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

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO PARA
OBTENÇÃO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA COM TEOR
AUMENTADO DE ISOFLAVONAS**

ANA CRISTINA LOPES BARBOSA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo
2004

Ana Cristina Lopes Barbosa

Estudo das Condições de Processamento para Obtenção de Isolado
Protéico de Soja com Teor Aumentado de Isoflavonas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Maria Inés Genovese
orientador/presidente

Prof. Titular Franco Maria Lajolo
1º examinador

Prof. Dr. Flávia Maria Netto
2º examinador

São Paulo, 15 de fevereiro de 2004.

Aprender é descobrir aquilo que você já sabe
Fazer é demonstrar que você o sabe
Ensinar é lembrar aos outros que eles sabem tanto quanto você
Somos todos aprendizes, fazedores, professores
Você ensina melhor aquilo que mais precisa aprender
(Richard Bach, in Ilusões)

Dedico este trabalho
Em especial, aos meus pais Miguel e Elizabeth
Aos meus irmãos Marcel, Caio, Agda e Junior
pelo incentivo enorme que tive em toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Sínceros agradecimentos aos meus pais, aos meus irmãos, e aos meus avôs pela cumplicidade, pelo apoio, pelo conforto 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 Profa. Maria Inés Genovese pela orientação, pelo seu exemplo, incentivo, dedicação, confiança, apoio e amizade. Creio que a confiança e amizade são os melhores presentes que podemos receber. Além da minha admiração por uma grande pesquisadora e mulher.

Agradeço a Cirlene e Daniella pela amizade eterna, sempre me incentivando e me dando ânimo.

Agradeço a Neuza e Lúcia pelas palavras sábias, pelo incentivo e principalmente pelo carinho.

Agradeço também aos professores do Departamento de Alimentos, Profa. Beatriz, Profa. Elizabeth, Prof. Eduardo, Prof. João Roberto, Prof. Franco Lajolo que em algum momento me brindaram com seu auxílio.

Agradeço aos meus professores que colaboraram na minha formação acadêmica Marcia, Elizeu, Leonardo, Valdir e Thaís, 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 Ana Lúcia do Ital (Campinas), que me encorajou a fazer a pós-graduação.

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

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, Ana Paula, Eliana, Giselli, Gracielli, Janaína, Jacqueline, João Paulo, Malu, Márcia, Marcinha, Maurício, Milana, Paola, Priscila, Ricardo, Rose, Tânia, Walter pela

solidariedade e a amizade, e também pelas discussões que muito contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

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

Por fim agradeço ao Nosso Pai Maior pela oportunidade da vida e de aprender. 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.

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

RESUMO

Os isolados protéicos de soja são utilizados como ingredientes em diversos alimentos e sua utilização vêm aumentando juntamente com o aumento das pesquisas sobre os metabólitos secundários da soja, as isoflavonas. Alguns efeitos benéficos vem sendo associados às isoflavonas, entre estes a sua ação antioxidante, a prevenção de câncer, doenças cardiovasculares e osteoporose. O objetivo deste estudo foi o de otimizar as condições de extração das isoflavonas e de suas formas conjugadas a partir da farinha desengordurada de soja, visando o preparo de isolado protéico de soja. Os resultados mostraram que a obtenção de isolados protéicos de soja com teor aumentado de isoflavonas depende da utilização de condições brandas de centrifugação para a separação do precipitado isoeletrico, assim como da utilização de água acidificada na sua lavagem. A presença de isoflavonas no isolado resulta de três fatores, o primeiro referindo-se à associação entre isoflavonas e proteínas através de interações hidrofóbicas, eletrostáticas, e pontes de hidrogênio; o segundo à menor solubilidade das isoflavonas presentes na farinha desengordurada de soja no pH isoeletrico; e o último ao processo de carregamento (físico) das isoflavonas pelas proteínas insolubilizadas.

PALAVRAS-CHAVE: isoflavonas, proteínas da soja, processo de obtenção de isolado protéico de soja.

SUMMARY

Soy protein isolates are used as ingredients in several food products and their use is increasing together with the increase of the researches on the secondary metabolites of soy, the isoflavones. Some beneficial effects have been associated to the isoflavones, among these their antioxidant action, prevention of cancer, cardiovascular diseases and osteoporosis. The objective of this study was to optimize the extraction conditions of the isoflavones from the defatted soy flour, seeking the preparation of soy protein isolates. The results showed that the obtention of soy protein isolates with increased content of isoflavones depends on the use of mild conditions of centrifugation for the separation of the isoelectric precipitate, as well as on the use of water acidified in the washing step. The presence of isoflavones in the isolates resulted from three factors, the first refers to the association between isoflavones and proteins through hydrophobic; and electrostatic interactions, and hydrogen bonding; the second to the decreased solubility of the isoflavones extracted from the defatted soy flour in the isoelectric pH; and the last to the carrying process (physical) of isoflavones by the precipitating proteins.

KEYWORDS: isoflavones, proteins, soy protein isolate, production

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estrutura química das isoflavonas	2
1.2. Absorção e metabolismo das isoflavonas	5
1.3. Efeitos biológicos das isoflavonas	7
1.4. Proteínas da soja	10
1.5. Efeito do processamento	11
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Umidade	15
3.2. Extração de proteínas a partir da farinha desengordurada de soja (FDS)	16
3.3. Análise de isoflavonas	16
3.3.1. Extração	16
3.3.2. Extração em fase sólida	17
3.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência	17
3.4. Determinação do conteúdo protéico	18
3.5. Determinação da solubilidade protéica	18
3.6. Eletroforese em condições dissociantes (SDS-PAGE)	19
3.7. Etapa de precipitação das proteínas da soja	20
3.8. Obtenção de isolado protéico de soja	20
3.9. Solubilidade das isoflavonas	23
3.10. β -glicosidases endógenas	23
3.11. Solubilização de proteínas e isoflavonas a partir de isolado protéico de soja (IPS) comercial	25
3.12. Análise dos resultados	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS)	26
4.2. Efeito da razão farinha:água sobre a eficiência de extração das proteínas a partir da farinha desengordurada de soja	29

4.3. Efeito do tempo e da temperatura sobre a eficiência de extração das isoflavonas e das proteínas em água	30
4.4. Efeito da força iônica sobre a eficiência de extração das isoflavonas e das proteínas	31
4.5. Efeito do pH sobre a eficiência de extração das isoflavonas e das proteínas	32
4.6. Efeito das condições de extração sobre o perfil de isoflavonas	34
4.7. Etapa de precipitação das proteínas da soja	39
4.8. Obtenção do isolado protéico de soja com teor aumentado de isoflavonas	41
4.9. Solubilidade das isoflavonas	53
4.10. Ação das β-glicosidases endógenas	56
4.11. Estudo da interação entre isoflavonas e proteínas	63
4.12. Proteínas da soja: fração 7S e 11S	79
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Parâmetros modificados durante as etapas de processamento na obtenção dos isolados protéicos de soja	21
TABELA 2	Teores de umidade, proteínas e isoflavonas da farinha desengordurada de soja	26
TABELA 3	Perfil de isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja, em MeOH 80%	27
TABELA 4	Perfil de isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em diferentes temperaturas	36
TABELA 5	Perfil de isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em diferentes forças iônicas	37
TABELA 6	Perfil de isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em diferentes pH	38
TABELA 7	Recuperação de isoflavonas e proteínas nos precipitados isoelétricos em pH 4, 4,5 e 5 a partir do extrato aquoso (pH 7) da farinha desengordurada de soja	39
TABELA 8	Razão das isoflavonas e proteínas precipitadas no pH 4, 4,5 e 5 a partir da solução aquosa da farinha desengordurada de soja	40
TABELA 9	Teores de umidade, proteínas e isoflavonas dos isolados protéicos de soja liofilizados	42
TABELA 10	Rendimento das etapas de obtenção dos isolados I, II e III (extração pH 7 à temperatura ambiente, variando-se o pH de precipitação), a partir de 100 g de farinha desengordurada de soja	43
TABELA 11	Rendimento das etapas de obtenção dos isolados IV e V (extração pH 7 à temperatura ambiente, variando-se as condições de centrifugação), a partir de 100 g de farinha desengordurada de soja	44

TABELA 12	Rendimento das etapas de obtenção dos isolados VI (extração pH 9 à temperatura ambiente), a partir de 100 g de farinha desengordurada de soja	45
TABELA 13	Rendimento das etapas de obtenção dos isolados VII (extração pH 9 a 55 °C), a partir de 100 g de farinha desengordurada de soja	45
TABELA 14	Perfil da solubilidade das isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja em diferentes pH	55
TABELA 15	Perfil das isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em tampão fosfato-citrato pH 5 a 45 °C e a 60 °C, na presença ou ausência do substrato <i>p</i> -NPG, por 3 horas	59
TABELA 16	Perfil das isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em tampão fosfato-citrato pH 7 na presença e na ausência de imidazol 10 mM a 45 °C, por 1 hora	60
TABELA 17	Perfil das isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em tampão fosfato-citrato pH 5 a 45 °C, em solução aquosa pH 7 a, 45 °C em solução aquosa pH 7 à temperatura ambiente, e em solução aquosa pH 9 a 55 °C, por 24 horas	61
TABELA 18	Teores de umidade, proteínas e isoflavonas do isolado protéico de soja comercial	63
TABELA 19	Perfil das isoflavonas extraídas a partir do isolado protéico de soja comercial em MeOH 80%	64
TABELA 20	Solubilização de isoflavonas e proteínas a partir de isolado protéico de soja em água, em diferentes pH, concentrações de NaCl, β -ME, SDS e Triton X-100	67
TABELA 21	Perfil das isoflavonas extraídas a partir de isolado protéico de soja comercial em soluções aquosas com pH 2 a 10	73
TABELA 22	Perfil das isoflavonas extraídas a partir de isolado protéico de soja comercial em água e solução de NaCl a 0,05 M, 0,2 M e 0,5M	75

TABELA 23	Perfil das isoflavonas do isolado protéico de soja comercial em SDS 0,1% e 1%, Triton X-100 0,1%, 0,5% e 1%, e β -ME 0,001M, 0,01M, 0,02M e 0,2M, no estudo da interação	77
TABELA 24	Teor de isoflavonas livres e associadas presentes no isolado protéico de soja comercial	78
TABELA 25	Análise densitométrica do perfil eletroforético das frações 7S e 11S extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em solução aquosa a 4 °C, 25 °C, 50 °C, em solução de NaCl 0,01M, 0,1M, 0,2M, 0,5M e 1,0M, e em solução aquosa pH7	84
TABELA 26	Análise densitométrica do perfil eletroforético das frações 7S e 11S extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em solução aquosa pH 2 a 10	86
TABELA 27	Análise densitométrica do perfil eletroforético das frações 7S e 11S solubilizadas a partir do isolado protéico de soja comercial nas seguintes soluções: água, solução aquosa pH 2 a 10, Triton X-100 0,5%, 0,1% e 1,0%, β -ME 0,001M, 0,01M, 0,02M e 0,2M, SDS 0,1% e 1%, NaCl 0,05 M, 0,2 M e 0,5M	87
TABELA 28	Análise densitométrica do perfil eletroforético das frações 7S e 11S extraídas a partir da farinha desengordurada de soja nas etapas de obtenção do isolado (laboratório), e do isolado comercial	89

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura geral da isoflavona e do estradiol	2
FIGURA 2	Estruturas das isoflavonas da soja	4
FIGURA 3	Esquema de obtenção do isolado protéico de soja no laboratório (esquerda) e na indústria (direita)	22
FIGURA 4	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	28
FIGURA 5	Rendimento da extração das proteínas da farinha desengordurada de soja em água na razão 1:10, 1:20 e 1:30 (m/v)	29
FIGURA 6	Efeito do tempo e da temperatura na extração de proteínas e isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja	30
FIGURA 7	Efeito da força iônica sobre a extração de proteínas e isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja	32
FIGURA 8	Efeito do pH sobre a extração de proteínas e isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja	33
FIGURA 9	Perfil da distribuição de isoflavonas nas etapas de obtenção dos isolados I, II, III, IV e V	47
FIGURA 10	Perfil da distribuição de isoflavonas nas etapas de obtenção dos isolados VI e VII	48
FIGURA 11	Perfil da distribuição das formas totais das isoflavonas (daidzeína, genisteína e gliciteína) nas etapas de obtenção dos isolados I, II, III, IV e V	51
FIGURA 12	Perfil da distribuição das formas totais das isoflavonas (daidzeína, genisteína e gliciteína) nas etapas de obtenção dos isolados VI e VII	52
FIGURA 13	Solubilidade das isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja em diferentes pH	54
FIGURA 14	Formação de <i>p</i> -nitrofenol a partir da farinha desengordurada de soja extraída em tampão fosfato-citrato pH 5, contendo 0,5 mM <i>p</i> -NPG, a 45 °C e a 60 °C	57

FIGURA 15	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 acetonitrila em fluxo de 1 mL/min	65
FIGURA 16	Extração de isoflavonas (%) por soluções aquosas em diferentes pH a partir da farinha desengordurada de soja e do isolado protéico de soja comercial	70
FIGURA 17	Extração de proteínas (%) por soluções aquosas em diferentes pH a partir da farinha desengordurada de soja e do isolado protéico de soja comercial (micro-Kjeldahl)	71
FIGURA 18	Rendimento protéico a partir da farinha desengordurada de soja determinado através dos métodos de Lowry e de micro-Kjeldahl	72
FIGURA 19	Perfil eletroforético dos extratos aquosos de farinha desengordurada de soja obtidos através de SDS-PAGE 12 %, em diferentes temperaturas e concentrações de NaCl	80
FIGURA 20	Perfil eletroforético dos extratos aquosos de farinha desengordurada de soja obtidos através de SDS-PAGE 12 %, em diferentes pH	80
FIGURA 21	Perfil eletroforético dos extratos aquosos de farinha desengordurada de soja obtidos através SDS-PAGE 12 %, em pH 7, em pH 4, em pH 4,5 e em pH 5	81
FIGURA 22	Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12 %) das proteínas presentes nas diversas etapas de obtenção dos isolados protéicos de soja	83
FIGURA 23	Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12 %) das proteínas solubilizadas a partir do isolado protéico de soja em solução aquosa em diferentes pH	81
FIGURA 24	Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12 %) das proteínas solubilizadas a partir do isolado protéico de soja, em diferentes soluções	82
FIGURA 25	Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12 %) das proteínas solubilizadas a partir do isolado protéico de soja, em água e em diferentes concentrações de NaCl	82

ABREVIATÓES

- ATP** – trifosfato de adenosina
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DAD** – (*Diode Array Detector*) detetor com arranjo de diodo
- FDS** – Farinha desengordurada de soja
- HCl** – Ácido clorídrico
- HPLC** – *High-Performance Liquid Chromatographic*
- IPS** – Isolado protéico de soja
- kDa** – kilo Dalton
- LDL** – lipoproteína de baixa densidade
- MeOH** – metanol
- NaCl** – cloreto de sódio
- NaOH** – hidróxido de sódio
- ODMA** – O-dimetilangolensina
- PA** – poliamida
- PAGE** – (*polyacrylamide gel electrophoresis*) eletroforese em gel de poliácridamida.
- pI** – ponto isoelétrico
- PTFE** – politetrafluoroetileno
- SDS** – (*sodium dodecyl sulfate*) dodecil sulfato de sódio.
- β-ME** – beta-mercaptoetanol
- p-NPG** – *p*-nitrofenol-β-D-glucopiranosídeo

1. INTRODUÇÃO

Tem-se observado no mundo inteiro a tendência ao uso de alimentos funcionais com a possibilidade de atuação na área da nutrição e saúde. Em geral, o termo funcional refere-se a alimentos e bebidas que apresentem benefícios à saúde, além da nutrição básica inerente (Hollingsworth, 1995).

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).

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). 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).

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. A proteína da soja possui uma das melhores composições de aminoácidos essenciais entre as proteínas de origem vegetal, com exceção dos aminoácidos sulfurados, os quais são limitantes na proteína, sendo comparáveis às proteínas de alta qualidade de origem animal. Além disso, o seu alto conteúdo de lisina possibilita

a suplementação e complementação das proteínas dos cereais (Bressani, 1981).

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, Food and Drug Administration (FDA) aprovou a alegação referente à diminuição de risco de doenças cardiovasculares associada ao consumo de 25 g de proteína de soja por dia (FDA, 1999).

