

MELIZA MARICELA HUAMANCAJA VILLALVA

**MODIFICAÇÃO QUÍMICA PARA OBTENÇÃO DE UM ISOLADO
PROTÉICO DE SOJA COM SOLUBILIDADE SEMELHANTE À DA
CASEINA HUMANA**

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

VIÇOSA

MINAS GERAIS-BRASIL

2008

MELIZA MARICELA HUAMANCAJA VILLALVA

**MODIFICAÇÃO QUÍMICA PARA OBTENÇÃO DE UM ISOLADO
PROTÉICO DE SOJA COM SOLUBILIDADE SEMELHANTE À DA
CASEINA HUMANA**

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

APROVADA: 27 de Novembro de 2008.

Prof^a. Neuza Maria Brunoro Costa
(Co-orientadora)

Prof. José Benício Paes Chaves
(Co-orientador)

Prof^a. Hercia Stampini Duarte Martino

Prof. Marco Túlio Coelho Silva

Prof. José Carlos Gomes
(Orientador)

A DIOS ,

A mis padres Juan y Marina a los que amo
mucho,

A k-lito y Pale mis grandes amigos,

A mis 4 chilingueras de siempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar cada passo da minha vida,

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Professor José Carlos Gomes, pelo apoio, orientação e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Neuza Maria Brunoro e ao Professor José Benício Paes Chaves, pela atenção, carinho e amizade em todos os momentos.

À Professora Hercia Stampini e ao Professor Marco Túlio Coelho, pela atenção, dedicação e participação da banca de tese.

Aos meus pais Juan e Marina, pela força e incentivo durante estes dois anos, amo muito vocês.

A meus irmãos k-lito e Pale, pela torcida e carinho de sempre, gracias!

A Camille, Fatinha, Tati, Pathy por fazer da estadia de casa o mais parecida a uma família.

A Claudia, pela amizade e ajuda incondicional, obrigada amiga!

Ana Claudia, Paula, Livia, Karol e Bruno grandes amigos, pelo carinho e pela amizade.

A meus amigos e familiares ausentes, pela torcida.

A todos que estiveram comigo nesta caminhada.

BIOGRAFIA

MELIZA MARICELA HUAMANCAJA VILLALVA, filha de Juan Arturo Huamancaja Diaz e Marina Villalva Villar, nasceu no 1º de maio de 1979, em Lima, Perú.

Em Dezembro de 2001, graduou-se em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú, submetendo-se a defesa de tese em novembro de 2002.

De Dezembro de 2002 a Fevereiro de 2007 trabalhou em Deltagen del Perú S.A. empresa privada enfocada na área de Ingredientes e Aditivos Alimentar, onde desempenhou o cargo de Representante Técnico-Comercial.

Em Março de 2007, iniciou o programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Viçosa, em nível de Mestrado, defendendo tese no dia 27 de novembro de 2008.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
 CAPITULO 1:	
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ISOLADO PROTEICO MODIFICADO DE SOJA	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Soja.....	4
2.2 Os componentes da soja.....	6
2.2.1 As proteínas da soja.....	7
2.2.1.1 Classificação de proteínas.....	7
2.2.2 Lipídios presentes na soja.....	9
2.2.3 Vitaminas.....	9
2.2.4 Minerais.....	10
2.2.5 Carboidratos e fibras	11
2.2.6 Isoflavonas.....	11
2.3 Propriedades funcionais.....	12
2.3.1 Solubilidade.....	14
2.3.2 Emulsificação.....	17
2.3.3 Formação de espuma.....	17
2.3.4 Gelificação.....	17
2.3.5 Capacidade de absorção de água.....	18
2.3.6 Capacidade de retenção de água.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Elaboração do isolado protéico de soja modificado	19
2.2. Caracterização do isolado protéico de soja modificado	20
2.2.1. Análise físico-química.....	20
2.2.1.1 Determinação de proteína.....	20
2.2.1.2 Determinação da umidade.....	20

2.2.1.3 Determinação de cinzas.....	22
2.2.1.4 Determinação de lipídios.....	22
2.2.1.5 Determinação de carboidratos.....	22
2.2.1.6 Determinação de Atividade Ureásica	22
2.2.1.7 Determinação de pH	23
2.2.2 Determinação da solubilidade protéica.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.1. Composição química do isolado protéico de soja modificado.....	24
3.2. Determinação da solubilidade protéica	26
4. CONCLUSÕES	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPITULO 2:	
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTÉICA DO ISOLADO PROTÉICO DE SOJA MODIFICADO.....	33
1.INTRODUÇÃO	34
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	34
2.1 Métodos para avaliar a qualidade protéica.....	35
2.1.1 Coeficiente de eficiência protéica (PER).....	35
2.1.2 Razão protéica líquida (NPR).....	36
2.1.3 Escore químico de aminoácido (EQ).....	36
2.1.4 Escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS)..	37
2.1.5 Digestibilidade (D).....	38
2.2 Fatores que afetam a qualidade nutricional das proteínas.....	39
2.3 Digestão e absorção em mamíferos monogástricos.....	41
2.4 Alergia alimentar.....	48
1.4.1 Alergia aos produtos de soja.....	49
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1 Animais.....	52

3.2 Preparo das dietas.....	53
3.3 Digestibilidade verdadeira.....	55
3.4 Coeficiente de eficácia protéica (PER).....	56
3.5 Coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR).....	56
3.6 Análise Estatística.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 Ganho de peso (GP) e Consumo alimentar (CA).....	57
4.2 PER, NPR e Digestibilidade	58
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

	Página
1. Composição do grão de soja e das partes de sua semente.....	6
2. Classificação das frações protéicas da soja por coeficiente de sedimentação.....	7
3. Composição dos triglicerídeos dos grão de soja.....	8
4. Composição mineral típica de produtos de soja.....	9
5. Propriedades funcionais dos produtos protéicos de soja nos alimentos.....	12
6. Composição química do isolado protéico de soja modificado (g/100g).....	23

CAPITULO II

	Página
1. Composição em aminoácidos (mg/g proteína) de produtos protéicos de soja.	35
2. Escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS) de diversas fontes protéicas.....	36
3. Composição base das dietas experimentais a utilizar no ensaio biológico (g/100 g)	51
4. Composição da mistura de vitaminas (AIN-93G-VX).....	52
5. Composição da mistura de minerais (AIN-93G-MX).....	52
6. Media de PER, RPER, NPR e RNPR e Digestibilidade verdadeira (DV) de animais mantidos com dietas baseadas em isolado protéico de soja e caseína....	56

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

	Página
1. Efeito do pH na extração da proteína de soja.....	14
2. Solubilidade de isolados protéicos comerciais.....	14
3. Perfil de solubilidade dos IPS modificados e da caseína humana.....	15
4. Curva de solubilidade das diferentes dosagens de hexametáfosfato (% m/v) em relação do sobrenadante.....	18
5. Fluxograma da produção de isolado protéico de soja modificado.....	20
6. Perfil de solubilidade da caseína bovina e isolados protéicos de soja.....	25
7. Perfil de solubilidade do isolado protéico modificado e da caseína humana...	26

CAPITULO II

	Página
1. Coágulos no estômago e no intestino delgado (i.d) de leitões com 14 dias de idade, 0, 20, 40 e 60 minutos após a ingestão de leite de porca.....	42
2. Coágulos no estômago e no intestino delgado (i.d) de leitões com 14 dias de idade, 0, 20, 40 e 60 minutos após a ingestão de leite de vaca.....	43
3. Coágulos no estômago e no intestino delgado (i.d) de leitões com 14 dias de idade, 0, 20, 40 e 60 minutos após a ingestão de substituto de leite obtido a partir de proteína isolada de soja modificada.....	44
4. Coágulos no estômago e no intestino delgado (i.d) de leitões com 14 dias de idade, 0, 20, 40 e 60 minutos após a ingestão de substituto de leite obtido a partir de proteína isolada de soja comercial.....	45
5. Esquema experimental do ensaio biológico.....	50
6. Ganho de peso dos animais consumindo dietas de caseína bovina, isolado protéico modificado (IPM), isolado protéico comercial (IPC).....	55
7. Consumo alimentar dos grupos experimentais recebendo dieta a base de caseína, isolado protéico de soja comercial (IPC) e isolado protéico de soja modificado (IPM) testadas.....	55

RESUMO

HUAMANCAJA, Meliza Maricela Villalva, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Novembro, 2008. **Modificação química para obtenção de um isolado protéico de soja com solubilidade semelhante à da caseína humana.** Orientador: José Carlos Gomes. Co-orientadores: Neuza Maria Brunoro Costa e José Benício Paes Chaves.

A soja é um produto agrícola de grande interesse mundial, graças à versatilidade de aplicação de seus produtos, propriedades nutricionais, facilidade na produção, alta produtividade e baixo custo e ainda são reconhecidas propriedades na prevenção de algumas doenças. A soja pode ser processada em ingredientes protéicos como os isolados protéicos que são amplamente usados na indústria de alimentos por apresentarem propriedades funcionais desejáveis como solubilidade, e a partir dela outras como emulsificação, capacidade de retenção de água, capacidade de gelificação. Fontes alternativas às proteínas de leite têm sido pesquisadas devido à alergia ao leite de vaca e a intolerância à lactose, os quais afetam tanto a crianças como a adultos. Fórmulas alimentícias baseadas em proteínas de soja têm sido consideradas como uma alternativa segura e eficiente para substituição de ingredientes lácteos. O presente trabalho foi desenvolvido para modificar o perfil de solubilidade do isolado protéico de soja e adequá-lo ao leite materno (caseína humana). Foi observada notável redução da solubilidade em pH inferiores a 4,5 para o isolado protéico modificado aproximando-se ao perfil de solubilidade da caseína humana. A importância da baixa solubilidade das proteínas em pH ácido se deve à formação de coágulos no estômago de alguns mamíferos. Os coágulos têm função de armazenamento de proteínas e lipídios os quais são liberados lentamente pela ação das enzimas pancreáticas. A formação imprópria do coágulo pode causar aumento descontrolado de carga bacteriana e disfunção intestinal.

A qualidade protéica foi determinada por testes biológicos. O isolado protéico modificado (IPM) apresentou valor de digestibilidade protéica, PER e NPR similares ao isolado comercial ($p > 0,05$), evidenciando que a metodologia empregada para a modificação do isolado protéico não alterou estes índices.

ABSTRACT

HUAMANCAJA, Meliza Maricela Villalva, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, November, 2008. **Chemist modification to obtain a soy protein isolate with solubility similar to that of human casein.** Adviser: José Carlos Gomes. Co-Advisers: Neuza Maria Brunoro Costa and José Benício Paes Chaves.

Soybean is an agricultural product of interest world-wide due to its versatility of application, nutritional properties, easiness in the production, high crop yield and low cost and still its recognized properties in the prevention of some diseases. Soybean can be processed in protein ingredients as protein isolate which are largely used in the food industry due to the desirable functional properties as solubility and from it others such as emulsification, water holding capacity and capacity of gelection. Alternative sources for milk proteins have been searched to overcome bovine milk allergies and lactose intolerance which is likely to reach both children and adults. Food formulations based on soybean proteins show to be safe and efficient in substitution for milk ingredients. This work was developed to modify the solubility behavior of soybean protein isolate to adequate it to the human milk pattern. It was observed a large decrease in solubility bellow pH 4.5 for the modified soybean protein isolate approaching its behavior of that of human casein. The importance of low solubility of proteins at low pH is because their coagulation step in the stomach of some mammals. Failure to form an appropriate coagulum which acts as a storage unit for proteins and lipids and are slowly liberated for pancreatic enzymes action will cause enormous bacterial growth and intestine dysfunction. The protein quality was determinate by biological assays. The modified isolate protein presented digestibility value, PER and NPR similar to commercial isolate protein ($p>0.05$), indicating that the methodology use to modified the isolate protein did not modify these properties.

CAPITULO 1

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ISOLADO PROTEICO MODIFICADO DE SOJA

1. INTRODUÇÃO

O leite materno humano é fundamental para a saúde das crianças nos seis primeiros meses de vida, por ser um alimento completo, fornecendo componentes para hidratação e fatores de desenvolvimento e proteção como anticorpos, sendo microbiologicamente seguro e perfeitamente adaptado ao metabolismo da criança. Entretanto, quando a mãe está impossibilitada de amamentar deve recorrer ao leite de outras mães, o que é trabalhoso e às vezes impossível, devido à baixa disponibilidade de leite humano. Recorre-se, assim, a substitutos, dentre eles aos derivados protéicos da soja ou produtos protéicos que mais se assemelham ao leite materno. As fórmulas infantis são em geral de custo elevado e inacessível para a maioria da população de baixa renda. Dado o elevado custo das fórmulas, o leite de vaca tornou-se uma alternativa na alimentação dos bebês em várias partes do mundo.

As proteínas do leite de vaca são capazes de produzir manifestações de hipersensibilidade em crianças de até três anos de idade. 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. Este processo pode ocorrer também no adulto, por mecanismo bastante parecido (SAMPSON, 1997).

Até mesmo o processo de digestão parece diferir quando mamíferos são alimentados com o leite materno ou de outra espécie. FERREIRA et al. (1988) observaram a formação de coágulos duros no estômago em leitões que foram alimentados com leite de vaca e comportamento diferente quando utilizado leite suíno. A alergia ao leite de vaca é uma das mais comuns em crianças, sendo muito difícil apresentar um número preciso da ocorrência, estimando-se que cerca de 0,3 a 7,5 % das crianças apresentam alergia às proteínas do leite bovino (WILSON, 2005). Segundo CORDLE (2004) as crianças que têm alergia ao leite de vaca podem também, com o tempo, desenvolver alergia à proteína de soja, uma a cada 10 crianças. No entanto, o maior problema reside no fato dos processos digestivos serem diferentes para as proteínas do leite e dos vegetais.

Diante do exposto, idealizou-se desenvolver um produto que apresentasse um perfil de solubilidade, em função do pH, similar à caseína humana, esperando assim similaridade na formação de coágulos no sistema gastrointestinal.

A demanda por proteína de origem vegetal vem aumentando nos últimos anos, devido, principalmente, aos custos mais baixos e algumas propriedades específicas de interesse funcional. A aceitação de uma proteína, como ingrediente, na indústria de alimentos, não depende apenas das suas qualidades nutricionais, também suas propriedades funcionais desempenham papel decisivo e a solubilidade é uma das principais propriedades funcionais dos ingredientes alimentícios (GOMES et al. 1987).

A soja é um produto agrícola de grande interesse mundial graças à facilidade de produção, à versatilidade da aplicação de seus produtos na alimentação humana e animal e ao seu valor econômico nos mercados nacional e internacional. O Brasil figura entre os maiores produtores de soja do mundo, sendo a leguminosa cultivada em várias regiões do país (FILHO et al. 2004).

A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido amplamente investigada pelas características nutricionais desse alimento, quer seja o elevado teor de proteína de qualidade nutricional adequada, o conteúdo significativo de minerais e fibras, ou ainda, a quantidade reduzida de gordura saturada e a ausência de colesterol (MACHADO et al. 2008).

A hipótese deste trabalho foi que poliânions, como o hexametáfosfato aplicado em pH alcalino, durante a extração do isolado protéico de soja, ligam-se fortemente à proteína por meio dos resíduos dos aminoácidos básicos, alterando assim sua carga superficial de positiva para negativa, baixando o pH do ponto isoelétrico o que provoca diminuição na solubilidade da proteína em pH ácido, similar ao estomacal.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver o isolado protéico de soja modificado, por meio da alteração da curva de solubilidade da proteína em função ao pH, de maneira que esta apresente um perfil de solubilidade similar ao da caseína humana e de alta qualidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Soja e sua importância no agronegócio do Brasil

Esta leguminosa originou-se na China, provavelmente nas regiões norte e centrais, entre 4000 e 5000 anos atrás. Durante muitos séculos a soja foi um grão exclusivo do Oriente e foi apresentada à Europa em 1712 pelo botânico alemão Engelbert Kaempfer (LIU, 1997).

