

MAURÍCIO HENRIQUES LOUZADA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO
PROTÉICO DE SOJA MODIFICADO COM PERFIL DE
SOLUBILIDADE DA CASEÍNA DO LEITE HUMANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586d
2007

Silva, Maurício Henriques Louzada, 1973-
Desenvolvimento e caracterização de um isolado
protéico de soja modificado com perfil de solubilidade
de caseína do leite humano / Maurício Henriques Louzada
Silva – Viçosa, MG, 2007.

xix, 107f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Carlos Gomes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 96-105.

1. Soja - Produtos. 2. Proteínas de soja. 3. Leite
humano - Composição. 4. Proteínas na nutrição
humana. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.726

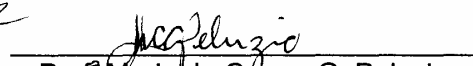
MAURÍCIO HENRIQUES LOUZADA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO
PROTÉICO DE SOJA MODIFICADO COM PERFIL DE
SOLUBILIDADE DA CASEÍNA DO LEITE HUMANO**

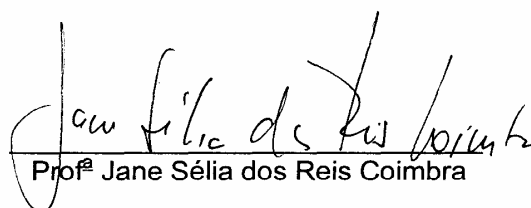
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

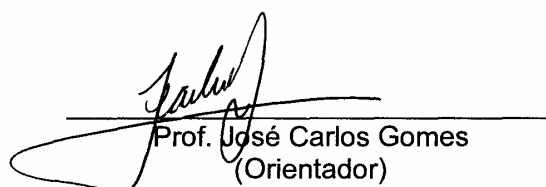
APROVADA: 2 de março de 2007.


Prof. Marco Túlio Coelho Silva
(Co-orientador)


Prof. Marialdo Carmo G. Peluzio
(Co-orientador)


Prof. Karla Silva Ferreira


Prof. Jane Sélia dos Reis Coimbra


Prof. José Carlos Gomes
(Orientador)

A Deus.

Aos meus queridos pais, Edson e Léa, pelo amor, pelo incentivo e pelo exemplo de vida.

À minha esposa, Vanessa, pelo amor, pelo carinho, pelo companheirismo e pelo apoio constante em minha vida. O seu incentivo foi imprescindível para a conclusão deste trabalho.

Aos meus sogros, Alexandre e Joselina, e às minhas cunhadas, Alessandra e Cristina.

A grandeza de uma profissão é talvez, antes de tudo, unir os homens: não há senão um verdadeiro luxo e esse é o das relações humanas.

Saint-Exupéry.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, aos Departamentos de Tecnologia de Alimentos e Nutrição e Saúde e ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba, Setor de Agroindústria, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Ao professor José Carlos Gomes, pela orientação, pelos conselhos, pela amizade, pelos valiosos ensinamentos e pela paciência.

Ao professor Marco Túlio Coelho Silva, pelos ensinamentos, pelas sugestões, pela amizade e pelo apoio, neste e em vários momentos da minha vida acadêmica.

À professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pela amizade, pelas sugestões e pela disponibilidade.

À professora Karla Silva Ferreira, pela amizade, pela disponibilidade e pelas valiosas sugestões.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela disponibilidade e pela valiosa colaboração.

À minha esposa, Vanessa, pela presença constante, pela compreensão e pela contribuição indispensável para realização deste trabalho.

Ao meu estagiário, ex-aluno e amigo, Andrew, pela dedicação constante e pelo auxílio indispensável.

À Tatiana, pela importante colaboração.

Ao amigo Cassiano, pela imprescindível ajuda e pelos conselhos.

À amiga Aline, pela valiosa ajuda na procura dos artigos.

Ao Bilico, pelo valioso auxílio na secagem das amostras.

A todos os meus alunos e ex-alunos, em especial ao Andrew, Cleuber, Daiany e Juliene, pela compreensão e amizade.

Aos meus amigos Manoel, Rodrigo, Renato, Iuri e João Felipe, pela força e pela amizade fraterna.

Aos amigos do Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba, em especial ao Bruno, Mário, Roscelino, Roselir, Ronald, Fátima, Elisete, pela compreensão, pela amizade e pelo incentivo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Laboratório do Setor de Agroindústria do CEFET-RP, Rosélio e Marcélio, pela compreensão e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, especialmente à Geralda, à Vânia e ao Sr. Manoel.

A todos os colegas do curso

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

BIOGRAFIA

MAURÍCIO HENRIQUES LOUZADA SILVA, filho de Edson Rodrigues da Silva e Léa Henriques Louzada Silva, nasceu em 2 de fevereiro de 1973, em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais.

Em agosto de 1999, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Em setembro de 1999, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, submetendo-se à defesa de tese no dia 14 de dezembro de 2001.

Em abril de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Doutorado, submetendo-se à defesa de tese no dia 2 de março de 2007.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE TABELAS | x |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xvii |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1. Soja..... | 4 |
| 2.2. Produção de soja | 6 |
| 2.3. Composição da soja..... | 6 |
| 2.3.1. Proteínas da soja | 7 |
| 2.3.1.1. Classificação e nomenclatura das proteínas..... | 8 |
| 2.3.1.2. Principais proteínas de reserva..... | 10 |
| 2.3.2. Lipídios da soja | 11 |
| 2.3.3. Vitaminas | 11 |
| 2.3.4. Minerais..... | 12 |
| 2.3.5. Carboidratos e fibras..... | 12 |
| 2.3.6. Isoflavonas..... | 14 |

| | Página |
|---|---------------|
| 2.4. Os produtos da soja | 15 |
| 2.4.1. Isolado protéico de soja | 17 |
| 2.5. Propriedades funcionais das proteínas de soja..... | 19 |
| 2.5.1. Solubilidade..... | 19 |
| 2.5.2. Emulsificação | 22 |
| 2.5.3. Espumabilidade..... | 23 |
| 2.5.4. Gelificação | 24 |
| 2.5.5. Capacidade de absorção e retenção de água..... | 25 |
| 2.6. Modificação das proteínas de soja..... | 25 |
| 2.6.1. Modificação física..... | 26 |
| 2.6.2. Modificação química | 26 |
| 2.6.3. Modificação enzimática..... | 28 |
| 2.7. Qualidade nutricional da proteína de soja..... | 29 |
| 2.8. Proteínas do leite humano | 34 |
| 2.9. Alergia e intolerância a proteínas dos alimentos..... | 38 |
| 2.9.1. A alergenicidade relacionada ao consumo da soja e seus produtos | 39 |
| CAPÍTULO 1 | 43 |
| MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FUNCIONAL DE ISOLADOS PROTÉICOS DE SOJA | 43 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 43 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 45 |
| 2.1. Obtenção da caseína a partir do leite humano..... | 45 |
| 2.1.1. Obtenção do leite humano | 45 |
| 2.1.2. Separação da caseína do leite humano..... | 45 |
| 2.2. Obtenção e modificação do isolado protéico de soja | 48 |
| 2.2.1. Obtenção do isolado protéico de soja | 48 |
| 2.2.2. Modificação dos isolados protéicos de soja | 48 |
| 2.3. Análise físico-químicas | 49 |
| 2.3.1. Determinação da umidade | 49 |

| | Página |
|---|---------------|
| 2.3.2. Determinação de proteína..... | 49 |
| 2.3.3. Determinação de cinzas..... | 50 |
| 2.3.4. Determinação de minerais (Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe e Cu).. | 50 |
| 2.3.5. Determinação de lipídios..... | 50 |
| 2.3.6. Determinação de carboidratos | 50 |
| 2.4. Propriedades funcionais..... | 51 |
| 2.4.1. Solubilidade..... | 51 |
| 2.4.2. Capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO) | 51 |
| 2.4.3. Emulsificação e estabilidade da emulsão | 52 |
| 2.4.4. Espumabilidade e estabilidade da espuma | 53 |
| 2.5. Análise estatística | 53 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 3.1. Composição química..... | 54 |
| 3.2. Propriedades funcionais..... | 58 |
| 3.2.1. Solubilidade..... | 58 |
| 3.2.2. Capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO)..... | 61 |
| 3.2.3. Emulsificação e estabilidade da emulsão | 64 |
| 3.2.4. Espumabilidade e estabilidade de espuma | 68 |
| 4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES | 74 |
| CAPÍTULO 2..... | 76 |
| AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTÉICA DE ISOLADOS PROTÉICOS DE SOJA MODIFICADOS..... | 76 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 76 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 78 |
| 2.1. Obtenção e modificação do isolado protéico de soja | 78 |
| 2.1.1. Obtenção do isolado protéico de soja | 78 |
| 2.1.2. Modificação dos isolados protéicos de soja | 78 |
| 2.2. Ensaio biológico..... | 79 |
| 2.3. Digestibilidade <i>in vivo</i> | 81 |
| 2.4. Coeficiente de eficiência protéica (<i>Protein Efficiency Ratio</i> – PER) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) | 82 |

| | Página |
|---|---------------|
| 2.5. Razão protéica líquida (<i>Net Protein Ratio</i> – NPR) | 83 |
| 2.6. Escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS)..... | 83 |
| 2.7. Análise estatística | 84 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 85 |
| 3.1. Ganho de peso (GP), Coeficiente de eficiência alimentar (CEA), PER e NPR | 85 |
| 3.2. Digestibilidade..... | 89 |
| 3.3. Escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS)..... | 91 |
| 4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES | 94 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 96 |
| APÊNDICE..... | 106 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|---------------|
| 1 Composição química (%) aproximada do grão de soja nas partes estruturais de sua semente | 7 |
| 2 Componentes das frações extraídas em água e ultracentrifugadas das proteínas de soja | 9 |
| 3 Composição em minerais dos principais produtos de soja..... | 13 |
| 4 Aplicação dos principais produtos de soja em alimentos | 16 |
| 5 Principais produtos derivados da soja | 17 |
| 6 Propriedades funcionais dos produtos protéicos de soja nos alimentos | 20 |
| 7 Composição em aminoácidos (mg/g proteína) de produtos protéicos de soja e recomendações para indivíduos em diferentes fases da vida..... | 30 |
| 8 Digestibilidade protéica de vários produtos de soja em humanos..... | 32 |
| 9 PDCAAS de diversas fontes protéicas | 33 |
| 10 Composição protéica dos leites humano e de vaca | 35 |

CAPÍTULO 1

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Composição centesimal dos isolados protéicos de soja..... | 54 |
| 2 | Composição em minerais dos IPS..... | 56 |
| 3 | Efeito do pH na capacidade de absorção de água (g água absorvida/g amostra) nos isolados protéicos de soja | 61 |
| 4 | Efeito do pH na atividade emulsificante (%) nos tratamentos | 65 |
| 5 | Efeito do pH na estabilidade emulsificante (%) nos tratamentos | 67 |
| 6 | Efeito do pH na capacidade de formação de espuma (%) nos tratamentos..... | 68 |

CAPÍTULO 2

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico (g/100 g mistura) | 81 |
| 2 | Valores médios de PER, RPER, NPR E RNPR das dietas à base de IPS e caseína determinados em experimentos com ratos | 87 |
| 3 | Valores médios de DV e DVR das dietas à base de IPS e caseína, determinados em experimentos com ratos | 89 |
| 4 | Composição em aminoácidos (mg/g proteína) e escore químico (EQ) dos IPS..... | 92 |
| 5 | Valores de PDCAAS dos IPS | 92 |

APÊNDICE

| | | |
|----|--|-----|
| 1A | Composição da mistura de vitaminas (AIN-93G-VX)..... | 107 |
| 2A | Composição da mistura de minerais (AIN-93G-MX)..... | 107 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| 1 Estrutura da semente de soja..... | 5 |
| 2 Produção mundial de soja no mundo | 6 |
| 3 Fluxograma do processo de obtenção de um isolado protéico de soja comercial..... | 18 |
| 4 Representação esquemática da estrutura da bolha de gás ... | 24 |
| CAPÍTULO 1 | |
| 1 Fluxograma do processo de obtenção da caseína humana ... | 47 |
| 2 Modificação dos IPS..... | 49 |
| 3 Perfil de solubilidade da caseína, dos IPS comerciais e modificados | 58 |
| 4 Capacidade de absorção de água dos IPS em diferentes pHs..... | 62 |
| 5 Capacidade de absorção de óleo (CAO) para os IPS | 64 |
| 6 Atividade emulsificante dos IPS avaliados em diferentes valores de pH | 65 |
| 7 Estabilidade de emulsão após 24 horas à temperatura ambiente..... | 67 |

| | Página |
|--|---------------|
| 8 Estabilidade de espuma (%) dos IPS em pH 3,0..... | 71 |
| 9 Estabilidade de espuma (%) dos IPS em pH 4,0..... | 71 |
| 10 Estabilidade de espuma (%) dos IPS em pH 5,0..... | 72 |
| 11 Estabilidade de espuma (%) dos IPS em pH 6,0..... | 72 |
| 12 Estabilidade de espuma (%) dos IPS em pH 7,0..... | 73 |

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| 1 Modificação dos IPS..... | 79 |
| 2 Delineamento experimental do ensaio biológico | 80 |
| 3 Ganho de peso médio por grupo de animais após os 14 dias de experimento..... | 86 |
| 4 Coeficiente de eficiência alimentar médio por grupo de animais após os 14 dias de experimento | 87 |

RESUMO

SILVA, Maurício Henriques Louzada, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Desenvolvimento e caracterização de um isolado protéico de soja modificado com perfil de solubilidade da caseína do leite humano.** Orientador: José Carlos Gomes. Co-orientadores: Marco Túlio Coelho Silva e Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

O Brasil destaca-se como o segundo maior produtor de soja no mundo. A utilização de seus derivados, sob a forma de ingredientes funcionais em alimentos, tem proporcionado melhor aceitação desses produtos no País. Dentre os processos de obtenção dos produtos protéicos de soja, o isolado protéico de soja (IPS) é o mais elaborado, contendo alto teor de proteína. Estudos têm demonstrado que as alterações nos processos tecnológicos podem modificar uma determinada propriedade funcional. Porém, poucos trabalhos avaliaram se essa modificação afetaria a qualidade protéica. Portanto, este trabalho visou modificar dois isolados protéicos de soja comerciais (IPSNB e IPSLH) por meio da alteração do seu perfil de solubilidade. Para tanto, foi utilizado um tratamento ácido moderado e sal de polifosfato, de modo que apresentassem curvas de solubilidade semelhantes à da caseína humana. Adicionalmente, também foi avaliado o grau de influência da modificação conduzida sobre as propriedades químicas e funcionais e sobre a qualidade protéica desses isolados. Os isolados protéicos de soja modificados NB e LH (IPSMNB e IPSMLH) apresentaram,

respectivamente, teores médios de umidade (6,60 e 6,20%) significativamente ($p < 0,05$) inferiores aos isolados comerciais (9,41 e 9,25%). O teor médio de lipídios foi inferior a 0,5% para ambos IPS. O teor de proteína do IPSMNB e do IPSMLH foi de 82,60 e 83,61%, respectivamente, inferiores aos recomendados pela legislação (88,00%). Entretanto, os teores de cinzas desses isolados foram de 11,15 e 11,59%, significativamente ($p < 0,05$) superiores aos IPSNB (4,37%) e IPSLH (5,00%), o que justifica os menores valores de proteínas obtidos para esses isolados. Sugere-se incluir uma etapa adicional ao processo produtivo dos isolados, com o objetivo de diminuir o conteúdo de sais encontrados neste estudo. O teor médio de carboidratos variou de 4,18 a 5,75%, não havendo diferença ($p > 0,05$) estatística entre os IPS. Os teores médios de cobre nos IPS variaram de 18,22 a 20,67 $\mu\text{g/g}$, de ferro 90,14 a 105,49 $\mu\text{g/g}$, de manganês 12,20 a 14,19 $\mu\text{g/g}$, de zinco 24,91 a 32,80 $\mu\text{g/g}$, de cálcio 0,12 a 0,19%, de magnésio 0,03 a 0,04% e de potássio 0,13 a 0,70%. Os teores de sódio dos IPSMNB (3,31%) e IPSMLH (3,64%) foram significativamente ($p < 0,05$) superiores aos dos IPSNB (0,74%) e IPSLH (0,70%). O perfil de solubilidade dos IPS modificados foi semelhante ao da caseína humana, na faixa de pH de 2,0 a 5,0. O IPSNB apresentou significativamente ($p < 0,05$) maior capacidade de absorção de água do que os outros isolados, em todas as faixas de pH analisadas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de capacidade de absorção de óleo entre os isolados comerciais e modificados. A atividade emulsificante variou entre os tratamentos, principalmente em função do pH. Os IPS comerciais apresentaram valores de estabilidade emulsificante (EE) praticamente constantes em toda faixa de pH estudada. Entretanto, para os IPS modificados observou-se ligeira queda na EE em pH 6,0, com diminuição acentuada nos valores de pH 7,0 e 8,0. De modo geral, verificou-se que a modificação dos IPS comerciais melhorou a sua capacidade de formação de espuma. Os valores médios de PER (*Protein Efficiency Ratio*) e RPER (*Relative Protein Efficiency Ratio*) dos IPS variaram de 2,19 a 2,63% e de 58,22 a 69,94%, respectivamente, sendo significativamente ($p < 0,05$) inferiores aos encontrados para a caseína (3,77 e 100,00%). Os valores médios de NPR (*Net Protein Ratio*) e RNPR (*Relative Net Protein Ratio*) dos tratamentos foram significativamente

($p < 0,05$) menores que os da dieta-padrão de caseína (4,55 e 100,00%) e oscilaram de 3,21 a 3,64% e de 70,61 a 80,31%, respectivamente. Não houve diferença ($p > 0,05$) significativa entres os valores de PER e NPR entre os IPS comerciais e modificados. Os valores de DV dos IPSNB (94,16%), IPSMNB (93,52%) e IPSMLH (93,01%) não diferiram ($p > 0,05$) significativamente dos da caseína (95,52%) e entre eles. Contudo, a DV da caseína foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a DV do IPSLH (89,44%). A modificação do IPSLH permitiu melhoria na DV, quando comparada com a caseína. Entretanto, não houve diferença entre o IPSLH e o IPSMLH, o que sugere que pode haver relação entre solubilidade e DV. Os valores de PDCAAS estiveram na faixa de 81 a 86%. Além disso, supõe-se que os PDCAAS dos isolados modificados possam estar superestimados, em razão de se ter considerado o mesmo teor de aminoácidos dos IPS comerciais. Portanto, a modificação dos IPS comerciais, por meio da combinação de tratamento ácido e sal de polifosfato, proporcionou algumas alterações nas suas propriedades químicas e funcionais. Já na qualidade protéica, observou-se apenas melhora na DV do IPSMLH em relação à dieta-padrão de caseína.

ABSTRACT

SILVA, Maurício Henriques Louzada, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2007. **Development and characterization of a modified soybean protein isolate with a human milk casein solubility profile.** Adviser: José Carlos Gomes. Co-advisers: Marco Túlio Coelho Silva and Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Brazil has an outstanding position as the second largest soybean producing- country worldwide. The use of soybean derivatives as functional ingredients in food has led to a better acceptance of these products by consumers. Among the processed soybean protein products, soybean protein isolate (SPI) is the most elaborate, containing high protein content. Studies have shown that technological processing alterations may alter a particular functional property. However, few studies have evaluated whether such alteration would affect protein quality. Thus, this work aimed to modify two commercial soybean protein isolates (IPSNB and IPSLH) by altering their solubility profile. A moderate acid and polyphosphate salt treatment was applied so as to present solubility curves similar to that of human casein. The degree of the modification effect on the chemical and functional properties and protein quality of these isolates was also evaluated. The modified soybean protein isolates NB and LH (IPSMNB and IPSMLH) presented, respectively, mean moisture contents (6.60% and 6.20%) significantly ($p < 0.05$) lower compared to the commercial isolates (9.41% and 9.25%). The

mean lipid content was lower than 0.5% for both SPIs. IPSMNB and IPSMLH protein content was 82.60% and 83.61%, respectively lower than those recommended by legislation (88.00%). However, the ash content of these isolates was respectively 11.15% and 11.59%, significantly ($p < 0.05$) higher than those of IPSNB (4.37%) and IPSLH (5.00%), justifying the lower protein values obtained for these isolates. We suggest an additional phase be added to the isolate productive process to decrease the salt content found in these studies. Mean carbohydrate content ranged from 4.18 to 5.75%, with no significant difference ($p > 0.05$) being found between the SPIs. The SPI mean content ranges were the following: copper, (18.22 to 20.67 $\mu\text{g/g}$) iron (90.14 $\mu\text{g/g}$ to 105.49 $\mu\text{g/g}$), manganese (12.20 to 14.19 $\mu\text{g/g}$), zinc (24.91 $\mu\text{g/g}$ to 32.80 $\mu\text{g/g}$), calcium (0.12 to 0.19%), magnesium (0.03 to 0.04%) and potassium (0.13 to 0.70%). Sodium contents of IPSMNB (3.31%) and IPSMLH (3.64%) were significantly ($p < 0.05$) higher than those of IPSNB (0.74%) and IPSLH (0.70%). The modified SPI solubility profile was similar to that of human casein in the pH range from 2.0 to 5.0. IPSNB showed significantly ($p < 0.05$) higher water absorption capacity than the other isolates in all the pH ranges analyzed. No significant difference ($p > 0.05$) was found in the oil absorption capacity values between the commercial and modified isolates. The emulsifying activity varied among the treatments, especially in function of the pH. The commercial SPIs presented emulsifying stability (ES) values practically constant throughout the pH range studied. However, for the modified SPIs, a slight ES drop was observed in pH 6.0, with a marked decrease in pH values 7.0 and 8.0. Overall, modification of the commercial SPIs improved their foam formation capacity. The PER (Protein Efficiency Ratio) and RPER (Relative Protein Efficiency Ratio) mean values of the SPIs varied from 2.19 to 2.63 and from 58.22 to 69.94%, respectively, being significantly ($p < 0.05$) lower than those found for casein (3.77 and 100.00). The NPR (Net Protein Ratio) and RNPR (Relative Net Protein Ratio) mean values of the treatments were significantly ($p < 0.05$) lower than the casein standard diet (4.55 and 100.00). oscillating from 3.21 to 3.64 and 70.61 to 80.31%, respectively. No significant difference ($p > 0.05$) between the PER and NPR values was found between the commercial and

modified SPIs. The DV values of NBSPI (94.16%), IPSMNB (93.52%) and IPSMLH (93.01%) did not differ ($p > 0.05$) significantly from those of casein (95.52%) and between them. However, the casein DV was significantly higher ($p < 0.05$) than that of the IPSLH (89.44%). IPSLH modification allowed DV improvement when compared to casein. However, no difference was observed between IPSLH and IPSMLH, suggesting that there may be a relation between solubility and DV. The PDCAAS values ranged from 81 to 86%. The PDCAAS of the modified isolates are thought to be overestimated since the same amino acid content of the commercial SPI was considered. Thus, modification of commercial SPIs by combining acid treatment and polyphosphate salt caused some alterations in their chemical and functional properties while for protein quality enhancement, enhanced IPSMLH DV was observed only in relation to the casein standard diet.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja é considerada um dos alimentos básicos para a população mundial, principalmente a oriental, por sua qualidade nutricional, facilidade de cultivo, baixo custo e alta produção. Além disso, ela vem sendo estudada como alimento funcional devido às descobertas científicas associadas à prevenção de enfermidades, como alguns tipos de câncer, dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes e sintomas pós-menopausa (FRIEDECK, 2003).

A conversão direta da proteína de soja em alimentos nos países ocidentais é ainda muito pequena, visto que mais de 95% do grão de soja é utilizado na produção de óleo e de farelo destinados à ração animal. Entretanto, em razão do crescimento da população, a demanda por proteína de soja tem aumentado consideravelmente, embora os alimentos de origem animal ainda sejam a principal fonte protéica na dieta. Esta demanda tem incentivado a indústria de alimentos a utilizar proteínas vegetais nas suas formulações (LIU, 1997; RODRIGUES, 2003).

A introdução de produtos de soja na alimentação ocidental, sob a forma de ingredientes em diversas formulações alimentícias, tem aumentado sua aceitação por pessoas de todas as idades e de diferentes culturas. Os avanços na tecnologia de processamento da soja resultaram em uma variedade de produtos comerciais, que apresentam grande potencial de emprego como ingredientes em alimentos de utilização pelo ser humano.

Esses ingredientes têm aplicações nutricionais e funcionais em produtos cárneos, lácteos, formulações infantis, bebidas, produtos de confeitaria e outros (ENDRES, 2001; RUSSEL, 2004).

Diversos produtos protéicos podem ser obtidos da soja. Dentre eles está o isolado protéico, é produzido a partir do farelo de soja desengordurado. O produto é elaborado por um processo de fracionamento, apresentando no mínimo 88% de proteína (ENDRES, 2001; BRASIL 2005).

Fontes alternativas de proteínas têm sido estudadas em substituição às proteínas do leite de vaca, especialmente as proteínas da soja, em razão da incidência de alergia e intolerância às proteínas desse leite, que atingem cerca de 0,3 a 7,5% das crianças, principalmente nos primeiros anos de vida (MORO *et al.*, 2002). Estudos têm demonstrado que as formulações à base de soja são seguras e eficazes, proporcionando uma alternativa nutricional válida para pacientes com alergia ao leite de vaca. Além disso, elas são mais baratas e mais agradáveis sensorialmente, principalmente as do isolado protéico de soja, quando comparadas com as formulações de alto grau de hidrólise (MURARO *et al.*, 2002).

Sabe-se que a má-digestão das proteínas pode desencadear uma reação alérgica, em razão da maior permeabilidade da mucosa às frações alergênicas dessa proteína, e, conseqüentemente, ativar o sistema imune. A caseína do leite humano apresenta diferenças significativas quando comparada com a do leite de vaca, como as diferenças na coagulação da proteína, velocidade de esvaziamento gástrico e tempo de trânsito intestinal. A caseína do leite humano coagula em pequenos flocos macios e porosos, facilitando a ação enzimática; já a do leite de vaca forma coágulos firmes e mais resistentes, tornando a digestão mais difícil (RUDLOFF e KUNZ, 1997; EUCLYDES, 2005).

As proteínas de soja são mais eficazes no tratamento de crianças alérgicas às proteínas do leite de vaca, quando esta alergia é mediada por imunoglobulinas E (IgE), ou seja, alergia verdadeira. Entretanto, em crianças com intolerância ao leite de vaca, a ocorrência de intolerância à soja mostrou ser mais comum e, neste caso, formulações com alto grau de hidrólise são recomendadas (MORO *et al.*, 2002).

Este trabalho teve por objetivos elaborar isolados protéicos de soja modificados, por meio da alteração de sua curva de solubilidade, de modo que esses apresentassem um perfil de solubilidade semelhante, em função do pH, ao da caseína humana e avaliar suas propriedades químicas e funcionais e a qualidade protéica dos isolados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soja

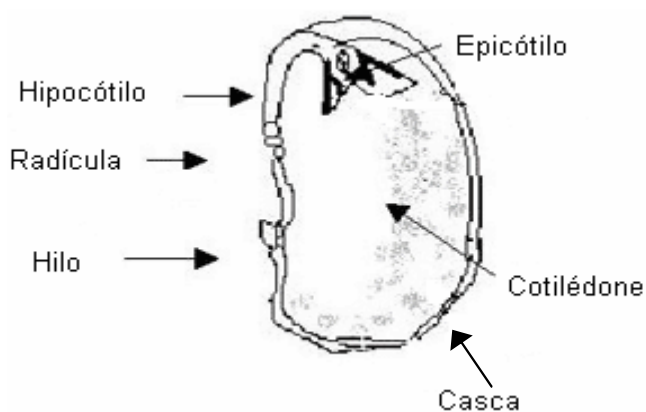
Historicamente, acredita-se que a soja originou-se na China, provavelmente nas regiões norte e central, entre 4.000 e 5.000 anos atrás. A planta foi registrada pelo imperador chinês Shen Nong, por volta de 2838 a.C., quando descreveu as plantas da China no seu livro (LIU, 1997).

A soja foi apresentada à Europa em 1712, pelo botânico alemão Engelbert Kaempfer. Na época, o botânico relacionou a leguminosa e os detalhes dos vários produtos alimentícios fabricados pelos japoneses. Nos Estados Unidos, a soja foi introduzida em 1804. Naquele país não houve registros de processamento de sua semente até 1922, quando toda a colheita já ultrapassava alguns milhões de toneladas. Primeiramente, o processamento de soja nos Estados Unidos visava apenas a obtenção de óleo, com toda massa restante destinada à alimentação de gado leiteiro e ao uso como fertilizante. Após a Segunda Guerra Mundial, quando uma deficiência mundial de proteínas para a alimentação humana foi detectada, deu-se atenção especial à soja, ocorrendo grandes avanços em novas tecnologias para a viabilização e aceitação de suas proteínas na alimentação humana (RUSSEL, 2004).

No Brasil, o agronegócio da soja teve sua expansão apenas na década de 1970, ganhando competitividade e elevando o País à condição de um dos maiores produtores e exportadores mundiais (GOMES, 2001).

Botanicamente, a soja pertence à família *Leguminosae*, à subfamília *Papilionoidae* e ao gênero *Glycine*, L. A forma cultivada, denominada *Glycine max* (L.) Merrill, cresce anualmente (LIU, 1997).

Morfologicamente, os grãos maduros consistem de três partes: o tegumento (casca) do grão, o embrião e uma ou mais estruturas de armazenamento (Figura 1). Porém, o grão da soja, como na maioria das outras leguminosas, é essencialmente destituído de endosperma, consistindo em um tegumento e um embrião bastante desenvolvido. Este último é constituído de dois cotilédones, que funcionam como estruturas de reserva. A semente é marcada com o hilo que varia da forma linear à oval. A casca protege o embrião de fungos e infecções bacterianas, antes e depois do plantio. Além dos cotilédones, o embrião apresenta três outras partes: radícula, hipocótilo e epicótilo. A radícula e o hipocótilo, juntos, são conhecidos como eixo embrionário ou gérmen. Estes se localizam abaixo da casca do grão, no fim do hilo. Estas partes podem ser observadas se o tegumento do grão é removido, mas é difícil de distinguir um do outro sem o auxílio de um microscópio. A terceira parte, o epicótilo, é muito pequena e está comprimida entre o par de cotilédones (LIU, 1997).