Alguns estudos indicam que as isoflavonas seriam as responsáveis pelos efeitos clínicos da soja. Entre estes, Crouse *et al.* (1999) demonstraram que as proteínas isoladas de soja diminuíram os níveis de LDL-colesterol em seres humanos de forma proporcional ao seu conteúdo de isoflavonas.

1.1. Estrutura química das isoflavonas

A estrutura química das isoflavonas é muito semelhante à do estrógeno 17 β -estradiol (Figura 1), 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 1. Estrutura geral da isoflavona 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 2).

Agliconas:

genisteína

daidzeína

gliciteína

Glicosiladas:

β-glicosídeos

acetilglicosídeos

malonilglicosídeos

Figura 2. Estruturas das isoflavonas da soja.

A estrutura química das isoflavonas pode influenciar a atividade biológica, biodisponibilidade, e portanto o efeito fisiológico desses constituintes (Setchell & Cassidy, 1999).

1.2. Absorção e metabolismo das isoflavonas

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, que podem ser excretadas ou absorvidas e posteriormente metabolizadas em vários metabólitos específicos. A daidzeína é convertida nos seguintes metabólitos: equol, dehidrodaidzeína e O-dimetilangolensina (ODMA), e a genisteína é convertida no composto inativo *p*-etilfenol (Setchell *et al.*, 1984; Hutchins *et al.*, 1995; 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 é influenciada pela flora intestinal e por outros componentes da dieta (Cassidy *et al.*, 2000).

Assim como os estrógenos endógenos, as isoflavonas apresentam uma circulação enterohepática, e são secretadas na bile (Kurzer & Xu, 1997).

A absorção tem lugar em todo o intestino, possivelmente por difusão passiva não-iônica, e a conjugação das isoflavonas ao ácido glicurônico se dá principalmente no fígado e também ocasionalmente no intestino, durante a fase de absorção (Setchell *et al.*, 2002).

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).

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.

Ainda, a biodisponibilidade das isoflavonas pode ser influenciada pela forma de consumo da soja. Os produtos de soja fermentados (missô, natto e tempeh) apresentaram como forma principal as agliconas, enquanto os não-fermentados (soja e seus derivados, farinha, isolado protéico, concentrado protéico) apresentaram 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.

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 crescente. O interesse nas isoflavonas como componente benéfico da dieta tem dirigido a atenção para a população ocidental, levando as pessoas a aumentarem o consumo de soja e seus derivados.

As propriedades biológicas associadas com os fitoestrógenos causaram um aumento nas pesquisas sobre seu potencial na prevenção e/ou tratamento das doenças hormônio-dependentes.

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).

1.3. Efeitos biológicos das isoflavonas

Vários estudos *in vitro*, em modelos animais, em seres humanos, e epidemiológicos vêm evidenciando os efeitos biológicos das isoflavonas, entre eles, anticarcinogênico, antioxidante, hipocolesterolêmico, prevenção de osteoporose, doenças cardiovasculares e melhora dos sintomas da menopausa.

A atividade antioxidante das isoflavonas foi demonstrada em sistema *in vitro* e observou-se que o equol e a O-dimetilangolensina inibem a oxidação da LDL, em concentrações de 0,1 μM , 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 μM) (Hodgson *et al.*, 1996). Já Pratt & Birac (1979) demonstraram que a soja e seus derivados (farinha desengordurada, concentrado protéico e isolado protéico) possuíam atividade antioxidante, avaliada através da porcentagem de descoloração do β -caroteno.

Os fitoestrógenos encontrados na soja podem reduzir o risco de cânceres hormônio-dependentes e não-dependentes, tais como de pulmão, cólon, reto, estômago, mama e próstata. Assim, observou-se uma relação direta entre concentração de fitoestrógeno no plasma e na urina de mulheres japonesas, que consomem uma dieta tradicional, e a baixa incidência de câncer de mama, endométrio e ovário neste grupo (Adlercreutz *et al.*, 1991; Setchell & Cassidy, 1999).

A genisteína inibiu a proliferação de células normais e cancerosas, provavelmente através da inibição de uma ou mais

enzimas envolvidas na transdução de sinal, incluindo tirosina quinase (Akiyama *et al.*, 1987), quinase S6 ribossomal, quinase MAP, DNA topoisomerase II (Thorburn *et al.*, 1994; Linassier *et al.*, 1990; Liu, 1997). Estas enzimas atuam na regulação e controle do crescimento celular.

A redução do estrógeno endógeno leva a uma série de mudanças fisiológicas que resultam em sintomas como ondas de calor, vaginite atrófica, secura vaginal, e ainda contribui para o desenvolvimento da osteoporose e aumento do risco de doenças cardiovasculares (Kurzer & Xu, 1997). Experiências epidemiológicas e clínicas mostraram que a terapia com estrógeno ajuda a amenizar os sintomas da menopausa. Adlercreutz *et al.* (1992) sugeriram que uma dieta rica em fitoestrógeno, por possuir uma ação estrogênica fraca, explicaria a menor incidência de sintomas da menopausa em mulheres japonesas.

A deficiência do estrógeno foi associada também com alterações significativas do metabolismo lipoprotéico. A redução ou prevenção do aumento do colesterol sérico leva à redução do risco de doenças cardíacas (Kurzer & Xu, 1997; Setchell & Cassidy, 1999). A redução de 1 % do colesterol sérico reduziu em 2-3 % o risco de doenças cardíacas (Liu, 1997; Bingham *et al.*, 1998).

Quanto maior for o nível inicial do colesterol, maior será o efeito da proteína de soja em baixar o colesterol. Mesmo em pessoas com colesterol normal as isoflavonas da soja podem ajudar a reduzir o risco de doenças coronarianas (Setchell & Cassidy, 1999). Carroll & Kurowska (1995) observaram que o decréscimo do colesterol sangüíneo geralmente é maior para indivíduos hipercolesterolêmicos que normocolesterolêmicos.

Essa redução do colesterol e do risco de doenças cardiovasculares parece ocorrer pela ação das proteínas da soja, e/ou das isoflavonas, ou por outros fatores ainda desconhecidos.

Contudo, o efeito hipocolesterolêmico foi menor quando as isoflavonas foram removidas da proteína de soja por extração alcoólica, sugerindo que os componentes ativos da soja podem ser as isoflavonas (Gardner *et al.*, 2001).

Crouse *et al.* (1999) realizaram um estudo com 156 pessoas saudáveis (homens e mulheres) para identificar o(s) agente(s) responsáveis pelo efeito de diminuição do colesterol da soja, em indivíduos moderadamente hipercolesterolêmicos. As dietas diárias consistiam de 25 g de caseína ou 25 g de IPS contendo 3, 27, 37, ou 62 mg de isoflavonas. Os autores observaram o efeito dose-resposta das isoflavonas sobre os níveis de colesterol total e LDL. O IPS contendo 3 mg de isoflavonas (sujeito a extração prévia com etanol) não apresentou efeito significativo sobre as concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL.

O efeito benéfico da terapia de reposição hormonal é conhecido em relação à prevenção da osteoporose, portanto a ação estrogênica fraca das isoflavonas pode também prevenir a perda óssea (Cassidy *et al.*, 2000).

A grande maioria dos estudos foi realizada em ratas ovariectomizadas, e Ishimi *et al.* (2002) observaram que a genisteína inibiu os osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea.

Em estudos epidemiológicos, Somekawa *et al.* (2001) relataram uma correlação positiva entre consumo de isoflavonas (54,3 mg/dia) e densidade mineral óssea em mulheres japonesas (44 a 80 anos) na pós-menopausa, assim as mulheres que consumiam mais isoflavonas tinham alta densidade mineral óssea e menor incidência de osteoporose. Potter *et al.* (1998) observaram um aumento significativo na densidade mineral óssea na coluna lombar em mulheres na pós-menopausa e hipercolesterolêmicas que consumiram proteína de soja com alta concentração de

isoflavonas comparadas com o grupo com teor reduzido de isoflavonas.

1.4. Proteínas da soja

As proteínas da soja são conhecidas por sua heterogeneidade e podem ser classificadas quanto à solubilidade como globulinas, tendo como característica serem insolúveis em água em seu ponto isoelétrico (pI), mas solúveis em soluções salinas diluídas ou água em valores de pH acima ou abaixo de seu pI. As proteínas de soja também podem ser classificadas de acordo com seu comportamento na ultracentrifugação em tampão fosfato pH 7,6 e força iônica 0,5. A análise 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, 1970; Wolf & Cowan, 1971). As duas principais proteínas de reserva encontradas na soja são 7S (β -conglucina) e a 11S (glicina) (Thanh & Shibasaki, 1976; Liu, 1997), e estas corresponderam a quase a totalidade das proteínas presentes nos isolados protéicos.

A β -conglucina é a principal proteína da fração 7S, e corresponde a um trímero com 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).

A β -conglucina é heterogênea em relação à composição de subunidades, sendo encontrada em seis diferentes estruturas isômeras: B₁ ($\alpha' \beta \beta$); B₂ ($\alpha \beta \beta$); B₃ ($\alpha \alpha' \beta$); B₄ ($\alpha \alpha \beta$); B₅ ($\alpha \alpha \alpha'$) e B₆ ($\alpha \alpha \alpha$) (Thanh & Shibasaki, 1978).

A β -conglucina sofre um complicado fenômeno de associação-dissociação em resposta às mudanças do pH e força

iônica. Os seis isômeros são capazes de dimerizar reversivelmente em baixa força iônica ou na região de pH de 4,8 a 11. A forma resultante 9S é um superdímero de 2 trímeros um à frente do outro, formando um hexâmero (Thanh & Shibasaki, 1979).

A glicinina corresponde à globulina 11S. O modelo aceito da glicinina é um hexâmero com P.M. de 360 KDa (Iyengar & Ravestein, 1981), com doze unidades, sendo seis ácidas (P.M. 34.800 Da) e seis básicas (P.M. 19.600 Da), e das 6 subunidades ácidas, a subunidade A4 apresentam peptídeos maiores, ao redor de 45.000 Da. As subunidades ácidas (A) e básicas (B) se alternam formando anéis com seis subunidades. Os dois anéis (hexâmero) se combinariam superpondo-se um ao outro através de interações eletrostáticas e/ou pontes de hidrogênio (Badley *et al.*, 1975).

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).

1.5. Efeito do processamento

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).

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 em soja e derivados protéicos como farinha desengordurada, isolados,

concentrados 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. As combinações de opções para produzir os diversos produtos são ilimitadas.

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).

O concentrado protéico de soja é produzido a partir da farinha de soja, e apresenta no conteúdo total 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 de processamento, sendo que a tecnologia empregada no

processo de obtenção permite o desenvolvimento de funcionalidade específica, otimizada para cada uma das aplicações recomendadas, tais como, suplementos alimentares, panificação, produtos não-lácteos, entre outros.

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 (frações não-protéicas insolúveis) 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, 1970).

Os isolados protéicos de soja contêm teores reduzidos de isoflavonas em relação à farinha e ao grão de soja, como resultado da extração aquosa usada no seu processamento (Anderson & Wolf, 1995). Em relação ao perfil, as agliconas apresentaram-se em maior concentração que os glicosídeos desesterificados, e 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 (Wang & Murphy, 1996; Wang & Murphy, 1994a).

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, lingüiças, 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 gera problemas relacionados com a textura e com o aroma dos produtos (Kinsella, 1979).

A utilização de isolado protéico 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 um maior aproveitamento nas etapas de processamento, diminuindo as perdas das isoflavonas e conservando o conteúdo protéico.

Desta maneira, novos produtos alimentícios são gerados através do avanço dos conhecimentos científicos, relacionando dieta e saúde, aliados também 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. 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).

2. OBJETIVOS

- Otimizar as condições de extração das isoflavonas e de suas formas conjugadas a partir da farinha desengordurada de soja, visando o preparo de isolado protéico de soja com alto teor de isoflavonas.
- Determinar os fatores que influenciam o teor e perfil de isoflavonas de isolados protéicos de soja.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes 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). As amostras de farinhas desengorduradas de soja e isolados protéicos de soja foram fornecidos pela BUNGE ALIMENTOS S.A. (Esteio, Rio Grande do Sul). Após o recebimento, a farinha desengordura de soja (FDS) e o isolado protéico de soja (IPS) comercial foram armazenados no freezer (-18 °C), durante todo o período de estudo.

3.1. Umidade

A umidade da FDS e do IPS comercial foi determinada por dessecação em estufa a 105 °C até peso constante (AOAC, 1995). As análises foram realizadas em triplicata.

3.2. Extração de proteínas a partir da farinha desengordurada de soja (FDS)

A FDS foi extraída com agitador mecânico e barra magnética, em meio aquoso. Foram avaliados os seguintes parâmetros: razão farinha:solução extratora, tempo e temperatura de extração, e pH e força iônica da solução extratora sobre o rendimento de proteínas e isoflavonas. Os extratos obtidos foram centrifugados a 11.951 *g* por 30 min (4 °C), e o sobrenadante utilizado para a determinação do teor protéico, perfil eletroforético e isoflavonas. As extrações foram realizadas em triplicata.

3.3. Análise de isoflavonas

3.3.1. Extração

As amostras (farinhas e isolados) 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 0,22 µm de poro (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) para posterior análise por CLAE. As extrações foram realizadas em triplicata.

3.3.2. Extração em fase sólida

Os extratos obtidos em 3.2 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, E.U.A.). 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 0,22 µm de poro para análise por CLAE.

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.

3.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

A separação e quantificação das isoflavonas e de suas formas conjugadas foi realizada em coluna C18 NovaPak (Waters, Milford, E.U.A.) de acordo com o método de Song *et al.* (1998). O cromatógrafo líquido utilizado foi o da Hewlett Packard (Palo Alto, E.U.A.) série 1100, equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detetor com arranjo de diodos (DAD), controlado pelo software ChemStation. Alíquotas de 20 µL foram injetadas em fluxo de 1 mL/min, utilizando solvente A: 0,1 % ácido acético em água e solvente B: 0,1 % ácido acético em acetonitrila. O gradiente linear foi iniciado com 18 % do solvente B, passando

para 29 % em 15 minutos, para 32 % em 20 minutos, para 50 % em 25 minutos, atingindo 60 % em 26 minutos, decrescendo para 50 % em 27 minutos e 18 % em 35 minutos. A calibração foi realizada com os padrões de daidzeína e genisteína da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, E.U.A.), daidzina e genistina da Apin Chemicals Ltd. (Abingdon, Reino Unido), glicitina e gliciteína da Fujicco Co. Ltd. (Kyoto, Japão), 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 isoflavona por 100 g de amostra (b.u.), após normalização das diferenças de peso molecular das formas glicosiladas, feita multiplicando-se a massa de cada derivado pela razão entre o peso molecular da respectiva aglicona e o peso molecular da forma glicosilada, conforme Song *et al.* (1998).

3.4. Determinação do conteúdo protéico

As amostras de farinha e de isolado tiveram seu conteúdo protéico determinado através do método de micro-Kjeldahl ($N \times 6,25$) (AOAC, 1995), em triplicata. O teor protéico dos extratos 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, ou, quando indicado, pelo método de micro-Kjeldahl.

3.5. Determinação de solubilidade protéica

A solubilidade da FDS e do IPS comercial foi determinada a partir da extração de um grama de amostra em 20 mL de água destilada ou de solução extratora por 1 hora a 4 °C. A suspensão

foi então centrifugada (11.951 g/10 min a 4 °C) e o sobrenadante utilizado para determinação do seu teor protéico pelo método de micro-Kjeldahl ($N \times 6,25$) (AOAC, 1995). As análises foram realizadas em triplicata. A correlação entre a proteína total da amostra e a proteína contida no sobrenadante permite o cálculo de solubilidade, através da fórmula:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{P_s \times 100}{P_T}$$

onde:

P_s = proteína contida no sobrenadante

P_T = proteína total contida na amostra

3.6. 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).

3.7. Etapa de precipitação das proteínas da soja

A fim de determinar o melhor pH de precipitação, as proteínas foram extraídas a partir de 10 g de FDS em 200 mL de água destilada pH 7, com agitador mecânico e barra magnética, durante 1 hora a 4 °C. Os extratos foram centrifugados a 11.951 g/10 min (4 °C) e do sobrenadante foi retirada uma alíquota para a determinação do teor protéico, perfil eletroforético e isoflavonas e o restante foi dividido em 3 alíquotas de 50 mL às quais adicionou-se HCl 6N para precipitação protéica no pH 4, pH 4,5 e pH 5. As suspensões permaneceram em repouso por trinta minutos à temperatura ambiente e então foram centrifugadas (11.951 g/10 min a 4 °C), e o sobrenadante utilizado para a determinação do teor protéico, perfil eletroforético e isoflavonas. As análises foram realizadas em triplicata.