Nos Estados Unidos a soja não é mencionada até o ano 1804, época em que passou a ser utilizada. Primeiramente, o processamento da soja nesse país visava apenas a obtenção de óleo, com toda a massa restante destinada à alimentação de gado leiteiro e ao uso como fertilizante. Após a segunda guerra mundial, quando foi detectada uma deficiência mundial de proteínas para a alimentação humana, foi dada atenção especial à soja havendo grandes avanços em novas tecnologias para a viabilização e aceitação de suas proteínas na alimentação humana (PEARSON, 1983).

Botanicamente, a soja pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoidae* e o gênero *Glycyne*, L. A forma cultivada *Glycine Max (L.)* Merrill, cresce anualmente. Sua planta se desenvolve até altura que varia de 0,75 a 1,25m e se ramifica escassamente ou densamente, dependendo de cultivares e condições de crescimento.

Morfologicamente, a semente de soja é como a maioria das leguminosas, não apresenta praticamente endosperma; consiste de um tegumento e um embrião bastante desenvolvido. Este último contém dois cotilédones que funcionam como estrutura de reserva. O tegumento protege o embrião de fungos e infecções bacterianas antes e depois do plantio (MULLER, 1981).

No Brasil, o agronegócio da soja teve sua expansão na década de 1970, quando ganhou competitividade e elevou-o à condição de um dos maiores produtores e exportadores mundiais (GOMES, 2001).

As condições climáticas favoráveis do 2006 e a prioridade que os produtores deram ao plantio de soja permitiram que o Brasil conseguisse uma produção recorde em

2007. A produção atingiu, em 2007, 58 milhões de toneladas, resultado que chega a ser 10,6% superior ao do ano anterior. O maior produtor de soja no Brasil foi Mato Grosso, 26,3% do total nacional, seguido de Paraná com 20,5% e Rio Grande do Sul com 17,1% (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2007).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2008), os rendimentos com as exportações de soja e derivados cresceram cerca de 70% nos primeiros seis meses deste ano (2008), quando comparados ao mesmo período do 2007. Foram US\$ 9,03 bilhões em 2008 e US\$ 5,39 bilhões em 2007. Do total de recursos obtidos pelo país com a exportação, a soja responde por 10%. O produto também manteve a liderança na balança comercial do agronegócio.

Embora a USDA (2008) tenha estimado uma redução de 1,5 milhões de toneladas na produção de soja no Brasil, a CONAB (2008) anunciou no primeiro semestre de 2008, que o volume de exportações aumentou 4%, saindo de 19,85 milhões para 20,70 milhões de toneladas.

2.2 Os componentes da soja

Segundo LIU (1997), a composição da semente da soja depende de muitos fatores como variedade, época de plantio, local geográfico e clima, relatando que a porcentagem de proteínas na soja varia de 39,5% a 50,2% e a porcentagem de óleo de 16,3% a 21,6%. Mesmo considerando esta variação, a soja é um dos mais competitivos e valiosos produtos agrícolas, devido à sua composição química *sui generis*, pois possui alto teor de proteína e lipídios comparados com outras leguminosas e cereais de expressão comercial. Outros componentes valiosos encontrados na soja incluem fosfolipídios, vitaminas e minerais.

Além disso, a soja contém muitas substâncias secundárias como inibidores de tripsina, fitatos e oligossacarídeos. Outras como isoflavonas, são registradas pela sua poderosa habilidade na diminuição do risco de ocorrência do câncer e outras enfermidades (LIU, 1997). Tipicamente a soja é constituída de 42% de proteína, 35% de carboidratos, 20% de óleo e 5% de cinzas, como se mostra na Tabela 1.

Tabela 1- Composição do grão de soja e das partes de sua semente.

	Porcentagem do Total da semente	Composição Química (% de matéria seca)			
		Proteína	Oleo	Carboidrato	Cinza
Grão	100	42	20	35	5,5
Cotilédone	90	43	23	29	5
Tegumento	8	8.8	1	86	4,3
Hipocólito	2	41	11	43	4,4

Fonte: LIU, 1997

2.2.1 As proteínas da soja

A proteína é o componente majoritário presente no grão, aproximadamente 42% do peso total. A maior parte das proteínas está armazenada nos cotilédones em forma de aleuronas. A maioria delas é globulina e tem peso molecular acima de 100.000 Da. As globulinas da soja têm solubilidade mínima em valores de pH entre 3,75 e 5,25 e máxima em pH variando entre 1,5 e 2,5 e acima de pH 6,3. Além disso, seu ponto isoeletrico está situado entre pH 4,2 – 4,6 (PEARSON, 1983).

2.2.1.1 Classificação de proteínas

a.- Pela função biológica

Na soja 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 de outras proteínas. 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 estruturas de carbono para o desenvolvimento da planta. A maior parte das proteínas da soja é de reserva (MULLER, 1981).

b.- Pelo padrão de solubilidade

Osborne dividiu as proteínas em cinco classes baseadas na solubilidade em diferentes solventes, estes grupos são conhecidos como as frações de Osborne. Depois de extrações contínuas de materiais biológicos usando água, solução salina diluída, etanol a 70% e álcali obtiveram-se 5 frações protéicas: albumina, proteínas solúveis em água, globulina, proteínas solúveis em soluções salinas diluídas, prolamina, solúveis

em etanol e glutelinas, solúveis em soluções alcalinas. As proteínas das leguminosas são principalmente albuminas e globulinas, sendo que estas representam a maior fração (DANIELS et al. 1977).

c.- Pelo coeficiente de sedimentação

Embora a classificação baseada na solubilidade em vários solventes forneça meios convenientes e práticos para classificar as proteínas de vários grãos, não se pode assegurar que o mesmo polipeptídeo não seria extraído por mais de uma técnica de solubilidade, devido a sua associação com outras proteínas. Meios mais precisos para classificar as proteínas são baseados nos coeficientes de sedimentação, utilizando ultra centrifugação (VAN, 1971). Em condições específicas, as proteínas de soja apresentam quatro frações após a ultra centrifugação, designados como 2, 7, 11 e 15S (Tabela 2) (PEARSON, 1983).

Tabela 2- Classificação das frações protéicas da soja por Coeficiente de Sedimentação.

Valor de sedimentação (S_{w20})*	Porcentagem do total	Componentes conhecidos	Massa Molar (Da)
2S	22	Inibidor de tripsina	8000-21500
		Citocromo C	12000
7S	37	Hemaglutinina	110000
		Lipoxigenase	102000
		β-amilases	61700
		7S globulina	180000-210000
11S	31	11S globulina	350000
15S	11		600000

Fonte: Pearson (1983)

*S: unidade Svedberg

Geralmente, a análise das quatro frações das proteínas de soja mostra que as frações 11S e 15S são puras. Mais especificamente a fração 11S que é a glicinina e corresponde à aproximadamente 30% das proteínas extraíveis, enquanto a fração 15S é considerada um polímero de glicinina, correspondendo mais ou menos 10% das proteínas extraíveis (LIU, 1997).

2.2.2 Lipídios presentes na soja

Os grãos de soja armazenam seus lipídios principalmente na forma de triglicerídeos em organelas conhecidas como corpos lipídicos. Estes, por sua vez, após maturação da semente são encontrados nas células vizinhas às aleuronas (PEARSON, 1983). A Tabela 3 mostra a composição básica dos triglicerídeos dos grãos de soja. Os lipídios da soja são constituídos por fosfolipídios, material saponificável, ácidos graxos livres e traços de metais (LIU, 1997). A lecitina (SOUZA, 2000), um subproduto do óleo de soja, é amplamente utilizada como emulsionante, sendo constituída por dois importantes fosfolipídios: a fosfatidilserina e a fosfatidilcolina.

Tabela 3- Composição dos triglicerídeos dos grãos de soja.

Acido Graxo	Número de carbonos	Número de insaturações	Porcentagem do total (%)
Acido palmítico	16	0	8 – 17 %
Acido esteárico	18	0	3 – 30 %
Acido oléico	18	1	25 -60 %
Acido linoléico	18	2	25 -60 %
Acido α -linolênico	18	3	2 – 15 %

Fonte: LIU (1997)

A soja possui dois ácidos graxos essenciais, linoléico e α -linolênico, os quais participam da síntese de ácido araquidônico e do ácido docosahexaenóico os dois importantes precursores de prostaglandinas e outros eicosanóides.

2.2.3 Vitaminas

As proteínas de soja, quando ingeridas em quantidade equivalente à metade das necessidades humanas diárias, poderão também suprir o organismo humano de 30% a 50% da ingestão diária recomendada de tiamina, riboflavina e niacina (PEARSON, 1983).

A soja contém tanto vitaminas hidrossolúveis quanto lipossolúveis. A tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), niacina (vitamina B₃), ácido pantotênico e ácido fólico são as vitaminas hidrossolúveis presentes na soja. As vitaminas lipossolúveis encontradas na soja são a vitamina A e E. A vitamina E está presente no óleo de soja refinado devido ao processo de extração deste. A vitamina E é um

antioxidante natural tanto para conservação do óleo comercial quanto ao organismo humano (MESSINA et al. 1994).

2.2.4 Minerais

O mineral que apresenta maior concentração no grão de soja é o potássio, seguido de fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloro e sódio. O teor destes minerais é de 0,2 – 2,1% em média (PEARSON, 1983).

Na Tabela 4 pode-se observar que as variações na composição de minerais no farelo desengordurado de soja e nas proteínas concentradas e isoladas.

Tabela 4 - Composição mineral típica de produtos de soja.

Elemento	Farelo de soja desengordurado	Concentrado	
		proteico de soja	Isolado protéico de soja
Arsênio	0,1 ppm	-	0,2ppm
Cádmio	0,25 ppm	-	<0,2ppm
Cálcio	0,22%	0,22%	0,18%
Cloro	0,13%	0,11%	0,13%
Cromo	0,9 ppm	<1,5ppm	<1,0ppm
Cobalto	0,5 ppm	-	<1,0ppm
Cobre	23 ppm	16ppm	12ppm
Flúor	1,4 ppm	-	<10ppm
Iodo	0,01 ppm	0,17ppm	<10ppm
Ferro	110 ppm	100ppm	160ppm
Lítio	0,2 ppm	-	<0,2ppm
Magnésio	0,31%	0,25%	380ppm
Manganês	28 ppm	30ppm	17ppm
Mercúrio	0,05 ppm	-	<0,5ppm
Molibdênio	2,6 ppm	4,5ppm	<0,3ppm
Fósforo	0,68%	0,70%	0,76%
Potássio	2,37%	2,10%	960ppm
Selênio	0,6 ppm	-	0,36ppm
Sódio	254 ppm	50ppm	1,10%
Enxofre	0,25%	0,42%	-
Zinco	61ppm	46ppm	40ppm

Fonte: PEARSON (1983).

2.2.5 Carboidratos e fibras

Os carboidratos são o segundo componente majoritário no grão de soja.

A soja contém, aproximadamente, 30% de carboidratos totais, sendo 15% carboidratos solúveis e 15% insolúveis. Basicamente, os oligossacarídeos na soja são açúcares não-redutores, contendo duas ou mais unidades de frutose, glicose e galactose. Dentre os carboidratos solúveis, a rafinose e estaquiose recebem mais atenção, principalmente pela sua presença estar relacionada com a flatulência e dores abdominais causados pelo consumo da soja e os seus produtos. Isto se deve ao fato de o organismo humano não possuir a enzima α -galactosidase, responsável pela hidrólise destes oligossacarídeos. Por isto, eles não são digeridos no duodeno, passando intatos pelo intestino delgado sendo metabolizados no intestino grosso pelos microorganismos que contêm esta enzima produzindo gases como dióxido de carbono, nitrogênio, hidrogênio etc (CRISTOFARO et al. 1974, LIENER 1994).

Os carboidratos insolúveis são componentes estruturais encontrados, principalmente, nas paredes celulares. Eles incluem celulose, hemicelulose e pectina. O tegumento representa aproximadamente 8% do grão de soja, contendo 86% de carboidratos (LIU, 1997).

2.2.6 Isoflavonas

As isoflavonas são compostos difenólicos encontrados naturalmente nas leguminosas, estando presente em altas concentrações na soja. São substâncias orgânicas, pertencentes à classe dos flavonóides, apresentando diversas funções nos tecidos animais e vegetais (BRZEZINSKI, et al. 1999). TAKAHASHI et al. (2008) demonstraram que as proteínas de soja são ricas em isoflavonas afetando significativamente o metabolismo de lipídios em animais. Destacam a função da proteína e a isoflavona, como componente da soja, na regulação do metabolismo de lipídios. A concentração de isoflavonas nos grãos de soja é geneticamente controlada e influenciada pelas condições ambientais, sendo a temperatura durante o desenvolvimento do grão o fator mais importante.

Flavonóides são considerados antioxidantes potentes, reagindo com radicais livres e inibindo a oxidação de lipídios. Estudos epidemiológicos mostram uma relação inversa entre uma dieta com ingestão de flavonóides e mortalidade por doenças coronárias. As isoflavonas, que juntamente com outros compostos vegetais denominados fitoquímicos, não são reconhecidos oficialmente como nutrientes mas são

reconhecidos pelo efeito benéfico à saúde da mesma forma que as vitaminas, e os minerais (MESSINA et al. 1994). Estes compostos têm influência não só no metabolismo e atividade de hormônios sexuais, estrógenos como também nas enzimas intracelulares, síntese de proteínas, ação dos fatores de crescimento, proliferação de células malignas, além de seu poder antioxidante (ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

Tem sido observada uma relação entre o consumo de soja e a redução dos riscos de doenças crônicas não-infecciosas como as doenças cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e osteoporose (LICHETENSTEIN, 1998).

2.3 Propriedades funcionais

As propriedades funcionais de uma proteína como solubilidade, emulsificação, viscosidade, formação de espuma e gelificação refletem efeitos específicos no processamento e vida útil dos alimentos (LI, 2002).

O uso da proteína de soja como ingrediente depende, principalmente, da sua estrutura e características físico-químicas. De todas estas propriedades, a solubilidade é considerada a mais importante porque tem grande influência nas outras, sendo o fator principal na aplicação e uso de uma proteína (Vojdani, 1996 citado por Kunsheng et al. 2007).

Além das funções nutricionais, as proteínas têm um papel importante nos atributos sensoriais dos alimentos. A preferência dos consumidores por certos alimentos é baseada predominantemente nas propriedades sensoriais como cor, sabor e textura dos alimentos (HOOGENKAMP, 1991).

O tamanho, forma, composição e sequência de aminoácidos, cargas líquidas, distribuição de cargas, hidrofobia, hidrofília, estruturas secundária, terciária e quaternária, o tipo de extração empregado, temperatura, o pH, as condições de secagem e estocagem da proteína isolada, definem as propriedades físicas e químicas das proteínas influenciando no comportamento funcional nos alimentos (DAMODARAN, S. et al. 1997).

Na maioria dos casos nenhuma proteína ou combinação delas pode fornecer todas as propriedades funcionais desejáveis em um sistema alimentício. O conhecimento das propriedades funcionais não é importante apenas para determinar a qualidade do produto final, mas também para delinear e otimizar processos, permitindo assim definir o uso das proteínas como substituto ou complemento protéico de alimentos tradicionais (Tabela 5). A funcionalidade de um produto não depende somente das proteínas, mas também de outros componentes que participem na sua composição, como lipídios e carboidratos (KINSELLA, 1979; FENNEMA, 1996).

Tabela 5 – 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
Viscosidade	Forças hidrodinâmicas e ligação com água	Sopas, molhos	FS, CPS, IPS
Geleificação	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

¹FS – Farinha de Soja; ²CPS – Concentrado Protéico de Soja; ³IPS – Isolado Protéico de Soja; ⁴SS – Soro de Soja.