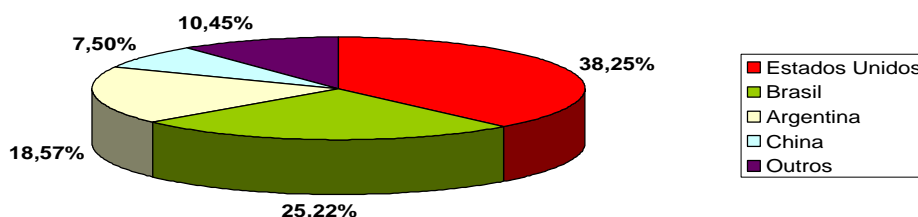


Fonte: adaptado de Liu (1997).

Figura 1 – Estrutura da semente de soja.

2.2. Produção de soja

A produção mundial de soja no período 2005/2006 foi de aproximadamente 218,04 milhões de toneladas, em uma área plantada de 92,37 milhões de hectares. Os maiores produtores foram Estados Unidos, Brasil, Argentina e China (Figura 2) (USDA, 2007).



Fonte: adaptado de USDA (2007).

Figura 2 – Produção mundial de soja no mundo.

A produção nacional (2005/2006) foi de aproximadamente 55 milhões de toneladas, em uma área plantada de 22,2 milhões de hectares. A Região Centro-Oeste foi a maior produtora (26 milhões), seguida da Região Sul (19,7 milhões), Sudeste (4,0 milhões), Nordeste (3,5 milhões) e Norte (1,2 milhão) (CONAB, 2007).

2.3. Composição da soja

A composição da semente da soja depende de diversos fatores, como variedade, época de plantio, local geográfico e clima. A soja é um dos produtos mais econômicos e valiosos do setor agrícola, em razão da sua composição química, que é única, possuindo maior teor de proteína (aproximadamente 40%) que os cereais e as leguminosas de outras espécies, que possuem teor entre 8 e 15%. Outra razão é a presença de óleo (20%), o segundo maior entre as leguminosas comestíveis. Outros componentes importantes encontrados na soja incluem fosfolípidos, vitaminas e minerais. Além disso, a soja contém muitas substâncias secundárias, como inibidores de tripsina, fitatos e oligossacarídeos. Outros

componentes, como as isoflavonas, são reportados por sua capacidade de diminuir o risco de ocorrência de câncer e outras doenças (LIU, 1997; SAIDU, 2005). Em média, a soja é constituída de 40% de proteína, 35% de carboidratos, 20% de lipídios e 5% de cinzas (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química (%) aproximada do grão de soja nas partes estruturais de sua semente

| Partes da semente | Proteína* | Lipídio* | Carboidrato* | Cinzas* |
|-------------------|-----------|----------|--------------|---------|
| Grão | 40 | 20 | 35 | 5,0 |
| Cotilédone | 43 | 23 | 29 | 5,0 |
| Casca | 9 | 1 | 86 | 4,3 |
| Hipocótilo | 41 | 11 | 43 | 4,4 |

* base seca.

Fonte: Liu (1997).

2.3.1. Proteínas da soja

A maior parte das proteínas está armazenada nos cotilédones, sob a forma de aleuronas ou corpos protéicos. A maioria delas é globulina e tem massa molar acima de 100 kDa. As globulinas da soja têm solubilidade mínima em valores de pH entre 3,7 e 5,2 e máxima em pH entre 1,5 e 2,5 e acima de pH 6,3. Além disso, seu ponto isoelétrico está situado entre pH 4,2 e 4,6. A proteína da soja tem maior valor nutricional que outras fontes de proteínas vegetais destinadas à alimentação humana, apresentando alto teor de lisina (SAIDU, 2005).

As proteínas da soja, solúveis em água, são caracterizadas de acordo com a sua massa molar, ou por seus coeficientes de sedimentação, sendo classificadas em grupos denominados 2S, 7S, 11S e 15S. As frações 7S (β -conglucina) e 11S (glicina) são os principais componentes protéicos e constituem a maior parte da proteína total. De particular importância entre os componentes de menor ocorrência estão os inibidores de tripsina, que fazem parte da fração 2S, que são fatores antinutricionais. Esses fatores, se não inativados, têm efeito negativo na digestibilidade e, conseqüentemente, na eficiência nutricional da proteína. Outro componente que pode causar problemas nas aplicações da proteína da soja é a lipoxigenase. Essa enzima

catalisa a oxidação de lipídios que contêm ácidos graxos insaturados, e os produtos da oxidação conferem características indesejáveis ao alimento, como o sabor de “mato” ou “feijão cru” (MCKLEM, 2002).

2.3.1.1. Classificação e nomenclatura das proteínas

O fracionamento e a classificação das proteínas de soja são bem complexos. Além disso, diferentes sistemas de nomenclatura para proteínas ou frações protéicas são usados na literatura. Isto se deve, em parte, à complexidade das proteínas das sementes e, em parte, aos diferentes métodos utilizados para extração e isolamento (PEARSON, 1983).

Com base nas funções biológicas da planta, existem dois tipos de proteínas: metabólicas e de reserva. As metabólicas incluem enzimas e proteínas estruturais, e estão ligadas à atividade celular normal, incluindo a síntese do segundo tipo. As proteínas de reserva, juntamente com os depósitos de óleo, são formadas durante o desenvolvimento do grão. Após a germinação do grão, vão fornecer nitrogênio e esqueletos de carbono para o desenvolvimento da planta. A maior parte das proteínas da soja é deste tipo (LIU, 1997).

Em relação aos padrões de solubilidade, as proteínas das leguminosas são divididas em albuminas e globulinas. As albuminas são solúveis em água e as globulinas, em soluções salinas. Sob esta classificação, a maior parte das proteínas da soja é de globulinas. Estas, presentes em diversas leguminosas, são divididas em dois tipos: leguminas e vicilinas. As leguminas têm massa molar maior, são menos solúveis em solução salina e mais estáveis termicamente que as vicilinas. Também constitui a maior parte das globulinas das leguminosas (SAIDU, 2005; ZARKADAS *et al.*, 2007).

Certas proteínas da soja têm nomes triviais. Por exemplo, os dois tipos de globulinas, isto é, as leguminas e vicilinas, são comumente denominadas glicininas e conglicininas, respectivamente. Os nomes derivam do nome científico da soja, *Glycine max*. Outras, particularmente as enzimas, são nomeadas de acordo com sua função biológica, como hemaglutininas, inibidores de tripsina e lipoxigenase (LIU, 1997).

Embora a classificação baseada na solubilidade em vários solventes forneça meios convenientes para comparar as proteínas de vários grãos, não se pode assegurar que o mesmo polipeptídeo não seria extraído por mais de uma técnica de solubilidade, devido à sua associação com outras proteínas. Meios mais precisos para identificar proteínas têm sido baseados nos coeficientes de sedimentação aproximados, usando ultracentrifugação para separar as proteínas. Sob condições apropriadas de tampão, as proteínas de soja apresentam quatro frações após a ultracentrifugação, designadas como 2, 7, 11 e 15S, em que S é a unidade Svedberg (Tabela 2) (PEARSON, 1983; RADOVIC *et al.*, 1999).

Tabela 2 – Componentes das frações extraídas em água e ultracentrifugadas das proteínas de soja

| Valor de sedimentação (S _{w20}) | Porcentagem total (%) | Componentes identificados | Massa molar (Da) |
|---|-----------------------|---------------------------|------------------|
| 2S | 22 | Inibidores de tripsina | 8.000-21.500 |
| | | Citocromo C | 12.000 |
| 7S | 37 | Hemaglutinina | 110.000 |
| | | Lipoxigenase | 102.000 |
| | | β-amilases | 61.700 |
| | | 7S globulina | 180.000-210.000 |
| 11S | 31 | 11S globulina | 350.000 |
| 15S | 11 | – | 600.000 |

Fonte: Pearson (1983).

Geralmente, a análise das frações mostra que as 11S e 15S são proteínas puras. Mais especificamente, 11S é a glicinina e corresponde à aproximadamente 31% das proteínas extraíveis, enquanto a fração 15S é considerada um polímero de glicinina, correspondendo mais ou menos 10% das proteínas extraíveis. Em contraste, as frações 2S e 7S são heterogêneas; a fração 2S compõe cerca de 20% das proteínas extraíveis e inclui os inibidores de tripsina de *Kunitz* e *Bowman-Birk* e o citocromo C; e a fração 7S corresponde ao terço complementar das proteínas extraíveis e consiste de β-conglicinina, β-amilase, lipoxigenase e hemaglutinina (PEARSON, 1983).

A fração 11S e a glicinina referem-se à mesma globulina de soja, enquanto a globulina 7S e a β -conglucina são apenas um componente da fração 7S. Deve-se também reforçar que os termos 2S, 7S, 11S e 15S são apenas para propósito de classificação e identificação. Não implicam que as constantes de sedimentação sejam sempre esses exatos números inteiros em diferentes estudos. Na verdade, essas constantes, assim como os padrões de separação das diferentes frações, dependem das condições de composição do tampão, do pH e de outros fatores. Por exemplo, uma porção da fração 7S observada a pH 7,6 e 0,5 de força iônica dimeriza a 0,1 de força iônica, formando um pico de 9S (WOLF, 1969, citado por LIU, 1997).

2.3.1.2. Principais proteínas de reserva

Localizadas nas organelas conhecidas como corpos protéicos, as proteínas de reserva constituem a maior parte das proteínas totais do grão. As proteínas de reserva das leguminosas são grandes moléculas multiméricas de pelo menos dois tipos principais, como a β -conglucina e a glicinina, cada qual consistindo de uma família de moléculas intimamente relacionadas. Elas contêm mais aminoácidos amidas (asparagina e glutamina) e argininas e menos aminoácidos sulfurados que as proteínas metabólicas médias, embora tenham ponto isoelétrico ácido (LIU, 1997).

Em razão das diferenças em sua composição e estrutura, as duas maiores globulinas da soja, β -conglucina (7S) e glicinina (11S), exibem diferenças em sua qualidade nutritiva e em suas propriedades funcionais. Geralmente, a globulina 11S contém uma quantidade três a quatro vezes maior de metionina e cisteína por unidade de proteína do que a proteína 7S. Sendo a soja geralmente insuficiente nesses aminoácidos sulfurados, a proteína 11S torna-se mais valiosa do ponto de vista nutritivo (ZARKADAS et al., 2007).

Quanto às propriedades funcionais, exibem diferenças em relação à capacidade de formar gel, à estabilidade térmica e à capacidade de formar emulsões. Em geral, a proteína 11S possui melhor habilidade para formar gel que a 7S. Por outro lado, a proteína 7S tem maior capacidade de emulsionar e maior estabilidade de emulsão que a proteína 11S. A glicinina

tem apresentado exercer um efeito significativo na firmeza do gel para *tofu* (LIU, 1997; POYSA *et al.*, 2006).

2.3.2. Lipídios da soja

Os grãos da soja armazenam seus lipídios, principalmente na forma de triglicerídeos, em organelas denominadas corpos lipídicos. Após a maturação da semente, eles são encontrados nas células vizinhas às aleuronas (PEARSON, 1983).

Os lipídios da soja são constituídos por triglicerídeos, fosfolipídeos, matéria insaponificável (esteróis, tocoferóis, hidrocarbonetos) e ácidos graxos livres. A lecitina, que é constituída dos três mais importantes fosfolipídeos, a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol, é um subproduto do óleo de soja e amplamente utilizada como emulsionante (RUSSEL, 2004). Estudos atribuem à fosfatidilserina a propriedade de ter um efeito benéfico à memória e ao coração, enquanto a fosfatidilcolina tem a propriedade de auxiliar na desintoxicação do fígado (SOUZA *et al.*, 2000).

O ácido graxo encontrado em maior porcentagem no óleo de soja é o ácido linoléico, decrescendo os demais ácidos graxos na seguinte ordem: oléico, palmítico, linolênico e ácido esteárico (SAIDU, 2005).

2.3.3. Vitaminas

A soja contém tanto vitaminas hidrossolúveis quanto lipossolúveis. A tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), a niacina (vitamina B₃), o ácido pantotênico (vitamina do complexo B) e o ácido fólico são as vitaminas hidrossolúveis presentes na soja. Já as vitaminas lipossolúveis biodisponíveis encontradas na soja são a A e E (LIU, 1997).

As vitaminas têm atenção especial, em razão da sua grande importância no organismo humano. Quando as proteínas da soja são ingeridas em quantidade equivalente à metade das necessidades humanas diárias, o grão consumido proverá também vitaminas na proporção de 30 a 50% da Ingestão Diária Recomendada (IDR), sendo as principais a tiamina, a riboflavina e a niacina (PEARSON, 1983).

2.3.4. Minerais

Os elementos minerais têm muitas funções essenciais, tanto como íons dissolvidos em líquidos orgânicos, quanto como constituintes de compostos essenciais. Os minerais auxiliam na regulação da atividade de muitas enzimas, mantêm o equilíbrio ácido-base e a pressão osmótica e facilitam a transferência de compostos essenciais através da membrana (CZAJKA-NARINS, 1994, citado por ENDRES, 2001).

Os produtos à base de proteína de soja contêm quantidades expressivas de minerais (Tabela 3). Dentre os minerais presentes na soja, o potássio apresenta a maior concentração, seguido por fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloro e sódio, devendo ser ressaltado que o conteúdo destes minerais atinge valores médios entre 0,2 e 2,1%. Também, verifica-se uma quantidade de cálcio biodisponível presente no grão de soja cerca de quatro vezes maior que a quantidade que se faz presente no extrato hidrossolúvel de soja (leite de soja). Este último tem uma quantidade do mineral aproximadamente igual àquela presente no leite de vaca. Os minerais presentes em menores proporções na soja e nos seus produtos incluem o silício, ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio, flúor, cromo, selênio, cobalto, cádmio, mercúrio, iodo, chumbo e arsênio, podendo o conteúdo destes minerais variar de 0,01 a 140 ppm. Assim como outros componentes, os minerais na soja também são influenciados pela variedade, estação e localidade de plantio (PERKINS, 1995; ENDRES, 2001).

2.3.5. Carboidratos e fibras

A soja contém, aproximadamente, 30% de carboidratos totais, apresentando 15% de carboidratos solúveis e 15% de insolúveis. Dos carboidratos solúveis, a soja madura contém quantidades-traço de monossacarídeos, como glicose e arabinose, e quantidades significativas de dissacarídeos e oligossacarídeos, com a sacarose variando de 2,5 a 8,2%, a rafinose de 0,1 a 0,9% e a estaquiose de 1,4 a 4,1%. Basicamente, os oligossacarídeos na soja são açúcares não-redutores, contendo duas ou mais unidades de frutose, glicose e galactose. Dentre os carboidratos

Tabela 3 – Composição em minerais dos principais produtos de soja

| Elemento | Farinha desengordurada de soja (%) | Concentrado protéico de soja (%) | Isolado protéico de soja (%) |
|----------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Potássio | 2,4-2,7 | 0,1-2,4 | 0,1-1,4 |
| Fósforo | 0,7-0,9 | 0,6-0,9 | 0,5-0,8 |
| Cálcio | 0,2-0,3 | 0,2-0,4 | 0,1-0,2 |
| Magnésio | 0,2-0,3 | 0,3 | 0,03-0,09 |
| Cloro | 0,1-0,3 | 0,7 | 0,13 |
| Ferro | 0,01 | 0,01-0,02 | 0,01-0,02 |
| Zinco | 0,005 | 0,005 | 0,004-0,009 |
| Manganês | 0,003-0,004 | 0,005 | 0,002 |
| Sódio | 0,003-0,015 | 0,002-1,2 | 0,04-1,2 |
| Cobre | 0,001-0,002 | 0,001-0,002 | 0,001-0,02 |

Fonte: adaptado de ENDRES (2001).

solúveis, a rafinose e a estaquiose recebem mais atenção, principalmente em razão da sua presença estar relacionada com a flatulência e as dores abdominais, quando humanos consomem a soja e os seus produtos (NACZK *et al.*, 1997; RUSSEL, 2004).

Os carboidratos insolúveis são componentes estruturais encontrados, principalmente, nas paredes celulares. A casca constitui aproximadamente 8% do grão de soja total, contendo 86% de carboidratos, conforme apresentado na Tabela 1 (LIU, 1997). Entretanto, ela pode contribuir com uma quantidade significativa de carboidratos insolúveis no farelo, quando este é obtido junto da casca (ENDRES, 2001).

A fibra dietética é o conjunto de compostos que resistem à hidrólise por meio das enzimas do aparelho digestivo. Esses componentes incluem celulose, hemicelulose, lignina, substâncias pécticas, gomas e mucilagens. Elas aumentam a velocidade do trânsito intestinal (celulose) e alteram a microflora para uma microflora mais saudável (celulose, hemicelulose, galactanas e pentosanas) (PEREIRA e OLIVEIRA, 2004).

As fibras estão presentes em quantidades significativas na soja e têm sido apontadas como fator benéfico à saúde, como a redução do risco de câncer de cólon, do colesterol sanguíneo, da pressão sanguínea e dos níveis de glicose no sangue (ENDRES, 2001; PEREIRA e OLIVEIRA, 2004).

2.3.6. Isoflavonas

As isoflavonas são compostos difenólicos heterocíclicos, de ocorrência natural, cuja distribuição no reino vegetal está praticamente limitada à subfamília *Papilionoideae* das *Leguminosae*, em que as sementes de soja destacam-se como a principal fonte (MURKIES, 1998). Em função de sua atividade estrogênica em humanos, são conhecidas como fitoestrógenos. Quimicamente, são moléculas orgânicas pertencentes ao subgrupo dos flavonóides, apresentando diversas funções nos tecidos animais e vegetais (SAIDU, 2005).

Nos últimos anos, vários trabalhos científicos têm sido publicados, expondo os diversos modos nos quais as isoflavonas podem ajudar na manutenção da saúde humana. Devido ao extensivo consumo dos produtos de soja pelos asiáticos, estudos epidemiológicos têm mostrado uma possível relação entre as isoflavonas e a prevenção de doenças crônico-degenerativas, como doenças cardiovasculares, osteoporose e cânceres de mama, cólon e próstata, quando comparado com a dieta dos ocidentais, pobre nessa leguminosa (BROUNS, 2002; SAIDU, 2005). As principais isoflavonas de ocorrência em leguminosas, sob a forma de agliconas, são a genisteína, daidzeína e gliciteína, estando primariamente presentes sob as formas de glicosídeos conjugados (genistina, daidzina e glicitina) ou seus derivados 4'-metoxi (biochanina A e formononetina, respectivamente) (PEREIRA e OLIVEIRA, 2004).

As isoflavonas ocorrem naturalmente em vegetais, principalmente sob a forma glicosídica. Após a ingestão, elas são hidrolisadas e desmetiladas pelas enzimas hidrolíticas das bactérias intestinais, liberando as formas agliconas livres, bem como os produtos demetilados. No lúmen, as bactérias convertem grande parte dessas agliconas em outras moléculas (SAIDU, 2005).

A concentração e o tipo de isoflavonas variam em função das técnicas de processamento, para obtenção do produto final. Os produtos tradicionais fermentados (*miso*, *tempeh*) contêm altas concentrações das formas agliconas, genisteína e daidzeína, resultantes da ação enzimática da β -glicosidase, enquanto produtos não-fermentados, como grãos secos, extrato

hidrossolúvel de soja, farinha de soja e tofu, contêm altas concentrações dos glicosídeos, genistina e daidzina (WANG e MURPHY, 1994).

Informações limitadas estão disponíveis sobre os efeitos de vários tipos de processamentos sobre a retenção de isoflavonas, especialmente em sementes de soja processadas. Wang e Murphy (1996) investigaram o efeito de diferentes métodos de processamento em função da retenção, distribuição e transformação das isoflavonas por meio do estudo do balanço de massa, durante o processamento de quatro produtos derivados da soja: *tempeh*, extrato hidrossolúvel de soja, tofu e isolado protéico de soja. As perdas no teor das isoflavonas nas etapas do processamento foram: imersão em água (12%), tratamento térmico (49%), coagulação do tofu (44%) e (53%) na extração alcalina do isolado protéico de soja.

2.4. Os produtos da soja

Existem diferenças na maneira de como o ocidente e o oriente utilizam a soja na alimentação. No oriente, tradicionalmente, a soja é preparada como alimento para o consumo imediato, como o *tofu* (queijo de soja), leite de soja, broto de soja, *miso*, *natto*, *tempeh* e outros. No ocidente, a soja é destinada à produção de óleo e farelo desengordurado, sendo este utilizado principalmente como ração animal. Somente uma pequena porção é processada como ingredientes de soja, como farinha de soja (56-59% de proteína), concentrado protéico de soja (65-72% de proteína) e isolado protéico de soja (88-92% de proteína). Estes ingredientes têm uma aplicação nutricional e funcional em vários tipos de produtos cárneos, lácteos, fórmulas infantis e também alimentos de soja denominados como nova geração de produtos à base de soja (FRIEDECK, 2003; RUSSEL, 2004). A Tabela 4 apresenta as aplicações em alimentos dos principais produtos da soja.

Em razão dessa diferença na aplicação da soja, dois grupos diferentes de grãos de soja surgiram, ou seja, os grãos utilizados na alimentação humana e grãos para extração de óleo. Desse modo, os grãos destinados à extração de óleo constituem a soja convencional, enquanto os chamados grãos para alimentação humana foram especialmente selecionados. Na realidade, estes grãos não diferem fundamentalmente na

Tabela 4 – Aplicação dos principais produtos de soja em alimentos

| Produtos da soja | Aplicações |
|--------------------------------|--|
| Farinha de soja desengordurada | Substitutos de carne Substituto de leite em pó desnatado Cereais matinais Alimentos infantis Produtos <i>diet</i> Mistura em pó para preparo de sopas Confeitaria |
| Concentrado protéico de soja | Carnes processadas Congelados Produtos matinais Alimentos infantis |
| Isolado protéico de soja | Leites imitação, sem lactose Mistura em pó para preparo de bolos e tortas Bebidas Panificação Carnes processadas Mistura em pó para preparo de sopas Substituto de carnes Fórmulas infantis Misturas em pó para dietas de emagrecimento Misturas em pós para atletas/esportistas Achocolatados Sobremesas Barras nutricionais/energéticas Sorvetes Chantily Capuccino |

Fonte: adaptado de Endres (2001) e Friedeck (2003).

sua composição química, exceto que os últimos apresentam casca mais fina, teor protéico mais elevado, teor de óleo reduzido e menor produtividade (ORTHOEFER e LIU, 1995). Na Tabela 5 está listado um grande número de produtos de soja que se derivam dos dois primeiros grupos de grãos. Dentre os produtos de soja existentes, verifica-se que alguns já se consolidaram no mercado, ou por sua importância na alimentação ou como coadjuvantes tecnológicos (LIU, 1997).

A farinha de soja desengordurada e o farelo são os produtos derivados da soja que são menos refinados, obtidos por trituração e peneiramento, sendo desengordurados antes deste processo (ENDRES 2001; RUSSEL, 2004).

Os concentrados protéicos de soja são preparados com o objetivo de remover os carboidratos solúveis a partir da farinha de soja desengordurada,

Tabela 5 – Principais produtos derivados da soja

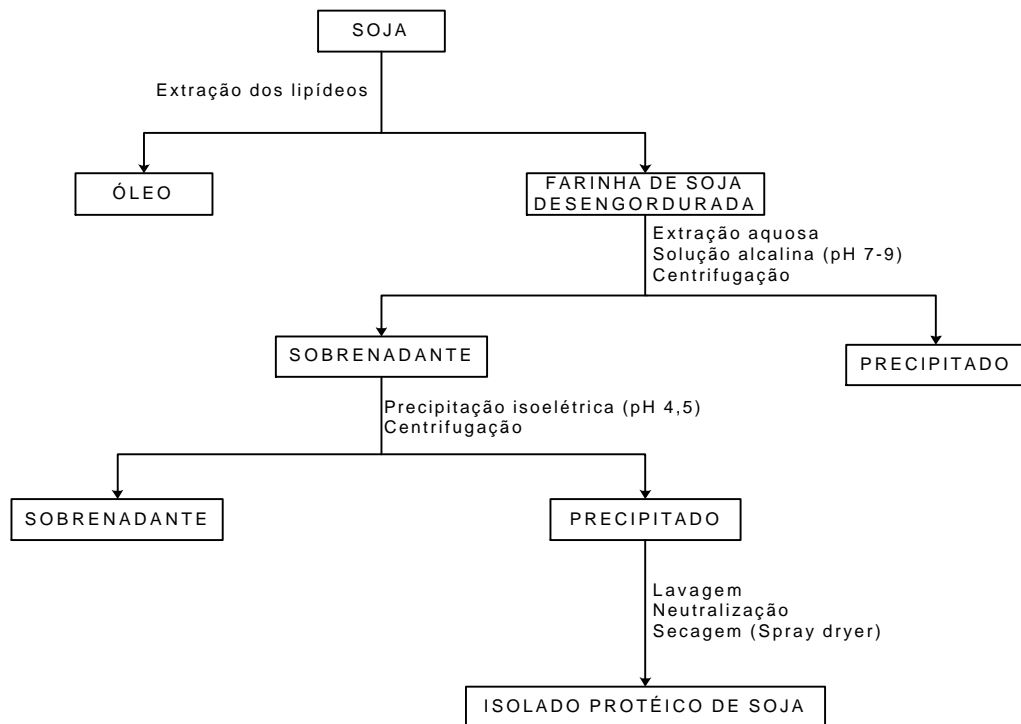
| Grupos de produtos | Produtos Finais |
|--|--|
| Óleo de soja | Óleo para fritura Óleos para salada Margarinas Gordura para fabricação de bolos |
| Farelo desengordurado de soja | Farelo e farinha de soja Concentrado protéico de soja Isolado protéico de soja Proteína texturizada de soja |
| Alimentos tradicionais à base de soja | Grãos Extrato hidrossolúvel de soja (leite de soja) Tofu (queijo de soja) Yuba (nata de leite de soja) Broto de soja Shoyu (molho de soja) Miso Tempeh Nuggets de soja |
| Nova geração de alimentos à base de soja | Sorvete de soja Iogurte de soja, queijo de soja Hambúrguer de soja Imitações de carnes |

Fonte: adaptado de Liu (1997).

o que pode ser feito geralmente de dois modos: extração alcoólica ou lavagem em solução ácida (FRIEDECK, 2003).

2.4.1. Isolado protéico de soja

O isolado protéico de soja é definido como um produto que contém no mínimo 90% de proteína. A Figura 3 apresenta o fluxograma do processo convencional de obtenção do isolado protéico de soja comercial. O processo de preparo pode ser resumido como: extração da farinha desengordurada com solução alcalina diluída (pH ajustado para 9,0); centrifugação para eliminar o resíduo insolúvel (fibras e polissacarídeos insolúveis) e obter o extrato alcalino; adição de ácido até pH do ponto isoelétrico (pH 4,5); e centrifugação para obtenção do precipitado (isolado isoelétrico) e do sobrenadante (soro), que contém os constituintes solúveis, como açúcares, estaquiose, rafinose, sais, proteínas não-precipitadas e nitrogênio solúvel. Após essa etapa o precipitado é lavado com água fria, para eliminar o



Fonte: adaptado de Murad (1993).

Figura 3 – Fluxograma do processo de obtenção de um isolado protéico de soja comercial.

resíduo do ácido e os constituintes solúveis, e neutralizado com álcali até pH 7-8, para dispersão do precipitado e secagem da proteína isolada por atomização (*spray dryer*) (MURAD, 1993).

Os isolados protéicos de soja foram primeiramente desenvolvidos para serem utilizados apenas como substitutos de carnes ou carnes reestruturadas. Entretanto, os isolados são caracterizados pela sua versatilidade de aplicação em diversos produtos (Tabela 4). O modo como essa proteína vai ser utilizada em uma determinada aplicação comercial do alimento vai depender de suas propriedades funcionais, como solubilidade, gelificação, emulsificação e espumabilidade (FRIEDECK, 2003).

Além disso, o procedimento comercial descrito anteriormente pode sofrer variações tanto nas etapas do processo quanto no produto final, com o objetivo de produzir isolados com funções, usos e propriedades específicas. Por exemplo, a variação de temperatura durante a extração aquosa, o tipo de extração, o pH e o uso de reagentes alcalinos podem variar durante o processo (MCKLEM, 2002).

2.5. Propriedades funcionais das proteínas de soja

O termo propriedade funcional tem sido definido como qualquer propriedade de um alimento ou componente de um alimento, excetuando-se as nutricionais, que afeta sua utilização como ingrediente em um alimento, principalmente sobre o caráter sensorial (HALL, 1996). As propriedades funcionais das proteínas são as propriedades físico-químicas que influem no seu comportamento nos sistemas alimentícios durante a preparação, o processamento, o armazenamento e o consumo.

Uma definição mais simples das propriedades funcionais foi sugerida por Araújo (1984), segundo o qual elas são propriedades físico-químicas que dão informações de como as proteínas se comportarão em um sistema alimentício. Portanto, o estudo das propriedades funcionais é o fator que determina o campo de aplicação de um novo ingrediente protéico.

O estudo das propriedades funcionais é essencialmente importante na determinação do potencial de aplicação dos produtos protéicos de soja, permitindo também definir o uso das proteínas como substituto ou complemento protéico de alimentos tradicionais (Tabela 6). A funcionalidade de um produto não depende somente das proteínas, mas também de outros componentes que fazem parte de sua composição, como lipídios e carboidratos (KINSELLA, 1979; FENNEMA, 1996).

Segundo Damodaran (1996), as propriedades funcionais das proteínas podem ser modificadas por meio da utilização de agentes físicos, químicos e biológicos, nos processos de obtenção ou isolamento de proteínas. O tipo de extração empregado, a temperatura, o pH, a força iônica e as condições de secagem e estocagem da proteína isolada são fatores que podem afetar as suas propriedades funcionais.