3.8. Obtenção de isolado protéico de soja

As proteínas foram extraídas em água a partir da FDS com agitador mecânico e barra magnética na proporção 1:20 (m/v) durante 1 hora. Ajustou-se a solução para pH 7 e para pH 9 com NaOH 4N, que foi mantido constante durante a extração, sendo que o pH foi verificado após as extrações. O extrato foi então centrifugado (16.274 g/20 min a 25 °C) e o sobrenadante (extrato total) teve seu volume medido e alíquotas retiradas para a determinação do teor protéico e de isoflavonas. A seguir, o extrato total teve seu pH ajustado para 4,5 por adição de HCl 6N. As proteínas formaram um precipitado de fácil decantação e o extrato permaneceu em repouso por trinta minutos à temperatura ambiente, após o qual foi centrifugado. Os precipitados ácidos foram lavados com água acidificada (pH 4,5) por 5 minutos sob

agitação, e centrifugados novamente. O sobrenadante obtido em pH 4,5 (soro ácido) e a água de lavagem tiveram os seus volumes medidos em proveta e alíquotas retiradas para a determinação do teor protéico e de isoflavonas. Os precipitados ácidos foram liofilizados e retirou-se uma alíquota para determinação do teor de sólidos. Os isolados protéicos obtidos após a liofilização foram armazenados no freezer para determinação do teor protéico e de isoflavonas. As extrações e as análises foram realizadas em triplicata. Foram preparados sete isolados (I a VII), e os parâmetros que foram modificados durante as etapas de processamento na obtenção dos isolados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros modificados durante as etapas de processamento na obtenção dos isolados protéicos de soja.

	pH	temperatura (°C)	centrifugação (g)	pH ppt	centrifugação (g)
Isolado I	7	26	16.274/20'	4,5	16.274/20'
Isolado II	7	24	16.274/20'	4,0	16.274/20'
Isolado III	7	22	16.274/20'	4,5	16.274/20'
Isolado IV	7	26	16.274/20'	4,5	162/2'
Isolado V	7	24	16.274/20'	4,5	162/1'
Isolado VI	9	24	16.274/20'	4,5	162/2'
Isolado VII	9	55	16.274/20'	4,5	162/2'

A Figura 3 mostra o esquema de obtenção de isolado protéico de soja no laboratório, e para efeito de comparação, na indústria.

Figura 3. Esquema de obtenção do isolado protéico de soja no laboratório (esquerda) e na indústria (direita).

* Segundo Liu (1997); Erickson (1995); FAO/WHO.

3.9. Solubilidade das isoflavonas

As isoflavonas foram extraídas a partir da FDS conforme 3.3.1. Após eliminação do metanol, os extratos obtidos foram passados em coluna de poliamida conforme descrito no item 3.3.2. Os eluatos foram evaporados sob vácuo a 40 °C até atingir o volume de 2 mL (exceto para o controle, obtido conforme 3.3.2). As amostras foram transferidas para béquer, com a ajuda de água destilada, de forma a obter-se um volume final de cerca de 5 mL. Cada amostra teve o pH ajustado para valores entre 2 e 10, ficando em repouso por 30 minutos, sendo então filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE de 0,22 µm de poro para balão volumétrico, e o volume completado com metanol (grau cromatográfico) para 10 mL. As amostras foram analisadas por CLAE. As extrações foram realizadas, para cada pH, em duplicata.

3.10. β-glicosidades endógenas

A determinação da atividade da β-glicosidase foi realizada de acordo com Matsuura *et al* (1995), utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenol-β-D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). A FDS (2 g) foi extraída em 40 mL de *p*-NPG 0,5 mM em tampão fosfato-citrato 0,1M pH 5, em banho sob agitação, em duas diferentes temperaturas. A primeira foi a 45 °C, temperatura ótima da enzima, e a outra foi a 60 °C, temperatura de inativação da enzima. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos seguintes tempos: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, e 120 minutos e adicionadas em tubos contendo 1 mL de solução de carbonato de sódio 0,625 M e 0,25 mL de tampão fosfato-citrato 0,1M pH 5. A coloração amarela, resultado da

liberação do *p*-nitrofenol em meio alcalino, foi determinada logo a seguir a 420 nm em espectrofotômetro modelo Ultrospec 2000 UV/ Visible (Amersham Biosciences, Cambridge, Reino Unido). O aparelho foi zerado com 1,0 mL de *p*-NPG 0,5 mM, 0,25 mL de tampão fosfato-citrato 0,1M pH 5 e 1 mL de solução de carbonato de sódio 0,625 M. O branco amostra consistiu de 1,0 mL do extrato de FDS em tampão fosfato-citrato 0,1M pH 5, 0,25 mL de tampão fosfato-citrato 0,1M pH 5 e 1 mL de solução de carbonato de sódio. A curva padrão foi preparada com 10 – 100 µL da solução de *p*-nitrofenol 0,5 mM em tampão fosfato-citrato 0,1M pH 5.

Em paralelo, a FDS foi extraída com as seguintes soluções:

- (1) tampão fosfato-citrato 0,1 M pH 5, na presença ou ausência do *p*-NPG 0,5 mM, a 45 °C e 60 °C, por 3 horas;
- (2) tampão fosfato-citrato 0,1 M pH 5 a 45 °C, por 24 horas;
- (3) solução aquosa pH 7 a 45 °C, por 24 horas;
- (4) solução aquosa pH 7 à temperatura ambiente, por 24 horas;
- (5) solução aquosa pH 9 a 55 °C, por 24 horas;
- (6) tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7 a 45 °C, na presença ou ausência do inibidor imidazol (Yeoh & Wee, 1994), na concentração de 10 mM, por 1 hora.

As extrações 4 e 5 foram realizadas nas mesmas condições de obtenção de IPS. As extrações foram realizadas na proporção 1:20 (m/v) e os extratos centrifugados a 11.951 *g*/20 min (25 °C). Os sobrenadantes foram analisados em relação ao teor e perfil das isoflavonas, conforme 3.3.2. As extrações foram realizadas em duplicata.

3.11. Solubilização de proteínas e isoflavonas a partir de isolado protéico de soja (IPS) comercial

A solubilização de proteínas e isoflavonas do IPS comercial por diversas soluções foi realizada utilizando-se a proporção IPS: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 variando de 2 a 10, soluções de NaCl 0,05 M, 0,2 M e 0,5 M, soluções de SDS 0,1 % e 1 %, soluções de Triton X-100 0,1 %, 0,5 % e 1 %, e soluções de β -ME 0,001 M, 0,01 M, 0,02 M e 0,2 M. As soluções de SDS, Triton X-100 e β -ME foram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7. A suspensão foi então centrifugada (11.951 g/10 min a 4 °C) e o sobrenadante analisado em relação ao teor protéico pelo método de micro-Kjeldahl, perfil eletroforético e teor e perfil das isoflavonas. As análises foram realizadas em triplicata.

3.12. Análise dos resultados

Os resultados foram analisados através da comparação das médias e desvios-padrões utilizando-se o programa Statistica versão 5.0 da StatSoft (Tulsa, E.U.A.). A comparação das médias foi realizada por análise de variância (ANOVA) e pelo teste LSD ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS).

A farinha desengordurada de soja foi caracterizada em relação aos teores de umidade, proteínas e isoflavonas, que são apresentados na Tabela 2. Os teores de umidade e proteínas corresponderam aos valores normalmente encontrados para esse produto. O teor de isoflavonas está dentro da faixa (156,5 a 203,2 mg/100 g) relatado por Genovese e Lajolo (2001a).

Tabela 2. Teores de umidade, proteínas e isoflavonas da farinha desengordurada de soja.

	Média $\pm$ DP
Umidade (g/100 g)	5,4 $\pm$ 0,2
Proteínas (g/100 g)	51,5 $\pm$ 0,2
Isoflavonas totais* (mg/100 g)	193 $\pm$ 3

* O teor de isoflavonas totais foi expresso como agliconas.

A Tabela 3 mostra o perfil da distribuição das isoflavonas observado na FDS (% de malonilglicosídeos, % de acetilglicosídeos, % de β -glicosídeos e % de agliconas), e a porcentagem total das três isoflavonas presentes (daidzeína, genisteína e gliciteína).

Tabela 3. Perfil de isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja, em MeOH 80 %.

	%
β -glicosídeos	43,4 $\pm$ 0,4
Malonilglicosídeos	46,8 $\pm$ 0,6
Acetilglicosídeos	4,1 $\pm$ 0,3
Agliconas	5,7 $\pm$ 0,4
<i>Daidzeína total</i>	37,3 $\pm$ 0,2
<i>Gliciteína total</i>	7,8 $\pm$ 0,1
<i>Genisteína total</i>	54,9 $\pm$ 0,2

Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3).

Os malonilglicosídeos e os β -glicosídeos foram os conjugados encontrados em maior proporção. Os resultados estão de acordo com Barnes *et al.* (1994), 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.

A Figura 4 mostra o cromatograma obtido através de CLAE referente à separação das isoflavonas da FDS.

Figura 4. 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.

Através do cromatograma foram detectados os seguintes compostos na FDS: daidzina, glicitina, malonildaidzina, malonilglicitina, genistina, acetildaidzina, malonilgenistina, daidzeína, gliciteína, acetilgenistina e genisteína. 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, acetildaidzina e daidzeína na variedade de soja Hutcherson. A diferença nos

resultados se deve, provavelmente, às baixas concentrações dessas formas.

Em seguida à caracterização da FDS foram analisadas as melhores condições de extração de isoflavonas e de proteínas visando à obtenção do isolado protéico de soja (IPS) com teor aumentado de isoflavonas.

4.2. Efeito da razão farinha:água sobre a eficiência de extração das proteínas a partir da farinha desengordurada de soja.

Inicialmente, foi determinada a melhor razão farinha:água (m/v) para a extração das proteínas a partir da FDS (Figura 5).

Figura 5. Rendimento da extração das proteínas da farinha desengordurada de soja em água na razão 1:10, 1:20 e 1:30 (m/v).

Não houve diferença significativa nas três razões analisadas (1:10, 1:20, 1:30), com uma média de 65 % das proteínas da FDS solubilizadas em água. A partir destes resultados, selecionou-se a razão 1:20 para as extrações posteriores.

4.3. Efeito do tempo e da temperatura sobre a eficiência de extração das isoflavonas e das proteínas em água.

Foram testados os tempos de extração de 1 e 3 horas e observou-se que, independente da temperatura utilizada (4, 25 ou 50 °C), o aumento do tempo não resultou em maior rendimento protéico (Figura 6). Já o aumento da temperatura proporcionou um aumento na eficiência de extração das proteínas, de 64 % a 4 °C para 88 % a 50 °C.

Figura 6. Efeito do tempo e da temperatura na extração de proteínas e isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja.

A seguir, usando-se o tempo de 1 hora de extração, determinou-se o efeito da temperatura sobre a extração das isoflavonas em meio aquoso. Ao contrário do observado para as proteínas, não houve diferença significativa entre as três temperaturas, tendo como média um rendimento de cerca de 76 % do total de isoflavonas contidas na FDS extraídas em meio aquoso.

Visto que a temperatura de extração não interfere no rendimento de isoflavonas, definiram-se como parâmetros de extração o tempo de 1 hora e a temperatura de 4 °C, já que a temperatura ambiente pode variar significativamente e a temperatura de 50 °C leva à alteração no perfil de isoflavonas, como posteriormente verificado.

4.4. Efeito da força iônica sobre a eficiência de extração das isoflavonas e das proteínas.

Utilizaram-se soluções de NaCl nas concentrações de 0,01 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,5 M e 1,0 M, e a extração foi realizada a 4 °C, em pH 7 por 1 hora. Na Figura 7 observa-se que forças iônicas entre 0,1 M e 0,2 M causam uma diminuição na extração tanto de proteínas como de isoflavonas, e quando se aumenta ou diminui a força iônica além dessa faixa, aumenta-se a porcentagem de extração de proteínas e de isoflavonas, atingindo-se um valor máximo em cerca de 0,5 M.

A maioria das proteínas segue o comportamento do chamado efeito "salting-in", onde para uma determinada temperatura e pH tem-se o aumento da solubilidade protéica com o aumento da concentração de sal, resultante do efeito do sal sobre as interações eletrostáticas, neutralizando os grupos com cargas na superfície das proteínas (Fennema, 1996).

Foi detectado por Iwabuchi & Yamauchi (1984) e Hermansson (1978) que concentrações salinas baixas (ao redor de 0,01 M de NaCl) causam aumento das interações hidrofóbicas, diminuindo a solubilidade protéica. O aumento da força iônica até 2,0 provoca aumento da solubilidade.

Figura 7. Efeito da força iônica sobre a extração de proteínas e isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja.

4.5. Efeito do pH sobre a eficiência de extração das isoflavonas e das proteínas.

A faixa de pH testada foi de 2 a 10, já que valores acima ou abaixo destes podem causar reações hidrolíticas. A Figura 8 mostra que na região próxima ao pH isoeletrico das proteínas ($pI \sim 4,5$) houve uma diminuição drástica da eficiência de extração das proteínas e a curva de isoflavonas acompanhou essa queda. A explicação para esse fato é que ao redor do pH isoeletrico a solubilidade é mínima, devido à falta de repulsão eletrostática,

promovendo assim a agregação e insolubilização via interações hidrofóbicas.

Valores acima ou abaixo do pI resultaram em maior eficiência de extração tanto de proteínas como de isoflavonas. No entanto, embora valores de pH acima de 7 tenham causado um aumento significativo do rendimento de proteínas, este não foi acompanhado de forma proporcional pelas isoflavonas, cujo rendimento foi de 81 % em pH 7 e 89 % em pH 10.

Figura 8. Efeito do pH sobre a extração de proteínas e isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja, sendo que os extratos básicos tiveram seus pH ajustados para 7 antes de passar pela coluna de poliamida.

Diante desses dados, pode-se concluir que as melhores condições para uma maior extração tanto de proteínas como de

isoflavonas foram o tempo de 1 hora, razão farinha:água (1:20 m/v), temperatura de 4 °C e pH de extração acima de 7.

4.6. Efeito das condições de extração sobre o perfil de isoflavonas.

As Tabelas 4 a 6 mostram a variação de distribuição das isoflavonas (% de malonilglicosídeos, % de acetilglicosídeos, % de β -glicosídeos e % de agliconas e a % das três agliconas presentes, daidzeína, genisteína e gliciteína) extraídas a partir da FDS em diferentes condições.

Na extração realizada à temperatura ambiente houve um pequeno aumento de agliconas, com diminuição proporcional de β -glicosídeos, em relação à extração realizada a 4 °C. Já a 50 °C, as isoflavonas na forma de agliconas corresponderam a 20 % do total extraído, com uma grande queda dos β -glicosídeos (Tabela 4). Pode-se observar ainda, que o aumento da temperatura não alterou a porcentagem de acetilglicosídeos nem a de malonilglicosídeos.

Wang *et al.* (1998) encontraram para a FDS 99 % das isoflavonas como glicosídeos. No presente trabalho, o valor encontrado foi 97 % para os glicosídeos na temperatura de 4 °C. Entretanto, os teores dos glicosídeos extraídos a 50 °C diminuem para 80 %, indicando portanto, que os glicosídeos presentes nos extratos a 4 °C e na temperatura ambiente foram hidrolisados nos extratos a 50 °C (Tabela 4).

Coward *et al.* (1998) e Kudou *et al.* (1991) reportaram que o perfil das isoflavonas depende da temperatura empregada durante o processamento dos produtos de soja. O calor causa a desesterificação dos conjugados malonilglicosídeos e acetilglicosídeos para os respectivos β -glicosídeos, porém isto foi

relatado para temperaturas acima da temperatura utilizada neste trabalho (50 °C). Coward *et al.* (1998) e Barnes *et al.* (1994) reportaram que durante a extração metanólica a 80 °C ocorria a conversão completa de malonilglicosídeos e acetilglicosídeos para β -glicosídeos.

