítica da CAT neste tecido (não houve diferença estatística entre os grupos), já para a GPx os resultados estão de acordo com o aumento da atividade catalítica observada anteriormente (Figura 34).

Os níveis de RNAm da CuZnSOD e da MnSOD no rim mostraram-se menores para os grupos tratados (0,2-0,7x) em relação ao grupo controle. Estes resultados estão de acordo com a atividade catalítica observada anteriormente que não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

O efeito da suplementação das isoflavonas na dieta pode ser potencializado quando há stress oxidativo envolvido. Song *et al.* (2006) observaram aumento da atividade e expressão gênica hepáticas das enzimas CAT e GPx para ratos que foram submetidos a radiação gama.

Quando se administra extrato fermentado rico em isoflavonas a ratos Wistar alimentados com uma dieta rica em colesterol observa-se um aumento na atividade da SOD no fígado e nos rins, aumento da atividade da CAT no fígado e não nos rins e aumento da GPx nos rins, mas não no fígado (WANG *et al.*, 2008).

Resultados prévios mostraram que a suplementação com isoflavonas, durante 3 semanas em 3 doses diferentes, a mais baixa correspondendo a níveis usuais de consumo, não alterou a atividade da SOD e da GPx em fígado, pulmão e rins, de ratos diabéticos, mesmo na maior dose de 8x em relação a dose de consumo (HSU *et al.*, 2003).

De forma similar, a suplementação com isoflavonas durante 6 semanas (150 mg/dia de isoflavonas) não causou alteração da atividade enzimática antioxidante de mulheres na pós menopausa (HSU *et al.*, 2001).

A suplementação da dieta de camundongos com genisteína pura durante 30 dias, mostrou afetar de maneira diversa a atividade das enzimas

antioxidantes, dependendo da dose e do órgão avaliados, a adição de genisteína a 50 ppm aumentou a atividade da catalase no intestino delgado e nos rins enquanto que no fígado a atividade desta enzima só foi aumentada com a adição de 250 ppm. Neste nível de adição também se observou aumento da atividade da SOD e da GPx na pele, porém sem afetar a atividade da glutathione-S-transferase. Esta última, no entanto mostrou-se aumentada pela dose menor de genisteína em todos os órgãos avaliados (pele, pulmão, fígado, rins e intestino delgado) (CAI & WEI, 1996).

Na avaliação destes resultados deve-se levar em consideração que o tempo curto da suplementação (4 semanas) pode não ter sido suficiente para causar o mesmo aumento na atividade enzimática do que uma suplementação a longo prazo. Além disso, a ração fornecida aos animais contém o complexo vitamínico considerado como antioxidante não-enzimático e a presença destes antioxidantes pode mascarar o efeito das isoflavonas na dieta.

Os resultados aqui obtidos demonstraram claramente que o aumento da capacidade antioxidante do plasma ocorre única e exclusivamente em decorrência da absorção das isoflavonas. A ingestão de proteínas da soja livre de isoflavonas não altera a capacidade antioxidante do plasma, porém causa um leve aumento na atividade e na expressão gênica da catalase no fígado. No entanto, não se descarta a ocorrência de efeitos hipocolesterolemiantes, os quais não foram avaliados neste estudo.

A soja contém grande quantidade de proteína de reserva, e constitui uma fonte protéica importante na dieta. Os efeitos nutricionais e fisiológicos da proteína de soja vêm sendo estudados há algum tempo, entre os efeitos potencialmente benéficos que têm sido relatados encontram-se o efeito hipocolesterolêmico e efeito antioxidante. No entanto, há uma certa contradição se esses efeitos seriam resultado da ação de peptídeos bioativos formados durante a passagem pelo trato gastrointestinal ou ação das isoflavonas, freqüentemente associadas às proteínas da soja.

6. CONCLUSÕES

- Há associações químicas entre as isoflavonas e as proteínas de reserva, indicando predominância de interações hidrofóbicas, preferencialmente com a fração 11S tanto da FDS como do IPS; e, entre as isoflavonas, os derivados da genisteína e as agliconas, que são mais apolares, parecem interagir preferencialmente com as proteínas.
- A maioria das isoflavonas está presente na fração digerida após proteólise *in vitro* com pepsina, e a fração não-digerida apresenta um elevado teor de agliconas.
- Após simulação *in vitro* da digestão no trato gastrointestinal, 6 a 25% das isoflavonas permanecem associadas à fração indigerível na forma de aglicona, dependendo do processamento e da matriz alimentar.
- A associação entre as isoflavonas e as proteínas reduziu a quantidade e levou a um retardo no tempo de absorção das isoflavonas no plasma *in vivo*.
- Os efeitos das isoflavonas sobre o status antioxidante *in vivo* são afetados pela presença das proteínas da soja.