Fonte: Adaptado de LIU (1997)

2.3.1 Solubilidade das proteínas

A solubilidade é uma das propriedades mais importantes das proteínas de soja, sendo necessário conhecer o comportamento dela em diferentes meios para uma aplicação adequada. As propriedades funcionais como a formação de espuma, emulsificação e formação de gel são afetadas pela solubilidade da proteína.

A solubilidade da proteína é medida pelo índice de solubilidade de nitrogênio, isto é, a porcentagem de proteína que se mantém em solução ou dispersão coloidal sob condições específicas e que não sedimenta com forças centrífugas moderadas (ORDOÑEZ et al. 2005).

São dois os fatores principais que determinam a solubilidade de uma proteína: as cargas iônicas e a natureza hidrofóbica. As interações hidrofóbicas favorecem as interações proteína-proteína que resulta em decréscimo na solubilidade. As interações iônicas favorecem as interações proteína-água, resultando em aumento de solubilidade (FENNEMA, 1996).

A solubilidade das proteínas em soluções aquosas dependem do pH. Para a maioria das proteínas a menor solubilidade se consegue no ponto isoelétrico (PI), onde a elas possuem carga líquida igual a zero, sendo a interação hidrofóbica máxima com a água. Neste ponto, observa-se também que a repulsão eletrostática e hidratação iônica são mínimas. Quando os valores de pH são superiores ou inferiores ao ponto isoelétrico as proteínas têm carga e a repulsão eletrostática e hidratação iônica promovem a solubilização (DAMORARAN, 1997).

A Figura 1 mostra a curva de solubilidade das proteínas de soja em diferentes valores de pH. Observa-se que são menos solúveis em sua região do ponto isoelétrico (pH 4,2 - 4,6). A solubilidade aumenta acima e abaixo desta faixa (WOLF, 1977). Isolados protéicos de soja comerciais acompanham este perfil, Figura 2, conforme GOMES et al. (1987).

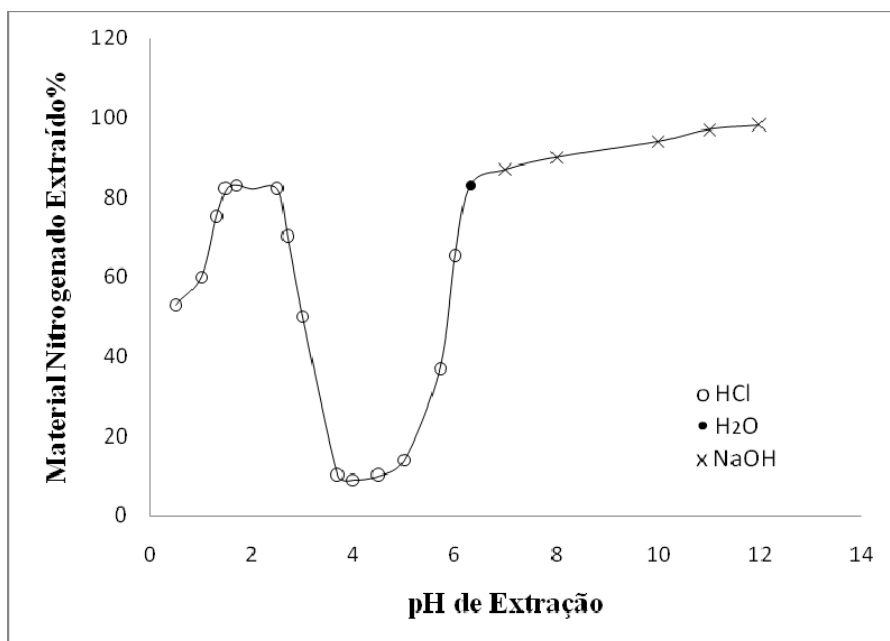


Figura 1- Efeito do pH na extração da proteína de soja.

Fonte: WOLF (1977)

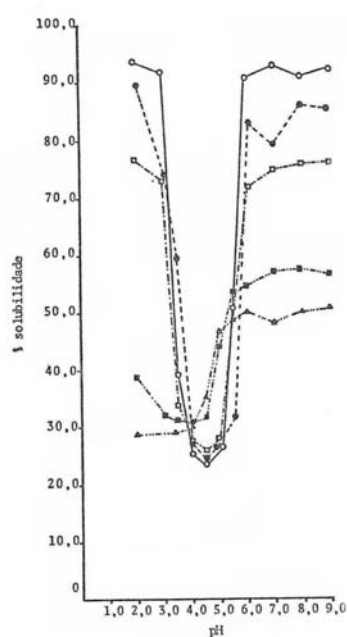


Figura 2- Solubilidade de isolados protéicos comerciais. Proteimax 90-SH em água (o) e em forças iônicas correspondentes a 0,05 M (•), 0,1 M (◻) e 1 M (Δ) de cloreto de sódio.

Fonte: Gomes et al. (1987).

Além do 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 DAMODARAN (1997).

SHEN (1981), citado por HENRIQUES (2007), estudou os perfis de solubilidade de um isolado protéico de soja em diversas soluções salinas de sódio. Dentre os sais testados, os de sulfito apresentaram um 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.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gomes et al. (1987) para isolados protéicos comerciais de soja. HENRIQUES (2007) estudou o perfil de solubilidade da caseína humana e a comparou com a curva de solubilidade dos isolados protéicos comerciais (Samprosoy 90NB e Samprosoy 90LH) que foram modificados. Nesta modificação química, foram preparadas suspensões de isolados protéicos de soja comerciais em concentrações de 10% m/v. O meio foi acidificado até pH 3,0 com HCl, por 1 hora. Após a acidificação, foi adicionado 0,5% de polifosfato, seguidamente atingiu-se pH 7 com NaOH e posteriormente as proteínas foram desidratadas em spray dryer; obtendo-se os isolados protéicos de soja modificados. A Figura 3 mostra os perfis de solubilidade encontrados.

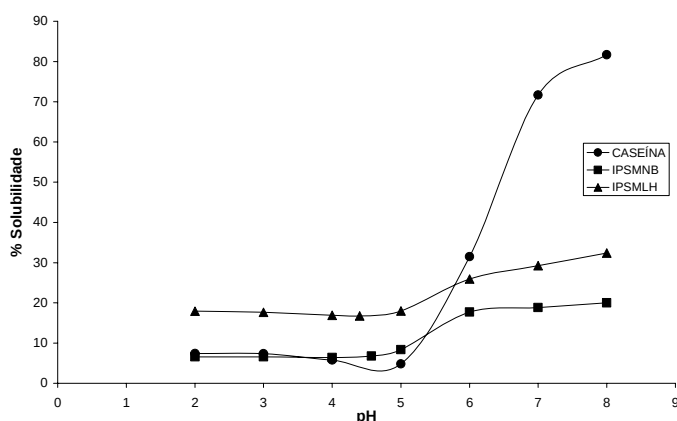


Figura 3 – Perfil de solubilidade dos IPS modificados e da caseína humana.

- Caseína humana,
- Δ Isolado protéico de soja modificado LH (IPSMHL)
- Isolado protéico de soja modificado NB (IPSMNB)

Fonte: Henriques (2007)

2.3.2 Emulsificação

Uma emulsão é uma dispersão de gotas de óleo em uma matriz aquosa contínua ou de água em uma matriz de óleo. A solubilidade e hidrofobicidade de uma proteína são as propriedades mais importantes que determinam a sua emulsificação. Alguns mecanismos como redução da tensão superficial, formação de uma película rígida, e cargas elétricas, participam na formação de uma emulsão estável (Mc WATTERS E CHERRY, 1981).

Em geral, a capacidade de emulsificação de produtos de soja aumenta com um incremento da solubilidade da proteína. Embora a estabilidade de emulsão aumente com a concentração da proteína, a capacidade de emulsão geralmente decresce. O pH, temperatura, tempo, presença de sais e tamanho das gotas de óleo também afetam a emulsificação das proteínas de soja (HOOGENKAMP, 1991).

2.3.3 Formação de espuma

Para a formação de espuma a proteína deve ser solúvel em água e flexível para formar uma película coesiva de água-ar. Para que a película seja estável, deve possuir força mecânica e viscosidade para prever rotura e coalescência. A formação de espuma das proteínas de soja está correlacionada com a sua solubilidade. Alguns estudos mostram que as propriedades de formação de espuma são superiores para proteínas isoladas em comparação com outros produtos de soja como proteínas concentradas ou farelos. A presença de gordura é a principal causa de desestabilização de espuma (LIU, 1997).

2.3.4 Gelificação

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. Os principais fatores que afetam a gelificação da proteína de soja incluem a concentração de proteína, tempo e temperatura de aquecimento e condições de resfriamento. Enquanto a farinha e o concentrado protéico de soja formam géis macios e fracos, os isolados protéicos formam géis firmes, duros e resistentes, devido a que a firmeza do gel depende da concentração protéica (YATSUMATSU et al. 1972).

2.3.5 Capacidade de absorção de água

A concentração de proteínas está diretamente relacionada com a quantidade total de água que elas podem absorver. O isolado protéico de soja apresenta uma maior capacidade de absorção de água, aproximadamente 35 g/100g, em razão do seu maior conteúdo protéico dentre os produtos protéicos de soja. As proteínas são consideradas como as primeiras responsáveis na absorção de água, embora outros constituintes e aditivos tenham esse efeito (HUTTON E CAMPBELL, 1981).

Os principais fatores que afetam a capacidade de absorção de água de uma proteína são a composição de aminoácidos, estrutura e conformação da proteína, polaridade, carga na superfície, pH e temperatura (DAMODARAN 1997).

2.3.6 Capacidade de retenção de água

O termo absorção quanto retenção de água envolvem uma interação entre a proteína com a água, que expressam a quantidade máxima de água que o material protéico pode captar e reter durante a formulação do alimento (FENNEMA, 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos onde foi elaborado o isolado protéico de soja modificado (IPM), e no laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal Viçosa (UFV) onde foi avaliada a qualidade protéica do produto.

3.1 Elaboração do isolado protéico modificado

O isolado protéico modificado foi obtido a partir de aproximadamente 7 kg do grão de soja da marca Pereira foi adquirida em comércio de Viçosa – Minas Gerais, os quais foram moídos duas vezes no moinho de marca Bradender Rusburg, a primeira moagem com granulometria de 1,41 mm. A farinha obtida foi desengordurada, utilizando-se como solvente éter de petróleo, ponto de ebulição de 30°C a 60 °C em equipamento Soxhlet por 6 horas. O farelo desengordurado passou por uma moagem fina, com granulometria de 0,42 mm, para criar maior área de contato e facilitar assim a extração de proteína.

Foram realizados testes preliminares para obter a proporção mais adequada de hexametáfosfato a ser utilizada. Testaram-se 4% m/v, 2% m/v, 0,5% m/v e 0,3% m/v de hexametáfosfato em relação ao sobrenadante obtendo-se as curvas de solubilidade em relação ao pH mostradas na Figura 4.

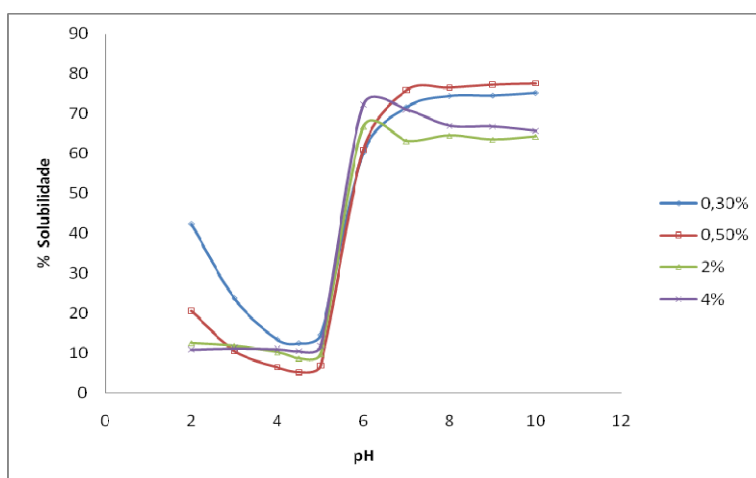


Figura 4.- Curva de solubilidade das diferentes dosagens de hexametáfosfato (% m/v) em relação ao sobrenadante.

Escolheu-se a dosagem 0,5% m/v de hexametáfosfato em relação ao sobrenadante porque esta apresentou um perfil de solubilidade similar ao da caseína humana, utilizando uma concentração baixa de hexametáfosfato, objetivo deste trabalho.

A extração das proteínas foi realizada tomando como referência algumas publicações como COOPER 1942, DANIELS et al. 1977, GOMES et al. 1987, de classificação de proteínas de acordo à solubilidade das mesmas, conhecidas como frações de Osborne. Foram preparadas suspensões de farelo desengordurado de soja em água na proporção 10:100 adicionando-se hidróxido de sódio 0,5 M até atingir pH 10 em que as proteínas de soja alcançam sua maior solubilidade permitindo maior extração. A suspensão foi mantida nesse meio por 24 horas.

Após a extração, foram separadas por centrifugação as proteínas solúveis em meio básico, sobrenadante, de outros compostos como carboidratos complexos, fibras e outros insolúveis. Utilizou-se uma centrífuga da marca Beckman J2-MC e os parâmetros utilizados foram 8,000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi pesado e adicionou-se hexametáfosfato de sódio, $(\text{NaPO}_3)_n$, para atingir concentração de 0,5% m/m em relação ao sobrenadante que equivale a 10% m/m sobre o conteúdo de proteínas do sobrenadante. Após agitação precipitou-se as proteínas levando-as ao ponto isoelétrico pH 4,5 com ácido clorídrico 0,5 M.

A suspensão resultante foi centrifugada nos mesmos parâmetros da centrifugação anterior. O material de baixa solubilidade nesse meio, precipitado, é o isolado protéico de soja, o qual foi atingido a pH 7, para melhorar a solubilidade, e submetido a tratamento térmico para inativar os fatores antinutricionais.

O tratamento térmico foi realizado no banho maria Frigomix® B. Braun Biotech International a 70°C por 4 minutos (MUSTAKAS e BAKER, 1973). O teste de atividade ureásica realizado indica que a urease foi inativada, refletindo assim que o tratamento térmico aplicado foi eficiente. Seguidamente procedeu-se a secagem em Spray Dryer, marca Niro, modelo Miror Atomizer, a temperatura de ar de entrada a 180°C e temperatura de saída do produto entre 60°C e 70°C, obtendo-se 980 g. de IPM seco, o que indica 14 % de rendimento. O fluxograma de obtenção do isolado protéico modificado é mostrado na Figura 5.

