



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NEUSA FÁTIMA SEIBEL

**CARACTERIZAÇÃO, FRACIONAMENTO E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DOS COMPONENTES DO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DA SOJA [*GLYCINE MAX* (L.)
MERRILL], FIBRAS DOS COTILÉDONES**

Londrina
2006

NEUSA FÁTIMA SEIBEL

**CARACTERIZAÇÃO, FRACIONAMENTO E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DOS COMPONENTES DO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DA SOJA [*GLYCINE MAX* (L.)
MERRILL], FIBRAS DOS COTILÉDONES**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Ciência de Alimentos, do Departamento de
Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da
Universidade Estadual de Londrina, como
requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Prof. Dra. Adelaide Del Pino
Beléia

Londrina
2006

NEUSA FÁTIMA SEIBEL

**CARACTERIZAÇÃO, FRACIONAMENTO E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DOS COMPONENTES DO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DA SOJA [*GLYCINE MAX* (L.)
MERRILL], FIBRAS DOS COTILÉDONES**

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Graciete Matioli

Dra. Lenita Brunetto Bruniera

Dra. Marta de Toledo Benassi

Dra. Sandra Helena Prudêncio

Orientadora - Dra. Adelaide Del Pino Beléia

Londrina, 16 de outubro de 2006.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Juliano e
aos meus pais Arno e Elide,
por todo o amor, carinho e
compreensão recebidos.

AGRADECIMENTOS

Especialmente à professora Adelaide pela orientação, carinho no momento que mais precisei, confiança depositada em mim e no meu trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao meu marido Juliano, por todo o seu amor e companheirismo, sua compreensão e ajuda psicológica.

A minha família, em especial aos meus pais e minha irmã pelo amor e compreensão recebidos, mesmo eles morando longe sempre estiveram perto de coração.

A todos que de uma ou de outra forma me ajudaram, em especial aos meus colegas Simone e Cláudio, pela ajuda na eletroforese, Lyssa por todos os artigos trazidos de Campinas e Carol pela “terapia”. Por estas e outras lindas amizades conquistadas nestes quatro anos, pois sei que serão para sempre.

Aos meus amigos que mesmo de longe sempre me passaram força e coragem para que eu alcançasse meu objetivo.

A todos os professores que sempre estavam à disposição no momento que eu precisei, em especial ao Fábio e à Marta e aos funcionários da UEL.

À indústria Solae Company de Esteio/RS pelo fornecimento da matéria-prima.

Ao CNPq pelo suporte financeiro, o qual foi imprescindível para a execução deste trabalho.

Às instituições UEL, EMBRAPA e Instituto de Botânica de São Paulo pelo apoio, através de seus laboratórios e equipamentos.

SEIBEL, Neusa Fátima. **Caracterização, fracionamento e hidrólise enzimática dos componentes do resíduo do processamento da soja [*Glycine Max* (L.) Merrill], fibras dos cotilédones**. 2006. 110f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2006.

RESUMO

Ingredientes derivados de soja, fibras de cotilédones, farinha desengordurada e concentrado protéico foram avaliados quanto às características químicas e propriedades funcionais. O macromineral de maior concentração foi o potássio e o micromineral foi o ferro em todos os ingredientes. O maior percentual de ácido fítico estava nas amostras protéicas, assim como as isoflavonas, no entanto, as fibras apresentaram mais genisteína e daidzeína e o total de isoflavonas correspondeu a 45% do valor encontrado na farinha. As fibras alimentares tiveram as melhores propriedades de hidratação e as propriedades relacionadas com o óleo foram similares à da farinha de soja, mesmo tendo menores percentuais de proteínas. A parede celular das fibras dos cotilédones de soja foi fracionada e o componente majoritário foi a hemicelulose, correspondendo a 55%, em média. Com a constituição dos monossacarídeos das frações houve a distinção de dois grupos: (1) celulose e (2) pectina e hemiceluloses. A classificação das proteínas foi baseada na solubilidade em diferentes solventes, a farinha desengordurada de soja apresentou a maior fração extraída com solução salina e o concentrado protéico, assim como as fibras de cotilédones, com solução alcalina. A eletroforese apresentou as proteínas majoritárias da soja, β -conglucina e glicina nas fibras de cotilédones e nos ingredientes protéicos. A proteína extraída das fibras também revelou bandas com peso molecular próximo aos 30KDa, sendo provavelmente glicoproteínas de parede celular, ricas em hidroxiprolina. Após a determinação das melhores condições, as fibras de soja foram hidrolisadas com carboidrase e com protease. As frações sólidas das fibras hidrolisadas com carboidrase tiveram maior quantidade de proteínas e aumento nas propriedades hidrofílicas, enquanto que a fração solúvel teve 73% dos carboidratos e 50% dos ácidos urônicos da quantidade inicial das amostras. A protease foi capaz de solubilizar 54% do total das proteínas, produzindo uma fração sólida contendo 76% de fibras alimentares totais. A fração solúvel teve peptídeos de baixo peso molecular, menor que 10KDa e uma banda de peso molecular próximo aos 25KDa. As micrografias da MEV confirmaram a redução das partículas na amostra micronizada em relação à original. A estrutura física da fibra original hidrolisada com protease ficou mais porosa superficialmente do que a fibra micronizada. As amostras hidrolisadas com carboidrase apresentaram uma estrutura mais compactada.

Palavras-Chave: Fibras alimentares. Parede celular. Compostos químicos e funcionais. Classificação e eletroforese de proteínas. Carboidrase. Protease. Microscopia.

SEIBEL, Neusa Fátima. **Characterization, isolation and enzymatic hydrolysis of cotyledon fiber from soybean [*Glycine Max* (L.) Merrill]**. 2006. 110f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2006.

ABSTRACT

Soybean derived ingredients: cotyledon fibers, defatted flour and protein concentrate were evaluated for chemical characteristics and functional properties. Potassium was the macro and iron the micro mineral in highest concentration in all the ingredients. The highest concentration of phytic acid was in the protein concentrate, as well as the highest concentration of isoflavones, however, the fibers had more genistin and daidzein and the total isoflavones in the fibers corresponded to 45% of the amount in the defatted flour. Dietary fibers had the best hydration properties and in properties related to oil emulsification had similar indexes to soybean flour, despite the lower protein concentration. The cell wall soybean cotyledon fiber was fractioned and the major component was hemicellulose, corresponding to 55% on the average. Based on monosaccharide composition of the cell wall fractions there were two groups: (1) cellulose and (2) pectin and hemicelluloses. Protein classification due to solubility in different solvents showed that defatted flour had a major protein fraction extracted with salt solution while the protein concentrate and dietary fibers had higher protein solubility with alkaline solution. The electrophoresis presented the major soybean proteins, β -conglitin and glycinin in cotyledon fibers and in protein ingredients. The protein extracted from fibers also revealed bands with molecular weight next 30KDa, probably cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins. After identifying the best conditions, the soybean fibers were hydrolyzed with carbohydrase and protease. The solid fraction of carbohydrase hydrolyzed fiber had higher protein concentration and increased hydrophilic properties, while the soluble fraction had 73% carbohydrates and 50% uronic acids of the initial quantity in samples. The protease hydrolyzed 54% of the total protein in the fiber samples, producing a solid fraction with 76% total dietary fiber. The soluble fraction had peptides of low molecular weight, lower than 10KDa, and one band of molecular weight close to 25KDa. The SEM micrographies confirmed the reduced particle in the milled sample in relation to the original sample. The physical structure of the original fiber hydrolyzed with protease had more superficial porosity than the reduced particle fiber. The hydrolyzed samples with carbohydrase presented a more compact structure.

Keywords: Dietary fiber. Cell wall. Chemical and functional components. Protein classification and electrophoresis. Carbohydrase. Protease. Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da parede celular vegetal.....	20
Figura 2 – Constituintes aromáticos da lignina.....	24

Polissacarídeos e Proteínas de Fibras de Cotilédones de Soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]

Figura 1 – Projeção das variáveis nos Componentes Principais 1 e 2.....	64
Figura 2 – Análise de Componentes Principais obtidos a partir dos dados cromatográficos para análise de monossacarídeos	65
Figura 3 – Dendograma da Análise de Agrupamento obtidos a partir dos dados cromatográficos para análise de monossacarídeos	65
Figura 4 – Quantidades dos monossacarídeos em cada fração da fibra de cotilédones de soja original (%).....	66
Figura 5 – Quantidades dos monossacarídeos em cada fração da fibra de cotilédones de soja micronizada (%).....	67
Figura 6 – Eletroforese dos ingredientes alimentares derivados de soja	70

Hidrólise Enzimática de Fibras de Cotilédones de Soja [*Glycine Max* (L.) Merrill] e Caracterização das Frações Solúveis e Sólidas

Figura 1 – Tempo de hidrólise enzimática para obter a solubilização máxima dos carboidratos das fibras de cotilédones de soja.....	85
Figura 2 – Tempo de hidrólise enzimática para obter a solubilização máxima das proteínas das fibras de cotilédones de soja.....	87
Figura 3 – Eletroforese de fibras de soja, original e micronizada, e amostras hidrolisadas com protease e carboidrase	92
Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura das fibras de soja, original (A), micronizada (B) (160x), original hidrolisada com protease (C), micronizada hidrolisada com protease (D), original hidrolisada com carboidrase (E) e micronizada hidrolisada com carboidrase (F) (800x)..	94

LISTA DE TABELAS

Caracterização Química e Funcional Comparativa de Ingredientes de Soja [*Glycine Max* (L.) Merrill] Baseados em Carboidratos e Proteínas

- Tabela 1** – Composição centesimal de fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha desengordurada de soja (%)39
- Tabela 2** – Minerais presentes em fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha desengordurada de soja40
- Tabela 3** – Teor de fósforo inorgânico, fósforo fítico e ácido fítico presentes em fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha de soja.....41
- Tabela 4** – Isoflavonas presentes em fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha desengordurada de soja (mg/100g).....45
- Tabela 5** – Efeito do pH na solubilidade protéica de fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha desengordurada de soja (% de proteínas solúveis em relação às proteínas totais).....46
- Tabela 6** – Propriedades funcionais relacionadas com água e óleo de fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha desengordurada de soja....48

Polissacarídeos e Proteínas de Fibras de Cotilédones de Soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]

- Tabela 1** – Rendimento do fracionamento da parede celular da fibra de soja (%)62
- Tabela 2** – Proteínas de ingredientes de soja extraídas com diferentes solventes (% de proteínas solúveis em relação às proteínas totais).....68

Hidrólise Enzimática de Fibras de Cotilédones de Soja [*Glycine Max* (L.) Merrill] e Caracterização das Frações Solúveis e Sólidas

Tabela 1 – Planejamento da hidrólise de carboidratos e proteínas de fibras de cotilédones de soja (experimento fatorial 2 ³ com dois pontos centrais, variáveis codificadas e não codificadas).....	79
Tabela 2 – Carboidratos e proteínas solúveis das fibras de cotilédones, após hidrólise enzimática (experimento fatorial 2 ³ mais dois pontos centrais).....	84
Tabela 3 – Médias dos carboidratos e proteínas solúveis antes do tratamento e após a hidrólise química (solubilidade em relação ao total de cada composto).....	86
Tabela 4 – Proteínas e propriedades funcionais da fração sólida, carboidratos totais e ácidos urônicos da fração solúvel das fibras dos cotilédones de soja após a hidrólise com a carboidrase, comparadas com as amostras não hidrolisadas	88
Tabela 5 – Efeito do pH na solubilidade protéica das frações sólidas das fibras dos cotilédones de soja após a hidrólise enzimática com a carboidrase, comparadas com as fibras não hidrolisadas (% de proteínas solúveis em relação às proteínas totais)	90
Tabela 6 – Caracterização das fibras de cotilédones de soja não hidrolisadas e das frações sólidas das fibras hidrolisadas com a protease (%).....	91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
4.1 INGREDIENTES ALIMENTARES DERIVADOS DE SOJA	15
4.1.1 Ingredientes protéicos	15
4.1.2 Fibra de Soja	17
4.2 PAREDE CELULAR	18
4.2.1 Composição da Parede Celular	18
4.2.2 Estrutura da Parede Celular	19
4.2.2.1 Substâncias Pécicas	21
4.2.2.2 Celulose	22
4.2.2.3 Hemicelulose	22
4.2.2.4 Lignina	23
4.2.2.5 Proteínas	24
4.3 PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E FUNCIONAIS DAS FIBRAS	25
4.4 COMPOSTOS DE SOJA COM ATIVIDADES FISIOLÓGICAS	27
4.4.1 Ácido Fítico	27
4.4.2 Isoflavonas	29
4.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	30

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	32
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FUNCIONAL COMPARATIVA DE INGREDIENTES DE SOJA [GLYCINE MAX (L.) MERRILL] BASEADOS EM CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS	
Resumo	24
Introdução	25
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão	31
Conclusões	44
Referências Bibliográficas	45
5.2 POLISSACARÍDEOS DAS FIBRAS DE COTILÉDONES E PROTEÍNAS DAS FIBRAS, FARINHA DESENGORDURADA E CONCENTRADO PROTÉICO DE SOJA [GLYCINE MAX (L.) MERRILL]	55
Resumo	49
Introdução	50
Material e Métodos	52
Resultados e Discussão	56
Conclusões	68
Referências Bibliográficas	69
5.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FIBRAS DE COTILÉDONES DE SOJA [GLYCINE MAX (L.) MERRILL] E CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E SÓLIDAS	76
Resumo	71
Introdução	72
Material e Métodos	73
Resultados e Discussão	79
Conclusões	91
Referências Bibliográficas	92
6 CONCLUSÕES GERAIS	99
REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

A soja é considerada um alimento funcional devido aos benefícios que traz à saúde humana. Antigamente o interesse na produção de soja estava relacionado somente com a produção de óleo e de proteínas, atualmente é dada atenção a todos os outros componentes e fitoquímicos que ela fornece. Uma fração que ainda não está bem estudada é a fibra dos cotilédones de soja, o resíduo insolúvel do processamento de obtenção da proteína isolada de soja, é constituída principalmente de carboidratos de parede celular, e não contém casca. Estas fibras têm várias propriedades funcionais, entre elas o alto poder de absorção de água e por isto apresentam uma série de aplicações na indústria de alimentos, além de proporcionar o sabor mais brando entre todas as fontes de fibras (Duxbury, 1991).

A estrutura das paredes celulares não é uniforme: composição, forma e tamanho dependem da função da célula dentro do tecido da planta. São estruturas complexas, constituídas de multicomponentes formando uma rede de polissacarídeos unidos por ligações intermoleculares. Apesar da estrutura química dos componentes individuais da parede celular já ter sido bem caracterizada, a proporção relativa de cada um deles é pouco conhecida, e desta forma, um entendimento completo da estrutura da parede celular vegetal está ainda para ser estabelecido. Numa descrição simples, pode-se dizer que a parede celular contém quatro componentes principais: celulose, polissacarídeos não celulósicos (PNC), proteínas e polifenóis (Da-Silva et al, 1997).

As fibras proporcionam efeitos fisiológicos a quem ingere a quantidade diária recomendada de fibras totais (25-30g), sendo que 75% desta quantidade devem estar na forma insolúvel. As propriedades fisiológicas das fibras são relacionadas com a principal característica físico-química, a propriedade de hidratação, possivelmente pela presença de componentes de fibras alimentares insolúveis, como celulose, hemicelulose e lignina, que são materiais hidrofílicos (Auffret et al, 1994; López et al, 1996). A composição química e as características físicas das fibras influenciam nesta propriedade, pois compostos de parede celular primária absorvem mais água do que compostos de parede celular secundária. Estas e outras características podem ser modificadas por vários tratamentos, sendo a hidrólise enzimática a preferida, porque pode ser controlada, havendo uma alteração total, parcial ou específica, dependendo do interesse (Guillon e Champ, 2000; Lahl e Braun, 1994; Sgarbieri, 1996).

2 JUSTIFICATIVA

Na indústria de alimentos, são conhecidos como “resíduos”, partes da matéria-prima não utilizadas no processamento do produto principal. A utilização das matérias-primas residuais faz surgir novas fontes de riquezas e torna-se praticável a existência, no mercado, de subprodutos mais variados e de menor preço. Além de muitas vezes, solucionar problemas ambientais e perdas de nutrientes. A fibra de soja se caracteriza como resíduo, já que o objetivo inicial é a produção da proteína isolada de soja a partir da farinha desengordurada. Embora seja um subproduto, apresenta muitas vantagens e potenciais aplicações, pois tem propriedades funcionais e o sabor mais brando entre todas as fontes de fibras (Duxbury, 1991).

Para a aplicação industrial de novos ingredientes alimentares é necessário o conhecimento da composição e das propriedades funcionais, pois estas são altamente correlacionadas com as características físico-químicas e efeitos fisiológicos. Estas e as outras características das fibras dos cotilédones de soja não estão disponíveis na literatura. Desta forma, pretendeu-se investigar os componentes deste produto, contribuindo para o entendimento das propriedades e possíveis aplicações industriais. Para isso ingredientes protéicos, farinha desengordurada e concentrado protéico de soja, foram usados para comparação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi caracterizar as propriedades químicas e funcionais das fibras de cotilédones de soja, obtidas durante a extração aquosa de proteínas isoladas, e fracionar os principais compostos presentes com métodos químicos e enzimáticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar a composição da fibra de soja.
- Quantificar compostos com atividade fisiológica, tais como fibras alimentares, ácido fítico e isoflavonas.
- Determinar as características tecnológicas da fibra de soja.
- Quantificar os componentes estruturais da parede celular presentes na fibra.
- Classificar as proteínas da fibra quanto à solubilidade e pesos moleculares.
- Relacionar as características de ingredientes de fibras alimentares com ingredientes protéicos.
- Hidrolisar os principais compostos das fibras de soja e caracterizar as frações.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 INGREDIENTES ALIMENTARES DERIVADOS DE SOJA

Inicialmente o interesse na produção de soja estava relacionado somente com a produção de óleo e de proteínas. A cada tonelada de óleo bruto de soja, são produzidas 4,5 toneladas de farinha de soja, contendo aproximadamente 44% de proteína. Atualmente são conhecidos os inúmeros benefícios que outros componentes da soja trazem para a saúde humana, por isso a soja está intitulada como um alimento funcional. O aumento no consumo de soja é atribuído a vários fatores: benefícios para a saúde do consumidor; novos hábitos alimentares; aumento da tecnologia dos produtos de soja e aumento na produção mundial de soja. Outro fator influente é a comprovação da crescente ênfase nos benefícios da ingestão de baixa quantidade de gordura saturada e alta quantidade de fibras, assim, a soja é uma alternativa apropriada (Kumar et al, 2002; Riaz, 2001).

4.1.1 Ingredientes Protéicos

A farinha de soja desengordurada é o primeiro produto sólido a ser gerado após a prensagem dos grãos, para a extração do óleo. Este produto contém aproximadamente 50% de proteínas e 30-35% de carboidratos, é formada dos “pellets” finos, já que estes são classificados em grossos (10-20 mesh), médios (20-40 mesh) e finos (40-80mesh), sendo que 97% das partículas da farinha passam através de 100mesh. O concentrado protéico é obtido a partir da farinha desengordurada por lavagem alcoólica (etanol 60-80%), água acidificada (pH 4,5) ou água fervente. Nesse processo de lavagem, componentes são arrastados, deixando as proteínas e os polissacarídeos. O concentrado protéico de soja não pode ter menos que 65% de proteínas. O isolado protéico é preparado a partir da farinha desengordurada por solubilização das proteínas e carboidratos usando uma solução aquosa (pH 7-10). A fração insolúvel é removida por centrifugação, seguida por

precipitação das proteínas da soja, utilizando o ponto isoelétrico (pH 4,5). Este produto tem aproximadamente 90% de proteínas (Fernández-Quintela et al, 1993; Liu, 1997; Pearson, 1982).

As principais proteínas da soja são β -conglucina (7S) e glicina (11S). A β -conglucina é constituída de subunidades α , α' e β , com pesos moleculares de 84, 72 e 51KDa, respectivamente, e a glicina tem subunidades ácidas (36-40KDa) e básicas (18-20KDa) (Garcia et al, 1997; Riblett et al, 2001). A glicina é a maior fração das proteínas totais do grão, 25-35%, sendo composta por no mínimo seis subunidades não idênticas, totalizando um peso molecular de 350KDa. Cada subunidade tem um polipeptídeo ácido associado a um básico por ligações dissulfeto e ligações de hidrogênio (Garcia et al, 1997; Liu 1997; Sathe et al, 1987). Além destas subunidades a soja pode apresentar uma banda de menor intensidade, ao redor de 15KDa. Riblett et al (2001) comentaram que esta banda é uma outra subunidade da glicina, uma vez que quando as frações 7S e 11S foram avaliadas separadamente, ela foi revelada somente na eletroforese da glicina. Devido a diferenças na composição e estrutura, as globulinas 7S e 11S exibem diferenças nas características nutricionais e funcionais: todas as subunidades da β -conglucina são glicoproteínas, contendo 4-5% de carboidratos e somente uma pequena porção de glicina é glicosilada; a 11S tem 3 a 4 vezes mais metionina e cisteína do que a 7S, e tem melhor formação de gel, enquanto que a 7S tem melhor capacidade emulsificante (Liu, 1997).

As proteínas de soja, sob a forma de farinhas desengorduradas, concentrados e isolados protéicos, são largamente utilizadas em carnes processadas, alimentos lácteos, maioneses, molhos, produtos de panificação, entre outros, devido a sua principal característica funcional: a solubilidade. Esta propriedade influencia na maioria das outras propriedades, tais como: geleificação, capacidade espumante e emulsificante. Portanto, o conhecimento da habilidade das proteínas em combinar água à sua estrutura é muito importante na maioria das aplicações alimentares (Chou e Morr, 1979; Souza et al, 2000).

As propriedades funcionais têm recebido atenção, principalmente em novos ingredientes alimentares, pois afetam as características nutritivas e sensoriais dos produtos, além de ter um importante papel físico na preparação, processamento ou estocagem dos alimentos. As propriedades funcionais dos componentes alimentares estão relacionadas com: capacidade de hidratação e características

relacionadas com tamanho, forma e propriedades de superfície das moléculas (Auffret et al, 1994; Sgarbieri, 1998; Thibault et al, 1992). Existe uma correlação entre as propriedades físico-químicas e as propriedades funcionais das proteínas, especialmente as da soja, as quais podem ser alteradas, favoravelmente ou não, por temperatura, secagem, métodos de preparação ou outros tratamentos durante o processamento e estocagem dos produtos (Lee et al, 2003). As proteínas da soja são tenso-ativas, agrupam-se nas interfaces óleo-água reduzindo a tensão superficial, promovendo e estabilizando as emulsões. Na absorção de gordura, estas proteínas permitem a retenção, reduzindo as perdas em diversas etapas do processamento e ajudam a manter as dimensões originais dos alimentos evitando o encolhimento. A água é mantida no produto final porque as regiões polares ao longo das moléculas facilitam a absorção. A melhora da textura em alguns produtos é talvez a propriedade mais importante da utilização das proteínas de soja, isto ocorre devido a capacidade de geleificação (Souza et al, 2000).

4.1.2 Fibra de Soja

A fibra dos cotilédones da soja é um produto obtido de duas formas: pela extração aquosa da farinha desengordurada de soja em solução neutra e alcalina (pH 7-10), é a fração insolúvel separada por centrifugação, durante o processo de obtenção do isolado protéico, ou por desnaturação protéica antes da extração aquosa. A primeira forma de extração é considerada como sendo a que proporciona produtos mais agradáveis ao consumidor (Lusas e Riaz, 1995). O produto final contém proteínas, mas seu maior constituinte é o material não celulósico, constituído de polissacarídeos ácidos e arabinogalactanos. Também possui 10% de celulose, oriundos das paredes celulares dos tecidos dos cotilédones, podendo totalizar até 80% de fibra alimentar, mas este valor é variado, pois depende do método utilizado para a determinação (Riaz, 2001; Slavin, 1991).

A fibra de soja possui cor bege clara, aroma e sabor suaves e pode ser apresentada em várias granulometrias, entretanto, a incorporação nos alimentos pode acarretar problemas com as propriedades físicas e sensoriais do produto, os quais os tornam inaceitáveis pelos consumidores. Este ingrediente pode ser

adicionado com sucesso em muitos alimentos, tais como snacks extrusados, barras energéticas, cereais, pães integrais (podendo ser usado na proporção de 5-20% do peso seco da farinha), dietas líquidas, sopas, assados em geral, alimentos enlatados e fórmulas nutricionais hospitalares (Riaz, 2001; Slavin, 1991).

É previsto um crescimento no desenvolvimento de novos produtos utilizando fibras de soja, já que estas têm diferentes funções no produto final, além de reduzir o valor calórico, proporcionam benefícios à saúde humana (Tockman, 2002). Estas fibras têm várias propriedades funcionais, entre elas o alto poder de absorção de água e, por isto, apresentam uma série de aplicações na indústria de alimentos, além de proporcionar o sabor mais brando entre todas as fontes de fibras (Duxbury, 1991). Mas a maior vantagem da fibra de soja em relação às demais fontes é a não influência sobre a absorção de minerais como o zinco (Erdman e Weingartner, 1981). Quando comparada à adição de fibra de soja na dieta com a adição, em igual quantidade, de fibra de trigo, não houve a diminuição da absorção de zinco e cobre proporcionada pela fibra de trigo (Riaz, 2001).

4.2 PAREDE CELULAR

A parede celular do tecido vegetal forma uma zona de fronteira entre cada célula e apresenta diversas funções tais como: conferir rigidez, tamanho e forma às células; controlar a expansão celular; dar proteção contra ataque de insetos e agentes patogênicos; controlar o transporte intercelular e armazenar reservas alimentares (Brett e Waldron, 1996).