2.5.1. Solubilidade

A solubilidade de uma proteína é definida como a porcentagem de proteína que se mantém em solução ou dispersão coloidal sob condições específicas e que não sedimenta com forças centrífugas moderadas (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Tabela 6 – Propriedades funcionais dos produtos protéicos de soja nos alimentos

| Propriedade funcional | Mecanismo | Alimento | Proteínas de soja |
|---|---|---|--|
| Solubilidade | Capacidade de hidratação | Bebidas | FS ^{1/} , CPS ^{2/} e IPS ^{3/} |
| Capacidade de absorção e retenção de água | Pontes de hidrogênio e hidratação iônica | Produtos cárneos (salsichas), bolos, pães | FS, CPS, IPS |
| Viscosidade | Forças hidrodinâmicas e ligação com água | Sopas, molhos | FS, CPS, IPS |
| Gelificação | Formação de uma matriz protéica | Carnes, queijos, sorvetes, sobremesas | CPS, IPS |
| Elasticidade | Pontes dissulfídicas intramoleculares e ligações hidrofóbicas | Carnes, produtos de panificação | IPS |
| Emulsificação | Formação de uma emulsão entre duas fases imiscíveis | Salsichas, sobremesas, sopas, tortas | FS, CPS, IPS |
| Espumabilidade | Formação de um filme para incorporar ar | Substituto de ovo, produtos de padaria e pastelaria, sorvetes | IPS, SS ^{4/} |

^{1/} FS = farinha de soja; ^{2/} CPS = concentrado protéico de soja; ^{3/} IPS = isolado protéico de soja; e ^{4/}SS = soro de soja.

Fonte: adaptado de Liu (1997).

A solubilidade da proteína de soja é uma propriedade físico-química relacionada com outras propriedades funcionais, razão pela qual é a primeira propriedade estudada em uma investigação sistemática. As principais propriedades funcionais afetadas pela solubilidade da proteína são gelificação, espumabilidade, emulsificação e capacidade de absorção de água (VOJDANI, 1996).

A solubilidade de uma proteína é uma manifestação termodinâmica do equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-água. As maiores interações que influenciam as características de solubilidade das proteínas são a natureza hidrofóbica e iônica. As interações hidrofóbicas favorecem as interações proteína-proteína, que resulta em um decréscimo na solubilidade, enquanto interações iônicas favorecem as interações proteína-água e resultam em aumento de solubilidade. A mudança de pH, portanto, altera a distribuição de sítios polares catiônicos, aniônicos e não-iônicos na molécula

de proteína, que afetam as interações água-proteína e proteína-proteína (FENNEMA, 1996).

No ponto isoelétrico (PI), a molécula de proteína possui carga líquida igual a zero, apresentando máxima interação eletrostática entre grupos carregados e interação mínima com água ocorrendo, portanto, agregação e precipitação. No PI, os grupos carregados não estão disponíveis para interagir com as moléculas de água, enquanto para valores de pH elevados ou menores que o PI a proteína apresenta cargas elétricas positivas e negativas, respectivamente, e as moléculas de água podem interagir com estas cargas, contribuindo para a sua solubilização. A solubilidade de uma proteína é afetada por fatores como massa molar e conformação das moléculas; densidade e distribuição das cargas elétricas, que é influenciada pelo pH; natureza e concentração de íons ou força iônica; polaridade do solvente; e temperatura e condições de processamento (DAMODARAN, 1996; ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Esses agentes afetam a solubilidade das proteínas, principalmente, por ocasionar alterações nas interações iônicas, hidrofóbicas e hidrofílicas na superfície da proteína. As proteínas de soja são menos solúveis em sua região do ponto isoelétrico (pH 4,2-4,6), e a solubilidade aumenta acima e abaixo desta faixa de pH (LIU, 1997).

Shen (1976) estudou os efeitos de pH e força iônica sobre a solubilidade de um isolado protéico de soja. Em pH 6,8, a solubilidade desse isolado decresceu ligeiramente com uma força iônica igual a 0,05 M, permanecendo constante com o aumento da força iônica. Em pH 4,7, entretanto, houve elevação da solubilidade com o aumento da força iônica, atingindo um valor máximo com força iônica igual a 0,6 M; enquanto em pH 2,0 a solubilidade decresceu progressivamente com o aumento da força iônica, atingindo um valor mínimo de solubilidade com força iônica igual a 0,6 M. O autor demonstrou que ambos, pH e força iônica, alteram a solubilidade das proteínas, em razão de seus efeitos sobre as forças eletrostáticas.

Geralmente, a solubilidade de uma proteína aumenta com a temperatura de 0 a 40°C. Acima disso, a proteína pode desnaturar, expondo, conseqüentemente, os grupos não-polares (hidrofóbicos), o que ocasiona agregação e precipitação, decrescendo a solubilidade (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Em adição ao efeito da força iônica, certos tipos específicos de íons de sais exercem efeitos sobre as características de solubilidade das proteínas. Enquanto o efeito da força iônica de sais atua sobre as forças eletrostáticas da proteína, os efeitos iônicos específicos de sais estão relacionados com seus efeitos sobre as forças hidrofóbicas. Shen (1981), citado por Damodaran (1996), estudou os perfis de solubilidade de um isolado protéico de soja em diversas soluções salinas de sódio. Dentre os vários sais testados, os sais de sulfito apresentaram efeito mais forte em reduzir a solubilidade das proteínas de soja. Para todos os outros sais, quando a força iônica aumentou, a solubilidade do isolado decresceu até a concentração salina atingir 0,1 M e aumentou acima desta concentração.

De modo geral, a solubilidade de uma proteína é influenciada pela maior ou menor afinidade das moléculas de proteínas pelo solvente, que no caso dos alimentos é a água. Em razão disso, a solubilidade é classificada como uma propriedade hidrofílica (SGARBIERI, 1996).

2.5.2. Emulsificação

Uma emulsão pode ser definida como a mistura de dois líquidos imiscíveis, um dos quais é disperso na forma de glóbulos (fase dispersa) no outro líquido (fase contínua). A principal característica de um agente emulsificante é a de possuir, na mesma molécula, partes hidrofílicas e hidrofóbicas, ou seja, apresenta característica anfifílica (HILL, 1996).

De modo geral, a capacidade emulsificante dos produtos protéicos de soja aumenta com o aumento da solubilidade da proteína, enquanto o isolado protéico de soja comercial, que é geralmente seco pelo processamento térmico, tem uma fraca propriedade emulsificante, visto que apresenta baixa solubilidade (MITIDIERI e WAGNER, 2002). Embora a estabilidade de emulsão aumente com a concentração da proteína, a capacidade de emulsão geralmente decresce. O pH, a força iônica e a temperatura de um sistema também afetam a emulsificação das proteínas de soja. Por exemplo, as propriedades de emulsão são ótimas em condições alcalinas, porém são fracas, quando obtidas na faixa de pH 5 a 6. A capacidade de emulsão decresceu quando a temperatura aumentou de

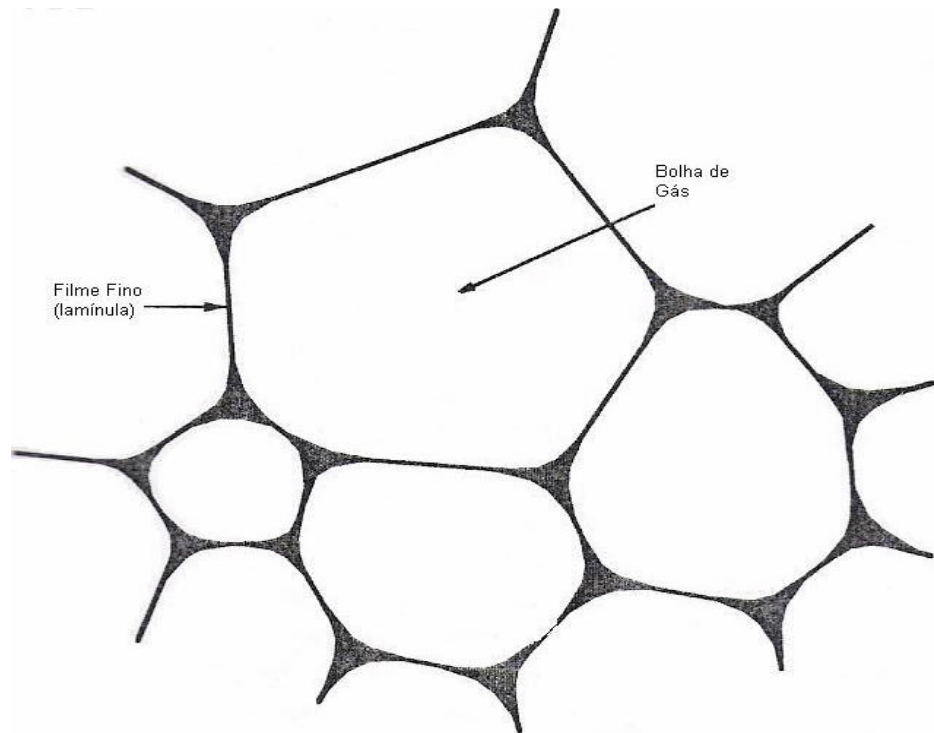
50°C. A capacidade emulsificante das proteínas de soja aumentou para 42%, quando a força iônica da dispersão da proteína aumentou de 0,03 para 0,05, em pH 7 (LIU, 1997).

2.5.3. Espumabilidade

As espumas, geralmente, consistem em bolhas de gás dispersas e envolvidas por um filme líquido fino (lamínulas), contendo um surfactante solúvel (proteína) (Figura 4). A capacidade de uma proteína formar espuma refere-se à expansão de volume da dispersão protéica. A incorporação de ar por batimento, agitação ou aeração é útil em diversos sistemas alimentícios, como produtos de padaria e confeitaria, cujo ganho de volume é de grande interesse, em razão da necessidade de incorporação de ar ou CO₂. É uma propriedade funcional de interface que depende da natureza da proteína, do pH, da solubilidade, da temperatura (desnaturação), da presença de sais, da presença de outros constituintes nos alimentos (lipídios e açúcares) e da concentração de proteína (WILDE e CLARK, 1996).

As espumas são mais estáveis na região do ponto isoelétrico das proteínas, em razão da falta de interações repulsivas (repulsão eletrostática mínima), que promovem uma interação mais favorável entre proteína-proteína, formando um filme viscoso na interface (FENNEMA, 1996, ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Geralmente, a maioria das proteínas forma uma espuma máxima com uma concentração de 2 a 8%. A desnaturação parcial das proteínas freqüentemente proporciona melhora nas propriedades de espumabilidade. Esta melhora é atribuída ao aumento da hidrofobicidade na superfície. Os lipídios, particularmente os fosfolipídios, afetam contrariamente a espumabilidade das proteínas, visto que desestabilizam as espumas da farinha e do concentrado de soja (DAMODARAN, 1996).

Estudos têm demonstrado que existem diferenças nas propriedades de espuma em diversos produtos protéicos de soja, devendo ser ressaltado que os isolados protéicos possuem maior espumabilidade quando comparados com farinhas e concentrados de soja (LIU, 1997).



Fonte: adaptado de WILDE e CLARK (1996).

Figura 4 – Representação esquemática da estrutura da bolha de gás.

2.5.4. Gelificação

A gelificação ocorre quando as moléculas desnaturadas pelo calor se agregam para formar uma rede protéica orientada. Géis de proteína consistem de uma rede tridimensional em que a água é encapsulada e, freqüentemente, são considerados por ter uma fase intermediária entre um sólido e um líquido (MATSUMURA e MORI, 1996). Os principais fatores que afetam a gelificação da proteína de soja incluem a concentração de proteína, o tempo e a temperatura de aquecimento, a concentração salina e as condições de resfriamento, visto que todos eles afetam as interações proteína-água ou proteína-proteína. Enquanto a farinha e o concentrado protéico de soja formam géis macios e fracos, os isolados protéicos formam géis firmes, duros e resistentes (LIU, 1997).

2.5.5. Capacidade de absorção e retenção de água

Segundo FENNEMA (1996), os termos absorção e retenção de água envolvem a interação entre a proteína e a água, e expressam a quantidade máxima de água que o material protéico pode captar e reter durante a formulação do alimento.

As proteínas interagem com a água por meio da formação de ligações, como as de hidrogênio, ligações dipolo-dipolo ou cadeias laterais dos aminoácidos (interação com grupos ionizados). Assim, quando há proporção maior de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas, a proteína apresenta menor capacidade de hidratação do que quando é composta por aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas, que podem formar mais facilmente ligações de hidrogênio com a água (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Os principais fatores que afetam a capacidade de absorção de água de uma proteína incluem a composição aminoacídica, a estrutura e conformação da proteína, a polaridade e carga na superfície, a força iônica, o pH e a temperatura (DAMODARAN, 1996).

A concentração de proteínas está diretamente relacionada com a quantidade total de água que elas podem absorver. O isolado protéico de soja apresenta maior capacidade de absorção de água (aproximadamente 35 g/100 g), em razão do seu maior conteúdo protéico dentre os produtos protéicos de soja (LIU, 1997). Os diferentes processamentos, como tratamento térmico, extrusão e texturização, podem ocasionar decréscimo na capacidade de absorção de água, em razão da agregação das proteínas desnaturadas (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

2.6. Modificação das proteínas de soja

As propriedades funcionais das proteínas são controladas pela sua composição e estrutura e pelas interações dessas com uma ou mais substâncias. As características moleculares das proteínas podem ser alteradas por mudanças químicas ou físicas na sua estrutura e conformação, em níveis diferentes. Condições ótimas de tamanho, superfície, carga,

relação hidrofobicidade/hidrofilicidade e flexibilidade molecular das proteínas podem ser alcançadas. Para as proteínas de soja apresentarem propriedades funcionais desejáveis, diversos métodos de modificação da proteína têm sido utilizados, os quais incluem as modificações físicas, químicas e enzimáticas (LIU, 1997; MOURE *et al.*, 2006).

2.6.1. Modificação física

Os métodos de modificação física das proteínas incluem os tratamentos ácido, alcalino ou térmico. Estes tratamentos geralmente promovem alterações nas estruturas secundárias e terciárias das moléculas de proteínas (desnaturação) (LIU, 1997).

Os tratamentos térmicos podem provocar, nas proteínas, alterações nas cadeias laterais dos aminoácidos, hidrólise das ligações peptídicas e mudanças estruturais (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

A desnaturação de proteínas geralmente proporciona perda de solubilidade, aumento na viscosidade e mudanças nas interações proteína-proteína. O grau de desnaturação de uma proteína depende da sua composição, concentração, conteúdo em água, força iônica e pH. Por exemplo, proteínas nas suas formas desidratadas são mais resistentes ao calor do que proteínas em solução, e soluções concentradas são mais estáveis do que soluções diluídas (LIU, 1997).

A desnaturação por pH ácido conduz à agregação e precipitação das proteínas. A desnaturação e a insolubilização das proteínas de soja sob condições ácidas podem limitar o uso dessas em bebidas (SORGENTINI *et al.*, 1984, citados por WAGNER *et al.*, 2000).

Wagner *et al.* (1996) modificaram um isolado protéico de soja por tratamento ácido e observaram maior desnaturação da globulina 11S do que a 7S. Estas alterações provocaram diminuição na solubilidade.

2.6.2. Modificação química

Modificações químicas, como alquilação, acilação, fosforilação e desamidação, têm sido utilizadas em estudos para caracterizar as relações

entre estrutura, estabilidade e propriedades funcionais das proteínas. Estes compostos têm por objetivos promover a derivatização dos grupos laterais dos resíduos de aminoácidos e, conseqüentemente, modificar a polaridade e carga líquida das proteínas (LIU, 1997). Essas alterações químicas podem, por exemplo, alterar a hidrofobicidade de uma proteína (MOURE *et al.*, 2006).

A alquilação é a substituição do hidrogênio por um radical alquila, ou seja, derivado de um hidrocarboneto. A alquilação tem por objetivo adicionar grupos alquila (RCH_2) nos aminoácidos lisina, cisteína, metionina e histidina, aumentando a sua ramificação (MOURE *et al.*, 2006).

A acilação é a substituição do hidrogênio de uma molécula por um radical acila ($RC = O$), que age principalmente na lisina. Segundo Shahidi e Wanasundara (1998), citados por MOURE *et al.* (2006), a acilação com anidrido succínico melhorou as propriedades físico-químicas, como a solubilidade, as propriedades emulsificantes e a espumabilidade de proteínas.

A fosforilação consiste em adicionar um grupo fosfato (PO_4) a um aminoácido de uma cadeia protéica. A fosforilação promove a formação de géis mais fracos que os obtidos com a acilação (MOURE *et al.*, 2006).

Entretanto, a maioria dessas modificações químicas foi desenvolvida em estudos específicos, visto que envolve processos químicos caros (LIU, 1997).

A carga de uma molécula de proteína é devido à ionização dos grupos funcionais de aminoácidos. Portanto, a força iônica de um solvente afeta o grau de dissociação desses grupos, alterando a carga da proteína e, conseqüentemente, a sua solubilidade (CHEN e SOUCIE, 1986). Estes autores modificaram um isolado protéico de soja comercial, adicionando diversos íons na forma de sais. De todos os íons estudados, constatou-se que os íons multivalentes, como alumínio, ferro, tripolifosfato e hexametáfosfato, alteraram o ponto isoelétrico do IPS e, conseqüentemente, a sua solubilidade.

A utilização de sais pode afetar a solubilidade de uma proteína (CHEFTEL *et al.*, 1989). O efeito de sal na solubilização depende da sua concentração, do número de cargas elétricas dos cátions e ânions que formam o sal e do pH da solução (ARAUJO, 1984).

2.6.3. Modificação enzimática

A modificação enzimática é geralmente produzida por meio da quebra de ligações peptídicas (proteólise), a fim de produzir peptídeos de tamanho desejável (MOURE *et al.*, 2006).

A hidrólise protéica pode ser realizada por meio de enzimas, ácidos ou álcalis (MARTINS, 2005). Contudo, na produção de hidrolisados destinados à nutrição, a hidrólise enzimática é preferencial aos tratamentos químicos, pelo fato de possibilitar a produção de hidrolisados com perfil de peptídeos mais bem definido, somado ao fato de que os tratamentos químicos podem ainda causar perdas nutricionais pela destruição e transformação de alguns aminoácidos essenciais (FURTADO, 1999).

Segundo Furtado (1999), além da melhoria das características nutricionais, a hidrólise protéica é também realizada para melhorar algumas propriedades funcionais.

Segundo Duarte *et al.* (1998b), a hidrólise enzimática pode contribuir para aumentar a solubilidade das proteínas, uma vez que leva à maior exposição de grupos carregados, diminui o tamanho molecular, aumenta a hidrofiliabilidade, além de provocar alterações favoráveis na configuração molecular.

Liu (1997) reportou que o tratamento com a enzima alcalase provocou melhoria na solubilidade, capacidade emulsificante e capacidade de formação de espuma das proteínas de soja.

Jones e Tung (1983), citados por Moure *et al.* (2006), verificaram que o tratamento com tripsina em produtos de soja proporcionou um aumento na sua solubilidade.

Outras enzimas, como pepsina, pancreatina e bromelina, têm sido reportadas por provocar alterações nas propriedades funcionais das proteínas de soja (LIU, 1997).

Entretanto, um dos mais importantes problemas relacionados à utilização da modificação enzimática é o aparecimento de sabor amargo, ocasionado pela formação de peptídeos com alto índice de aminoácidos hidrofóbicos (FURTADO, 1999; MARTINS 2005).

2.7. Qualidade nutricional da proteína de soja

Atualmente, a soja é a principal fonte de proteína vegetal para a nutrição animal e humana. A qualidade nutricional de uma proteína depende de muitos fatores, incluindo a digestibilidade e a composição em aminoácidos, devendo esses serem absorvidos em uma forma biodisponível. Portanto, para avaliar a qualidade nutricional de uma proteína é importante conhecer a sua composição aminoacídica e a biodisponibilidade dos aminoácidos presentes nessa proteína (FRIEDMAN, 1996).

A biodisponibilidade dos aminoácidos de uma proteína é medida pela porcentagem da proteína ingerida que foi absorvida, através da digestibilidade e dos índices de qualidade protéica que medem quanto dos aminoácidos absorvidos vão ser utilizados para síntese protéica (SGARBIERI, 1996).

Os requerimentos de aminoácidos para alimentação de indivíduos em diferentes fases da vida foram estimados pela *Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (FAO/WHO, 1991) e estão apresentados na Tabela 7, juntamente com a composição em aminoácidos de farinha de soja, concentrado protéico de soja e isolado protéico de soja.

A maioria das proteínas de leguminosas, como a proteína de soja, contém pequenas quantidades de aminoácidos sulfurados, com a metionina apresentando o primeiro aminoácido limitante (CASTRO *et al.*, 2000). Entretanto, as proteínas de soja contêm quantidades suficientes de lisina, que é um aminoácido limitante em muitas proteínas de cereais. Portanto, as combinações de cereais e leguminosas podem permitir que as deficiências na qualidade protéica de uma sejam compensadas pelos excessos dos mesmos aminoácidos de outra, proporcionando uma mistura de proteínas com um valor nutritivo superior ao de cada componente separadamente (DHINGRA e JOOD, 2001; MENSA-WILMOT *et al.*, 2001).

Os métodos para avaliação das propriedades nutricionais das proteínas podem ser divididos em três categorias principais: químicos e, ou, bioquímicos, biológicos e microbiológicos. Dos métodos citados, alguns são consagrados no que diz respeito à qualidade nutricional da proteína de soja (HERNÁNDEZ *et al.*, 1996).

Tabela 7 – Composição em aminoácidos (mg/g proteína) de produtos protéicos de soja e recomendações para indivíduos em diferentes fases da vida

| Aminoácidos essenciais | Farinha de soja ^b | Concentrado protéico de soja ^b | Isolado protéico de soja ^b | FAO/WHO ^a | | |
|------------------------|------------------------------|---|---------------------------------------|----------------------|------------|---------|
| | | | | 2-5 anos | 10-12 anos | Adultos |
| Histidina | 26 | 25 | 28 | 19 | 19 | 16 |
| Isoleucina | 46 | 48 | 49 | 28 | 28 | 13 |
| Leucina | 78 | 79 | 82 | 66 | 44 | 19 |
| Lisina | 64 | 64 | 64 | 58 | 44 | 16 |
| Cistina+metionina | 26 | 28 | 26 | 25 | 22 | 17 |
| Fenilalanina+tirosina | 88 | 89 | 92 | 63 | 22 | 19 |
| Treonina | 39 | 45 | 38 | 34 | 28 | 9 |
| Triptofano | 14 | 16 | 14 | 11 | 9 | 5 |
| Valina | 46 | 50 | 50 | 35 | 25 | 13 |

^a Fonte: FAO/WHO (1991).

^b Fonte: adaptado de Endres (2001).

A medida da digestibilidade, por exemplo, indica o quanto das proteínas ingeridas foi hidrolisado pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo, constituindo o primeiro fator que afeta a eficiência da utilização protéica da dieta (DARRAGH e HODGKINSON, 2000; MONTEIRO *et al.*, 2004). Quando ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes, ou metabolizada pelos microrganismos do intestino grosso (DUARTE, 1999).

A digestibilidade *in vivo* da proteína é determinada pela medida do nitrogênio ingerido que o animal absorve. O nitrogênio absorvido é obtido pela diferença entre o nitrogênio ingerido com a dieta e aquele que é eliminado nas fezes. Esta digestibilidade é denominada aparente, visto que não é considerado o nitrogênio eliminado nas fezes resultante da descamação do tubo digestivo, dos sucos e das secreções da flora intestinal. A digestibilidade verdadeira é determinada por meio da correção da quantidade de nitrogênio fecal excretado, considerando a quantidade de nitrogênio excretado quando o indivíduo consome uma dieta livre de proteína (FAO/WHO, 1991; DARRAGH e HODGKINSON, 2000).

A digestibilidade *in vitro* de uma proteína é estimada ao usar enzimas proteolíticas que atuam normalmente na digestão, procurando, desse modo, simular as condições de acidez ou de pH, características do estômago e do intestino, onde a digestão das proteínas se processa (HERNÁNDEZ *et al.*,

1996). Rozan *et al.* (1997) usaram digestibilidade *in vitro* para estimar a digestibilidade verdadeira de fontes diferentes de proteínas. Para a maior parte das fontes estudadas, houve boa correlação ($r = 0,88$) quando se comparou a digestibilidade *in vitro* com a digestibilidade verdadeira determinada em ratos.

Os alimentos de origem animal apresentam maior digestibilidade que os de origem vegetal. O fato de os alimentos de origem animal não conterem fibra alimentar e fatores antinutricionais faz com que a velocidade de trânsito intestinal seja mais lenta e, em consequência, obtém-se maior digestão dos nutrientes (MONTEIRO, 2000).

Sendo assim, a digestibilidade da proteína é um condicionante da qualidade protéica. Um dado aminoácido pode estar presente na proteína, mas não estar necessariamente disponível para o organismo. Em outras palavras, proteínas não podem ser utilizadas pelo organismo sem serem digeridas por ele. Diversos fatores têm sido identificados por interferir na digestibilidade. Dentre estes citam-se a presença de componentes biologicamente ativos, o tratamento térmico e a estrutura química da proteína. Esses fatores afetam a digestibilidade da proteína, diminuindo sua hidrólise, o que torna os aminoácidos menos disponíveis para serem absorvidos pelo organismo (LIU, 1997; MONTEIRO, 2000).

Os inibidores de proteases presentes na soja crua são considerados os principais fatores responsáveis pela diminuição da digestibilidade dessa proteína. Eles inibem a ação das enzimas tripsina e quimotripsina sobre a hidrólise das proteínas da dieta. Este efeito foi evidenciado pela relação entre o aumento da qualidade protéica, medida pelo PER, em ratos alimentados com soja tratada termicamente, cujos inibidores de proteases foram destruídos (LAJOLO e GENOVESE, 2002).

Embora os efeitos nutricionais dos inibidores de proteases sejam conhecidos em ratos, em humanos continua obscura a correlação entre a qualidade da proteína de leguminosas e os níveis de inibidores presentes. Primeiramente, tem sido sugerido que proteínas de soja na forma natural (não-desnaturada) são mais resistentes ao ataque das enzimas proteolíticas do que a proteína desnaturada pelo calor (MONTEIRO, 2000). Portanto, o efeito do tratamento térmico no aumento da qualidade protéica é devido não

somente à inativação dos inibidores de tripsina, como também por desnaturar a proteína de soja, rompendo a sua estrutura interna e permitindo que a molécula de proteína esteja mais disponível ao ataque enzimático (LIU, 1997).

Segundo Krogdahl e Holm (1981), citados por Monteiro (2000), os inibidores de proteases presentes nos grãos de soja são parcialmente inativados por digestão com pepsina ou quando incubados com suco gástrico humano. Aproximadamente 80% da atividade do inibidor de tripsina *Kunitz* e 23% da atividade do inibidor *Bowman-Birk* desapareceram durante a digestão com pepsina, quando esses inibidores, na forma purificada, foram incubados com suco gástrico humano.

Liu (1997) verificou que existe uma variação considerável na digestibilidade da proteína de soja em humanos entre os diversos produtos tradicionais de soja (Tabela 8). A proteína de *yuba* apresentou a maior digestibilidade (100%), enquanto a soja tostada obteve o menor valor (78%). Ikeda *et al.* (1995) realizaram um estudo *in vitro* e observaram que não existia nenhuma correlação significativa entre a digestibilidade da proteína de produtos orientais de soja e os níveis de inibidores de proteases (tripsina e quimotripsina). A proteína de *yuba* é desenovelada e tem uma estrutura estirada por meio de ligações hidrofóbicas com lipídios. Portanto, a conformação das proteínas nos produtos de soja pode exercer um papel importante na digestibilidade destas (LIU, 1997).

Tabela 8 – Digestibilidade protéica de vários produtos de soja em humanos

| Produtos de soja | Digestibilidade (%) |
|----------------------------------|---------------------|
| Soja tostada | 78 |
| Soja fermentada (<i>natto</i>) | 90 |
| Grãos de soja cozidos | 92 |
| <i>Tofu</i> liofilizado | 93 |
| <i>Yuba</i> | 100 |

Fonte: adaptado de LIU (1997).

Outras substâncias biologicamente ativas presentes na soja, como fenóis e fitatos, são também conhecidas por reduzir a qualidade protéica

(ROHN *et al.*, 2006). Ritter *et al.* (1987) reportaram que a redução de compostos fenólicos e fitatos em um isolado protéico de soja aumentou a digestibilidade da proteína, quando comparado com o controle.

O Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade da Proteína (PDCAAS) é um método baseado no requerimento de aminoácidos para humanos e na digestibilidade da proteína, sendo considerado o método mais apropriado para avaliar a qualidade protéica de alimentos e fórmulas infantis (GILANI e SEPEHR, 2003; SCHAAFSMA, 2005). De acordo com esse método, as proteínas de soja têm apresentado qualidade semelhante às proteínas de origem animal (Tabela 9).

Tabela 9 – PDCAAS de diversas fontes protéicas

| Fonte protéica | PDCAAS |
|------------------------------|--------|
| Caseína | 1,00 |
| Clara de ovo | 1,00 |
| Concentrado protéico de soja | 0,99 |
| Isolado Protéico de soja | 0,92 |
| Carne de boi | 0,92 |
| Farinha de ervilha | 0,69 |
| Feijão enlatado | 0,68 |
| Amendoim | 0,52 |
| Trigo | 0,42 |
| Glúten | 0,25 |

Fonte: adaptado de ENDRES (2001).

Entretanto, o método tem apresentado algumas limitações, como a falta de padronização e reprodutibilidade nas análises da composição em aminoácidos sulfurados e triptofano e a incapacidade de se distinguir as formas D e L (SCHAAFSMA, 2005).

Sarwar (1997) modificou um isolado protéico de soja, fazendo um tratamento alcalino e térmico, encontrando valores de PDCAAS de 100 e 49%, respectivamente, para o IPS comercial e modificado.