- A suplementação com isoflavonas livres aumenta a capacidade antioxidante do plasma e a atividade catalítica das enzimas SOD e GPx nos eritrócitos. Esses efeitos não são observados quando as isoflavonas se encontram associadas às proteínas.

- As proteínas da soja isentas de isoflavonas não afetam a capacidade antioxidante do plasma, mas aumentam a atividade e a expressão gênica hepática da catalase, e a suplementação com proteínas associadas às isoflavonas aumenta a atividade da catalase eritrocitária.

- A expressão gênica das enzimas antioxidantes foi afetada de modo diverso pela administração de isoflavonas e proteínas livres ou associadas no fígado e nos rins.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, H.; VAN DER WILDTZ, J.; KINZEL, J.; ATTALLA, H.; WÄHÄLÄ, K. Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Amsterdam, v.52, p.97-103, 1995.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods of Enzimology**, New York, v.105, p.121-126, 1984.
- AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. **Process Biochem.**, v.40, p.1131-1136, 2004.
- AKESON, W.R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **J. Nutr.**, Bethesda, v.83, n.3, p.257-261, 1964.
- ANDERSON, J.W.; JOHNSTONE, B.M.; COOK-NEWELL, M.E. Meta-analysis of the effects of soy intake on the serum lipids. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.333, p.276-282, 1996.
- ANDLAUER, W.; KOLB, J.; FÜRST P. Isoflavone from tofu are absorbed and metabolized in the isolated rat small intestine. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.3021-3027, 2000.
- ANVISA, 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.2 de 07 de janeiro de 2002. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>. Acessado em 10 de outubro de 2007.
- ANVISA, 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução n.268 de 22 de setembro de 2005. Revoga a Resolução n.14/1978 que estabelece padrão identidade e qualidade para farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, concentrado protéico de soja, isolado protéico de soja e extrato de soja. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/14_78.htm. Acessado no dia 22 de março de 2007.

ARABBI, P.R. Alimentos funcionais: aspectos gerais. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, São Paulo, v.21, p.82-102, 2001.

ARÊAS, J.A.G.; LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: I- The phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. **J. Food Biochem.**, Wesport, v.5, p.19-37, 1981.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of A.O.A.C.** 16.ed. Washington, 1995. 2000p.

BADLEY, R.A.; ATKINSON, D.; HANSER, H.; OLDANI, D.; GREEN, J.P.; STUBBS, J.M. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.412, p.214-228, 1975.

BARBOSA, A.C.L. **Estudo das condições de processamento para obtenção de isolado protéico de soja com teor aumentado de isoflavonas**. São Paulo, 2004. 105 p., Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BARBOSA, A.C.L.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, MI. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. **Food Chem.**, Oxford, v.98, p.757-766, 2006.

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

BARNETT, D.T.; MOWREY, R.A.; HAGLER, W.M. JR; BRISTOL, D.G.; MANSMANN, R.A. The correlation of selected mycotoxins to the incidence of colic in horses. In: **Proc. Fourteenth Equine Nutr. Physiol. Symp.**, Ontario. p.242-247, 1995.

BECKMAN, G. Population studies in northern Sweden. VI. Polymorphism of superoxide dismutase. **Hereditas**, Lund, v.73, p.305-309, 1973.

- BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**, New York: Academic Press, 2ed, v.3, p.1212-1215, 1974.
- BEUTLER, E.; WEST, C.; BEUTLER, B. Electrophoretic polymorphism of glutathione peroxidase. **Hum. Genet.**, Heidelberg, v.38, p.163-169, 1974.
- BINGHAM, S.A.; ATKINSON, C.; LIGGINS, J.; BLUCK, L.; COWARD, A. Phyto-oestrogens: where are we now? **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.79, p.393-406, 1998.
- BOYNE, A.F.; ELLMAN, G.L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. **Anal. Bioch.**, v.46, p.639-653, 1972.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. – Wiss. u.- Technol.**, London, v.28, p.25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução n.16, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos funcionais e ou novos ingredientes. **Diário Oficial União**, Brasília, 3 maio 1999. Seção 1-E, p.11.
- BRASIL. Resolução n.18, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 maio 1999. Seção 1-E, p.11.
- BROOKS, J. R.; MORR, C. V. Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Chicago, v.62, p.1347-1354, 1985.
- CAI, Q.; WEI, H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. **Nutr. Cancer**, Mahwah, v.25, p.1-7, 1996.
- CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M.; PUSZTAI, A. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins? **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, p.742-749, 2000.