O calor seco causa uma perda do dióxido de carbono (descarboxilação) dos malonilglicosídeos, levando à formação de quantidade substancial de acetilglicosídeos, como ocorre na tostagem de farinha ou na extrusão utilizada no processo de texturização (Coward *et al.*, 1993; Mahungu *et al.*, 1999). O calor úmido provoca a desesterificação dos malonilglicosídeos e acetilglicosídeos para os β -glicosídeos, utilizado no processamento de tofu e leite de soja (Grün *et al.*, 2001; Coward *et al.*, 1993). O calor úmido em temperaturas abaixo de 50 °C, também pode causar hidrólise dos β -glicosídeos com aumento das agliconas, pela ação das β -glicosidases endógenas, observado após o molho da soja, na primeira etapa de produção do leite de soja (Matsuura & Obata, 1993; Matsuura *et al.*, 1989).

Os resultados aqui obtidos indicam a ação das β -glicosidases endógenas, já que a FDS foi extraída em água e a temperatura empregada está na faixa de atividade da enzima (10 a 50 °C), conforme posteriormente verificado (item 4.10). No entanto, Mahungu *et al.* (1999) obtiveram um resultado inverso em condições onde a água do meio era limitante (processo de extrusão) e a temperatura empregada foi a de inativação da β -glicosidase, o que favoreceu, neste caso, a descarboxilação sobre a hidrólise.

Tabela 4. Perfil de isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em diferentes temperaturas.

	% de extração		
	4 °C	temp. amb.	50 °C
β-glicosídeos	38,5 ± 0,9 ^a	34,5 ± 0,5 ^b	19,2 ± 0,4 ^c
M glicosídeos	57 ± 1 ^d	57,3 ± 0,7 ^d	59,0 ± 0,4 ^d
Ac glicosídeos	1,5 ± 0,1 ^e	1,6 ± 0,1 ^e	1,9 ± 0,3 ^e
Agliconas	3,3 ± 0,1 ^f	6,5 ± 0,2 ^g	19,9 ± 0,6 ^h
<i>Daidzeína total</i>	39 ± 2 ^a	38 ± 1 ^a	34,4 ± 0,5 ^b
<i>Gliciteína total</i>	9 ± 2 ^c	9 ± 1 ^c	8,9 ± 0,7 ^c
<i>Genisteína total</i>	52 ± 3 ^d	53 ± 2 ^d	57 ± 1 ^e

Resultados na forma de média ± desvio-padrão (n=3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

A Tabela 5 mostra que a força iônica não influenciou o perfil das isoflavonas extraídas em meio aquoso nas concentrações de NaCl 0,01 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,5 M e 1,0 M.

Tabela 5. Perfil de isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em diferentes forças iônicas.

	% de extração				
	NaCl 0,01 M	NaCl 0,1 M	NaCl 0,2 M	NaCl 0,5 M	NaCl 1,0 M
β -glicosídeos	45 $\pm$ 2 ^a	40 $\pm$ 3 ^a	46 $\pm$ 1 ^a	44 $\pm$ 3 ^a	45 $\pm$ 1 ^a
M glicosídeos	49 $\pm$ 2 ^b	54 $\pm$ 1 ^c	50 $\pm$ 1 ^b	50 $\pm$ 2 ^b	49 $\pm$ 1 ^b
Ac glicosídeos	0,6 $\pm$ 0,2 ^c	0,4 $\pm$ 0,2 ^c	0,5 $\pm$ 0,1 ^c	0,6 $\pm$ 0,2 ^c	0,7 $\pm$ 0,1 ^c
Agliconas	4,5 $\pm$ 0,7 ^d	5,2 $\pm$ 0,4 ^d	3,7 $\pm$ 0,3 ^d	5 $\pm$ 1 ^d	5,4 $\pm$ 0,4 ^d
<i>Daidzeína total</i>	44 $\pm$ 3 ^a	47 $\pm$ 2 ^a	48 $\pm$ 1 ^a	46 $\pm$ 2 ^a	46 $\pm$ 4 ^a
<i>Gliciteína total</i>	8 $\pm$ 1 ^b	8 $\pm$ 1 ^b	8,0 $\pm$ 0,4 ^b	7,7 $\pm$ 0,5 ^b	8 $\pm$ 1 ^b
<i>Genisteína total</i>	47 $\pm$ 2 ^c	44 $\pm$ 2 ^c	44 $\pm$ 1 ^c	46 $\pm$ 2 ^c	46 $\pm$ 4 ^c

Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

Na Tabela 6, pode-se notar que nos pH básicos (pH 8 a 10), e abaixo de pH 4 têm-se o favorecimento da reação de desesterificação. As formas acetilglicosídeos e agliconas tiveram uma variação mínima. A isoflavona que aparece em maior proporção é a genisteína e a porcentagem de gliciteína foi maior entre os pH 3 a 5.

Tabela 6. Perfil de isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em diferentes pH.

	% de extração								
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
β -glicosídeos	44 ± 1^a	48 ± 1^b	$49 \pm 2^{b,d}$	44 ± 1^a	$46 \pm 1^{a,b}$	$45 \pm 2^{a,b}$	50 ± 1^d	51 ± 1^d	53 ± 1^d
M glicosídeos	46 ± 2^e	44 ± 1^e	43 ± 1^e	$50,2 \pm 0,3^f$	49 ± 1^f	50 ± 1^f	$43 \pm 2^{e,g}$	$42 \pm 2^{e,g}$	39 ± 1^g
Ac glicosídeos	$1,3 \pm 0,1^h$	$1,3 \pm 0,1^h$	$1,1 \pm 0,2^h$	$0,9 \pm 0,1^h$	$0,5 \pm 0,1^i$	$0,3 \pm 0,1^i$	$0,5 \pm 0,1^i$	$0,5 \pm 0,2^i$	$0,5 \pm 0,2^i$
Agliconas	$6,3 \pm 0,4^j$	$6,6 \pm 0,3^j$	$6,3 \pm 0,4^j$	$4,8 \pm 0,3^l$	$5,4 \pm 0,5^l$	$5 \pm 1^{j,l}$	$7 \pm 1^{j,m}$	$8 \pm 1^{j,m}$	$7 \pm 1^{j,m}$
<i>Daidzeína total</i>	39 ± 2^a	38 ± 1^a	42 ± 2^a	40 ± 2^a	40 ± 2^a	38 ± 3^a	38 ± 2^a	37 ± 4^a	36 ± 3^a
<i>Gliciteína total</i>	8 ± 1^b	12 ± 1^c	12 ± 1^c	12 ± 1^c	9 ± 1^b	7 ± 2^b	6 ± 1^b	6 ± 1^b	7 ± 1^b
<i>Genisteína total</i>	53 ± 3^d	47 ± 2^e	46 ± 2^e	48 ± 1^e	52 ± 2^d	55 ± 2^d	57 ± 3^d	57 ± 2^d	57 ± 3^d

Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3). n.d. não detectados. Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

4.7. Etapa de precipitação das proteínas da soja.

A segunda etapa no preparo dos isolados protéicos consiste da precipitação isoelétrica das proteínas extraídas em meio aquoso a partir da FDS. Os IPS comerciais são normalmente preparados através da extração da FDS em meio alcalino, utilizando pH entre 8 e 10, e da precipitação protéica em pH 4,5.

Com a finalidade de se obter a melhor relação entre isoflavonas e proteínas no IPS preparado a partir da FDS, foram testados os pH de precipitação 4, 4,5 e 5.

A Tabela 7 mostra o rendimento da precipitação das isoflavonas e proteínas nos pH 4, 4,5 e 5. A FDS contém 192,5 mg de isoflavonas/100 g e 51,5 % de proteína. O extrato aquoso obtido em pH 7 (1:20 m/v) apresentou um rendimento de 157,7 mg de isoflavonas e 34,9 g de proteína por 100 g de FDS. O precipitado obtido em pH 4 apresentou uma porcentagem maior de isoflavonas em relação ao pH 5, porém não foi significativamente diferente do rendimento obtido em pH 4,5. No entanto, em pH 4,5 o rendimento protéico foi significativamente maior.

Tabela 7. Recuperação de isoflavonas e proteínas nos precipitados isoelétricos em pH 4, 4,5 e 5 a partir do extrato aquoso (pH 7) da farinha desengordurada de soja.

		pH 4	pH 4,5	pH 5
Isoflavonas (%)	soro ácido	62 ± 3 ^a	67 ± 2 ^a	72 ± 2 ^b
	precipitado	38 ± 3 ^c	33 ± 2 ^c	28 ± 2 ^d
Proteínas (%)	soro ácido	15,5 ± 0,3 ^e	12,1 ± 0,2 ^f	19,0 ± 0,2 ^g
	precipitado	84,5 ± 0,3 ^h	87,9 ± 0,2 ⁱ	81,0 ± 0,2 ^j

Resultados na forma de média ± desvio-padrão (n=3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

A Tabela 8 apresenta a razão isoflavonas/ proteínas e mostra que o precipitado obtido em pH 4 foi o mais rico em isoflavonas, como resultado de uma quantidade menor de proteínas precipitadas em relação ao pH 4,5. Para efeito de comparação, a FDS apresenta uma razão de 374,8 mg de isoflavonas por 100 g de proteína, e o extrato aquoso (pH 7) de 451,9 mg de isoflavonas por 100 g de proteína.

Estes resultados mostram que há uma perda significativa de isoflavonas na etapa de precipitação.

Tabela 8. Razão das isoflavonas e proteínas precipitadas no pH 4, 4,5 e 5 a partir da solução aquosa da farinha desengordurada de soja.

	pH 4	pH 4,5	pH 5
soro ácido (mg isofl/100 g prot)	1821 ^a	2518 ^b	1715 ^c
precipitado (mg isofl/100 g prot)	200 ^d	170 ^e	130 ^f

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Assim, através desses dados, conclui-se que o pH 4,5 foi o melhor pH para a precipitação das proteínas associadas às isoflavonas.

4.8. Obtenção do isolado protéico de soja com teor aumentado de isoflavonas.

A partir dos resultados obtidos, sete diferentes IPS foram preparados sendo que, para cada um, algum parâmetro da etapa de processamento foi alterado, conforme segue:

Isolado I) 50 g farinha/1000 mL H₂O destilada/ pH 7 a 26 °C – primeira centrifugação a 16.274 g/20 min a 25 °C – precipitação pH 4,5 – centrifugação do soro ácido e da água de lavagem a 16.274 g/20 min a 25 °C.

Isolado II) 10 g farinha/200 mL H₂O destilada/ pH 7 a 24 °C – precipitação pH 4 – centrifugação do soro ácido e da água de lavagem a 16.274 g/20 min a 25 °C.

Isolado III) 10 g farinha/200 mL H₂O destilada/ pH 7 a 22 °C – precipitação pH 4,5 – centrifugação do soro ácido e da água de lavagem a 16.274 g/20 min a 25 °C.

Isolado IV) 10 g farinha/200 mL H₂O destilada/ pH 7 a 26 °C – precipitação pH 4,5 – centrifugação do soro ácido e da água de lavagem a 162 g/2 min a 25 °C.

Isolado V) 10 g farinha/200 mL H₂O destilada/ pH 7 a 24 °C – precipitação pH 4,5 – centrifugação do soro ácido e da água de lavagem a 162 g/1 min a 25 °C.

Isolado VI) 10 g farinha/200 mL H₂O destilada/ pH 9 a 24 °C – precipitação pH 4,5 – centrifugação do soro ácido e da água de lavagem a 162 g/2 min a 25 °C.

Isolado VII) 10 g farinha/200 mL H₂O destilada/ pH 9 a 55 °C – precipitação pH 4,5 – centrifugação do soro ácido e da água de lavagem a 162 g/2 min a 25 °C.

Os IPS liofilizados foram caracterizados em relação aos teores de umidade, proteínas, e isoflavonas (Tabela 9). Observou-

se que os produtos obtidos correspondem à definição de IPS, por apresentarem mais de 90 % de proteína (N x 6,25).

Os isolados I, II e III foram obtidos em condições mais rigorosas de centrifugação. Como os isolados obtidos industrialmente, antes de serem submetidos à secagem, apresentam consistência mais pastosa (~18 % de sólidos) do que estes (~50 % de sólidos), para os isolados IV, V, VI e VII foram utilizadas condições bem mais brandas de centrifugação. O objetivo foi verificar se a presença maior de soro ácido nos precipitados resultaria em conteúdo maior de isoflavonas. Assim, a Tabela 9 mostra que a utilização de centrifugação mais branda resultou em aumento de 52 a 80 % no conteúdo de isoflavonas nos isolados IV, V, VI e VII.

Tabela 9. Teores de umidade, proteínas e isoflavonas dos isolados protéicos de soja liofilizados.

	Isolado I	Isolado II	Isolado III	Isolado IV	Isolado V	Isolado VI	Isolado VII
Umidade (g/100 g)	1,8 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,7 ^a	2,0 ± 0,2 ^a	2,5 ± 0,4 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,4 ^a
Proteínas (g/100 g)	93,5 ± 0,5 ^b	91,2 ± 0,4 ^c	93 ± 2 ^{b,c}	92,5 ± 0,3 ^b	92,1 ± 1 ^b	90 ± 2 ^{b,c}	90,5 ± 0,5 ^c
Isoflavonas* (mg/100 g)	50 ± 4 ^d	50 ± 1 ^d	48 ± 2 ^d	80 ± 3 ^e	78 ± 2 ^e	76 ± 4 ^e	90 ± 1 ^f

Resultados na forma de média ± desvio-padrão (n=3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). * O teor de isoflavonas totais foi expresso como agliconas.

O rendimento do processo para a obtenção do IPS a partir da FDS variou de 27 a 35 % (m/m). Esse rendimento foi maior que o de 17,8 % obtido por Wang & Murphy (1996) e compatível com os

28,9 % obtidos por Wang *et al.* (1998). A diferença no rendimento é provavelmente decorrente de diferentes condições de extração utilizadas, como pH, temperatura, condições de precipitação e centrifugação.

O isolado I mostrou-se pobre em isoflavonas, com apenas 10 % do total extraído em pH 7, ficando a maior parte no soro ácido. O resultado se repetiu nos isolados II e III (9 %), e verificou-se que o pH de precipitação não influenciou o rendimento de isoflavonas (Tabela 10).

Tabela 10. Rendimento das etapas de obtenção dos isolados I, II e III (extração em pH 7 à temp. amb., variando-se o pH de precipitação), a partir de 100 g de farinha desengordurada de soja.

	isoflavonas (%)	proteínas (%)
Extrato pH 7	100	100
Soro ácido I (pH 4,5)	70 ± 2	13,5 ± 0,1
Isolado liofilizado I (pH 4,5)	10 ± 1	74,6 ± 0,2
H ₂ O lavagem I (pH 4,5)	6,1 ± 0,2	0,4 ± 0,1
Soro ácido II (pH 4)	67 ± 2	13,9 ± 0,1
Isolado liofilizado II	9,0 ± 0,2	67,7 ± 0,2
H ₂ O lavagem acidificada II	5,7 ± 0,5	0,3 ± 0,1
Soro ácido III (pH 4,5)	74 ± 2	12,8 ± 0,2
Isolado liofilizado III	8,7 ± 0,3	67 ± 1
H ₂ O lavagem acidificada III	5,1 ± 0,3	0,3 ± 0,2
Resultados na forma de média ± desvio-padrão (n=3).		

Nos isolados IV, V e VI obteve-se uma quantidade maior de isoflavonas (média de 17% do extrato total), ajustando-se o tempo e a velocidade de centrifugação (Tabela 11 e 12). Porém a centrifugação não alterou a quantidade de isoflavonas perdida no soro ácido. O pH de extração do isolado VI foi modificado para pH 9, resultando em maior porcentagem de extração de proteínas e isoflavonas, mas isso não se refletiu em uma maior quantidade de isoflavonas no isolado.

Tabela 11. Rendimento das etapas de obtenção dos isolados IV e V (extração em pH 7 à temp. amb., variando-se as condições de centrifugação), a partir de 100 g de farinha desengordurada de soja.

	isoflavonas (%)	proteínas (%)
Extrato pH 7	100	100
Soro ácido IV	72 ± 1	12,0 ± 0,3
Isolado liofilizado IV	15,6 ± 0,4	65,4 ± 0,2
H ₂ O lavagem acidificada IV	7,9 ± 0,3	1,3 ± 0,1
Soro ácido V	75 ± 3	10,7 ± 0,1
Isolado liofilizado V	19 ± 1	66,6 ± 0,6
H ₂ O lavagem acidificada V	9,6 ± 0,3	1,3 ± 0,1
Resultados na forma de média ± desvio-padrão (n=3).		