4.2.1 Composição da Parede Celular

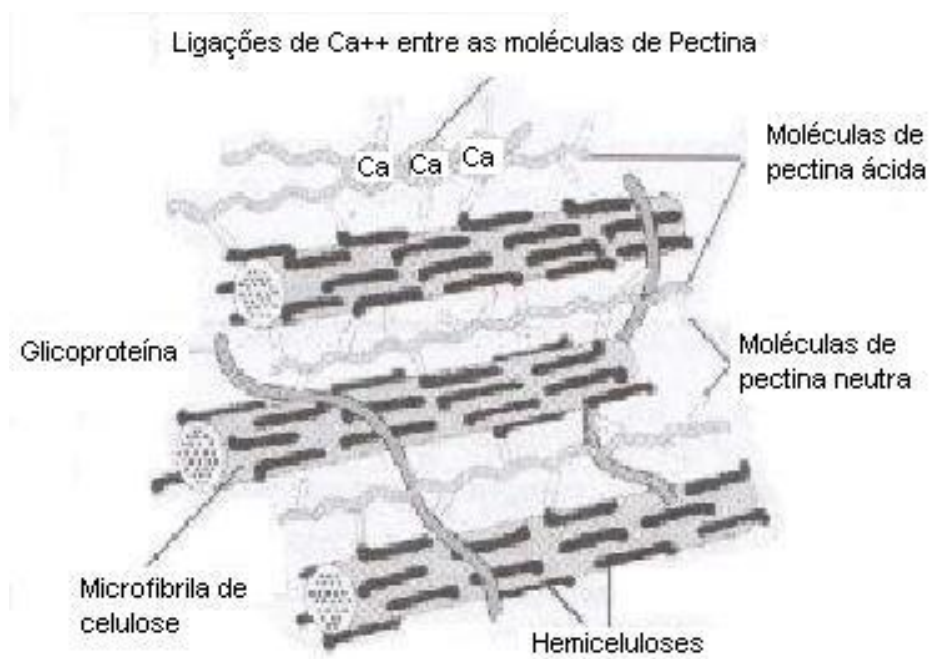
A parede da célula vegetal é formada por três camadas: lamela média, parede celular primária e parede celular secundária. A lamela média é composta de substâncias pécticas, sendo chamada de substância intercelular, pois mantém juntas as paredes primárias das células adjacentes (Cutter, 1996). A parede

celular primária é a primeira parede a ser formada pela célula e é depositada sobre cada lado da lamela média pelas células adjacentes, recobrando a membrana plasmática, sendo encontrada em plantas dicotiledôneas e os principais constituintes são pectinas e xiloglucanos. As substâncias pécticas da lamela média têm, relativamente, uma menor proporção de oligossacarídeos na cadeia principal e ramificações não tão extensas como a pectina da parede celular primária (Thakur et al, 1997; Waldron et al, 2003). A parede celular secundária é considerada suplementar e caracterizada pela fração mais lignificada, sendo encontrada em maior quantidade nos cereais (Heredia et al, 1995).

A parede celular é constituída por duas fases: uma fase cristalina e outra amorfa. A fase cristalina apresenta uma conformação química relativamente homogênea, composta por microfibrilas, nas quais as moléculas de celulose são os maiores componentes, alinhadas paralelamente ao eixo da cadeia. A matriz amorfa da parede celular apresenta uma composição química bastante complexa, sendo constituída por uma variedade de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos. Possui composição variável segundo as diversas partes da parede, o tipo de célula, o estágio do ciclo celular e a espécie em questão. A variação desta composição não se refere somente quanto à proporção dos polímeros presentes, mas também quanto à estrutura de cada polímero (Heredia et al, 1995).

4.2.2 Estrutura da Parede Celular

As paredes celulares não são uniformes: sua composição, forma e tamanho dependem da função da célula dentro do tecido da planta. Elas são estruturas complexas, constituídas de multicomponentes, formando uma rede de polissacarídeos unidos por ligações intermoleculares (Figura 1). Apesar da estrutura química dos componentes individuais da parede já ter sido bem caracterizada, a proporção relativa de cada um deles é pouco conhecida, e desta forma, um entendimento completo da estrutura da parede celular vegetal está ainda para ser estabelecido. Numa descrição simples, pode-se dizer que a parede celular contém quatro componentes principais: celulose, polissacarídeos não celulósicos (PNC), proteínas e polifenóis (Da-Silva et al, 1997).



Fonte: Da-Silva et al (1997)

Figura 1 – Estrutura da parede celular vegetal.

Os PNC podem ser classificados pelos seus resíduos: neutros, quando possuem na sua maioria resíduos de açúcares neutros; e ácidos, quando seus resíduos forem basicamente ácidos urônicos (Asp 1996). Mais comumente os PNC são divididos em polissacarídeos hemicelulósicos e pectínicos. Certas generalizações podem ser feitas sobre os tipos de polímeros encontrados em cereais (monocotiledôneas) e vegetais comestíveis (dicotiledôneas). Pectinas e xiloglucanos são os principais PNC da maioria dos vegetais, mas são encontrados em menores quantidades nos cereais, onde as β -glucanas são mais importantes. As hemiceluloses estão ligadas às microfibrilas de celulose formando estruturas resistentes que protegem a membrana plasmática e o protoplasma da célula. As ligninas estão situadas na camada secundária proporcionando maior resistência aos ataques de agentes químicos e de microrganismos (Da-Silva et al, 1997).

Os polissacarídeos da parede celular de cotilédones de soja, geralmente são avaliados quanto aos teores de monossacarídeos e ácidos urônicos, os quais indicam a presença das frações; ou os polissacarídeos são determinados

como fibras alimentares totais, solúveis e insolúveis, para após serem hidrolisados e então avaliar os monossacarídeos. Independentemente da metodologia utilizada, galactose, glicose, arabinose e ácidos urônicos são os principais componentes, enquanto que xilose, ramnose e fucose são encontradas em menores quantidades (Brillouet e Carré, 1983; Huisman et al, 1998; Mullin e Xu, 2000; Ouhida et al, 2002; Stombaugh et al, 2000).

4.2.2.1 Substâncias Pécnicas

As pectinas contribuem com a firmeza e estrutura dos tecidos das plantas, são os principais componentes da lamela média e um dos principais polímeros da parede celular vegetal. Os polissacarídeos pécticos são ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. Os resíduos de ácidos galacturônicos são carregados negativamente, devido a estas cargas estes polímeros são altamente hidratáveis e ácidos, podendo ligar-se ionicamente a cátions bivalentes. As substâncias pécticas podem ser divididas em três polissacarídeos:

Ramnogalacturonano I (RG I): este polissacarídeo é o maior componente da lamela média e parede celular primária de dicotiledôneas. Possui ligações α -1,4 de ácido galacturônico e ligações α -1,2 de ramnose. Apresenta inúmeras cadeias laterais que podem estar alternadas com moléculas de homogalacturonanos, formando extensas cadeias. Muitos dos resíduos de ácido galacturônico são metil ou etil esterificados. Apresenta, ainda, diversas cadeias laterais ligadas à posição 4 da ramnose. Estas cadeias laterais são compostas, principalmente, por arabinose e galactose, e estão unidas à ramnose através de ligações 1,5 e 1,4, respectivamente.

Homogalacturonanos: são formados por ligações α -1,4 de cadeias de ácido galacturônico, que podem estar parcialmente metil esterificados. Outros açúcares podem estar presentes em baixas concentrações. Estão unidos através de ligações covalentes ao RG I ou a outros polissacarídeos. Interagem com íons Ca^{+2} formando uma estrutura em “caixa de ovos”. São encontrados na parede primária de dicotiledôneas e em muitas frutas. Homogalacturonanos com baixo grau de metil

esterificação são chamados ácidos pécticos e os altamente metil esterificados são chamados ácidos pectínicos, ou simplesmente pectinas.

Ramnogalacturonano II (RG II): encontrado em menor quantidade na parede primária de dicotiledôneas, ligado ao RG I e a homogalacturonanos. É constituído por ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose (Brett e Waldron, 1996; McDougall et al, 1996; Thakur et al, 1997).

4.2.2.2 Celulose

A celulose é o principal componente de sustentação das estruturas vegetais; é um homopolissacarídeo neutro formado por cadeias retilíneas de anidro D-glucose unidas em β -1,4. A ausência de substituintes nas longas cadeias de glicose permite a associação intermolecular por grande número de ligações de hidrogênio, tendo alto grau de polimerização, 2000 a 6000 na parede celular primária e mais de 10000 na parede secundária, produzindo áreas de cristalinidade, as quais contribuem para sua insolubilidade e pouca reatividade. A celulose é insolúvel em água e parcialmente hidrolisada por enzimas (celulase), em meio ácido é parcialmente hidrolisada nas regiões amorfas formando microcristais. A celulose nativa difere em cristalinidade quanto à localização na parede celular: a camada secundária contém celulose altamente cristalina enquanto a camada primária contém principalmente celulose amorfa (Da-Silva et al, 1997; Theander et al, 1993; Waldron et al, 2003).

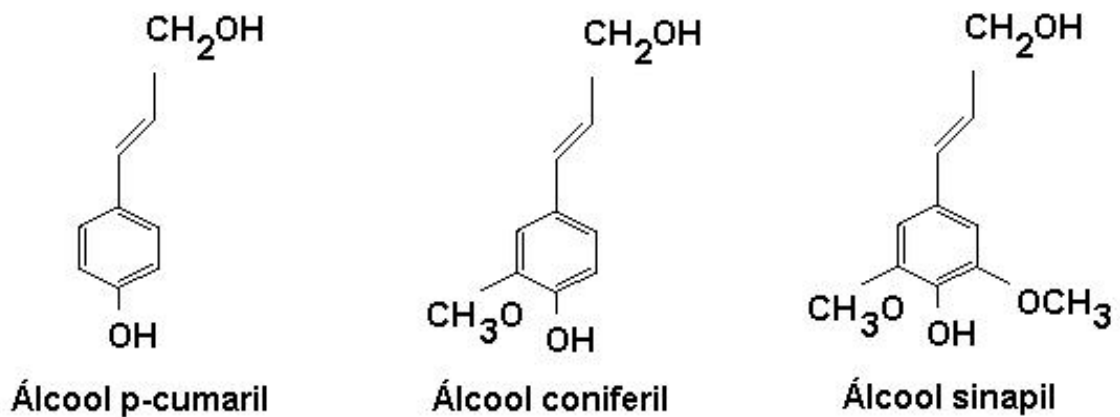
4.2.2.3 Hemicelulose

A hemicelulose corresponde a um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados que se ligam firmemente à superfície das microfibrilas de celulosas e entre si, cobrindo as microfibrilas e mantendo ligações cruzadas, via ligações de hidrogênio, em uma rede complexa, sendo facilmente solubilizados em álcali diluído após a eliminação da lignina. Os polímeros das hemiceluloses são

formados por vários resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros. Estes açúcares estão ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4 formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduos, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. São classificados de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral: xilanos (principal componente), galactomananos, arabinoxilanos, galactosanas, ramnogalactosanas, etc. As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular, mas concentram-se principalmente nas camadas primária e secundária de monocotiledôneos e dicotiledôneos, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina (Da-Silva et al, 1997; Heredia et al, 1995; Waldron et al, 2003).

4.2.2.4 Lignina

São compostos polifenólicos altamente insolúveis formados pela polimerização de três álcoois: álcool trans-p-cumaril, álcool-coniferil e álcool trans-sinapil (Figura 2). Eles mantêm uma extensa rede de ligações cruzadas dentro da parede celular, conferindo-lhes elevada resistência, pela eliminação de água entre os polímeros (Da-Silva et al, 1997). Os precursores destes compostos são álcoois cinâmicos que formam as unidades de fenilpropano. Estes são transformados em ligninas por ligações complexas de polimerização, formando éter e ligações C-C, durante estas ligações. Diferenças nas proporções relativas destas unidades fenólicas são características para diferenciar ligninas de diferentes fontes (Theander et al, 1993). A quantidade de polimerização é dependente da atividade dos precursores e dos espaços vazios na parede celular, pois estas moléculas tendem a ocupá-los, deixando na estrutura final a incapacidade de ocorrer extensão plástica. A lignina também é uma efetiva barreira contra a penetração de patógenos, tal que as células totalmente lignificadas morrem sem serem infectadas (Brett e Waldron, 1996).



Fonte: Theander et al (1993).

Figura 2 – Constituintes aromáticos da lignina.

4.2.2.5. Proteínas

A parede celular vegetal contém proteínas estruturais que desempenham papel importante na arquitetura da parede por meio de ligações cruzadas com outros componentes. Dentre elas, a proteína melhor descrita é a extensina, que constitui aproximadamente 5% da camada primária dos vegetais dicotiledôneos. É uma glicoproteína constituída de cerca de 40% de hidroxiprolina e outros aminoácidos, lisina, serina e tirosina. Este último está envolvido em ligações cruzadas com compostos fenólicos contribuindo para a insolubilidade da proteína na parede (Da-Silva et al, 1997; Waldron et al, 2003).

As proteínas podem reagir reversível ou irreversivelmente com os compostos polifenóis reduzidos ou oxidados. Na forma reduzida os polifenóis reagem com as proteínas de maneira reversível através de ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas. Quando oxidados seus produtos de oxidação, as quinonas, formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas, sendo que os grupos sulfidrilos (cisteína) e os epsilon-amino (lisina) são os mais reativos (Sgarbieri, 1996).

Showalter (1993) cita mais quatro classes de proteínas em paredes celulares:

- Proteínas ricas em glicina: são caracterizadas por estrutura primária repetitiva, contendo mais de 70% de glicina arranjadas em curtas seqüências de aminoácidos;

- Proteínas ricas em prolina: caracterizam-se pela ocorrência de unidades repetidas de prolina-prolina. Estas proteínas estão envolvidas no desenvolvimento vegetal e na formação de nódulos fixadores de nitrogênio;

- Lectinas: este grupo apresenta a habilidade de se ligar especificamente a certos açúcares. O principal monossacarídeo presente nestas proteínas é arabinose (92%), o qual está ligado à hidroxiprolina (16%) (Heredia et al, 1995). As lectinas parecem estar relacionadas com a interação célula-célula e com o sistema de defesa vegetal.

- Proteínas de arabinogalactanos: são glicoproteínas ricas em hidroxiprolina que estão glicosiladas por cadeias de arabinogalactanos. Estas proteínas compreendem apenas 2 a 10% do total de proteínas presentes na parede. Devido à sua abundância na lamela média tem sido proposto que agiriam como colas e lubrificantes e também em processos de reconhecimento célula-célula.

4.3 PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E FUNCIONAIS DAS FIBRAS

Fibras alimentares são macromoléculas resistentes à digestão pelas enzimas do trato gastrointestinal humano e são essencialmente compostas de componentes de parede celular, tais como polissacarídeos e lignina. As fibras proporcionam efeitos fisiológicos a quem ingere a quantidade diária recomendada de fibras totais (25-30g), sendo que 75% desta quantidade devem estar na forma insolúvel. Os benefícios descritos são: aumento da saciedade, regulação do trânsito intestinal, aumento do volume fecal (principalmente as insolúveis), redução do colesterol, aumento na excreção de sais biliares e prevenção de algumas doenças, incluindo o câncer de cólon (principalmente as solúveis) (Tharanathan e Mahadevamma, 2003).

Parte das respostas fisiológicas benéficas é devido a maior mastigação exigida pelas fibras e, portanto, o bolo alimentar tem maior quantidade de saliva. No estômago podem diminuir a velocidade da vazão e causar o

retardamento da digestão e, por conseguinte, da absorção no intestino delgado por mecanismos variados: a) formação de uma matriz que prende os glicídios entre suas malhas (quando se tratam de fibra viscosa) ou nas paredes celulares; b) fenômenos de dispersão por absorção e insorção de água, sais biliares e intercâmbio iônico com a soma de cátions e maior eliminação de colesterol; este último é subtraído ao diminuir o ciclo entero-hepático da biliar e transportado ao intestino grosso onde as bactérias o transformam em coprostanol sendo eliminado pelas fezes; c) inibição de enzimas digestivas como as amilases, enteroglucagon, modificação do GIP (polipeptídeo inibidor gástrico), em especial pela fibra viscosa (Salinas, 2002; Mälkki, 2001; Schneeman, 1986).

Em pacientes que ingeriram dietas preparadas com fibra de soja, houve o aumento do volume fecal e o decréscimo do tempo de trânsito intestinal, efeitos comuns das fibras com componentes insolúveis. No entanto, a fibra de cotilédones de soja também apresenta ações fisiológicas oriundas de fibras solúveis. Em alguns estudos foi verificada a diminuição do colesterol em animais e humanos e da glicose (8,5%) quando os pacientes ingeriram 25g destas fibras. A fibra de soja parece ser extremamente fermentável em humanos, um estudo comprovou que 93% das fibras foram digeríveis quando os pacientes ingeriram 30g diárias e 86% quando ingeriram 60g, sendo uma diferença não significativa. Mas esta alta digestibilidade da fibra de soja pode ajudar a explicar alguns dos efeitos fisiológicos (Slavin, 1991; Riaz, 2001).

Um efeito nutricional negativo, associado à ingestão de fibras, que tem sido relatado em alguns estudos *in vitro* é a absorção, pela fibra, de alguns minerais importantes, como o zinco e o cálcio. Mas quando os mesmos estudos foram realizados em ratos e em humanos foi verificado que as fibras não exerceram efeito na absorção de minerais (Gordon, 1989; Roehrig, 1988; Schneeman, 1986).

As propriedades fisiológicas das fibras são relacionadas com a principal característica físico-química, a propriedade de hidratação, possivelmente pela presença de componentes de fibras alimentares insolúveis, como celulose, hemicelulose e lignina, que são materiais hidrofílicos (Auffret et al, 1994; López et al, 1996). A composição química e as características físicas das fibras influenciam nesta propriedade, pois compostos de parede celular primária absorvem mais água do que compostos de parede celular secundária. Além disso, processos tecnológicos, como moagem, secagem, aquecimento e extrusão modificam as

propriedades físicas da matriz, afetando as propriedades de hidratação (Guillon e Champ, 2000).

O conhecimento das propriedades de hidratação, tais como: capacidade de absorção de água, volume de intumescimento e solubilidade, das fibras alimentares é importante para a aplicação em alimentos. A presença de cargas, ácidos urônicos dissociados, sulfatos e fitatos tendem a favorecer a solubilização, mas suas cargas elétricas dependem do pH e da temperatura (Tharanathan e Mahadevamma, 2003). Segundo Erdman e Weingartner (1981) as fibras de cotilédones de soja têm maior poder de absorção de água do que as fibras extraídas de cereais.

4.4 COMPOSTOS DE SOJA COM ATIVIDADES FISIOLÓGICAS

4.4.1 Ácido Fítico

O ácido fítico ou inositol hexafosfato ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) na soja e seus derivados varia de 1 a 2%. Este composto constitui a principal forma de armazenamento de fósforo nos vegetais, correspondendo de 60 a 90% do fósforo total (Cheryan, 1980). No entanto, este fósforo não é nutricionalmente disponível (Torre et al, 1991), ao menos que ocorra uma hidrólise pelas fitases ou fosfatases alcalinas, capazes de digerir os fitatos, as quais não são encontradas no trato gastrointestinal humano (Plaami, 1997). Os níveis de fitato nos grãos podem ser influenciados pela genética, condições ambientais, localização, condições de irrigação, tipo do solo, ano e aplicações de fertilizantes. A proporção de fósforo fítico aumenta com o aumento da suplementação de P_2O_5 para a planta, pois quando a planta recebe maior quantidade de fósforo do que necessita, este é estocado sob a forma de ácido fítico (Oatway et al, 2001).

Normalmente o ácido fítico é encontrado sob a forma de complexos com minerais essenciais e proteínas. Em pH ácido, a proteína possui cargas positivas e o ácido fítico cargas negativas, ocorrendo a forte interação eletrostática proteína-ácido fítico. A quantidade da interação parece ser dependente do número

de cargas positivas dos grupos aminos que estarão disponíveis para reagir com os ésteres fosfatos aniônicos do ácido fítico (Cheryan, 1980). As interações ácido fítico-minerais e ácido fítico-minerais-proteína, podem ter a molécula de ácido fítico associada a mais de um mineral, sendo estes complexos mais estáveis do que quando o fitato encontra-se ligado a um único mineral.

O ferro é o mineral menos influenciado por altas concentrações de ácido fítico, porque o complexo ferro-fitato não se forma no pH alcalino da porção superior do duodeno, onde a maior parte do ferro é absorvida (Coelho, 1995), e também porque 40% do total de ferro em carne, aves e peixes estão na forma heme, a qual é muito melhor absorvida, pelo organismo humano, do que a forma não-heme (Plaami, 1997). A biodisponibilidade do cálcio pode ser afetada pela interação com o ácido fítico, pois este componente tem alta afinidade com todas as formas de Ca, formando complexos insolúveis em baixo pH (Torre et al, 1991). O zinco é o mineral essencial mais afetado pelo fitato, porque é capaz de formar os complexos mais fortes e insolúveis: fitato-Zn-proteína e fitato-Zn, por isto foi criado um indicador de biodisponibilidade do zinco. A taxa molar do fitato:Zn é calculada pela divisão dos milimoles de fitato (mg de fitato/peso molecular do fitato) pelos milimoles de Zn (mg de Zn/peso molecular do Zn) e a taxa molar do complexo fitato x Ca : Zn é dada pelos milimoles de fitato multiplicada pelos milimoles de Ca e dividida pelos milimoles de Zn (Ellis et al, 1987). Taxas molares de fitato:Zn maiores que 15mmol indicam absorção reduzida e menores que 10mmol mostram disponibilidade adequada, mas quando o cálcio estiver presente neste complexo (fitato x Ca : Zn) a taxa molar recomendada aumenta para um máximo de 200mmol (Adeyeye et al, 2000; Ellis et al, 1987).

O poder quelante do ácido fítico, especialmente com o Fe, tem ação antioxidante, inibindo a formação do radical livre (*OH) e da peroxidação lipídica. Efeitos sinérgicos de misturas de tocoferol (vitamina E) e ácido fítico têm sido usados na proteção contra a autooxidação de lipídios. Esta propriedade também foi verificada em carnes, onde a interação foi dependente da concentração e pH (Oatway et al, 2001). O consumo de ácido fítico também tem demonstrado alguns benefícios para controlar doenças: prevenção ou redução do tamanho e da proliferação celular de alguns tipos de câncer, principalmente câncer de cólon; diminuição dos riscos de doenças coronárias; redução da glicose sanguínea e de cálculos renais (Anderson et al, 1991; Frühbeck et al, 1995; Plaami, 1997).

4.4.2. Isoflavonas

Isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides encontradas principalmente na soja e podem existir em 4 formas químicas: glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) e duas formas conjugadas malonil-glicosídeo (6"O-malonil-daidzina, 6"O-malonil-genistina e 6"O-malonil-glicitina) e acetil-glicosídeo (6"O-acetil-daidzina, 6"O-acetil-genistina e 6"O-acetil-glicitina) (Liu, 1997). As isoflavonas não são encontradas no tegumento da semente. O hipocótilo, mesmo sendo somente 2% do peso seco da semente, tem de 5,5 a 6 vezes mais isoflavonas do que os cotilédones. A forma glicosídica glicitina e seus derivados ocorrem somente no hipocótilo (Kudou et al, 1991; Tsukamoto et al, 1995).

Malonil-genistina foi a isoflavona encontrada em maior concentração nos grãos (25-42%), seguido por genistina, malonil-daidzina e daidzina respectivamente, num total que variava entre 83-93% de isoflavonas (Wang e Murphy, 1994). Os conjugados malonil e acetil-glicosídicos são termicamente instáveis, sofrendo hidrólise pela ação de temperaturas elevadas (80°C) (Kudou et al, 1991; Liu, 1997), dando origem às formas glicosídicas, através de uma reação de de-esterificação das ligações éster entre o grupo carboxila-malonato ou carboxila-acetato, produzindo metil-malonato ou metil-acetato e a forma glicosídica (Barnes et al, 1994).

Das diferentes isoflavonas, as agliconas, sobretudo a genisteína tem despertado maior interesse dos pesquisadores. Estudos *in vitro* demonstraram que ela previne a transformação de células normais em pré-malignas, torna mais lenta a proliferação celular e atenua a angiogênese (Anderson et al, 1999), sendo que a biodisponibilidade das agliconas é maior que dos conjugados glicosídeos (Kurzer e Xu, 1997). Assim, considerando que a disponibilidade da enzima β -glicosidase é limitada no organismo, a ingestão de alimentos com maiores concentrações de agliconas torna o processo de absorção mais rápido.

Além do efeito anticarcinogênico, as isoflavonas têm sido associadas beneficemente ao tratamento da osteoporose, uma doença bastante grave em mulheres pós-menopausa, pois baixos níveis de estrógenos estimulam a perda de massa óssea (Neven, 1998; Chambô Filho et al, 2000). Segundo Messina (1999),

além das isoflavonas, a proteína de soja também contribui para a diminuição da perda de massa óssea, reduzindo a excreção de cálcio através da urina, provavelmente devido ao baixo teor de aminoácidos sulfurados que apresenta. A quantidade de isoflavonas na dieta necessária para produzir efeitos biológicos no organismo humano parece ser de 30 a 50 mg/dia (Setchell, 1998).

4.5 Hidrólise Enzimática

As propriedades físico-químicas de macromoléculas, proteínas e carboidratos, podem ser manipuladas por tratamentos químicos, mecânicos, enzimáticos ou térmicos. Os objetivos destas modificações intencionais são: aumentar a funcionalidade e a disponibilidade de nutrientes, produzir hidrolisados com peptídeos definidos, isolar peptídeos fisiologicamente ativos e remover sabores ou odores assim como compostos tóxicos. A hidrólise enzimática é preferida em proteínas e carboidratos porque pode ser controlada, havendo uma alteração total, parcial ou específica, dependendo do interesse (Lahl e Braun, 1994; Sgarbieri, 1996).

Em proteínas os tratamentos mecânicos e térmicos causam desnaturação, resultando em menor solubilidade, perda da atividade biológica e aumento de interações proteína-proteína ou proteína com outras substâncias, lipídios, carboidratos e minerais. Estas interações também são ocasionadas por tratamentos químicos, que provocam modificações na polaridade, além de serem caros, não específicos e formar compostos tóxicos. Enquanto que os tratamentos enzimáticos têm proteólise limitada e seletiva; aumentam a solubilidade, a capacidade emulsificante e espumante; melhoram a disponibilidade dos aminoácidos e os processos podem ser acelerados com maior quantidade de enzimas, reduzindo tempo e custos operacionais. Devido ao maior controle na hidrólise, os produtos resultantes de modificações enzimáticas podem ser utilizados em dietas especiais, para doentes, idosos e crianças (Fischer et al, 2001; Lahl e Braun, 1994; Liu, 1997; Marsman et al, 1997; Tsumura et al, 2005).

A incorporação de fibras em alimentos pode causar modificações indesejáveis, particularmente quanto ao sabor e textura, por isso estes

polissacarídeos têm sofrido tratamentos antes do uso para alterar a complexa estrutura física existente em compostos de parede celular (Marsman et al, 1997; Tharanathan e Mahadevamma, 2003). As fontes das fibras e as condições operacionais influenciam no impacto do tratamento. Tratamentos enzimáticos são os preferidos para a produção de hidrolisados que serão utilizados em alimentos, resultando no aumento das quantidades de fibras solúveis; no aumento do volume de intumescimento das fibras insolúveis, provavelmente pelo aumento da porosidade, e na maior ou menor absorção de água dependendo do tamanho e da distribuição dos poros (Guillon e Champ, 2000).