- CASSIDY, A. Dietary phyto-oestrogens: molecular mechanisms, bioavailability and importance to menopausal health. **Nutr. Res. Rev.**, New York, v.18, n.2, p.183-201, 2005.
- CASSIDY, A. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.89, n.4, p.1182-1188, 2006.
- CASSIDY, A.; ALBERTAZZI, P.; NIELSEN, I.L.; HALL, W.; WILLIAMSON, G.; TETENS, I.; ATKINS, S.; CROSS, H.; MANIOS, Y.; WOLK, A.; STEINER, C.; BRANCA, F. Critical review of health effects of soyabean phyto-estrogens in post-menopausal women. **Proc. Nutr. Soc.**, Aberystwyth, v.65, p. 76-92, 2006.
- CASSIDY, A.; HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Isoflavones, lignans and stilbenes: origins, metabolism and potential importance to human health. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.80, p.1044-1062, 2000.
- CHAILLOU L.L.; NAZARENO, M.A. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.54, p.8397-8402, 2006.
- CHANCE, B. Effect of pH upon the reaction kinetics of the enzyme-substrate compounds of catalase. **J. Biol. Chem.**, v.194, n. 2, p.471-481, 1952.
- CHANCE, B.; OSHINO, N. Kinetics and mechanisms of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction. **Biochem. J.**, v.122, p.225-233, 1971.
- CHIEN, J.T.; HSIEH, H.C.; KAO, T.H.; CHEN, B.H. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. **Food Chem.**, Oxford, v.91, p.425-434, 2005.
- CHOMCZYNSKI P.; SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v.162, p.156-9, 1987.
- CHUNG, H.L.; YANG, L.; XU, J.Z.; YEUNG, S.Y.V.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food Chem.**, Oxford, v.90, p.735-741, 2005.

CIRIOLO, M.R.; FISKIN, K. DE MARTINO, A.; CORASANITI, M.T.; NISTICO, G.; RTILIO, G. Age-related changes in Cu, Zn superoxide dismutase, Se-dependent and -independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. **Mech. Ageing Dev.**, v.61, p.287-297, 1991.

COOKE, G.M. A review of the animal models used to investigate the health benefits of soy isoflavones. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.89, n.4, p.1215-1227, 2006.

COTTER, A. Genistein, appears to prevent early postmenopausal bone loss as effectively as hormone replacement therapy. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, p.346-351, 2003.

COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein, daidzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.41, p.1961-1967, 1993.

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, suppl.2, p.1486S-1491S, 1998.

CRESPY, V.; MORAND, C.; BESSON, C.; MANACH, C.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Quercetin, but not its glycosides is absorbed from the rat stomach. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, p.618-621, 2002.

CROUSE, J.R.^{3rd}; MORGAN, T.; TERRY, J.G.; ELLIS, J.; VITOLINS, M.; BURKE, G.L. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentration of lipids and lipoproteins. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.159, n.17, p.2070-2076, 1999.

DAVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOME B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, n.1, p.48-54, 2004.

DAVEY, M.W.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I.J.J.; STRAIN, J.J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J. Plant

- L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **J. Sci. Food Agric.**, v.80, p.825-860, 2000.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochem.**, Amsterdam, v.15, p.3-24, 1976.
- DIXON, R.A.; FERREIRA, D. Molecules of interest: genistein. **Phytochem.**, Amsterdam, v.60, p.205-211, 2002.
- DRABKIN, D.L.; AUSTIN, S.H. Spectrophotometric studies. II - Preparation from washed blood cells, nitric oxide hemoglobin and sulphmoglobin. **J. Biol. Chem.**, v.112, p.51-65, 1935.
- DRAPER, M.; CATSIMPOOLAS, N. Disulfide and sulfhydryl groups in glycinin. **Cereal Chem.**, v.55, p.16, 1978.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v.28, p.350-356, 1956.
- ELDRIDGE, A.C.; KWOLEK, W.F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.31, p.394-396, 1983.
- ERDMAN, J.W. Soy protein and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA. **Lipid Lipoprot. Metabolic.**, v.102, p.2555-2559, 2000.
- ERICKSON, D.R. **Practical handbook of soybean processing and utilization.** Saint Louis: AOCS Press, United Soybean Board, 1995. 584p.
- FAO/WHO. Food and agriculture organization of the United Nations. **FAO**, Rome, 1992. 140p.
- FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean isoflavones: Effects of processing and health benefits. **Food Rev. Inter.**, v.20, n.1, p.51-75, 2004.