Tabela 12. Rendimento das etapas de obtenção do isolado VI (extração em pH 9 à temp. amb.), a partir de 100 g de farinha desengordurada de soja.

	isoflavonas (%)	proteínas (%)
Extrato pH 9	100	100
Soro ácido VI	78 ± 2	$9,9 \pm 0,6$
Isolado liofilizado VI	17 ± 1	67 ± 1
H ₂ O lavagem VI	$4,1 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3).		

No isolado VII, onde a extração foi realizada em pH 9 a 55 °C, obteve-se um isolado com uma grande quantidade de isoflavonas, 23 % do extrato total, e em relação aos primeiros isolados teve-se um aumento de 129 % do conteúdo de isoflavonas e uma redução de 30 % da sua perda no soro ácido (Tabela 13). Quanto às proteínas extraídas, houve um aumento significativo em relação à extração realizada em pH 9 à temperatura ambiente, confirmando os dados da Figura 6.

Tabela 13. Rendimento das etapas de obtenção do isolado VII (extração em pH 9 a 55 °C), a partir de 100 g de farinha desengordurada de soja.

	isoflavonas (%)	proteínas (%)
Extrato pH 9	100	100
Soro ácido VII	37 ± 4	8 ± 1
Isolado liofilizado VII	23 ± 1	65 ± 3
H ₂ O lavagem VII	$3,2 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$
Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3).		

Em todos os processos de obtenção de IPS observou-se uma perda de proteínas, em torno de 10 a 13 %, no soro ácido, e de

0,5 a 1 % na água de lavagem do precipitado. Observou-se uma maior porcentagem de proteínas solúveis em pH 9 em relação ao pH 7, porém não houve uma maior precipitação protéica, representando uma média de 66 % em relação ao extrato aquoso alcalino.

Na etapa de lavagem do precipitado houve uma perda de 3 a 8 % das isoflavonas, bem mais baixa que os 22 % relatados por Wang *et al.* (1998). As isoflavonas são solúveis em água e assim na etapa de lavagem do precipitado isoelétrico elas são perdidas, causando uma grande diminuição do teor final do isolado. A diferença no resultado nessa etapa do processo foi a utilização da água de lavagem acidificada (pH 4,5), pois em pH 4,5 temos uma diminuição da solubilidade das isoflavonas, como posteriormente observado (Figura 13).

O teor de isoflavonas encontrado nos primeiros isolados (48 a 80 mg/100 g) foi inferior ao obtido no isolado VII (90 mg/100 g). Tanto Wang *et al.* (1998) como Wang & Murphy (1996) encontraram teores maiores de isoflavonas em relação aos IPS obtidos neste trabalho, de 135 e 161mg/100 g em base seca, respectivamente. No entanto, o rendimento da obtenção dos isolados foi apenas 17,8 % para o isolado contendo 161 mg isoflavonas/100 g e 28,9 % para o isolado contendo 135 mg isoflavonas/100 g.

Assim, conclui-se que uma centrifugação mais branda para a separação do precipitado isoelétrico (162 g/2 min a 25 °C), pH 9 de extração, pH 4,5 de precipitação isoelétrica e a utilização de água acidificada na lavagem do precipitado foram as melhores condições de obtenção do IPS com teor aumentado de isoflavonas.

As Figuras a seguir apresentam o perfil das isoflavonas presentes nas diversas etapas de obtenção do IPS a partir da FDS.

Figura 9. Perfil da distribuição de isoflavonas nas etapas de obtenção dos isolados I, II, III, IV e V. Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

Figura 10. Perfil da distribuição de isoflavonas nas etapas de obtenção dos isolados VI e VII. Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

O extrato aquoso obtido em pH 7 (Figura 9) apresentou a maior porcentagem de malonilglicosídeos, e os extratos aquosos obtidos em pH 9 (Figura 10) em β -glicosídeos, pois em pH alcalino há o favorecimento da reação de desesterificação (Morrison & Boyd, 1981).

Os isolados I a VI apresentaram grande quantidade de agliconas (27 a 48 %), porém o isolado VII apresentou-se com baixo teor de agliconas, de apenas 15 %. Os IPS I a IV foram obtidos à temperatura ambiente e pH 7, onde se tem ação das β -glicosidases (Matsuura & Obata, 1993), que hidrolisam os β -glicosídeos transformando-os em agliconas, porém em pH 9 a 55 °C, condições usadas na obtenção do isolado VII, as β -glicosidases tem sua atividade muito reduzida.

Ao se comparar o perfil de isoflavonas da FDS (Tabela 2) com os isolados I a VII (Figuras 9 e 10) pode-se notar que os isolados apresentaram um conteúdo relativamente alto de agliconas, ratificando o trabalho de Wang *et al* (1998), que encontraram 2 % e 28 % de agliconas para farinha e isolado, respectivamente.

O soro ácido e a água de lavagem acidificada, ambos com pH 4,5, apresentaram o perfil de isoflavonas muito semelhante entre si, com teores altos de malonilglicosídeos e β -glicosídeos. No entanto, o soro ácido e a água de lavagem acidificada dos isolados extraídos em pH 9 apresentaram uma maior porcentagem de β -glicosídeos, enquanto as dos isolados extraídos em pH neutro apresentaram os malonilglicosídeos como principais conjugados (Figuras 9 e 10). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que o pH básico usado na extração favoreceu a reação de desesterificação, aumentando assim os β -glicosídeos.

Os acetilglicosídeos não aumentaram no processo de obtenção dos IPS, correspondendo a 1 a 2 % das isoflavonas, o que também foi reportado por Wang & Murphy (1996), pois os IPS

obtidos foram liofilizados e a produção desses conjugados parece estar relacionada ao calor seco. Na produção dos IPS comerciais o “spray-drying” é utilizado no processo de secagem do isolado, e os conjugados acetilglicosídeos são observados em maiores proporções (Wang & Murphy, 1994a).

Wang *et al.* (1998) no processamento do IPS obtiveram um perfil de isoflavonas semelhante entre o soro ácido e a água de lavagem, com alto conteúdo de malonilglicosídeos (75 e 78 %, respectivamente). No entanto, a porcentagem de β -glicosídeos apresentou-se muito reduzida (15 %), diferente do encontrado em nosso trabalho. Isso se deve ao fato de que os autores partiram de uma FDS com elevado conteúdo de malonilglicosídeos e provavelmente as condições brandas utilizadas no processamento do IPS não levaram à desesterificação.

As Figuras 11 e 12 apresentam o perfil da distribuição das formas totais das isoflavonas (daidzeína, genisteína e gliciteína) nas etapas de obtenção dos IPS I a VII.

Figura 11. Perfil da distribuição das formas totais de isoflavonas (daidzeína, gliciteína e genisteína) nas etapas de obtenção dos isolados I, II, III, IV e V.

Figura 12. Perfil da distribuição das formas totais de isoflavonas (daidzeína, gliciteína e genisteína) nas etapas de obtenção dos isolados VI e VII.

Os isolados apresentaram as 3 principais isoflavonas em proporção similar às encontradas na farinha, com maior proporção de genisteína, entre 59 e 64 % (Figuras 11 e 12).

Os soros ácidos I, II, III e VI apresentaram uma proporção diferente das três isoflavonas em relação à água de lavagem, com maior proporção de genisteína na água de lavagem, como observado por Wang *et al.* (1998). Além disso, observou-se uma proporção igual de genisteína e daidzeína nos soros ácidos I, II e III. Já os soros ácidos V, VI e VII apresentaram uma proporção das três isoflavonas igual em relação à água de lavagem.

O soro ácido, por outro lado, apresentou quantidade significativamente maior de daidzeína que o isolado e a farinha, indicando que esta seria preferencialmente perdida na obtenção do isolado, também observado por Wang *et al.* (1998). Uma explicação seria a natureza mais hidrofílica da daidzeína comparada com a genisteína (Coward *et al.*, 1993).

4.9. Solubilidade das isoflavonas.

Soluções aquosas das isoflavonas extraídas a partir da FDS tiveram o pH ajustado para valores entre 2 e 10. Após repouso e filtração, a fração solúvel foi analisada e os resultados mostrados na Figura 13.

Figura 13. Solubilidade das isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja em diferentes pH.

O controle (100% solúvel) corresponde à solução metanólica. Os resultados mostraram que as isoflavonas da FDS apresentaram alta solubilidade em solução aquosa em toda a faixa de pH analisada, exceto em valores entre 4 e 6. Essa faixa de pH corresponde também à faixa de menor solubilidade das proteínas da soja.

Em relação ao perfil das isoflavonas (Tabela 14), pode-se notar que com o aumento do pH a partir de 7, as formas malonilglicosídicas diminuíram com o aumento proporcional dos β -glicosídeos. As três principais isoflavonas mantiveram sua proporção nos diferentes pH.

Tabela 14. Perfil da solubilidade das isoflavonas a partir da farinha desengordurada de soja em diferentes pH.

	% de extração								
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
β -glicosídeos	38 ± 2^a	40 ± 1^a	40 ± 2^a	41 ± 2^a	41 ± 2^a	$43 \pm 2^{a,b}$	45 ± 2^b	51 ± 1^c	57 ± 2^d
Mglicosídeos	$51,8 \pm 0,4^e$	$50,8 \pm 0,6^e$	$50,6 \pm 0,5^e$	$49,2 \pm 0,8^e$	$50,3 \pm 0,8^e$	49 ± 1^e	47 ± 1^f	$42,3 \pm 0,7^g$	36 ± 2^h
Acglicosídeos	$1,3 \pm 0,1^i$	$1,4 \pm 0,1^i$	$1,5 \pm 0,1^i$	$1,5 \pm 0,1^i$	$1,4 \pm 0,1^i$	$1,2 \pm 0,2^i$	$1,3 \pm 0,1^i$	$0,3 \pm 0,1^j$	n.d.
Agliconas	$8,8 \pm 0,5^l$	$7,9 \pm 0,4^l$	$8,2 \pm 0,1^l$	$7,9 \pm 0,6^l$	$7,8 \pm 0,5^l$	$6,8 \pm 0,1^m$	$6,9 \pm 0,2^m$	$6,4 \pm 0,3^m$	$6,8 \pm 0,5^m$
<i>Daidzeína total</i>	38 ± 1^a	$38,6 \pm 0,4^a$	39 ± 2^a	40 ± 3^a	38 ± 4^a	39 ± 1^a	40 ± 5^a	41 ± 5^a	39 ± 3^a
<i>Gliciteína total</i>	$6,3 \pm 0,3^b$	$5,6 \pm 0,6^b$	$5,8 \pm 0,3^b$	6 ± 1^b	6 ± 1^b	$6,1 \pm 0,3^b$	$6,4 \pm 0,8^b$	$6,4 \pm 0,9^b$	$6,1 \pm 0,5^b$
<i>Genisteína total</i>	55 ± 2^c	$55,7 \pm 0,6^c$	56 ± 2^c	54 ± 4^c	55 ± 4^c	55 ± 2^c	54 ± 4^c	53 ± 3^c	55 ± 3^c

Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3). n.d. não detectados. Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

Estes resultados ajudam a explicar por quê os IPS apresentam conteúdo elevado de isoflavonas. Como a maioria das isoflavonas se encontra na forma glicosilada, isto resulta em uma elevada solubilidade em água, e estas são co-extraídas com as proteínas.

Durante a precipitação isoelétrica das proteínas, as isoflavonas poderiam ser simplesmente carreadas. No entanto, a etapa de lavagem ácida resultaria em sua eliminação quase completa se não houvesse essas outras interações (por exemplo hidrofóbicas) que as mantivessem ligadas às proteínas. A menor solubilidade das isoflavonas em pH ácido também colaboraria em sua retenção no precipitado.

4.10. Ação das β -glicosidases endógenas.

A partir dos experimentos de otimização da temperatura de extração de proteínas e isoflavonas da FDS foi observado que à temperatura de 50 °C havia diminuição dos β -glicosídeos e um aumento das agliconas em relação às demais temperaturas testadas (Tabela 4). Este fato indicou que poderia estar ocorrendo ação das β -glicosidases endógenas, visto que elas possuem atividade ótima em temperaturas elevadas (45 °C) e atuam na faixa de pH entre 3 e 7 (pH ótimo 5) (Matsuura *et al.*, 1995). Três isoformas da β -glicosidase (A, B e C) foram purificadas a partir dos cotilédones de soja (Matsuura & Obata, 1993; Matsuura *et al.*, 1995).

Para verificar se as β -glicosidases estariam agindo durante a extração aquosa da FDS, adicionou-se o substrato sintético específico *p*-nitrofenol- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG), e monitorou-

se o produto liberado, *p*-nitrofenol, na temperatura ótima da enzima (45 °C) e na temperatura de inativação (60 °C).

Os resultados (Figura 14) mostraram que as β -glicosidases atuaram sobre o substrato a 45 °C, com aumento de formação de *p*-nitrofenol com o tempo de extração. A 60 °C não houve formação do produto (*p*-nitrofenol), confirmando a inativação da enzima nessa temperatura.

Figura 14. Formação de *p*-nitrofenol a partir da farinha desengordurada de soja extraída em tampão fosfato-citrato pH 5, contendo 0,5 mM *p*-NPG, a 45 °C e a 60 °C.

Matsuura & Obata (1993) analisaram a atividade das β -glicosidases B e C adicionando *p*-NPG em tampão fosfato-citrato 0,1 M. A β -glicosidase B apresentou um pH ótimo a 5,5 e a β -glicosidase C a pH 5, porém ambas apresentaram atividade na faixa de pH entre 4,3 – 7,0. A temperatura ótima foi 45 °C e a de inativação de 60 °C para as β -glicosidases B e C, atuando na faixa de 10 °C a 55 °C. Matsuura *et al.* (1995) purificaram a

β -glicosidase C e encontraram um pH ótimo ao redor de 4,5 e temperatura ótima de 45 °C. A atividade da enzima foi observada na faixa de pH 3,5 – 7,0 e de temperatura entre 10 a 50 °C, sendo que 5 min a 60 °C foram suficientes para inativar completamente a enzima.

A Tabela 15 mostra o perfil das isoflavonas nos extratos aquosos obtidos a 45 °C e a 60 °C, na presença e na ausência do *p*-NPG. Observou-se que durante a extração a 45 °C as β -glicosidases atuaram hidrolisando os β -glicosídeos, que sofreram redução de cerca de 50 para 20 % das formas totais, enquanto as agliconas aumentaram de cerca de 9 % para 29 % do total, em relação à temperatura de inativação (60 °C). Os malonilglicosídeos tiveram uma diminuição na temperatura de 60 °C, quando comparados com 45 °C, provavelmente devido à instabilidade desses conjugados em temperaturas elevadas (Kudou *et al.*, 1991; Coward *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1994).

Quanto aos acetilglicosídeos, não houve uma variação significativa entre as temperaturas testadas e nem nas formas totais das isoflavonas (daidzeína, genisteína e gliciteína) a 45 °C e a 60 °C, na presença como na ausência do substrato *p*-NPG, sendo a genisteína a isoflavona em maior concentração.

Tabela 15. Perfil das isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em tampão fosfato-citrato 0,1 M pH 5 a 45 °C e a 60 °C, na presença ou ausência do substrato *p*-NPG, por 3 horas.

	% de extração			
	45 °C	45 °C/ <i>p</i> -NPG	60 °C	60 °C/ <i>p</i> -NPG
β-glicosídeos	22,2 ± 0,6 ^a	20 ± 1 ^a	47 ± 1 ^b	54,4 ± 0,8 ^c
Mg licosídeos	48,4 ± 0,7 ^d	49 ± 3 ^d	40,8 ± 0,6 ^e	38 ± 2 ^e
Ac glicosídeos	1,1 ± 0,2 ^f	1,0 ± 0,1 ^f	1,0 ± 0,1 ^f	1,0 ± 0,1 ^f
Agliconas	28 ± 1 ^g	30 ± 1 ^g	11 ± 1 ^h	7,0 ± 0,2 ⁱ
<i>Daidzeína total</i>	36 ± 1 ^a	40 ± 1 ^b	37 ± 1 ^a	40 ± 1 ^b
<i>Gliciteína total</i>	5,5 ± 0,4 ^c	5,0 ± 0,1 ^c	5,9 ± 0,8 ^c	6,5 ± 0,6 ^c
<i>Genisteína total</i>	58 ± 3 ^d	55 ± 1 ^d	58 ± 3 ^d	54 ± 1 ^d

Resultados na forma de média ± desvio-padrão (n=3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para o radical malonil e acetil, respectivamente.