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FUNCIONAL COMPARATIVA DE INGREDIENTES DE SOJA [*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL] BASEADOS EM CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS

RESUMO

O objetivo do trabalho foi quantificar componentes químicos e determinar propriedades funcionais de ingredientes à base de soja. Ingredientes de carboidratos ou fibras alimentares derivadas de cotilédones e ingredientes protéicos como concentrado e farinha desengordurada foram avaliados. Os ingredientes protéicos tinham em média 72% de proteína e os ingredientes de fibras, em média 60% de fibra alimentar. O macromineral de maior concentração foi o potássio e o micromineral foi o ferro em todos os ingredientes. As várias formas de fósforo diferiram nos dois tipos de ingredientes: fósforo inorgânico que variaram de 0,1 a 0,6mg/g, fósforo fítico de 1,0 a 4,9mg/g e ácido fítico de 3,6 a 17,3mg/g, os maiores valores estavam associados com as frações protéicas. Taxas molares de ácido fítico: minerais foram avaliadas e o Zn, mineral mais afetado, apresentou uma taxa menor da necessária para ter a absorção prejudicada. Dos oito isômeros de isoflavonas quantificados, daidzina e malonil daidzina estavam somente nos produtos protéicos, e as formas gliciteína e acetil genistina somente nas amostras de fibra alimentar. As propriedades funcionais avaliadas foram índice de absorção de água (IAA), volume de intumescimento (VI), índice de absorção de óleo (IAO), capacidade emulsificante (CE) e atividade emulsificante (AE). Os ingredientes de fibras alimentares tiveram as melhores propriedades de hidratação (IAA 8,4g/g; VI 18mL/g) e nas propriedades relacionadas com o óleo, mesmo tendo menores percentuais de proteínas, apresentaram índices similares à da farinha de soja (IAO 2,4g/g; CE 187,8mL/g e AE 53%).

Palavras-Chave: Ingredientes alimentares de soja. Propriedades tecnológicas. Fibra alimentar. Ácido fítico. Isoflavonas. Minerais.

INTRODUÇÃO

Comercialmente a soja é industrializada para obtenção de óleo e de proteínas, a cada tonelada de óleo bruto de soja, são produzidas 4,5 toneladas de farinha de soja, contendo aproximadamente 44% de proteína (Kumar et al, 2002). A farinha de soja desengordurada é o primeiro produto sólido a ser gerado após a prensagem dos grãos, para a extração do óleo. O concentrado protéico é separado da farinha desengordurada por desnaturação e precipitação com soluções de álcool (etanol 60-80%) ou de ácido diluído (pH 4,5). O isolado protéico é preparado a partir da farinha desengordurada por solubilização das proteínas e carboidratos usando uma solução aquosa (pH 7-10), e a fração insolúvel é removida por centrifugação, seguida por precipitação das proteínas da soja, utilizando o ponto isoelétrico (pH 4,5) (Liu, 1997b). A fibra de soja, ou fração insolúvel, é separada por centrifugação, contém principalmente carboidratos da parede celular dos cotilédones da soja, mas não contém casca de soja. É um produto com características ainda não descritas, o que é necessário para a posterior utilização.

Alguns compostos químicos presentes na soja e seus derivados têm sido investigados devido às suas propriedades nutricionais e funcionais, relacionadas à saúde. Isoflavonas, com atividades anticarcinogênicas, são compostos fenólicos presentes na soja e podem existir em 4 formas químicas: os glicosídeos, as agliconas e duas formas conjugadas o malonil-glicosídeo e o acetil-glicosídeo (Liu, 1997a; Wang e Murphy, 1994).

O ácido fítico ou inositol hexafosfato ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) constitui a principal forma de armazenamento de fósforo nos vegetais, correspondendo de 60 a 90% do fósforo total (Cheryan, 1980). A soja e seus derivados contêm de 1 a 2% de ácido fítico, que podem quelar íons metálicos di e trivalentes, tais como Ca, Mg, Zn e Fe, formando compostos insolúveis que atrapalham a absorção destes íons metálicos no intestino (Anderson e Wolf, 1995; Liu, 1997a). No entanto a ligação do ferro pelo ácido fítico, pode ter um efeito benéfico, atuando como antioxidante, inibindo a taxa de formação de radicais livres e da oxidação lipídica (Plaami, 1997).

As propriedades funcionais também têm recebido atenção, principalmente em novos ingredientes alimentares, pois afetam as características nutritivas e sensoriais dos produtos, além de ter um importante papel físico na

preparação, processamento ou estocagem dos alimentos. As propriedades funcionais dos componentes alimentares estão relacionadas com: capacidade de hidratação e propriedades relacionadas com tamanho, forma e propriedades de superfície das moléculas (Auffret et al, 1994; Sgarbieri, 1998; Thibault et al, 1992). Existe uma correlação entre as propriedades físico-químicas e as propriedades funcionais das proteínas, especialmente as da soja, as quais podem ser alteradas, favoravelmente ou não, por temperatura, secagem, métodos de preparação ou outros tratamentos durante o processamento e estocagem dos produtos (Lee et al, 2003).

Os ingredientes protéicos, farinhas desengorduradas e concentrados protéicos, têm como principal característica funcional a solubilidade, pois esta influencia na maioria das outras propriedades, tais como: geleificação, capacidade espumante e emulsificante. Portanto o conhecimento da habilidade das proteínas em combinar água à sua estrutura é muito importante na maioria das aplicações alimentares (Chou e Morr, 1979). Fibras alimentares são macromoléculas resistentes à digestão pelas enzimas do trato gastrointestinal humano e são essencialmente compostas de componentes de parede celular, tais como polissacarídeos e lignina (Tharanathan e Mahadevamma, 2003). A composição química destes compostos é variável em decorrência da origem e tem sido relacionada com efeitos fisiológicos para o organismo humano, tais como, regulação do trânsito intestinal, aumento do volume fecal e prevenção de algumas doenças, incluindo o câncer de cólon. As responsáveis por estes efeitos são as propriedades de hidratação, as principais características físico-químicas das fibras, as quais podem ser avaliadas pelo volume de intumescimento e índice de absorção de água (Auffret et al, 1994).

O objetivo do presente estudo foi quantificar os compostos químicos e determinar as propriedades funcionais de ingredientes derivados de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

As matérias-primas utilizadas foram fibras de cotilédones de soja, apresentadas sob duas formas: fibra alimentar original (FAO) e com redução do

tamanho das partículas (fibra alimentar micronizada - FAM), concentrado protéico e farinha desengordurada, fornecidas pela empresa Solae Company (Esteio/RS).

Propriedades Químicas

Composição centesimal: umidade determinada por secagem a 105°C até peso constante, cinzas por incineração em mufla a 550°C, o conteúdo de nitrogênio por Microkjeldahl usando sulfato de cobre e sulfato de potássio como catalisadores, o conteúdo de proteínas foi calculado multiplicando o nitrogênio por 6,25 e os lipídios foram extraídos em Soxhlet com éter de petróleo, todas as análises foram segundo A.O.A.C. (1995). Carboidratos não identificados foram determinados por diferença.

Fibras alimentares insolúveis, solúveis e totais: fibras alimentares insolúveis e solúveis foram determinadas com a metodologia enzimática-gravimétrica segundo o método nº 985.29 da AOAC (1995), usando o kit de ensaio de fibra alimentar total da Sigma (TDF 100A) e tampão fosfato 0,08M pH 6. Fibras alimentares totais foram determinadas como a soma das frações insolúveis e solúveis.

Minerais: foram determinados, nas cinzas das amostras após solubilização em ácido clorídrico, por absorção atômica no Espectrofotômetro Perkin-Elmer. Foi utilizado padrão Merck para comparação.

Fósforo inorgânico e fítico: foram determinados segundo a metodologia de Thompson e Erdman (1982). O fósforo inorgânico foi extraído com ácido tricloroacético 12,3% em shaker horizontal Marconi MA830/A (125 rpm a temperatura ambiente). O fósforo fítico foi extraído com ácido tricloroacético 3% e sulfato de sódio 10% no mesmo shaker e condições, e precipitado com cloreto férrico em banho-maria a 100°C. Os fósforos foram determinados segundo Chen et al (1956), a leitura das absorbâncias foi feita em 820nm em Espectrofotômetro UV-visível Cintra 20, usando uma curva de calibração de 10 pontos, com concentração de 10 a 100ug de fósforo e com $R^2 = 0,9991$.

Ácido fítico: foi calculado assumindo-se que na molécula há 28,2% de fósforo.

Isoflavonas: foram extraídas com etanol e ácido acético, sob agitação de 250 rpm por uma hora em uma mesa agitadora Tecnal Orbital, Modelo

TE 140. A separação das isoflavonas foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Waters, Milford, E.U.A.) equipado com coluna de fase reversa (YMC Pack ODS-AM, 250 mm x 0,4 mm de diâmetro) e detector de Arranjo de Diodo (Waters 996) ajustado para o comprimento de onda de 260nm. A fase móvel constituiu um gradiente linear binário de metanol contendo 0,025% de ácido trifluoroacético (TFA) (Solvente A) e água destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% de TFA (Solvente B) num fluxo de 1mL/min. A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, que aos 40 minutos atingiu a concentração de 100% para, em seguida, retornar a 20% aos 41 minutos e permanecer nestas condições até os 60 minutos. A identificação foi realizada por comparação com uma solução padrão contendo daidzina, daidzeína, genistina e genisteína (Fujicco) e a quantificação das isoflavonas foi por padronização externa (área dos picos). Os conjugados malonil-glicosídeos foram calculados com base em seus pesos moleculares (Song et al 1998), considerando sua absorvidade molar igual à absorvidade molar dos glicosídeos e confirmado com os espectros.

Propriedades Funcionais

Solubilidade em diferentes pHs: Um grama de amostra foi suspensa em 25mL de soluções tampão McIlvaine em pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0, e agitada por 30 minutos em shaker horizontal Marconi MA830/A (125 rpm a temperatura ambiente). Após centrifugação (3000 rpm por 20 minutos, em centrífuga Harrier 15/80 MSE), as amostras foram filtradas em papel filtro Whatman nº 3. No sobrenadante foi determinada proteína, pelo método de Microkjeldahl, usando uma alíquota de 2mL.

$$\% \text{proteína solúvel} = \frac{\text{Proteína solúvel no sobrenadante}}{\text{Proteína total}} \times 100$$

Volume de intumescimento: um grama de amostra foi misturado com excesso de água destilada em proveta de 100 mL. A suspensão foi continuamente agitada por 2 horas com barra magnética e posteriormente deixada em repouso para completa decantação. O volume ocupado pela amostra na proveta foi denominado volume de intumescimento e foi expresso em mL/grama de matéria seca.

Índice de absorção de água: dois gramas de amostra foram misturados com 20 mL de água destilada a temperatura ambiente em tubos de centrífuga, previamente pesados, foram continuamente agitados durante 30 minutos em agitador horizontal Marconi MA830/A (75 rpm a temperatura ambiente), e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos em centrífuga Harrier 15/80 MSE. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o sedimento úmido pesado. O IAA foi obtido através da razão entre o peso do sedimento úmido e o peso da matéria seca e expresso em gramas de água absorvida / grama de matéria seca.

Índice de absorção de óleo: foi determinado como o índice de absorção de água, substituindo a água por óleo de soja comercial.

Capacidade emulsificante: um grama de amostra e 50mL de água destilada foram homogeneizados por 30 segundos e adicionado óleo de soja a uma taxa de 10mL/min e misturados com shaker DIAX 600 Heidolph, em velocidade máxima. O ponto de inversão de fase foi registrado visualmente com a liquefação da emulsão. A capacidade emulsificante foi calculada como a quantidade de óleo emulsificado por grama de amostra.

Atividade emulsificante: um grama de amostra, 10 mL de água destilada e 10 mL de óleo de soja comercial foram emulsificados em um béquer de 100 mL com shaker DIAX 600 Heidolph por 1 minuto, em velocidade máxima. A suspensão foi centrifugada em tubos graduados a 3600 rpm por 10 minutos em centrífuga Harrier 15/80 MSE, onde o volume da camada emulsificada e o volume total foram lidos.

$$\text{Atividade emulsificante} = \frac{\text{V da camada emulsificada}}{\text{V total no tubo}} \times 100$$

Análises estatísticas: os resultados das amostras foram avaliados por ANOVA e para comparar a diferença das médias, o teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) foi usado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média de proteínas nas fibras de cotilédones foi de 28% e dos carboidratos foi de 65%, dos quais 60% são fibras alimentares totais (Tabela 1). O concentrado e a farinha desengordurada apresentaram médias de 72% de proteínas

e como componentes minoritários os carboidratos, média de 16% sendo 12,5% de fibras alimentares totais. As maiores quantidades de fibras alimentares totais eram fibras insolúveis, em todos os ingredientes, isto porque os carboidratos solúveis foram retirados durante o processamento. As maiores concentrações de cinzas e de lipídios estavam na farinha e no concentrado protéico, 7,9% e 6,5%, respectivamente. O concentrado protéico diferiu da farinha desengordurada por ter maior concentração de proteínas e lipídios, e menores de cinzas e fibras alimentares totais, enquanto que os ingredientes de carboidratos apresentaram composição similar.

Analisando a composição química de diferentes fibras alimentares Chang e Morris (1990) relataram teores menores de proteínas (21,4%), cinzas (3,6%) e lipídios (1,7%) para a fibra de soja, mas os dados foram expressos em base úmida. Os resultados de fibra alimentar total, expressos em base seca, igualaram à da amostra de fibra alimentar micronizada (62,3%), enquanto que a fibra solúvel foi maior (7,3%), e a fibra insolúvel menor (53,2%). Martins (1995) relatou teores menores de proteínas (25,3%), cinzas (2,8%), lipídios (1,1%) e fibra total (47,1%), assim como as frações solúvel (2,2%) e insolúvel (44,9%) para a fibra de soja. Os valores menores para os componentes determinados resultam em um valor superior (23,7%) em carboidratos não identificados comparado ao valor máximo encontrado nas amostras aqui avaliadas, que variou de 1,4 a 5,2%. Kumar et al (2002) relatou teores menores de proteínas na farinha (48%) e no concentrado (64%), e maiores para os carboidratos totais na farinha (31%) e valor semelhante no concentrado protéico (14%). Liu (1997b) relatou que o concentrado protéico tem, em média, 5,0% de cinzas e 72% de proteínas, valores próximos aos quantificados neste trabalho, mas lipídios (1,0%) e carboidratos (20%) os teores foram diferentes. Na farinha, o mesmo autor relatou teores menores de proteínas (59%), lipídios (1,1%) e cinzas (6,5%), e maiores de carboidratos (32%), calculados por diferença para ambos os produtos, mas sem análise de fibra alimentar. Lee et al (2003), avaliaram produtos de soja oriundos de várias indústrias, quantificaram teores máximos de proteínas em concentrados de 66,1% e em farinhas de 52,3%, os quais foram inferiores aos determinados neste trabalho. As fibras de cotilédones, obtidas como a fração insolúvel do processamento de isolado protéico de soja, juntamente com o concentrado protéico e a farinha desengordurada são ingredientes industriais

que apresentam variações na composição que podem ser atribuídas às variedades de sojas utilizadas como matéria-prima e aos diferentes métodos de processamento.

Macro e microminerais foram quantificados (Tabela 2). Os ingredientes de fibras alimentares tiveram a mesma composição, pois os dois ingredientes diferem somente no tamanho das partículas, tiveram maior quantidade de cálcio e menor de fósforo, enxofre, zinco, manganês e cobre quando comparados aos ingredientes protéicos. A farinha desengordurada e o concentrado protéico apresentaram teores similares entre si para o fósforo, cálcio, enxofre e cobre. Em todas as amostras o macromineral de maior concentração foi o potássio e entre os microminerais foi o ferro. Com exceção do cálcio e do enxofre, todos os minerais da farinha desengordurada apresentaram teores maiores do que nas outras amostras, o que é consequência do maior percentual de cinzas quantificado nesta amostra.

Tabela 1 – Composição centesimal de fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha desengordurada de soja (%).

Amostras	Proteínas	Cinzas	Lipídios	Fibra insolúvel	Fibra solúvel	Fibra total	Carboidratos não identificados
FAO	28,2 ^c ± 0,1	4,1 ^b ± 0,1	3,1 ^b ± 0,3	55,5 ^a ± 0,6	3,8 ^a ± 0,1	59,4 ^a ± 0,5	5,2
FAM	27,6 ^c ± 0,1	4,3 ^b ± 0,1	2,9 ^b ± 0,4	56,6 ^a ± 0,6	5,9 ^a ± 1,4	62,5 ^a ± 0,8	2,7
Concentrado	76,1 ^a ± 1,4	4,8 ^b ± 0,1	6,5 ^a ± 0,9	8,2 ^c ± 0,1	3,0 ^a ± 1,0	11,2 ^b ± 1,0	1,4
Farinha	68,8 ^b ± 3,8	7,9 ^a ± 0,1	4,3 ^b ± 0,3	13,8 ^b ± 0,4	0,2 ^b ± 0,1	14,0 ^b ± 0,3	5,0

FAO= fibra alimentar original; FAM= fibra alimentar micronizada.

Médias de determinações em triplicata, em base seca. Carboidratos não identificados foram determinados por diferença.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferiram ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Assim como os outros nutrientes, os minerais são influenciados pela variedade, local e época de plantio (Liu, 1997a). A fibra de soja apresentou maiores quantidades de cálcio, ferro, cobre e potássio do que o grão inteiro de soja, as

quantidades determinadas por Garcia et al (1998) foram: 125; 1,89; 0,33; 1316 mg/100g; respectivamente. O fósforo e o zinco no grão da soja foram maiores (443 e 3,5 mg/100g, respectivamente) do que a quantidade determinada nas fibras alimentares. A farinha de soja analisada por Koplik et al (2002) apresentou valores similares para o fósforo (7160 µg/g), magnésio (2990 µg/g), zinco (52,9 µg/g), manganês (41,7 µg/g) e ferro (140 µg/g), maior teor de cálcio (3160 µg/g) e menores de potássio (24000 µg/g) e cobre (16,1 µg/g).

Tabela 2 – Minerais presentes em fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha desengordurada de soja.

Amostras	P (mg/g)	K (mg/g)	Ca (mg/g)	Mg (mg/g)	S (mg/g)	Zn (µg/g)	Mn (µg/g)	Fe (µg/g)	Cu (µg/g)
FAO	2,4 ^b ±0,2	14,2 ^b ±0,3	4,6 ^a ±0,1	1,4 ^b ±0,1	2,3 ^b ±0,1	22,9 ^b ±2,8	19,8 ^b ±0,7	106,4 ^b ±2,3	7,9 ^b ±0,1
FAM	2,5 ^b ±0,1	15,6 ^b ±0,0	5,4 ^a ±0,1	1,5 ^b ±0,1	2,4 ^b ±0,2	19,4 ^b ±0,1	20,6 ^b ±0,0	86,3 ^b ±0,8	8,1 ^b ±0,1
Concentrado	6,6 ^a ±0,2	9,7 ^c ±0,4	2,4 ^b ±0,5	1,4 ^b ±0,2	3,9 ^a ±0,1	28,2 ^b ±0,2	25,6 ^b ±2,2	127,6 ^b ±1,5	16,1 ^a ±0,2
Farinha	6,8 ^a ±0,2	30,7 ^a ±1,8	2,5 ^b ±0,2	3,3 ^a ±0,2	3,7 ^a ±0,1	53,1 ^a ±2,4	43,3 ^a ±2,3	137,9 ^a ±12,1	20,2 ^a ±0,8

FAO= fibra alimentar original; FAM= fibra alimentar micronizada.

Médias de determinações em duplicata, em base seca.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferiram ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Houve diferença nos teores de fósforo inorgânico entre todas as amostras e nos teores de fósforo fítico entre os dois grupos de ingredientes alimentares (Tabela 3). Em relação ao fósforo total determinado na amostra de fibra alimentar original, 45,7% estava na forma de fósforo fítico e 6,1% na forma de inorgânico. Na amostra de fibra alimentar micronizada 41,0% do fósforo total era fósforo fítico e 8,1% era fósforo inorgânico. Na farinha desengordurada e no concentrado protéico, respectivamente, 69,1% e 74,2% estavam na forma de fítico e 8,8% e 6,1% estavam na forma de inorgânico. O ácido fítico quantificado na fibra

alimentar original equivale a 0,39% do peso da amostra, na fibra alimentar micronizada 0,36% e nas amostras de ingredientes protéicos 1,7%.

Tabela 3 – Teor de fósforo inorgânico, fósforo fítico e ácido fítico presentes em fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha de soja.

Amostras	Fósforo Inorgânico (mg/g)	Fósforo Fítico (mg/g)	Ácido Fítico (mg/g)
FAO	0,15 ^d ± 0,01	1,10 ^b ± 0,05	3,89 ^b ± 0,16
FAM	0,20 ^c ± 0,01	1,03 ^b ± 0,03	3,64 ^b ± 0,10
Concentrado	0,42 ^b ± 0,01	4,89 ^a ± 0,25	17,34 ^a ± 1,68
Farinha	0,60 ^a ± 0,01	4,74 ^a ± 0,11	16,79 ^a ± 0,51

FAO= fibra alimentar original; FAM= fibra alimentar micronizada.

Médias de determinações em triplicata, em base seca.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferiram ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Na soja até 75% do fósforo total pode ser fósforo fítico e 4,5% fósforo inorgânico e do peso total do grão 1,4% pode ser ácido fítico, valores encontrados nos ingredientes protéicos, porque a maior fração de fósforo, o ácido fítico, geralmente se associa às proteínas durante o processamento. Em pH ácido, a proteína possui cargas positivas e o ácido fítico cargas negativas, ocorrendo a forte interação eletrostática proteína-ácido fítico. A quantidade da interação parece ser dependente do número de cargas positivas dos grupos aminos que estarão disponíveis para reagir com os ésteres fosfatos aniônicos do ácido fítico (Cheryan, 1980). A interação explica a maior quantidade de ácido e fósforo fítico nos ingredientes protéicos e a menor quantidade nos ingredientes de fibras alimentares que são resíduos do isolado protéico. No entanto, Honig et al (1984) não verificou diferença estatística nos teores de ácido fítico do isolado protéico (1,60%) e dos respectivos resíduos insolúvel (1,31%) e solúvel (1,23%).

Além das interações ácido fítico-proteína, podem existir outros complexos: ácido fítico-minerais e ácido fítico-minerais-proteína, sendo que uma molécula de ácido fítico pode se associar a mais de um mineral, formando complexos mais estáveis do que quando o fitato encontra-se ligado a um único

mineral. O ferro é o mineral menos influenciado por altas concentrações de ácido fítico, porque o complexo ferro-fitato não se forma no pH alcalino da porção superior do duodeno, onde a maior parte do ferro é absorvida (Coelho, 1995), e também porque 40% do total de ferro em carne, aves e peixes estão na forma heme, a qual é muito melhor absorvida, pelo organismo humano, do que a forma não-heme (Plaami, 1997). A biodisponibilidade do cálcio pode ser afetada pela interação com o ácido fítico, pois este componente tem alta afinidade com todas as formas de Ca, formando complexos insolúveis em baixo pH (Torre et al, 1991). O zinco é o mineral essencial mais afetado pelo fitato, porque é capaz de formar os complexos mais fortes e insolúveis: fitato-Zn-proteína e fitato-Zn, por isto foi criado um indicador de biodisponibilidade do zinco. Taxas molares de fitato:Zn maiores que 15mmol indicam absorção reduzida e menores que 10mmol mostram disponibilidade adequada, mas quando o cálcio estiver presente neste complexo (fitato x Ca : Zn) a taxa molar recomendada aumenta para um máximo de 200mmol (Adeyeye et al, 2000; Ellis et al, 1987).

A taxa molar do fitato:Zn foi calculada pela divisão dos milimoles de fitato (mg de fitato/peso molecular do fitato) pelos milimoles de Zn (mg de Zn/peso molecular do Zn) e a taxa molar do complexo fitato x Ca : Zn é dada pelos milimoles de fitato multiplicada pelos milimoles de Ca e dividida pelos milimoles de Zn (Ellis et al, 1987). Para as quatro amostras a taxa molar do fitato:Zn foi maior que 15, indicando redução na biodisponibilidade do zinco. As amostras de fibra alimentar apresentaram valores mais próximos deste índice (original 19,3mmol e micronizada 17,8mmol), mas as amostras de ingredientes protéicos foram duas e quatro vezes maiores (farinha 33,3mmol e concentrado 57,14mmol). Estes valores são maiores do que a taxa molar do grão da soja (8mmol) determinada por Adeyeye et al (2000), a qual foi menor que a taxa recomendada para a disponibilidade adequada. Segundo Ellis et al (1987) a taxa fitato x Ca : Zn é a melhor para predizer a biodisponibilidade do Zn, e por esta taxa a absorção do zinco não é afetada. Todas as amostras apresentaram índices inferiores ao máximo permitido (fibra alimentar original 2,2mmol; fibra alimentar micronizada 2,4mmol; farinha 2,1mmol e concentrado 3,4mmol). É importante ressaltar que a absorção de qualquer nutriente pelos humanos depende das condições de saúde e dos hábitos alimentares e sociais.

O poder quelante do ácido fítico, especialmente com o Fe, tem ação antioxidante, inibindo a formação do radical livre (*OH) e da peroxidação lipídica.

Efeitos sinérgicos de misturas de tocoferol (vitamina E) e ácido fítico têm sido usados na proteção contra a autooxidação de lipídios, esta propriedade também foi verificada em carnes, onde a interação foi dependente da concentração e pH (Oatway et al, 2001). O consumo de ácido fítico também tem demonstrando alguns benefícios para controlar doenças: prevenção ou redução do tamanho e da proliferação celular de alguns tipos de câncer, principalmente câncer de cólon; diminuição dos riscos de doenças coronárias; redução da glicose sangüínea e de cálculos renais (Anderson et al, 1991; Frühbeck et al, 1995; Plaami, 1997).