- FARMER, E.H. Peroxidation in relation to olefinic structure. **Trans. Faraday Soc.**, v.42, p.228-236, 1946.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. **Food labeling: Health claims; soy protein and coronary heart disease**. October 26, 1999. Disponível em: <http://www.fda.gov/> Acesso em: 27 de setembro de 2001.
- FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assay. **Methods of Enzimology**, New York, v.105, p.93-104, 1984.
- FORSBERG, L.; DE FAIRE, U.; MORGENSTERN, R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.389, p.84-93, 2001.
- FORSTRON, J.W.; ZAKOWSKI, J.J.; TAPEL, A.L. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. **Biochem.**, v.17, n.13, p.2639-2644, 1978.
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, Washington DC, v.201, p.875-880, 1978.
- FRIDOVICK, I. Superoxido dismutase. **Adv. . Enzymol. Mol. Biol.**, v.58, p.61-76, 1986.
- FRIEDMAN, M.; BRANDON, D.L. Review: nutritional and health benefits of soy proteins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.3, p.1069-1086, 2001.
- FRITZ, K.L.; SEPPANEN, C.M.; KURZER, M.S.; CSALLANY, A.S. The *in vivo* antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. **Nutr. Res.**, v.23, p.479-487, 2003.
- GAETANI, G.F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A.M.; KIRKMAN, H.N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v.73, n.1, p.334-339, 1989.

- GALL, K. L.; OTWELL, W. S.; KOBURGUER, J. A.; APPLIEDORF, H. Effects of four cooking methods on the proximate, mineral and fatty acid composition of fish fillets. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 48, p. 1068–1074, 1983.
- GARCIA, M.C.; MARINA, M.L.; LABORDA, F.; TORRE, M. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chem.**, Oxford, v.62, n.3, p.325–331, 1998.
- GENOVESE, M.I.; BARBOSA, A.C.L.; PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M. Commercial Soy Protein Ingredients as Isoflavone Sources for Functional Foods. **Plant Foods Human Nutr.**, Dordrecht, v.62, p.53–58, 2007.
- GENOVESE, M.I.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybeans varieties. **Food Sci. Tech. Inter.**, v.11, n.3, p.205–211, 2005.
- GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Cienc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v.21, n.1, p.86–93, 2001a.
- GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Isoflavonas da soja: fatores que influem nos tipos e teores em alimentos. **Food Ingr.**, São Paulo, v.11, p.62–64, 2001b.
- GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.21, p.5987–5993, 2002.
- GRIFFITHS, H.R. ROS as signaling molecules in T cells - evidence for abnormal redox signaling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis. **Redox Rep.**, v.10, p.273–280, 2005.
- GRÜN, I.U.; ADHIKARI, K.; LI, C.; LI, Y.; LIN, B.; ZHANG, J.; FERNANDO, L.N. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.6, p.2839–2843, 2001.
- HALL III, C.A.; CUPPETT, S.L. Structure-activities of natural antioxidants. In: ARUOMA, O.I.; CUPPETT, S.L., editors. Antioxidant Methodology *in vivo* and *in vitro* concepts. Illinois: **AOCS PRESS**. p.141–172, 1997.

- HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidant: the need for *in vivo* markers of oxidative stress In: ARUOMA, O.I.; CUPPETT, S.L., editors. **Antioxidant Methodology *in vivo* and *in vitro* concepts**. Illinois: AOCS PRESS. p.1-22, 1997.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE J.M.C The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Mol. Aspects Med.**, v.8, n.2, p.89-193, 1985.
- HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr. Rev.**, New York, v.52, p.253-265, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2ed. Oxford: Clarendon Press, p.136-158, 1989.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M. **Free radicals in biology and medicine diseases**. 3ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 2004.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochem.**, Oxford, v.55, n.6, p.481-504, 2000.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruits pulps. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, n.8, p.2928-2935, 2005.
- HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars Hematol.**, v.26, n.4, p.277-285, 1989.
- HITZ, W.D.; CARLSON, T.J.; KERR, P.S.; SEBASTIAN, S.A. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose saccharide and phytic acid phenotype on soybean seeds. **Plant Physiol.**, v.128, p.650-660, 2002.
- HJELMELAND, L.M.; CHRAMBACH, A. Electrophoresis and electrofocusing in detergent containing media: a discussion of basic concepts. **Electrophoresis**, Weinheim, v.2, n.1, p.1-11, 1981.

- HO, Y.S.; HOWARD, A.J. Cloning and characterization of the rat glutathione-peroxidase gene. **FEBS LETTERS**, v.301, n.1, p.5-9, 1992.
- HODGSON, J.M.; CROFT, K.D.; PUDDEY, I.B.; MORI, T.A.; BEILIN, L.J. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein metabolism. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.7, p.664-669, 1996.
- HSU, C.; CHIU, W.; YEH, S. Effects of soy isoflavone supplementation on plasma glucose, lipids, and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. **Nutr. Res.**, v.23, p.67-75, 2003.
- HSU, C.S.; SHEN, W.W.; HSUEH, Y.M.; YEH, S.L. Soy isoflavone supplementation in postmenopausal women: effects on plasma lipids, antioxidant enzyme activities and bone density. **J. Reprod. Med.**, St. Louis, v.46, p.221-226, 2001.
- HU, B.; ESEN, A. Heterogeneity of soybean seed proteins: one dimensional electrophoretic profile of six different solubility fractions. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.29, p.497-501, 1981.
- HU, M. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods of Enzimology**, New York, v.233, p.380-385, 1994.
- HUTCHINS, A.M.; SLAVIN, J.; LAMPE, J.W. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.95, n.5, p.545-551, 1995.
- IYENGAR, R.B.; RAVESTEIN, P. New aspects of subunit structure of soybean glycinin. **Cereal Chem.**, Saint Paul, v.58, p.325-330, 1981.
- IZUMI, T.; PISKULA, M.K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, n.7, p.1695-1699, 2000.
- JONES, P.L.; KUCERA, G.; GORDON, H.; BOSS J.M. Cloning and characterization of the murine manganous superoxide dismutase-encoding gene. **Gene**, v.153, n.2, p.155-161, 1995.