A seguir, verificou-se a ação das β-glicosidases durante a extração aquosa a pH 7, na presença e na ausência de imidazol. A porcentagem de inibição da atividade das β-glicosidases de 3 diferentes plantas (*Manihot glaziovii*, *Passiflora foetida*, *Prunus polystachya*) pelo imidazol 5 mM variou de 33 a 80 % enquanto a da glucono-1,5-lactona, nessa mesma concentração, foi de 42 a 68 % (Yeoh & Wee, 1994). Nos extratos aquosos da FDS obtidos a 45 °C na presença do inibidor imidazol em concentração de 10 mM, encontrou-se um perfil dos conjugados com maior porcentagem de β-glicosídeos em relação ao extrato aquoso obtido a 45 °C sem inibidor (Tabela 16). As agliconas tiveram uma redução de 37 % na presença do inibidor, que provavelmente não foi maior por não se tratar de um inibidor específico das β-glicosidases da soja.

Matsuura *et al.* (1989) controlaram a hidrólise dos β -glicosídeos pelas β -glicosidases endógenas durante o molho da soja no processamento do leite de soja, adicionando na água glucono-1,5-lactona 0,5% (p/p), um inibidor competitivo específico das β -glicosidases da soja. A produção de daidzeína e genisteína foi inibida pela adição de glucono-1,5-lactona em cerca de 38 % e 55 %, respectivamente, após 8 horas de molho.

A porcentagem de malonilglicosídeos dos extratos a 45 °C (atuação das β -glicosidases) (Tabela 15) não diminuiu em relação ao extrato na presença do inibidor (Tabela 16) e também entre as temperaturas de 4 °C, 25 °C e 50 °C (Tabela 4), indicando que as β -glicosidases não atuam na molécula de açúcar ligada a um radical. As formas totais das isoflavonas, daidzeína, genisteína e gliciteína, não variaram.

Tabela 16. Perfil das isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordura de soja em tampão fosfato-citrato 0,05 M pH 7 na presença e ausência de imidazol 10 mM a 45°C, por 1 h.

	% de extração	
	tampão sem inibidor	tampão na presença do inibidor
β -glicosídeos	25,9 $\pm$ 0,4 ^a	36,8 $\pm$ 0,2 ^b
Malonilglicosídeos	55,5 $\pm$ 0,5 ^c	50,2 $\pm$ 0,8 ^d
Acetilglicosídeos	n.d.	n.d.
Agliconas	19 $\pm$ 1 ^e	13,0 $\pm$ 0,2 ^f
<i>Daidzeína total</i>	38 $\pm$ 1 ^a	35 $\pm$ 2 ^a
<i>Gliciteína total</i>	7 $\pm$ 1 ^b	8 $\pm$ 1 ^b
<i>Genisteína total</i>	55 $\pm$ 3 ^c	57 $\pm$ 2 ^c

Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3). n.d. não detectados. Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

Os extratos aquosos da FDS obtidos nas condições de preparo dos IPS também foram analisados quanto à atuação das β -glicosídeses. Para efeito de comparação, analisaram-se os extratos obtidos em água pH 7 a 45 °C, em tampão fosfato-citrato pH 5 a 45 °C, água pH 7 a 24 °C e água pH 9 a 55 °C (Tabela 17).

Tabela 17. Perfil das isoflavonas extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em tampão fosfato-citrato 0,1 M pH 5 a 45 °C, em solução aquosa pH 7 a 45 °C, em solução aquosa pH 7 à temperatura ambiente, e em solução aquosa pH 9 a 55 °C, por 24 h.

	% de extração			
	tampão pH 5/45 °C	água pH 7/45 °C	pH 7/ 24°C	pH 9/ 55 °C
β -glicosídeos	$4,7 \pm 0,9^a$	20 ± 1^b	$4,3 \pm 0,5^a$	$76,1 \pm 0,3^c$
M glicosídeos	70 ± 2^d	49 ± 3^e	61 ± 2^f	$16,4 \pm 0,5^g$
Ac glicosídeos	$1,1 \pm 0,2^h$	$1,0 \pm 0,1^h$	n.d.	n.d.
Agliconas	25 ± 1^i	30 ± 1^j	35 ± 1^l	$7,5 \pm 0,3^m$
<i>Daidzeína total</i>	46 ± 1^a	40 ± 4^a	42 ± 3^a	45 ± 1^a
<i>Gliciteína total</i>	10 ± 1^b	5 ± 1^c	9 ± 1^b	8 ± 1^b
<i>Genisteína total</i>	44 ± 1^d	55 ± 1^e	49 ± 2^f	47 ± 1^f

Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3). n.d. não detectados. Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

Nos extratos aquosos obtidos em pH 7 a 24 °C, em tampão pH 5 a 45 °C e em água pH 7 a 45 °C foi observado conteúdo elevado de agliconas e redução de β -glicosídeos, em relação aos extratos obtidos à temperatura de inativação (60 °C) (Tabela 15) e do extrato obtido na presença do inibidor (Tabela 16). Já em pH 9

a 55 °C não houve atuação das β -glicosidases, evidenciado pelo alto conteúdo de β -glicosídeos (76 %) e redução das agliconas. O conteúdo extremamente elevado de β -glicosídeos foi provavelmente devido à diminuição dos malonilglicosídeos, pois em pH básico há o favorecimento da reação de desesterificação (Morrison & Boyd, 1981), além do efeito da alta temperatura (Kudou *et al.*, 1991; Coward *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1994) (Tabela 17). O mesmo pode ser dito ao comparar-se os extratos aquosos (pH 7) obtidos a 24 °C e a 45 °C, onde o aumento da temperatura de extração foi acompanhado por diminuição dos malonilglicosídeos. No entanto, no extrato obtido em pH 5 observou-se alta proporção de malonilglicosídeos, indicando uma maior termoestabilidade desses compostos em pH ácido.

Os extratos da FDS em tampão pH 5 a 45 °C e água pH 7 a 45 °C não tiveram variação dos conjugados acetilglicosídeos e estes não foram detectados nos extratos a pH 7 a 24 °C e em pH 9 a 55 °C. Contudo, em relação às formas totais das isoflavonas, daidzeína, genisteína e gliciteína, os extratos da FDS obtidos em tampão pH 5 a 45 °C e em pH 9 a 55 °C apresentaram uma porcentagem equivalente de genisteína e de daidzeína, enquanto os extratos em água pH 7 a 45 °C e a 24 °C apresentaram genisteína em maior concentração (Tabela 17).

Pandjaitan *et al.* (2000) estudaram a hidrólise da isoflavona glicosídica genistina para sua correspondente aglicona genisteína e observaram que ocorria hidrólise completa de forma estequiométrica. Porém, esses resultados foram obtidos com as isoflavonas purificadas e as β -glicosidases purificadas foram adicionadas e incubadas na temperatura e pH ótimos (50 °C e pH 5, respectivamente). No entanto, os pesquisadores também notaram que embora a FDS contenha β -glicosidases endógenas, a conversão da genistina para genisteína foi menor na preparação do

concentrado protéico de soja sem adição da enzima exógena. Esses resultados confirmam os aqui obtidos, onde mesmo após 24 horas de extração as β -glicosidases endógenas não converteram todas as isoflavonas glicosídicas não esterificadas em agliconas (Tabela 17).

4.11. Estudo da interação entre isoflavonas e proteínas.

Para estudar possíveis interações entre proteínas e isoflavonas, utilizou-se um isolado protéico de soja comercial, cujos teores de umidade, proteínas, e isoflavonas são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Teores de umidade, proteínas e isoflavonas do isolado protéico de soja comercial.

	Média $\pm$ DP
Umidade (g/100 g)	3,5 $\pm$ 0,1
Proteínas (g/100 g)	94 $\pm$ 4
Isoflavonas totais* (mg/100g)	136 $\pm$ 4

* O teor de isoflavonas totais foi expresso como agliconas.

A Tabela 19 apresenta o perfil da 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 comercial, extraídas com MeOH 80 %.

Tabela 19. Perfil das isoflavonas extraídas a partir do isolado protéico de soja comercial em MeOH 80%.

	(%)
β -glicosídeos	$17,8 \pm 0,2$
Malonilglicosídeos	$40,2 \pm 0,2$
Acetilglicosídeos	$3,4 \pm 0,2$
Agliconas	$38,6 \pm 0,4$
<i>Daidzeína total</i>	26 ± 1
<i>Gliciteína total</i>	$5,8 \pm 0,8$
<i>Genisteína total</i>	68 ± 3

Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3).

O IPS comercial analisado apresentou um alto conteúdo de agliconas e de malonilglicosídeos (Tabela 19), assim como os IPS I a IV obtidos no laboratório (Figura 9). Das três isoflavonas presentes, a mais abundante foi a genisteína, assim como em todos os IPS obtidos no laboratório (Figuras 11 e 12).

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.

O cromatograma obtido por CLAE do IPS comercial mostrou que os maiores picos correspondem exatamente às agliconas e aos malonilglicosídeos, sendo que os três picos finais correspondem às três agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína), e os picos 3 e 5 a malonildaidzina e malonilgenistina, respectivamente (Figura 15).

Figura 15. 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 acetonitrila em fluxo de 1 mL/min. 1. daidzina, 2. glicitina, 3. malonildaidzina, 4. genistina, 5. malonilgenistina, 6. daidzeína, 7. gliciteína, 8. genisteína.

A Tabela 20 mostra a capacidade de diferentes meios extratores de solubilizar isoflavonas e proteínas a partir do IPS comercial. Através desta análise objetivou-se verificar eventuais interações entre isoflavonas e proteínas.

Os resultados mostraram maior solubilidade protéica em soluções aquosas a pH 8 a 10; solução de SDS 1 %; e em solução de β -ME 0,2 M (73 a 85 %). As isoflavonas, por outro lado, apresentaram maior solubilização em solução aquosa a pH 2 e 10 e soluções de Triton X-100 0,5 e 1 % (89 a 121 %). Na região de pH próximo ao ponto isoeletrico, observou-se redução significativa da solubilidade das isoflavonas, conforme anteriormente verificado (Figura 13).

Tabela 20. Solubilização de isoflavonas e proteínas a partir de isolado protéico de soja em água, em diferentes pH, concentrações de NaCl, β -ME, SDS e Triton X-100.

	Isoflavonas solúveis (%)	Proteínas solúveis (%)	Razão isoflavona total/ aglicona	Razão genisteína total/ daidzeína total	Isoflavonas/ proteínas solúveis (mg isofl/ 100g prot)
H ₂ O	70	57,6	2,6	2,7	174
pH 2	91	63,0	3,0	2,2	209
pH 3	45	32,0	2,0	2,1	205
pH 4	29	1,3	5,7	1,7	3173
pH 4,5	34	1,5	6,8	1,4	3350
pH 5	46	3,0	7,9	2,0	2251
pH 6	68	36,0	4,3	2,3	270
pH 7	77	55,4	3,2	3,1	200
pH 8	69	73,0	2,4	2,5	137
pH 9	72	75,0	2,0	2,6	138
pH 10	121	73,8	2,8	2,5	237
NaCl 0,05 M	71	29,8	4,8	2,1	344
NaCl 0,2 M	51	16,7	3,9	2,0	439
NaCl 0,5 M	51	16,1	4,2	1,9	455
SDS 0,1%	34	34,5	0,9	2,2	142
SDS 1%	57	85,5	1,1	2,1	97
Triton 0,1%	62	34,0	2,5	3,1	267
Triton 0,5%	89	33,2	3,1	3,0	386
Triton 1%	105	35,0	3,5	3,0	433
β -ME 0,001M	60	60,9	3,0	2,6	143
β -ME 0,01M	59	57,0	2,1	2,8	145
β -ME 0,02M	65	39,5	2,2	3,1	237
β -ME 0,2 M	67	74,0	2,1	2,6	131
IPS	136 mg/ 100g	94,3 g/ 100g	3,6	2,4	144

Em soluções de NaCl 0,2 M e 0,5 M as proteínas apresentaram valores de solubilidade extremamente baixos, e apenas cerca de 50 % das isoflavonas foram solubilizadas. Em solução de menor força iônica (NaCl 0,05 M) observou-se aumento de solubilização de proteínas, acompanhado de aumento de solubilização de isoflavonas, estas atingindo valores similares aos

obtidos em água. Nas regiões de pH extremos, 2 e 10, a maior solubilidade protéica também foi acompanhada pela maior solubilidade de isoflavonas.

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. O SDS 0,1 % solubilizou cerca de 35 % das proteínas e das isoflavonas presentes, aproximadamente a metade dos valores obtidos em água. O aumento da concentração de SDS resultou em aumento da solubilização de ambas, proteínas e isoflavonas, embora apenas as proteínas tenham atingido valores maiores que 85 % do total. O Triton, por sua vez, solubilizou cerca de 34 % das proteínas nas três concentrações analisadas (0,1 %, 0,5 % e 1 %), já as isoflavonas tiveram sua solubilização aumentada de 64 % a 105 % conforme aumentou-se a concentração do Triton.

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 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).

A razão entre o teor de isoflavonas e o de proteínas solúveis apresentada na Tabela 20 mostra que os três maiores valores, 3350, 3173, e 2251 mg isoflavonas/100 g proteínas, são devidos à baixa % de proteínas solúveis nos pH 4, 4,5 e 5, respectivamente. O menor valor correspondeu à solução de SDS 1 % (96,8 mg isoflavonas/100 g proteínas), que solubilizou uma grande quantidade de proteínas e apenas cerca de 57 % das isoflavonas totais.

Na Tabela 20 são apresentadas também as proporções entre as formas totais de genisteína e daidzeína extraídas pelas diferentes soluções. Pode-se observar que estas variaram entre 1,4 e 3,1, demonstrando solubilidade diferencial entre estas. Em geral, a genisteína correspondeu a cerca do dobro da daidzeína total extraída, exceto no pH isoelétrico, onde a proporção cai para 1,4, e nas soluções de Triton ($\sim 3,0$), β -Mercaptoetanol (2,6 a 3,1) e soluções aquosas com pH maior ou igual a 7 (2,5 a 3,1). Como observado através de CLAE em fase reversa, todos os derivados de genisteína (malonil, acetil e β -glicosídeos), e a própria genisteína, apresentam caráter mais apolar que os derivados de daidzeína e gliciteína. Dessa forma, poderia haver uma maior interação entre os derivados de genisteína e as proteínas, o que explicaria o fato de que soluções que provocam maior solubilização de proteínas também resultam em maior solubilização destas.

A maior razão isoflavonas totais/agliconas ocorreu nas soluções a pH 4, 4,5, 5, e 6, nas soluções de NaCl 0,2 M e 0,5 M, e na solução de Triton X-100 1 %. Os menores valores foram nas soluções de SDS 0,1 e 1 %, onde se obteve uma grande porcentagem de agliconas e baixa porcentagem de malonilglicosídeos.

Os resultados da eficiência de extração de isoflavonas e de proteínas nos diferentes pH analisados, tanto para a FDS como para o IPS comercial, foram resumidos nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

De modo geral, o perfil de extração de isoflavonas de acordo com o pH foi similar para a FDS e o IPS. Na extração aquosa em pH 2 e 10 obtiveram-se os maiores rendimentos de isoflavonas a partir do IPS comercial, já nos demais pH de extração (pH 3 a 9) os valores foram todos abaixo dos obtidos para a FDS (Figura 16).

Figura 16. Extração de isoflavonas (%) por soluções aquosas em diferentes pH a partir da farinha desengordurada de soja e do isolado protéico de soja comercial.

A Figura 17 mostra o rendimento de extração das proteínas determinado pelo método de micro-Kjeldahl. Assim como observado para as isoflavonas, os perfis obtidos para a FDS e o IPS foram similares entre si. No entanto, observou-se uma maior solubilização das proteínas a partir da farinha em relação ao isolado. Isto pode estar associado ao processo de “spray-drying” ao qual os isolados comerciais são submetidos.

Figura 17. Extração de proteínas (%) por soluções aquosas em diferentes pH a partir da farinha desengordurada e do isolado protéico de soja comercial (micro-Kjeldahl).

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos através de dois diferentes métodos para a determinação de proteínas solúveis, método de Lowry *et al.* (1951) e micro-Kjeldahl (item 3.4). Embora a variação de solubilidade em função do pH seja similar medido pelos dois métodos, o de Lowry *et al.* (1951) apresentou valores significativamente superiores. No método de Lowry *et al.* (1951) os compostos fenólicos também reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu, levando a uma superestimação do conteúdo protéico (Harris & Angal, 1989).