Oito formas químicas de isoflavonas foram quantificadas nos produtos de soja (Tabela 4). Daidzina e malonil daidzina estavam presentes somente nos produtos protéicos, e as formas gliciteína e acetil genistina somente nas amostras de fibra alimentar original e micronizada. Não houve diferença na quantidade de genistina, malonil genistina e nas isoflavonas totais presentes nas amostras de fibra alimentar. O concentrado protéico e a farinha desengordurada de soja apresentaram diferentes quantidades para todas as formas de isoflavonas detectadas. A farinha de soja foi o produto com maior concentração de isoflavonas totais, isto se deve ao processo de desengorduramento que concentra estes componentes na fração não lipídica (Wang e Murphy, 1994). O concentrado protéico de soja apresentou menores quantidades de isoflavonas totais do que na farinha, devido provavelmente ao processamento, o qual muitas vezes é feito com extração aquosa de etanol 65%, que é um excelente solvente para isoflavonas (Coward et al, 1993), este efeito foi verificado por Wang e Murphy (1994) que quantificaram 73µg/g de isoflavonas totais em concentrado de soja extraído com álcool. Os glicosídeos e malonil-glicosídeos predominaram nos ingredientes protéicos, correspondendo a 79% no concentrado e 94% na farinha do total das isoflavonas presentes. Na farinha 50% das isoflavonas eram malonil glicosídeo, concordando com Coward et al (1993), que cita que glicosídeos estão em maior proporção nos produtos de soja minimamente processados, tais como a farinha. Wang e Murphy (1994) encontraram 134,1mg/100g de malonil glicosídeo dos 201,4mg/100g de isoflavonas totais na farinha de soja.

Os ingredientes de fibra alimentar apresentaram os menores valores de isoflavonas totais e a quantidade determinada foi similar com a relatada por Coward et al (1993), que avaliaram amostras de fibra de soja quanto às agliconas e conjugados, totalizando 49,4mg/100g de isoflavonas. A concentração total de

isoflavonas nas fibras correspondeu a 45% do valor encontrado na farinha, e apresentou mais genisteína e daidzeína, assim estes ingredientes alimentares também poderão atuar na prevenção de osteoporose, doenças cardíacas, alguns tipos de câncer e sintomas da menopausa, propriedades associadas com o consumo de isoflavonas (Brouns, 2002). A identificação de gliciteína na amostra de fibra alimentar micronizada sugere a presença de hipocótilo, pois Tsukamoto et al (1995) afirma que o glicosídeo glicitina e suas agliconas são encontrados somente nesta fração do grão. Provavelmente as amostras são de diferentes extrações de proteínas e na amostra micronizada não houve a separação completa do hipocótilo dos cotilédones. Outro indício de que as amostras são oriundas de diferentes extrações foi a presença da forma conjugada acetil genistina na fibra alimentar original, muito associada com tratamento térmico do material. De acordo com Anderson e Wolf (1995) e Kurzer e Xu (1997) em produtos com tratamento térmico a forma malonil é instável e pode ser transformada na forma acetil.

Tabela 4 – Isoflavonas presentes em fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha desengordurada de soja (mg/100g).

Amostras	Tipos de Isoflavonas								Total
	Daidzina	Genistina	Daidzeína	Genisteína	Gliciteína	Malonil Daidzina	Malonil Genistina	Acetil Genistina	
FAO	nd	11,8 ^c ±0,1	10,9 ^b ±0,2	8,3 ^b ±0,1	nd	nd	6,3 ^c ±0,1	11,3 ±0,2	48,6 ^c ±2,2
FAM	nd	11,0 ^c ±0,3	14,1 ^a ±0,1	11,0 ^a ±0,1	8,0 ±0,3	nd	5,6 ^c ±0,3	nd	49,7 ^c ±3,0
Concentrado	7,4 ^b ±0,3	17,1 ^b ±0,2	6,9 ^c ±0,1	5,8 ^c ±0,1	nd	9,1 ^b ±0,3	14,7 ^b ±0,6	nd	61,0 ^b ±1,1
Farinha	17,8 ^a ±0,4	28,0 ^a ±0,9	4,1 ^d ±0,4	2,9 ^d ±0,6	nd	23,6 ^a ±0,9	32,5 ^a ±0,8	nd	108,9 ^a ±1,7

nd = não detectado. FAO= fibra alimentar original; FAM= fibra alimentar micronizada.

Médias de determinações em triplicata, em base seca. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferiram ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

O efeito do pH na solubilidade protéica foi avaliado utilizando soluções com pH de 3,0 a 7,0 (Tabela 5). Para os ingredientes de fibra alimentar o conteúdo de proteínas solúveis foi menor no pH 3,0 (original 5,7% e micronizada 4,7%), atingindo máximo de 10,7% na solução com pH 7,0, pois a proteína solúvel já havia sido extraída. O concentrado protéico e a farinha desengordurada apresentaram menor solubilidade em pH 4,0 (2,8% e 8,0% respectivamente), pois próximo do pI a quantidade de cargas positivas e negativas são iguais e se neutralizam intramolecularmente. Nas soluções com pH acima do pI, a solubilidade dos ingredientes protéicos aumentou, atingindo um máximo de 7,2% para o concentrado e 30,1% para a farinha, no pH 7,0.

Tabela 5 – Efeito do pH na solubilidade protéica de fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha desengordurada de soja (% de proteínas solúveis em relação às proteínas totais).

Amostras	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
FAO	5,7 ^c ± 0,5	6,0 ^b ± 0,5	6,7 ^c ± 0,1	7,7 ^b ± 0,4	7,6 ^c ± 0,1
FAM	4,7 ^c ± 0,3	6,4 ^b ± 0,7	9,6 ^b ± 0,2	10,5 ^b ± 0,3	10,7 ^b ± 0,3
Concentrado	16,3 ^b ± 0,5	2,8 ^c ± 0,3	4,1 ^d ± 0,1	6,1 ^b ± 0,9	7,2 ^c ± 0,1
Farinha	39,4 ^a ± 0,5	8,0 ^a ± 0,5	18,4 ^a ± 0,6	28,3 ^a ± 4,6	30,1 ^a ± 0,7

FAO= fibra alimentar original; FAM= fibra alimentar micronizada.

Médias de determinações em triplicata, em base seca.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferiram ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

A fração solúvel dos ingredientes protéicos foi similar aos conteúdos relatados por Lee et al (2003) que avaliaram a solubilidade protéica de concentrados e farinhas desengorduradas de soja oriundas de diversas indústrias. A proteína solúvel em soluções de pH 7,0 foi menor que 10% para a maioria dos concentrados, e variou de 20% a 50% para as farinhas desengorduradas. Chau et al (1997) relataram que aproximadamente 75% das proteínas de concentrado protéico de soja estavam solúveis em pH 7,0, e para a farinha de soja Chau e Cheung (1998) comentaram que aproximadamente 70% das proteínas eram solúveis em pH 7,0. A temperatura do processamento afeta a fração solúvel nos produtos, diminuindo a

solubilidade com a maior temperatura de processamento por alteração da conformação molecular e causando a agregação das proteínas. Concentrados obtidos a partir de soluções alcoólicas têm menor solubilidade protéica devido à desnaturação (Liu, 1997b). A habilidade das proteínas em se associar e imobilizar a água na estrutura é útil em várias aplicações alimentares e é uma variável para a caracterização físico-química dos produtos finais. Para a indústria alimentícia este conhecimento é fundamental, já que a maioria das propriedades funcionais depende das propriedades de hidratação das proteínas.

As propriedades funcionais dos ingredientes de fibras alimentares e protéicos foram avaliadas utilizando as análises de índice de absorção de água (IAA), volume de intumescimento (VI), índice de absorção de óleo (IAO), capacidade emulsificante (CE) e atividade emulsificante (AE) (Tabela 6). Os IAA das quatro amostras apresentaram diferença estatística, a amostra original apresentou o maior índice (8,4g/g) e a farinha o menor (3,8 g/g). O VI foi similar entre os ingredientes protéicos e entre as duas amostras de fibras, mas diferiu entre estes dois grupos, pois os ingredientes de fibras alimentares apresentaram maior capacidade de hidratação (média de 17,6 mL/g). Valores de IAA para farinhas e concentrados da literatura foram menores que os encontrados neste trabalho: farinha de cowpea 1,8g/g (Prinyawiwatkul et al, 1997), farinha de soja 1,8g/g; 3,5g/g e 1,2g/g (respectivamente Chau e Cheung, 1998; Onweluzo et al, 1995; Padilla et al, 1996) e concentrado protéico de soja 3,5g/g (Chau et al, 1997). O IAA dos ingredientes de fibra alimentar foi maior do que a casca de soja 2,4g/g (Chen et al, 1984) e as fibras de lima bean (*Phaseolus lunatus*) e Jack bean (*Canavalia ensiformis*) que foram, respectivamente, 0,3g/g e 0,4g/g (Betancur-Ancona et al, 2003).

Tabela 6 – Propriedades funcionais relacionadas com água e óleo de fibras de cotilédones, concentrado protéico e farinha desengordurada de soja.

Amostras	IAA	VI	IAO	CE	AE
FAO	8,4 ^a ± 0,2	17,2 ^a ± 1,0	2,5 ^b ± 0,1	187,8 ^b ± 1,5	52,4 ^b ± 1,4
FAM	5,7 ^c ± 0,1	18,0 ^a ± 0,5	2,4 ^b ± 0,1	250,4 ^a ± 2,3	53,0 ^b ± 0,3
Concentrado	6,8 ^b ± 0,1	8,3 ^b ± 1,5	2,9 ^a ± 0,2	194,7 ^b ± 10,6	85,1 ^a ± 0,7
Farinha	3,8 ^d ± 0,1	8,7 ^b ± 0,6	2,4 ^b ± 0,1	197,6 ^b ± 1,8	56,8 ^b ± 0,3

FAO= fibra alimentar original; FAM= fibra alimentar micronizada. IAA= índice de absorção de água (g água absorvida/ g de amostra); VI= volume de intumescimento (mL de água/ g de amostra); IAO= índice de absorção de óleo (g óleo absorvido/ g de amostra); CE= capacidade emulsificante (mL de óleo emulsificado/ g de amostra); AE= atividade emulsificante (%).

Médias de determinações em triplicata.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferiram ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

As propriedades de hidratação são medidas pelo índice de absorção de água e pelo volume de intumescimento e diferentes resultados são obtidos ao se avaliar produtos iguais, porque o VI, que é definido como a fixação espontânea de água pela matriz protéica, depende da densidade, porosidade e solubilidade. O IAA é determinado após o completo intumescimento da amostra e estima a quantidade de água retida na matriz sem que haja exsudação após a ação de uma força centrífuga, este índice depende da conformação molecular, tamanho das partículas, números de sítios de ligação das moléculas e força de centrifugação (Auffret et al, 1994; Chou e Morr, 1979; Thibault et al, 1992). Nas fibras de cotilédones de soja avaliadas, a redução do tamanho das partículas juntamente com as mudanças na estrutura física da matriz molecular foram responsáveis pela menor absorção de água na amostra micronizada em relação à amostra de fibra alimentar original. As fibras apresentam como principal característica físico-química a propriedade de hidratação, possivelmente pela presença de componentes de fibras alimentares insolúveis, como celulose, hemicelulose e lignina, que são materiais hidrofílicos (López et al, 1996). Esta propriedade tem sido relacionada com os efeitos fisiológicos proporcionados a quem ingere a quantidade diária recomendada de fibras totais (25-30g), sendo que 75% desta quantidade devem estar na forma insolúvel. Os benefícios descritos são: aumento da saciedade, regulação do trânsito intestinal, aumento do volume fecal (principalmente as insolúveis), redução do

colesterol, aumento na excreção de sais biliares e prevenção de algumas doenças, incluindo o câncer de cólon (principalmente as solúveis) (Tharanathan e Mahadevamma, 2003).

O concentrado protéico de soja apresentou a maior absorção de óleo (2,9g/g) e a fibra de cotilédones de soja micronizada teve maior capacidade emulsificante (250,4 mL/g), diferindo das outras amostras. As amostras de fibras e a farinha de soja não diferiram entre si quando a atividade emulsificante foi avaliada, mas o concentrado protéico diferiu e apresentou a maior AE (85,1%). Os IAO das quatro amostras avaliadas foram maiores do que os índices da farinha de cowpea, 0,9g/g (Prinyawiwatkul et al, 1997), farinha de soja, 1,9g/g; 1,5g/g e 0,3 g/g (respectivamente Chau e Cheung, 1998; Onweluzo et al, 1995; Padilla et al, 1996) e das fibras de lima bean (*Phaseolus lunatus*) e Jack bean (*Canavalia ensiformis*) 0,2g/g (Betancur-Ancona et al, 2003). O concentrado protéico de soja avaliado por Chau et al (1997) apresentou IAO igual ao avaliado neste trabalho, e AE menor (58,2%). Chau e Cheung (1998) obtiveram AE máxima de 62% para a farinha de soja e Onweluzo et al (1995) determinaram AE de 55% para a farinha de soja, muito similar às amostras de farinha e de fibras alimentares de soja deste trabalho e Prinyawiwatkul et al (1997) encontraram 49,3% de AE para a fibra de lima bean (*Phaseolus lunatus*).

A maior atividade emulsificante e IAO do concentrado protéico de soja, provavelmente são decorrentes da maior quantidade de proteína, pois a atividade emulsificante mede, indiretamente, a área superficial da membrana protéica que recobre as gotículas de óleo, e a absorção de óleo é atribuída principalmente à combinação de gordura aos grupos não polares das proteínas ou à disponibilidade de grupos lipofílicos (Padilla et al, 1996). Betancur-Ancona et al (2003) comenta que um baixo índice de absorção de óleo está associado à diminuição da absorção do colesterol, portanto estes ingredientes poderiam ser úteis na alimentação de pacientes hipercolesterolêmicos. A maior capacidade emulsificante apresentada pela fibra de cotilédones de soja micronizada significa que ela incorporou mais óleo na emulsão, provavelmente porque esta amostra tem mais superfície de contato. López et al (1996) comentaram que as fibras têm propriedade de absorver óleo devido à presença de lignina na composição química e que as fibras insolúveis absorvem maior quantidade de óleo do que as fibras solúveis.

CONCLUSÕES

Nos ingredientes protéicos (farinha desengordurada e concentrado protéico) e de fibras alimentares (fibras dos cotilédones, original e micronizada), o macromineral de maior concentração foi o potássio e o micromineral foi o ferro. A biodisponibilidade do zinco não foi afetada pela presença do ácido fítico, de acordo com as taxas molares do complexo fitato x Ca : Zn. Os ingredientes protéicos tiveram a maior concentração de fósforo fítico, ácido fítico e isoflavonas, mas as fibras de cotilédones de soja contêm maiores quantidades de daidzeína e genisteína. A farinha desengordurada apresentou a maior quantidade de proteína solúvel em pH 7,0 e o menor índice de absorção de água, enquanto que o concentrado protéico teve os maiores índice de absorção de óleo e atividade emulsificante. Os ingredientes de fibras alimentares apresentaram as melhores propriedades de hidratação e as outras propriedades funcionais foram similares ou melhores que os ingredientes protéicos, mesmo tendo menores percentuais de proteínas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pelo financiamento desta pesquisa; à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – Londrina), pelas análises de minerais e isoflavonas e à empresa Solae Company pelo fornecimento das amostras.

REFERÊNCIAS

ADEYEYE, E.I.; AROGUNDADE, L.A.; AKINTAYO, E.T.; AISIDA, O.A.; ALAO, P.A. Calcium, zinc and phytate interrelationships in some foods of major consumption in Nigeria. **Food Chemistry**, v.71, p.435-441, 2000.

ANDERSON, R.L.; HAMILTON, C.C.; HORN, J.L.; SPENCER, D.B.; DILLON, D.W.; ZEIGLER, J.A. Metabolic effects on insoluble oat fiber on lean men with type II diabetes. **Cereal Chemistry**, v.68, n.3, p.291-294, 1991.

ANDERSON, R.L., WOLF, W.J. Compositional changes in Trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.581S-588S, 1995.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemists 16ed. v. I e II. 1995.

AUFFRET, A.; RALET, M.C.; GUILLON, F.; BARRY, J.L.; THIBAUT, J.F. Effect of grinding and experimental conditions on the measurement of hydration properties of dietary fibres. **LWT**, v.27, p.166-172, 1994.

BETANCUR-ANCONA, D.; PERAZA-MERCADO, G.; MOGUEL-ORDOÑEZ, Y.; FUERTES-BLANCO, S. Physicochemical characterization of lima bean (*Phaseolus lunatus*) and jack bean (*Canavalia ensiformis*) fibrous residues. **Food Chemistry**, p.1-9, 2003.

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

CHANG, M.C.; MORRIS, W.C. Effect of heat treatments on chemical analysis of dietary fiber. **Journal of Food Science**, v.55, n.6, p.1647-1650, 1990.

CHAU, C.F.; CHEUNG, C.K. Functional properties of flours prepared from three chinese indigenous legume seeds. **Food Chemistry**, v.61, n.4, p.429-433, 1998.

CHAU, C.F.; CHEUNG, C.K.; WONG, Y.S. Functional properties of protein concentrates from three chinese indigenous legume seeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.2500-2503, 1997.

CHEN, J.Y.; PIVA, M.; LABUZA, T.P. Evaluation of water binding capacity (WBC) of food fiber sources. **Journal of Food Science**, v.49, p.59-63, 1984.

CHEN, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, R.N. Microdetermination of phosphorus. **Anal. Chem**, v.28, n.11, p.1786-1758, 1956.

CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.14, n.4, p.297-335, 1980.

CHOU, D.H.; MORR, C.V. Protein-water interactions and functional properties. **JAACS**, v.56, p.53A-62A, 1979.

COELHO, R.G. Interações nutricionais. Parte 1: Interações ao nível do trato gastrointestinal. **Revista de Metabolismo e Nutrição**, v.3, n.2, p.106-117, 1995.

COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein, daidzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybeanbean foods from american and asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1961-1967, 1993.

ELLIS, R.; KELSAY, J.L.; REYNOLDS, R.D.; MORRIS, E.R.; MOSER, P.B.; FRAZIER, C.W. Phytate:zinc and phytate x calcium:zinc millimolar ratios in self – selected diets of Americans, Asian Indians, and Nepalese. **Journal of the American Dietetic Association**, v.87, p.1043-1047, 1987.

FRÜHBECK, G.; ALONSO, R.; MARZO, F.; SANTIDRIÁN, S. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. **Analytical Biochemistry**, v.225, n.2, p.206-212, 1995.

GARCIA, M.C.; MARINA, M.L.; LABORDA, F.; TORRE, M. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**, v.62, n.3, p.325-331, 1998.

HONIG, D.H.; WOLF, W.J.; RACKIS, J.J. Phytic acid and phosphorus content of various soybean protein fractions. **Cereal Chemistry**, v.61, n.6, p.523-526, 1984.

KOPLIK, R.; PAVELKOVÁ, H.; CINCIBUCHOVÁ, J.; MESTEK, O.; KVASNICKA, F.; SUCHANEK, M. Fractionation of phosphorus and trace elements species in soybean flour and common white bean seeds by size exclusion chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.770, p.261-273, 2002.

KUMAR, R.; CHOUDHARY, V.; MISHRA, S.; VARMA, I.K.; MATTIASON, B. Adhesives and plastics based on soy protein products. **Industrial Crops and Products – an International Journal**, v.16, p.155-172, 2002.

KURZER, M.S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Review Nutrition**, v.17, p.353-381, 1997.

LEE, K.H.; RYU, H.S.; RHEE, K.C. Protein solubility characteristics of commercial soy protein products. **JAOCs**, v.80, n.1, p.85-90, 2003.

LIU, K. Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. In: LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997a. p.25-99.

LIU, K. Soybean Protein Products. In: LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997b. p. 379-411.

LÓPEZ, G.; ROS, G.; RINCON, F.; PERIAGO, M.J.; MARTÍNEZ, M.C.; ORTUÑO, J. Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. **J. Agric. Food Chem**, v.44, p.2773-2778, 1996.

MARTINS, T.R. **Efeito do tratamento alcalino associado à extrusão nas propriedades funcionais da fibra de cotilédone de soja**. 1995. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR.

OATWAY, L.; VASANTHAN, T; HELM, J.H. Phytic Acid. **Food Reviews International**, v.17, n.4, p.419-430, 2001.

ONWELUZO, J.C.; ONUOHA, K.C; OBANU, Z.A. A comparative study of some functional properties of *Azelia africana* and *Glycine max* flours. **Food Chemistry**, v.54, p.55-59, 1995.

PADILLA, F.C.; ALVAREZ, M.T.; ALFARO, M.J. Functional properties of barinas nut flour (*Caryodendron orinocense* Karst., Euphorbiaceae) compared to those of soybean. **Food Chemistry**, v.57, n.2, p.191-196. 1996.

PLAAMI, S. Myoinositol Phosphates: Analysis, Content in Foods and Effects in Nutrition. **LWT**, v.30, p.633-647. 1997.

PRINYAWIWATKUL, W.; BEUCHAT, L.R.; McWATTERS, K.H.; PHILLIPS, R.D. Functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) flour as affected by soaking, boiling, and fungal fermentation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, n.2, p.480-486. 1997.

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAM, G.; MURPHY, P.A. Soybean isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.1474S-1479S. 1998.

THARANATHAN, R.N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes – a boon to human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, p.507-518. 2003.

THIBAUT, J.F.; LAHAYE, M.; GUILLON, F. Physico-chemical properties of food plant cell wall. In: SCHEIZER, T.; EDWARDS, C.A. **Dietary Fibre: a component of food: nutritional function in health and disease**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p.21-39.

THOMPSON, D.B.; ERDMAN, J.W. Phytic acid determination in soybeans. **Journal of Food Science**, v.47, n.2, p.513-517, 1982.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.1, n.1, p.1-22, 1991.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.1184-1192, 1995.

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

5.2 POLISSACARÍDEOS DAS FIBRAS DE COTILÉDONES E PROTEÍNAS DAS FIBRAS, FARINHA DESENGORDURADA E CONCENTRADO PROTÉICO DE SOJA [*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL]

RESUMO

Fibras alimentares obtidas de cotilédones de soja original (FAO) e micronizada (FAM) foram fracionadas e avaliadas quanto aos polissacarídeos e monossacarídeos constituintes. O componente majoritário foi a hemicelulose, totalizando 59% na amostra original e 51,1% na micronizada. Pectina representou 14%, em média, e celulose 8,5%. As duas amostras de fibras apresentaram 17,1mg/g de ácidos urônicos e a mesma composição de monossacarídeos nas frações de hemicelulose, extraídas com hidróxido de sódio 0,1M e 4M, e na fração de celulose. Na fração de pectina, a FAO tinha mais xilose e manose do que a FAM. Na fração de hemicelulose, extraída com hidróxido de sódio 1M, a fibra alimentar original apresentou mais glicose e manose e menores níveis de arabinose/ramnose, quando comparada com a mesma fração da fibra alimentar micronizada. As proteínas de concentrado protéico, farinha desengordurada e fibras alimentares (FAO e FAM) foram avaliadas quanto à solubilidade em diferentes solventes (solução salina, água, etanol e solução alcalina) e quanto ao peso molecular. A farinha desengordurada de soja teve a maior parte das proteínas passível de extração com solução salina, e o concentrado protéico juntamente com as fibras de cotilédones com solução alcalina. A fração protéica que não foi extraída com nenhum dos quatro solventes utilizados permaneceu no resíduo, o maior percentual estava no concentrado, seguido pela fibra alimentar micronizada e a farinha, a menor quantidade desta fração estava na fibra alimentar original. A eletroforese das proteínas dos quatro ingredientes alimentares derivados de soja mostrou as frações β -conglucina, constituída de subunidades α , α' e β , com pesos moleculares de 84, 72 e 51KDa, respectivamente, e glicina com as subunidades ácidas (36-40KDa) e básicas (18-20KDa). Bandas com peso molecular próximo aos 30KDa foram reveladas nas proteínas extraídas das fibras de cotilédones de soja, sendo provavelmente glicoproteínas de parede celular, ricas em hidroxiprolina.

Palavras-Chave: Fracionamento de parede celular. Monossacarídeos. Ácidos urônicos. Classificação de proteínas. Eletroforese. Hidroxiprolina.

INTRODUÇÃO

A fibra de soja, ou fração insolúvel do processamento de concentrado protéico, é separada por centrifugação, contém principalmente carboidratos de parede celular dos cotilédones da soja, sem componentes da casca. É um produto que necessita de caracterização para posterior utilização. Fibras alimentares são macromoléculas resistentes à digestão pelas enzimas do trato gastrointestinal humano e são essencialmente compostas de componentes de parede celular, tais como polissacarídeos e lignina. A parede celular é composta principalmente por pectina, lignina, hemicelulose e celulose, recentemente estes compostos têm tido importância devido aos efeitos benéficos à saúde humana, como regulação do trânsito intestinal e prevenção de algumas doenças, incluindo o câncer (Tharanathan e Mahadevamma, 2003). No entanto, é necessário o conhecimento da constituição destas frações, isto é possível com o fracionamento da parede celular, que promove uma separação dos polissacarídeos, podendo então identificar os seus constituintes.

A pectina é rica em ramnose, arabinose, galactose e ácidos galacturônicos, (ligados ionicamente a Ca e Mg), esta fração é covalentemente ligada a fenóis, proteínas e celulose, em todos os tipos de parede celular. Ligninas são compostos polifenólicos altamente insolúveis formados pela polimerização de três álcoois: álcool trans-p-cumaril, álcool-coniferil e álcool trans-sinapil, que mantêm uma extensa rede de ligações cruzadas na parede celular, conferindo-lhes elevada resistência, pois substituem a água entre os polímeros (Brett e Waldron, 1996). A hemicelulose corresponde a um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados que se ligam firmemente à superfície das microfibrilas de celulosas e entre si, cobrindo as microfibrilas e mantendo ligações cruzadas, via ligações de hidrogênio, em uma rede complexa. A celulose é constituída exclusivamente de glicose que forma cadeias por ligações β 1-4, e de ligações de hidrogênio entre as cadeias, com alto grau de polimerização, 2000 a 6000 na parede celular primária e mais de 10000 na parede secundária, produzindo áreas de cristalinidade (Waldron et al, 2003). Os polissacarídeos totais da parede celular de quatorze variedades de soja representaram em média 21% do grão, e os principais componentes foram galactose, glicose, arabinose e ácidos urônicos, enquanto que xilose, ramnose e

fucose foram encontradas em menores quantidades (Brillouet e Carré, 1983; Huisman et al, 1998; Stombaugh et al, 2000).

As proteínas da soja são amplamente utilizadas em produtos alimentícios sob a forma de vários ingredientes e para este uso é importante conhecer as classes das proteínas presentes. A classificação das proteínas, usada inicialmente em cereais, é baseada na solubilização destas macromoléculas em diferentes soluções extratoras, não existindo certeza de que alguns polipeptídeos possam ser extraídos em outra classe, devido às associações com outras proteínas ou que permaneçam no resíduo insolúvel quando associados a outros compostos (Liu, 1997). As proteínas majoritárias da soja são β -conglucina e glicina, respectivamente, globulinas 7S e 11S. A β -conglucina é constituída de subunidades α , α' e β , com pesos moleculares de 84, 72 e 51KDa, respectivamente e a glicina tem subunidades ácidas (36-40KDa) e básicas (18-20KDa). Devido a diferenças na composição e estrutura, as globulinas 7S e 11S exibem diferenças nas características nutricionais e funcionais (Liu, 1997; Riblett et al, 2001).