2.8. Proteínas do leite humano

As proteínas do leite humano são quantitativa (apresentam um conteúdo três vezes menor) e qualitativamente diferentes das do leite de vaca, e são basicamente divididas em três grupos principais: caseína, proteínas do soro e proteínas constituintes do interior da membrana do glóbulo de gordura (mucinas); os outros componentes são enzimas e fatores de crescimento (semelhante a hormônios – peptídeos de baixa massa molar) (RUDLOFF e KUNZ, 1997; LÖNNERDAL, 2003). No leite humano, a maior concentração das proteínas está na fração do soro, enquanto no leite de vaca predomina a caseína. A relação caseína:proteínas do soro varia de aproximadamente 40:60 a 50:50, no leite maduro, enquanto no leite de vaca esta relação é estimada em 80:20 (LÖNNERDAL, 2003). Além disso, o leite humano contém cerca de 20 a 25% de nitrogênio não-protéico (NNP), do qual uma parte contribui para a síntese de aminoácidos não-essenciais. A concentração de NNP é maior no leite humano do que no leite de vaca (RUDLOFF e KUNZ, 1997; CARRATÙ *et al.*, 2003). Dentre os compostos identificados nessa fração, o principal é a uréia (quase 50%), sendo encontrados também amônia, creatinina, creatina, ácido úrico, ácido nucléico, carnitina, peptídeos de baixa massa molar, nucleotídeos, glicosamina, aminoácidos livres etc. (CARRATÙ *et al.*, 2003; EUCLYDES, 2005).

Além da diferença quantitativa, existem diferenças qualitativas significativas entre as caseínas dos leites humano e de vaca (Tabela 10). O primeiro contém β , κ -caseínas, entretanto a subunidade β predomina, enquanto no segundo as frações α_{s1} e α_{s2} , em conjunto, representam mais de 50% da caseína total. Além disso, a caseína do leite de vaca é altamente fosforilada, o que afeta a absorção de ferro e outros minerais (RUDLOFF e KUNZ, 1997). Essas características também são responsáveis por diferenças encontradas na coagulação da proteína, na velocidade de esvaziamento gástrico e no tempo de trânsito intestinal. A caseína do leite humano coagula em pequenos flocos macios e porosos, facilitando a ação enzimática, já a do leite de vaca forma coágulos firmes e mais resistentes, o que torna a digestão mais difícil (EUCLYDES, 2005).

Tabela 10 – Composição protéica dos leites humano e de vaca

| Proteína | Leite humano | | Leite de vaca | |
|-------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Conc. (g/100mL) | % Carboidratos | Conc. (g/100mL) | % Carboidratos |
| Proteínas totais | 0,8-0,9 | | 3,30 | |
| Caseína | 0,3-0,5 | | 2,60 | |
| α_{s1} -caseína | – | – | 1,0 | – |
| α_{s2} -caseína | – | – | 0,26 | – |
| β -caseína | 0,3-0,5 | – | 0,93 | – |
| γ -caseína | – | – | 0,08 | – |
| κ -caseína | 0,1-0,3 | 40-60 | 0,33 | 10 |
| Proteínas do soro | 0,4-0,6 | | 0,5-0,7 | |
| β -lactoglobulina | – | – | 0,20-0,30 | – |
| α -lactalbumina | 0,2-0,3 | – | 0,08-0,12 | – |
| Soroalbumina | 0,03 | – | 0,04 | – |
| Imunoglobulinas | | | | |
| SIgA | 0,05-0,1 | 12 | – | – |
| IgA | 0,01 | 7-11 | 0,003 | – |
| IgG | 0,001 | 2-3 | 0,06 | Traço |
| IgM | 0,002 | 12 | 0,005 | – |
| Lactoferrina | 0,1-0,3 | 6 | Traço | – |

Fonte: adaptado de Rudloff e Kunz (1997).

A fração de κ -caseína contém grande quantidade de carboidratos (galactose, N-acetilglicosamina e N-acetil-galactosamina), que durante o processo de digestão produzem glicopeptídeos responsáveis pelo crescimento de bifidobactérias (*Lactobacillus bifidus*), diminuindo o risco de infecções intestinais provocadas por microrganismos patogênicos, por exemplo *E coli*. Além disso, os fragmentos de β -caseína (fosfopeptídeos) oriundos da proteólise das proteínas do leite humano têm sido apontados por melhorar a absorção de cálcio, em razão da sua capacidade de aumentar a solubilidade do cálcio no lúmen intestinal. Estudos também têm mostrado maior absorção de zinco (RUDLOFF e KUNZ, 1997; KROENING *et al.*, 1998).

As proteínas do soro dos leites humano e de vaca também são diferentes. No leite de vaca a β -lactoglobulina é predominante, enquanto no

leite humano ela está ausente. Esta proteína constitui uma importante fração antigênica do leite de vaca, visto que ela é responsável pela reação alérgica em 82% dos casos (ELWING, 1988). No leite humano, a α -lactoalbumina, a lactoferrina e as imunoglobulinas são as principais proteínas, enquanto no leite de vaca estas se encontram em menor concentração. A α -lactoalbumina é um importante componente do sistema enzimático da síntese de lactose na glândula mamária. O soro do leite humano contém ainda albumina, lisozima, imunoglobulinas, dentre outras proteínas (RUDLOFF e KUNZ, 1997; EUCLYDES, 2005).

As imunoglobulinas obtidas do colostro e leite humano conferem proteção, particularmente, ao trato gastrointestinal e respiratório. A imunoglobulina mais importante presente no leite humano é a imunoglobulina secretória (SIgA), que corresponde a 90%, embora outras, como IgG, IgM, IgD e IgE, também estejam presentes. A SIgA tem a característica de ser resistente à digestão, podendo, desse modo, atravessar intacta o trato gastrointestinal, mantendo a sua capacidade de atuação (CARBONARE e CARNEIRO-SAMPAIO, 2001). A SIgA aloja-se na superfície das células epiteliais intestinais, formando um revestimento protetor, impedindo, assim, a aderência de substâncias alergênicas e de bactérias e vírus patogênicos na mucosa intestinal, bem como de suas toxinas (EUCLYDES, 2005).

A lactoferrina é uma glicoproteína de aproximadamente 80 kDa que apresenta dois sítios capazes de se ligar a íons Fe^{+3} , é resistente à proteólise enzimática, está presente em altas concentrações no colostro (5-7 mg/mL) e leite (1-2 mg/mL) e possui como principal função quelar íons Fe^{+3} , que são essenciais para a multiplicação de microrganismos patogênicos, diminuindo, desse modo, a sua disponibilidade no ambiente intestinal. Além da ação bacteriostática, a lactoferrina pode influenciar positivamente o crescimento celular da mucosa intestinal e, conseqüentemente, aumentar a resistência à infecção. Além disso, é sugerido que ela tenha capacidade de melhorar a absorção de ferro, em razão de a mucosa intestinal possuir um receptor exclusivo para a lactoferrina e, possivelmente, facilitar a absorção de ferro (CARBONARE e CARNEIRO-SAMPAIO, 2001; LÖNNERDAL, 2003).

A lisozima é uma enzima capaz de degradar ligações glicosídicas da parede de bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, mas também pode ser bactericida para outras bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, interagindo conjuntamente com lactoferrina (LÖNNERDAL, 2003; EUCLYDES, 2005).

Segundo Carbonare e Carneiro-Sampaio (2001), a mucina é uma proteína altamente glicosilada e, no colostro e leite, está ligada aos glóbulos de gordura. Sua principal função é inibir a adesão bacteriana.

O leite humano fornece, qualitativamente, todos os aminoácidos essenciais e em quantidades adequadas, compatíveis com as necessidades e limitações metabólicas do lactente, fato que não acontece com o leite de vaca. O leite humano apresenta concentrações maiores de cistina e menores de metionina. Isso é importante porque a concentração da enzima que catalisa a conversão de metionina em cistina é baixa no recém-nascido (CARBONARE e CARNEIRO-SAMPAIO, 2001). A concentração de taurina é elevada, principalmente em fetos e prematuros, visto que ela é importante na conjugação de sais biliares, o que facilita a absorção de gorduras. Além disso, níveis elevados de taurina também são encontrados no tecido nervoso, no cérebro em desenvolvimento, no coração e na retina (CARRATÙ *et al.*, 2003). O leite humano apresenta teores relativamente baixos de aminoácidos, como a fenilalanina e a tirosina. Este efeito é desejável porque o recém-nascido tem dificuldade para metabolizar esses aminoácidos, que acabam afetando o desenvolvimento do sistema nervoso central, quando são encontrados em níveis elevados na corrente sanguínea (EUCLYDES, 2005).

A porta de entrada da maioria das infecções no ser humano é pelas superfícies das mucosas, principalmente as dos tratos gastrointestinais e respiratórias. Por meio da alimentação e respiração, o organismo entra em contato com microrganismos patogênicos e não-patogênicos, como também com substâncias potencialmente alergênicas ou nocivas (CARBONARE e CARNEIRO-SAMPAIO, 2001).

Particularmente no caso do trato gastrointestinal, a imaturidade do epitélio permite maior permeabilidade para macromoléculas, e o padrão de glicosilação dos microvilos propicia maior adesão de microrganismos. Além

disso, a baixa acidez gástrica e menor atividade de enzimas digestivas não constituem barreiras eficientes, como ocorre nos organismos adultos (CARBONARE e CARNEIRO-SAMPAIO, 2001).

2.9. Alergia e intolerância a proteínas dos alimentos

O organismo humano, graças ao seu sistema imunológico, mantém a integridade e constância de sua composição, livrando-se de substâncias heterólogas, principalmente as de origem exógena, como microrganismos e proteínas alimentares.

As terminologias alergia e intolerância são freqüentemente utilizadas conjuntamente por, algumas vezes, apresentarem manifestações clínicas semelhantes, já que ambas têm sido denominadas por alguns autores pelo termo “enteropatia sensível às proteínas do leite de vaca” (LOZANO DE LA TORRE e TOLEDANO, 1999). Entretanto, a alergia alimentar é uma reação de imunidade, segundo a *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*. A substância agressora ou antígeno, geralmente proteína, atravessa a mucosa intestinal, entra na circulação e é percebida pelo sistema imunológico, que estimula a produção de anticorpos específicos, pertencentes a uma ou mais classes de imunoglobulinas, com propriedades físicas e químicas características. A alergia verdadeira é causada pelas imunoglobulinas E (IgE), em resposta à presença destas proteínas consideradas antigênicas pelo sistema imunológico. A IgE causa liberação de substâncias vaso-ativas por alguns tipos de células, que podem causar problemas inflamatórios na pele, nos pulmões e nas articulações (ESTEBAN *et al.*, 1999; SPRIKKELMAN *et al.*, 2000). Heine *et al.* (2002) relataram que quando um antígeno e um anticorpo específico se combinam formam um complexo, o que produz no organismo efeitos biológicos de uma reação alérgica, como vômito, diarreia, rinite alérgica, dermatite atópica ou eczema atópico e outros sintomas.

Segundo a *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*, a intolerância alimentar é definida como uma resposta fisiológica alterada a certos alimentos ou aditivos alimentares por diversos mecanismos, que, geralmente, é decorrente de uma deficiência ou anomalia enzimática, de um

problema digestivo ou até mesmo de uma reação psicológica (LOZANO DE LA TORRE e TOLEDANO, 1999; SPRIKKELMAN *et al.*, 2000).

O leite de vaca, um importante componente da dieta, especialmente durante a infância, é capaz de produzir, por meio de suas proteínas, manifestações de hipersensibilidade que, em crianças de idade mais baixa (até 3 anos), registram uma ocorrência de 0,3 a 7,5% (MORO *et al.*, 2002; WILSON, 2005). Essas crianças são mais suscetíveis ao aparecimento da alergia alimentar, possivelmente por imaturidade da mucosa intestinal e do sistema imunológico, com conseqüente prejuízo na absorção e maior desenvolvimento de sensibilidade às macromoléculas absorvidas. Esse processo pode ocorrer também no adulto, por meio de mecanismo bastante parecido (SAMPSON, 1997).

Rozenfeld *et al.* (2002) apontaram a caseína, a β -lactoglobulina e a α -lactalbumina do leite de vaca como os agentes mais freqüentemente envolvidos nas reações alergênicas. A alergenicidade à caseína bovina já foi demonstrada, já que 92% de pacientes alérgicos apresentaram aumento da IgE no sangue (BERNARD *et al.*, 2000).

Para atender à nutrição de crianças alérgicas ou sensíveis às proteínas do leite de vaca, faz-se necessário o uso de outras fontes protéicas, que preencham as suas necessidades. Assim, produtos com proteínas hidrolisadas, fórmulas à base de carne de boi, de frango, de rã, de soja e mesmo leite de cabra, podem ser utilizados como substitutos do leite de vaca na alimentação dessas crianças (LOZANO DE LA TORRE e TOLEDANO, 1999).

2.9.1. A alergenicidade relacionada ao consumo da soja e seus produtos

A alergenicidade relacionada à soja está ligada à sua fração protéica. Produtos de soja, como o óleo e a lecitina de soja, normalmente não contêm alérgenos, a menos que uma contaminação protéica tenha ocorrido. Em estudos com animais, principalmente bezerros, a maior parte das proteínas de soja, incluindo as globulinas de armazenamento, inibidores de proteases e lectinas, tem mostrado uma participação direta na ocorrência das reações imunológicas. Entretanto, dentre as proteínas da soja, a β -conglucina é um

forte alérgeno, por provocar hipersensibilidade em bezerros. Além disso, proteínas de soja com baixa massa molar, denominadas P22-25, demonstraram forte indução na produção de anticorpos em bezerros. Entretanto, sabe-se que um tratamento térmico eficiente nesses produtos é suficiente para eliminação desta alergenicidade, visto que geralmente os produtos de soja são considerados por serem hipoalergênicos (LIU, 1997).

Embora o tratamento térmico possa eliminar a maioria dos componentes responsáveis por induzir uma reação imunológica, alguns componentes da proteína de soja, com forte atividade alergênica, podem ser resistentes ao aquecimento e outros processamentos. Portanto, esses componentes também podem ser resistentes à digestão e, conseqüentemente, permanecer intactos ao longo do estômago e intestino e induzir reações adversas em alguns humanos e animais (LIU, 1997).

Kleine-Tebbe *et al.* (2002) descreveram que 16 sítios alergênicos foram encontrados na soja. Dentre eles, as proteínas 68, 30 e 28-kDa são aquelas que apresentaram maior alergenicidade. As alergias provocadas pelas proteínas 68 e 30-kDa foram bem caracterizadas, porém maiores informações sobre a alergenicidade da proteína 28-kDa, uma glicoproteína, ainda são necessárias, segundo Hiemori *et al.* (2001).

Aproximadamente 90% das proteínas da soja são duas globulinas termoestáveis: a β -conglucina e a glicina, que são consideradas as principais frações alergênicas da soja. A primeira possui três subunidades e a segunda, seis subunidades. Essas proteínas de armazenamento são representadas, respectivamente, pela Gly m I 30 kDa ou P34 (considerada o principal alérgeno em pacientes sensíveis à soja) e 22 kDa G₂ glicina, que também é um alérgeno (MURARO *et al.*, 2002).

Ogawa *et al.* (2001) desenvolveram um estudo para identificar os principais componentes responsáveis pelas manifestações alérgicas, conseqüentes da ingestão de soja, e, portanto, para reduzir esta alergenicidade. Eles também verificaram que as proteínas 68, 30 e 28-kDa apresentaram maior alergenicidade. Essas proteínas podem ser eliminadas por meio de técnicas químicas para este fim. Por exemplo, Samoto *et al.* (1994), citados por Liu (1997), realizaram um tratamento combinado de 1 M

de Na₂SO₄, acidificação com pH a 4,5 e centrifugação, e removeram mais de 90% da proteína de 30 kDa de um leite de soja desengordurado.

Estudos indicaram que a antigenicidade das proteínas de soja pode contribuir com todo problema de má-digestão e distúrbios gastrointestinais de animais alimentados com produtos de soja, visto que as proteínas antigênicas apresentam a capacidade de ativar o sistema imune, que está relacionado diretamente com a má-digestão dessas proteínas (LIU, 1997).

A incidência da intolerância à soja em crianças com alergia ao leite de vaca varia muito, e a ocorrência de alergia à soja, mediada por IgE, em pacientes com alergia verdadeira ao leite de vaca atinge 14% das crianças. Contudo, crianças com alergia não-mediada por IgE apresentaram maior incidência de intolerância a soja. Alguns autores descreveram lesões do intestino delgado, mais especificamente nas vilosidades, semelhantes àquelas observadas na doença celíaca, traduzindo um quadro de enteropatia com má-absorção (SAMPSON e HO, 1997; KLEMOLA *et al.*, 2002; MURARO *et al.*, 2002).

A maioria dos estudos mostrou a maior sensibilidade à proteína da soja naquelas crianças que são sensíveis à proteína do leite de vaca. Em mais de 60% das vezes isso se deve ao fato de que a maior permeabilidade da mucosa intestinal, resultado da reação de hipersensibilidade ao leite de vaca, permite aumentar a captação do antígeno da soja, e daí aumentar a resposta imune a ela (MURARO *et al.*, 2002). Lozano de La Torre e Toledano (1999) não recomendaram formulações de soja quando os pacientes apresentavam um quadro clínico de intolerância às proteínas do leite de vaca, visto que elas não eram efetivas no tratamento de problemas de má-digestão. Entretanto, esses autores relataram que as formulações à base de soja eram eficazes no tratamento de alergia verdadeira às proteínas do leite de vaca, já que não havia problemas de reação cruzada das proteínas de soja com as proteínas do leite de vaca.

Os estudos de ocorrência da intolerância à proteína de soja são muito variáveis entre os autores: desde 0 até 63% (ZEIGER *et al.*, 1999). Muraro *et al.* (2002) reportaram variação de 3 a 40% de alergia à soja. Klemola *et al.* (2002) observaram que a intolerância à soja ocorria em 10 a 35% de crianças com alergia ao leite de vaca. Além disso, no caso de crianças com

alergia a alimentos, a alergia à soja foi documentada em 4 a 5% de pacientes com dermatite e em 7 a 14% com alergia ao leite de vaca. A maior ocorrência (30 a 50%) foi observada em casos com enteropatias não-mediadas por IgE. De acordo com esses dados, Sampson e Ho (1997) concluíram que a prevalência de alergia à soja não é tão alta quanto se imaginava. Além disso, o tipo de estudo conduzido pode contribuir para a variação desses resultados, principalmente em relação ao critério utilizado para diagnosticar um quadro de alergia e seleção dos pacientes. Por exemplo, Muraro *et al.* (2002) relataram que a incidência de alergia à soja foi estimada em apenas 0,3% dos pacientes e 1,1% em crianças atópicas, quando o estudo foi realizado por teste de provocação duplo cego placebo controlado.

Nos pacientes com colite alérgica, Machida *et al.* (1994) observaram, em mais de 30 crianças, resolução do quadro somente com a retirada dos derivados do leite de vaca e substituição por isolado protéico de soja.

A proteína da soja é antigênica, mas isso não significa que seja obrigatoriamente alergênica. Deve-se entender que pode existir hipersensibilidade à soja, sem que obrigatoriamente aconteça um fenômeno alérgico, isto é, formação de anticorpos específicos. Zeiger *et al.* (1999) avaliaram 93 crianças com menos de 3 anos e meio de idade, todas com alergia à proteína do leite de vaca mediada por IgE. Todas foram avaliadas para uma possível alergia à proteína da soja, por teste de provocação duplo-cego placebo controlado. Apenas 14% delas tiveram diagnósticos comprovados de alergia à soja, o que significa que as formulações de isolado protéico de soja devem ser consideradas como alternativa segura e capaz de promover um bom desenvolvimento para a maioria das crianças com alergia ao leite de vaca.

CAPÍTULO 1

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FUNCIONAL DE ISOLADOS PROTÉICOS DE SOJA

1. INTRODUÇÃO

A crescente tendência pela formulação e fabricação de alimentos tem acentuado a procura por ingredientes nutritivos de qualidade. Assim, as proteínas, devido a sua importância nutricional, suas propriedades funcionais e suas características físico-químicas, são componentes importantes em diversos alimentos (DUARTE *et al.*, 1998a).

Avanços na tecnologia de processamento de soja têm proporcionado uma variedade de produtos comerciais, que são capazes de desempenhar na indústria alimentícia funções que, até pouco tempo, só eram realizadas por proteínas de origem animal (MURAD, 1993).

Vários produtos protéicos podem ser obtidos a partir da soja. Dentre eles, o isolado protéico de soja (IPS) é o derivado mais elaborado, sendo obtido a partir do farelo desengordurado de soja por um processo de fracionamento, apresentando alto teor de proteína (ENDRES, 2001).

O Brasil destaca-se como o segundo produtor de soja (USDA, 2007). Entretanto, o consumo dessa leguminosa e de seus derivados ainda é limitado no País. Isto se deve à influência de aspectos socioculturais nos hábitos alimentares, principais fatores limitantes à sua aceitação e ao consumo diário (RODRIGUES *et al.*, 2003). Porém, a utilização de seus

derivados sob a forma de ingredientes em alimentos tem proporcionado melhor aceitação desses produtos.

A aceitação de uma proteína, como ingrediente, depende tanto das suas qualidades nutricionais quanto das suas propriedades funcionais. Estas propriedades são dependentes de complexas interações influenciadas pela composição, conformação e propriedades físico-químicas das proteínas, além de suas interações com outros componentes do alimento, sendo também reflexo do meio em que se encontram (FURTADO, 1999).

Investigações têm sido realizadas no sentido de avaliar o efeito de processos tecnológicos que podem alterar a estrutura da proteína e, conseqüentemente, modificar as suas propriedades funcionais. Estas alterações são geralmente efetuadas por tratamentos enzimático, térmico e, ou, químico. O tratamento em meio ácido moderado à temperatura ambiente, devido à sua ação desnaturante-dissociante, é uma alternativa interessante, com potencial de uso em escala industrial. A acidez induz mudanças na conformação das proteínas 7S e 11S, devido à dissociação de ambas proteínas em subunidades e também ao desdobramento da estrutura da cadeia polipeptídica (WAGNER *et al.*, 1996; 2000). Além disso, estudos demonstraram que a carga superficial de uma proteína pode ser influenciada por íons, alterando a sua solubilidade (CHEN e SOUCIE, 1986).

Portanto, este trabalho teve por objetivos modificar dois isolados protéicos de soja comerciais por meio da alteração do seu perfil de solubilidade, utilizando-se tratamento ácido moderado e sal de polifosfato, de modo que apresentassem curvas de solubilidade semelhantes à da caseína humana, e, também, verificar se a modificação realizada influenciaria as propriedades funcionais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) e no Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Solos, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e no Setor de Agroindústria do Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba (CEFET-RP).

2.1. Obtenção da caseína a partir do leite humano

2.1.1. Obtenção do leite humano

Aproximadamente 8 L de leite humano maduro cru foram doados pelo Banco de Leite Humano de Juiz de Fora-MG.

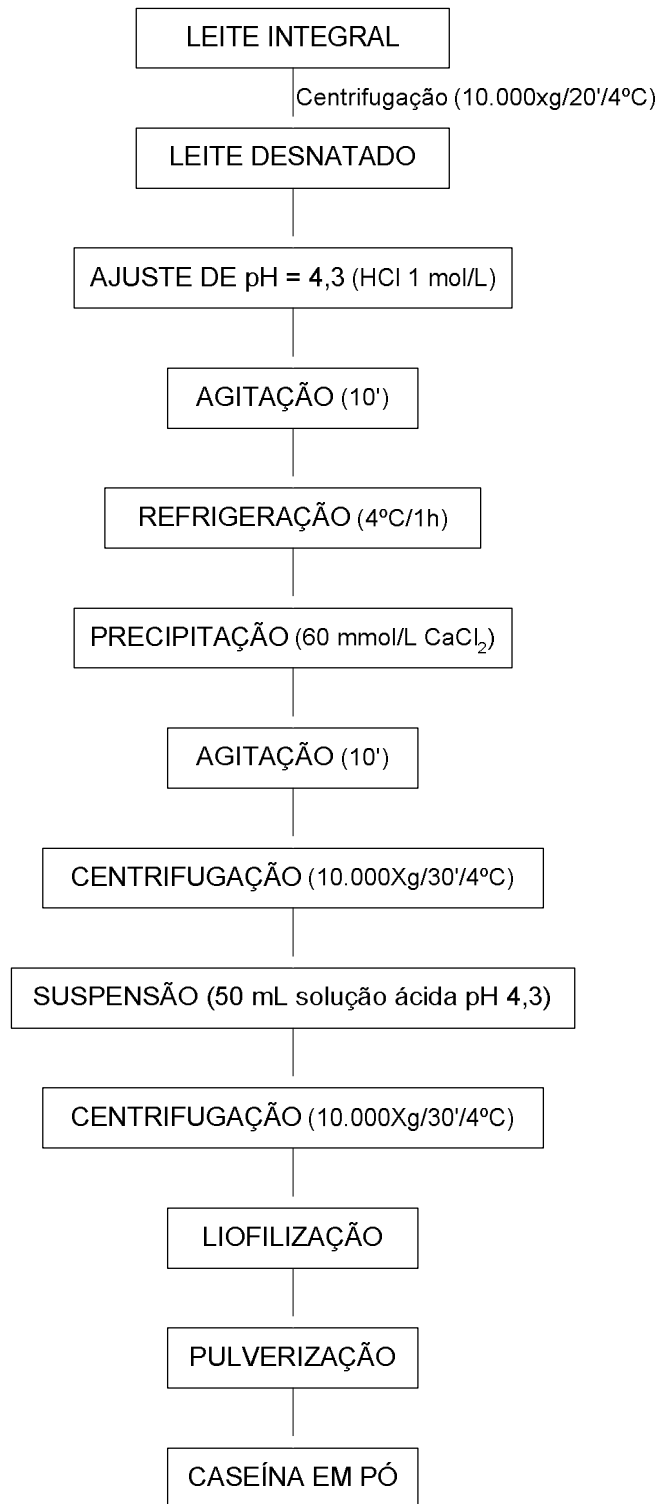
2.1.2. Separação da caseína do leite humano

Geralmente, não existe um método disponível que permita separar totalmente a caseína das proteínas do soro. As técnicas freqüentemente utilizadas são adaptadas daquelas desenvolvidas para separar a caseína bovina, que é, em diversos aspectos, bastante diferente da caseína humana.

A diferença qualitativa e quantitativa entre as caseínas de ambas as espécies indica que os métodos de separação da caseína bovina, como o

ajuste do leite para pH 4,6, seguido por centrifugação, não sejam aplicáveis à caseína humana, visto que a precipitação ácida no leite humano pode levar à formação de quantidades significativas de co-precipitados de proteínas do soro (KUNZ e LÖNNERDAL, 1990). Por essa razão, a separação da caseína das proteínas do soro foi realizada, neste trabalho, pelo método de Kunz e Lönnerdal (1989). Esses autores usaram diversas combinações entre diferentes variáveis para separação da caseína humana, obtendo, assim, um método otimizado. As combinações partiram do leite integral ou leite desnatado, com ou sem ajuste de pH para 4,6 ou 4,3, com ou sem adição de cloreto de cálcio, centrifugação ou ultracentrifugação em diferentes temperaturas.

Para o presente estudo, inicialmente o leite humano integral (100 mL) foi desnatado em uma centrífuga (Beckman J2-MC), por 20 minutos/4°C a 10.000 x g. Então, após o ajuste do pH para 4,3 (*pH-metro digital Hanna Instruments*) com HCl 1 mol/L, o leite desnatado foi agitado em agitador com barra magnética por 10 minutos e, posteriormente, levado a um refrigerador e mantido a 4°C/1 hora. Durante esse período, o valor do pH foi monitorado e eventualmente ajustado para 4,3, com HCl 0,1 mol/L ou NaOH 0,1 mol/L. Para completar a precipitação da caseína, adicionou-se cloreto de cálcio (CaCl₂) suficiente para atingir a concentração de 60 mmol/L, sendo a amostra agitada por mais 10 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 30 minutos (10.000 x g), a 4°C. A caseína precipitada foi suspensa em 50 mL de água destilada, o pH da suspensão foi ajustado para 4,3 e a suspensão foi novamente centrifugada sob as mesmas condições anteriores. Para obtenção da caseína em pó, procedeu-se à liofilização (Edwards do Brasil – Pirani 78”) e à pulverização em almofariz com pistilo. Um fluxograma do processo de obtenção da caseína do leite humano, conforme descrito previamente, pode ser observado na Figura 1.



2.2. Obtenção e modificação do isolado protéico de soja

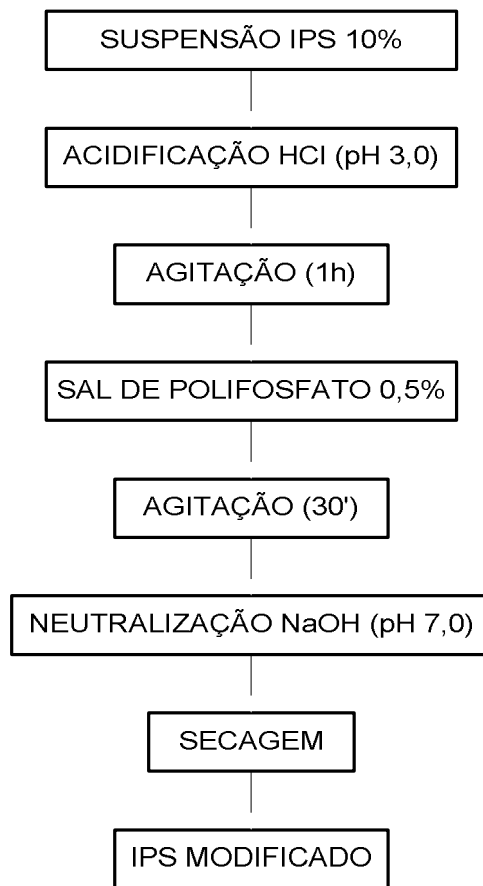
2.2.1. Obtenção do isolado protéico de soja

Dois isolados protéicos de soja comerciais (SAMPROSOY 90 LH e SAMPROSOY 90 NB) foram adquiridos da BUNGE Alimentos (Brasil). Essas amostras foram denominadas de IPSLH e IPSNB, respectivamente.

2.2.2. Modificação dos isolados protéicos de soja

A modificação dos IPS foi baseada no método proposto por Gomes *et al.* (1992), com algumas adaptações.