Figura 18. Rendimento protéico a partir da farinha desengordurada de soja determinado através dos métodos de Lowry e de micro-Kjeldahl.

A Tabela 21 mostra o perfil das isoflavonas do IPS comercial solubilizadas em soluções aquosas nos pH 2 a 10, a Tabela 22 em água e em soluções salinas (NaCl 0,05 M; 0,2 M e 0,5 M), e a Tabela 23 em soluções de SDS 0,1% e 1%, Triton X-100 0,1 %, 0,5 % e 1 %, e β -mercaptoetanol 0,001 M, 0,01 M, 0,02 M, e 0,2 M.

Tabela 20. Perfil das isoflavonas extraídas a partir de isolado protéico de soja comercial em soluções aquosas com pH 2 a 10.

	% de extração									
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 4,5	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
β -glicosídeos	22 $\pm$ 1 ^a	33 $\pm$ 2 ^{b,d}	43 $\pm$ 2 ^c	40 $\pm$ 2 ^c	36 $\pm$ 1 ^d	32 $\pm$ 2 ^b	27 $\pm$ 3 ^b	31 $\pm$ 2 ^b	30 $\pm$ 2 ^b	32 $\pm$ 2 ^b
Mglicosídeos	43 $\pm$ 1 ^e	34 $\pm$ 1 ^f	38 $\pm$ 1 ^g	44 $\pm$ 1 ^e	51 $\pm$ 1 ^h	46 $\pm$ 4 ^{e,h}	40 $\pm$ 2 ^e	30 $\pm$ 3 ^f	19 $\pm$ 4 ⁱ	21 $\pm$ 1 ⁱ
Acglicosídeos	1,5 $\pm$ 0,1 ^j	1,6 $\pm$ 0,4 ^j	0,9 $\pm$ 0,3 ^j	0,7 $\pm$ 0,3 ^j	0,8 $\pm$ 0,5 ^j	0,7 $\pm$ 0,5 ^j	2 $\pm$ 1 ^j	0,6 $\pm$ 0,6 ^j	0,8 $\pm$ 0,3 ^j	1,4 $\pm$ 0,2 ^j
Agliconas	34 $\pm$ 1 ^l	31 $\pm$ 2 ^l	18 $\pm$ 1 ^m	15 $\pm$ 1 ⁿ	13 $\pm$ 1 ⁿ	22 $\pm$ 1 ^o	31 $\pm$ 2 ^l	39 $\pm$ 1 ^p	50 $\pm$ 4 ^q	45 $\pm$ 2 ^q
<i>Daidzeína total</i>	28 $\pm$ 2 ^a	30 $\pm$ 2 ^a	38 $\pm$ 1 ^b	33 $\pm$ 3 ^a	30 $\pm$ 2 ^a	29 $\pm$ 1 ^a	23 $\pm$ 2 ^c	26 $\pm$ 3 ^a	25 $\pm$ 3 ^{a,c}	27 $\pm$ 3 ^a
<i>Gliciteína total</i>	9 $\pm$ 1 ^d	9 $\pm$ 1 ^d	8 $\pm$ 1 ^{d,e}	10 $\pm$ 1 ^d	10 $\pm$ 1 ^d	7 $\pm$ 1 ^e	5 $\pm$ 2 ^e	8 $\pm$ 1 ^{d,e}	10 $\pm$ 1 ^d	4 $\pm$ 3 ^e
<i>Genisteína total</i>	62 $\pm$ 3 ^f	62 $\pm$ 3 ^f	54 $\pm$ 1 ^g	56 $\pm$ 1 ^g	60 $\pm$ 3 ^f	65 $\pm$ 2 ^f	72 $\pm$ 2 ^h	66 $\pm$ 4 ^{f,h}	66 $\pm$ 5 ^{f,h}	68 $\pm$ 3 ^{f,h}

Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

O perfil das isoflavonas do IPS comercial solubilizadas em soluções aquosas com pH entre 2 e 10 mostrou-se muito variado (Tabela 21). Nos extratos aquosos pH 4 e 4,5 observou-se uma diminuição das agliconas com aumento proporcional dos β -glicosídeos, e nos pH 5 e 6 têm-se também uma diminuição das agliconas, mas com aumento proporcional dos malonilglicosídeos. Pode-se concluir que as agliconas são pouco solúveis entre os pH 4 a 6, em relação à quantidade solúvel em água e em extrato metanólico (36 e 38 %, respectivamente). Esses resultados indicam que a solubilização das agliconas está mais associada à solubilização protéica.

Os malonilglicosídeos tiveram uma diminuição nos extratos alcalinos (pH > 7), com aumento proporcional das agliconas. O extrato aquoso pH 3 diferiu de qualquer outro valor de pH, pois apresentou uma proporção média de 33 % entre os β -glicosídeos, malonilglicosídeos e agliconas.

Quanto aos acetilglicosídeos, não houve uma variação significativa entre os pH analisados. As formas totais das isoflavonas apresentaram uma pequena variação, com uma diminuição de genisteína e aumento de daidzeína nos pH 4 e 4,5. No entanto, a genisteína foi a isoflavona que se apresentou em maior proporção em todos os pH.

Na Tabela 22 observa-se o perfil das isoflavonas do IPS comercial solubilizadas em água e em soluções de NaCl a 0,05 M, 0,2 M e 0,5 M.

Tabela 22. Perfil das isoflavonas extraídas a partir de isolado protéico de soja comercial em água e solução de NaCl a 0,05 M, 0,2 M e 0,5 M.

	% de extração			
	H ₂ O	0,05M	0,2M	0,5M
β-glicosídeos	29 ± 2 ^a	29 ± 1 ^a	29 ± 2 ^a	32 ± 2 ^a
Malonilglicosídeos	34 ± 4 ^b	50 ± 2 ^c	53 ± 1 ^c	51 ± 2 ^c
Acetilglicosídeos	1,2 ± 0,3 ^d	0,8 ± 0,3 ^d	0,7 ± 0,5 ^d	0,8 ± 0,5 ^d
Agliconas	36 ± 3 ^e	20 ± 1 ^f	18 ± 2 ^f	16 ± 3 ^f
<i>Daidzeína total</i>	26 ± 1 ^a	31 ± 1 ^b	31 ± 1 ^b	32 ± 1 ^b
<i>Gliciteína total</i>	5 ± 1 ^c	5 ± 1 ^c	6 ± 1 ^c	6 ± 1 ^c
<i>Genisteína total</i>	69 ± 1 ^d	64 ± 1 ^c	63 ± 3 ^e	62 ± 2 ^e

Resultados na forma de média ± desvio-padrão (n=3). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

Pode-se observar que a proporção de β-glicosídeos (29 % do total) solubilizados em solução salina não se diferenciou em relação ao extrato aquoso. No entanto, os malonilglicosídeos apresentaram-se em proporção (~51 %) muito maior em soluções salinas do que em água, enquanto as agliconas tiveram uma redução significativa. Quanto aos acetilglicosídeos, não houve uma variação significativa em relação ao extrato aquoso.

Esses resultados mostram que os malonilglicosídeos estariam associados às proteínas através de interações eletrostáticas com os aminoácidos básicos.

A genisteína e seus derivados em água apareceram numa concentração levemente maior do que em soluções salinas.

Os perfis das isoflavonas do IPS comercial solubilizadas na presença do agente redutor β-mercaptoetanol 0,001 M, 0,01 M,

0,02 M e 0,2 M, do detergente aniônico SDS 0,1 % e 1 %, e do detergente não-iônico Triton X-100 0,1 %, 0,5 % e 1 % foram comparados entre si (Tabela 23) e em relação à solução aquosa (Tabela 22).

A porcentagem de β -glicosídeos (aproximadamente 30 %) presente nas soluções de β -ME e dos detergentes aniônicos e não-iônicos foi similar à do extrato aquoso, exceto para o SDS 0,1 %, com aumento de cerca de 33 %. Os malonilglicosídeos tiveram uma drástica redução no extrato de SDS 0,1 e 1 %, não sendo detectados na solução de SDS 1 %. O aumento das concentrações de Triton (0,1 %, 0,5 %, e 1 %) resultou em aumento da solubilidade das agliconas e das isoflavonas totais. O aumento da concentração das soluções de β -ME resultou em diminuição dos malonilglicosídeos, em 13 %, em relação ao extrato aquoso.

As soluções de SDS solubilizaram um teor alto de agliconas em relação ao extrato aquoso, e quanto maior a concentração do SDS, maior a porcentagem de agliconas. A maior solubilização de agliconas foi acompanhada por uma maior solubilização de proteínas, o que indicaria a ocorrência de interações hidrofóbicas entre estas, conforme anteriormente mencionado. A solução de β -ME 0,001 M foi a única que apresentou redução na porcentagem de agliconas em relação aos demais extratos analisados.

Os acetilglicosídeos não foram detectados nos extratos de SDS 0,1 % e 1 % e Triton 0,1 % e 1 %. Nas soluções de Triton 0,5 % e β -ME 0,001 M, 0,01 M, 0,02 M e 0,2 M os acetilglicosídeos não variaram entre si e em relação ao extrato aquoso.

A isoflavona genisteína apresentou-se em maior concentração em todos os extratos analisados. Porém, no extrato em SDS 0,1 e 1 % observou-se uma leve diminuição da genisteína total, com aumento da gliciteína, em relação ao extrato em água.

Tabela 23. Perfil das isoflavonas do isolado protéico de soja comercial em SDS 0,1 % e 1 %, Triton X-100 0,1 %, 0,5 % e 1 %, e β -ME 0,001 M, 0,01 M, 0,02 M e 0,2 M, no estudo da interação.

	% de extração								
	SDS 0,1%	SDS 1%	Triton 0,1 %	Triton 0,5%	Triton 1%	β -ME 0,001 M	β -ME 0,01 M	β -ME 0,02 M	β -ME 0,2 M
β -glicosídeos	40 ± 1^a	31 ± 2^b	30 ± 1^b	$29 \pm 1^{b,c}$	26 ± 2^c	32 ± 2^b	33 ± 2^b	34 ± 2^b	31 ± 1^b
Mglicosídeos	8 ± 2^d	n.d.	36 ± 1^e	30 ± 2^f	33 ± 1^f	39 ± 1^g	$28 \pm 4^{f,h}$	25 ± 1^h	$26 \pm 2^{f,h}$
Acglicosídeos	n.d.	n.d.	n.d.	$1,8 \pm 0,4^i$	n.d.	$1,3 \pm 0,1^i$	$1,2 \pm 0,3^i$	$1,3 \pm 0,2^i$	$0,7 \pm 0,4^i$
Agliconas	53 ± 2^j	70 ± 1^k	34 ± 2^l	40 ± 1^m	41 ± 1^m	27 ± 2^n	$38 \pm 3^{l,m}$	39 ± 2^m	43 ± 2^m
<i>Daidzeína total</i>	28 ± 1^a	29 ± 3^a	23 ± 1^b	24 ± 2^b	23 ± 2^b	$27 \pm 3^{a,b}$	25 ± 1^b	23 ± 2^b	$26 \pm 3^{a,b}$
<i>Gliciteína total</i>	8 ± 1^c	$11 \pm 2^{d,c}$	6 ± 1^c	$5 \pm 2^{c,e}$	7 ± 2^c	$5 \pm 3^{c,e}$	$5 \pm 3^{c,e}$	3 ± 1^e	$5 \pm 2^{c,e}$
<i>Genisteína total</i>	64 ± 1^f	60 ± 3^f	71 ± 1^g	71 ± 3^g	69 ± 2^g	69 ± 3^g	70 ± 2^g	74 ± 3^g	$68 \pm 3^{f,g}$

Resultados na forma de média $\pm$ desvio-padrão (n=3). n.d. não detectados. Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). Foram utilizadas as abreviações M e Ac para os radicais malonil e acetil, respectivamente.

A Tabela 24 apresenta os teores de isoflavonas livres que estariam presentes no IPS comercial, calculados a partir das Tabelas 20 a 23. 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 24. Teor de isoflavonas livres e associadas presentes no isolado protéico de soja comercial.

solução extratora	isoflavonas	β -glicosídeos (%)	malonilglicosídeos (%)	agliconas (%)
pH 4,5	livres	14	15	5
Triton 1%	livres	14	15	5
	associadas	12	18	36
	total	26	33	41
NaCl 0,2M	livres	14	15	5
	associadas	1	12	4
	total	15	27	9
SDS 1 %	livres	14	0	5
	associadas	3	0	35
	total	17	0	40

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

Os resultados obtidos mostram que cerca de 35 % das isoflavonas presentes nos IPS comerciais estão livres, já que não dependem da solubilização protéica para serem solubilizadas (Tabela 24). Os outros 65 % corresponderiam as isoflavonas ligadas às proteínas e às isoflavonas insolúveis na região do pH isoelétrico. Considerando-se, a partir de nossos resultados anteriores, que 85 % das isoflavonas solúveis em água permanecem solúveis em pH 4 e 5, 55 % das isoflavonas estariam associadas às proteínas. Entre as isoflavonas associadas às proteínas, cerca de 55 % seriam agliconas, através de interações hidrofóbicas, e cerca de 28 % seriam os malonilglicosídeos, associados através de ligações eletrostáticas.

O detergente aniônico SDS é capaz de solubilizar todas as isoflavonas presentes na forma de agliconas, porém não solubiliza os malonilglicosídeos.

4.12. Proteínas da soja: Frações 7S e 11S.

Com o intuito de verificar quais frações protéicas estariam envolvidas na possível interação com as isoflavonas e também o de estudar o comportamento das proteínas em diferentes meios extratores realizou-se a análise dos extratos através de eletroforese em condições dissociantes (SDS-PAGE).

Os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE 12 %) dos extratos aquosos obtidos a partir da FDS e das proteínas solubilizadas a partir do IPS comercial por diferentes soluções aquosas são apresentados nas Figuras 19, 20, 21, 23, 24 e 25.

Figura 19. Perfil eletroforético dos extratos aquosos de farinha desengordurada de soja obtidos através de SDS-PAGE 12%, nas seguintes condições: poço (1) padrão de peso molecular, (2) 4 °C, (3) 25 °C, (4) 50 °C, (5) 0,01 M de NaCl, (6) 0,1 M de NaCl, (7) 0,2 M de NaCl, (8) 0,5 M de NaCl e (9) 1,0 M de NaCl.

Figura 20. Perfil eletroforético dos extratos aquosos de farinha desengordurada de soja obtidos através de SDS-PAGE 12%, nos seguintes pH: poço (1) padrão de peso molecular, (2) pH 2, (3) pH 3, (4) pH 4, (5) pH 5, (6) pH 6, (7) pH 7, (8) pH 8, (9) pH 9, (10) pH 10.

Figura 21. Perfil eletroforético dos extratos aquosos de farinha desengordurada de soja obtidos através de SDS-PAGE 12%. Poço (1) padrão de peso molecular, poço (2) extrato aquoso em pH 7, poço (3) soro ácido pH 4, (4) soro ácido pH 4,5, (5) soro ácido pH 5.

Figura 23. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) das proteínas solubilizadas a partir do isolado protéico de soja em solução aquosa, nos diferentes pH. Poço (1) padrão de peso molecular, (2) pH 2, (3) pH 3, (4) pH 4, (5) pH 5, (6) pH 6, (7) pH 7, (8) pH 8, (9) pH 9, (10) pH 10.

Figura 24. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) das proteínas solubilizadas a partir do isolado protéico de soja, em diferentes soluções. Poço (1) padrão de peso molecular, (2) Triton 0,5 %, (3) Triton 0,1 %, (4) Triton 1 %, (5) β -ME 0,001 M, (6) β -ME 0,01 M, (7) β -ME 0,02 M, (8) β -ME 0,2 M, (9) SDS 0,1 %, (10) SDS 1 %.

Figura 25. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) das proteínas solubilizadas a partir do isolado protéico de soja, em diferentes soluções. Poço (1) padrão de peso molecular, (2) H_2O , (3) 0,5 M de NaCl, (4) 0,5 M de NaCl, (5) 0,5 M de NaCl.

As proteínas presentes no IPS comercial e no IPS obtido em laboratório, assim como nas várias etapas de processamento para obtenção do IPS (extratos aquosos, soros ácidos e água de lavagem), também foram analisadas e são apresentadas na Figura 22.