- KAKADE, M.L.; SIMONS, N.; LIENER, I.E. An evaluation of natural vs synthetic substract for measuring the antitryptic of soybean samples. **Cereal Chem.**, Saint Paul, v.46, n.4, p.518-526, 1969.
- KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidant in fruits and vegetables – the millennium's health. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.36, p.703-725, 2001.
- KAWAKAMI, Y.; TSURUGASAKI, W.; NAKAMURA, S.; OSADA, K. Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavone aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. **J. Nutr. Biochem.**, v.16., p.205-212, 2005.
- KAWAKAMI, Y.; TSURUGASAKI, W.; YOSHIDA, Y.; IGARASHI, Y. NAKAMURA, S.; OSADA, K. Regulative actions of dietary soy isoflavone on biological antioxidative system and lipid metabolism in rats. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, p.1764-1768, 2004.
- KEILEN, D.; HARTREE, E.F. Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation in alcohols. **Biochem. J.**, v.39, p. 293-301, 1945.
- KIM, Y.H.; YOO, H.Y.; JUNG, G.; KIM, J.Y.; RHO, H.M. Isolation and analysis of the rat genomic sequence encoding Cu Zn superoxide-dismutase. **Gene**, v.133, n.2, p.267-271, 1993.
- KING, R.A. Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, p.1496S-1499S, 1998.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of soy proteins. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.56, p.242-258, 1979.
- KITAMURA, K., TAKAGI, T. & SHIBASAKI, K. Renaturation of soybean 11S globulin. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.40, p.1837-1844, 1976.
- KOGAN, M. Natural chemical in plant resistance to insects. **Iowa State J. Res.**, v.60, n.4, p.501-527, 1986.

- KOSSLAK, R. M.; JOSHI, R. S.; BOWEN, B. A; PAAREN, E. R. Strain-specific inhibition of nod gene induction in *Bradyrhizobium japonicum* by flavonoid compounds. **Appl. Envir. Microbiol.**, v.56, n.5, p.1333-1341, 1990.
- KUDOU, D.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.55, n.9, p.2227-2233, 1991.
- KULLING, S.E.; HONIG, D.M.; METZLER, M. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.6, p.3024-3033, 2001.
- KURZER, M.S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.17, p.353-381, 1997.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LEE, J.; RENITA, M.; FIORITTO, R.J.; MARTIN, S.K.St.; SCHWARTZ, S.J.; VODOVOTZ, Y. Isoflavone characterization and antioxidant of Ohio soybeans. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, p.2647-2651, 2004.
- LEE, S.; KIM, J.; MOON, H.; AHN, J.; CHUN, S.; JUNG, W.; LEE, O.; CHUNG, I. Analysis of isoflavones and phenolic compounds in Korean soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds of different seed weights. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, p.2751-2758, 2008.
- LEE, S.J.; YAN, W.; AHN, J.K.; CHUNG, M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Res.**, Amsterdam, v.81, p.181-192, 2003.
- LEI, M.-G.; REECK, G. R. Two dimensional electrophoretic analysis of the proteins of isolated soybean protein bodies and of the glycosylation of soybean proteins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.35, p.296-300, 1987.
- LIU, J.; CHANG, S.K.C.; WIESENBORN, D. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu *in vitro* and *in vivo*. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, p.2333-2340, 2005.

- LIU, K. **Soybean**: chemistry, technology and utilization. New York: Chapman & Hall, 1997. 532p.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T) (-delta delta Ct) method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.193, p.265-275, 1951.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.81, suppl 1, p.230S-242S, 2005.
- MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, New York, v.113, p.490-495, 1985.
- MASTERS, C.; CRANE, D. Isozymes and the micro organization of organellar structure and function. In: **Isozymes: Structure, Function, and Use in Biology and Medicine**. Wilwy-Liss, Inc., p.101-122, 1990.
- MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **J. Food Sci.**, Chicago, v.58, n.1, p.144-147, 1993.
- MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. **J. Food Sci.**, Chicago, v.54, n.3, p.602-605, 1989.
- MAYNE, S.T. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, p.933S-940S, 2003.
- McBRIDE, O.W.; MITCHELL, A.; LEE, B.J.; MULLENBACH, G.; HATFIELD, D. Gene for selenium-dependent glutathione peroxidase maps to human chromosomes 3, 21 and X. **BioFactors**, v.1, n.4, p.285-292, 1988.