Foram preparadas suspensões dos isolados protéicos de soja comerciais de modo que a concentração fosse igual a 10 g de IPS/100 mL. A seguida, o meio foi acidificado com HCl, mantendo-se a suspensão em pH 3,0 por 1 hora. Após a acidificação, foi adicionado polifosfato, de forma que a sua concentração final na suspensão fosse de 0,5% (m/v). A suspensão foi homogeneizada sob agitação manual por mais 30 minutos, e depois neutralizada com NaOH até pH 7,0. Finalmente, a suspensão da proteína modificada foi conduzida ao tanque de alimentação, para secagem em *spray-dryer* (Niro Atomizer modelo *Minor Production*), com ar de entrada aquecido à temperatura de 210-220°C e ar de saída a 95-110°C, com vazão média de 10 L/hora, obtendo-se os isolados protéicos de soja modificados LH e NB (IPSMLH e IPSMNB). Um fluxograma do processo da modificação dos IPS, conforme descrito previamente, pode ser observado na Figura 2.



os isolados e de 6,38 para a caseína humana. Esse método utiliza o princípio de que a substância orgânica que contém nitrogênio é decomposta na presença de ácido sulfúrico concentrado e de catalisadores, liberando sulfato de amônia quantitativamente.

2.3.3. Determinação de cinzas

A análise de cinzas foi determinada por incineração em mufla a 550°C, conforme a metodologia descrita pelas Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (PREGNOLATTO e PREGNOLATTO, 1985).

2.3.4. Determinação de minerais (Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe e Cu)

A determinação de minerais foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1984). Após a digestão das amostras em mistura nitroperclórica (3:1), a concentração de ferro, cobre, manganês, zinco, cálcio e magnésio foi quantificada por espectrofotometria de absorção atômica (Espectrofotômetro Varian, modelo SPECTRAA 220 FS). Adicionou-se cloreto de estrôncio às soluções das amostras analisadas quanto ao teor de cálcio e magnésio, para diminuir as interferências de silicatos e fosfatos na quantificação desses elementos.

Para determinação de sódio e potássio, foi utilizado fotometria de chama (Fotômetro Coring, modelo 400 Phame Photometer).

2.3.5. Determinação de lipídios

Utilizou-se o método de extração em aparelho extrator de *Soxhlet*, empregando-se como solvente éter de petróleo por 8 horas, sob refluxo, conforme descrito pelas Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (PREGNOLATO e PREGNOLATO, 1985).

2.3.6. Determinação de carboidratos

A determinação de carboidratos foi obtida por diferença, ou seja, pela subtração de 100 da soma dos teores de proteínas, lipídios, cinzas e umidade (AOAC, 1984).

2.4. Propriedades funcionais

2.4.1. Solubilidade

A metodologia empregada foi uma combinação dos métodos descritos por Tobelmann (1979) e Morr *et al.* (1985), com algumas modificações.

Inicialmente, suspensões de 25 mL dos isolados protéicos de soja e da caseína humana, contendo 1% de proteína, tiveram seus valores de pH ajustados para 2,0, 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0, com soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio, nas concentrações de 0,1 e 0,01 mol/L.

As suspensões foram mantidas sob agitação por um período de 1 hora e o pH monitorado e mantido nos seus respectivos valores. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação (centrífuga Fanem, modelo 206 MP) a 1.000 x g por 20 minutos, à temperatura ambiente (27°C).

O sobrenadante das suspensões centrifugadas foi filtrado através de papel-filtro Whatman nº 1. A concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de *Kjeldahl*, segundo a metodologia da AOAC (1984).

A determinação da solubilidade foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{Solubilidade} = \left(\frac{\text{CP}_s \times 25}{\frac{\text{Pa} \times \text{TP}}{100}} \right) \times 100$$

em que

CP_s = concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL);

Pa = peso da amostra (mg); e

TP = teor de proteína na amostra (%).

2.4.2. Capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO)

A capacidade de absorção de água (CAA) e de óleo (CAO) foi determinada pelo método descrito por OKEZIE e BELLO (1988), com algumas modificações.

Uma suspensão com 1 g de amostra e 40 mL de água destilada foi preparada em tubos de centrífuga, para determinação da CAA. A suspensão foi agitada em agitador de tubos, por 1 minuto. Em seguida, ajustou-se o pH das suspensões para valores de 3,0 a 8,0, com soluções de ácido clorídrico (1 mol/L e/ou 0,1 mol/L) ou hidróxido de sódio (1 mol/L e/ou 0,1 mol/L). Após o ajuste de cada pH, as suspensões foram novamente agitadas por 1 minuto, sendo então submetidas à centrifugação (centrífuga Fanem, modelo 206 MP) por 15 minutos, a 1.500 x g, desprezando-se o sobrenadante.

Para determinação da CAO, uma suspensão de 1 g de amostra e 40 mL de óleo de milho foi preparada em tubos de centrífuga. A suspensão foi agitada em agitador de tubos por 1 minuto e centrifugada por 15 minutos, a 1.500 x g, desprezando-se o sobrenadante.

A diferença entre o peso da amostra antes e após a centrifugação foi tomada como a quantidade de água ou de óleo absorvida. A CAA e CAO foram expressas como a quantidade de água ou de óleo absorvida por grama de amostra.

2.4.3. Emulsificação e estabilidade da emulsão

A atividade emulsificante foi determinada pelo método descrito por Donadel e Prudencio-FERREIRA (1999), com algumas adaptações.

Suspensões com 2 g de amostra, 20 mL de água destilada e 20 mL de óleo de milho, em béqueres de 100 mL, foram misturadas com agitador de barra magnética (agitador *Radelkis, Stirrer type OP 951*) por 1 minuto, ajustando-se o pH para valores entre de 3,0 e 8,0. Em seguida, as suspensões foram emulsificadas, utilizando agitador de haste (*Quimis*) por 1 minuto, em velocidade média (aproximadamente 800 rpm). As emulsões formadas foram transferidas para tubos graduados de 50 mL, que foram, então, centrifugados a 1.000 x g, por 9 minutos.

A atividade emulsificante foi expressa como o percentual volumétrico da camada emulsificada em relação ao volume de amostra total no tubo.

Para verificar a estabilidade, as emulsões preparadas conforme procedimento descrito anteriormente foram deixadas em repouso por 24 horas, à temperatura ambiente. O percentual de estabilidade da emulsão

foi calculado como a relação entre o volume da camada emulsificada após 24 horas e o volume inicial da camada, conforme descrito por BETSCHART *et al.* (1979).

2.4.4. Espumabilidade e estabilidade da espuma

A espumabilidade foi determinada de acordo com o método de Donadel e Prudencio-Ferreira (1999), com algumas modificações: Preparou-se uma suspensão com 2 g de amostra e 80 mL de água destilada, em um béquer de 500 mL. Ajustou-se o pH para os valores de 3,0 a 7,0 e agitou-se por 1 minuto. A suspensão obtida foi agitada em agitador de haste (Quimis) por 5 minutos, com agitação média (aproximadamente 800 rpm). Transferiu-se a dispersão para uma proveta graduada de 500 mL. A capacidade de formação de espuma foi expressa como a porcentagem de aumento de volume, baseando-se nos volumes inicial e após a formação de espuma.

A proveta que continha a espuma foi mantida em repouso à temperatura ambiente (29°C), e mediu-se a estabilidade da espuma por meio da redução porcentual do volume em intervalos de 1, 5, 10, 30 e 60 minutos.

2.5. Análise estatística

Para as análises químicas e a determinação da capacidade de absorção de óleo (CAO), considerou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com os quatro isolados protéicos de soja analisados em triplicata. Para verificação do efeito do pH, entre os tratamentos, sobre a capacidade de absorção de água, a atividade e estabilidade emulsificante e a espumabilidade, também foi utilizado o DIC, com as análises realizadas também em triplicata.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, em nível de erro de 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary NC) versão 8.2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição química

Os resultados das características químicas dos isolados protéicos de soja comerciais (IPSNB e IPSLH) e modificados (IPSMNB e IPSMLH) estão na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição centesimal dos isolados protéicos de soja

| Tratamento | Umidade* | Proteínas ^{1/} | Lipídios ^{1/} | Cinzas ^{1/} | Carboidratos ^{1/} |
|----------------------|----------|-------------------------|------------------------|----------------------|----------------------------|
| IPSNB ^{2/} | 9,41 a | 90,75 a | 0,34 a | 4,37 d | 4,58 a |
| IPSLH ^{3/} | 9,25 a | 90,40 a | 0,38 a | 5,00 c | 4,18 a |
| IPSMNB ^{4/} | 6,60 b | 82,60 b | 0,08 b | 11,59 a | 5,75 a |
| IPSMLH ^{5/} | 6,20 b | 83,61 b | 0,19 ab | 11,15 b | 5,07 a |

* As médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

^{1/} base seca

^{2/} IPSNB = isolado protéico de soja NB.

^{3/} IPSLH = isolado protéico de soja LH.

^{4/} IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

^{5/} IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

O teor médio de umidade variou entre 6,20 e 9,41%. De acordo com os resultados apresentados, os IPSNB e IPSLH foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos isolados modificados, entretanto não houve

diferença estatística ($p > 0,05$) entre esses últimos. Martins (2005) encontrou valor inferior (5,40%) em um IPS comercial. Os IPS comerciais apresentaram valores superiores de umidade, quando comparados com os dados do fabricante (6,0%).

O teor médio de proteínas variou de 83,61 a 90,44%. De acordo com os resultados, observa-se que os IPS comerciais foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos IPS modificados, entretanto não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os modificados. Os valores de proteínas dos isolados comerciais estão dentro da faixa recomendada pela legislação, que estabelece um mínimo de 88% de proteína (BRASIL, 2005), com os valores determinados por Jacobucci *et al.* (2001) e MURAD (1993), considerando o fator de conversão de 6,25. O teor de proteínas dos IPS comerciais está de acordo com os reportados pelo fabricante (90%).

Os menores valores encontrados para os isolados modificados podem ser justificados pelo fato de se ter introduzido, durante a elaboração, uma certa quantidade de polifosfato, de modo que a concentração final fosse 0,5% (m/v) na suspensão. Além disso, houve o processo de neutralização com solução de hidróxido de sódio, produzindo sal. Isso pode ser evidenciado pelo elevado teor de cinzas encontrado nos IPS modificados (Tabela 1). Sugere-se para trabalhos futuros adicionar mais uma etapa no desenvolvimento do produto após a incorporação do polifosfato e da neutralização, que seria a centrifugação ou filtração, com posterior ressuspensão para o mesmo volume.

O teor médio de lipídios oscilou de 0,08 a 0,34%, sendo inferior aos citados por Jacobucci *et al.* (2001) e Martins (2005), que encontraram, respectivamente, valores de 0,5 e 0,7% em um IPS comercial. Pode-se verificar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os IPSNB, IPSLH e IPSMLH. Também não houve diferença ($p > 0,05$) entre o IPSMNB e o IPSMLH. Entretanto, os IPSNB e IPSLH foram significativamente superiores ($p < 0,05$) ao IPSMNB, conforme demonstrado na Tabela 1.

Para o teor de cinzas, o valor médio variou de 4,17 a 11,79%, tendo o IPSMNB sido significativamente superior ($p < 0,05$) aos demais isolados. Murad (1993) desenvolveu um IPS modificado e encontrou valores superiores (6,3%) aos IPSNB e IPSLH. Já Araújo (1984) encontrou valores

entre 3,59 e 4,82% para diferentes IPS comerciais. Entretanto, todos os resultados foram inferiores quando comparados com os IPSMNB e IPSMLH. Conforme discutido anteriormente, esse maior teor de cinzas para os isolados modificados pode ser justificado pela adição de sal de polifosfato e pela formação de sal (etapa de neutralização), durante a elaboração desses produtos.

O teor médio de carboidratos não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os quatro produtos, variando de 4,08 a 5,85%. Jacobucci *et al.* (2001) encontraram valores inferiores (3,5%) aos deste trabalho.

A composição média de minerais dos IPS está na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição em minerais dos IPS

| Tratamento | Cu ^{1/} (mg/g) | Fe ^{1/} (mg/g) | Mn ^{1/} (mg/g) | Zn ^{1/} (mg/g) | Ca ^{1/} (%) | Mg ^{1/} (%) | K ^{1/} (%) | Na ^{1/} (%) |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| IPSNB ^{2/} | 20,67 a | 105,49 a | 12,20 a | 24,91 c | 0,17 ab | 0,031 c | 0,14 b | 0,74 c |
| IPSLH ^{3/} | 20,03 ab | 96,93 b | 14,19 a | 32,80 a | 0,19 a | 0,040 a | 0,70 a | 0,70 c |
| IPSMNB ^{4/} | 19,36 b | 100,12 b | 14,03 a | 26,88 c | 0,12 c | 0,028 d | 0,13 b | 3,31 b |
| IPSMLH ^{5/} | 18,22 c | 90,14 c | 13,67 a | 30,55 b | 0,15 bc | 0,034 b | 0,60 a | 3,64 a |

* As médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

^{1/} base seca.

^{2/} IPSNB = isolado protéico de soja NB.

^{3/} IPSLH = isolado protéico de soja LH.

^{4/} IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

^{5/} IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

Os teores de cobre variaram de 18,22 a 20,67 $\mu\text{g/g}$. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os IPS comerciais. Também não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o IPSMNB e o IPSLH. Entretanto, o IPSMLH apresentou significativamente ($p < 0,05$) o menor valor, quando comparado com os demais. Murad (1993) desenvolveu um IPS modificado e encontrou resultado superior (30 $\mu\text{g/g}$) ao obtido neste trabalho. Endres (2001) relatou que o teor de cobre pode variar de 10 a 200 $\mu\text{g/g}$ em um IPS.

O teor de ferro nos IPS variou de 90,14 $\mu\text{g/g}$ a 105,49 $\mu\text{g/g}$, tendo o IPSMLH sido significativamente menor ($p < 0,05$). O IPSNB foi significativamente superior ($p < 0,05$) aos demais isolados. Entretanto, não

houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o IPSLH e o PSMNB. Embora tenha ocorrido diferença significativa entre o IPSNB e o IPSMNB, ambos estão dentro da faixa de valores (100 a 200 $\mu\text{g/g}$ de ferro) citados por Endres (2001), enquanto o IPSLH e o seu modificado ficaram abaixo.

Na Tabela 2, pode-se observar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores médios de manganês para os tratamentos, tendo os valores (12,20 a 14,19 $\mu\text{g/g}$) sido inferiores (20 $\mu\text{g/g}$) ao reportado por Endres (2001).

Quanto ao teor de zinco, verifica-se que o valor encontrado no IPSLH foi significativamente superior ($p < 0,05$) aos demais isolados. O IPSMLH foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao IPSMNB e IPSNB, devendo-se ressaltar que entre esses não houve diferença estatística ($p > 0,05$). Todos os valores citados neste trabalho foram menores do que a faixa (40 a 90 $\mu\text{g/g}$) descrita por Endres (2001).

A faixa de valores médios de cálcio para os IPS foi de 0,12 a 0,19%. Araújo (1984) avaliou cinco isolados comerciais, cujo teor de cálcio variou de 0,04 a 0,92%. Além disso, os resultados mostram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os IPSLH e IPSNB e também entre os seus modificados.

O teor médio de magnésio oscilou de 0,03 a 0,04%. Resultados semelhantes foram encontrados por Araújo (1984), em quatro isolados comerciais. MURAD (1993) observou valor superior (0,12%) em um IPS modificado. Observa-se na Tabela 2 que o IPSLH foi significativamente ($p < 0,05$) superior aos demais produtos, enquanto o IPSMNB foi o que apresentou significativamente ($p < 0,05$) o menor valor.

O teor médio de potássio variou de 0,13 a 0,70%, visto que não houve diferença ($p > 0,05$) significativa entre os isolados modificados e seus respectivos comerciais. Endres (2001) reportou valores de 0,1 a 1,4% de potássio, enquanto Araújo (1984) encontrou valores na faixa de 0,10 a 0,15%, semelhantes ao apresentado neste trabalho.

Quanto ao teor de sódio, observa-se que os isolados modificados apresentaram valores significativamente ($p < 0,05$) superiores aos comerciais. Esses resultados podem ser justificados em razão da adição de

solução de NaOH ao processo de neutralização e também da utilização de polifosfato (à base de sódio) na sua elaboração. MURAD (1993) encontrou valor de 2,80% em um IPS modificado.

3.2. Propriedades funcionais

3.2.1. Solubilidade

Os perfis de solubilidade, em função do pH, dos IPS comerciais (NB e LH) e seus respectivos modificados (IPSMNB e IPSMLH) e da caseína humana estão representados na Figura 3.

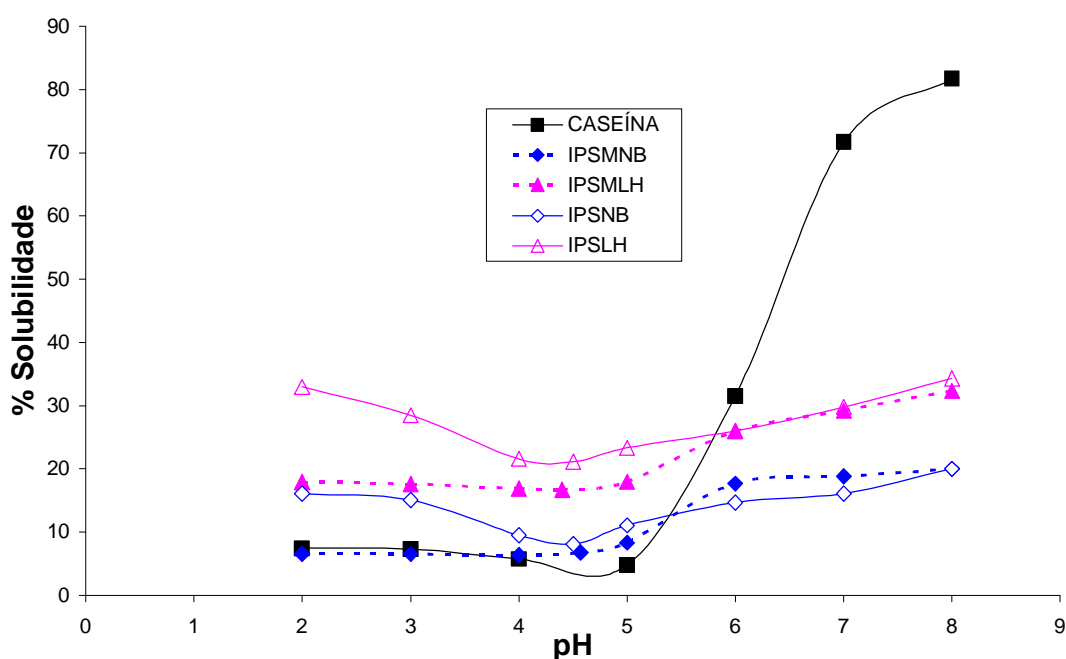


Figura 3 – Perfil de solubilidade da caseína, dos IPS comerciais e modificados.

Na Figura 3, observa-se que o comportamento entre a curva de solubilidade dos IPS comerciais e modificados não foi semelhante. Verifica-se que, para ambos os IPS comerciais, o ponto isoelétrico da proteína situou-se em torno do pH 4,5, estando de acordo com diversos autores (ARAÚJO, 1984; VOJDANI, 1996; LIU, 1997; SORGENTINI e WAGNER, 2002). Os IPS modificados apresentaram solubilidade mínima na faixa de pH 2,0 a 4,5, com ligeiro aumento a partir do pH 5,0

Além disso, também se verifica que os IPS modificados apresentaram perfis de solubilidade semelhantes ao da caseína humana, ou seja, na faixa de pH 2,0 a 5,0, a solubilidade permaneceu baixa e praticamente constante e a partir de pH 5,0 houve aumento na solubilidade, embora este aumento tenha sido bem mais acentuado para a caseína. Para o maior pH avaliado (8,0), as solubilidades do IPSMNB, do IPSMLH e da caseína foram de 20,01, 32,40 e 81,68%, respectivamente. A curva de solubilidade da caseína humana foi bastante semelhante à da caseína bovina, segundo estudos realizados por Cheftel *et al.* (1989) e Duarte *et al.* (1998a), em toda faixa de pH estudada.

Wagner *et al.* (1996) investigaram o efeito de um tratamento ácido moderado em temperatura ambiente sobre as mudanças na estrutura e propriedades funcionais de um IPS. Os autores verificaram que houve desnaturação seletiva da proteína 11S, que conduziu à maior hidrofobicidade. Além disso, observou-se que a solubilidade decresceu em torno de 21% em relação ao IPS comercial. Eles também verificaram que a duração do tratamento ácido não influenciou a solubilidade. Ao testar diferentes concentrações (1 a 8% m/v de IPS), constatou-se maior perda de solubilidade na maior concentração.

Sorgentini *et al.* (1984), citados por WAGNER *et al.* (2000), submeteram um IPS comercial a diferentes combinações de tratamentos, com o objetivo de modificar o grau de desnaturação e agregação das suas principais proteínas constituintes (7S e 11S). O tratamento térmico (80°C) associado à concentração protéica baixa (5% p/p) provocou a desnaturação total da globulina 7S e parcial da 11S. Eles verificaram que o tratamento ácido afetou principalmente a globulina 11S, que apresentou graus de desnaturação crescentes à medida que o pH diminuía de 3,5 para 1,0, aumentando na mesma proporção a hidrofobicidade e também diminuindo a solubilidade. Wagner *et al.* (1996) também observaram o mesmo efeito entre redução de valor de pH e maior queda na solubilidade, explicando que essa menor solubilidade deveria ser devido à maior agregação de proteína causada pelo gradual aumento da desnaturação da globulina 11S, assim como pela agregação induzida pelo aumento da concentração salina, que ocorreu no processo de neutralização do ácido.

Segundo Cheftel *et al.* (1989), a natureza e a concentração de íons exercem efeitos significativos sobre a solubilidade das proteínas. Por exemplo, concentrações salinas compreendidas entre 0,5 e 1 M (para os sais neutros) podem elevar a solubilidade da proteína (efeito *salting in*). Por outro lado, quando os níveis de sais são mais elevados, predominam as interações água-sal, em detrimento das interações água-proteína (efeito *salting out*), contribuindo para reduzir a solubilidade protéica (DUARTE *et al.*, 1998b).

Chen e Soucie (1986) modificaram um IPS comercial para verificar o efeito da ligação de cátions e ânions sobre a carga superficial das proteínas de soja. Eles verificaram que este efeito sobre a molécula de proteína é devido à ionização dos grupos funcionais dos aminoácidos. A força iônica do solvente afeta o grau de dissociação desses grupos funcionais, alterando a carga superficial da proteína e, conseqüentemente a solubilidade. De todos os íons estudados, foi observado que os íons multivalentes, como alumínio, ferro, tripolifosfato e hexametáfosfato, alteraram o ponto isoelétrico do IPS. Por exemplo, em pH 4,5 (ponto isoelétrico da proteína) o hexametáfosfato se ligou à proteína, mantendo-a solúvel, devido à repulsão eletrostática das cargas negativas proporcionadas pelo ânion.

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, supõe-se que os seguintes fatores podem explicar a modificação no perfil de solubilidade dos IPS comerciais: i) o tratamento ácido moderado com HCl (pH 3,0) desnaturou parcialmente a globulina 11S, permitindo maior exposição de grupos hidrofóbicos e, conseqüentemente, maior interação proteína-proteína, o que diminuiu a sua solubilidade; ii) o processo de neutralização proporcionou a formação de sais neutros, que devido à sua alta concentração promoveu o efeito *salting out*, reduzindo a interação proteína-água e também a sua solubilidade; e iii) a combinação tratamento ácido e adição de sal de polifosfato talvez seja o que tenha mais colaborado para a alteração da curva de solubilidade. Ao acertar o pH para 3,0, a superfície da proteína ficou carregada positivamente (pH < PI), e ao adicionar ânions polivalentes, estes se ligaram a ela, reduzindo a repulsão eletrostática e provocando diminuição na solubilidade.

De acordo com a Figura 3, sugere-se que o IPSLH pode ser utilizado como ingrediente em sucos e bebidas carbonatadas, devido à sua maior solubilidade em meio ácido. Para os demais isolados, recomenda-se que eles sejam aplicados em produtos em que a solubilidade não seja uma limitação.

3.2.2. Capacidade de absorção de água (CAA) e capacidade de absorção de óleo (CAO)

A CAA é um indicador usual se farinhas ou isolados podem ser incorporados em formulações alimentícias em meio aquoso. A CAO pode determinar se o material protéico irá atuar bem em produtos cárneos, como os análogos e os cominuídos, e também em produtos de panificação (OKEZIE e BELLO, 1988; WONG e KITTS, 2003).

A Tabela 3 mostra o efeito do pH na capacidade de absorção de água (CAA) nos diferentes isolados protéicos de soja.

Tabela 3 – Efeito do pH na capacidade de absorção de água (g água absorvida/g amostra) nos isolados protéicos de soja

| Tratamento | pH | | | | | |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| | 3,0* | 4,0* | 5,0* | 6,0* | 7,0* | 8,0* |
| IPSMNB ^{1/} | 2,42 c | 2,30 c | 2,50 b | 3,35 b | 4,07 b | 4,43 b |
| IPSMNH ^{2/} | 2,33 c | 2,18 c | 2,38 b | 2,47 d | 2,69 c | 3,15 c |
| IPSNB ^{3/} | 5,06 a | 3,13 a | 2,98 a | 3,96 a | 5,63 a | 8,04 a |
| IPSLH ^{4/} | 4,10 b | 2,65 b | 2,48 b | 2,74 c | 3,67 bc | 4,72 b |

* As médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

¹ IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

² IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

³ IPSNB = isolado protéico de soja NB

⁴ IPSLH = isolado protéico de soja LH.

De acordo com os resultados encontrados no Tabela 3, verifica-se que o IPSNB apresentou significativamente ($p < 0,05$) maior absorção de água em todas as faixas de pH estudadas. Nos pHs 3,0 e 4,0, observa-se que a CAA do IPSLH foi significativamente ($p < 0,05$) superior à dos isolados modificados, não havendo diferença estatística ($p > 0,05$) entre esses. No

pH 5,0 não houve diferença ($p > 0,05$) significativa de CAA entre os IPSLH, IPSMNB e IPSMLH. No pH 6,0 e 8,0, o valor de CAA para o IPSMLH foi significativamente ($p < 0,05$) inferior ao dos demais isolados. Para o pH 7,0, a CAA do IPSMNB foi semelhante ao encontrado no IPSLH, tendo este não diferido do seu isolado modificado.

A Figura 4 apresenta o comportamento da CAA dos diferentes IPS, em função do pH.

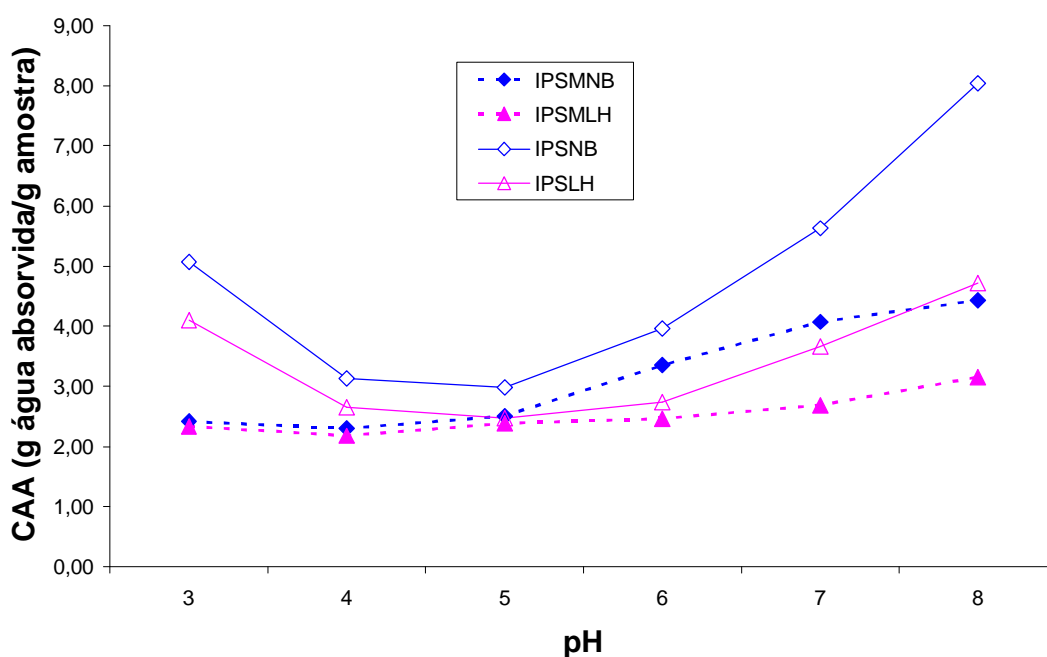


Figura 4 – Capacidade de absorção de água dos IPS em diferentes pHs.

Observando o comportamento dos IPS comerciais, pode-se verificar a tendência geral de aumento dos valores de CAA encontrados quando de sua aproximação dos intervalos extremos da faixa de pH avaliada, sendo notados valores mínimos entre os pHs 4,0 e 5,0, próximo ao ponto isoelétrico das proteínas. Já para os IPS modificados, observa-se que na faixa de pH 3,0 a 5,0, que também apresentou menor solubilidade (Figura 4), a CAA foi mínima, com tendência de aumento a partir do pH 6,0.

Ordóñez *et al.* (2005) reportaram que quando determinada proteína é encontrada em valores de pH distantes do ponto isoelétrico, ela está carregada positiva ou negativamente; assim, as moléculas de água reagem com ela facilmente, contribuindo, desse modo, para a sua hidratação.

Entretanto, se o pH da dispersão protéica coincide com o ponto isoelétrico, as interações entre as proteínas são máximas e, portanto, o grau de hidratação é mínimo, o que justifica o comportamento dos IPS comerciais encontrados neste estudo.