Proteínas de parede celular podem ser divididas em três classes estruturais. As extensinas, glicoproteínas básicas ricas em hidroxiprolina, serina, tirosina e lisina, contém muitas seqüências repetidas de Ser(Hyp)₄ e são os componentes majoritários da parede celular primária, podendo conter 40% de hidroxiprolina. As proteínas ricas em glicinas são caracterizadas pela repetitividade (Gly-X), onde X, frequentemente é glicina. As proteínas ricas em prolina e hidroxiprolina contém unidades repetidas de Pro-Pro-Val-X-Lys, onde X, frequentemente é histidina, tirosina ou glicina (Kleis-San Francisco e Tierney, 1990; Waldron et al, 2003). Durante o desenvolvimento do grão de soja até 30% das extensinas podem ser extraídas por soluções salinas, no entanto, quando o grão é dessecado estas proteínas tornam-se insolúveis devido a mudanças irreversíveis da parede celular durante a secagem (Cassab e Varner, 1988; Waldron et al, 2003).

O objetivo do trabalho foi avaliar os carboidratos das fibras de cotilédones de soja, quanto aos polissacarídeos e monossacarídeos, e as proteínas das fibras, farinha desengordurada e concentrado protéico quanto à solubilidade em diferentes solventes e à distribuição de pesos moleculares por eletroforese.

MATERIAL E MÉTODOS

As matérias-primas utilizadas para análise dos carboidratos foram fibras de cotilédones de soja, FAO e FAM. Para a classificação das proteínas foram utilizados concentrado protéico, farinha desengordurada e fibras alimentares (FAO e FAM), oriundas de outro lote e com diferente composição. Todas as amostras foram fornecidas pela empresa Solae Company (Esteio/RS).

Açúcares totais: foram determinados pelo método colorimétrico de fenol-sulfúrico, segundo Dubois et al (1956) e quantificados por absorção em Espectrofotômetro UV-visível Cintra 20 a 490nm, usando uma curva de calibração de 10 pontos, com concentração de 10 a 100ug de glicose e com $R^2 = 0,9848$.

Ácidos urônicos: foram determinados segundo Kintner e Van Buren (1982). As amostras foram hidrolisadas em ácido sulfúrico contendo tetraborato de sódio 0,0125M, reação com m-hidroxidifenil 0,15% em NaOH 0,5% e quantificados por absorção em Espectrofotômetro UV-visível Cintra 20 a 520nm. Os teores de ácidos urônicos foram calculados com base na curva de calibração de 6 pontos, com concentrações de 10 a 60 μ g de ácido galacturônico e com $R^2 = 0,9791$.

Fracionamento da parede celular: foi realizado a partir de 500mg de amostras. Primeiramente os açúcares solúveis foram extraídos com etanol 80%, por 20 minutos a 80°C, com agitação eventual. O material foi centrifugado a 8000xg por 15 min (Centrifuga Sorvall, rotor SL 50 T) e o precipitado foi seco em estufa a 60°C por 12 horas e pesado. A extração da pectina foi conduzida com 20 mL de oxalato de amônio 0,5% (p/v), para cada 200mg de material, submetido à extração por 1h a 80°C com agitação constante em agitador magnético (3 vezes). Terminada a extração foi centrifugado a 8000xg por 15 minutos e o sobrenadante dialisado com água potável (4 a 5 trocas) e com água destilada (2 a 3 trocas) e o precipitado foi lavado 3 vezes com água destilada, liofilizado e pesado. A delignificação foi realizada em banho-maria (70-80°C) com 40 mL de água deionizada, 1,25g de NaClO (clorito de sódio), 150 μ L de ácido acético glacial, usando o resíduo da extração com oxalato. O material foi agitado manualmente para quebrar os grumos. Após 1 hora adicionou-se 0,4g NaClO e 150 μ L de ácido acético glacial. Depois de mais 1 hora de extração, o material foi centrifugado a 8000xg por 15 minutos, o sobrenadante foi dialisado, liofilizado e pesado, o resíduo foi lavado com água e

lioofilizado. As hemiceluloses foram extraídas em três frações: ao material residual foram adicionados 20 mL de solução NaOH 0,1M com NaBH₄ (3mg/mL), as amostras permaneceram sob agitação, com barra magnética, por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 8000xg por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e neutralizado com ácido acético a pH 7,0, dialisado com água potável por 24 horas e água destilada por 24 horas e centrifugado a 8000xg por 15 minutos, o sobrenadante foi liofilizado e pesado. No precipitado foi repetido o processo com adição de NaOH 1M mais NaBH₄ (3mg/mL) e depois com NaOH 4M mais NaBH₄ (3mg/mL). Metade do precipitado remanescente da extração com NaOH 4M foi pesado e colocado em tubos cônicos de vidro. A esse material foi adicionado reagente de Updegraff (5% ácido nítrico e 15% ácido acético em água) e levado ao banho-maria a 100°C por 90 minutos, com agitação a cada 15 minutos. Após esfriado, foi centrifugado a 8000xg por 15 minutos a 10°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado 3 vezes com água deionizada e liofilizado. O peso resultante da hidrólise correspondeu à fração celulósica.

Monossacarídeos: 1mg de material seco de cada fração de parede celular foi pré-hidrolisado em 100µL de ácido sulfúrico 72% em banho-maria a 30°C por 45 minutos. Após este período foram adicionados 1,7mL de água destilada e o material foi autoclavado por 1 hora a 120°C. Em seguida o material foi neutralizado com hidróxido de sódio 50% e submetido à retirada de sais com resinas aniônicas (Dowex 1x8 50-100mesh, Cl Form Supelco) e catiônicas (Dowex 50wx8 50-100mesh, H Form Supelco). Os monossacarídeos foram analisados por cromatografia aniônica de alta resolução com detector amperométrico (HPAEC-PAC) utilizando coluna CarboPack PA1 num sistema Dionex DX-500, em corrida isocrática com fluxo de 1mL/min e injeção automática de 10µL. Foi utilizado padrão Sigma de monossacarídeos para comparação.

Classificação das proteínas: foi realizada segundo o método modificado de Chavan et al (2001). Amostras secas (2,5g) foram dispersas em 30mL de NaCl 5% e extraídas por 30 minutos em temperatura ambiente (25±1°C) usando um shaker MA830/A Marconi a 125 rpm. A suspensão foi centrifugada a 4000g por 20 minutos, em centrífuga Harrier 15/80 MSE, e o sobrenadante guardado. O resíduo foi reextraído uma vez no mesmo solvente e o sobrenadante somado ao anterior também guardado. O resíduo foi extraído sucessivamente com água deionizada, etanol 70% a 60°C e com NaOH 0,2% nas mesmas condições da

extração com solução salina. As frações solubilizadas foram coletadas separadamente e determinada proteína por Microkjeldahl. A mesma determinação foi feita no resíduo.

Eletroforese: foi realizada segundo Marsman et al (1997) e Maruyama et al (2003). As amostras foram extraídas em solução tampão Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, 2% de SDS, 1% de β -mercaptoetanol e 10% de glicerol, durante 1 hora sob agitação com barra magnética, após foram centrifugadas a 10000rpm por 30 minutos a 10°C. No sobrenadante foram quantificadas as proteínas totais por Microkjeldahl. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi usado para a análise (gel separador 12% e gel concentrador 4%). Uma alíquota contendo 2mg de proteína foi diluída em tampão de amostra e utilizada para a corrida em corrente elétrica de 100V. As bandas eletroforéticas foram reveladas e fixadas com solução metanol 40%, ácido acético 10% e água 50%, contendo 0,1% de corante Coomassie Brilhante Blue. O excesso do corante foi retirado com solução metanol 40%, ácido acético 10% e água 50%. O padrão utilizado foi o BenchMark Protein Ladder INVITROGEN, com bandas de 10 a 220KDa.

Hidroxirolina: foi realizada segundo Woessner (1961). A hidroxiprolina foi oxidada com cloramina T, ao complexo formado foi adicionado *para*-dimetilaminobenzaldeído e quantificado por absorção em Espectrofotômetro UV-visível Cintra 20 a 557 nm, usando uma curva de calibração de 9 pontos, com concentração de 0,5 a 2,5 μ g de hidroxiprolina e com $R^2 = 0,9958$.

Análise estatística: para caracterizar as frações quanto aos monossacarídeos foi aplicada estatística Multivariada para a interpretação dos resultados, empregando-se Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Agrupamentos (AA). Para isto, foram utilizados os procedimentos “Multivariate Exploratory Techniques” – “Cluster Analysis” e “Principal Componentes & Classification Analysis”, do programa computacional Statistica 6.0. Os dendogramas foram obtidos por estratégia de agrupamento não-ponderado aos pares e considerando-se a distância euclidiana como coeficiente de semelhança. A classificação das proteínas foi avaliada por ANOVA e para comparar a diferença das médias, o teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) foi usado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Carboidratos

As fibras de cotilédones de soja apresentaram concentrações de açúcares totais de 19,7mg/g (FAO) e 21,2mg/g (FAM), que representam os açúcares livres, enquanto que a grande maioria dos açúcares está associada formando os polissacarídeos. Além disso, muitos carboidratos solúveis foram retirados, por centrifugação, durante o processo industrial de obtenção das fibras de cotilédones. Karr-Lilienthal et al (2005) relataram que em dez amostras de grãos de soja, os açúcares livres encontrados foram galactose, glicose e frutose, com o total variando de 0,7mg/g a 4,7mg/g.

Com o fracionamento do material de parede celular das duas amostras de fibras alimentares (Tabela 1) foi observado que o componente majoritário foi a hemicelulose, totalizando 59% na amostra original e 51% na micronizada. A extração de hemicelulose foi realizada em três etapas para ser mais eficiente. A primeira extração removeu os polissacarídeos mais solúveis e promoveu o intumescimento das amostras. A segunda extração removeu hemiceluloses de baixo grau de polimerização (~100), enquanto que as hemiceluloses com maior grau de polimerização (~200) requerem uma solução de álcali mais forte, sendo retiradas na terceira extração (Selvendran e O'Neill, 1987). Ouhida et al (2002) também encontraram mais hemicelulose na fração insolúvel da farinha de soja, mas as quantidades do fracionamento foram diferentes, 40% de hemicelulose, 34% de pectina e 10,7% de celulose.

Tabela 1 – Rendimento do fracionamento da parede celular da fibra de soja (%).

Frações	FAO	FAM
Pectina	13,2 ±1,3	15,4 ±4,0
Hemicelulose (extraída em NaOH 0,1M)	12,4 ±0,5	13,2 ±0,2
Hemicelulose (extraída em NaOH 1M)	8,1 ±0,7	7,8 ±0,7
Hemicelulose (extraída em NaOH 4M)	38,5 ±2,1	30,1 ±5,2
Celulose	8,4 ±1,6	8,5 ±0,8

FAO= fibra alimentar original; FAM= fibra alimentar micronizada.

Média ± desvio padrão de análises em triplicata.

A pectina das duas amostras de fibras foi extraída com oxalato de amônio para ter a mínima degradação possível e máximo poder quelante dos cátions Ca e Mg, complexados com os resíduos dos ácidos galacturônicos (Selvendran e O'Neill, 1987). Esta fração rendeu 14%, em média, estando coerente com Karr-Lilienthal et al (2005), pois os autores comentaram que em parede celular de soja pode haver até 20% de ácidos galacturônicos. Stombaugh et al (2000) avaliou paredes celulares de quatorze variedades de soja, encontrando, em média, 10% de pectina, no entanto os autores definiram esta fração como a soma de galactose, arabinose, ramnose, fucose e ácidos urônicos. Os ácidos urônicos das fibras de cotilédones de soja foram quantificados nas frações pécticas e presumidamente considerados, sendo essencialmente do tipo galacturônico. As duas amostras apresentaram a mesma quantidade 17,1mg/g, cujo valor é muito similar ao encontrado na farinha de soja (1,58%), de uma dieta para aves, na qual era a única fonte de polissacarídeos (Karr-Lilienthal et al, 2005). Stombaugh et al (2000) encontrou valores superiores, 24mg/g. Huisman et al (1998) comentaram que 90% dos ácidos urônicos presentes na farinha de soja estão na fração insolúvel, isto pode ser uma indicação da complexidade ou diversidade das moléculas pécticas na parede celular.

A celulose representou o componente minoritário da FAO e FAM (8,5%), porque esta fração está localizada predominantemente nas cascas de soja (Stombaugh et al, 2000). Ouhida et al (2002) encontraram 10,7% de celulose nos cotilédones, mas as amostras incluíam as cascas, e comentaram que a maior parte da glicose estava na fração insolúvel das cascas. Brillouet e Carré (1983)

encontraram 11% de celulose, mas os autores usaram outro método de análise, hidrolisando a parede celular com TFA (ácido trifluoroacético) para a obtenção desta fração. A lignina teve, em média, 22%, mas esta fração está superestimada, porque durante a delignificação, carboidratos (5-10%), compostos fenólicos e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina são solubilizados em clorito sódico, o reagente usado para a delignificação (Selvendran e O'Neill, 1987). Brillouet e Carré (1983) encontraram menores quantidades de lignina (3,7%) ao analisar paredes celulares do grão de soja, porém usaram metodologias diferentes, a farinha dos grãos foi primeiramente hidrolisada com proteases e amilases e a lignina analisada por espectrofotometria.

Para uma avaliação em conjunto da capacidade de caracterização das amostras de fibras alimentares, utilizando a composição de monossacarídeos, empregou-se a Análise de Componentes Principais (ACP) e a Análise de Agrupamentos (AA). O primeiro ($\lambda_1 \cong 4,24$) e segundo componentes ($\lambda_2 \cong 1,19$) explicaram, em conjunto, 90,5% da variabilidade dos dados (Figuras 1 e 2). As equações (1) e (2), obtidas pelos *loadings* ou autovalores dos CPs, geraram as coordenadas (escores) do gráfico de componentes principais (Figura 1).

$$\text{CP1} = 0,922 \text{ fucose} + 0,963 \text{ arabinose/ramnose} + 0,957 \text{ galactose} - 0,978 \text{ glicose} + 0,768 \text{ xilose} + 0,012 \text{ manose} \quad (1)$$

$$\text{CP2} = 0,299 \text{ fucose} + 0,131 \text{ arabinose/ramnose} - 0,082 \text{ galactose} + 0,102 \text{ glicose} - 0,277 \text{ xilose} - 0,994 \text{ manose} \quad (2)$$

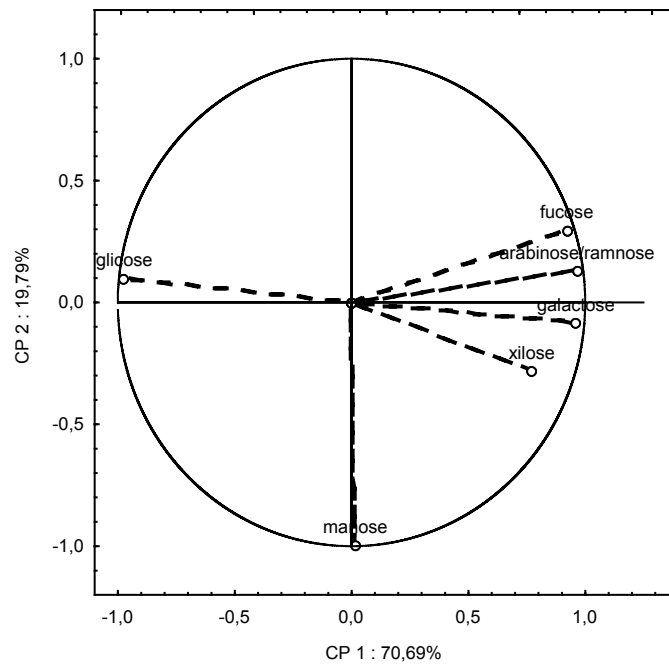
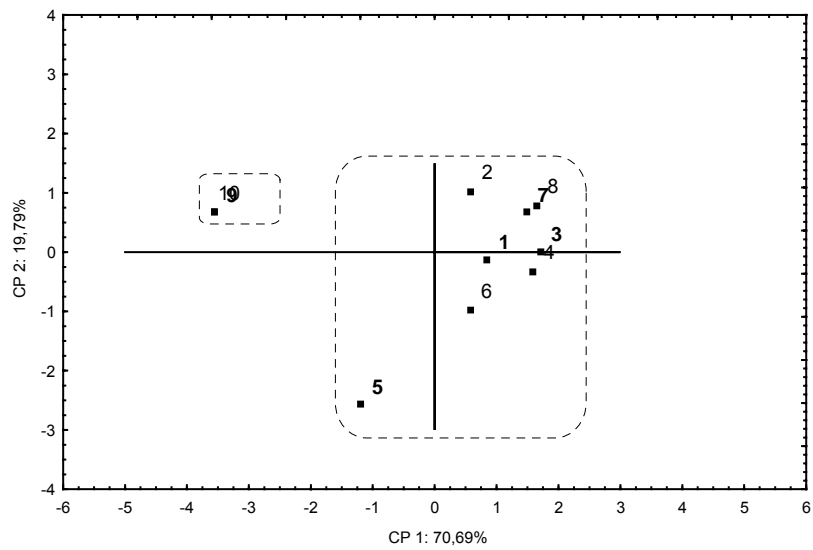


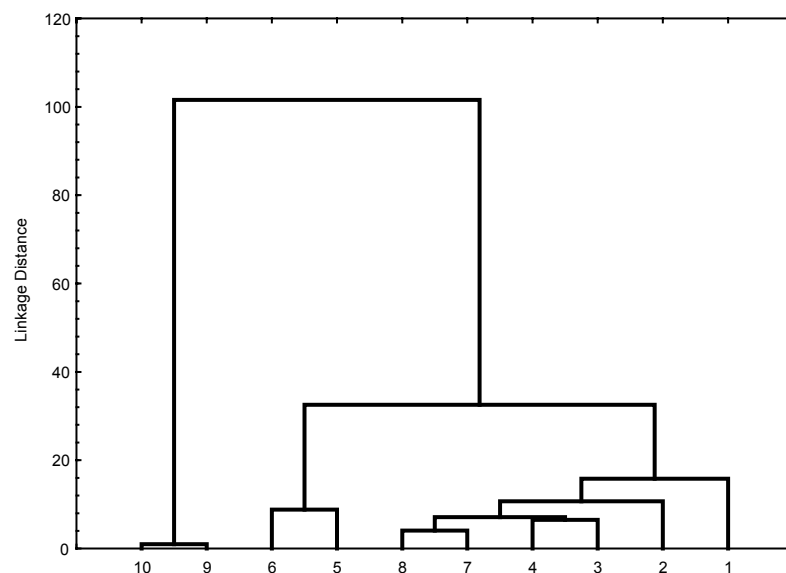
Figura 1 – Projeção das variáveis nos Componentes Principais 1 e 2.

Com o gráfico bidimensional da ACP e o dendograma da AA (Figuras 2 e 3), foi possível verificar a distinção de dois grandes grupos: (1) fração da celulose e (2) frações da pectina e das hemiceluloses (frações solúveis em NaOH 0,1M; NaOH 1M e NaOH 4M). As amostras do grupo 1 ficaram isoladas das demais, pois a fração de celulose é constituída somente de glicose. No grupo 2 houve a separação das amostras da fração de NaOH 1M, porque a FAO apresentou mais glicose e manose e menores níveis de arabinose/ramnose, provocando o deslocamento da amostra para baixo e para a esquerda do gráfico. As duas amostras de fibras apresentaram composição de monossacarídeos similar nas frações de hemicelulose, extraídas com NaOH 0,1M e NaOH 4M, e celulose. Na pectina, a FAO apresentou mais xilose e manose do que a FAM, por isso ficou locada mais abaixo. Estas diferenças podem ser pelo uso de diferentes variedades de soja no processamento, pois sendo as fibras produtos industriais, não se têm conhecimento de quais variedades foram utilizadas e a amostra original pode ser de variedade diferente da micronizada. Stombaugh et al (2003) analisando treze cultivares de soja, quanto aos monossacarídeos, encontraram diferenças nas composições devido às variedades.



1: FAO pectina; 2: FAM pectina; 3: FAO NaOH 0,1M; 4: FAM NaOH 0,1M; 5: FAO NaOH 1M; 6: FAM NaOH 1M; 7: FAO NaOH 4M; 8: FAM NaOH 4M; 9: FAO celulose; 10: FAM celulose.

Figura 2 – Análise de Componentes Principais obtidos a partir dos dados cromatográficos para análise de monossacarídeos.



1: FAO pectina; 2: FAM pectina; 3: FAO NaOH 0,1M; 4: FAM NaOH 0,1M; 5: FAO NaOH 1M; 6: FAM NaOH 1M; 7: FAO NaOH 4M; 8: FAM NaOH 4M; 9: FAO celulose; 10: FAM celulose.

Figura 3 – Dendrograma da Análise de Agrupamento obtido a partir dos dados cromatográficos para análise de monossacarídeos.

Os principais monossacarídeos das fibras alimentares de soja foram galactose, glicose e arabinose/ramnose (Figuras 4 e 5), o que está de acordo com relatos de literatura. Independentemente da metodologia utilizada, galactose, glicose, arabinose e ácidos urônicos são os principais componentes, encontrados em polissacarídeos de parede celular de cotilédones de soja, enquanto que xilose, ramnose e fucose são encontrados em menores quantidades. Os polissacarídeos geralmente são avaliados quanto aos teores de monossacarídeos e ácidos urônicos, os quais indicam a presença das frações, ou são determinados como fibras alimentares totais, solúveis e insolúveis, para após serem hidrolisados e então avaliar os monossacarídeos (Brillouet e Carré, 1983; Huisman et al, 1998; Mullin e Xu, 2000; Ouhida et al, 2002; Stombaugh et al, 2000).

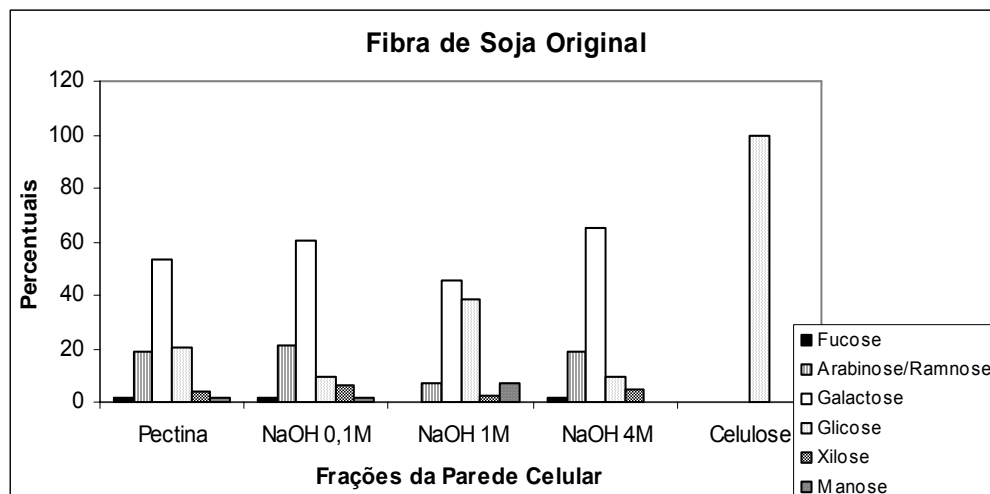


Figura 4 – Quantidades dos monossacarídeos em cada fração da fibra de cotilédones de soja original (%).

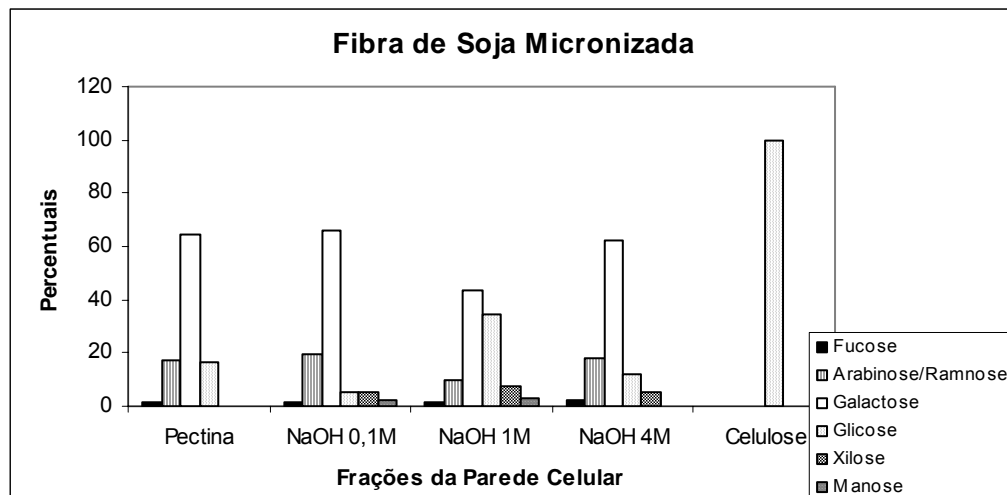


Figura 5 – Quantidades dos monossacarídeos em cada fração da fibra de cotilédones de soja micronizada (%).

Os compostos de parede celular, pectina, celulose e hemicelulose, são materiais higroscópicos, classificados como fibras alimentares insolúveis, e estão relacionados com as propriedades funcionais dos alimentos, por apresentar como principal característica físico-química a propriedade de hidratação e intumescimento (López et al, 1996). Esta propriedade tem sido relacionada com os efeitos fisiológicos proporcionados a quem ingere a quantidade diária recomendada de fibras totais (25-30g), sendo que 75% devem estar na forma insolúvel. Os benefícios descritos são: aumento da saciedade, regulação do trânsito intestinal, aumento do volume fecal (principalmente as insolúveis), redução do colesterol, aumento na excreção de sais biliares e prevenção de algumas doenças, incluindo o câncer de cólon (principalmente as solúveis) (Tharanathan e Mahadevamma, 2003).

Proteínas

A classificação protéica dos ingredientes alimentares derivados de soja foi realizada homogeneizando-os em diferentes solventes para obter as frações de proteínas extraídas em solução salina, água, etanol, solução alcalina e o resíduo (Tabela 2). As quantidades de proteínas extraídas da farinha desengordurada, do

concentrado protéico e das fibras de cotilédones apresentaram diferença estatística entre todas as frações solubilizadas e nos resíduos das extrações, com exceção dos percentuais solubilizados pelo etanol na farinha e no concentrado.

Tabela 2 – Proteínas de ingredientes de soja extraídas com diferentes solventes (% de proteínas solúveis em relação às proteínas totais).