- McCARTY, M.F. Isoflavones made simple - genistein's agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. **Med Hypoth.**, v.66, n.6, p.1093-1114, 2006.
- McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J.Biol.Chem.**, v.244, n.22, p.6049-6055, 1969.
- McVEIGH, B.L.; DILLINGHAM, B.L.; LAMPE, J.W.; DUNCAN, A.M. Effect of soy protein varying in isoflavone content on serum lipids in healthy young men. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.83, p.244-251, 2006.
- MEERA KHAN, P.; VERMA, C.; WIJNEN, L.M.M.; JAIRAJ, S. Red cell glutathione peroxidase (GPX1) variation in Afro-Jamaican, Asiatic Indian and Dutch populations: is the GPX1*2 allele of "Thomas" variant an African marker? **Hum. Genet.**, v.66, p.352-355, 1984.
- MESSINA, M.J. Legumes and soybean: overview of their nutritional profiles and health effects. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.70, p.439S-450, 1999.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.48, p.91, 1971.
- MIURA, E.M.Y.; BINOTTI, M.A.R.; CAMARGO, D.S.; MIZUBUTI, I.Y.; IDA, E.I. Avaliação biológica de linhagem de soja com baixa atividade de inibidores de tripsina. **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v.29, n.6, p. 1754-1758, 2000.
- MODESTO, Z.M.M.; SIQUEIRA, N.J.B. **Botânica**. São Paulo: EPU, 1981. 167p.
- MONTEIRO, M.R.P.; MOREIRA, M.A.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; PIRES, C.V. Avaliação da digestibilidade protéica de genótipos de soja com ausência e presença do inibidor de tripsina Kunitz e lipoxigenases. **Braz. J. Food Tech.**, v.6, n.1, p.99-107, 2003.
- MURPHY, P.A.; BARUA, K.; HAUCK, C.C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. **J. Chrom. B**, v.777, p.129-138, 2002.

- NAIM, M.; GESTETNER, B.; BONDI, A.; BIRK, Y. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.24, p.1174-1177, 1976.
- NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybean and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.83, n.3, p.635-650, 2000.
- NAKASHIMA H.; YAMAMOTO M.; GOTO K.; OSUMI T.; HASHIMOTO T.; ENDO, H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. **Gene**, v.79, n.2, p.279-288, 1989.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v.95, p.351-358, 1979.
- PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J.Lab.Clin.Med.**, v.70, n.1, p.158-169, 1967.
- PAN, Z.; TANGRATANAVALEE, W. Characteristics of soybean as affected by soaking conditions. **Lebensm. Wiss. U.- Technol.**, London, v.36, p. 143-151, 2003.
- PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Effect of storage temperature and water activity on the content and profile of isoflavones, antioxidant activity, and in vitro protein digestibility of soy protein isolates and defatted soy flours. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, p.6340-6346, 2005.
- PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Cien. Tecnol. Alim.**, Campinas, v.26, n.1, p.179-187, 2006.
- PISKULA, M.K.; YAMAKOSHI, J.; IWAI, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. **Fed. European Biochem. Soc. (FEBS)**, v.447, p.287-291, 1999.

- PISKULA, M.K. Soy isoflavone conjugation differs in fed and food-deprived rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1766-1771, 2000.
- PRATT, D.E.; DI PIETRO, C.; PORTER, W.L.; ZILLIKEN, F. Inhibition of *in vitro* microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. **J. Food Sci.**, Chicago, v.47, p.24-25, 1981.
- PROSKY, L.; ASP, N.G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J.W.; FURDA, I. Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and products: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.75, p.360-367, 1992.
- RAWEL, H.M.; CZAJKA, D.; HOHL, U.C.; KROLL, J. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. **Int. J. Biol. Macro.**, v.30, p.137-150, 2002.
- REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M.J.; RODRÍGUEZ-SEVILLA, M.D.; MATEOS-APARICIO, I. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybean. **Food Chem.**, Oxford, v.101, p.1216-1222, 2006.
- RICKERT, D.A.; MEYER, M.A.; MURPHY, P.A. Effect of extraction pH and temperature on isoflavone and saponin partitioning and profile during soy protein isolate production. **J. Food Sci.**, Chicago, v.69, n.8, p.623-631, 2004.
- RIMBACH, G.; WEINBERG, P.D.; PASCUAL-TERESA, S.; ALONSO, M.G.; EWINS, B.A.; TURNER, R.; MINIHANE, A.M.; BOTTING, N.; FAIRLEY, B.; MATSUGO, S.; UCHIDA, Y.; CASSIDY, A. Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1670, p.229-237, 2004.
- ROCHA, J.M.S. Aplicações de agentes tensioativos em biotecnologia. **Bol. Biotecnol.**, Lisboa, v.64, p.5-11, 1999.
- ROWLAND, L.R.; WISEMAN, H.; SANDERS, T.A.B.; ADLERCREUTZ, H.; BOWEY, E.A. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans:

- influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. **Nutr. Cancer**, Mahwah, v.36, p.27-32, 2000.
- RÜFER, C.E.; KULLING, S.E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.54, p.2926-2931, 2006.
- RUIZ-LARREA, M. B.; RUIZ-SANZ, J. I. Fitoestrógenos y salud. **Revisión Temática**. Disponível em: <http://www.antioxidantes.com.ar/Art211.htm>. Acesso em: 26 fev. 2007.
- RUIZ-LARREA, M.B.; MOHAN, A.R.; PAGANGA, G.; MILLER, N.J.; BOLWELL, G.P.; RICE-EVANS, C.A. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. **Free Rad. Res.**, London, v.26, n.1, p.63-70, 1997.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- SATHE, S.K.; LILLEY, G.G.; MASON, A.C.; WEAVER, C.M. High resolution sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (*Glycine max* L.) seed proteins. **Cereal Chem.**, St. Paul, v.64, n.6, p.380-384, 1987.
- SAURA-CALIXTO, F.; GARCIA-ALONSO, A.; GÖNI, I.; BRAVO, L. *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, p.3342-3347, 2000.
- SETCHELL, K.D.R. Phytoestrogens: The biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, suppl.3, p.1333S-1346S, 1998.
- SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B.E.; BRASHEAR, W.T.; KIRSCHNER, A.S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J.E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. **J. Nutr.**, Bethesda, v.131, p.1362S-1375S, 2001.
- SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; NECHEMIAS, L.Z.; BRASHEAR, W.T.; WOLFE, B.E.; KIRSCHNER, A.S.; HEUBI, J.E. Evidence for lack of absorption of soy

- isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.76, p.447-453, 2002.
- SETCHELL, K.D.R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, n.3, p.758S-767S, 1999.
- SETCHELL, K.D.R.; NECHEMIAS, L.Z.; CAI, J.; HEUBI, J.E. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in the early life. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, p.1453S-1461S, 1998.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.
- SGARBIERI, V.C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: SGARBIERI, V.C. **Alimentação e Nutrição - Fator de Saúde e Desenvolvimento**, São Paulo, p.250-261, 1987.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. Review. **Eur. J. Biochem.**, v.215, p.213-219, 1993.
- SIMONNE, A.H.; SMITH, M.; WEAVER, D.B.; VAIL, T.; BARNES, S.; WEI, C.I. Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame) during processing. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, p.6061-6069, 2000.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, New York, v.299, p.152-178, 1999.
- SOMEKAWA, Y.; CHIGUCHI, M.; ISHIBASHI, T.; ASO, T. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.97, n.1, p.109-115, 2001.

- SONG, L.; YAN, H.; CAI, D. Protective effects of soybean isoflavone against gamma-irradiation induced damages in mice. **J. Radiat. Res.**, v.47, n.2, p.157-167, 2006.
- SONG, T.; BARVA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P.A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, n.4, p.1475S-1479S, 1998.
- SONG, T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P.A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, p.1607-1610, 1999.
- SONG, T.; LEE, S.; MURPHY, P.A.; HENDRICH, S. Soy protein with or without isoflavones, soy germ and soy germ extract, and daidzein lessen plasma cholesterol levels in golden Syrian hamsters. **Exp. Biol. Med.**, v.228, p.1063-1068, 2003.
- SOUZA, G. VALLE, J.L.E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. **Bol. Soc. Bras. Cien. Tecnol. Alim.**, Campinas, v.34, n.2, p.61-69, 2000.
- STAJNER, D.; IGIC, R.; POPOVIC, B.M.; MELENCIC, D. Comparative study of antioxidant properties of wild growing and cultivated *Allium* species. **Phytother. Res.**, v.22, p.113-117, 2008.
- STEENSMA, A.; FAASSEN-PETERS, M.A.W.; NOTEBORN, H.P.J.M.; RIETJENS, I.M.C.M. Bioavailability of genistein and its glycoside genistin as measured in the portal vein of freely moving unanesthetized rats. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.54, p.8006-8012, 2006.
- STEINBRECHER, U.P.; ZHANG, H.; LOUGHEED, M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.9, n.2, p.155-168, 1990.
- SYKES, G.E.; GAYLER, K.R. Detection and characterization of a new beta-conglycinin from soybean seeds. **Arch Biochem Biophys.**, v.210, n.2, p.525-530, 1981.