A concentração e a natureza dos íons presentes em uma dispersão protéica têm efeito muito importante na CAA. Estabelece-se uma relação entre a água, os sais e as cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas. Em concentrações salinas baixas, a CAA pode aumentar (efeito *salting in*), enquanto em concentrações salinas elevadas ocorre uma competição entre os sais e a proteína pela água, cuja CAA pode diminuir (efeito *salting out*) (DUARTE *et al.*, 1998b; ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

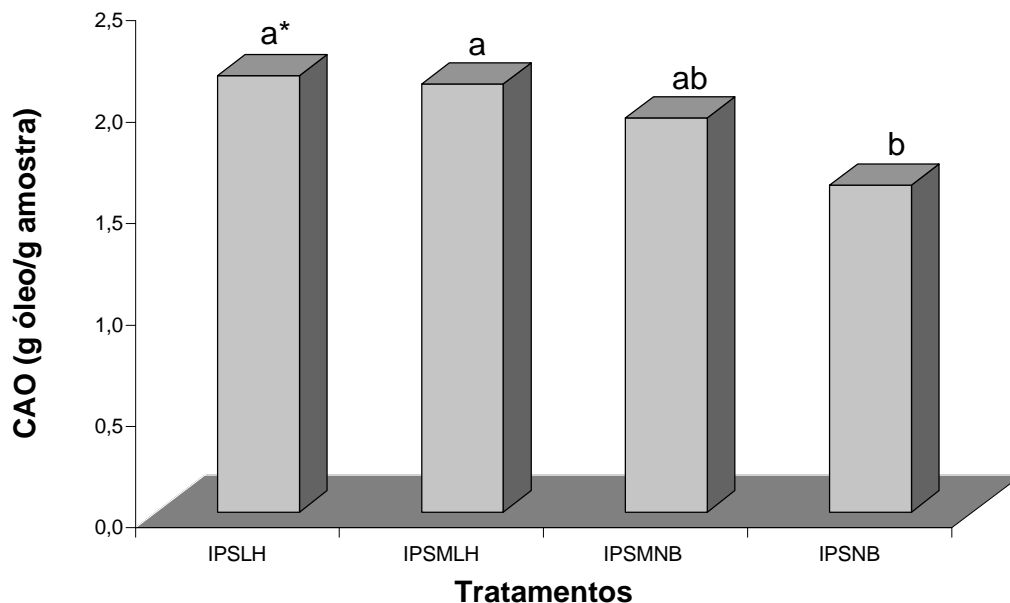
Wong e Kitts (2003) encontraram correlação inversa entre solubilidade e CAA para um IPS comercial, explicando que a formação de uma matriz estável da proteína parcialmente desnaturada, durante a secagem, implicava redução da superfície protéica exposta à água. Entretanto, Murad (1993) estudou um IPS modificado e verificou correlação positiva entre solubilidade e CAA, o que está de acordo com os resultados apresentados neste trabalho.

Além disso, acredita-se que outros fatores contribuíram para os resultados encontrados, como o tratamento ácido moderado (desnaturação parcial) e a alta concentração de sais, que podem ter contribuído para o comportamento observado para os IPS modificados, principalmente na faixa de pH 3,0 a 5,0.

Os resultados da CAO (g óleo absorvido/g amostra) estão na Figura 5.

A CAO variou de 1,61 a 2,15 g de óleo/g de IPS. De acordo com a Figura 5, pode-se observar que não houve diferença ($p > 0,05$) significativa entre os IPSLH, IPSMLH e IPSMNB. Este último foi semelhante ao seu isolado comercial. Wong e Kitts (2003) encontraram, em um IPS comercial, valor de 2,54 g de óleo/g de IPS. Moure *et al.* (2006) reportaram valores semelhantes aos encontrados neste estudo de CAO em diferentes IPS comerciais, que variaram de 1,55 a 2,38 g de óleo/g de IPS.

Segundo Donadel e Prudencio-Ferreira (1999), a absorção de gordura varia em função do número de grupos hidrofóbicos expostos da proteína, o que indica que provavelmente as cadeias laterais não-polares das proteínas tenham afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de gordura.



* As colunas do histograma, seguidas pelas mesmas letras, não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.
 IPSLH = isolado protéico de soja LH.
 IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.
 IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.
 IPSNB = isolado protéico de soja NB.

Figura 5 – Capacidade de absorção de óleo (CAO) para os IPS.

3.2.3. Emulsificação e estabilidade da emulsão

A Tabela 4 mostra o efeito do pH na atividade emulsificante (AE) dos diferentes IPS.

De acordo com os resultados encontrados no Tabela 4, observa-se no pH 3,0 que a AE do IPSNB foi significativamente superior ($p < 0,05$) à do IPSMNB, enquanto não houve diferença ($p > 0,05$) significativa entre o IPSLH e o IPSMLH. Nos pHs 4,0 e 5,0, a AE do IPSMNB foi significativamente superior ($p < 0,05$) à dos demais isolados. No pH 6,0, a AE do IPSLH foi significativamente superior ($p < 0,05$) à dos demais tratamentos, não havendo diferença estatística entre esses últimos. Nos pHs 7,0 e 8,0 não houve diferença ($p > 0,05$) significativa de AE entre os tratamentos. Portanto, a escolha do IPS vai depender da AE em um determinado pH do alimento.

A Figura 6 representa a AE (%) dos IPS, em função do pH.

Tabela 4 – Efeito do pH na atividade emulsificante (%) nos tratamentos

| Tratamento | pH | | | | | |
|----------------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 3,0* | 4,0* | 5,0* | 6,0* | 7,0* | 8,0* |
| IPSMNB ^{1/} | 16,94 b | 48,00 a | 49,36 a | 16,59 b | 34,50 a | 45,07 a |
| IPSMNH ^{2/} | 44,49 a | 7,24 d | 12,37 b | 8,16 b | 18,76 a | 29,84 a |
| IPSNB ^{3/} | 47,83 a | 15,91 c | 12,26 b | 16,70 b | 39,05 a | 46,06 a |
| IPSLH ^{4/} | 34,62 ab | 44,86 b | 8,23 b | 34,45 a | 32,86 a | 47,76 a |

* As médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

^{1/} IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

^{2/} IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

^{3/} IPSNB = isolado protéico de soja NB.

^{4/} IPSLH = isolado protéico de soja LH.

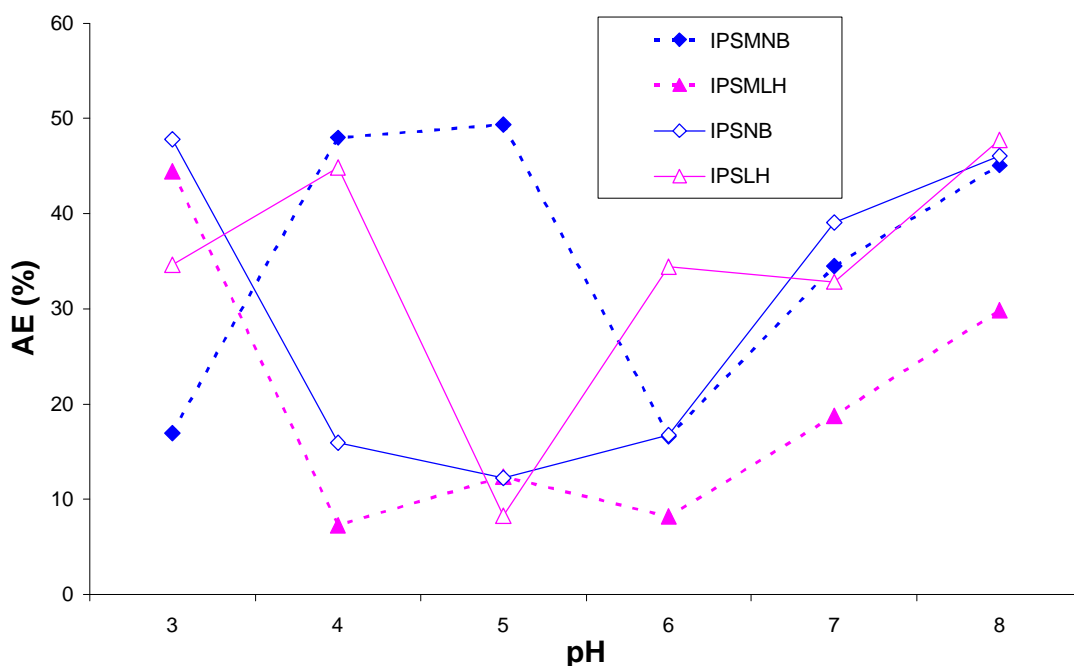


Figura 6 – Atividade emulsificante dos IPS avaliados em diferentes valores de pH.

Pode-se observar que para os IPS comerciais a AE mínima ocorreu próximo ao ponto isoelétrico da proteína (pH 5,0), enquanto nos valores extremos da faixa de pH avaliada a AE foi alta. Segundo Wong e Kitts (2003), a ionização das proteínas em diversos valores de pH afeta a atividade emulsificante. Eles verificaram que o aumento no pH em direção à

alcalinidade promove uma carga superficial negativa na molécula de proteína, facilitando a emulsificação por promover maior interação proteína-óleo do que proteína-proteína.

Estudos têm demonstrado que existe correlação positiva entre solubilidade e capacidade emulsificante (CHEFTEL *et al.*, 1989; MURAD, 1993; ELIZALDE *et al.*, 1996). Moure *et al.* (2006) reportaram que proteínas altamente insolúveis não são emulsificantes. Portanto, nota-se que os resultados apresentados neste trabalho para os IPS comerciais estão de acordo com esses autores. Entretanto, Wang e Kinsella (1976) e Aoki *et al.* (1980), citados por Murad (1993), discordaram dessa afirmação.

Constata-se na Figura 6 que o IPSMNB mostrou comportamento inverso de AE, em comparação com o IPSNB, nas faixas de pH de 3 a 5, ou seja, AE mínima em pH 3,0 e alta AE nos pHs 4,0 e 5,0. Já para o IPSMLH, pode-se verificar que o comportamento da curva foi semelhante à do seu comercial, porém apresentou menor AE no pH 4,0 e 6,0.

A AE depende de vários fatores, como hidrofobicidade, pH, força iônica, temperatura e solubilidade. Portanto, como os IPS modificados sofreram combinação de tratamentos, é difícil concluir qual fator principal contribuiu para os resultados encontrados.

A Tabela 5 e a Figura 7 apresentam a estabilidade de emulsão (EE) dos IPS após 24 horas em repouso.

Na Tabela 5, observa-se que não houve diferença ($p > 0,05$) significativa para EE entre os IPS na faixa de pH de 3,0 a 6,0. No pH 7,0, O IPSMNB não diferiu ($p > 0,05$) significativamente do IPSNB, enquanto o IPSMLH foi significativamente ($p < 0,05$) inferior ao IPSLH. No pH 8,0, os IPS modificados foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos isolados comerciais.

Nota-se na Figura 7 que os IPS comerciais apresentaram boa EE, praticamente constante em toda faixa de pH estudada. Entretanto, para os IPS modificados observa-se ligeira queda na EE no pH 6,0, com uma diminuição acentuada nos pHs 7,0 e 8,0.

Wong e Kitts (2003) encontraram uma forte correlação entre solubilidade e estabilidade de emulsão. Elizalde *et al.* (1996) e Yim e Lee (2000) reportaram que perto da região do ponto isoelétrico a estabilidade de

Tabela 5 – Efeito do pH na estabilidade emulsificante (%) nos tratamentos

| Tratamento | pH | | | | | |
|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 3,0* | 4,0* | 5,0* | 6,0* | 7,0* | 8,0* |
| IPSMNB ^{1/} | 96,43 a | 100,00 a | 100,00 a | 88,54 a | 51,72 b | 53,54 bc |
| IPSMNH ^{2/} | 100,00 a | 100,00 a | 100,00 a | 81,04 a | 53,63 b | 38,33 c |
| IPSNB ^{3/} | 100,00 a | 100,00 a | 100,00 a | 100,00 a | 79,57 ab | 100,00 a |
| IPSLH ^{4/} | 100,00 a | 96,75 a | 98,14 a | 87,67 a | 91,33 a | 77,80 ab |

* As médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

^{1/} IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

^{2/} IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

^{3/} IPSNB = isolado protéico de soja NB.

^{4/} IPSLH = isolado protéico de soja LH.

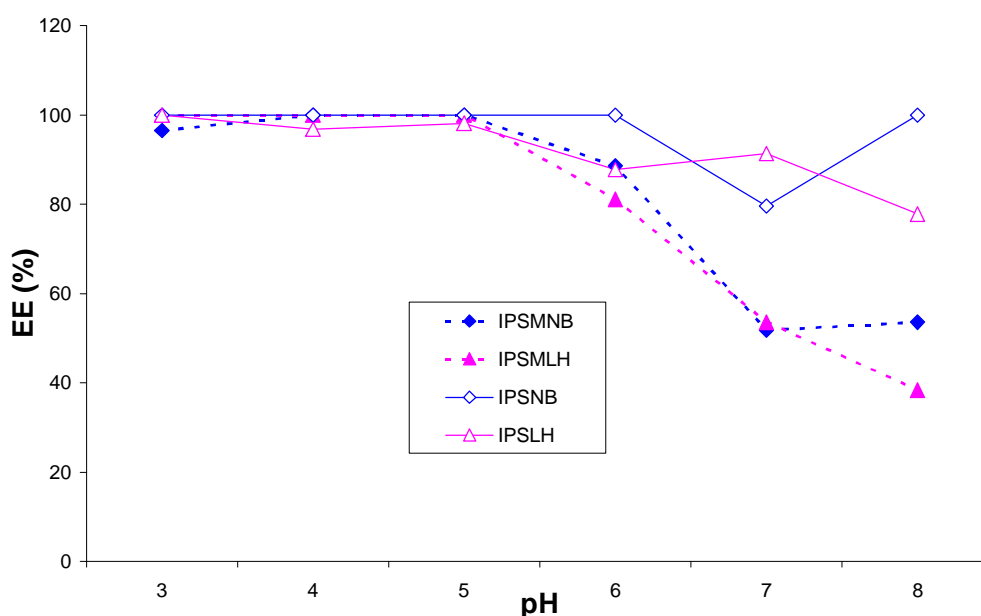


Figura 7 – Estabilidade de emulsão após 24 horas à temperatura ambiente.

emulsão tende a diminuir, devido à carga elétrica líquida ser próximo de zero e, portanto, haver redução da repulsão eletrostática, fazendo com que ocorra floculação das gotículas de gordura e, conseqüentemente, reduzindo a EE. De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, pode-se verificar que, na região do ponto isoelétrico dos IPS comerciais (pHs 4,0 e 5,0), não houve diminuição da EE, discordando então dos resultados encontrados por esses autores. Além disso, os IPS modificados apresentaram solubilidade mínima na faixa de pH 2,0 a 5,0 e apresentaram alta EE nessa faixa de pH.

Estudos têm demonstrado correlação positiva entre hidrofobicidade superficial e AE e EE (YIM e LEE, 2000; WONG e KITTS, 2003). Portanto, quando as interações eletrostáticas não existem, as interações hidrofóbicas se tornam importantes. Portanto, sugere-se que, em parte, o comportamento de EE apresentado nos IPS modificados, nas faixas de pH 3,0 a 5,0, possa ser devido a possíveis interações hidrofóbicas entre essas proteínas, pelo fato de que pode ter ocorrido desnaturação parcial das proteínas com o tratamento ácido.

3.2.4. Espumabilidade e estabilidade de espuma

A Tabela 6 mostra o efeito do pH na capacidade de formação de espuma (CFE), nos diferentes IPS.

Tabela 6 – Efeito do pH na capacidade de formação de espuma (%) nos tratamentos

| Tratamento | pH | | | | |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| | 3,0* | 4,0* | 5,0* | 6,0* | 7,0* |
| IPSMNB ¹ | 170,73 b | 141,46 b | 275,61 a | 269,51 a | 215,85 a |
| IPSMNH ² | 551,83 a | 411,59 a | 346,34 a | 239,63 a | 148,17 b |
| IPSNB ³ | 154,88 b | 134,76 b | 118,29 b | 126,83 b | 128,05 c |
| IPSLH ⁴ | 297,56 b | 346,34 a | 196,34 b | 129,88 b | 135,06 bc |

* As médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

^{1/} IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

^{2/} IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

^{3/} IPSNB = isolado protéico de soja NB.

^{4/} IPSLH = isolado protéico de soja LH.

O IPSMLH mostrou significativamente ($p < 0,05$) maior CFE do que o seu isolado comercial no pH 3,0, contudo não houve diferença ($p > 0,05$) estatística entre a CFE do IPSNB e o seu modificado. No pH 4,0, observa-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) de CFE entre isolados comerciais e modificados. Nos pHs 5,0 e 6,0, verifica-se que houve diferença ($p < 0,05$) significativa entre a CFE dos isolados comerciais e modificados, devendo ser ressaltado que não foi encontrada diferença ($p > 0,05$)

estatística entre estes. O IPSMNB apresentou significativamente ($p < 0,05$) maior CFE no pH 7,0 do que os demais isolados.

Sorgentini *et al.* (1984), citados por Wagner *et al.* (2000), modificaram um IPS comercial por tratamento ácido e observaram que a capacidade espumante melhorou em meio ácido, em maior grau no menor pH (1,0). Sorgentini e Wagner (2002) reportaram que em pH menor que 3,5 ocorre desnaturação seletiva da globulina 11S, o que promove maior hidrofobicidade superficial e melhora a capacidade de formação de espumas.

Estudos têm demonstrado que o aumento na concentração salina pode aumentar a formação de espumas em proteínas (WAGNER *et al.*, 1996; RAGAB *et al.*, 2004).

Na Tabela 6, verifica-se que a CFE do IPSMLH diminuía à medida que o pH aumentava. Cheftel *et al.* (1989) e Murad (1993) observaram máxima formação de espuma pelas proteínas em valores de pH logo abaixo do ponto isoelétrico. Wong e Kitts (2003) encontraram alta capacidade espumante na região fora do ponto isoelétrico (pH 4,5) de um IPS comercial. O IPSLH teve o mesmo comportamento, com exceção somente no pH 4,0, embora não tenha ocorrido diferença significativa ($p > 0,05$) com o seu modificado.

Entretanto, vale ressaltar que a solubilidade do IPSMLH foi relativamente baixa na faixa de pH 3,0 a 5,0. Portanto, outros fatores, como a provável desnaturação das proteínas com o tratamento ácido e a alta concentração de sais, podem ter colaborado com os resultados apresentados neste estudo.

O IPSNB apresentou baixa CFE ao longo de todo o pH, principalmente na faixa de pH do ponto isoelétrico (pHs 4,0 e 5,0), o que talvez esteja correlacionado com a sua baixa solubilidade em toda faixa de pH. Ragab *et al.* (2004) e Ordóñez *et al.* (2005) reportaram que as proteínas são pouco solúveis no ponto isoelétrico, e apenas a fração solúvel influencia a formação de espuma, ou seja, como a sua concentração é muito baixa a quantidade de espuma que se forma é muito pequena.

Na faixa de pH 3,0 e 4,0 verifica-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na CFE do IPSMNB e IPSNB, apresentando maior valor ($p < 0,05$) a partir do pH 5,0.

Portanto, acredita-se que um conjunto de efeitos, devido à combinação de tratamentos, tenha colaborado para os resultados apresentados neste trabalho.

As Figuras 8, 9, 10, 11 e 12 representam a estabilidade de espuma (EE) dos IPS, em função dos valores de pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0, respectivamente.

Nas faixas de pH 3,0 e 4,0, observa-se que o comportamento da curva de EE foi similar entre os isolados comerciais e os seus respectivos modificados. Entretanto, verifica-se no pH 3,0 maior EE de espuma para o IPSMNB do que o IPSNB, em todo o tempo analisado. O IPSMLH apresentou no pH 3,0 maior EE do que todos os isolados estudados, até atingir o tempo de 10 minutos. Após esse tempo, verificou-se uma queda acentuada da sua estabilidade. No pH 4,0, verifica-se que a EE foi bastante semelhante entre os IPSLH e IPSMLH e os IPSNB e IPSMNB.

Nos pHs 5,0 e 6,0, pode-se observar que a modificação dos IPS comerciais resultou em maior EE em todo o tempo analisado.

No pH 7,0, verifica-se que o IPMNB foi o que apresentou maior EE do que os IPS.

Wong e Kitts (2003) e Ordóñez *et al.* (2005) relataram que a maior EE de uma proteína pode ser encontrada em pH do ponto isoelétrico. Isto se deve ao fato de que as atrações eletrostáticas intermoleculares produzidas nesses valores de pH são máximas e aumentam a espessura e rigidez das proteínas adsorvidas na interface ar/água, resultando em maior estabilidade. De acordo com os resultados apresentados neste estudo, pode-se verificar que os IPS comerciais não apresentaram boa EE, principalmente o IPSNB, nas faixas de pH 4,0 e 5,0, próximo ao ponto isoelétrico das proteínas.

Wagner *et al.* (1996) encontraram correlação positiva entre hidrofobicidade e estabilidade de espuma em um IPS modificado por tratamento ácido. Eles sugeriram que a desnaturação da proteína promovia melhor adsorção da proteína na interface ar/água, aumentando a estabilidade. Supõe-se, para este estudo, que a maior EE encontrada em alguns valores de pH nos isolados modificados pode ser parcialmente

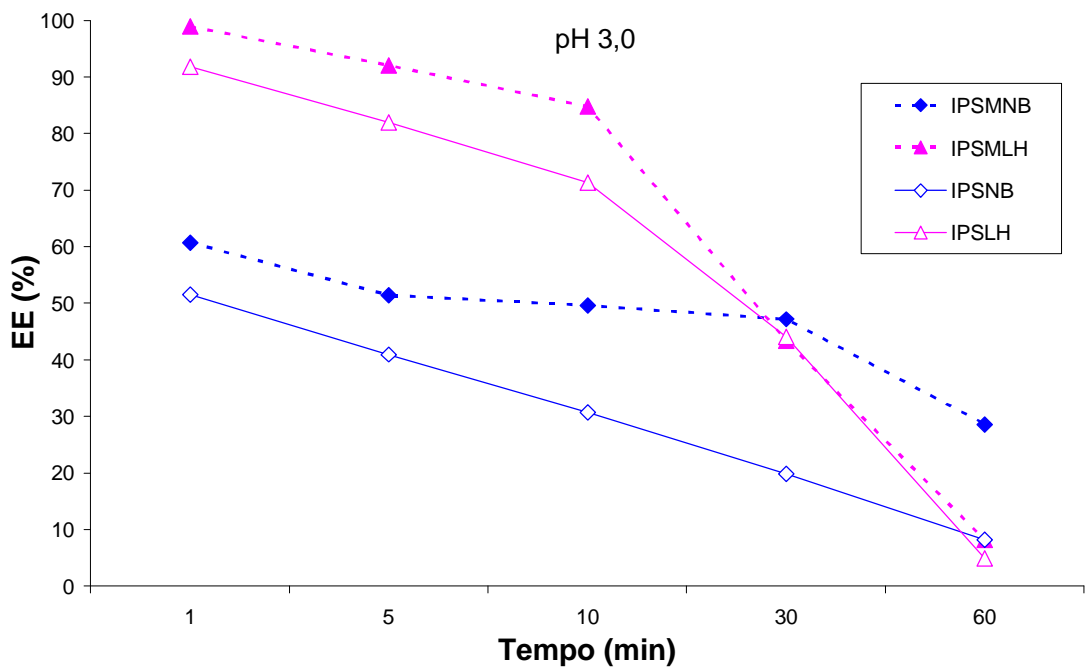


Figura 8 – Estabilidade de espuma (%) dos IPS em pH 3,0.

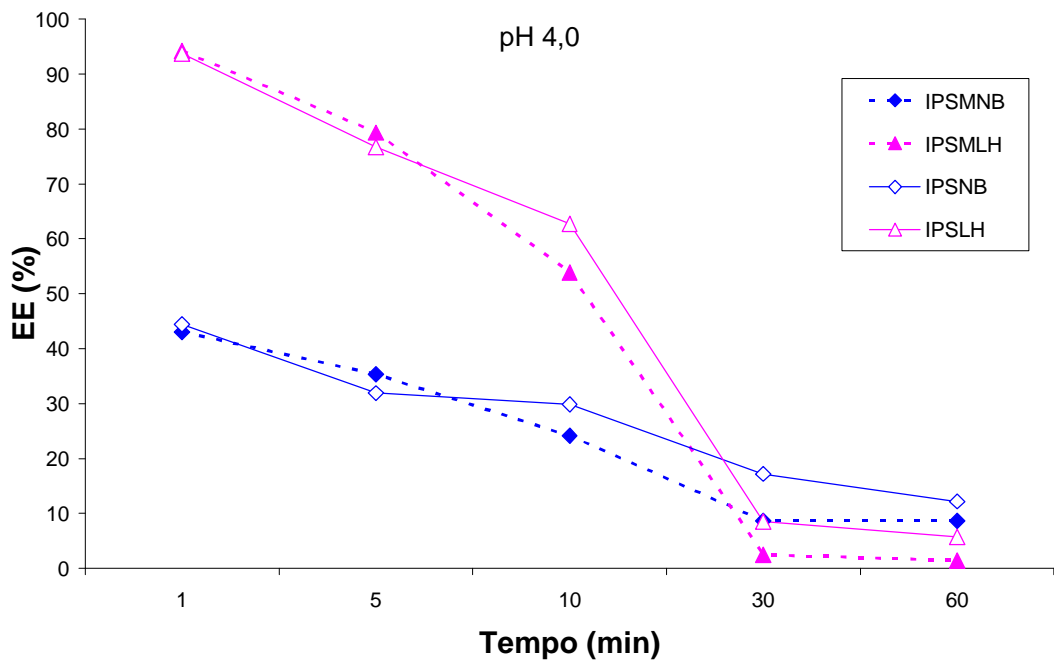


Figura 9 – Estabilidade de espuma (%) dos IPS em pH 4,0.

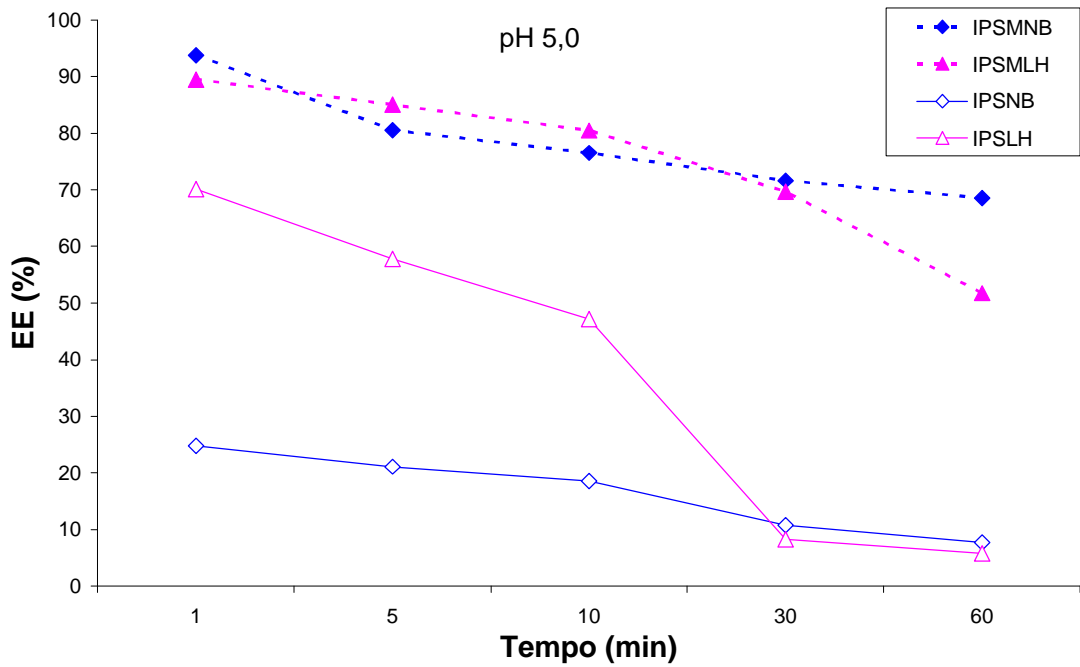


Figura 10 – Estabilidade de espuma (%) dos IPS em pH 5,0.

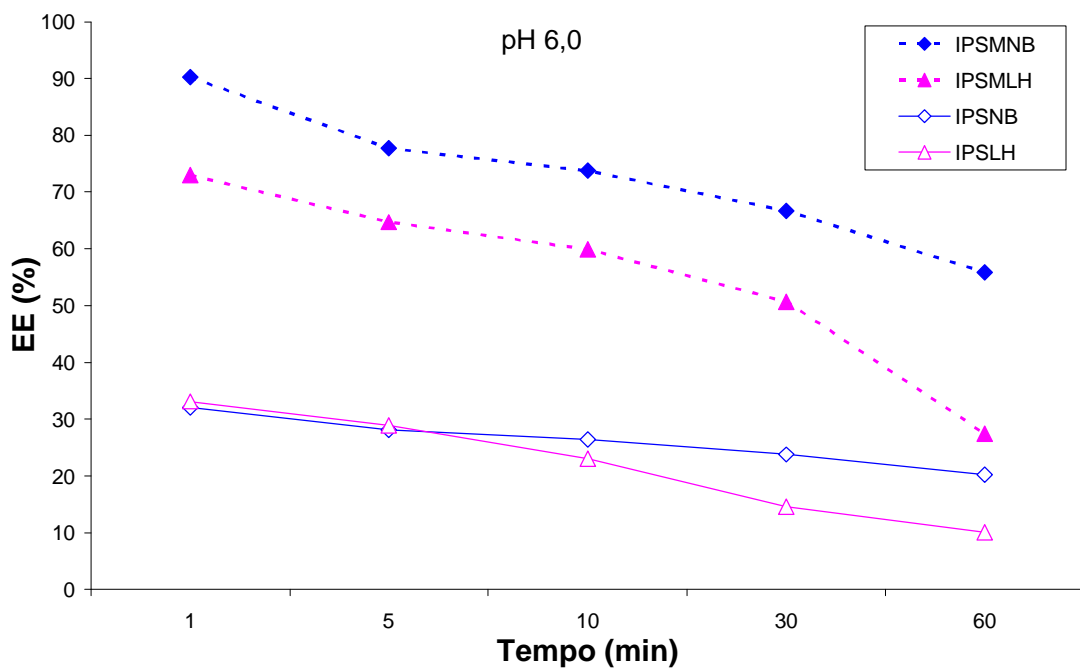


Figura 11 – Estabilidade de espuma (%) dos IPS em pH 6,0.