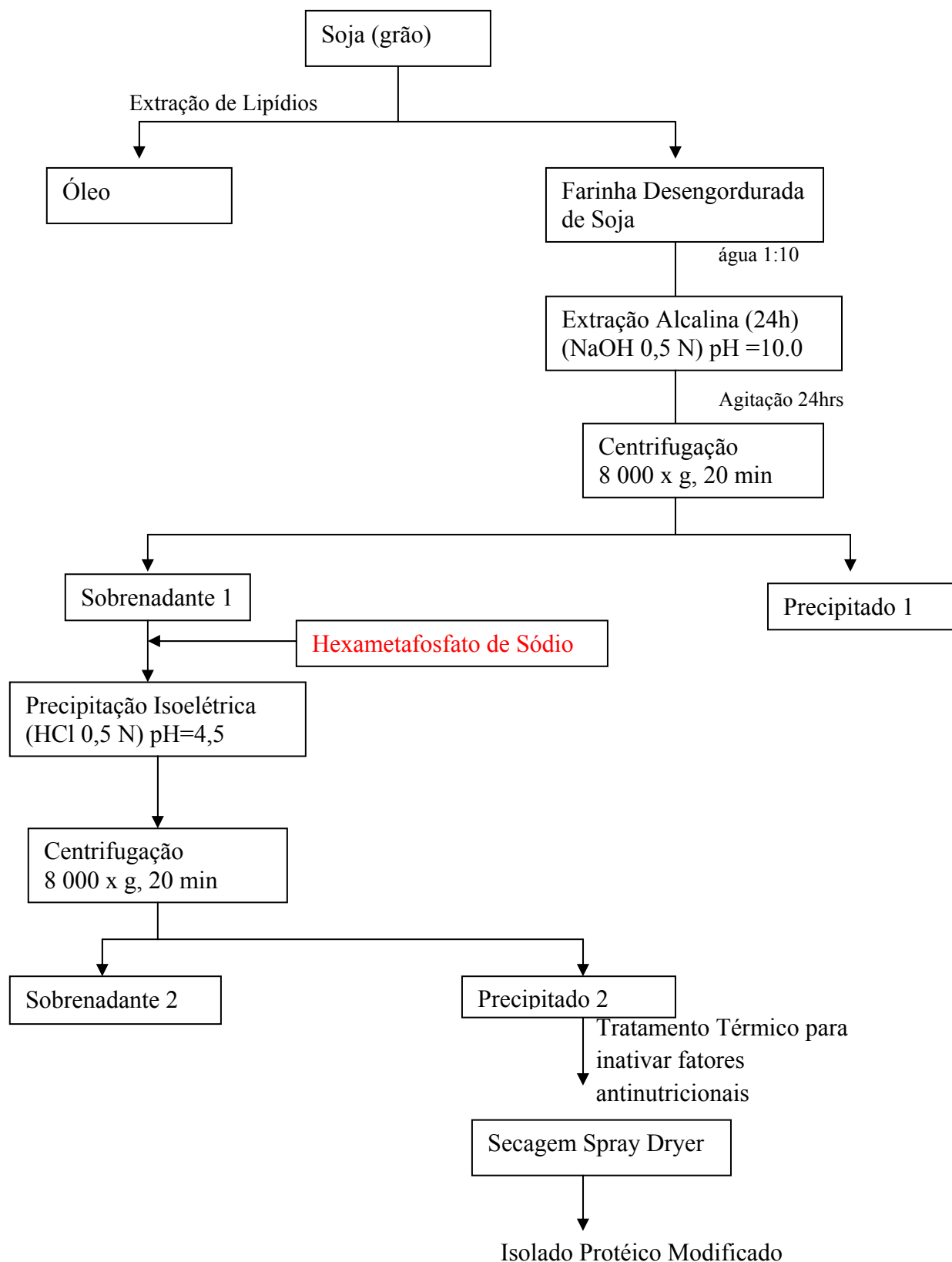


Figura 5- Fluxograma da produção de isolado protéico de soja modificado

Fonte: Adaptado de MURAD (1993)

3.2. Caracterização do isolado protéico modificado

3.2.1. Análise físico-química

3.2.1.1 Determinação de proteína no IPM

O teor protéico foi determinado pelo método Kjeldahl ($N \times 6,25$). Para a quantificação de nitrogênio total, utilizou-se o método descrito pela AOAC (1984). As análises foram realizadas em triplicatas.

3.2.1.2 Determinação da umidade no IPM

A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa a 105°C, até que o produto atingisse massa constante, conforme descrito pelas Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (PREGNOLATO e PREGNOLATO, 1985).

3.2.1.3 Determinação de cinzas no IPM

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

3.2.1.4 Determinação de lipídios no IPM

A determinação de lipídios foi conduzida pelo 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).

3.2.1.5 Determinação de carboidratos no IPM

A determinação de carboidratos foi realizada por subtrair de 100 a soma de proteínas, lipídios, cinzas e umidade (AOAC, 1984).

3.2.1.6 Determinação de Atividade Ureásica no IPM

A atividade ureásica foi determinada pela metodologia AACC (1962), a qual se baseia no princípio de que a atuação da enzima sobre a uréia provoca a liberação de amônia, formando hidróxido de amônio. O aumento de pH é proporcional à atividade ureásica presente na amostra.

Pesou-se 0,200 g da amostra dentro de um tubo de ensaio e adicionou-se 10 mL de uma solução tampão de uréia. Os tubos foram homogenizados e transferidos para um banho-maria a 30°C.

Preparou-se uma prova em branco com 0,200 g da amostra e 10 mL de solução-tampão fosfato 0,05 M. Marcou-se um tempo de 30 minutos. Ao final deste tempo, mediu-se o pH. A diferença entre o pH do tubo com uréia e o pH do branco é o índice de atividade de urease.

Entre as medidas de pH, o eletrodo foi lavado com solução de HCl 0,1 M, para remover uma possível camada de proteína aderida à superfície de vidro.

3.2.1.7 Determinação de pH do IPM

Determinou-se o valor de pH conforme o método descrito pela AOAC (1984).

3.2.2 Determinação da solubilidade protéica do IPM

Para determinação da solubilidade protéica utilizou-se uma variação da metodologia proposta por Morr et al. (1985). Porções de 500 mg do isolado protéico de soja modificada, comercial e caseína bovina foram dissolvidas com 25 mL de água em béquer de 100 mL. O pH da amostra foi ajustado para 2,0; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0; 9,0; 10,0, sendo mantido pela adição de soluções de NaOH 0,1M ou HCl 0,1M. Depois de manter as suspensões nos seus respectivos pH por 1 h sob agitação, as amostras foram levadas à centrifugação a 8 000 x g por 30 minutos a 4 °C. Tomou-se alíquotas do sobrenadante e determinou-se a concentração de proteínas pelo método micro- Kjeldahl, segundo método 38012 da AOAC (1984).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química do IPM

A composição química do isolado protéico de soja modificado está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição química do isolado protéico de soja modificado (g/100g)

DETERMINAÇÃO	ISOLADO PROTEICO DE SOJA MODIFICADO
Proteínas (base úmida)	80,40
Proteínas *	85,30
Cinzas*	9,09
Carboidratos*	5,45
Umidade	4,90
Lipídios*	0,14
Atividade ureásica (Δ pH)	0,05
pH de suspensão aquosa a 1% p/v	6,80

*valores expressos em base seca

O teor de proteína, de 85,3% (base seca), é menor que o estabelecido pela legislação brasileira que indica um mínimo de 88% de proteína (Brasil, 2005), enquanto o *Codex Alimentarius* estabelece que um isolado protéico de soja deve ter no mínimo 90% de proteína. O valor de proteína encontrado justifica-se pelo fato de ser adicionado, durante a elaboração, 0,5% de polifosfato em relação ao peso do sobrenadante, antes da precipitação. Além disso, houve o processo de neutralização com adição de solução de hidróxido de sódio, produzindo os sais correspondentes, conforme evidenciado pelo elevado teor de cinzas encontrado (Tabela 6). O aumento da fração de cinzas diminui, relativamente, o teor das outras frações, incluindo as proteínas.

O valor encontrado para o teor de cinzas foi 9,09%, sendo superior ao estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (2008) para estes produtos em que o valor não deveria ser superior a 8% em base seca. Henriques (2007) desenvolveu um isolado

protéico de soja modificado e relatou média 11,37% de cinzas, justificando este valor elevado pela adição de polifosfato e pela formação de sal na etapa de neutralização, durante a elaboração desses produtos.

O teor de carboidratos, obtido por diferença dos outros componentes, foi de 5,45%. O *Codex Alimentarius* (2008) não estabelece valores para carboidratos, no entanto o valor encontrado neste trabalho coincide com o reportado por Henriques (2007) para isolado protéico comercial e modificado 4,38% e 5,91% respectivamente.

O teor médio de umidade de 4,9% está dentro do estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (2008) para produtos protéicos de soja, em que o nível de umidade não deverá exceder a 10%. A informação técnica recebida para o isolado protéico comercial SPI- 950 adquiridos da Kerry (Brasil) que se usou para os testes de qualidade protéica, reportam máximo 7% de umidade no produto.

O teor de lipídios encontrado de 0,14% é inferior ao reportado por Henriques (2007) para isolados protéicos comerciais (0,34-0,38%). Tal fato pode ser oriundo da diferença entre as matérias-primas utilizadas. Enquanto neste trabalho partiu-se de grãos de soja, sendo a remoção de lipídios conduzida por extração em laboratório, no trabalho anterior utilizaram-se isolados protéicos comerciais Samprosoy 90 LH e Samprosoy 90 NB que foram adquiridos da Bunge Alimentos (Brasil).

O índice de atividade de urease foi 0,05, evidenciando-se, desta forma, um tratamento térmico eficiente, pois uma variação do valor de pH superior a 0,25 indica atividade de urease elevada, imprópria ao consumo de monogástricos, refletindo tratamento térmico insuficiente. Segundo Baker et al.(1973) inativando-se a urease, eliminam-se conseqüentemente os fatores antinutricionais, pois esses necessitam de menor tratamento térmico para sua inativação.

O tratamento térmico utilizado neste trabalho foi 70°C por 4 minutos, equivalente ao aplicado por Murad (1993) em um isolado protéico de soja modificado 73°C por 1 minuto, obtendo atividade de urease de 0,04.

4.2. Determinação da solubilidade protéica do IPM

As curvas de solubilidade do isolado protéico de soja modificado (IPM), isolado protéico comercial (IPC) e caseína (do leite de vaca), em relação ao pH se apresentam a na Figura 6.

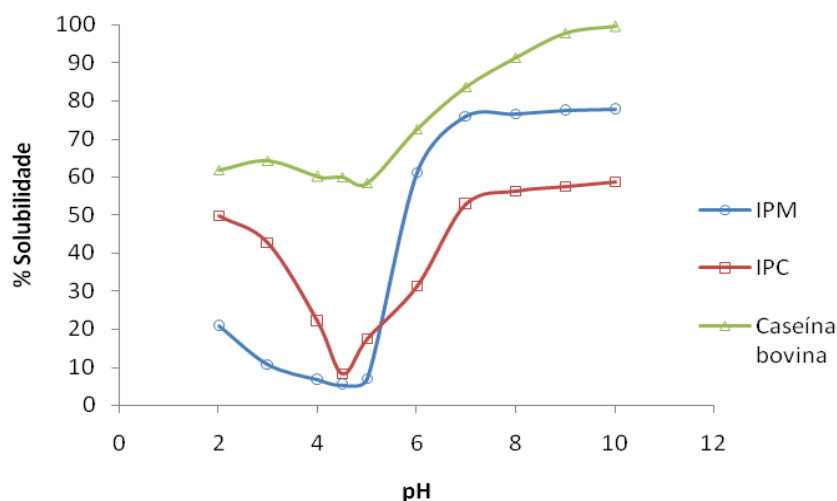


Figura 6- Perfil de solubilidade da caseína bovina e isolados protéicos de soja
IPM = Isolado protéico modificado.
IPC = Isolado protéico comercial.

Foi observada redução da solubilidade em valores de pH inferiores ao ponto isoelétrico das proteínas de soja modificada (Figura 6). Acima deste ponto, a solubilidade aumentou inclusive mais que o isolado comercial. A explicação para a baixa solubilidade na faixa de pH inferior ao ponto isoelétrico é que a carga negativa da porção do hexametáfosfato na proteína modificada é maior do que a carga na proteína sem o hexametáfosfato. Em pH menores que o pH do ponto isoelétrico os grupos amino encontram-se carregados positivamente, pois estes valores de pH são mais baixos do que os valores dos pKa destes grupos e ocorrerá forte interação entre cadeias de polipeptídeos e os grupos iônicos do hexametáfosfato, formando assim grandes agregados que precipitam. As cargas das proteínas e a força iônica do meio afetam a solubilidade delas (LIGHT, 1974; KINSELLA and SHETTY, 1979; CHEFTEL, 1989; VOJDANI, 1996; DAMODARAN, 1997). Esta situação é bem ilustrada na Figura 2, onde observa-se que o aumento da força iônica pela adição de cloreto de sódio diminuiu substancialmente a solubilidade abaixo do ponto isoelétrico. No entanto, tal comportamento exigiu altas concentrações de cloreto de sódio. Tal fenômeno está relacionado com íons da série Hofmeister (DAMODARAN, 2008).

As proteínas isoladas de soja têm solubilidade mínima no pH isoeletrico, pH entre 4 a 5, como é relatado por vários autores (WOLF, 1977; GOMES et al. 1987; VODJANI, 1996; LIU, 1997; SORGENTINI and WAGNER, 2002). O mesmo aconteceu no isolado protéico comercial avaliado como se mostra na Figura 6.

Este comportamento de solubilidade é similar ao da caseína bovina (VOJDANI, 1996; DALGLEISH, 1997) e humana (HENRIQUES, 2007). Foi observada redução na solubilidade em pH menores do que 4,5, o qual é também o pH isoeletrico do isolado protéico comercial; para o isolado protéico modificado o perfil de solubilidade é equivalente ao da caseína humana. O perfil de solubilidade da caseína humana, obtido por HENRIQUES (2007) e o perfil de solubilidade do isolado protéico de soja modificado desenvolvido no presente trabalho é mostrado na Figura 7.

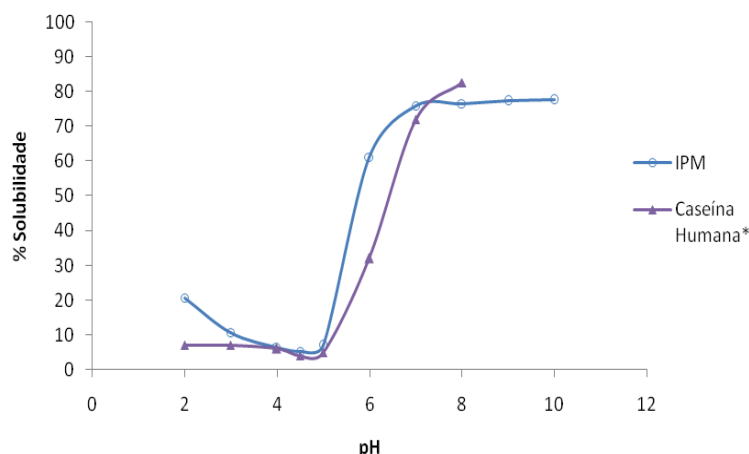


Figura 7 – Perfil de solubilidade do IPM e da caseína humana.

*Fonte: Henriques (2007)

A solubilidade baixa das proteínas em pH ácido é importante no processo de coagulação das proteínas no estômago de alguns mamíferos. FERREIRA et al. (1988) estudaram a digestão de proteínas em leitões. Observou-se que a formação de coágulos deve ser firme, mas o suficientemente macio para uma apropriada digestão no intestino delgado. Os autores explicaram que a incorreta formação de coágulo pode causar crescimento descontrolado de bactérias e desordens intestinais. Explicaram também que os coágulos têm função de armazenamento de proteínas e lipídios e são lentamente liberados pela ação das enzimas pancreáticas.

5. CONCLUSÃO

O isolado protéico modificado apresentou perfil de solubilidade diferente ao isolado protéico comercial, principalmente na faixa de pH 3 a 5, assemelhando-se ao perfil da caseína humana.

O hexametáfosfato de sódio, aplicado em pH alcalino (durante a extração do isolado protéico de soja), alterou a carga superficial provocando redução na solubilidade da proteína em pH ácido (pH similar ao estomacal), isto indica que poderia-se formar coágulos adequados que serão absorvidos sem provocar desordens intestinais como diarreia.

O isolado protéico de soja modificado, por ter apresentado perfil de solubilidade semelhante à caseína humana, possivelmente poderá ser utilizado, em substituição total ou parcial dessa, em produtos alimentícios, como fórmulas infantis, no qual essa característica de solubilidade seja importante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREALS CHEMISTS. **“General laboratory Methods”**. Seventh edition. AACC. St Paul Minn. 1962. p.22-90.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14. ed. Washington, D.C.: 1984. 1141p.

BAKER E, MUSTAKAS G. Northern regional research laboratory. Illinois. Heat inactivation of trypsin inhibitor, lipoxygenase and urease in soybeans: Effect of acid and base additives. **Journal of the American Oil Chemistry Society** vol.50, n.5, 1973, p.137- 141

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.