- TACHIBANA, N.; MATSUMOTO, I.; FUKUI, K.; ARAI, S.; KATO, H.; ABE, K.; TAKAMATSU, K. Intake of soy protein isolate alters hepatic gene expression in rats. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, p.4253-4257, 2005.
- TAKAHASHI, R.; OHMORI, R.; KIOSE, C.; MOMIYAMA, Y.; OHSUZU, F.; KONDO, K. Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, p.4578-4582, 2005.
- TAYLOR, J.I.; GRACE, P.B.; BINGHAM, S.A. Optimization of conditions for the enzymatic hydrolysis of phytoestrogen conjugates in urine and plasma. **Anal. Biochem.**, v.341, p.220-229, 2005.
- TBCAUSP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 1998. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela/index.asp> Acesso em: 21 de outubro de 2006.
- THANH, V.H.; SHIBASAKI, K. β -conglycinin from soybean proteins: isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.490, p.370-384, 1977.
- THANH, V.H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds: a straightforward fractionation and their characterization. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.24, n.6, p.1117-1121, 1976.
- THANH, V.H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds: reversible and irreversible dissociation of β -conglycinin. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.27, p.805-809, 1979.
- THANH, V.H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds: subunit structure of β -conglycinin. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.26, p.692-695, 1978.
- TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.1184-1192, 1995.

- TURNER, N.J.; THOMSON, B.M.; SHAW, I.C. Bioactive isoflavones in functional foods: The importance of gut microflora on bioavailability. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n.6, p.204-213, 2003.
- TURNER, R.; BARON, T.; WOLFFRAM, S.; MINIHANE, A.M.; CASSIDY, A.; RIMBACH, G.; WEINBERG, P.D. Effect of circulating forms of soy isoflavones on the oxidation of low density lipoprotein. **Free Rad. Res.**, London, v.38, n.2, p.209-216, 2004.
- UNGAR, Y.; OSUNDAHUNSI, O.O.; SHIMONI, E. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, p.4394-4399, 2003.
- UTSUMI, S.; DAMODARAN, S.; KINSELLA, J.E. Heat-induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and β subunits of 7S. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.32, p.1406-1412, 1984.
- VILJANEN, K.; KIVIKARI, R.; HEINONEN, M. Protein-Lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, p.1104-1111, 2004.
- VISSER, A.; THOMAS, A. Review: soya protein products - their processing, functionality, and application aspects. **Food Rev. Int.**, Monticello, v.3, n.1/2, p.1-32, 1987.
- WANG, C.; MA, Q.; PAGADALA, S.; SHERRARD, M.S.; KRISHNAN, P.G. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.75, p.337-341, 1998.
- WANG, D.; WANG, L.; 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 Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). **Food Chem.**, Oxford, v.107, p.1421-1428, 2008.
- WANG, H.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.42, p.1666-1673, 1994a.

- WANG, H.; MURPHY, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.42, p.1674-1677, 1994b.
- WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, p.2377-2383, 1996.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods of Enzimology**, New York, v.77, p.325-333, 1981.
- WIEACKER, P.; MUELLER, C.R.; MAYEROVA, A.; GRZESCHIK, K.H.; ROPERS, H.H. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. **Ann. Genet.**, v.23, n.2, p.73-77, 1980.
- WOLF, W.J. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.18, p.969-976, 1970a.
- WOLF, W.J. Scanning electron microscopy of soybean protein bodies. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.47, p.107-108, 1970b.
- WOLF, W.J.; COWAN, J.C. **Soybeans as a food source**. London: Butterworths, 1971. 86p. (CRC monotopics series)
- WU, S.; MURPHY, P.A.; JONHSON, L.A.; FRATZKE, A.R.; REUBER, M.A. Pilot-plant fractionation of soybean glycinin and β -conglycinin. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.76, n.3, p.285-293, 1999.
- XU, X.; HARRIS, K.S.; WANG, H.; MURPHY, P.; HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends on gut microflora in women. **J. Nutr.**, Bethesda, v.125, p.2307-2315, 1995.
- YAMAUCHI F.; YAMAGISHI, T.; IWABUCHI, S. Molecular understanding of heat inducet phenomena of soybean proteins. **Food Rev. Int.**, London, v.7, p.283-322, 1981.
- YEN, G.; LAI, H. Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, p.7892-7900, 2003.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species--induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Res.**, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

ZHANG, Y.; HENDRICH, S.; MURPHY, P.A. Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, p.399-404, 2003.

ZHANG, Y.; WANG, G.J.; SONG, T.T.; MURPHY, P.A.; HENDRICH, S. Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, n.5, p.957-962, 1999.