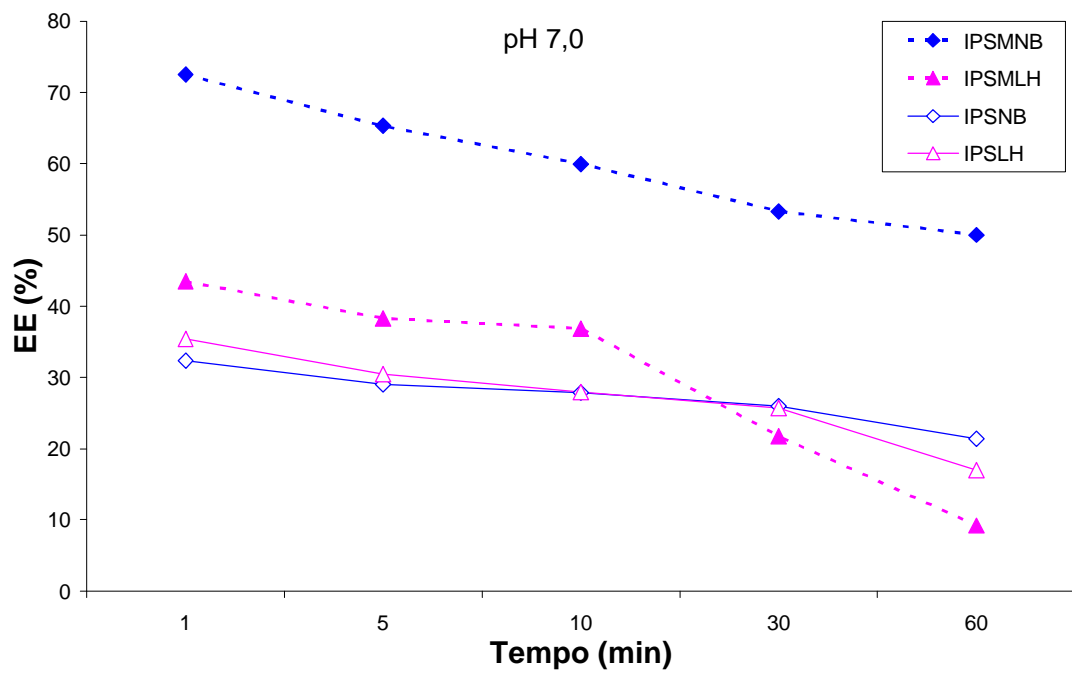


Figura 12 – Estabilidade de espuma (%) dos IPS em pH 7,0.

explicada por esses autores. Parcialmente, pelo fato de que altas concentrações salinas têm proporcionado maior estabilidade de espuma, visto que maior interação proteína-proteína tem efeito estabilizante na lamínula da proteína.

4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os isolados protéicos de soja modificados apresentaram valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) nos teores de proteína, quando comparados com os isolados comerciais. Essa redução foi acompanhada por um aumento no teor de cinzas desses produtos, que pode ser explicado pelo tratamento realizado nos isolados comerciais, que foi a adição de sal de polifosfato e neutralização. Sugere-se mais uma etapa de processamento dos isolados modificados, que poderia ser a centrifugação ou filtração, com posterior ressuspensão para o mesmo volume.

Os teores de minerais encontrados neste trabalho estão de acordo com os reportados pela literatura, com exceção de manganês e zinco, que apresentaram valores médios inferiores. O teor de sódio dos isolados modificados foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao dos comerciais, o que pode ser justificado pelas etapas de adição de sal de polifosfato e neutralização.

Os isolados protéicos de soja modificados apresentaram um perfil de solubilidade diferente dos isolados comerciais, principalmente na faixa de pH 2 a 5, assemelhando-se ao perfil da caseína humana.

O IPSNB foi o que apresentou significativamente ($p < 0,05$) maior capacidade de absorção de água (CAA), quando comparado com os demais isolados. A modificação dos isolados propiciou diminuição da CAA, principalmente na faixa de pH entre 3,0 e 5,0.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de capacidade de absorção de óleo (CAO) entre os isolados comerciais e modificados.

A atividade emulsificante (AE) dos IPS variou em função do pH, o que demonstra que a escolha do produto vai depender da faixa de pH encontrada em um determinado alimento.

A estabilidade emulsificante (EE) foi constante para todos os tratamentos na faixa de pH 3,0 a 5,0, com pequena redução para os isolados comerciais, a partir do pH 6,0. Já os isolados modificados apresentaram queda constante de EE na faixa de pH 6,0 a 8,0. Portanto, a escolha de um IPS vai depender tanto da AE quanto da EE, em função da faixa de pH do alimento.

A capacidade de formação de espuma (CFE) do IPMLH foi significativamente maior que a do IPSLH ($p < 0,05$), nos pHs 3,0, 5,0, 6,0 e 7,0. Os valores de CFE para o IPSMNB foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos do IPSNB, nos pHs 5,0, 6,0 e 7,0. De modo geral, pode-se concluir que a modificação dos IPS comerciais melhorou a sua CFE.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTÉICA DE ISOLADOS PROTÉICOS DE SOJA MODIFICADOS

1. INTRODUÇÃO

O interesse na utilização de proteínas vegetais e seus derivados pela indústria de alimentos tem crescido consideravelmente. A soja, em razão de suas qualidades nutricionais, é considerada um alimento com propriedades funcionais que contribuem com a saúde, auxiliando na prevenção de diversas doenças. Além disso, ela tem grande disponibilidade no mercado, baixo custo e alta produção, devendo ser ressaltado que o Brasil destaca-se como o segundo produtor mundial (RODRIGUES *et al.*, 2003; MARTINS, 2005).

A soja, nos países ocidentais, vem sendo utilizada principalmente no consumo de óleo e ração animal, sendo restrita a sua utilização e de seus derivados na alimentação humana (MONTEIRO, 2000). Entretanto, a aplicação dos produtos protéicos de soja sob a forma de ingredientes em alimentos industrializados tem aumentado a sua aceitação (ENDRES, 2001).

A produção do isolado protéico de soja (IPS) é mais elaborada dentre os derivados protéicos (farinha de soja e concentrado protéico), sendo preparado por meio de processo de fracionamento em etapas (ENDRES, 2001).

O IPS tem sido recomendado no tratamento de crianças com quadros de alergia verdadeira. Entretanto, alguns problemas relacionados com a digestão e absorção dessa proteína têm limitado o seu uso, principalmente nos casos de intolerância alimentar (MURARO *et al.*, 2002).

As proteínas podem ser hidrolisadas por meio de tratamento ácido, alcalino ou enzimático para produção de peptídeos e, eventualmente, aminoácidos. A modificação de IPS tem sido empregada com o objetivo de melhorar a qualidade protéica e funcional da proteína, devendo ser ressaltado que a hidrólise enzimática tem sido preferencialmente utilizada aos tratamentos químicos. Porém, essa tecnologia apresenta problemas como alto custo e possibilidade de falta de controle no tamanho dos peptídeos, que pode ocasionar sabor amargo ao produto (DE LA BARCA *et al.*, 2000; MARTINS, 2005).

A qualidade nutricional de uma proteína depende basicamente da sua composição em aminoácidos indispensáveis, biodisponibilidade, digestibilidade e ausência de fatores antinutricionais. A digestibilidade indica o quanto das proteínas é hidrolisado pelas enzimas digestivas e absorvido pelo organismo (FRIEDMAN, 1996; MONTEIRO *et al.*, 2004).

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivos modificar dois isolados protéicos de soja comerciais por meio da alteração do seu perfil de solubilidade, utilizando-se tratamento ácido moderado e sal de polifosfato, de modo que apresentassem curvas de solubilidade semelhante à da caseína humana, e, também, avaliar se a modificação realizada influenciaria a qualidade protéica desses isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.1. Obtenção e modificação do isolado protéico de soja

2.1.1. Obtenção do isolado protéico de soja

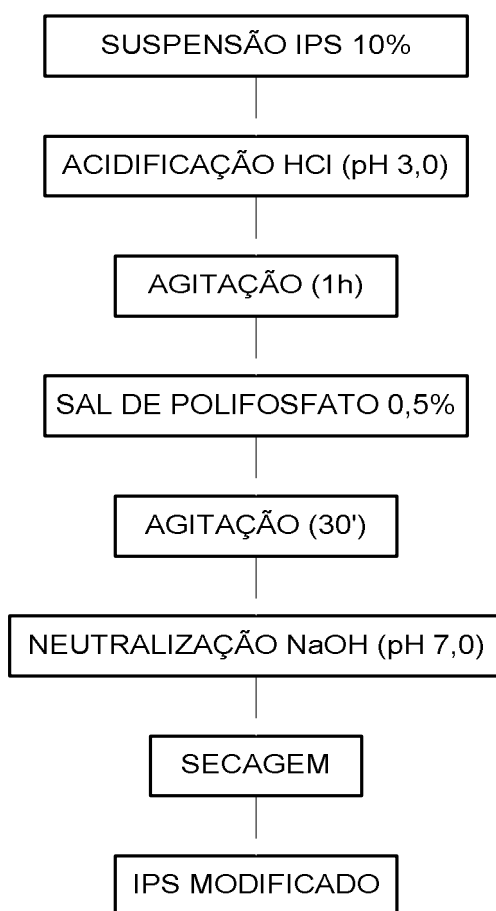
Dois isolados protéicos de soja comerciais (SAMPROSOY 90 LH e SAMPROSOY 90 NB) foram adquiridos da BUNGE Alimentos. Essas amostras foram denominadas IPSLH e IPSNB, respectivamente.

2.1.2. Modificação dos isolados protéicos de soja

A modificação dos IPS foi baseada no método proposto por GOMES *et al.* (1992), com algumas adaptações.

Foram preparadas suspensões dos isolados protéicos de soja comerciais, de modo que a concentração fosse igual a 10 g de IPS/100 mL. Em seguida, o meio foi acidificado com HCl, mantendo-se a suspensão em pH 3,0 por 1 hora. Após a acidificação, foi adicionado polifosfato, de forma que a sua concentração final na suspensão fosse de 0,5% (m/v). A

suspensão foi homogeneizada sob agitação manual por mais 30 minutos e depois neutralizada com NaOH, até pH 7,0. Finalmente, a suspensão da proteína modificada foi conduzida ao tanque de alimentação, para secagem em *spray-dryer* (*Niro Atomizer modelo Minor Production*), com ar de entrada aquecido à temperatura de 210-220°C e ar de saída a 95-110°C, com vazão média de 10 L/hora, obtendo-se assim os IPS modificados LH e NB (IPSMNH e IPSMNB). Um fluxograma do processo da modificação dos IPS, conforme descrito previamente, pode ser observado na Figura 1.



individuais de aço inoxidável, com ciclo de luz de 12 horas, onde receberam água e alimento *ad libitum*, conforme recomendação da AOAC (1984). A distribuição foi sistemática, a fim de possibilitar a menor variação possível entre grupos.

O experimento foi conduzido por meio de ensaios biológicos, durante 14 dias, sendo constituído de seis grupos: um grupo-controle com dieta aprotéica (livre de nitrogênio – LN), um com dieta-padrão de caseína (CAS), e mais quatro dietas compostas das fontes protéicas dos isolados citadas anteriormente, perfazendo um total de 36 animais, ou seja, seis repetições (blocos) para cada grupo de fonte protéica avaliado. O delineamento experimental está representado na Figura 2.

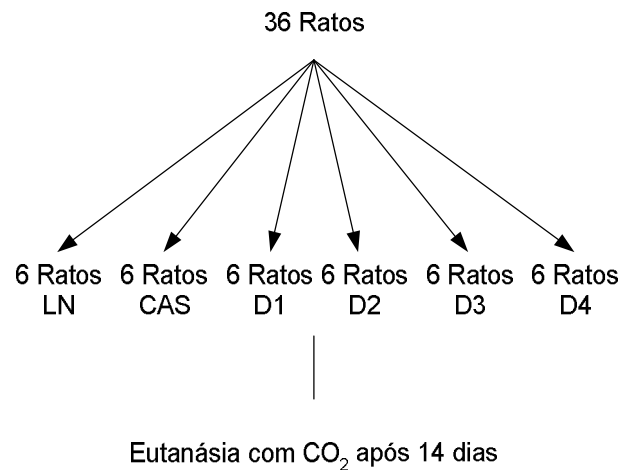


Tabela 1 – Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico (g/100 g mistura)

| Ingredientes (g/100g) | Dietas | | | | | |
|---------------------------|--------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | LN | Caseína | D1 | D2 | D3 | D4 |
| Caseína | - | 11,68 | - | - | - | - |
| Isolado protéico de soja | - | - | 11,59 | 11,43 | 12,16 | 12,25 |
| Maltodextrina | 13,2 | 13,2 | 13,2 | 13,2 | 13,2 | 13,2 |
| Celulose microfina | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 |
| Sacarose | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| Óleo de soja ⁴ | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 |
| Mistura mineral | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 |
| Mistura vitamínica | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| L-cistina | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Bitartarato de colina | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Amido de milho (q.s.p.) | 59,75 | 48,07 | 48,16 | 48,32 | 47,59 | 47,50 |
| Proteína (%) | - | 10,06 | 9,96 | 9,72 | 10,05 | 9,28 |

Fonte: Reeves *et al.* (1993).

D1 = dieta de isolado protéico de soja LH (IPSLH).

D2 = dieta de isolado protéico de soja NB (IPSNB).

D3 = dieta de isolado protéico de soja modificado LH (IPSMNH).

D4 = dieta de isolado protéico de soja modificado NB (IPSMNB).

O consumo alimentar e o peso corporal dos animais foram registrados semanalmente. A ingestão alimentar foi utilizada para o cálculo do coeficiente de eficiência alimentar, bem como o cálculo de digestibilidade das fontes protéicas.

No final do experimento, os animais foram pesados e procedeu-se à eutanásia, por asfixia com CO₂.

2.3. Digestibilidade *in vivo*

Para determinação da digestibilidade, as dietas foram marcadas com corante índigo carmim (100 mg/100 g de dieta) e oferecidas aos animais no sétimo e décimo dia do experimento.

As fezes foram coletadas entre o oitavo e 11^o dia, armazenadas em recipientes individuais, e mantidas sob refrigeração até o período de análise.

Ao término do experimento, as fezes foram secas em estufa (marca Fanem) com circulação de ar a 105°C, por 24 horas, resfriadas em dessecador, trituradas em multiprocessador e pesadas em balança analítica. O nitrogênio fecal foi determinado em triplicata, pelo método semimicro *Kjedahl* (AOAC, 1984).

O cálculo da digestibilidade verdadeira foi determinado de acordo com a seguinte fórmula (NATIONAL..., 1963):

$$D(\%) = \frac{I - (F - F_K)}{I} \times 100$$

em que

D = digestibilidade;

I = nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta-teste;

F = nitrogênio fecal do grupo com dieta-teste; e

F_K = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

Calculou-se a digestibilidade verdadeira relativa (DVR), dividindo-se o valor individual de digestibilidade de cada animal pelo valor médio de digestibilidade verdadeira do grupo com a dieta de caseína-padrão.

2.4. Coeficiente de eficiência protéica (*Protein Efficiency Ratio* – PER) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA)

O PER foi determinado no 14^o dia, tomando-se o ganho de peso do grupo-teste em relação ao consumo de proteína do grupo-teste (OSBORNE e MENDEL, 1919). Para isto, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$PER = \frac{GP}{PC}$$

em que

GP = ganho de peso do grupo-teste (g); e

PC = Proteína consumida pelo grupo-teste (g).

Calculou-se o PER relativo (RPER), dividindo-se o valor individual de PER de cada animal pelo valor médio de PER do grupo com a dieta de caseína-padrão.

O CEA também foi determinado no 14^o dia do experimento e foi calculado pela seguinte fórmula:

$$CEA = \frac{GP}{CA}$$

em que

CA = consumo alimentar do grupo-teste (g).

2.5. Razão protéica líquida (*Net Protein Ratio* – NPR)

O NPR foi determinado no 14^o dia do experimento, tomando-se o ganho de peso do grupo-teste mais a perda de peso do grupo de dieta aprotéica, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste, segundo Bender e Doell (1957). Para isto, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$NPR = \frac{GP + PP}{PC}$$

em que

PP = perda de peso do grupo aprotéico (g).

Calculou-se o NPR relativo (RNPR), dividindo-se o valor individual de NPR de cada animal pelo valor médio de NPR do grupo com a dieta de caseína-padrão.

2.6. Escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS)

A determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) foi realizada nos IPS, segundo o método proposto por Henley e Kuster (1994). Para o cálculo do PDCAAS, procedeu-se da seguinte forma:

- Determinou-se o teor de nitrogênio das amostras de IPS.
- Calculou-se o conteúdo protéico (N x 6,25).

- Determinou-se o perfil de aminoácidos (dados fornecidos pelo fabricante).

- Determinou-se o escore químico (EQ) de aminoácidos, que foi calculado pela relação entre cada um dos aminoácidos indispensáveis dos IPS com os aminoácidos do padrão de referência da FAO/WHO (1985) para crianças de 2 a 5 anos, de acordo com HENLEY e KUSTER (1994):

$$EQ = \frac{\text{mg do aminoácido indispensável por g da proteína - teste}}{\text{mg do aminoácido indispensável de referência por g da proteína de referência}}$$

- Determinou-se a digestibilidade por ensaio biológico, conforme descrito anteriormente.

- Calculou-se o PDCAAS, multiplicando-se o escore mais baixo de aminoácido indispensável pela digestibilidade da proteína.

2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos, a partir do experimento no delineamento em blocos casualizados (DBC), foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de erro de 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary NC) versão 8.2.

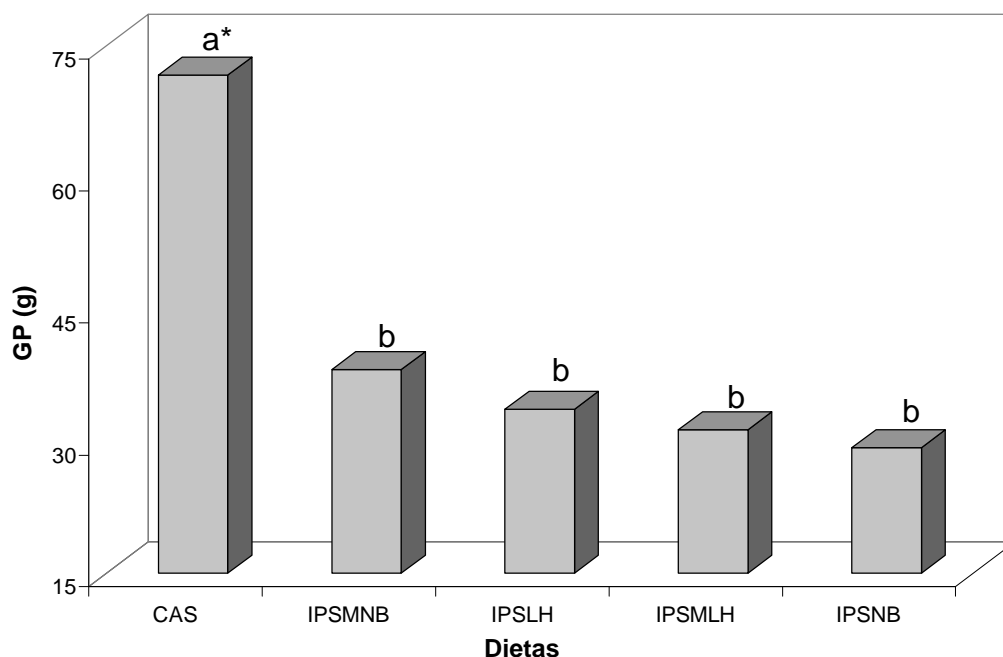
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ganho de peso (GP), coeficiente de eficiência alimentar (CEA), PER e NPR

As Figuras 3 e 4 apresentam os valores médios para GP e CEA, respectivamente.

Nas Figuras 3 e 4, observa-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a dieta-padrão (caseína), em relação às dietas dos isolados protéicos de soja, pelo teste de Tukey. Entretanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico. Os valores médios de GP e CEA variaram de 29,33 a 38,17 g e de 22,05 a 24,71 g/100 g, respectivamente, para os animais alimentados com os isolados protéicos de soja, demonstrando que as proteínas de origem vegetal são menos eficientes na promoção do crescimento dos animais que as proteínas de origem animal. Este resultado pode ser explicado, uma vez que a caseína animal não possui fibras em sua composição, fazendo com que a velocidade do trânsito intestinal seja mais lenta, permitindo maior absorção dos nutrientes.

Sarwar (1997) encontrou valores semelhantes de GP para um isolado protéico de soja comercial (39 g), quando comparado com o IPSMNB, diferindo das demais dietas experimentais. Com relação ao CEA, o autor encontrou valores semelhantes (24,07 g/100 g) aos dos tratamentos realizados



* As colunas do histograma, seguidas pelas mesmas letras, não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

CAS = caseína-padrão.

IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

IPLSH = isolado protéico de soja LH.

IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

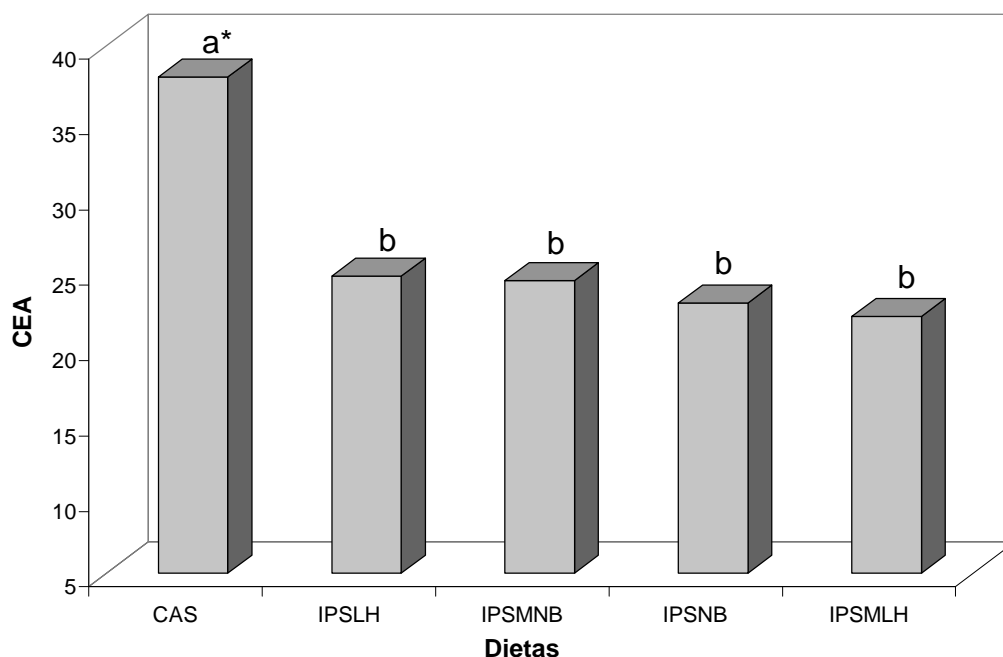
IPSNB = isolado protéico de soja NB.

Figura 3 – Ganho de peso médio por grupo de animais após os 14 dias de experimento.

neste trabalho. Entretanto, Sarwar (1997) modificou o isolado protéico de soja, fazendo um tratamento alcalino e térmico, e encontrou valores iguais a zero para GP e CEA.

Rohn *et al.* (2006) modificaram um isolado protéico de soja comercial, adicionando compostos fenólicos, com o objetivo de verificar os efeitos de interação entre esses compostos e as proteínas dos alimentos. Eles encontraram valores inferiores de GP e CEA, respectivamente, tanto para IPS comercial (11,7 g e 15,6 g/100 g) quanto para IPS modificado (6,7 g e 10,1 g/100 g). Os resultados encontrados por esses autores confirmam que compostos como fenóis, ácido fítico ou fibras podem prejudicar a proteólise de proteínas, constituindo um fator antinutricional.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos de PER, RPER, NPR, RNPR. Nessa tabela, observa-se que a caseína apresentou valores significativamente



As colunas do histograma, seguidas pelas mesmas letras, não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

CAS = caseína-padrão.

IPSLH = isolado protéico de soja LH.

IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

IPSNB = isolado protéico de soja NB.

IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

Figura 4 – Coeficiente de eficiência alimentar médio por grupo de animais após os 14 dias de experimento.

Tabela 2 – Valores médios de PER, RPER, NPR E RNPR das dietas à base de IPS e caseína determinados em experimentos com ratos

| Dieta | PER* | RPER* ^{1/} | NPR* | RNPR* ^{2/} |
|----------------------|--------|---------------------|--------|---------------------|
| Caseína | 3,77 a | 100,00 a | 4,55 a | 100,00 a |
| IPSMNB ^{3/} | 2,63 b | 69,94 b | 3,64 b | 80,31 b |
| IPSLH ^{4/} | 2,48 b | 65,97 b | 3,54 b | 78,08 b |
| IPSNB ^{5/} | 2,36 b | 62,67 b | 3,51 b | 77,43 b |
| IPSMLH ^{6/} | 2,19 b | 58,22 b | 3,21 b | 70,61 b |

* As médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

^{1/} RPER = PER relativo.

^{2/} RNPR = NPR relativo.

^{3/} IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

^{4/} IPSLH = isolado protéico de soja LH.

^{5/} IPSNB = isolado protéico de soja NB.

^{6/} IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

superiores ($p < 0,05$) em relação ao IPS para PER, RPER, NPR, RNPR. Contudo, verifica-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as dietas experimentais de IPS. Além disso, os valores de RNPR foram superiores aos de RPER para todos os IPS, o que indica que esta proteína é mais eficiente em promover a manutenção dos pesos dos ratos do que para promover o seu crescimento.

Friedman (1996) considerou que, geralmente, fontes de proteína com PER menor que 1,5 são consideradas de qualidade baixa ou pobre, entre 1,5 e 2,0 de qualidade intermediária e acima de 2,0 de boa ou alta qualidade. Portanto, de acordo com os resultados apresentados neste trabalho, pode-se considerar que as fontes protéicas dos IPS são de boa qualidade.

Os valores de PER e RPER variaram de 2,19 a 2,63 e de 58,22 a 69,94%, respectivamente, enquanto o de NPR e RNPR variaram de 3,21 a 3,64 e de 70,61 a 80,31%, para as dietas que continham como fonte protéica os IPS. Sarwar (1997) encontrou valores semelhantes para PER (2,69) e NPR (3,66) para um IPS comercial, porém o IPS modificado com tratamento alcalino apresentou resultados iguais a zero. Portanto, de acordo com os resultados encontrados neste trabalho pode-se dizer que a metodologia empregada na modificação dos IPS não afetou esses índices, já que não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Murad (1993) elaborou um IPS modificado com perfil de solubilidade aproximado ao da caseína bovina e encontrou valores de NPR e RNPR (3,17 e 72%, respectivamente) dentro da faixa de valores listada na Tabela 2.

Emmert e Baker (1995) compararam o efeito da suplementação de um IPS comercial com metionina e metionina + cisteína, e observaram que ambas proporcionaram aumento significativo de PER, de 2,99 (IPS comercial) para 4,14 e 4,51 (IPS suplementado com metionina e metionina + treonina, respectivamente).

Castro *et al.* (2000) compararam a qualidade nutricional de misturas protéicas de três fontes obtidas comercialmente com cada uma analisada individualmente (IPS, gelatina hidrolisada e trigo). Eles encontraram valores de NPR e RNPR, respectivamente, para a combinação IPS + trigo (2,9 e 72,5%) estatisticamente superiores quando comparado somente com o IPS

(2,3 e 57,5%), tendo estes últimos apresentado valores menores que a faixa analisada neste estudo (Tabela 2).

Friedman e Brandon (2001) reportaram que o baixo teor de metionina nas proteínas de soja limita o seu valor nutritivo, visto que este aminoácido essencial atua como intermediário na biossíntese de cisteína e cistina, o que o torna ainda mais limitante. Além disso, segundo Friedman (1996), o tratamento alcalino (pH > 9,0) e, ou, tratamento térmico podem reduzir a quantidade de aminoácidos essenciais, como metionina, lisina e triptofano.

3.2. Digestibilidade

A Tabela 3 apresenta os valores médios de digestibilidade verdadeira (DV) e digestibilidade verdadeira relativa (DVR) à caseína.

Tabela 3 – Valores médios de DV e DVR das dietas à base de IPS e caseína, determinados em experimentos com ratos

| Dieta | DV* | DVR* |
|----------------------|----------|----------|
| Caseína | 95,52 a | 100,00 a |
| IPSNB ^{1/} | 94,16 a | 98,59 a |
| IPSMNB ^{2/} | 93,52 a | 97,92 a |
| IPSMLH ^{3/} | 93,01 ab | 97,39 ab |
| IPSLH ^{4/} | 89,44 b | 93,65 b |

* As médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

^{1/} IPSNB = isolado protéico de soja NB.

^{2/} IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

^{3/} IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

^{4/} IPSLH = isolado protéico de soja LH.

Constata-se na Tabela 3 que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a caseína bovina e as dietas experimentais de IPSNB, IPSMNB e IPSMLH. Entretanto, a caseína bovina foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao IPSLH. Comparando as dietas experimentais dos IPS, verifica-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre IPSNB, IPSMNB e IPSMLH e entre IPSMLH e IPSLH. Os IPSNB e IPSMNB foram significativamente superiores ($p < 0,05$) ao IPSLH. Portanto, pode-se

concluir que a modificação não melhorou a capacidade de digestão para o IPS comercial NB, visto que este já apresentava digestibilidade equivalente à da caseína humana. Já em relação ao IPS comercial LH, a modificação proporcionou melhoria da digestibilidade, equiparando-a àquela observada para a caseína.

Os valores de DV e DVR variaram entre 89,44 e 94,16% e 93,65 e 98,59%, respectivamente, para as dietas experimentais utilizadas com ratos. Castro *et al.* (2000) e Gilani e Sepehr (2003) encontraram valores de DV de 94,8 e 95%, respectivamente, para um IPS comercial, ou seja, semelhantes ao deste estudo.

Sarwar (1997) modificou um IPS por tratamento alcalino e verificou efeito negativo sobre a digestibilidade, encontrando valores de 96% para o IPS comercial e 68% para o modificado. Ele atribuiu essa redução à formação de fatores antinutricionais durante o tratamento efetuado, principalmente lisinoalanina. Friedman e Brandon (2001) relataram que a exposição de proteínas a pH excessivamente alcalino e à alta temperatura pode promover a destruição total de aminoácidos como a cistina, ou parcial como a lisina, arginina, serina e treonina. Essas perdas foram acompanhadas pela formação de lisinoalanina.

SCHAAF SMA (2005) reportou que a anatomia do trato gastrointestinal e a fisiologia de crescimento de leitões se assemelham às dos humanos. O leite de porca consiste de soroproteínas e favorece a formação de um coágulo macio e fragmentado, semelhante ao do leite humano. A função de coágulos não é bem conhecida na fisiologia digestiva de leitões. Parece que o coágulo teria uma função de armazenamento, em que a proteína e a gordura seriam lentamente digeridas no intestino delgado. Além disso, existem indicações de que a presença de coágulo no estômago estimularia a atividade das enzimas proteolíticas, gástricas e pancreáticas (FERREIRA *et al.*, 1988).