BRZEZINSKI, A., DEBI, A. Phytoestrogens: **The natural selective estrogen receptor modulators?** European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v.85, 1999. p. 47-51.

CHEFTEL, J. C. Proteins and amino acids. In: TANNENBAUM, S. R. Ed. **Nutritional and safety aspects of food processing**. New York, NY: Marcel Dekkar, 1989. p. 153-215.

CODEx ALIMENTARIUS. **Norma do codex para produtos proteicos de soja (pps) codex stan 175-1989**. Disponível em <<http://www.codexalimentarius.net>> Acesso em: 06/11/2008.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 25/10/2008.

COOPER T., The tools of biochemistry. University of Pittsburgh, London Wiley Interscience publication. 423p. 1942.

CORDLE, C.; Soy Protein Allergy: Incidence and Relative Severity. **Journal of Nutrition**, 2004. p. 1213-1219.

CRISTOFARO, E., MOTTU, F., and WUHRMANN, J., Involvement of the raffinose family of oligosaccharides in flatulence. Ch.20. In sugar in Nutrition, H.L. Sipple and K.W. Mc Nutt (Ed.). Academic Press, New York. 1974.

DALGLEISH, D. G. **Structure-Function Relationships of Caseins**. In: Food Proteins and Their Applications. Damodaran,S. and Paraf,A. (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York. N.Y. 1997.

DAMODARAN, S., PARAF, A.,. **Food Protein and their Applications** In: NAKAI, S., MODLER, H.W (ed). New York: VCH Publishers, Inc., 1997.

DAMODARAM, S., **Amino Acids, Peptides, and Protein**. In: Fennema's Food Chemistry. 4th Ed. Damodaran, S., Parkin, K.L, Fennema, O.R., Eds. CRC Press. Boca Raton. 2008. 1144p.

DANIELS, N.W.R., FRAZIER P.J., Wheat proteins – Physical properties and baking function. In: Plant proteins. G. Norton. Department of applied Biochemistry and nutrition. University of Nottingham school of agriculture. Butterworths. 1977, n 18, p.352

ESTEVEZ, E.A.; MONTEIRO, J.B **Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas**. Rev. Nutr., Abr 2001, vol.14, no.1, p.43-52.

FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. 1069p.

FERREIRA, A., COSTA, P., GOMES, J.C., NEVES, M.T., 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. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 1988, vol.17, n. 3, p. 308- 315.

FILHO, M.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A.; REIS, M. S.; MASSONI, G. A.; PIOVESAN, N. D. Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 39, n. 5, 2004. p. 445-450.

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

GOMES, J.C., ARAUJO, M., MOREIRA, M., COELHO, D. Caracterização funcional de isolados e de um concentrado protéico de soja produzido no Brasil: Solubilidade e capacidade de absorção de água. **Revista Ceres** 34 (193). 1987. p.232-249.

HENRIQUES M. **Desenvolvimento e caracterização de um isolado protéico de soja modificado com perfil de solubilidade de caseína do leite humano**. Universidade Federal Viçosa. (Tese de Doutorado) 2007. 107p.

HOOGENKAMP, H. Vegetable Protein. Technology value in meat and poultry products. Protein Technologies International, Inc. 1991, p.180.

HUTTON, C., CAMPBELL, A., Protein Functionality in Foods. Water and Fat Absorption. American Chemical Society, 1981. Cap 9, p. 178-200.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. Dirección de Investigaciones, Coordinación de Agropecuaria. **Producción Agrícola Municipal**. Comunicación Social 2007.

KINSELLA, J.E.; SHETTY, K. J. **Chemical Modification for Improving Functional Properties of Plant and Yeast Proteins**. In: Functionality and Protein Structure. Pour-EI, A. (Ed.) ACS Symposium Series 92. American Chemical Society, Washington, D.C. 1979.

KUNSHENG, Z., YANGYANG, L., YUNXIA, R.; Research on the phosphorylation of soy protein isolate with sodium tripoly phosphate. **Journal of Food Engineering** 79 2007. p. 1233-1237

LI, LITE., **The process and applications of soybean**. Beijing. 2002

LICHTENSTEIN, A. H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *Nutr.*, v. 128, n. 10, p. 1589-1592, 1998.

LIENER, I.E., Implications of antinutritional components in soybean foods. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1994. V. 34 (1): 31 – 67.

LIGHT, A. **Proteins, Structure and Function**. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. 1974.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. p.532.

MACHADO, F., QUEIRO, J., OLIVEIRA, M., PIOVESAN, N., PELUZIO, M., COSTA, N. M. B., MOREIRA, M. Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. **Food Chemistry** 107. 2008 p. 649–655.

Mc WATTERS, K., CHERRY, J., Protein Functionality in Foods. Emulsification: Vegetable Proteins. **American Chemical Society**. 1981. Cap 11, p. 217-242

MESSINA, M.; MESSINA, V. The second golden age of nutrition: **Phytochemicals and disease prevention**. In: Food Phytochemicals for cancer prevention I, 1994. p.382-387.

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.

MULLER, L. Taxonomía e morfologia. In: **A soja no Brasil**. Miyasaka, S. e Medina, JC, Eds. Instituto de Tecnologia de alimentos. Campinas. SP, Cap. III, 1981. 1062p.

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

MUSTAKAS, G., BAKER, E., Heat Inactivation of Trypsin Inhibitor, Lipoxigenase and Urease in Soybeans: Effect of Acid and Base Additives. **Journal of the American Oil Chemists Society**. 1973. Vol. 50, Nº5, p.137-141.

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. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Vol.1. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 294p.

PEARSON, A.M. Soy proteins. In: HUDSON, B.J.F. **Developments in food proteins – 2**. London: Applied Science Publisher LTD, 1983. v.1, cap.2, p.339.

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

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.

SMITH, A.; CIRCLE, S. **Soybeans: Chemistry and technology**. Volume 1 Proteins, AVI Publishing Company, INC. Westport, Connecticut. 1895, 470p.

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.

TAKAHASHI, Y., TAKASHI, I., Effects of soy protein and isoflavone on hepatic fatty acid synthesis and oxidation and mRNA expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor γ in adipose tissues of rats **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Volume 19. Issue 10, October 2008. p.682-693.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE- USDA. **World agricultural production**. www.usda.gov January 2008.

VAN, H. **Physical Biochemistry**. Prentice-Hall, INC., Englewood Cliffs, N.J. Foundations of modern biochemistry series. 1971. 475p.

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

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

WOLF, W., Legumes: Seed Composition and Structure, Processing into Protein Products and Protein Properties. In: Food Proteins. Whitaker, J.R. Tannenbaum, S.R., eds. AVI Publishing Company. Westport. 1977. 602p.

YATSUMATSU, K., TODA, T., WADA, T., MISAKI, M., ISHII, K., Studies on the functional properties of food grade soy bean products. Part III. Properties of heat coagulated gels from soybean products. **Agric. Biol. Chem.** 1972. 36: 537.

CAPITULO 2

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTÉICA DO ISOLADO PROTÉICO DE SOJA MODIFICADO

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são moléculas essenciais para os organismos animais, portanto devem estar presentes na alimentação em quantidades adequadas. Deve-se levar em conta não só o aspecto quantitativo mas também o aspecto qualitativo, isto é, seu valor nutricional, que dependerá de sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade e de fatores antinutricionais.

Ao se fazer a recomendação de proteína para diferentes grupos populacionais, além da composição de aminoácidos, devem ser consideradas a quantidade total de nitrogênio e a digestibilidade da mistura protéica. Uma mistura protéica de boa qualidade ou de alto valor biológico é aquela que fornece boa digestibilidade, quantidades adequadas de aminoácidos essenciais e de nitrogênio total (PIRES et. al. 2006).

A qualidade protéica da soja refere-se à sua capacidade de satisfazer as necessidades nutricionais do homem em aminoácidos essenciais e nitrogênio não-essencial, para fins de síntese protéica (FAO/WHO, 2007)

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade protéica do isolado protéico de soja modificado, em comparação ao isolado protéico de soja comercial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Métodos para avaliar a qualidade protéica

As características utilizadas para avaliar qualidade de proteína são a relação de eficiência protéica, digestibilidade, valor biológico, utilização protéica líquida, escore químico de aminoácidos e escore químico corrigido pela digestibilidade protéica. Este último é determinado, parte quimicamente analisando a composição de aminoácidos, e parte por meio de ensaio biológico empregando a digestibilidade verdadeira.

2.1.1 Coeficiente de eficiência protéica (PER)

Esta característica determina a capacidade de uma proteína promover o crescimento de ratos recém-desmamados. Representa a relação de ganho de peso relacionado à quantidade de proteína consumida. A relação de eficiência protéica (PER) é ainda utilizada frequentemente como medida biológica para determinar a qualidade de proteínas. Os valores de PER são determinados em testes com ratos, em que os animais são alimentados com uma dieta contendo uma ração de cerca de 10% de proteínas. O PER é o valor do crescimento de ratos em gramas por grama de proteína ingerida. Esse valor encontrado é comparado ao de uma proteína de referência, normalmente a caseína bovina. PER >2,0 indica proteína de alta qualidade; entre 1,5-2,0, qualidade intermediária; e PER <1,5, baixo valor nutricional (FRIEDMAN, 1996).

Suas principais desvantagens são: sua baixa precisão e exatidão e o fato de que ele só considera as necessidades para o crescimento, desprezando as necessidades nutricionais para a manutenção ou prevenção da perda de peso (HERNÁNDEZ et al. 1996).

Sabe-se que a necessidade de aminoácidos sulfurados dos ratos é muito maior que a dos seres humanos. Assim, os ensaios com esses animais superestimam o valor de algumas proteínas de origem animal para seres humanos, subestimando o valor de proteínas vegetais. Além disso, o PER não considera a proteína utilizada para manutenção do organismo desde que uma proteína pode não propiciar o crescimento dos ratos e ter PER próximo de zero, embora seja uma fonte adequada para fins de manutenção do organismo (NIELSEN, 1998).

2.1.2 Razão protéica líquida (NPR)

Este método constitui uma modificação do PER e acrescenta ao ganho de peso do grupo com dieta protéica a perda de peso de um grupo com dieta aprotéica. O NPR é determinado no 14º 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 o método de Bender e Doell (1957). Essa soma de perda de peso elimina possíveis erros ocorridos nos valores de PER decorrentes de variações nos teores de proteína na dieta.

2.1.3 Escore químico de aminoácido (EQ)

Trata-se de uma técnica química considerada rápida, consistente e barata. Esse índice determina o conteúdo de aminoácidos presentes em uma fonte de proteínas e compara os valores obtidos com os de uma proteína ideal tendo como referência as necessidades de crianças entre 2 e 5 anos de idade, segundo FAO/WHO (2007).

As necessidades de aminoácidos para a alimentação foram estimados pela Food and Agriculture Organization/World Health Organization (2007) e estão apresentados na Tabela 1 juntamente com a composição em aminoácidos de farinha de soja, concentrado protéico de soja e isolado protéico de soja.

Tabela 1 – Composição em aminoácidos (mg/g proteína) de produtos protéicos de soja.

Aminoácidos essenciais	Farinha de Soja ^b	Concen- trado protéico de soja ^b	Isolado protéico de soja comercial ^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+tirosi na	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

^aFonte: FAO/WHO (2007).

^bFonte: Adaptado de ENDRES (2001).

A qualidade da proteína é avaliada com base no aminoácido essencial limitante. Valores de EQ maiores que 1,0, indicam fontes protéicas de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades para a dieta de humanos.

2.1.4 Escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS)

A quantidade de aminoácidos essenciais, a digestibilidade protéica e a biodisponibilidade dos aminoácidos são índices usados para determinar a qualidade de proteínas. Entretanto, em 1991 foi realizada uma consulta pela FAO/WHO com especialistas em avaliação de qualidade de proteína para revisar métodos usados na determinação da qualidade de proteínas. Determinou-se que o método de escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS) era o mais satisfatório para avaliação de qualidade de proteínas para humanos, sendo, então, indicada a sua adoção como método oficial em nível internacional. A validade desse método foi endossada oficialmente por FAO/WHO, em 2001, e é a medida atualmente aceita para avaliar a qualidade de proteína.

De acordo com esse método, as proteínas de soja têm apresentado qualidade semelhante às proteínas de origem animal (Tabela 2).

Tabela 2 – 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).

Esse método consiste em adicionar ao escore químico mais um componente, que é a digestibilidade protéica. A digestibilidade protéica corrigida pelo escore químico de aminoácido (PDCAAS) é definida como a relação entre o conteúdo do primeiro aminoácido limitante na proteína (em mg/g), e o conteúdo daquele aminoácido em uma

proteína de referência (mg/g), multiplicado pela digestibilidade verdadeira. São recomendadas como padrão as necessidades de aminoácidos essenciais para crianças entre 2 e 5 anos de idade, segundo FAO/WHO (2007). Valores de PDCAAS maiores que 1,0 são considerados de fonte protéica de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades da dieta de humanos.

2.1.5. Digestibilidade protéica (D)

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

A digestibilidade da proteína é determinada em função da fração do nitrogênio ingerido e aquele que aparece nas fezes. Considera-se a digestibilidade, assim calculada, como aparente, por não levar em conta o nitrogênio endógeno, eliminado nas fezes como resultado da descamação do tubo digestivo, dos sucos e das secreções da microbiota intestinal, algumas enzimas digestivas, que se constituem em perdas inevitáveis de nitrogênio, o chamado nitrogênio endógeno (DARRAGH, A et al. 2000). Assim, para determinar a digestibilidade verdadeira é necessário corrigir a quantidade de nitrogênio fecal excretado quando o indivíduo consome uma dieta livre de proteína (FAO/WHO, 2007).

Segundo Mitchel (1923), a qualidade protéica é a quantidade de nitrogênio que o organismo é capaz de reter a partir da proteína consumida. Bodwell et al. (1980) usaram digestibilidade *in vitro* para estimar a digestibilidade verdadeira de diversas fontes de proteínas. Para a maior parte das fontes estudadas, houve boa correlação quando se comparou a digestibilidade *in vitro* com a digestibilidade verdadeira.

Para avaliar a qualidade nutricional de uma proteína, é importante conhecer a sua composição aminoacídica e a biodisponibilidade dos aminoácidos presentes nessa proteína. A biodisponibilidade dos aminoácidos de uma proteína é a medida dos aminoácidos absorvidos que serão utilizados na síntese protéica (FAO/WHO, 2007).

Digestibilidade protéica é definida como a porcentagem da proteína ingerida que vai ser absorvida pelo organismo, o que está relacionado com a biodisponibilidade de

aminoácidos. Digestibilidade da proteína é condicionante da qualidade protéica, pois dado aminoácido pode estar presente na proteína, mas não estar necessariamente disponível para o organismo. Assim, proteínas não podem ser utilizadas pelo organismo sem serem digeridas por este. Vários interferem na digestibilidade, dentre estes se incluem a presença de componentes biologicamente ativos, tratamento térmico e estrutura química da proteína. Esses fatores afetam a digestibilidade da proteína diminuindo a sua hidrólise, tornando os aminoácidos menos disponíveis para serem absorvidos pelo organismo (LIU, 1997).

A digestibilidade das proteínas é considerada um fator limitante de sua qualidade. Os alimentos de origem animal apresentam maior digestibilidade do 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, obtenha-se maior absorção dos nutrientes (FAO/WHO, 2007). Fatores intrínsecos como os fatores antinutricionais e a estrutura protéica, e fatores extrínsecos como tratamento térmico e processo de purificação afetam a digestibilidade da proteína. Isto explica os diferentes níveis de digestibilidade para cada produto: isolado protéico de soja 93% a 97%, farelo desengordurado de soja 84% a 90%, farelo integral de soja 75% a 92% (BRESSANI, 1989)

2.2 Fatores que afetam a qualidade nutricional das proteínas

Os principais agentes responsáveis pela alteração das propriedades das proteínas em alimentos são: tratamentos térmicos, formação de complexos com carboidratos, lipídios e compostos fenólicos, acidez ou alcalinidade elevadas, além da presença de fatores antinutricionais (SGARBIEIRE, 1996).