Figura 22. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) das proteínas presentes nas diversas etapas de obtenção dos isolados protéicos de soja. Poço (1) padrão de peso molecular, (2) extrato de FDS em pH 9, (3) soro ácido pH 4,5, (4) H₂O de lavagem, (5) extrato de FDS em pH 7, (6) soro ácido pH 4,5, (7) H₂O de lavagem, (8) IPS comercial e (9) IPS obtido no laboratório.

Para que se pudesse fazer uma melhor comparação dos perfis eletroforéticos (Figuras 19 a 25), efetuaram-se as análises densitométricas das bandas de interesse as subunidades α , α' , e β (fração 7S), e as subunidades ácidas e básicas, dentre as subunidades ácidas foi realçada a banda A4, um polipeptídeo com PM ao redor de 45.000 Da (fração 11S).

As Tabelas 25 a 28 apresentam as porcentagens obtidas pela análise densitométrica das bandas α , α' , β da fração 7S e das subunidades ácidas, A4 e básicas da fração 11S.

Tabela 25. Análise densitométrica do perfil eletroforético das frações 7S e 11S extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em solução aquosa a 4 °C, 25 °C, 50 °C, em solução de NaCl 0,01 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,5 M, 1,0 M, e em solução aquosa a pH 7.

	7S			11S		
	α' (%)	α (%)	β (%)	A4 (%)	Ácidas (%)	Básicas (%)
sol. aq. 4 °C	15,2	18,3	17,9	10,6	18,9	19,0
sol. aq. 25 °C	15,5	18,5	16,9	10,5	19,2	19,3
sol. aq. 50 °C	15,6	18,6	17,4	11,0	18,5	18,9
NaCl 0,01 M	16,0	19,1	18,0	9,3	18,3	19,2
NaCl 0,1 M	16,2	21,4	20,0	6,9	15,7	19,7
NaCl 0,2 M	16,1	19,2	19,1	8,1	17,4	20,1
NaCl 0,5 M	14,9	19,0	18,4	9,7	18,0	20,0
NaCl 1,0 M	14,6	18,2	17,6	10,5	19,2	19,9
sol. aq. pH 7	14,9	17,8	17,3	11,5	18,7	19,8

Na análise densitométrica das frações 7S e 11S das proteínas da FDS em solução aquosa a 4 °C, 25 °C, 50 °C observou-se que não houve variação na porcentagem das subunidades α' , α , β da fração 7S e A4, ácidas e básicas da fração 11S (Tabela 25).

Petrucelli & Añón (1995a) observaram que os tratamentos térmicos em temperaturas abaixo de 80 °C não resultaram em diferença significativa do perfil das frações protéicas, confirmando o resultado do nosso trabalho.

As soluções de NaCl apresentaram porcentagens diferentes das subunidades nas diferentes concentrações utilizadas. A subunidade α' diminuiu com o aumento da concentração do sal ($> 0,5$ M), a subunidade α aumentou na solução de NaCl 0,1 M e a β diminuiu na solução de NaCl 1,0 M. As subunidades básicas não apresentaram variação (Tabela 25). Em geral, observa-se que o aumento da força iônica da solução extratora leva a um aumento da fração 11S e diminuição da 7S extraídas.

Petrucelli & Añón (1995b) relataram que o aumento da concentração de NaCl diminui a fração 7S e consequentemente aumenta a fração 11S.

Os soros ácidos (pH 4, 4,5 e 5) não apresentaram as subunidades relativas às frações 7 e 11S. Já as proteínas extraídas em solução aquosa a pH 7 à temperatura ambiente apresentaram uma porcentagem similar das frações 7 e 11S em relação às soluções aquosas extraídas nas diferentes temperaturas (Tabela 25).

A análise densitométrica das frações 7S e 11S das proteínas extraídas a partir da FDS em solução aquosa em pH 2 a 10 é apresentada na Tabela 26.

Tabela 26. Análise densitométrica do perfil eletroforético das frações 7S e 11S extraídas a partir da farinha desengordurada de soja em solução aquosa pH 2 a 10.

	7S				11S	
	α' (%)	α (%)	β (%)	A4 (%)	ácidas (%)	básicas (%)
pH 2	16,4	23,3	18,9	8,6	14,8	18,1
pH 3	15,1	21,2	19,1	8,6	18,5	17,6
pH 6	13,8	20,4	19,3	8,6	18,5	19,4
pH 7	14,3	18,5	18,2	9,2	19,8	20,0
pH 8	14,8	19,0	17,8	9,4	19,8	19,2
pH 9	15,5	19,3	17,3	10,3	19,0	18,6
pH 10	15,2	19,2	16,4	12,6	19,0	17,6

Os resultados mostraram um aumento gradual da fração 7S e diminuição da 11S com a diminuição do pH, em relação ao pH 7 (Tabela 26). Já em pH básico (pH até 10) não houve diferença nas frações 7 e 11S em relação ao pH 7.

A análise densitométrica das proteínas solubilizadas a partir do IPS em diferentes soluções mostrou que não há diferença significativa entre a composição das frações solubilizadas em pH ácido e básico, excetuando-se o pH 10, onde há aumento de α' e diminuição da subunidade A4 (Tabela 26). Já Petruccelli & Añón (1995b) não observaram diferença significativa na composição das proteínas em soluções de IPS em pH 7, 8, e 9. Porém, em solução a pH 10 houve um aumento da subunidade ácida da fração 11S.

Tabela 27. Análise densitométrica do perfil eletroforético das frações 7S e 11S solubilizadas a partir do isolado comercial nas seguintes soluções: água, solução aquosa em pH 2 a 10, Triton X-100 0,5 %, 0,1 %, 1 %, β -ME 0,001 M, 0,01 M, 0,02 M, 0,2 M, SDS 0,1 %, 1 %, NaCl 0,05 M, 0,2 M e 0,5 M.

	7S			11S		
	α' (%)	α (%)	β (%)	A4 (%)	ácidas (%)	básicas (%)
H ₂ O	15,8	18,5	17,4	11,0	19,9	17,5
pH 2	15,9	18,3	17,1	13,5	18,2	17,0
pH 3	15,9	17,9	16,9	14,2	18,1	17,1
pH 6	15,6	17,5	17,3	14,2	18,2	17,3
pH 7	16,4	18,9	17,6	12,8	17,4	17,0
pH 8	15,0	18,3	17,4	13,8	17,7	17,8
pH 9	14,9	18,1	17,1	13,5	18,2	18,2
pH 10	17,6	17,9	17,0	11,8	18,5	17,2
Triton 0,5 %	16,8	21,4	16,9	9,3	20,2	15,4
Triton 0,1 %	16,1	20,4	16,2	10,6	20,3	16,4
Triton 1 %	16,1	18,6	17,1	11,7	20,6	15,9
β -ME 0,001 M	16,6	19,9	16,9	8,9	21,5	16,1
β -ME 0,01 M	15,4	18,7	16,8	11,9	18,9	18,3
β -ME 0,02 M	14,3	18,4	17,6	11,6	19,1	19,0
β -ME 0,2 M	16,1	19,5	16,6	10,5	19,8	17,4
SDS 0,1 %	16,1	20,5	17,1	9,9	20,8	15,6
SDS 1 %	16,3	18,5	17,4	10,7	18,4	18,7
0,05 M NaCl	15,8	19,0	16,4	11,2	19,9	17,6
0,2 M NaCl	16,9	20,2	12,4	10,6	23,5	16,4
0,5 M NaCl	16,6	21,3	12,1	10,3	24,5	15,2

As proteínas solubilizadas a partir da FDS e do IPS comercial não diferiram em relação à composição das subunidades das frações 7 e 11S (Tabela 27).

Na solubilização de IPS comercial em Triton X-100 observou-se uma diminuição da subunidade α e aumento da A4 com o aumento das concentrações do detergente (Tabela 27).

Na solução de IPS comercial em β -mercaptoetanol 0,001 M as subunidades ácidas aumentaram em relação às outras concentrações analisadas (0,01, 0,02 e 0,2 M). A presença de agente redutor causa tanto desnaturação protéica como redução parcial das pontes dissulfeto das subunidades AB da fração 11S, causando a liberação dos peptídeos ácidos e básicos (Wagner *et al.*, 2000).

A solução de IPS comercial em detergente SDS a 1 % apresentou diminuição da subunidade α e aumento das básicas, em relação ao SDS 0,1 %. Já na solução com 0,1 % de SDS observou-se aumento das subunidades ácidas (Tabela 27).

Nas soluções de IPS comercial em NaCl 0,2 M e 0,5 M observou-se uma diminuição na subunidade β e aumento das ácidas em relação à concentração de 0,05 M (Tabela 27). Essa diminuição da subunidade β pode ser devido à interação dessa subunidade com a subunidade básica da fração 11S (Utsumi *et al.*, 1984).

A presença de cátion divalente pode induzir agregação por interação iônica, principalmente devido a fração 11S possuir o sítio de ligação para cálcio e magnésio (Wagner *et al.*, 2000).

A análise densitométrica das proteínas solubilizadas nas várias etapas do processo de obtenção do IPS, e ainda do IPS comercial e do IPS obtido em laboratório é apresentada na Tabela 28.

Tabela 28. Análise densitométrica do perfil eletroforético das frações 7S e 11S extraídas a partir da farinha desengordurada de soja nas etapas de obtenção do isolado (laboratório), e do isolado comercial.

	7S			11S		
	α' (%)	α (%)	β (%)	A4 (%)	ácidas (%)	básicas (%)
extrato pH 7	14,9	17,1	17,0	13,0	18,6	19,4
extrato pH 9	15,5	17,9	17,0	13,3	18,3	18,0
IPS laboratório	14,5	18,3	16,6	12,1	20,8	17,8
IPS comercial	14,9	18,6	17,0	12,2	19,9	17,4

Nas etapas de obtenção do IPS, as proteínas extraídas a partir da FDS nas soluções aquosas a pH 7 e 9 não apresentaram diferenças nas frações 7 e 11S. Enquanto que as bandas protéicas presentes nos soros ácidos e água de lavagem (pH 4,5) não apresentaram as subunidades relativas às frações 7 e 11S.

O IPS obtido no laboratório e o IPS comercial apresentaram a mesma proporção das frações 7S e 11S.

A análise densitométrica das proteínas solubilizadas a partir do IPS comercial, por diferentes soluções, mostrou diferenças quantitativas nos perfis eletroforéticos, porém esses dados foram insuficientes para indicar uma associação preferencial com as isoflavonas.

5. CONCLUSÕES

- Os resultados deste trabalho mostraram que a obtenção de isolados protéicos de soja com teor aumentado de isoflavonas depende da utilização de condições brandas de centrifugação para a separação do precipitado isoelétrico, assim como da utilização de água acidificada na sua lavagem.
- A diferença entre o perfil de isoflavonas presentes na FDS e no IPS é decorrente da atuação de β -glicosidases endógenas no processo de obtenção dos isolados, resultando em porcentagem mais elevada de agliconas.
- A presença de isoflavonas no IPS resultou de três fatores:
 - ✓ associação entre isoflavonas e proteínas através de interações hidrofóbicas; ligações eletrostáticas entre a carboxila ionizada dos malonilglicosídeos e os aminoácidos básicos das proteínas; pontes de hidrogênio, como exemplo entre as hidroxilas e carboxilas (N – H e C = O da ligação peptídica);
 - ✓ menor solubilidade das isoflavonas presentes na FDS no pH isoelétrico;
 - ✓ processo de carreamento (físico).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, H.; GORBACH, S.; GOLDIN, B. Dietary phytoestrogens and the menopause in Japan. **Lancet**, London, v.339, p.1233, 1992.
- ADLERCREUTZ, H.; HONJO, H.; HIGASHI, A.; FOTSIS, T.; HAMALAINEN, E.; HASEGAWA, T.; OKADA, H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.54, p.1093-1100, 1991.
- 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.
- AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S.; OGAWARA, S.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIYBA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.262, p.5592-5595, 1987.
- ANDERSON, R.L.; WOLF, W.J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **J. Nutr.**, Bethesda, v.125, n.3, p.581S-588S, 1995.
- ARABBI, P.R. Alimentos funcionais: aspectos gerais. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, São Paulo, v.21, p.82-102, 2001.

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.

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.

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.

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. [Review].

BRESSANI, R. The role of soybeans in food systems. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, Champaign, v.58, p.392-400, 1981.

CARROLL, K.K.; KUROWSKA, E.M. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. **J. Nutr.**, Bethesda, v.125, p.594S-597S, 1995.

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.

COTTER, A. Genistein, appears to prevent early postmenopausal bone loss as effectively as hormone replacement therapy. **Nutr. Rev.**, Secaucus, 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.

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.

DIXON, R.A.; FERREIRA, D. Molecules of interest: genistein. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.60, p.205-211, 2002.

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.

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, 140p.

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 setembro 2001.

FENNEMA, O.R. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 1069p. (Food Science and Technology Serie).

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.

GARDNER, C.D.; NEWELL, K.A.; CHERIN, R.; HASKELL, W.L. The effect of soy protein with or without isoflavones relative to milk protein on plasma lipids in hypercholesterolemic postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.73, p.728-735, 2001.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, 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 Ingredients**, São Paulo, v.11, p.62-64, 2001b.

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.

HARRIS, E.L.V. ANGAL, S., eds. **Protein purification methods: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1989. 317p. (Practical Approach Series).

HERMANSSON, A.M. Physico-chemical aspects of soy protein structure formation. **J. Texture Stud.**, Trumbull, v.9, p.33-58, 1978.

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.

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.

HOLLINGSWORTH, P. Functional foods: fad or fact? **Food Technol.**, Chicago, v.49, n.4, p.32-34, 1995.

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.

ISHIMI, Y.; YOSHIDA, M.; WAKIMOTO, S.; WU, J.; CHIBA, H.; WANG, X.; TAKEDA, K.; MIYAURA, C. Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. **Bone**, New York, v.31, n.1, p.180-185, 2002.

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.

IWABUCHI, S.; YAMAUCHI, F. Effects of heat and ionic strength upon dissociation-association of soybean protein fractions. **J. Food Sci.**, Chicago, v.49, p.1289-1294, 1984.

IYENGAR, R.B.; RAVESTEIN, P. New aspects of subunit structure of soybean glycinin. **Cereal Chem.**, Saint Paul, v.58, p.325-330, 1981.

KINSELLA, J.E. Functional properties of soy proteins. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.56, p.242-258, 1979.

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, 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.

LINASSIER, C.; PIERRE, M.; LE PECO, J.B.; PIERRE, J. Mechanism of action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase activity. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v.39, p.187-193, 1990.

LIU, K. **Soybean**: chemistry, technology and utilization. New York: Chapman & Hall, 1997. 532p.

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.

MAHUNGU, S.M.; DIAZ-MERCADO, S.; LI, J.; SCHWENK, M.; SINGLETARY, K.; FALLER, J. Stability of isoflavones during extrusion processing of corn/soy mixture. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, p.279-284, 1999.

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.

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

MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. **Química orgânica**. 7.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981. 1498p.

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.

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

PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M.C. Soy protein isolates components and their interactions. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.1762-1767, 1995b.

PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M.C. Thermal aggregation of soy protein isolates. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.3035-3041, 1995a.

POTTER, S.M.; BAUM, J.A.; TENG, H.; STILLMAN, R.; SHAY, N.F.; ERDMAN Jr., J.W. Soy protein, and isoflavones: their effects on lipids and bone density in postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, p.1375S-1379S, 1998.

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

ROCHA, J.M.S. Aplicações de agentes tensioactivos em biotecnologia. **Bol. Biotecnol.**, São Paulo, v.64, p.5-11, 1999.

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.; BORRIELLO, S.P.; HULME, P.; KIRK, D.N.; AXELSON, M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.40, p.569-578, 1984.

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.

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.

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, 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, supp.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.

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.

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.

THORBURN, J.; THORBURN, N. The tyrosine kinase inhibitor, genistein, prevents α -adrenergic-induced cardiac muscle cell hypertrophy by inhibiting activation of the Ras-MAP kinase signaling pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.22, p.1586-1591, 1994.

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.

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.

WAGNER, J.R.; SORGENTINI, D.A.; AÑÓN, M.C. Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, p.3159-3165, 2000.

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, 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.

WOLF, W.J.; COWAN, J.C. **Soybeans as a food source**. London: Butterworths, 1971. 86p. (CRC monographs series).

WOLF, W.J. Scanning electron microscopy of soybean protein bodies. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.47, p.107-108, 1970.

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.

YEOH, H.; WEE, Y. Some properties of β -glucosidases from tropical plant species. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.35, n.6, p.1391-1393, 1994.