Em virtude de os leitões recém-nascidos apresentarem menor desempenho quando alimentados com fontes protéicas de origem vegetal, em comparação àqueles que se alimentavam com proteína de leite, Murad (1993) desenvolveu um IPS modificado, que apresentava um perfil de solubilidade semelhante ao da caseína bovina, e observou a formação de

coágulos no estômago e intestino desses animais. A autora verificou que o produto desenvolvido aumentou o tempo de passagem no estômago, permitindo que a proteína fosse lentamente digerida no intestino delgado, o que previne a sobrecarga intestinal e o crescimento microbiano excessivo. Além disso, os coágulos formados eram macios e compactos, semelhantes aos dos leites de porca (controle) e de vaca.

No capítulo anterior, verificou-se que o perfil de solubilidade da caseína humana é semelhante ao da caseína bovina e do IPS modificado desenvolvido por Murad (1993). Os IPS modificados tiveram perfil de solubilidade semelhante na faixa de pH de 2,0 a 5,0. Sendo assim, sugere-se que a modificação do IPS possa melhorar a digestão de proteínas no trato gastrointestinal de pessoas com problemas de digestão de proteínas à base de soja e leite de vaca, especialmente crianças e idosos.

Entretanto, mais estudos devem ser realizados para comprovar esses resultados. Apesar de a modificação do IPSLH ter proporcionado melhora na digestibilidade em relação ao IPSLH comercial, isso não significa necessariamente aumento da qualidade protéica, visto que os aminoácidos podem estar sendo absorvidos e não estar participando da síntese protéica, em razão de um possível aumento da deficiência de aminoácidos essenciais, provocado pelo tratamento realizado. De fato, o IPSMLH apresentou estatisticamente menor NPR em relação à caseína (70,61%) (Tabela 2).

3.3. Escore químico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS)

Os valores encontrados para a composição aminoacídica e para o escore químico (EQ) de aminoácidos dos IPS podem ser observados na Tabela 4. Vale ressaltar que os dados foram fornecidos pelo fabricante (BUNGE Alimentos, Brasil), para o IPSNB e o IPSLH. Além disso, foi considerado o mesmo teor de aminoácidos para o IPSMNB e o IPSMLH.

De acordo com a Tabela 4, pode-se verificar que os IPS apresentaram deficiência no aminoácido indispensável triptofano. Estes resultados estão de acordo com Castro *et al.* (2000), que também utilizaram um isolado protéico de soja (SAMPROSOY 90 NB, ou seja, IPSNB) da mesma marca do fabricante.

Tabela 4 – Composição em aminoácidos (mg/g proteína) e escore químico (EQ) dos IPS

| Aminoácidos | IPSNB ^{1/} | IPSLH ^{2/} | IPSMNB ^{3/} | IPSMNH ^{4/} | Padrão FAO ^{5/} |
|-------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| Indispensáveis | | | | | |
| Fenilalanina + tirosina | 95 | 95 | 95 | 95 | 63 |
| Histidina | 27 | 27 | 27 | 27 | 19 |
| Isoleucina | 43 | 43 | 43 | 43 | 28 |
| Leucina | 78 | 78 | 78 | 78 | 66 |
| Lisina | 65 | 65 | 65 | 65 | 58 |
| Metionina + cistina | 28 | 28 | 28 | 28 | 25 |
| Treonina | 36 | 36 | 36 | 36 | 34 |
| Triptofano | 10 | 10 | 10 | 10 | 11 |
| Valina | 45 | 45 | 45 | 45 | 35 |
| Dispensáveis | | | | | |
| Alanina | 42 | 42 | 42 | 42 | |
| Arginina | 80 | 80 | 80 | 80 | |
| Ácido aspártico | 121 | 121 | 121 | 121 | |
| Ácido glutâmico | 204 | 204 | 204 | 204 | |
| Glicina | 42 | 42 | 42 | 42 | |
| Prolina | 53 | 53 | 53 | 53 | |
| Serina | 57 | 57 | 57 | 57 | |
| Escore químico (EQ) | 0,91 | 0,91 | 0,91 | 0,91 | |
| Aminoácido limitante | Triptofano | Triptofano | Triptofano | Triptofano | |

^{1/} IPSNB = isolado protéico de soja NB.

^{2/} IPSLH = isolado protéico de soja LH.

^{3/} IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

^{4/} IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

^{5/} Padrão de referência protéica FAO/WHO/UNU (1985) (necessidade de aminoácidos indispensáveis para crianças de 2 a 5 anos de idade).

Os resultados do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) para os IPS encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de PDCAAS dos IPS

| Dieta | DV | EQ | PDCAAS |
|----------------------|--------|------|--------|
| IPSNB ^{1/} | 0,9416 | 0,91 | 0,86 |
| IPSMNB ^{2/} | 0,9352 | 0,91 | 0,85 |
| IPSMNH ^{3/} | 0,9301 | 0,91 | 0,85 |
| IPSLH ^{4/} | 0,8944 | 0,91 | 0,81 |

^{1/} IPSNB = isolado protéico de soja NB.

^{2/} IPSMNB = isolado protéico de soja modificado NB.

^{3/} IPSMLH = isolado protéico de soja modificado LH.

^{4/} IPSLH = isolado protéico de soja LH.

Os valores de PDCAAS variaram de 0,81 (81%) a 0,86 (86%) para os IPS. Porém, nenhum dos IPS teve um PDCAAS igual ou superior a 1,0

(100%), que foi convencionado para considerar uma proteína como de boa qualidade (HENLEY e KUSTER, 1994). Castro *et al.* (2000) encontraram um PDCAAS de 80% para um IPS do mesmo fabricante utilizado neste estudo (SAMPROSOY 90 NB – IPSNB).

Sarwar (1997) modificou um IPS por tratamento alcalino e observou que o PDCCAS foi de 100 para 49%, evidenciando que a destruição de alguns aminoácidos (cistina, lisina e treonina) afetou negativamente a qualidade protéica.

Rohn *et al.* (2006) verificaram a influência de compostos fenólicos adicionados a um IPS comercial e observaram que a modificação propiciou redução no valor do PDCAAS. Os autores atribuíram esses resultados ao fato de ter ocorrido interação desses compostos com o nitrogênio dos aminoácidos indispensáveis.

Vale ressaltar que os valores de PDCAAS para os IPS modificados podem estar superestimados, em virtude de ter considerado o mesmo teor de aminoácidos dos IPS comerciais. Pode ter acontecido que, durante a modificação dos IPS, o tratamento ácido/alcalino e a secagem possam ter reduzido a quantidade de alguns aminoácidos indispensáveis, como a metionina, a lisina e o triptofano.

4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os valores médios de PER, PER relativo, NPR e NPR relativo dos IPS foram significativamente ($p < 0,05$) inferiores aos da dieta-padrão de caseína. Já entre as dietas experimentais, não houve diferença ($p > 0,05$) significativa, o que indica que a modificação dos IPS não influenciou a utilização das dietas pelos animais, para manutenção e crescimento.

A digestibilidade verdadeira (DV) dos IPSNB, IPSMNB e IPSMLH não diferiu ($p > 0,05$) significativamente da dieta-padrão de caseína e entre eles. Contudo, a caseína bovina foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao IPSLH. Comparando as dietas dos IPS, observou-se que os IPSNB e IPSMNB foram significativamente ($p < 0,05$) superiores ao IPSLH. Já entre o IPSLH comercial e o seu modificado, verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$). A modificação do IPSNB não proporcionou melhoria da digestibilidade, em virtude de ter apresentado valores iguais ao da dieta-padrão de caseína. Entretanto, a modificação do IPSLH proporcionou melhoria da digestibilidade, que apresentou valores iguais ao da caseína.

Os resultados indicam que a modificação do isolado protéico de soja pode propiciar melhora na digestão e absorção dessa proteína. Porém, esse fato provavelmente deve depender da porcentagem de solubilidade na faixa de pH de 2,0 a 5,0 e também de uma possível desnaturação das proteínas durante o tratamento ácido moderado. Embora os IPSNB e IPSMNB tenham apresentado um perfil de solubilidade diferente, a porcentagem de

solubilidade do isolado comercial foi bem baixa na faixa do pH citado, o que pode explicar porque não houve diferença estatística entre eles. Também entre o IPSLH e o IPSMLH, a diferença de porcentagem de solubilidade entre a caseína humana e o IPSMLH acarretou o mesmo resultado observado no isolado comercial.

Os valores de PDCAAS estiveram na faixa de 81 a 86%. Além disso, supõe-se que os PDCAAS dos isolados modificados possam estar superestimados, em razão de se ter considerado o mesmo teor de aminoácidos dos IPS comerciais.

Sendo assim, são sugeridos mais estudos para constatação dos resultados encontrados. Em trabalhos futuros, seria interessante a comprovação de uma relação entre solubilidade e digestibilidade. Um outro estudo interessante seria a combinação com uma fonte animal, como o soro de queijo, que também é muito utilizado como ingrediente alternativo na indústria alimentícia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, M. F. **Caracterização funcional de isolados e de um concentrado protéico de soja produzidos no Brasil**. 1984. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14. ed. Washington, DC, 1984. 1.141 p.

BENDER, A. E.; DOELL, B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **Brit. J. Nutr.**, v. 11, p.138-43, 1957.

BERNARD, H.; NEGRONI, L.; CHATEL, J. M.; CLEMENT, G.; ADEL-PATIENT; K.; PELTRE, G.; CREMINON, C.; WAL, J. M. Molecular basis of IgE cross-reactivity between human β -casein and bovine β -casein, a major allergen of milk. **Molecular Immunology**, v. 37, p. 161-167, 2000.

BETSCHART, A. A.; FONG, R. Y.; HANAMOTO, M. M. Safflower protein isolates: functional properties in simple systems and bread. **Journal of food Science**, v. 44, n. 4, p. 1022-1026, 1979.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1.

BROUNS, F. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector. **Food Research International**, v. 35, p. 187-193, 2002.

CARBONARE, S. B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Composição do leite humano – aspectos imunológicos. In: REGO, J. D. **Aleitamento materno**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 83-97.

CARRATÙ, B.; BONIGLIA, C.; SCALISE, F.; AMBRUZZI, A. M.; SANZINI, E. Nitrogenous components of human milk: non-protein nitrogen, true protein and free amino acids. **Food Chemistry**, v. 81, p. 357-362, 2003.

CASTRO, I. A.; TIRAPEGUI, J.; SILVA, R. S. S. F. Protein mixtures and their nutritional properties optimized by response surface methodology. **Nut. Res.**, v. 20, n. 9, p. 1341-1353, 2000.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1989. 346 p.

CHEN, W. S.; SOUCIE, W. G. The ionic modification of the surface charge and isoelectric point of soy protein. **JAOCs**, v. 63, n. 19, p. 1346-1350, 1986.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 15 jan. 2007.

DAMODARAN, S. Functional properties. In: NAKAI, S., MODLER, H.W (Ed). **Food proteins: properties and characterization**. New York: VCH Publishers, Inc., 1996. p. 167-234.

DARRAGH, A. J.; HODGKINSON, S. M. Quantifying the digestibility of dietary protein. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1850S-1856S, 2000.

DE LA BARCA, A. M. C.; MEDRANO, A. W.; MARINI, M. J.; CORDOVA, F. G.; SALAZAR, A. R. Modificación enzimática de las propiedades funcionales, nutricias y sensoriales de la soya para alimentación especial. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50, n. 1, p. 17, 2000.

DHINGRA, S.; JOOD, S. Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. **Food Chemistry**, v. 77, p. 479-488, 2001.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 1-15, 1999.

DUARTE, A. J.; CARREIRA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; COELHO, J. V.; SILVESTRE, M. P. C. Propriedades emulsificantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados trípticos: efeito do pH e do tempo de hidrólise. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 1-16, 1998a.

DUARTE, A. J.; CARREIRA, R. L.; JUNQUEIRA, R.G.; COELHO, J. V.; SILVESTRE, M. P. C. Propriedades emulsificantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados trípticos: efeito da adição de NaCl. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 1-12, 1998b.

DUARTE, M. S. L. **Digestibilidade *in vivo* e *in vitro* de proteínas de feijão preto**. 1999. 63 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

ELIZALDE, B. E.; BARTHOLOMAI, G. B.; PILOSOFF, A. M. R. The effect of pH on the relationship between hydrophilic/lipophilic characteristics and emulsification properties of soy proteins. **Lebensm.-Wiss.u.-Tchenol.**, v. 29, p. 334-339, 1996.

ELWING, S. **Características físico-químicas e imunológicas de leite e estudos que visam a sua preservação em bancos de leite**. 1988. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

EMMERT, J. L.; BAKER, D. H. Protein quality assessment of soy products. **Nut. Res.**, v. 15, n. 11, p. 1647-1656, 1995.

ENDRES, J. G. **Soy proteins products**: characteristics, nutritional aspects, and utilization. Champaign: AOCS Press, 2001. 61 p.

EUCLYDES, M. P. **Nutrição do lactente**: base científica para uma alimentação adequada. 3. ed. Viçosa-MG: Suprema Gráfica e Editora, 2005, 551 p.

ESTEBAN, M. M.; ARA, M. C. G.; MARCOS, C. P. Alergia imediata a alimentos em el niño: aspectos etiológicos, patogénicos y diagnósticos. **Bol. Pediatr.**, v. 39, p. 140-147, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION/ UNITED NATIONS UNIVERSITY - FAO/WHO/UNU. **Energy and protein requirements**. Report of the joint FAO/WHO/UNU. Expert Consultation Technical Report Series nº 724, FAO/WHO and the United Nations University, Geneva, 1985.

FAO/WHO. **Protein quality evaluation**. Rome: 1991. 66 p. (FAO Food and Nutrition Paper, 51).

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. 1.069 p.

FERREIRA, A. S.; COSTA, P. M. A.; GOMES, J. C.; NEVES, M. T. D. Desaparecimento de ingesta, pH estomacal e duodenal e formação de coágulos de leites de porca e de vaca e de extrato de soja no estômago e intestino delgado de leitões. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v. 17, n. 3, p. 308-316, 1988.

FRIEDECK, K. G. **Soy protein fortification of a low fat dairy-based ice cream**. Raleigh: Faculty of North Carolina State University, 2003. 123 p. (Tese de Mestrado).

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 6-29, 1996.

FURTADO, M. A. M. **Caracterização de hidrolisados de proteína Láctea co-precipitada**. 1999. 129 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

GILANI, G. S.; SEPEHR, E. Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats. **J. Nutr.**, v. 133, p. 220-225, 2003.

GOMES, J. C.; MURAD, A. L.; COELHO, D. T.; COSTA, P. M. A.; FERREIRA, A. S. **Processo de obtenção de um isolado protéico de soja modificado**. Belo Horizonte, 1992. 11 p. (Registrado e protocolado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial, sob o nº 003962 em dia 12.8.1992).

GOMES, A. G. Sistema agroindustrial da soja: em busca da competitividade perdida. **Agrianual**, p. 26-28, 2001.

HALL, G. M. **Methods of testing protein functionality**. 1. ed. London: Chapman e Hall, 1996. p. 1-10.

HEINE, R. G.; ELSAYED, S.; HOSKING, C. S.; HILL, D. J. Cow's milk in infancy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 2, p. 217-225, 2002.

HENLEY, E. C.; KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring. **Food Technology**, v. 4, p. 74-77, 1994.

HERNANDEZ, M.; LAVEJA, A.; SOTLO, A. Determinación de la digestibilidad proteínica in vitro e in vivo en cereales y leguminosas crudos y cocidos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 34, n. 3, p. 514-522, 1984.

HERNÁNDEZ, T.; HERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ, C. Calidad de proteínas. Conceptos y evaluación. **Alimentaria**, n. 274, p. 27-37, 1996.

HIEMORI, M.; KIMOTO, M.; KOBATAKE, R.; YAMASHITA, H.; BANDO, N.; KOICHI, S.; OKITA, M.; TSUJI, H. Allergenicity of soybean allergen, Gly m Bd 28K. **Annals of Nutrition & Metabolism: 17th Internacional Congreso Of Nutrition**, Austria, S.Karger AG, P.307, v.45 (Suppl. 1), 2001. 636 p.

HILL, S. E. Emulsions. In: HALL, G.M. **Methods of testing protein functionality**. 1. ed. London: Chapman e Hall, 1996. p. 153-185.

IKEDA, K.; MATSUDA, Y.; KATSUMARU, A.; TERANISHI, M.; YAMANOTO, T.; KISHIDA, M. Factors affecting protein digestibility in soybean foods. **Cereal Chem.**, v. 72, n. 4, p. 401, 1995.

JACOBUCCI, H. B.; SGARBIERI, V. C.; DIAS, N. F. G. P.; BORGES, P.; TANIKAWA, C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and liver cholesterol. **Nutrition Research**, v. 21, p. 905-915, 2001.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 56, n. 3, p. 242-258, 1979.

KLEINE-TEBBE, J.; WANGORSCH, A.; VOGEL, L.; CROWELL, D. N.; HAUSTEIN, U-F.; VIETHS, S. Severe oral allergy and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 110, p. 797-804, 2002.

KLEMOLA, T.; VANTO, T.; JUNTUNEN-BACKMAN, K.; KALIMO, K.; KORPELA, R.; VARJONEN, E. Allergy to soy formula and to extensively hydrolysed whey formula in infants with cow's milk allergy: A prospective, randomized study with a follow-up to the age of 2 years. **J. Pediatr.**, v. 40, p. 219-224, 2002.

KROENING, T. A.; MUKERJI, P.; HARDS, R. G. Analysis of beta-casein and its phosphoforms in human milk. **Nutr. Res.**, v. 18, n. 7, p. 1175-1186, 1998.

KUNZ, C.; LÖNNERDAL, B. Human milk proteins: separation of whey proteins and their analysis by polyacrylamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration, and anion-exchange chromatography. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 49, n. 3, p. 464-470, 1989.

KUNZ, C.; LÖNNERDAL, B. Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 51, n. 1, p. 37-46, 1990.

LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 6592-6598, 2002.

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

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 77 (Suppl.), p. 1537S-1543S, 2003.

LOZANO DE LA TORRE, M. J.; TOLEDANO, F. L. Mesa Redonda: alergia e intolerancia alimentaria. Aspectos terapéuticos. **Bol. Pediatr.**, v. 39, p. 172-180, 1999.

MACHIDA, H. M.; SMITH, A. G. C.; GALL, D. G.; TREVENEN, C.; SCOTT, R. B. Allergic colitis in infancy: Clinical and pathologic aspects. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 19, n. 1, p. 22-26, 1994.

MARTINS, M. T. S. Caracterização química e nutricional de plasteína produzida a partir de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 4, p. 683-690, 2005.

MATSUMURA, Y.; MORI, T. Gelation. In: HALL, G.M. **Methods of testing protein functionality**. 1. ed. London: Chapman e Hall, 1996. p. 76-109.

MCKLEM, L. K. **Investigation of molecular forces involved in gelation of commercially prepared soy protein isolates**. Raleigh: Faculty of North Carolina State University, 2002. 72 p. (Tese de Mestrado).

MENSA-WILMOT, Y.; PHILLIPS, R. D.; HARGROVE, J. L. Protein quality evaluation of cowpea-based extrusion cooked cereal/legume weaning mixtures. **Nutr. Res.**, v. 21, p. 849-857, 2001.

MITIDIERI, F. E.; WAGNER, J. R. Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. **Food Research International**, v. 35, p. 547-557, 2002.

MONTEIRO, M. R. P. **Avaliação da digestibilidade e da qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina *kunitz* e das isoenzimas lipoxigenases**. 2000. 79 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

MONTEIRO, M. R. P.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; MOREIRA, M. A. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina *kunitz* e das isoenzimas lipoxigenases. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 195-205, 2004.

MORO, G. E.; WARM, A.; ARSLANOGLU, S.; MINIELLO, V. Management of bovine allergy: new perspectives and nutritional aspects. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v. 89 (Suppl. 1), p. 91-96, 2002.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1715-1718, 1985.

MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Functionality of oilseed protein products: a review. **Food Research International**, v. 39, p. 945-963, 2006.

MURAD, A. L. **Desenvolvimento e caracterização química, funcional e biológica de um isolado protéico de soja modificado**. 1993. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

MURARO, M. A.; GIAMPIETRO, P. G.; GALLI, E. Soy formulas and nonbovine milk. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v. 89, p. 97-101, 2002.

MURKIES, A. Phytoestrogens – what is the current knowledge? **Aus. Fam. Physician**, v. 27, p. 47S -51S, 1998.

NACZK, M.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. α -galactosides of sucrose in foods: composition, flatulence-causing effects, and removal. In: SHAHIDI, F. **Antinutrients and phytochemicals in food**. Washington-DC: American Chemical Society, 1997. p. 127-151.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Evaluation of protein quality**. Washington-DC. 1963. 74 p.

OGAWA, T.; SAMOTO, M.; TAKAHASHI, K. Development of hypoallergenic soybean products. **Annals of Nutrition & Metabolism: 17th International Congreso of Nutrition**. Austria, S. Karger AG, p. 307, v. 45 (Suppl. 1), 2001. 636 p.

OKEZIE, B. O.; BELLO, A. B. Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 2, p. 450-454, 1988.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. S. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MIGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Tradução de Fátima Murad, v.1. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 294 p.

ORTHOEFER, F.; LIU, K. S. Soybeans for food uses. **Int'l Food Marketing & Technol.**, v. 9, n. 4, p. 4-8, 1995.

OSBORNE, T. B.; MENDEL, L. B. The use of soybean as food. **J. Biol. Chem.**, v. 32, p. 369-387, 1917.

PEARSON, A. M. Soy proteins. In: HUDSON, B. J. F. **Developments in food proteins – 2**. v. 1. London: Applied Science Publishers LTD, 1983. p. 67-108.

PEREIRA, C. A. S.; OLIVEIRA, F. B. **Soja, alimento e saúde: valor nutricional e preparo**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2004. 102 p.

PERKINS, E. G. Composition of soybeans and soy products. In: ERICKSON, D. R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Champaign: AOCS Press, 1995. p. 9-28.

POYSA, V.; WOODROW, L.; YU, K. Effect of soy protein composition on tofu quality. **Food Research International**, v. 39, p. 309-317, 2006.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N. P. **Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz**. São Paulo: Instituto Adolf Lutz, 1985. 533 p.

RADOVIC, R. S.; MAKSIMOVIC, R. V.; VARKONJI-GASIC, I. E.; SAVIC, P. A. 2S Albumin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemical**, v. 47, p. 1467-1470, 1999.

RAGAB, D. M.; BABIKER, E. E.; ELTINAY, A. H. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. **Food Chemistry**, v. 84, p. 207-212, 2004.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J. Nutr.**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RITTER, M. A.; MORR, C. V.; THOMAS, R. L. In vitro digestibility of phytase-reduced and phenolics-reduced soy protein. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 2, p. 325-341, 1987.

RODRIGUES, R. S.; GOZZO, A. M.; MORETTI, R. H. Comportamento reológico de extratos de grãos, farinha integral e isolado protéico de soja. **Boletim Ceppa**, v. 21, n. 2, p. 367-378, 2003.

ROHN, S.; PETZKE, K. J.; RAWEL, H. M.; KROLL, J. Reactions of chlorogenic acid and quercetin with a soy protein isolate – influence on the in vivo food protein quality in rats. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, p. 696-704, 2006.

ROZAN, P.; LAMGHARI, R.; LINDER, M.; VILLAUME, C.; FANNI, J.; PARMENTIER, M.; MÉJEAN, L. *In vivo* and *in vitro* digestibility of soybeans, lupine, and rapeseed meal proteins after various technological processes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 1762-1769, 1997.

ROZENFELD, P.; DOCENA, G. H.; AÑÓN, M. C.; FOSSATI, C. A. Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 130, p. 49-58, 2002.

RUDLOFF, S.; KUNZ, C. Protein and nonprotein nitrogen components in human milk, bovine milk, and infant formula: quantitative and qualitative aspects in infant nutrition. **Journal of Pediatr. Gastroenterol. and Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 328-344, 1997.

RUSSEL, T. A. **Comparison of sensory properties of whey and soy protein concentrates and isolates**. Raleigh: Faculty of North Carolina State University, 2004. 123 p. (Tese de Mestrado).

SAIDU, J. E. P. **Development, evaluation and characterization of protein-isoflavone enriched soymilk**. Louisiana: Faculty of the Louisiana State University, 2005. 216 p. (Tese de Doutorado).

SAMPSON, H. A. Food allergy: primer on allergic and immunologic diseases. **Journal of the American Medical Association**, v. 278, n. 22, p. 1888-1894, 1997.

SAMPSON, H. A.; HO; D. J. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 100, p. 444-451, 1997.

SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **J. Nutr.**, v. 127, p. 758-764, 1997.

SCHAAFSMA, G. The protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS)-a concept for describing protein quality in foods and foods ingredients: a critical review. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 3, p. 988-994, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

SHEN, J. L. Solubility profile, intrinsic viscosity, and optical rotation studies of acid precipitated soy protein and of commercial soy isolate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, p. 784-788, 1976.

SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R. Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins. **Food Research International**, v. 35, p. 721-729, 2002.

SOUZA, G.; VALLE, J. L. E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 34, n. 2, p. 61-69, 2000.

SPRIKKELMAN, A. B.; HEYMANS, H. S. A.; VAN AALDEREN, W. M. C. Development of allergic disorders in children with cow's milk protein allergy or intolerance in infancy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 1358-1363, 2000.

TOBELMANN, D. W. **Chemical, physical and functional properties of selected milk protein co-precipitates**. Michigan: Michigan State University, 1979. 115 p. (Tese de Mestrado).

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <<http://www.usda.gov/>> Acesso em: 15 jan. 2007.

VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G.M. **Methods of testing protein functionality**. 1. ed. London: Chapman e Hall, 1996. p. 11-60.

WAGNER, J. R.; SORGENTINI, D. A.; AÑÓN, M. C. Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity, and some functional properties of acid-treated soy isolates. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 1881-1889, 1996.

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.**, v. 48, p. 3159-3165, 2000.

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effect of variety, crop Year. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1674-1674, 1994.

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 2377-2383, 1996.

WILDE, P. J.; CLARK, D. C. Foam formation and stability. In: HALL, G. M. **Methods of testing protein functionality**. 1. ed. London: Chapman e Hall, 1996. p. 110-152.

WILSON, J. Milk intolerance: lactose intolerance and cow's milk protein allergy. **Newborn and Infant Nursing Reviews**, v. 5, n. 4, p. 203-207, 2005.

WONG, P. Y. Y.; KITTS, D. D. A comparison of the buttermilk solids functional properties to nonfat dried milk, soy protein isolate, dried egg white, and egg yolk powders. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 746-754, 2003.

YIM, M-H.; LEE, J-H. Functional properties of fractionated soy protein isolates by proteases from meju. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 9, n. 4, p. 253-257, 2000.

ZARKADAS, C. G.; CAGNON, C.; GLEDDIE, S.; KHANIZADEH, S.; COBER, E. R.; GUILLEMETTE, R. J. D. Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis. **Food Research International**, v. 40, p. 129-146, 2007.

ZEIGER, R. S.; SAMPSON, H. A.; BOCK, A.; BURKS, W.; HARDEN, K.; NOONE, S.; MARTIN, D.; LEUNG, S.; WILSON, G. Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow's milk allergy. **J. Pediatrics**, v. 134, n. 5, p. 614-622, 1999.

APÊNDICE

Tabela 1A – Composição da mistura de vitaminas (AIN-93G-VX)

| Ingredientes | g/kg da mistura |
|---|------------------------|
| Ácido nicotínico | 3,000 |
| Pantotenato de cálcio | 1,600 |
| Piridoxina-HCl | 0,700 |
| Tiamina-HCl | 0,600 |
| Riboflavina | 0,600 |
| Ácido fólico | 0,200 |
| D-Biotina | 0,020 |
| Vitamina B12 (cianocobalamina: 0,1% em amnitol) | 2,500 |
| Vitamina E (all-rac-A-acetato de tocoferila: 500 UI/g) | 15,000 |
| Vitamina A (all-trans-palmitato de retinil: 500.000 UI/g) | 0,800 |
| Vitamina D (colecalfiferol: 400.000 UI/g) | 0,250 |
| Vitamina K (filoquinona) | 0,075 |
| Sacarose | 974,655 |

Fonte: Reeves *et al.* (1993).

Tabela 2A – Composição da mistura de minerais (AIN-93G-MX)

| Ingredientes | g/kg de mistura |
|---|------------------------|
| Elementos minerais essenciais | |
| Carbonato de cálcio anidro (40,04%) | 357,00000 |
| Fosfato de potássio monobásico (22,76% P; 23,73% K) | 196,00000 |
| Citrato de potássio, tri-potássio, monohidrato (36,16% K) | 70,78000 |
| Cloreto de sódio (39,34% Na, 60,66% Cl) | 74,00000 |
| Sulfato de potássio (44,87% K; 18,39% S) | 46,60000 |
| Óxido de magnésio (60,32% Mg) | 24,00000 |
| Citrato de ferro (16,5% Fe) | 6,06000 |
| Carbonato de zinco (52,14% Zn) | 1,65000 |
| Carbonato de manganês (47,79% Mn) | 0,63000 |
| Carbonato de cobre (57,47% Cu) | 0,30000 |
| Iodato de potássio (59,3% I) | 0,01000 |
| Selenato de sódio anidro (41,79% Se) | 0,01025 |
| Paramolibdato de amônio tetrahidratado (54,34% Mo) | 0,00795 |
| Elementos minerais potencialmente benéficos | |
| Meta silicato de sódio eneahidratado (9,88% Si) | 1,4500 |
| Sulfato de cromo e potássio dodecahidratado (10,42% Cr) | 0,2750 |
| Cloreto de lítio (16,38% Li) | 0,0174 |
| Ácido bórico (17,5% B) | 0,0815 |
| Fluoreto de sódio (45,24% F) | 0,0635 |
| Carbonato de níquel (45% Ni) | 0,0318 |
| Vanadato de amônio (43,55% V) | 0,0066 |
| Sacarose | 221,0260 |

Fonte: Reeves *et al.* (1993).