Segundo TORRE et al. (1991), sob condições fisiológicas, o ácido fítico é fortemente ionizado e capaz de interagir extensivamente com proteínas e íons metálicos. Muitos desses complexos são insolúveis e biologicamente indisponíveis para seres humanos em condições fisiológicas normais. Os taninos (fenóis condensados) são considerados potentes inibidores de enzimas devido à sua complexação com elas.

A grande tendência dos taninos em formar complexos com proteínas em vez de carboidratos e outros polímeros pode explicar a baixa digestibilidade das proteínas das leguminosas, inibição do crescimento e aumento da excreção de nitrogênio fecal em animais (KAUR; KAPOOR, 1992).

Os inibidores são substâncias antinutricionais que se encontram distribuídos em alimentos de consumo habitual. Estão amplamente distribuídos na natureza, encontrando-se tanto em alimentos de origem vegetal quanto de origem animal.

Os inibidores de proteases são considerados os principais fatores responsáveis pela diminuição da digestibilidade de proteínas, pois estes inibem a ação das enzimas tripsina e quimotripsina que agem sobre a hidrólise das proteínas da dieta. Tal efeito é evidenciado pela relação entre o aumento da qualidade protéica, medida pelo PER, em ratos alimentados com soja tratada termicamente, cujos inibidores de proteases foram inativados (LIU, 1997).

O valor nutricional das proteínas é aumentado pelo processamento térmico, especialmente pelo calor úmido. Isso decorre, provavelmente, da desnaturação das proteínas e dos fatores antinutricionais de natureza protéica, já que para exercer os seus efeitos biológicos *in vivo* esses fatores precisam manter a sua integridade estrutural. Além disso, o aumento do valor nutricional pode ser resultante de maior acessibilidade das proteínas ao ataque enzimático, devido à desnaturação térmica. O processo térmico deve garantir suficiente inativação dos fatores antinutricionais e ao mesmo tempo, prevenir a degradação de aminoácidos essenciais (POEL et al. 1990).

O processamento dos alimentos pode envolver o uso de calor, agentes oxidantes (como peróxido de hidrogênio), solventes orgânicos, álcalis e ácidos, com o objetivo de melhorar sabor, textura, propriedades funcionais e sensoriais, além de inativar fatores antinutricionais. Esses tratamentos, entretanto, podem levar à formação da reação de Maillard, oxidação de aminoácidos sulfurados e ligações cruzadas entre peptídeos, diminuindo, assim, a qualidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais (CHEFTEL, 1979).

A reação de Maillard, que ocorre entre aminoácidos e açúcares redutores, é a principal responsável para reduzir a biodisponibilidade de alguns aminoácidos como a Lisina durante tratamento térmico em meio alcalino (FAO/WHO, 2007).

Sarwar (1997) modificou um isolado protéico de soja por tratamento alcalino e verificou efeito negativo sobre a digestibilidade, encontrando valores de 96% para o isolado protéico comercial e 68% para o modificado.

Outro fator que compromete a qualidade das proteínas, especialmente as de leguminosas, é a limitação dos aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína. A metionina é considerada um aminoácido limitante do valor biológico das proteínas de leguminosas, por ser nutricionalmente essencial para o organismo humano. A cisteína, apesar de não constituir um aminoácido essencial, tem a metionina como intermediário na biossíntese, tornando, assim, esse aminoácido ainda mais limitante (SGARBIERI, 1996).

2.3 Digestão e absorção em mamíferos monogástricos

Uma alternativa para testar a digestibilidade de proteínas na dieta é o uso de modelos animais. O uso de modelos animais também permite maior flexibilidade e controle das condições do experimento. Embora ratos e camundongos sejam tradicionalmente usados para a determinação da qualidade protéica, o suíno tem sido reportado como uma alternativa mais adequada para pesquisas de digestibilidade de proteínas em humanos (DARRAGH et al. 2000).

A anatomia gastrointestinal, fisiologia e metabolismo do suíno é muito similar ao humano, acrescentando que ambos são monogástricos, mamíferos e onívoros (MOUGHAN et al. 1994). Pesquisas confirmam que a digestibilidade de aminoácidos em suínos e humanos mostraram pouca diferença o que valida o uso de suínos como modelo animal para estudos de digestibilidade de proteínas em humanos (DARRAGH et al. 2000).

O sistema digestivo de todo mamífero recém nascido é naturalmente adaptado ao leite materno. FERREIRA et al. (1988) afirmam que no caso do porco, a troca do leite de porca por outro tipo de leite e outro sistema de alimentação no caso de desmame precoce, pode associar-se a distúrbios gastrointestinais e depressão de crescimento.

Em virtude de suas características nutricionais, a soja é usada como ingrediente em diversas formulações alimentícias. Segundo MURAD (1993), há alguns problemas relacionados com a absorção e digestão dessa proteína no trato gastrointestinal de leitões em fase de aleitamento, fato que decorre da inadequação do sistema enzimático digestivo do suíno, nessa idade, à proteína de soja.

O tipo de coágulo formado no estômago pode estimular, de maneira diferente, a atividade das enzimas proteolíticas, gástricas e pancreáticas (DECUYPERE, et al. 1981), por esse motivo é essencial a formação adequada do coágulo para que a passagem do leite pelo estômago permita uma ação mais eficiente das enzimas. Segundo SGARBIERRI, et al. 1987 citado por MURAD 1993, deve-se proporcionar um retardamento da passagem do leite pelo estômago. Esse maior tempo de passagem permite que a proteína e a gordura sejam lentamente digeridas no intestino delgado prevenindo sobrecarga intestinal e crescimento bacteriano (DECUYPERE, et al. 1981).

FERREIRA et al. (1988) verificaram o desaparecimento de ingesta no estômago e duodeno e observaram a formação de coágulos em virtude da ingestão de leites de porca e de vaca e de substituto de leite obtido a partir do isolado protéico de soja. Os resultados obtidos indicaram que o leite de porca favoreceu a formação de coágulo macio e fragmentado no estômago, o qual é esvaziado rapidamente, a diferença dos coágulos densos e duros formados no estômago e intestino de leitões que consumiram leite de vaca, os quais foram solubilizados lentamente e digerido no intestino delgado. Finalmente a proteína de soja modificada favoreceu a formação de coágulo macio, e intensamente fragmentado, confirmando assim o relatado por MURAD (1993). Também notaram que as fezes dos animais que receberam leite de vaca eram mais duras, e que as fezes dos animais que receberam isolado protéico de soja eram mais macias do que as que foram alimentados com leite de porca.

O coágulo parece ter função de armazenamento, em que a proteína e a gordura seriam lentamente digeridas no intestino delgado, prevenindo sobrecarga intestinal e aumento da carga bacteriana (DECUYPERE et al. 1981).

Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 pode se observar que a formação de coágulo para o leite de porca e de vaca foi mais compacta e menos fragmentada que os de substituto de leite. Nesses, o obtido a partir do isolado protéico modificado apresentou forma de coágulo mais compacta que o obtido pelo isolado protéico comercial.

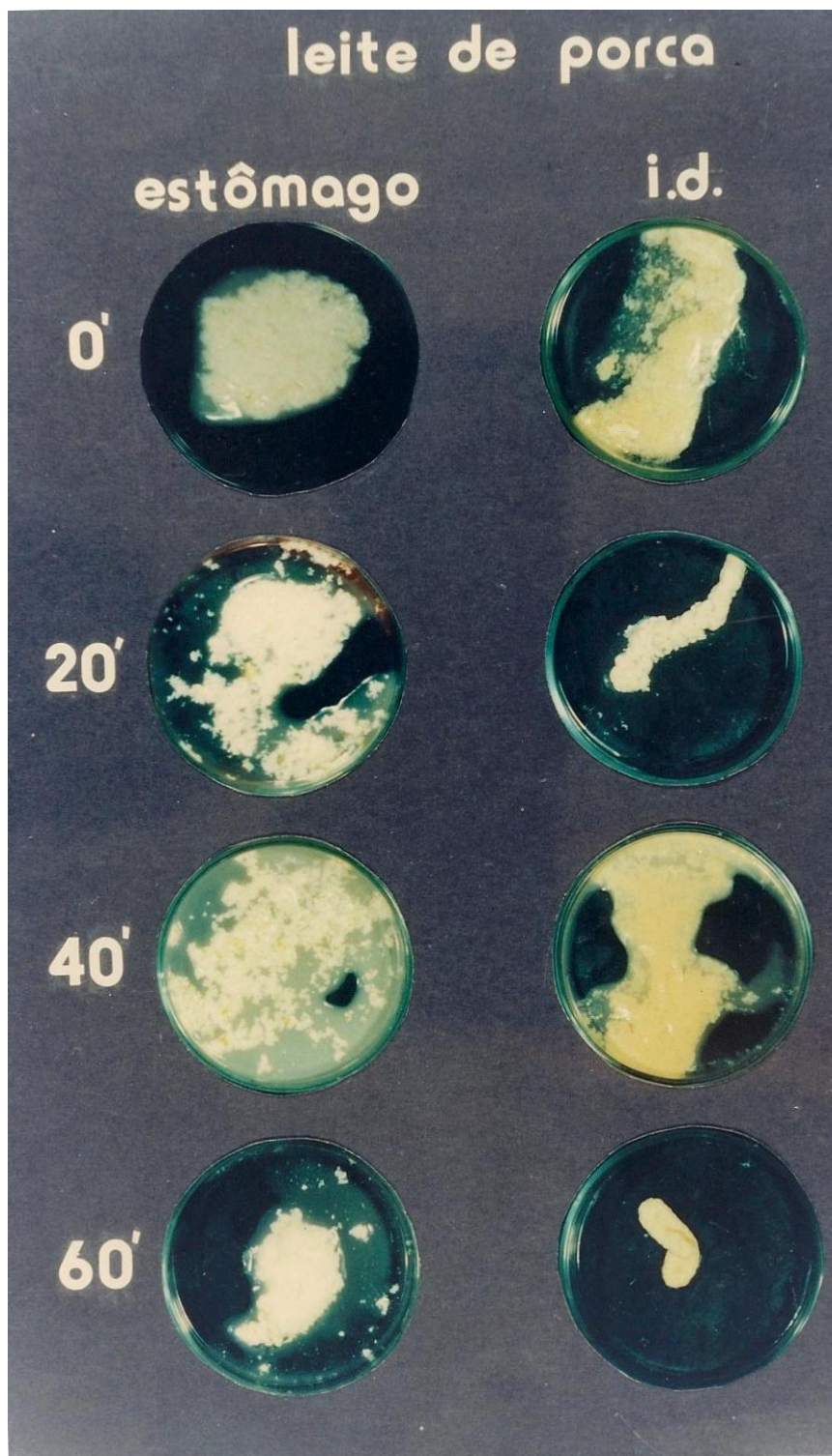


Figura 1 - Coágulos no estômago e no intestino delgado (i.d) de leitões com 14 dias de idade, 0, 20, 40 e 60 minutos após a ingestão de leite de porca.

Fonte: MURAD (1993)

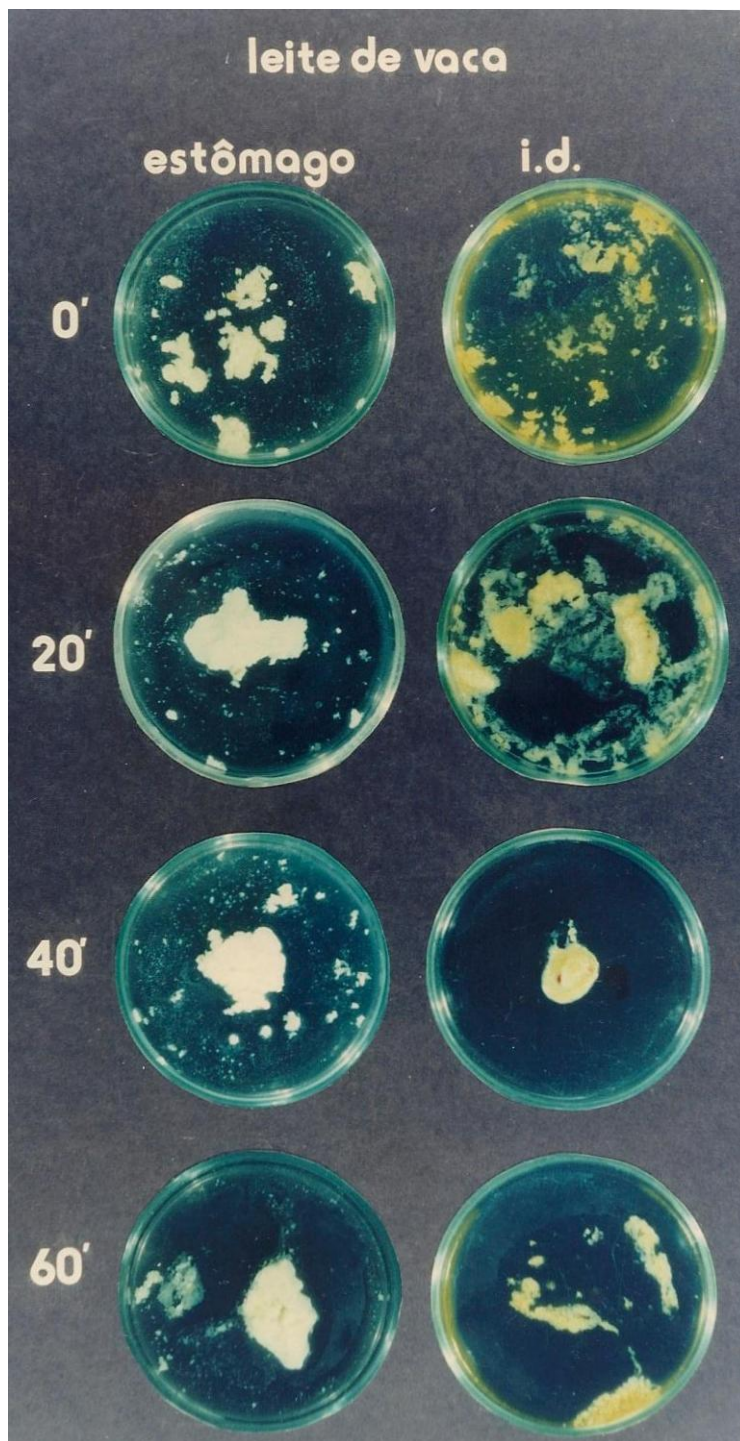


Figura 2 - Coágulos no estômago e no intestino delgado (i.d) de leitões com 14 dias de idade, 0, 20, 40 e 60 minutos após a ingestão de leite de vaca.