Amostras	Extração com NaCl	Extração com água	Extração com etanol	Extração com NaOH	Resíduo
Farinha	46,72 ^a	6,26 ^c	2,96 ^c	18,40 ^d	26,31 ^b
	±1,95	±0,20	±0,19	±0,24	±3,62
Concentrado	10,26 ^d	2,69 ^d	1,49 ^c	47,08 ^a	36,96 ^a
	±0,47	±0,36	±0,19	±3,22	±3,85
FAO	25,12 ^b	16,78 ^a	9,12 ^a	30,46 ^c	16,78 ^c
	±0,42	±1,25	±0,95	±0,06	±0,45
FAM	17,51 ^c	9,07 ^b	6,08 ^b	37,88 ^b	26,82 ^b
	±1,08	±0,77	±0,98	±0,57	±2,38

FAO= fibra alimentar original; FAM= fibra alimentar micronizada.

Média de três extrações determinadas em duplicata ± desvio padrão, em base seca

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferiram ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

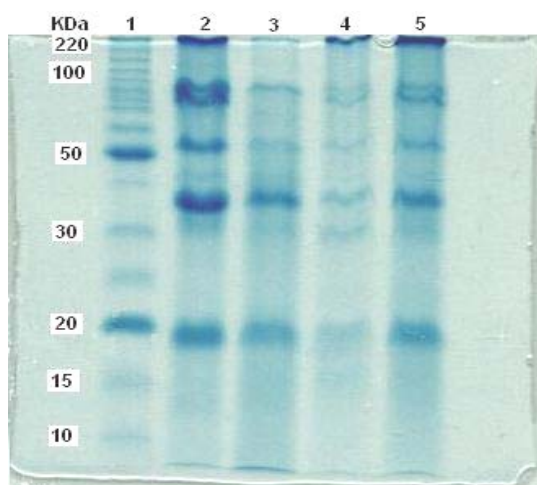
A farinha desengordurada de soja tinha 69% de proteínas, sendo a maior parte passível de extração com solução salina. O concentrado protéico tinha 76% de proteínas e a maior fração foi extraída em solução alcalina, assim como as amostras de fibras de cotilédones, que inicialmente tinham 24% (original) e 43% (micronizada) de proteínas. As proteínas que constituem o resíduo devem estar associadas com outros compostos e não foram extraídas com os quatro solventes utilizados. O concentrado apresentou o maior percentual de proteínas não extraíveis, seguido pela fibra alimentar micronizada e a farinha, a menor quantidade desta fração estava na fibra alimentar original.

As principais proteínas da soja são classificadas como globulinas, extraídas em solução salina e no grão esta fração pode corresponder até 80% do total destas macromoléculas (Liu, 1997). A farinha desengordurada, que é o primeiro produto sólido gerado no processamento da soja, teve a maior quantidade de proteínas nesta fração, pois foi a amostra com menor grau de processamento. As

outras amostras podem ter sido afetadas pelo processamento subsequente, que pode alterar as propriedades funcionais das proteínas, incluindo a solubilidade. Além disso, alguns polipeptídeos podem ser extraídos em outra classe, devido às associações com outras proteínas ou permanecer no resíduo insolúvel quando associados a outros compostos (Liu, 1997).

Os percentuais de proteínas extraídas das fibras de cotilédones de soja, neste trabalho, foram diferentes dos encontrados em cotilédones de beach pea (*Lathyrus maritimus* L.), uma leguminosa com 43% de proteínas e que contém amido. Chavan et al (2001) relataram que a maior fração de proteínas foi extraída com solução salina (62%), seguida pela extração alcalina (19%) e pela água (15%), mas os autores também encontraram o menor percentual de extração em etanol (3%). Estas variações são explicadas pelas diferenças das leguminosas e também porque os autores fizeram o processamento de separação dos cotilédones em laboratório, manualmente e logo após a colheita, sem os processamentos sofridos pela FAO e FAM.

Os quatro ingredientes alimentares derivados de soja apresentaram as proteínas majoritárias da leguminosa, β -conglucina e glicina, respectivamente, globulinas 7S e 11S (Figura 6). A β -conglucina é constituída de subunidades α , α' e β , com pesos moleculares de 84, 72 e 51KDa, respectivamente e a glicina tem subunidades ácidas (36-40KDa) e básicas (18-20KDa) (Garcia et al, 1997; Riblett et al, 2001). A glicina é a maior fração das proteínas totais do grão, 25-35%, é composta por no mínimo, seis subunidades não idênticas, totalizando um peso molecular de 350KDa, cada subunidade tem um polipeptídeo ácido associado a um básico por ligações dissulfeto e ligações de hidrogênio (Garcia et al, 1997; Liu, 1997; Sathe et al, 1987). Uma banda de menor intensidade foi verificada ao redor de 15KDa, nas quatro amostras, provavelmente é uma subunidade da glicina, a qual também foi verificada por Riblett et al (2001) quando avaliaram as frações 7S e 11S separadamente, esta fração foi revelada somente nas corridas de glicina, com baixa intensidade. Devido a diferenças na composição e estrutura, as globulinas 7S e 11S exibem diferenças nas características nutricionais e funcionais: todas as subunidades da β -conglucina são glicoproteínas, contendo 4-5% de carboidratos, e somente uma pequena porção de glicina é glicosilada; a 11S tem 3 a 4 vezes mais metionina e cisteína do que a 7S e melhor formação de gel, enquanto que a 7S tem melhor capacidade emulsificante (Liu, 1997).



1: padrão; 2: concentrado protéico; 3: farinha desengordurada; 4: fibra alimentar original; 5: fibra alimentar micronizada.

Figura 6 – Eletroforese dos ingredientes alimentares derivados de soja.

A farinha desengordurada é o primeiro produto sólido após a retirada do óleo, portanto rico em proteínas e o concentrado protéico é produzido com as proteínas solúveis da soja, principalmente β -conglucina e glicina. As fibras de cotilédones de soja são ricas em carboidratos, mas o segundo componente é proteína (28%), nas quais foi verificada uma fração remanescente de 7S e 11S, que devido aos vários processos sofridos podem ter tido a solubilidade diminuída, permanecendo na fração insolúvel. Estas proteínas podem não terem sido totalmente solubilizadas no processo de obtenção do isolado protéico, pois a solubilização ocorreu em pH 7-10 e a precipitação em pH 4,5, e segundo Liu (1997) o pH utilizado para a solubilização é 6,4 (11S) e 6,2 (7S) e a precipitação de 90% da fração 11S ocorre em pH 5,5, enquanto que em pH 4,5 a precipitação é constituída de 70% da 7S e 30% da 11S. Devido à presença destas proteínas, as fibras de cotilédones tiveram maior solubilidade em pH 6 e 7, original 7,7% e micronizada 10,6%, quando o efeito do pH na solubilidade protéica foi avaliado.

A eletroforese das proteínas das fibras também mostrou bandas com peso molecular próximo aos 30KDa, que provavelmente, são glicoproteínas de parede celular ricas em hidroxiprolina, extensinas, segundo Kleis-San Francisco e Tierney (1990) estas proteínas têm peso molecular de 30 a 33 KDa e têm a mesma quantidade de hidroxiprolina e prolina. Averyhart-Fullard et al (1988) avaliou

proteínas de parede celular de soja ricas em hidroxiprolina pela constituição de aminoácidos, 20% eram hidroxiprolina e 20% eram prolina, além destes, estas proteínas são ricas em serina, histidina e valina. A hidroxiprolina dos ingredientes alimentares foi quantificada, as amostras de fibras de cotilédones tiveram quantidades superiores (original 381,9ug/g e micronizada 359,3ug/g), às amostras protéicas (concentrado 218,2ug/g e farinha 191,5ug/g), mesmo tendo menores quantidades de proteínas, média de 28% nas fibras e 72% nos ingredientes protéicos. Estes resultados confirmam a presença de proteínas de parede celular e indicam que estas macromoléculas permanecem associadas aos outros compostos de parede celular. As extensinas são os componentes majoritários da parede celular primária, podendo conter 40% de hidroxiprolina, que está associada com arabinose na parede celular da soja. Durante o desenvolvimento do grão de soja a maioria das extensinas (30%) pode ser extraída por soluções salinas, no entanto, quando o grão é dessecado estas proteínas tornam-se insolúveis devido a mudanças irreversíveis na conformação da parede durante a secagem (Cassab e Varner, 1988; Waldron et al, 2003).

CONCLUSÕES

Os dois compostos majoritários da fibra de cotilédones de soja foram caracterizados. A maior fração de carboidratos é a hemicelulose. Com a constituição dos monossacarídeos das frações houve a distinção de dois grupos: (1) celulose e (2) pectina e hemiceluloses, sendo galactose, glicose e arabinose/ramnose, os principais componentes das amostras. A maioria das proteínas da farinha desengordurada de soja foi extraída em solução salina e a solução alcalina extraiu a maior quantidade de proteínas do concentrado protéico e das fibras de cotilédones. Na eletroforese dos quatro ingredientes alimentares derivados de soja foi constatada a presença das proteínas majoritárias, β -conglucina e glicina, além de bandas com peso molecular próximo aos 30KDa nas fibras dos cotilédones, sendo provavelmente glicoproteínas de parede celular, ricas em hidroxiprolina.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pelo financiamento desta pesquisa; ao Instituto de Botânica de São Paulo pelo uso do laboratório para a análise dos componentes de paredes celulares; à Professora Marta de Toledo Benassi pela ajuda na avaliação dos dados e à empresa Solae Company pelo fornecimento das amostras.

REFERÊNCIAS

AVERYHART-FULLARD, V.; DATTA, K.; MARCUS, A. A hydroxyproline-rich protein in the soybean cell wall. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.85, p.1082-1085, 1988.

BRETT, C.T.; WALDRON, K.W. The molecular components o the wall. In: BRETT, C.T.; WALDRON, K.W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. 2 ed. London : Chapman & Hall. 1996. p. 5-43.

BRILLOUET, J.M.; CARRÉ, B. Composition of cell walls from cotyledons of *Pisum Sativum*, *Vicia Faba* and *Glycine Max*. **Phytochemistry**, v.22, n.4, p.841-847, 1983.

CASSAB, G.I.; VARNER, J.E. Cell wall proteins. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.39, p.321-353, 1988.

CHAVAN, U.D.; MCKENZIE, D.B.; SHAHIDI, F. Protein classification of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). **Food Chemistry**, v.75, p.145-153, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350, 1956.

GARCIA, M.C.; TORRE, M.; MARINA, M.L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, n.4, p.361-391, 1997.

HUISMAN, M.M.H.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max*) meal. Isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v.37, p.87-95, 1998.

KARR-LILIENTHAL, L.K.; KADZERE, C.T.; GRIESHOP, C.M.; FAHEY Jr., G.C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. **Livestock Production Science**, v.97, p.1-12, 2005.

KINTNER, P.K.; VAN BUREN, J.P. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenil method. **Journal of Food Science**, v.47, p.756-764, 1982.

KLEIS-SAN FRANCISCO, S.M.; TIERNEY, M.L. Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings. **Plant Physiol.**, v.94, p.1897-1902, 1990.

LIU, K. Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. In: LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York : Chapman & Hall. 1997. p. 25-99.

LÓPEZ, G.; ROS, G.; RINCON, F.; PERIAGO, M.J.; MARTÍNEZ, M.C.; ORTUÑO, J. Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2773-2778, 1996.

MARSMAN, G.J.P.; GRUPPEN, H; MUL, A.J.; VORAGEN, A.G.J. *In vitro* accessibility of untreated, toasted, and extruded soybean meals for proteases and carbohydrases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.4088-4095, 1997.

MARUYAMA,N.; FUKUDA, T.; SAKA, S.; INUI, N.; KOTOH, J.; MIYAGAWA, M.; HAYASHI, M.; SAWADA, M.; MORIYAMA, T.; UTSUMI, S. Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins. **Phytochemistry**, v.64, p.701-708, 2003.

MULLIN, W.J.; XU, W. A study of the intervarietal differences of cotyledon and seed coat carbohydrates in soybeans. **Food Research International**, v.33, p.883-891, 2000.

OUHIDA,I.; PÉREZ, J.F.; GASA, J. Soybean (*Glycine max*) cell wall composition and availability to feed enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.1933-1938, 2002.

RIBLETT, A.L.; HERALD, T.J.; SCHMIDT, K.A.; TILLEY, K.A. Characterization of β -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4983-4989, 2001.

SATHE, S.K.; LILLEY G.G.; MASON, A.C.; WEAVER, C.M. High-resolution sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (*Glycine max* L.) seed proteins. **Cereal Chemistry**, v.64, n.6, p. 380-384. 1987.

SELVENDRAN, R.R.; O'NEILL, M.A. Isolation and analysis of cell walls from plant material. **Methods of Biochemical Analysis**, v.32, p.25-153, 1987.

STOMBAUGH, S.K.; ORF, J.H.; JUNG, H.G.; SOMERS, D.A. Relationships between soybean seed cell wall polysaccharides, yield, and seed traits. **Crop Science**, v.43, p.571-576, 2003.

STOMBAUGH, S.K.; JUNG, H.G.; ORF, J.H.; SOMERS, D.A. Genotypic and environmental variation in soybean seed cell wall polysaccharides. **Crop Science**, v.40, p.408-412, 2000.

THARANATHAN, R.N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes – a boon to human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, p.507-518, 2003.

WALDRON, K.W.; PARKER, M.L.; SMITH, A.C. Plant cell walls and food quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p.101-119, 2003.

WOESSNER, J.F., The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. **Arch. Biochem. Biophys**, v.93, p.440-447, 1961.

5.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FIBRAS DE COTILÉDONES DE SOJA [*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL] E CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E SÓLIDAS

RESUMO

Após a determinação das melhores condições, fibras alimentares obtidas de cotilédones de soja, original (FAO) e micronizada (FAM), foram hidrolisadas enzimaticamente com carboidrase (Viscozyme L – Novozymes) utilizando 200 μ L/g, durante 12 horas sob agitação a 30°C, e com protease (P3910 – Sigma) utilizando 150 μ L/g durante 5 horas sob agitação a 55°C. A fração sólida das fibras hidrolisadas com carboidrase apresentou maior quantidade de proteínas e aumento nas propriedades de hidratação: solubilidade, índice de absorção de água e volume de intumescimento; a fração solúvel foi composta de 73% dos carboidratos e 50% dos ácidos urônicos da quantidade inicial das amostras. A protease solubilizou 54% do total das proteínas das amostras, formando peptídeos com peso molecular menor que 10 KDa e uma banda de peso molecular próximo aos 25KDa, provavelmente a glicoproteína de parede celular, rica em hidroxiprolina, parcialmente hidrolisada e uma fração sólida contendo 76% de fibras alimentares totais. A eletroforese revelou as proteínas majoritárias da soja, β -conglucina e glicina nas fibras alimentares não hidrolisadas. As análises por microscopia eletrônica de varredura confirmaram que a amostra micronizada é constituída por partículas menores em relação à fibra alimentar original. A estrutura física da amostra original hidrolisada com protease ficou mais porosa superficialmente do que a fibra micronizada e a solubilização das proteínas parece ter deixado as amostras menos compactadas do que a solubilização dos carboidratos.

Palavras-Chave: fibras alimentares, enzimas, microscopia eletrônica de varredura, eletroforese, hidrolisados.

INTRODUÇÃO

Fibra dos cotilédones de soja é a fração insolúvel do processamento do isolado protéico, constituída principalmente de polissacarídeos de parede celular. As fibras alimentares são definidas como macromoléculas resistentes à digestão pelas enzimas do trato gastrointestinal humano e são essencialmente compostas de componentes de parede celular, tais como polissacarídeos e lignina. As fibras proporcionam efeitos fisiológicos a quem ingere a quantidade diária recomendada de fibras totais (25-30g), sendo que 75% desta quantidade deve ser fibra insolúvel, além de apresentar propriedades funcionais. A principal característica físico-química é a propriedade de hidratação, possivelmente pela presença de componentes de fibras alimentares insolúveis, como celulose, hemicelulose e lignina, que são materiais higroscópicos (Auffret et al, 1994; López et al, 1996; Tharanathan e Mahadevamma, 2003). No entanto, processos tecnológicos, como moagem, secagem, aquecimento e extrusão modificam as propriedades físicas da matriz, afetando as propriedades de hidratação (Guillon e Champ, 2000).

A incorporação de fibras em alimentos pode causar modificações indesejáveis, particularmente quanto ao sabor e textura, por isso estes polissacarídeos têm sofrido tratamentos antes do uso para alterar a complexa estrutura física existente em compostos de parede celular (Marsman et al, 1997; Tharanathan e Mahadevamma, 2003). Modificações intencionais podem ser por tratamentos químicos, mecânicos, enzimáticos ou térmicos, com objetivos de aumentar a funcionalidade e a disponibilidade de nutrientes, produzir hidrolisados com peptídeos definidos, isolar peptídeos fisiologicamente ativos e remover sabores ou odores, assim como compostos tóxicos (Lahl e Braun, 1994). A hidrólise enzimática é preferida em produtos alimentícios porque pode ser controlada, havendo uma alteração total, parcial ou específica, dependendo do interesse.

Após a hidrólise, os polissacarídeos de parede celular têm aumento de fibras solúveis; aumento do volume de intumescimento das fibras insolúveis, provavelmente pelo aumento da porosidade, e maior ou menor absorção de água, dependendo do tamanho e da distribuição dos poros (Guillon e Champ, 2000). Também aumenta a digestibilidade dos componentes da parede celular, por produzir compostos mais solúveis (Karr-Lilienthal et al, 2005). O efeito nas proteínas é

percebido, principalmente nas propriedades funcionais, aumento da solubilidade, da capacidade emulsificante e espumante; além de melhorar a disponibilidade dos aminoácidos (Fischer et al, 2001; Tsumura et al, 2005).

O objetivo do trabalho foi hidrolisar enzimaticamente fibras de cotilédones de soja, usando carboidrase e protease comercial, e caracterizar os hidrolisados solúveis e sólidos.

MATERIAL E MÉTODOS

A matéria-prima utilizada foi fibra de cotilédones de soja, fibra alimentar original (FAO) e fibra alimentar micronizada (FAM), fornecidas pela empresa Solae Company (Esteio/RS). As enzimas utilizadas foram carboidrase de *Aspergillus aculeatus* Viscozyme L (Novozymes), atividade 100unidades/mL, lote KTN02106 e protease de *Bacillus licheniformis* P3910 (Sigma), E.C. 3.4.21.14.

Planejamento experimental: O experimento fatorial escolhido foi 2^3 mais dois pontos centrais, totalizando 10 experimentos, realizados em duplicata e aleatoriamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Planejamento da hidrólise de carboidratos e proteínas de fibras de cotilédones de soja (experimento fatorial 2³ com dois pontos centrais, variáveis codificadas e não codificadas).

Experi- mento	Carboidratos			Proteínas		
	X1 concen- tração (µL)	X2 tempo de hidrólise (min)	X3 tempera- tura (°C)	X1 concen- tração (µL)	X2 tempo de hidrólise (min)	X3 tempera- tura (°C)
1	-1 (100)	-1 (20)	-1 (30)	-1 (50)	-1 (20)	-1 (55)
2	+1 (200)	-1 (20)	-1 (30)	+1 (150)	-1 (20)	-1 (55)
3	-1 (100)	+1 (40)	-1 (30)	-1 (50)	+1 (40)	-1 (55)
4	+1 (200)	+1 (40)	-1 (30)	+1 (150)	+1 (40)	-1 (55)
5	-1 (100)	-1 (20)	+1 (50)	-1 (50)	-1 (20)	+1 (65)
6	+1 (200)	-1 (20)	+1 (50)	+1 (150)	-1 (20)	+1 (65)
7	-1 (100)	+1 (40)	+1 (50)	-1 (50)	+1 (40)	+1 (65)
8	+1 (200)	+1 (40)	+1 (50)	+1 (150)	+1 (40)	+1 (65)
9	0 (150)	0 (30)	0 (40)	0 (100)	0 (30)	0 (60)
10	0 (150)	0 (30)	0 (40)	0 (100)	0 (30)	0 (60)

Para a hidrólise dos carboidratos o pH da solução extratora (água) foi fixado em $5,5 \pm 0,1$ e ajustado com NaOH 5% e HCl 10%. Os fatores avaliados foram: concentração de enzima (100µL, 150µL e 200µL por grama de amostra), tempo de hidrólise (20, 30 e 40 minutos) e temperatura (30°C, 40°C e 50°C). Para a hidrólise das proteínas o pH da solução extratora (água) foi fixado em $7,5 \pm 0,1$ e ajustado com as mesmas soluções do ensaio para os carboidratos. Os três fatores avaliados foram: concentração de enzima (50µL, 100µL e 150µL por grama de amostra), tempo de hidrólise (20, 30 e 40 minutos) e temperatura (55°C, 60°C e 65°C). As hidrólises foram realizadas com agitação em Banho Dubnoff T-053 TECNAL.

Os carboidratos solúveis foram determinados pelo método fenol-sulfúrico, segundo Dubois (1956), quantificados por absorção em Espectrofotômetro UV-visível Cintra 20 a 490nm, usando uma curva de calibração de 10 pontos, com concentração de 10 a 100ug de glicose e com $R^2 = 0,9961$. As proteínas solúveis

foram determinadas segundo Lowry (1951), quantificadas por absorção em Espectrofotômetro UV-visível Cintra 20 a 490nm, usando uma curva de calibração de 10 pontos, com concentração de 40 a 400ug de albumina de soro bovina e com $R^2 = 0,9929$. Nas amostras sem tratamento foram determinados carboidratos e ácidos urônicos solúveis em etanol 80% e proteínas solúveis em água (ponto inicial). Em amostras completamente hidrolisadas (ponto final), para os carboidratos totais foi realizada uma hidrólise com ácido sulfúrico 72% em autoclave por 1 hora e para proteínas, Microkjeldahl (usando sulfato de cobre e sulfato de potássio como catalisadores e calculadas com fator de correção 6,25).

Após obter a indicação das condições com as maiores solubilizações foram realizados novos experimentos para definir qual o tempo de hidrólise necessário para maximizar a solubilização de carboidratos e proteínas. Para a solubilização dos carboidratos foi utilizada a carbohidrase em concentração de 200 μ L/g de amostra e a temperatura de hidrólise foi 30°C. Para a solubilização das proteínas foi utilizada a protease em concentração de 150 μ L/g de amostra e a temperatura de hidrólise foi 55°C. As análises foram realizadas de hora em hora, com o ponto inicial após 30 minutos de hidrólise, em banho-maria, como descrito anteriormente, assim como o ajuste do pH da solução extratora (água). O ponto final da hidrólise enzimática foi definido experimentalmente, verificando-se o menor tempo para obter a máxima solubilização. As frações solúveis foram determinadas com os métodos acima citados.

Análise dos hidrolisados: Após a verificação dos menores tempos de hidrólise para obter o percentual máximo de carboidratos e proteínas solúveis, foram realizados novos ensaios, com as condições ideais, para a caracterização das frações solúveis e sólidas. Os resíduos sólidos, após as hidrólises, foram secos em uma fina camada sobre lâmina de vidro em estufa com circulação e renovação de ar TE-394/3 TECNAL a 30°C. Os sólidos foram recuperados e triturados em moinho para pequenas amostras IKA A11 basic QUIMIS. Nos sólidos oriundos da ação da carbohidrase foram determinadas proteínas totais, que foram avaliadas para funcionalidade e peso molecular (por eletroforese). As frações sólidas da hidrólise com a protease foram avaliadas quanto aos teores de proteínas totais usando o método de Microkjeldahl e de fibras alimentares solúveis, insolúveis e totais, com a metodologia enzimática-gravimétrica segundo o método nº 985.29 da AOAC (1995) usando o kit de ensaio de fibra alimentar total da Sigma (TDF 100A) e tampão

fosfato 0,08M pH 6. Na fração solúvel da hidrólise com a carboidrase foram determinados carboidratos totais e ácidos urônicos e a fração oriunda do ensaio com protease foi caracterizada por eletroforese. A estrutura física dos hidrolisados sólidos, assim como das amostras não hidrolisadas, foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura.

Solubilidade em diferentes pHs: Um grama de amostra foi suspensa em 25mL de soluções tampão McIlvaine em pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0, e agitada por 30 minutos em shaker horizontal Marconi MA830/A (125 rpm a temperatura ambiente). Após centrifugação (3000 rpm por 20 minutos, em centrífuga Harrier 15/80 MSE), as amostras foram filtradas em papel filtro Whatman n° 3. No sobrenadante foi determinada proteína, pelo método de Microkjeldahl, usando uma alíquota de 2mL.

$$\% \text{proteína solúvel} = \frac{\text{Proteína solúvel no sobrenadante}}{\text{Proteína total}} \times 100$$

Volume de intumescimento: um grama de amostra foi misturado com excesso de água destilada em proveta de 100 mL. A suspensão foi continuamente agitada por 2 horas com barra magnética e posteriormente deixada em repouso para completa decantação. O volume ocupado pela amostra na proveta foi denominado volume de intumescimento e foi expresso em mL/grama de matéria seca.

Índice de absorção de água: dois gramas de amostra foram misturados com 20 mL de água destilada a temperatura ambiente em tubos de centrífuga, previamente pesados, foram continuamente agitados durante 30 minutos em agitador horizontal Marconi MA830/A (75 rpm a temperatura ambiente), e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos em centrífuga Harrier 15/80 MSE. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o sedimento úmido pesado. O IAA foi obtido através da razão entre o peso do sedimento úmido e o peso da matéria seca, e expresso em gramas de água absorvida / grama de matéria seca.

Índice de absorção de óleo: foi determinado como o índice de absorção de água, substituindo a água por óleo de soja comercial.

Capacidade emulsificante: um grama de amostra e 50mL de água destilada foram homogeneizados por 30 segundos e adicionado óleo de soja a uma taxa de 10mL/min e misturados com shaker DIAX 600 Heidolph, em velocidade máxima. O ponto de inversão de fase foi registrado visualmente com a liquefação da

emulsão. A capacidade emulsificante foi calculada como a quantidade de óleo emulsificado por grama de amostra.