Fonte: MURAD (1993)

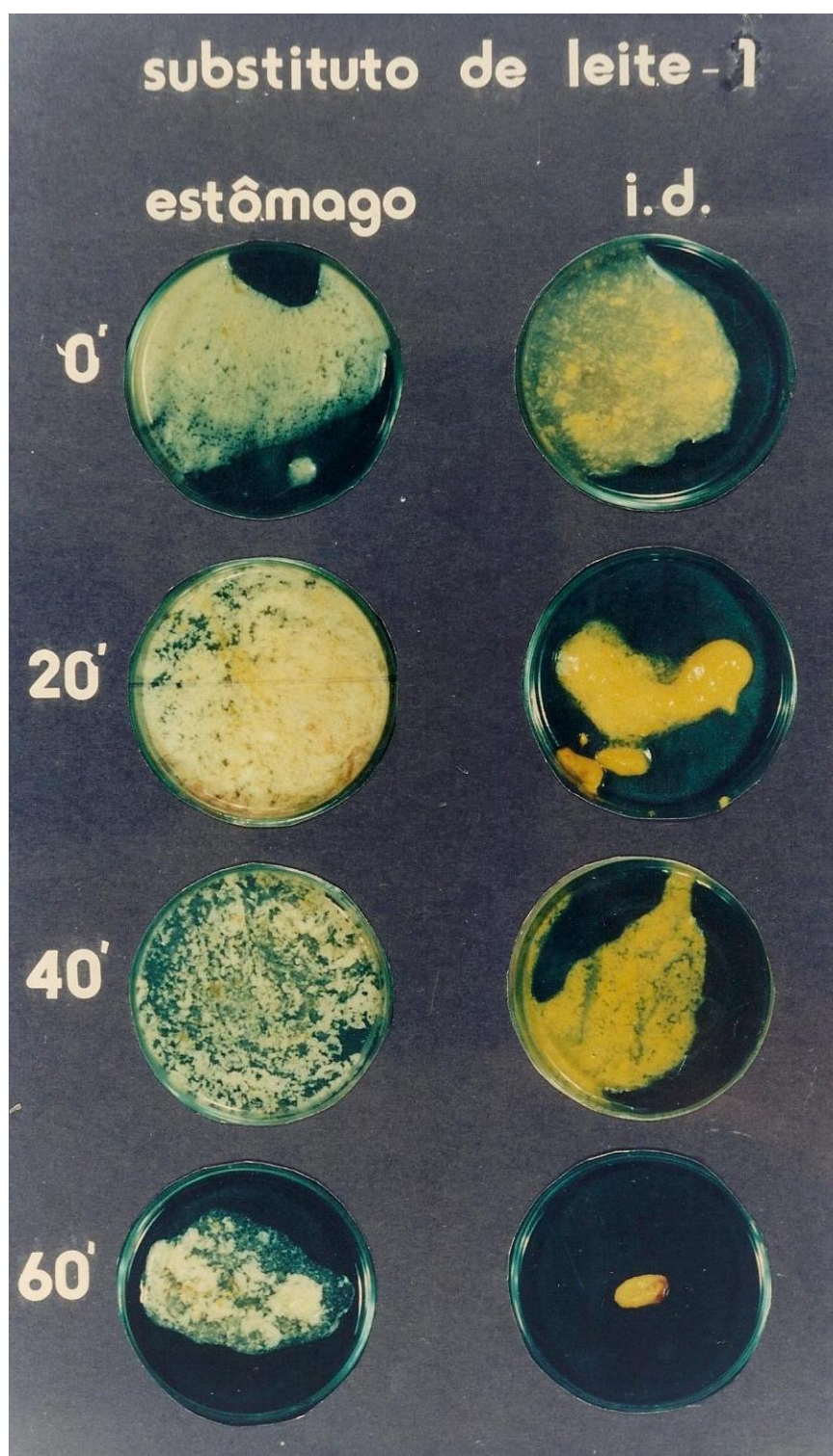


Figura 3 - Coágulos no estômago e no intestino delgado (i.d) de leitões com 14 dias de idade, 0, 20, 40 e 60 minutos após a ingestão de substituto de leite obtido a partir de proteína isolada de soja modificada.

Fonte: MURAD (1993)

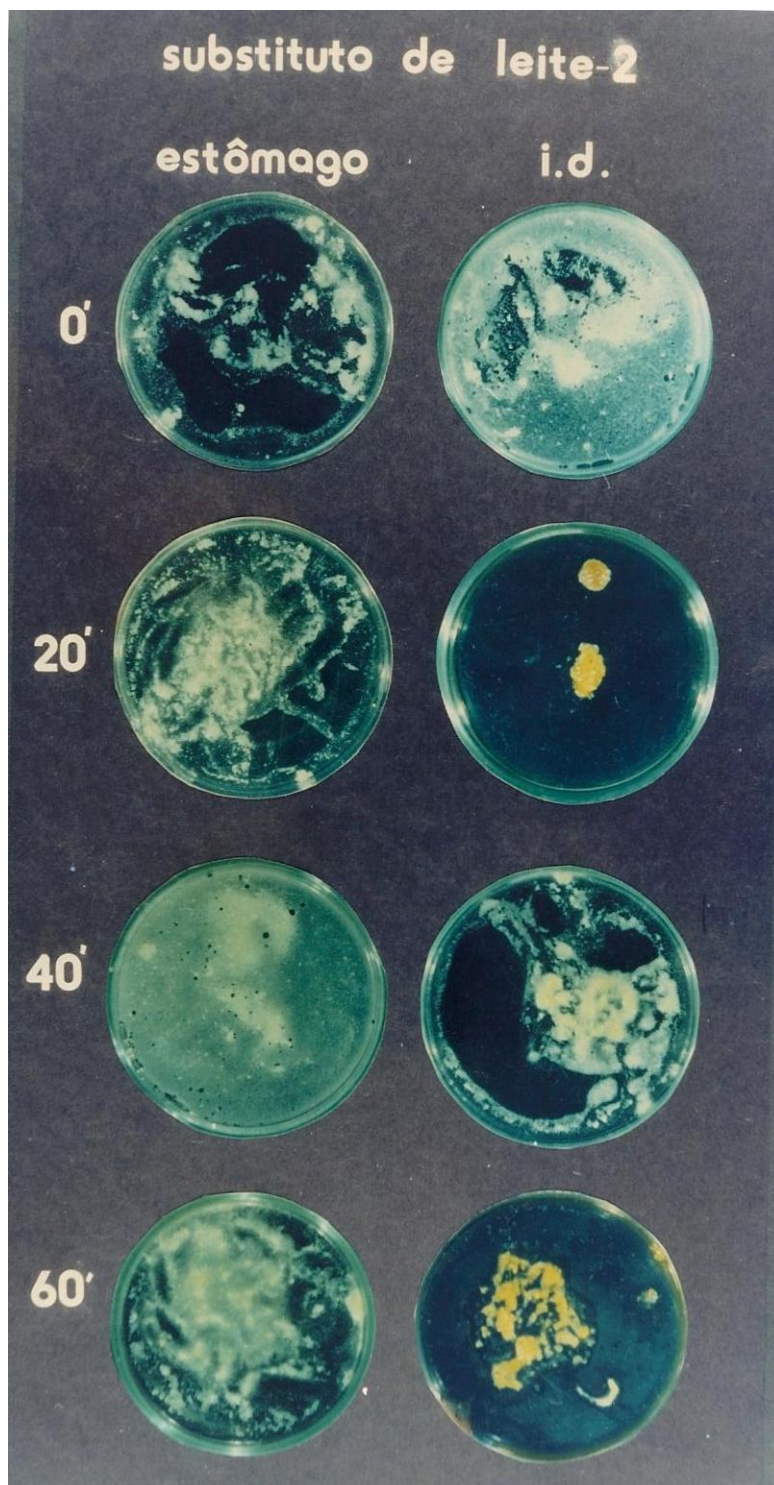


Figura 4 - Coágulos no estômago e no intestino delgado (i.d) de leitões com 14 dias de idade, 0, 20, 40 e 60 minutos após a ingestão de substituto de leite obtido a partir de proteína isolada de soja comercial.

Fonte: MURAD (1993)

2.4 Alergia alimentar

2.4.1 Alergia de proteínas

A alergia alimentar é uma reação do sistema imunológico do corpo frente a proteínas, com a formação de anticorpos nas células brancas do sangue (CORDLE, 2004). O sistema imunológico combate os invasores estranhos ao corpo por meio dos anticorpos. Quando esses invasores são bactérias e vírus perigosos, a resposta imunológica é necessária e desejável. No caso da alergia às proteínas do leite, por outro lado, a resposta imunológica seria desnecessária, além de causar diversos problemas (BRANDÃO, et al. 2008).

A alergia é causada em crianças por proteínas que não existem normalmente no leite humano e que são introduzidas na nova alimentação do bebê. Segundo ROZENFELD et al. (2002), a caseína, a β -lactoglobulina e a α -lactalbumina do leite de vaca são apontados como os agentes mais freqüentemente envolvidos nas reações alérgicas.

A alergia é causada pelas imunoglobulinas E (IgE), em resposta à presença destas proteínas consideradas como antigênicas pelo sistema imunológico das crianças. A IgE causa liberação de substâncias vaso-ativas por alguns tipos de células (BRANDÃO et al. 2008).

A alergenidade à caseína bovina já foi demonstrada, já que 92% de pacientes alérgicos apresentaram um aumento da IgE no sangue (BERNARD et al. 2000).

O uso exclusivo do leite humano até aos seis meses de vida, reduz significativamente a incidência cumulativa de alergia ao leite de vaca, durante os primeiros 18 meses de vida. A alergia ao leite de vaca é uma das alergias mais comuns em crianças, talvez porque o leite de vaca usualmente é o veículo para a primeira proteína estranha ser introduzida no estômago das crianças (BRANDÃO et al. 2008).

É muito difícil apresentar um número preciso da ocorrência da alergia do leite, mas estima-se que cerca de 0,3 a 7,5 % dos infantes apresentam alergia às proteínas do leite (WILSON, 2005).

Nos adultos, a alergia pode ser considerada rara, parecendo ser mais comum em mulheres. Entretanto, pessoas de todas as idades podem apresentar alergia às proteínas do leite de vaca pela primeira vez, desde a adolescência até a idade adulta.

Embora o leite de vaca esteja envolvido com problemas de alergia, cerca de 50% das crianças apresentam alergia simultânea às proteínas de outros alimentos, incluindo ovos, soja, amendoim, achocolatados, laranja, peixes e trigo. Cerca de 50 a 80 % das crianças que apresentam alergia ao leite também podem apresentar alergia a inalantes alergênicos, como pólen, pêlos (de gato, por exemplo), mofo, poeira de carpetes etc. (CORDLE, 2004).

A alergia surge basicamente em razão de dois fatores: predisposição genética (do pai ou da mãe) e introdução de alimentos potencialmente alergênicos antes dos seis meses de vida. Quando nascem, os bebês têm um sistema imunológico imaturo e dependem muito dos anticorpos do leite da mãe. O sistema digestivo não está preparado para substâncias que não venham do leite da mãe.

A alergia está relacionada com a permeabilidade do intestino delgado às proteínas (ou peptídeos alergênicos) durante os primeiros meses de vida. Pequenas quantidades de proteínas dos alimentos podem ainda ser absorvidas por meio do intestino, durante a infância, e provocar alergias.

Geralmente, mais de um sistema do corpo está envolvido nas reações alérgicas. Os sintomas gastrointestinais são os mais comuns.

2.4.2 Alergia aos produtos de soja

CORDLE (2004) pesquisou a alergenidade da soja e comprovou que tem uma atividade imunológica menor em comparação com as outras fontes proteicas estudadas (leite de vaca, ovo, trigo e amendoim), indicando-a como uma boa alternativa ao leite de vaca, mas nesta mesma pesquisa, o autor confirmou, ademais, que crianças que tem alergia ao leite de vaca desenvolvem também, com o tempo, alergia à soja. Pesquisas mostram que 1 de cada 10 crianças desenvolveu alergia à soja após de ter alergia ao

leite de vaca. KLEMOLA et al. (2002) observaram que a intolerância à soja ocorreu em 10 a 35% de crianças com alergia ao leite de vaca.

A maioria dos estudos mostraram maior sensibilidade à proteína da soja em crianças sensíveis à proteína do leite de vaca. A maior permeabilidade da mucosa intestinal conseqüente à reação de hipersensibilidade ao leite de vaca permite aumentar a captação do antígeno da soja aumentando a resposta imune (MURARO et al. 2002).

Segundo LIU (1997), o tratamento térmico pode eliminar a maioria dos componentes responsáveis pela reação imunológica, mas alguns componentes da proteína de soja, que tem forte atividade alergênica, podem ser resistentes ao aquecimento e outros processamentos. Conseqüentemente, esses componentes também podem ser resistentes à digestão, ou seja, serem resistentes às enzimas proteolíticas, ácidos, sais biliares e, portanto, permanecerem intactos ao longo do estômago e intestino, e induzir reações adversas em alguns humanos e animais.

KLEINE-TEBBE et al. (2002) descreveram que dezesseis sítios alergênicos foram encontrados na soja. Dentre eles, as proteínas de 68, 30 e 28-kDa são aquelas que apresentaram maior alergenicidade.

A proteína majoritária da soja pertence ao grupo das globulinas (aproximadamente 90%) principalmente por duas globulinas termoestáveis: a β -conglucina e glicina, que são consideradas as principais frações alergênicas da soja. 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).

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).

Segundo HENRIQUES (2007), o fato de a proteína da soja ser antigênica, não significa que seja obrigatoriamente alergênica. Ele indica 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, controlado com placebo. 14% 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.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio biológico foi conduzido no Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para avaliar a qualidade protéica dos isolados protéicos de soja, utilizaram-se métodos biológicos: Digestibilidade verdadeira (D), Coeficiente de eficiência protéica (PER) e coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR).

3.1 Animais

Para este ensaio foram utilizados 24 ratos machos da raça Wistar, recém-desmamados, com média de 21 dias de idade, peso variando de 50-60 g. Os animais foram divididos em quatro grupos de seis (Figura 5) de modo que a média dos pesos entre os grupos não excedesse a cinco gramas, conforme recomendação da ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1984). Um grupo de animais recebeu dieta-padrão de caseína, outro dieta aprotéica e os outros dois receberam as dietas experimentais com isolado protéico de soja modificado (IPM) e isolado protéico de soja comercial (IPC).

Os ratos foram distribuídos em gaiolas individuais e mantidos em ambiente de temperatura controlada ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$), onde receberam água e dieta experimental *ad libitum* por um período de 14 dias. O monitoramento do consumo alimentar foi feito aos 7 dias e no final do ensaio.

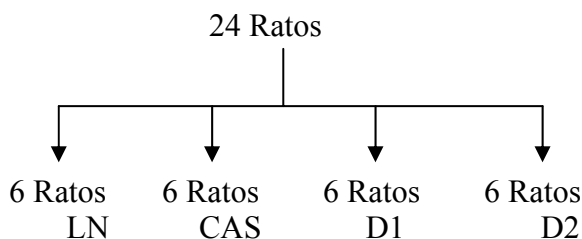


Figura 5 - Esquema experimental do ensaio biológico

LN = Dieta livre de nitrogênio

CAS = dieta-padrão de caseína

D1 = Dieta de isolado protéico de soja modificado (IPM)

D2 = Dieta de isolado protéico de soja comercial (IPC)

3.2 Preparo das dietas

A composição das dietas foi baseada na AIN-93G, segundo Reeves et al. (1993), com o teor de proteínas entre 9 a 10%. Após o preparo, foi determinada a concentração protéica de cada dieta, pelo método semimicro-Kjeldahl, usando-se o fator 6,25 para a obtenção do teor de proteína. As dietas com concentração de proteína fora da faixa estipulada foram corrigidas e, posteriormente, acondicionadas em sacos de polietileno devidamente rotulados e armazenados em refrigerador a 4 °C.

Vitaminas e minerais foram acrescentados às dietas, suprimindo-se as exigências nutricionais dos animais de acordo com o AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (Reeves et al. 1993). (Tabela 4 e 5). Os teores de óleo de soja, amido de milho, fibra alimentar, amido dextrinizado e de sacarose foram ajustados de modo a obter dietas isocalóricas e isoprotéicas. A composição das dietas e os respectivos teores de proteínas obtidos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição base das dietas experimentais do ensaio biológico (g/100 g)

Ingredientes (g/100g)	Dietas			
	LN	CAS	D1	D2
Caseína	----	11,47	----	----
Isolado protéico modificado (IPM)	----	----	11,87	----
Isolado protéico comercial (IPC)	----	----	----	11,27
Amido dextrinizado	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja	7,0	7,0	7,0	7,0
Celulose microfina	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura mineral	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica	1,0	1,0	1,0	1,0
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho (q.s.p.)	59,75	48,28	48,16	19,82
Proteína (g/100g)	----	9,69	9,54	9,33
Calorias (kcal/100g)	394,8	394,8	394,8	394,8

Fonte: REEVES et al. (1993).