Atividade emulsificante: um grama de amostra, 10 mL de água destilada e 10 mL de óleo de soja comercial foram emulsificados em um béquer de 100 mL com shaker DIAX 600 Heidolph por 1 minuto, em velocidade máxima. A suspensão foi centrifugada em tubos graduados a 3600 rpm por 10 minutos em centrífuga Harrier 15/80 MSE, onde o volume da camada emulsificada e o volume total foram lidos.

$$\text{Atividade emulsificante} = \frac{\text{V da camada emulsificada}}{\text{V total no tubo}} \times 100$$

Eletroforese: foi realizada segundo Marsman et al (1997) e Maruyama et al (2003). As amostras foram extraídas em solução tampão Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, 2% de SDS, 1% de β -mercaptoetanol e 10% de glicerol, durante 1 hora sob agitação com barra magnética, após foram centrifugadas a 10000 rpm por 30 minutos a 10°C. No sobrenadante foram quantificadas as proteínas totais por Microkjeldahl. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi usado para a análise (gel separador 12% e gel concentrador 4%). Uma alíquota contendo 2mg de proteína foi diluída em tampão de amostra e utilizada para a corrida em corrente elétrica de 100V. As bandas eletroforéticas foram reveladas e fixadas com solução metanol 40%, ácido acético 10% e água 50%, contendo 0,1% de corante Coomassie Brilhante Blue. O excesso do corante foi retirado com solução metanol 40%, ácido acético 10% e água 50%. O padrão utilizado foi o BenchMark Protein Ladder INVITROGEN, com bandas de 10 a 220KDa.

Microscopia eletrônica de varredura: as amostras secas foram colocadas sobre uma fita de carbono dupla face, a qual foi colada em "stubs". As amostras foram recobertas com ouro em metalizador BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 200 (FEI) da Philips, sob tensão de 20KV.

Densidade direta: foi determinada diretamente, utilizando um cilindro de vidro graduado para medir 9 mL, este volume foi pesado e a densidade foi calculada pela razão de peso e volume e expressa em g/mL.

Análise estatística: o planejamento experimental foi gerado e avaliado pelo programa Statistica 5.1. Os resultados das amostras foram avaliadas

por ANOVA e para comparar a diferença das médias, o teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) foi usado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento fatorial indicou os fatores e níveis que produziram maior solubilização e se haviam interações entre os fatores. As médias dos experimentos (Tabela 2), com a avaliação estatística, indicaram efeito positivo da concentração de enzima na produção de carboidratos solúveis. O nível superior de concentração enzimática (experimentos 2, 4, 6 e 8) teve um efeito positivo na solubilização dos carboidratos de 2,8% para FAO e 2,2% para FAM, quando comparado à menor concentração de enzima.

As proteínas solúveis da FAO tiveram efeito positivo de 10,2% quando usado o maior nível de concentração enzimática e 8% com maior tempo de hidrólise. Para a amostra micronizada houve interação entre tempo e temperatura, se usados nos maiores níveis (experimentos 7 e 8) houve efeito positivo de 6,8% em proteínas solubilizadas. Outra interação foi entre concentração de enzima e temperatura de hidrólise que produziu efeito positivo de 9,5% quando um dos fatores fosse utilizado no nível superior e outro no inferior, mas quando a concentração foi utilizada no maior nível o efeito positivo foi de 12% (experimentos 2 e 4).

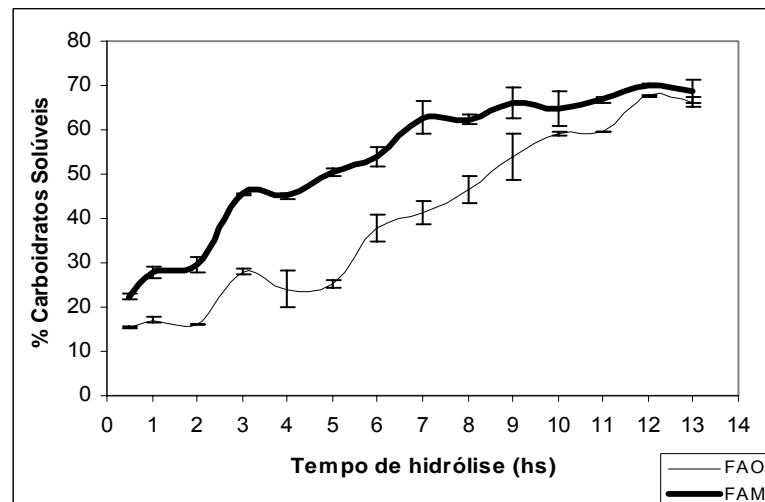
Tabela 2 – Carboidratos e proteínas solúveis das fibras de cotilédones, após hidrólise enzimática (experimento fatorial 2³ mais dois pontos centrais).

Experimentos	% Carboidratos Solúveis		% Proteínas Solúveis	
	FAO	FAM	FAO	FAM
1	7,4 ±1,5	9,8 ±0,3	15,4 ±0,6	26,5 ±1,5
2	11,2 ±0,3	12,8 ±1,9	26,9 ±1,0	41,5 ±0,2
3	6,8 ±0,5	10,1 ±0,4	24,2 ±3,5	18,0 ±0,8
4	9,4 ±0,1	13,4 ±0,3	36,3 ±1,3	46,0 ±1,2
5	6,6 ±0,4	11,3 ±0,8	19,9 ±0,5	28,6 ±1,6
6	9,7 ±0,2	13,4 ±1,3	29,5 ±1,2	35,2 ±0,3
7	7,5 ±0,5	11,5 ±0,9	27,8 ±1,2	44,3 ±3,4
8	9,0 ±0,3	11,8 ±1,1	35,3 ±0,5	42,6 ±1,9
9	8,8 ±0,3	13,5 ±0,4	21,9 ±1,6	26,0 ±0,2
10	10,2 ±0,8	12,1 ±1,2	24,8 ±0,6	26,2 ±2,3

FAO: fibra alimentar original. FAM: fibra alimentar micronizada

Médias dos experimentos realizados em duplicata. Carboidratos e proteínas solúveis, em relação ao total destes compostos nas amostras, em base seca.

Um novo experimento de solubilização dos carboidratos foi realizado para saber qual o tempo necessário para a obtenção da extração máxima dos carboidratos, utilizando a concentração máxima de enzima (200µL/g) e a mínima temperatura de hidrólise (30°C), já que este fator não apresentou influência (Figura 1). A solubilização dos carboidratos foi determinada por até 13 horas, mas a partir das 7 horas de hidrólise a fibra alimentar micronizada não apresentou mais diferença estatística, enquanto que a fibra alimentar original teve o mesmo comportamento a partir das 10 horas de hidrólise. As duas amostras tiveram valor máximo de solubilização após 12 horas de hidrólise, original 68% e micronizada 70%, portanto este foi considerado o menor tempo para obter a maior extração de carboidratos.



FAO: fibra alimentar original. FAM: fibra alimentar micronizada

Figura 1 – Tempo de hidrólise enzimática para obter a solubilização máxima dos carboidratos das fibras de cotilédones de soja.

Para comparar a capacidade de hidrólise da enzima foram determinados os açúcares solúveis nas amostras sem tratamento e foram feitas hidrólises químicas, com ácido sulfúrico 72%, presumidamente considerando que a quantidade máxima de carboidratos da amostra seria hidrolisada. A quantidade de carboidratos solubilizados pela ação da enzima foi a mesma, na fibra micronizada (70%), que a solubilização promovida pela hidrólise química (Tabela 3). A amostra original teve a solubilidade diminuída em 6% quando tratada enzimaticamente, isto pode ter ocorrido pela diferença no tamanho das partículas. Sendo assim, pode-se dizer que esta enzima é adequada para hidrolisar os carboidratos das fibras de cotilédones de soja, pois uma completa hidrólise não é conseguida, devido à complexidade estrutural dos carboidratos da soja (Fischer et al, 2001).

Tabela 3 – Médias dos carboidratos e proteínas solúveis antes do tratamento e após a hidrólise química (solubilidade em relação ao total de cada composto).

Experimentos	% Carboidratos Solúveis		% Proteínas Solúveis	
	FAO	FAM	FAO	FAM
Sem Tratamento	4,0 ±0,1	8,5 ±0,3	7,9 ±0,6	13,3 ±0,4
Hidrólise Química	73,9 ±2,5	70,0 ±0,9	28,2* ±0,2	27,6* ±0,1

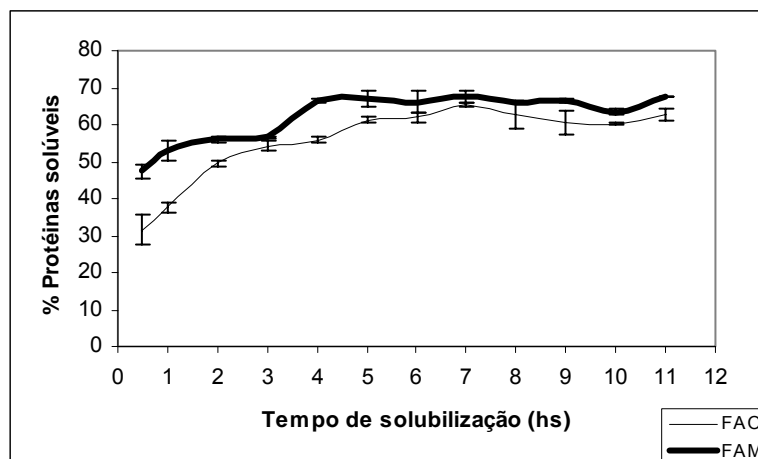
FAO: fibra alimentar original. FAM: fibra alimentar micronizada

Médias das determinações realizadas em triplicata, em base seca.

* total de proteínas presentes na amostra, em base seca.

Para que o experimento do tempo fosse realizado com as duas amostras, e assim obter a máxima solubilização das proteínas, a temperatura ideal foi baseada nos resultados da amostra micronizada, pois este fator não influenciou na amostra original. Assim, foram utilizadas a maior concentração (150µL/g) e a menor temperatura de hidrólise (55°C), evitando a desnaturação protéica (Figura 2). As duas amostras foram hidrolisadas por até 11 horas. A amostra original não apresentou diferença estatística a partir de 5 horas de hidrólise, onde a quantidade de proteínas solubilizadas foi a mesma (61%). Para a amostra micronizada, o máximo da extração (67%) ocorreu com 4 horas, portanto, o menor tempo para a máxima solubilização das proteínas das fibras de soja é de 5 horas.

Após a determinação dos menores tempos capazes de solubilizar os maiores percentuais de carboidratos e proteínas, foi possível a realização de novas hidrólises, com as condições ideais para a carbohidrase e para a protease, tendo como objetivo a caracterização das frações solúveis e sólidas.



FAO: fibra alimentar original. FAM: fibra alimentar micronizada

Figura 2 – Tempo de hidrólise enzimática para obter a solubilização máxima das proteínas das fibras de cotilédones de soja.

As frações sólidas da hidrólise com carbohidrase tiveram, em média, 62% a mais de proteínas do que as amostras antes da hidrólise (Tabela 4), portanto, se há interesse em aumentar rendimento em proteínas por extração, a aplicação da Viscozyme L poderia extrair quantidades adicionais de proteínas. A hidrólise enzimática afetou as propriedades tecnológicas dos materiais sólidos resultantes da hidrólise. O índice de absorção de água (IAA) foi menor após a hidrólise, enquanto que o volume de intumescimento (VI) foi maior, provavelmente devido às mudanças na estrutura física ocorridas durante a hidrólise, pois o IAA depende da conformação molecular, tamanho das partículas, números de sítios de ligação das moléculas e força de centrifugação e o VI depende da densidade, porosidade e solubilidade (Auffret et al, 1994; Chou e Morr, 1979; Thibault et al, 1992). O VI da fração sólida da hidrólise da FAM foi menor que da FAO, provavelmente devido às diferenças ocorridas em consequência da diminuição do tamanho das partículas pela micronização. Guillon e Champ (2000) justificaram o aumento do volume de intumescimento das fibras insolúveis, provavelmente pelo aumento da porosidade, e a menor absorção de água pelo tamanho e distribuição dos poros.

Tabela 4 – Proteínas e propriedades funcionais da fração sólida, carboidratos totais e ácidos urônicos da fração solúvel das fibras dos cotilédones de soja após a hidrólise com a carbohidrase, comparadas com as amostras não hidrolisadas.

Amostras	Frações Sólidas					Frações Solúveis	
	Proteínas (%)	IAA	VI	IAO	AE	Carboidratos Totais (%)	Ácidos Urônicos (mg/g)
FAO não hidrolisada	28,2 ^b ± 6,5	8,4 ^a ± 0,2	17,2 ^c ± 1,0	2,5 ^a ± 0,1	52,4 ^a ± 1,4	64,6 ^a ± 0,2	17,5 ^a ± 0,3
FAO após a hidrólise	45,5 ^a ± 1,6	4,1 ^c ± 0,1	31,0 ^a ± 0,3	2,4 ^a ± 0,2	7,9 ^b ± 1,2	47,8 ^b ± 0,2	8,5 ^b ± 0,1
FAM não hidrolisada	27,6 ^b ± 0,1	5,7 ^b ± 0,1	18,0 ^c ± 0,5	2,4 ^a ± 0,1	53,0 ^a ± 0,3	65,2 ^a ± 0,4	17,4 ^a ± 0,1
FAM após a hidrólise	45,0 ^a ± 1,2	3,3 ^d ± 0,1	21,5 ^b ± 0,8	2,4 ^a ± 0,2	9,4 ^b ± 2,0	46,5 ^b ± 0,7	8,1 ^b ± 0,1

FAO= fibra alimentar original; FAM= fibra alimentar micronizada. IAA= índice de absorção de água (g água absorvida/ g de amostra); VI= volume de intumescimento (mL de água/ g de amostra); IAO= índice de absorção de óleo (g óleo absorvido/ g de amostra); AE= atividade emulsificante (%).

Médias de determinações em triplicata. Proteínas, carboidratos totais e ácidos urônicos, em base seca.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferiram ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

O índice de absorção de óleo (IAO) não sofreu influência da hidrólise enzimática. A atividade emulsificante das frações sólidas das fibras hidrolisadas foi menor do que as amostras não hidrolisadas e a capacidade emulsificante não pôde ser verificada porque durante a determinação não houve a formação da emulsão. As propriedades emulsificantes são típicas de produtos protéicos e estão relacionadas com a solubilidade, mas não basta ter maior quantidade de proteínas com maior solubilidade, é necessário ter aumento na razão hidrofobicidade/hidrofilicidade, pois uma hidrofobicidade relativamente elevada favorece as características emulsificantes das proteínas da soja (Sgarbieri, 1998). Estas características são atribuídas principalmente à combinação de gordura aos grupos não polares das proteínas ou à disponibilidade de grupos lipofílicos (Padilla et al, 1996). Provavelmente a ação enzimática, juntamente com a secagem das frações sólidas das fibras alimentares hidrolisadas com carbohidrase, mudaram a conformação e

indisponibilizaram os grupos não polares das proteínas, ocorrendo associações proteína-proteína, produzindo uma superfície compactada (Figura 4E e 4F).

A quantidade total dos ácidos urônicos, das fibras alimentares antes da hidrólise, é a soma dos ácidos quantificados na fração péctica (17,1mg/g) e na extração com etanol antes do fracionamento (0,3mg/g). Huisman et al (1998) comentaram que 90% dos ácidos urônicos da farinha de soja estão na fração insolúvel, isto pode ser uma indicação da complexidade ou diversidade das moléculas pécticas na parede celular. Sendo as fibras a fração insolúvel da farinha é coerente apresentar 98% do total dos ácidos urônicos nas pectinas. A carbohidrase foi capaz de solubilizar 73% dos carboidratos totais e 50% dos ácidos urônicos da quantidade inicial. Fischer et al (2001) solubilizaram 76% dos carboidratos de farinha de soja após tratamento enzimático e comentaram que a extração incompleta é devido à complexa estrutura dos compostos majoritários da soja. Marsman et al (1997) solubilizaram praticamente a metade dos ácidos urônicos presentes em farinha de soja, quando utilizaram enzima para degradação de parede celular, mas isto ocorreu somente após 24 horas de hidrólise.

O efeito do pH na solubilidade protéica de fibras alimentares e das frações sólidas das fibras hidrolisadas com a carbohidrase foi avaliado utilizando soluções com pH de 3,0 a 7,0 (Tabela 5). Para os ingredientes de fibra alimentar o conteúdo de proteínas solúveis foi menor no pH 3,0 (original 5,7% e micronizada 4,7%), atingindo máximo de 10,7% na solução com pH 7,0, pois a proteína solúvel já havia sido extraída no processo industrial de produção de isolado protéico. As frações sólidas oriundas da hidrólise com carbohidrases tiveram maior solubilidade protéica, em todas as soluções avaliadas, quando comparadas com as amostras não hidrolisadas ($p > 0,05$). O hidrolisado sólido da fibra original teve a solubilidade triplicada e o hidrolisado oriundo da fibra micronizada duplicada, esta diferença pode ser devido à diminuição das partículas pela micronização. As quantidades de proteínas solúveis nos pHs 3,0; 5,0 e 6,0 das frações sólidas da fibra alimentar original foram maiores do que as frações sólidas da fibra alimentar micronizada, provavelmente devido às diferenças nas conformações e agregações formadas pelas proteínas e também do tamanho e da distribuição dos poros (Guillon e Champ, 2000).

Tabela 5 – Efeito do pH na solubilidade protéica das frações sólidas das fibras dos cotilédones de soja após a hidrólise enzimática com a carbohidrase, comparadas com as fibras não hidrolisadas (% de proteínas solúveis em relação às proteínas totais).

Amostras	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
FAO não hidrolisadas	5,7 ^c ± 0,5	6,0 ^b ± 0,5	6,7 ^d ± 0,1	7,7 ^c ± 0,4	7,6 ^c ± 0,1
FAO após a hidrólise	13,5 ^a ± 0,3	15,2 ^a ± 1,8	18,6 ^a ± 0,4	20,8 ^a ± 0,3	19,5 ^a ± 0,6
FAM não hidrolisadas	4,7 ^c ± 0,3	6,4 ^b ± 0,7	9,6 ^c ± 0,3	10,5 ^c ± 0,3	10,7 ^b ± 0,3
FAM após a hidrólise	10,4 ^b ± 0,4	12,5 ^a ± 0,7	13,3 ^b ± 0,4	16,4 ^b ± 2,2	19,8 ^a ± 1,6

FAO= fibra alimentar original; FAM= fibra alimentar micronizada.

Médias de determinações em triplicata, em base seca.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferiram ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

As frações sólidas das fibras alimentares, original e micronizada, hidrolisadas com a protease, foram avaliadas quanto aos teores de proteínas e fibras alimentares e comparadas com os resultados das amostras antes da hidrólise (Tabela 6). Em média a protease foi capaz de solubilizar 54% do total das proteínas presentes nas amostras, assim o percentual de fibras alimentares totais aumentou de 60% para 76%, sendo as fibras insolúveis, as frações majoritárias nas duas amostras, antes e depois da hidrólise. Estas frações sólidas das hidrólises podem ser utilizadas como ingredientes em vários produtos, pois o aumento da concentração de fibras totais permite o uso como ingrediente (fonte de fibras) em concentrações menores em comparação com os ingredientes originais. Além disso, podem ser usados como componentes benéficos à saúde, pois as fibras apresentam efeitos fisiológicos proporcionados a quem ingere a quantidade diária recomendada, 25 a 30g no total, sendo que 75% desta quantidade devem estar na forma insolúvel. Os benefícios descritos são: aumento da saciedade, regulação do trânsito intestinal, aumento do volume fecal (principalmente as insolúveis), redução do colesterol, aumento na excreção de sais biliares e prevenção de algumas doenças, incluindo o câncer de cólon (principalmente as solúveis) (Tharanathan e Mahadevamma, 2003).

Tabela 6 – Caracterização das fibras de cotilédones de soja não hidrolisadas e das frações sólidas das fibras hidrolisadas com a protease (%).

Amostras	Proteínas	Fibras		Fibras totais
		insolúveis	solúveis	
FAO não hidrolisada	28,2 ^a ± 6,5	55,5 ^b ± 0,5	3,8 ^c ± 0,1	59,4 ^c ± 0,4
FAO após a hidrólise	16,1 ^b ± 0,2	70,6 ^a ± 1,2	4,4 ^{bc} ± 0,6	75,0 ^a ± 0,8
FAM não hidrolisada	27,6 ^a ± 0,1	56,6 ^b ± 0,4	5,9 ^{ab} ± 1,0	62,5 ^b ± 0,6
FAM após a hidrólise	14,8 ^b ± 0,3	72,4 ^a ± 1,8	4,9 ^{bc} ± 0,1	77,2 ^a ± 1,8

FAO: fibra alimentar original. FAM: fibra alimentar micronizada

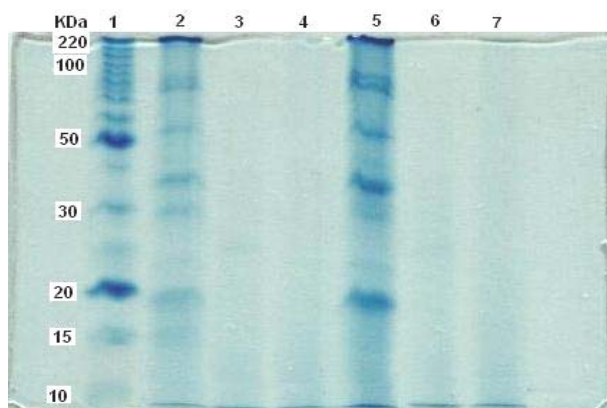
Médias de determinações em triplicata, em base seca.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferiram ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

As frações solúveis da proteólise foram avaliadas quanto ao peso molecular dos peptídeos, juntamente com as proteínas das fibras alimentares não hidrolisadas e das proteínas das amostras tratadas com carboidrase (Figura 3). Para a eletroforese em gel foi usado 2mg de proteínas solubilizadas em tampão (Tris-HCl, SDS, β -mercaptoetanol e glicerol). Os sobrenadantes da hidrólise com a protease foram diluídos no tampão, enquanto que as outras amostras foram extraídas neste tampão. Para as duas amostras de fibras alimentares a extração das proteínas foi total, mas parcial para as amostras de fibras hidrolisadas com carboidrase, original 60% e micronizada 50%.

A fração protéica remanescente nas fibras é parte das proteínas majoritárias da soja, β -conglucina e glicina, respectivamente, globulinas 7S e 11S. As amostras apresentaram as subunidades que constituem a β -conglucina, α , α' e β , com pesos moleculares de 84, 72 e 51KDa, respectivamente, e as subunidades ácidas (36-40KDa) e básicas (18-20KDa) que compõem a glicina (Garcia et al, 1997; Riblett et al, 2001). Uma banda de menor intensidade foi verificada em 15KDa, sendo provavelmente uma subunidade da glicina, também verificada por Riblett et al (2001), quando avaliaram as frações 7S e 11S separadamente, esta banda foi revelada na eletroforese de glicina, com baixa intensidade. De acordo com a análise visual da eletroforese, a protease hidrolisou as proteínas das fibras de soja a peptídeos com baixos pesos moleculares (menores que 10KDa). Lee et al (2001) comentaram que os hidrolisados de farinha de soja, oriundos da proteólise de várias proteases, incluindo a produzida pelo *Bacillus licheniformis*, apresentaram baixos pesos moleculares, 95% das proteínas tinham menos de 12,5KDa após 6 horas de

hidrólise. O mesmo comportamento foi verificado quando a enzima utilizada foi a Viscozyme L (carboidrase), isto ocorreu porque, provavelmente esta enzima não é pura e contém protease. Esta redução de peso molecular, pela carboidrase, também pode ter sido influenciada pelo tempo de hidrólise, 12 horas, mais do que duas vezes ao da proteólise.



1: padrão; 2: fibra alimentar original; 3: fibra alimentar original hidrolisada com protease; 4: fibra alimentar original hidrolisada com carboidrase; 5: fibra alimentar micronizada; 6: fibra alimentar micronizada hidrolisada com protease; 7 fibra alimentar micronizada hidrolisada com carboidrase.

Figura 3 – Eletroforese de fibras de soja, original e micronizada, e amostras hidrolisadas com protease e carboidrase.

Bandas com peso molecular próximo aos 30KDa também foram reveladas na eletroforese das amostras de fibras de cotilédones, provavelmente glicoproteínas de parede celular ricas em hidroxiprolina. Segundo Kleis-San Francisco e Tierney (1990) estas proteínas têm peso molecular variando de 30 a 33 KDa e tem a mesma quantidade de hidroxiprolina e prolina. Quando as fibras foram hidrolisadas com protease por 5 horas (colunas 3 e 6) apresentaram uma banda com peso molecular próximo aos 25KDa, sendo resultado da ação das enzimas, pois as amostras não hidrolisadas não contêm esta banda. Possivelmente é a glicoproteína de parede celular parcialmente hidrolisada, pois estes polipeptídeos são mais resistentes à hidrólise enzimática devido à complexa estrutura e associação com outros compostos, que dificultam o acesso da enzima (Karr-Lilienthal et al, 2005). Marsman et al (1997) recomendaram o uso de misturas de várias enzimas para degradação de compostos de parede celular, em menores

concentrações, ao invés de adicionar uma protease ou carboidrase separadamente, em maior concentração.

As análises por microscopia eletrônica de varredura das fibras de cotilédones de soja, original e micronizada (Figura 4A e 4B) representaram a real estrutura física das amostras, pois a micronização foi realizada na empresa fornecedora do material. A redução, visível ao comparar as amostras na mesma magnificação, mostra que a fibra de cotilédones de soja micronizada é constituída, em maior proporção, de partículas menores em relação à fibra alimentar original. A diferença no tamanho das partículas justifica a maior densidade apresentada pela fibra alimentar original (0,46g/mL), quando comparada com a fibra alimentar micronizada (0,39g/mL), as quais apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). Este comportamento foi observado por Cadden (1987) ao avaliar fibras de trigo e aveia, onde comentou que o volume específico pode ser usado como um índice de diferença estrutural.

As microfotografias das amostras hidrolisadas com protease e com carboidrase não representam o tamanho real das partículas, pois o processo de secagem foi realizado com uma fina camada de amostra sobre uma superfície de vidro. O material seco formou uma cobertura compactada de fibras alimentares hidrolisadas, as quais foram moídas para proceder as análises microscópicas. A estrutura física da amostra original hidrolisada com protease (Figura 4C) ficou mais porosa superficialmente do que a fibra micronizada hidrolisada com a mesma enzima (Figura 4D), provavelmente porque esta amostra não tinha sofrido modificações na estrutura antes da ação da enzima. A solubilização e retirada das proteínas parece ter deixado as amostras menos compactadas do que a solubilização e retirada dos carboidratos, pois as duas fibras alimentares hidrolisadas com carboidrase (Figuras 4E e 4F), cuja fração sólida continha mais proteínas, apresentaram uma estrutura mais compacta. É possível que as proteínas, mais concentradas após a hidrólise dos carboidratos, associaram-se intermolecularmente e intramolecularmente, mudando a agregação destas macromoléculas e a temperatura, do processo e da secagem, também pode ter influenciado.