Tabela 4 – 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 manitol)	2,500
Vitamina E (all-rac-A-acetato de tocoferila: 500 UI/g)	15,00
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 5 – Composição da mistura de minerais (AIN-93G-MX)

Ingredientes	g/kg da mistura
Elementos minerais essenciais	
Carbonato de cálcio anidro (40,04%)	357,00
Fosfato de potássio monobásico (22,76% P; 23,73% K)	196,00
Citrato de potássio, tri-potássio, monohidrato (36,16% K)	70,78
Cloreto de sódio (39,34% Na, 60,66% Cl)	74,00
Sulfato de potássio (44,87% K; 18,39% S)	46,60
Óxido de magnésio (60,32% Mg)	24,00
Citrato de ferro (16,5% Fe)	6,06
Carbonato de zinco (52,14% Zn)	1,65
Carbonato de manganês (47,79% Mn)	0,63
Carbonato de cobre (57,47% Cu)	0,30
Iodato de potássio (59,3% I)	0,01
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 9 hidrato (9,88% Si)	1,45
Sulfato de cromo e potássio dodecahidratado (10,42% Cr)	0,275
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	221,026

Fonte: REEVES et al. (1993).

3.3 Determinação da digestibilidade verdadeira do IPM

Para a determinação da digestibilidade verdadeira, as dietas foram marcadas com carmin na proporção de 200 mg/100 g e oferecidas aos animais no 7º e 13º dias. As fezes foram coletadas do 8º ao 14º dia, correspondendo às fezes marcadas com carmin oferecidas no 7º dia e às fezes não-marcadas dos dias subsequentes. As fezes foram acondicionadas em recipientes individuais para cada rato e mantidas sob condições de refrigeração a 4 °C. Posteriormente ao período de coleta, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar mecânica a 105°C, por 24 horas, depois resfriadas em dessecador, pesadas e moídas em moinho de navalha, para posterior determinação do teor de nitrogênio. Para tal, foi utilizado o método semimicro Kjeldahl (AOAC, 1984)

A digestibilidade verdadeira foi calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a quantidade excretada nas fezes e a perda metabólica nas fezes que corresponde ao nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica. O valor da digestibilidade foi expresso em porcentagem, conforme recomendação da National Academy of Sciences (1963).

O cálculo da digestibilidade verdadeira (DV) foi efetuado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Digestibilidade verdadeira (DV)} = \frac{I - (F - F_K) \times 100}{I}$$

Em que:

I = nitrogênio ingerido pelo grupo-teste;

F = nitrogênio fecal do grupo-teste;

F_K = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

3.4 Determinação do coeficiente de eficácia protéica (PER) do IPM

O PER foi determinado no 14º dia, relacionando o ganho de peso dos animais com o consumo de proteína. O PER foi calculado com a seguinte equação:

$$\text{PER} = \frac{\text{ganho de peso do grupo-teste (g)}}{\text{proteína consumida pelo grupo-teste (g)}}$$

3.5 Coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR) do IPM

O NPR foi determinado no 14º 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 o método de BENDER & DOELL (1957). Foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso do grupo-teste (g)} + \text{perda de peso do grupo aprotéico (g)}}{\text{proteína consumida do grupo-teste}}$$

3.6 Delineamento experimental

Para o ensaio biológico se considerou um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro dietas (LN, CAS, D1, D2) e seis repetições, sendo cada rato uma repetição. As medias foram comparadas pelo teste de amplitude múltiplas de Duncan, em nível de 5% de probabilidade. Utilizou-se procedimentos do programa estatístico SAS, para as análises estadísticas.

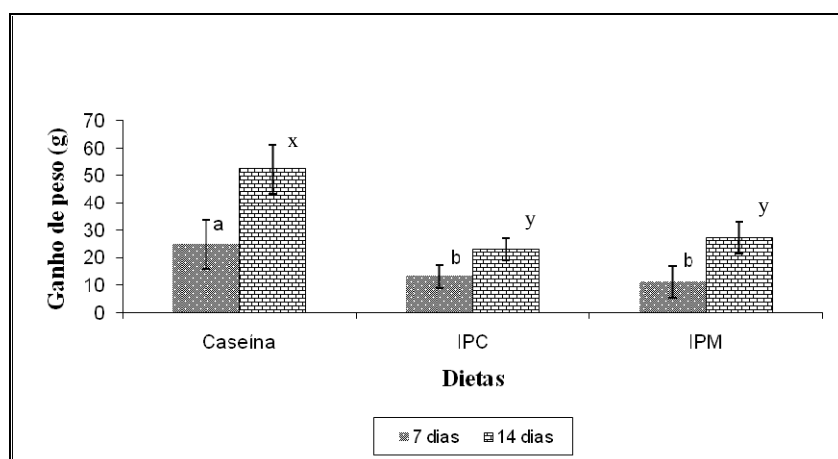
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ganho de peso (GP), Consumo alimentar (CA)

O ganho de peso dos animais não difiriu ($p>0,05$) entre os grupos recebendo IPM e IPC, entretanto foram inferiores à caseína (Figura 6). Não houve diferença ($p>0,05$) de ganho de peso e consumo alimentar (Figura 7) dentre os grupos que consumiram isolado proteico de soja no 7º e 14º dia de experimentação.

Na figura 6 está apresentada a evolução de peso dos ratos durante o experimento ao dia 7 e 14, se denota semelhança entre os produtos de soja em promover crescimento dos ratos.

Figura 6- Ganho de peso dos animais consumindo dietas de caseína bovina, isolado protéico modificado (IPM), isolado protéico comercial (IPC).



* Médias seguidas de mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

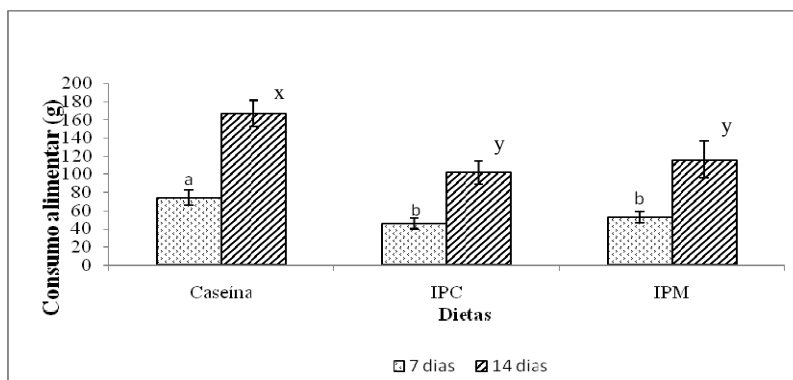


Figura 7- Consumo alimentar dos grupos experimentais recebendo dieta a base de caseína, isolado protéico de soja comercial (IPC) e isolado protéico de soja modificado (IPM) testadas.

4.2 Índices de qualidade protéica PER, NPR e Digestibilidade do IPM

A qualidade protéica dos isolados protéicos modificado e comercial foram similares segundo os índices biológicos PER e NPR (Tabela 6). Denota-se que os valores de NPR para IPC (3,63) e IPM (3,62) foram superiores aos valores de PER correspondentes (2,32 e 2,44 respectivamente) indicando que a proteína de soja tem um melhor desempenho para manutenção do que para o crescimento dos ratos.

Tabela 6. Media de PER, RPER, NPR e RNPR e Digestibilidade verdadeira (DV) de animais mantidos com dietas baseadas em isolado protéico de soja e caseína.

DIETA	PER*	RPER* ¹	NPR*	RNPR* ²	DV* ³
Caseína	3,23 a	100	4,01 a	100	94,1 ± 0,9 a
IPC	2,32 b	71,9	3,63 a	90,33	91,2 ± 2,7 b
IPM	2,44 b	75,73	3,62 a	90,07	90,8 ± 1,9 b

Os resultados são médias de 6 repetições.

* Médias seguidas de mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

¹ RPER = PER relativo à caseína;

² RNPR = NPR relativo à caseína.

³ DV = Digestibilidade Verdadeira

IPC: Isolado protéico comercial

IPM: Isolado protéico modificado

ROMAM & SGARBIERI (2005), encontraram um valor de 3,36 para o PER de uma caseína comercial com 91,98% de proteínas. Encontrou-se valores ligeiramente maiores para o PER de IPM que o de IPC, embora estes resultados não tenham sido significativos.

SIKKA et al. (1978) encontraram valores de NPR na faixa de 2,5 a 3,9, para proteínas de grãos de diferentes variedades de soja. SARWAR (1997) relatou o valor 3,7 para proteína isolada de soja, superior ao presente estudo.

FRIEDMAN (1996) considerou que geralmente, fontes de proteína com PER menor que 1,5 são 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 isolados protéicos são de boa qualidade.

Os valores de PER e NPR do isolado protéico modificado foram semelhantes ao encontrado por SARWAR (1997), PER (2,69) e NPR (3,66) para IPC, valores estatisticamente similares aos encontrado para o IPM (2,44 e 3,62 respectivamente) portanto, pode-se dizer que a metodologia empregada na modificação dos IPM não afetou a qualidade protéica, já que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

A digestibilidade da proteína (Tabela 6) para os produtos de soja foi menor 91,0 % que para a caseína (94,1%) ($p < 0,05$). De acordo com MAGA, et al. (1973), as proteínas da soja apresentam estruturas mais organizadas que a caseína, o que as tornam mais resistentes ao ataque enzimático; logo, proporcionam menor digestibilidade.

ROMAN&SGARBIERI (2005) relataram digestibilidade verdadeira de 93,78% para caseína comercial, próximo ao encontrado no presente trabalho (94,12%).

Os valores obtidos para digestibilidade entre os isolados protéicos modificado e comercial não diferiram ($p > 0,05$), entretanto inferior ao se comparar com o valor encontrado para a caseína ($p < 0,05$). As variações na digestibilidade podem ser devidas às diferenças intrínsecas da natureza das proteínas e à presença de fatores dietéticos (fibras, taninos e outros), que modificam a digestão e as reações químicas que alteram a liberação de aminoácidos e proteínas por processos enzimáticos (MONTEIRO et al. 2004).

5. CONCLUSÃO

O IPM apresentou valor de digestibilidade protéica, PER e NPR similares ao do IPC ($p>0,05$), evidenciando que o processo de modificação não alterou a qualidade da proteína do isolado protéico de soja.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS – AOAC **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14. ed. Washington, D.C.: 1984. p.1141

BENDER, A. E.; DOELL, B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal Nutrition**, v. 11, 1957. p. 138-143.

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, 2000. p.161-167.

BODWELL, C. E.; SATTERLEE, L. D.; HACKLER, L. R. Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by in vitro enzymic digestion methods. **American Journal Clinical Nutrition**. v. 33, 1980. p. 677-686.

BRANDÃO, S., MATEDI, M., CARDOSO, M., **Alergia e intolerância ao leite de vaca**. www.ufv.br Universidade Federal Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2008.

BRESSANI, R. Revisión sobre la calidad del grano de frijol. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 39, n. 3, p. 419-442, 1989.

CORDLE, C., Fifth International Symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease. Soy protein allergy: Incidence and relative severity. **American Society for Nutritional Sciences**. 2004, vol. 134, p.1213-1219.

CHEFTEL, J. C. Proteins and amino acids. In: TANNENBAUM, S. R. (Ed.). **Nutritional and safety aspects of food processing**. New York, NY: Marcel Dekkar, 1979. p. 153-215.

DARRAGH, A.; HODGKINSON, S.; Quantifying the digestibility of dietary protein. **American Society for Nutritional Sciences**. 2000. p. 1850-1855.

DECUYPERE, J. A., MEEUSEN, A., HENDERICK, H. K. Influence of the partial replacement of milk protein by soybean protein isolate with different physical properties on the performance and nitrogen digestibility of early-weaned pigs. **J. Anim. Sci.**, 53 (4): 1011-8, 1981.

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

FAO-WHO Technical report series. Protein and amino acid requirements in human nutrition. 2007. N° 935 p.265

FERREIRA, A., COSTA, P., GOMES, J.C., NEVES, M.T., 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. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**. 1988. vol.17, n. 3, p. 308- 315.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins form different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44. 1996. p. 6-29.

FAO/OMS. INFORME DE UNA REUNIÓN CONSULTIVA CONJUNTA FAO/OMS/UNU DE EXPERTOS. **Necessidades de energia y de proteínas**. Ginebra, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Protein quality evalution**. Rome, 1991. (FAO Food and Nutrition, Paper 51). 66 p.

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

HENRIQUES M. **Desenvolvimento e caracterização de um isolado protéico de soja modificado com perfil de solubilidade de caseína do leite humano**. Universidade Federal Viçosa. (Tese de Doutorado) 2007. 107p.

KAUR, J. R.; KAPOOR, A. C. Nutrient composition and antinutritional factors of rice and bean (*Vigna umbellate*). **Food Chem.**, v. 43, n. 22, 1992. p. 119-124.

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, 2002. p.797-804.

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. **Journal Pediatric.**, v.40, 2002. p.219-224.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. p.532.

MAGA, J.A.; LORENZ, K.; ONAYEMI, O. Digestive acceptability of proteins as measured by the initial rate of *in vitro* pteoteolisis. **Journal of Food Science** v.38, p. 173-174, 1973.

MITCHELL, H. A. A method of determining the biological value of proteins. **Journal Biology Chemistry**, v. 58, 1923. p. 873-922.

MONTEIRO, J.B.R; COSTA, N.M.B; ESTEVES, E.A; MILAGRES, K.; avaliação da qualidade protéica de dois formulados em pó, à base de soja enriquecidos com zinco, selênio e magnésio para utilização em nutrição enteral. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24(1): 006-010, jan.-mar. 2004

MOUGHAN, P. J., CRANWELL, P. D., DARRAGH, A. J. & ROWAN, A. M. The domestic pig as a model for studying digestion in humans. In: Digestive physiology in pigs. Proceedings of the Vth. International symposium on digestive physiology in pigs. EAAP Publication n° 80. Puduc, Wageningen, the Netherlands. p.389 – 396, 1994.

MURAD, A., **Desenvolvimento e caracterização química, funcional e biológica de um isolado protéico de soja modificado.** Dissertação Mestrado. Universidade Federal Viçosa. MG 1993, p.71.

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

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NAS-NRC. **Evaluation of protein quality.** Washington, D.C.: 1963. 74p.

NIELSEN, S. S. **Food analysis.** 2. ed. West Lafayette, Indiana, 1998.

PIRES, C., OLIVEIRA, G., ROSA, J., COSTA, N.M.B Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, 26 (1). Jan-mar. 2006. p. 179-187.

POEL, T. F. B.; BLONK, J.; ZUILICHEM, D. J.; OORT, M. G. Thermal inactivation of lectins and trypsin inhibitor activity during steam processing of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) and effects on protein quality. **Journal Science Food Agriculture**, v. 53, n. 2. 1990. p. 215-228.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C.Jr. 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. **Journal of Nutrition**, v. 123, 1993. p. 1939-1951.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. **Rev. Nutr.**, v. 18, n. 1, p. 75-83, 2005.

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.

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. **Journal of Nutrition**, v.127, 1997. p.758-764.

SGARBIERI, V.C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição – fator de saúde e desenvolvimento.** São Paulo: Almed, 1987. p. 250-261.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos.** São Paulo: Varela, 1996. p.517

SIKKA, K. C.; GUPTA, A. K.; SINGH, R.; GUPTA, D. P. Comparative nutritive value, amino acid content, chemical composition, and digestibility in vitro of vegetable- and grain-type soybeans. *J. Agric. Food Chem.*, v. 26, n. 2, p. 312-316, 1978.

TORRE, M.; RODRIGUES, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 1, n. 1. 1991. p. 1-22.

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

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.