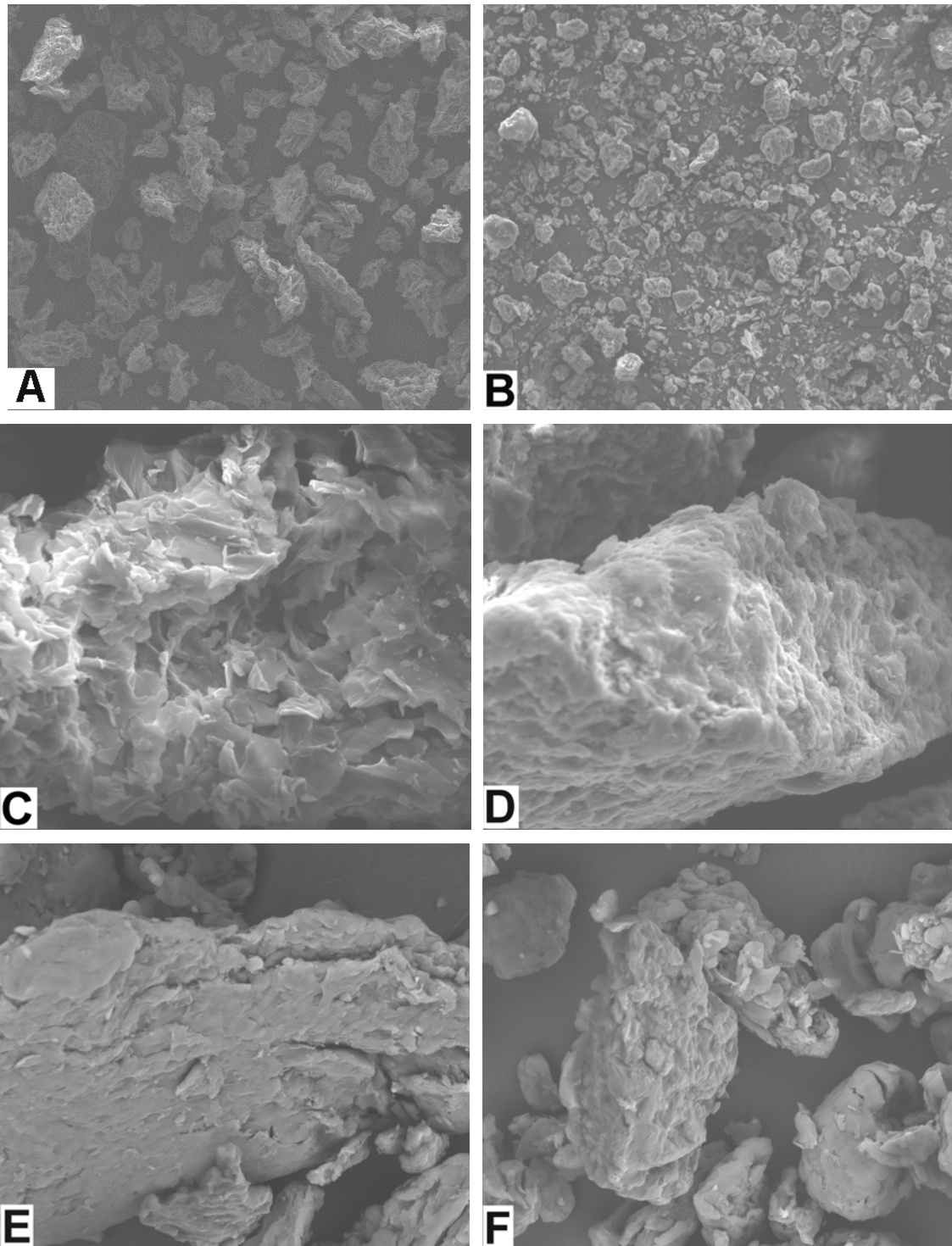


Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura das fibras de soja, original (A), micronizada (B) (160x), original hidrolisada com protease (C), micronizada hidrolisada com protease (D), original hidrolisada com carbohydrase (E) e micronizada hidrolisada com carbohydrase (F) (800x).

CONCLUSÕES

As melhores condições de hidrólise das fibras dos cotilédones de soja foram determinadas para obter a maior solubilização de carboidratos e proteínas. Foi utilizada 200µL/g de carboidrase durante 12 horas sob agitação a 30°C, e 150µL/g de protease durante 5 horas sob agitação a 55°C. Na fração sólida das fibras hidrolisadas com carboidrase houve concentração de proteínas e aumento nas propriedades hidrofílicas. A fração solúvel teve 73% dos carboidratos e 50% dos ácidos urônicos da quantidade inicial das amostras. A protease foi capaz de solubilizar 54% do total das proteínas, produzindo uma fração sólida contendo 76% de fibras alimentares totais, e uma fração solúvel com peptídeos de peso molecular menor que 10KDa e uma banda de peso molecular próximo aos 25KDa. As micrografias das fibras confirmaram que a amostra micronizada é constituída por partículas menores em relação à original. A estrutura física da FAO hidrolisada com protease ficou com aparência mais porosa superficialmente do que a FAM e as amostras hidrolisadas com carboidrase apresentaram uma estrutura mais compactada.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pelo financiamento desta pesquisa; ao Professor Fábio Yamashita pela ajuda prestada no planejamento experimental e à empresa Solae Company pelo fornecimento das amostras.

REFERÊNCIAS

AOAC. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemists 16. ed. v. I e II, 1995.

AUFFRET, A.; RALET, M.C.; GUILLON, F.; BARRY, J.L.; THIBAUT, J.F. Effect of grinding and experimental conditions on the measurement of hydration properties of dietary fibres. **LWT**, v.27, p.166-172, 1994.

CADDEN, A.M. Comparative effects of particle size reduction on physical structure and water binding properties of several plant fibers. **Journal of Food Science**, v.52, n.6, p.1595-1599, 1987.

CHOU, D.H.; MORR, C.V. Protein-water interactions and functional properties. **JAACS**, v.56, p.53A-62A, 1979.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

FISCHER, M.; KOFOD, L.V.; SCHOLS, H.A.; PIERSMA, S.R.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A.G.J. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4463-4469, 2001.

GARCIA, M.C.; TORRE, M.; MARINA, M.L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, n.4, p.361-391, 1997.

GUILLON, F.; CHAMP, M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. **Food Research International**, v.33, p.233-245, 2000.

HUISMAN, M.M.H.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max*) meal. Isolation and characterisation. **Carbohydrate Polymers**, v.37, p.87-95, 1998.

KARR-LILIENTHAL, L.K.; KADZERE, C.T.; GRIESHOP, C.M.; FAHEY Jr., G.C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. **Livestock Production Science**, v.97, p.1-12, 2005.

KLEIS-SAN FRANCISCO, S.M.; TIERNEY, M.L. Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings. **Plant Physiol.**, v.94, p.1897-1902, 1990.

LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, p.68-71, 1994.

LEE, J.Y.; LEE, H.D.; LEE, C.H. Characterization of hydrolysates produced by mild-acid treatment and enzymatic hydrolysis of defatted soybean flour. **Food Research International**, v.34, p.217-222. 2001.

LÓPEZ, G.; ROS, G.; RINCON, F.; PERIAGO, M.J.; MARTÍNEZ, M.C.; ORTUÑO, J. Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.2773-2778, 1996.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

MARSMAN, G.J.P.; GRUPPEN, H; MUL, A.J.; VORAGEN, A.G.J. *In vitro* accessibility of untreated, toasted, and extruded soybean meals for proteases and carbohydrases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.4088-4095. 1997.

MARUYAMA, N.; FUKUDA, T.; SAKA, S.; INUI, N.; KOTOH, J.; MIYAGAWA, M.; HAYASHI, M.; SAWADA, M.; MORIYAMA, T.; UTSUMI, S. Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins. **Phytochemistry**, v.64, p.701-708, 2003.

PADILLA, F.C.; ALVAREZ, M.T.; ALFARO, M.J. Functional properties of barinas nut flour (*Caryodendron orinocense* Karst., Euphorbiaceae) compared to those of soybean. **Food Chemistry**, v.57, n.2, p.191-196, 1996.

RIBLETT, A.L.; HERALD, T.J.; SCHMIDT, K.A.; TILLEY, K.A. Characterization of β -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4983-4989, 2001.

SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim SBCTA**, v.32, n.1, p.105-126, 1998.

THARANATHAN, R.N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes – a boon to human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, p.507-518, 2003.

THIBAUT, J.F.; LAHAYE, M.; GUILLON, F. Physico-chemical properties of food plant cell wall. In: SCHEIZER, T.; EDWARDS, C.A. **Dietary Fibre: a component of food: nutritional function in health and disease**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p.21-39.

TSUMURA, K.; SAITO, T.; TSUGE, K.; ASHIDA, H.; KUGIMIYA, W.; INOUE, K. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. **LWT**, v.38, p.255-261, 2005.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- Nos ingredientes protéicos (farinha desengordurada e concentrado protéico) e de fibras alimentares (fibras dos cotilédones, original e micronizada), o macromineral de maior concentração foi o potássio e o micromineral foi o ferro. A biodisponibilidade do zinco não foi afetada pela presença do ácido fítico, de acordo com as taxas molares do complexo fitato x Ca : Zn. Os ingredientes protéicos tiveram a maior concentração de fósforo fítico, ácido fítico e isoflavonas, mas as fibras de cotilédones de soja contêm maiores quantidades de daidzeína e genisteína.

- A farinha desengordurada apresentou a maior quantidade de proteína solúvel em pH 7,0 e o menor índice de absorção de água, enquanto que o concentrado protéico teve os maiores índice de absorção de óleo e atividade emulsificante. Os ingredientes de fibras alimentares apresentaram as melhores propriedades de hidratação e as outras propriedades funcionais foram similares ou melhores que os ingredientes protéicos, mesmo tendo menores percentuais de proteínas.

- A maior fração de carboidratos da fibra de cotilédones de soja é a hemicelulose, correspondendo a 55%, em média. Com a constituição dos monossacarídeos das frações houve a distinção de dois grupos: (1) celulose e (2) pectina e hemiceluloses, sendo galactose, glicose e arabinose/ramnose os principais componentes das amostras.

- A maioria das proteínas da farinha desengordurada de soja foi extraída em solução salina e a solução alcalina extraiu a maior quantidade de proteínas do concentrado protéico e das fibras de cotilédones. Na eletroforese dos quatro ingredientes alimentares derivados de soja foi constatada a presença das proteínas majoritárias, β -conglucina e glicina, além de bandas com peso molecular próximo aos 30KDa nas fibras dos cotilédones, sendo provavelmente glicoproteínas de parede celular, ricas em hidroxiprolina.

- As condições ideais de hidrólise das fibras dos cotilédones de soja foram determinadas para obter a maior solubilização de carboidratos e proteínas. Foi utilizada 200 μ L/g de carboidrase durante 12 horas sob agitação a 30°C e 150 μ L/g de protease durante 5 horas sob agitação a 55°C.

- A fração sólida das fibras hidrolisadas com carboidrase apresentou maior quantidade de proteínas e aumento nas propriedades de hidratação. A fração solúvel teve 73% dos carboidratos e 50% dos ácidos urônicos da quantidade inicial das amostras.

- A protease foi capaz de solubilizar 54% do total das proteínas, produzindo uma fração sólida contendo 76% de fibras alimentares totais, e uma fração solúvel com peptídeos de peso molecular menor que 10KDa e com uma banda de peso molecular próximo aos 25KDa.

- As micrografias das fibras mostraram que a amostra micronizada é constituída por partículas menores em relação à original. A estrutura física da fibra original hidrolisada com protease ficou mais porosa superficialmente do que a fibra micronizada e as amostras hidrolisadas com carboidrase apresentaram uma estrutura mais compactada.

REFERÊNCIAS

ADEYEYE, E.I.; AROGUNDADE, L.A.; AKINTAYO, E.T.; AISIDA, O.A.; ALAO, P.A. Calcium, zinc and phytate interrelationships in some foods of major consumption in Nigeria. **Food Chemistry**, v.71, p.435-441, 2000.

ANDERSON, R.L.; HAMILTON, C.C.; HORN, J.L.; SPENCER, D.B.; DILLON, D.W.; ZEIGLER, J.A. Metabolic effects on insoluble oat fiber on lean men with type II diabetes. **Cereal Chemistry**, v.68, n.3, p.291-294, 1991.

ANDERSON, J.W.; SMITH, B.M.; WASHNOCK, C.S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 464S-474S, 1999.

ANDERSON, R.L., WOLF, W.J. Compositional changes in Trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.581S-588S, 1995.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemist, 16.ed. v. I e II. 1995.

ASP, N.G. Dietary carbohydrates: classification by chemistry and physiology. **Food Chemistry**, v.57, n.1, p.9-14, 1996.

AUFFRET, A.; RALET, M.C.; GUILLON, F.; BARRY, J.L.; THIBAUT, J.F. Effect of grinding and experimental conditions on the measurement of hydration properties of dietary fibres. **LWT**, v.27, p.166-172, 1994.

AVERYHART-FULLARD, V.; DATTA, K.; MARCUS, A. A hydroxyproline-rich protein in the soybean cell wall. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.85, p.1082-1085, 1988.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC – Mass Spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.42, p.2466-2474, 1994.

BETANCUR-ANCONA, D.; PERAZA-MERCADO, G.; MOGUEL-ORDOÑEZ, Y.; FUERTES-BLANCO, S. Physicochemical characterization of lima bean (*Phaseolus lunatus*) and jack bean (*Canavalia ensiformis*) fibrous residues. **Food Chemistry**, p.1-9, 2003.

BRETT, C.T.; WALDRON, K.W. The molecular components of the wall. In: BRETT, C.T.; WALDRON, K.W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1996. p.5-43.

BRILLOUET, J.M.; CARRÉ, B. Composition of cell walls from cotyledons of *Pisum Sativum*, *Vicia Faba* and *Glycine Max*. **Phytochemistry**, v.22, n.4, p.841-847, 1983.

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

CADDEN, A.M. Comparative effects of particle size reduction on physical structure and water binding properties of several plant fibers. **Journal of Food Science**, v.52, n.6, p.1595-1599, 1987.

CASSAB, G.I.; VARNER, J.E. Cell wall proteins. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, v.39, p.321-353, 1988.

CHAMBÔ FILHO, A.; CHAMBÔ, D.; CHAMBÔ, F. A soja como alimento funcional em ginecologia. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.15, n.2, p.326-329, 2000.

CHANG, M.C.; MORRIS, W.C. Effect of heat treatments on chemical analysis of dietary fiber. **Journal of Food Science**, v.55, n.6. p.1647-1650, 1990.

CHAU, C.F.; CHEUNG, C.K. Functional properties of flours prepared from three chinese indigenous legume seeds. **Food Chemistry**, v.61, n.4, p.429-433, 1998.

CHAU, C.F.; CHEUNG, C.K.; WONG, Y.S. Functional properties of protein concentrates from three chinese indigenous legume seeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.2500-2503.1997.

CHAVAN, U.D.; MCKENZIE, D.B.; SHAHIDI, F. Protein classification of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). **Food Chemistry**, v.75, p.145-153, 2001.

CHEN, J.Y.; PIVA, M.; LABUZA, T.P. Evaluation of water binding capacity (WBC) of food fiber sources. **Journal of Food Science**, v.49, p.59-63. 1984.

CHEN, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, R.N. Microdetermination of phosphorus. **Anal. Chem**, v.28, n.11, p.1786-1758, 1956.

CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.14. n.4. p.297-335, 1980.

CHOU, D.H.; MORR, C.V. Protein-water interactions and functional properties. **JAACS**, v.56, p.53A-62A, 1979.

COELHO, R.G. Interações nutricionais. Parte 1: Interações ao nível do trato gastrointestinal. **Revista de Metabolismo e Nutrição**, v.3, n.2, p.106-117, 1995.

COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein, daidzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1961-1967, 1993.

CUTTER, E.G. Células e Tecidos – Parte 1. In: **Anatomia Vegetal**. 2ed. São Paulo : Rocca. 1996.

DA-SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim SBCTA**, v.31, n.2, p.249-260, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem**, v.28, p.350, 1956.

DUXBURY, D.D. Dietary fiber many sources, multi-functional. **Food Processing**, p.136-139. 1991.

ELLIS, R.; KELSAY, J.L.; REYNOLDS, R.D.; MORRIS, E.R.; MOSER, P.B.; FRAZIER, C.W. Phytate:zinc and phytate x calcium:zinc millimolar ratios in self – selected diets of Americans, Asian Indians, and Nepalese. **Journal of the American Dietetic Association**, v.87, p.1043-1047. 1987.

ERDMAN, J.W.; WEINGARTNER, K.E. Nutrition aspects of fiber in soya products. **JAACS**, p.511-514. 1981.

FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; LARRALDE, J.; MACARULLA, M.T.; MARCOS, R.; MARTÍNEZ, J.A. Leguminosas y concentrados de proteína: nuevas perspectivas y aplicaciones. **Alimentaria**, p.59-63. 1993.

FISCHER, M.; KOFOD, L.V.; SCHOLS, H.A.; PIERSMA, S.R.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A.G.J. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.4463-4469, 2001.

FRÜHBECK, G.; ALONSO, R.; MARZO, F.; SANTIDRIÁN, S. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. **Analytical Biochemistry**, v.225, n.2, p.206-212, 1995.

GARCIA, M.C.; MARINA, M.L.; LABORDA, F.; TORRE, M. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**, v.62, n.3, p.325-331, 1998.

GARCIA, M.C.; TORRE, M.; MARINA, M.L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, n.4, p.361-391, 1997.

GORDON, D.T. Functional properties vs physiological action of total dietary fiber. **Cereal Foods World**, v.34, n.7, p.517-525, 1989.

GUILLO, F.; CHAMP, M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. **Food Research International**, v.33, p.233-245, 2000.

HEREDIA, A.; JIMENEZ, A.; GUILLEN, R. Composition of plant cell walls. **Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v.200, p.24-31, 1995.

HONIG, D.H.; WOLF, W.J.; RACKIS, J.J. Phytic acid and phosphorus content of various soybean protein fractions. **Cereal Chemistry**, v.61, n.6, p.523-526, 1984.

HUISMAN, M.M.H.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max*) meal. Isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v.37, p.87-95, 1998.

KARR-LILIENTHAL, L.K.; KADZERE, C.T.; GRIESHOP, C.M.; FAHEY Jr., G.C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. **Livestock Production Science**, v.97, p.1-12, 2005.

KINTNER, P.K.; VAN BUREN, J.P. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenil method. **Journal of Food Science**, v.47, p.756-764, 1982.

KLEIS-SAN FRANCISCO, S.M.; TIERNEY, M.L. Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings. **Plant Physiol**, v.94, p.1897-1902, 1990.

KOPLIK, R.; PAVELKOVÁ, H.; CINCIBUCHOVÁ, J.; MESTEK, O.; KVASNICKA, F.; SUCHANEK, M. Fractionation of phosphorus and trace elements species in soybean flour and common white bean seeds by size exclusion chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.770, p.261-273, 2002.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonil isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glicine max* Merrill). **Agriculture and Biological Chemistry**, v.55, n.9, p.2227-2233, 1991.

KUMAR, R.; CHOUDHARY, V.; MISHRA, S.; VARMA, I.K.; MATTIASON, B. Adhesives and plastics based on soy protein products. **Industrial Crops and Products – an International Journal**, v.16, p.155-172, 2002.

KURZER, M.S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Review Nutrition**, v.17, p.353-381, 1997.

LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, p.68-71, 1994.

LEE, J.Y.; LEE, H.D.; LEE, C.H. Characterization of hydrolysates produced by mild-acid treatment and enzymatic hydrolysis of defatted soybean flour. **Food Research International**, v.34, p.217-222, 2001.

LEE, K.H.; RYU, H.S.; RHEE, K.C. Protein solubility characteristics of commercial soy protein products. **JAOCs**, v.80, n.1, p.85-90, 2003.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. 531p.

LÓPEZ, G.; ROS, G.; RINCON, F.; PERIAGO, M.J.; MARTÍNEZ, M.C.; ORTUÑO, J. Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, p.2773-2778, 1996.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LUSAS, E.W.; RIAZ, M.N. Soy protein products: processing and use. **The Journal of Nutrition**, v.125, n.3S, p.573-580, 1995.

MÄLKKI, Y. Physical properties of dietary fiber as keys to physiological functions. **Cereal Foods World**, v.46, n.5, p.196-199, 2001.

MARSMAN, G.J.P.; GRUPPEN, H; MUL, A.J.; VORAGEN, A.G.J. *In vitro* accessibility of untreated, toasted, and extruded soybean meals for proteases and carbohydrases. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.4088-4095, 1997.

MARTINS, T.R. **Efeito do tratamento alcalino associado à extrusão nas propriedades funcionais da fibra de cotilédone de soja**. 1995. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR.

MARUYAMA, N.; FUKUDA, T.; SAKA, S.; INUI, N.; KOTOH, J.; MIYAGAWA, M.; HAYASHI, M.; SAWADA, M.; MORIYAMA, T.; UTSUMI, S. Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins. **Phytochemistry**, v.64, p.701-708, 2003.

McDOUGALL, G.J.; MORRISON, I.M.; STEWART, D.; HILLMAN, J.R. Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. **J. Sci. Food Agric.**, v.70, p.33-150, 1996.

MESSINA, M. Soy and breast cancer risk. **The Soy Connection**, v.7, n.1, p.1-7. 1999.

MULLIN, W.J.; XU, W. A study of the intervarietal differences of cotyledon and seed coat carbohydrates in soybeans. **Food Research International**, v.33, p.883-891, 2000.

NEVEN, L. Isoflavones – na overview of benefits for health and market. **Agro Food Industry Hi-Tech**, p.39-41, 1998.

OATWAY, L.; VASANTHAN, T; HELM, J.H. Phytic Acid. **Food Reviews International**, v.17, n.4, p.419-430, 2001.

ONWELUZO, J.C.; ONUOHA, K.C; OBANU, Z.A. A comparative study of some functional properties of *Azelia africana* and *Glycine max* flours. **Food Chemistry**, v.54, p.55-59. 1995.

OUHIDA, I.; PÉREZ, J.F.; GASA, J. Soybean (*Glycine max*) cell wall composition and availability to feed enzymes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.1933-1938, 2002.

PADILLA, F.C.; ALVAREZ, M.T.; ALFARO, M.J. Functional properties of barinas nut flour (*Caryodendron orinocense* Karst., Euphorbiaceae) compared to those of soybean. **Food Chemistry**, v.57, n.2, p.191-196, 1996.

PEARSON, A.M. Soy Proteins. In: HUDSON, B.J.F. **Developments in Food Proteins**. London: Applied Science, 1982, v.2. p.67-108.

PLAAMI, S. Myoinositol Phosphates: Analysis, Content in Foods and Effects in Nutrition. **LWT**, v.30, p.633-647. 1997.

PRINYAWIWATKUL, W.; BEUCHAT, L.R.; McWATTERS, K.H.; PHILLIPS, R.D. Functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) flour as affected by soaking, boiling, and fungal fermentation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, n.2, p.480-486. 1997.

RIAZ, M.N. Uses and benefits of soy fiber. **Cereal Foods World**, v.46, n.3, p.98-100. 2001.

RIBLETT, A.L.; HERALD, T.J.; SCHMIDT, K.A.; TILLEY, K.A. Characterization of β -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.4983-4989, 2001.

ROEHRIG, K.L. The physiological effects of dietary fiber – a review. **Food Hydrocolloids**, v.2, n.1, p.1-18, 1988.

SALINAS, R.D. Fibras e Nutrição. In: **Alimentos e Nutrição. Introdução à Bromatologia**. 3 ed. Porto Alegre : Artmed. 2002, p.182-187.

SATHE, S.K.; LILLEY G.G.; MASON, A.C.; WEAVER, C.M. High-resolution sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (*Glycine max* L.) seed proteins. **Cereal Chemistry**, v.64, n.6, p.380-384. 1987.

SCHNEEMAN, B.O. Dietary fiber: physical and chemical properties, methods of analysis, and physiological effects. **Food Technology**, p.104-110. 1986.

SELVENDRAN, R.R.; O'NEILL, M.A. Isolation and analysis of cell walls from plant material. **Methods of Biochemical Analysis**, v.32, p.25-153, 1987.

SETCHELL, K.D.R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.1333S-1346S, 1998.

SGARBIERI, V.C. Deterioração e Modificações Químicas, Físicas e Enzimáticas de Proteínas. In: **Proteínas em Alimentos Protéicos – Propriedades, Degradações e Modificações**. São Paulo : Varela. 1996, p.387-517.

SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim da SBCTA**, v.32, n.1, p.105-126, 1998.

SHOWALTER, A.M. Structure and functions of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**, v.5, p.9-23, 1993.

SLAVIN, J. Nutritional benefits of soy protein and soy fiber. **Perspectives in Practice**, v.91, n.7, p.816-819, 1991.

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAM, G.; MURPHY, P.A. Soybean isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.1474S-1479S, 1998.

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

STOMBAUGH, S.K.; JUNG, H.G.; ORF, J.H.; SOMERS, D.A. Genotypic and environmental variation in soybean seed cell wall polysaccharides. **Crop Science**, v.40, p.408-412, 2000.

STOMBAUGH, S.K.; ORF, J.H.; JUNG, H.G.; SOMERS, D.A. Relationships between soybean seed cell wall polysaccharides, yield, and seed traits. **Crop Science**, v.43, p.571-576, 2003.

THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.K. Chemistry and uses of pectin – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, n.1, p.47-73, 1997.

THARANATHAN, R.N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes – a boon to human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, p.507-518, 2003.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E.; AMAN, P. Structure and components of dietary fiber. **Cereal Foods World**, v.38, n.3, p.135-141, 1993.

THIBAUT, J.F.; LAHAYE, M.; GUILLON, F. Physico-chemical properties of food plant cell wall. In: SCHEIZER, T.; EDWARDS, C.A. **Dietary Fibre: a component of food: nutritional function in health and disease**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p.21-39.

THOMPSON, D.B.; ERDMAN, J.W. Phytic acid determination in soybeans. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 2, p. 513-517, 1982.

TOCKMAN, J. Capitalizing on increasing consumer interest in soy protein. **Cereal Foods World**, v.47. n.5. p.172-174. 2002.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.1, n.1, p.1-22, 1991.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.1184-1192, 1995.

TSUMURA, K.; SAITO, T.; TSUGE, K.; ASHIDA, H.; KUGIMIYA, W.; INOUE, K. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. **LWT**, 38, p.255-261, 2005.

WALDRON, K.W.; PARKER, M.L.; SMITH, A.C. Plant cell walls and food quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p.101-119, 2003.

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

WOESSNER, J.F., The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. **Arch. Biochem. Biophys**, v.93, p.440-447, 1961.