UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

EFEITOS DA IRRADIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA SOJA

Aparecida Sônia de Souza

Engenheira de Alimentos

Profª. Drª. Flávia Maria Netto

Orientadora

CAMPINAS–SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

So89e

Souza, Aparecida Sônia de
Efeitos da irradiação na composição e propriedades funcionais da soja / Aparecida Sônia de Souza. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Flávia Maria Netto
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Irradiação gama. 2. Feixes de elétrons. 3. Grãos. 4. Isolado protéico de soja. 5. Estocagem. 6. Propriedades funcionais. 7. Proteínas. I. Netto, Flávia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Effects of irradiation on the composition and functional properties of soyben
Palavras-chave em inglês (Keywords): Gamma irradiation, Electrons beans, Grains, Soy protein isolates, Storage, Functional properties, Proteins
Área de concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos
Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição
Banca examinadora: Flávia Maria Netto
Anna Lucia Casañas Haasis Villavicencio
Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Jaime Amaya-Fárfan
Rosemary Aparecida de Carvalho
Vera Lúcia Signorelli Baldini
Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

Aparecida Sônia de Souza

EFEITOS DA IRRADIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA SOJA

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Profª. Drª. Flávia Maria Netto

Orientadora

CAMPINAS–SP

2006

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Flávia Maria Netto
Universidade Estadual de Campinas
Orientadora

_____

Profª. Drª. Anna Lucia Casañas Haasis Villavicencio
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Membro

_____

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Universidade Estadual de Campinas
Membro

_____

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Universidade Estadual de Campinas
Membro

_____

Profª. Drª. Rosemary Aparecida de Carvalho
Universidade de São Paulo
Membro

_____

Profª. Drª. Vera Lúcia Signorelli Baldini
Instituto de Tecnologia de Alimentos
Membro

“ Eis que estou contigo e te guardarei
por onde quer que fores
e te farei voltar a esta terra,
porque te não desampararei até cumprir
eu aquilo que te hei referido”.

Gênesis 28:15

Aos meus pais, Aurélio e Tereza

que compartilharam dos meus ideais
e os alimentaram, incentivando-me a
prosseguir e transpor os obstáculos; a
vocês que sempre estiveram ao meu lado,
lutando comigo, dedico esta conquista,
pois ela também pertence a vocês.

Às minhas irmãs Sandra e Vanessa
e ao meu cunhado José Carlos

Pelo amor e apoio incondicional
em todos os momentos. É muito bom sentir que
existem pessoas que nos compreendem
e querem nos ver em constante harmonia,
crescimento e felicidade...

AGRADECIMENTOS

À prof[a]. Dr[a]. Flávia Maria Netto, pela orientação, apoio e disponibilidade na realização desta pesquisa;

Aos professores da banca examinadora, pelas valiosas sugestões na elaboração do trabalho;

Às prof[a] Dr[a] Maria Teresa Bertoldo Pacheco e Dr[a]. Vera Lúcia Signorelli Baldini, pela carinhosa amizade, generosidade, disponibilidade, auxílio e apoio constante;

À Secretária de Pós-Graduação, em especial ao Cosme Perota, pelo profissionalismo, amizade, gentileza e prestabilidade constante;

Aos amigos e funcionários do DEPAN, Maria Aparecida V. Osteti, Sônia Aparecida Rinaldi Mendonça, Isabel de Fátima Valentino, Francisco Carraro, Carla De Marco Greghi, Soely M. P. M. Reis, Edma M. de Araújo, Erenice P. Santos e Eder Müller Risso pela atenção, colaboração e disponibilidade;

Aos funcionários da biblioteca da FEA, Creuza K. Nomura, Cláudia Romano e Geraldo A. Silva pelo auxílio e disponibilidade;

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, em especial ao pesquisador Dr. Paulo Roberto Rela pela permissão e aos engenheiros Elizabeth S.R. Somessari e Carlos Gaia, pela execução da irradiação dos grãos de soja;

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em especial ao pesquisador Dr. Roberto Moraes e ao funcionário Plínio Rafael de Oliveira, pela permissão na utilização do equipamento de descascador de grãos;

À Marlene Braz do laboratório de micronutrientes da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUCC) e aos Srs. Carlos R. M. Fauvel e *Júlio C. Terroni da Empresa Terroni Equipamentos Científicos ltda., pela liofilização dos isolados protéicos de soja;*

Ao laboratório de óleos e gorduras da FEA, em especial ao Dr. Renato Grimaldi pela permissão na utilização do equipamento extrator de óleo;

Ao Prof. Dr. Paulo J. do A. Sobral e Ana Mônica Quinta Barbosa Habitante pelo auxílio na análise térmica por Calorimetria Diferencial de Varredurra (CDV);

Ao Instituto de Biologia da Unicamp, em especial a Prof[a] Dr[a] Eneida de Paula pela permissão na utilização do equipamento Fluorímetro;

À Prof[a]. Dr[a.] Maria Inês Genovese e a doutoranda Ana Cristina Lopes Barbosa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela colaboração na realização das análises de isoflavonas dos grãos de soja;

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas/Biológicas e Agrícolas, em especial ao pesquisador Adilson Fartoratto, pela gentileza e auxílio na análise densitométrica dos géis de eletroforese (SDS-PAGE) dos isolados protéicos de soja;

A querida Eliana M. P. Motta, pelo profissionalismo, amizade, carinho, paciência, apoio técnico incondicional e pelos muitos momentos alegres, pelas muitas risadas e convivência muito especial;

A querida, Elizabeth F. Silva, pela amizade, carinho, paciência, incentivo, auxílio em todos os momentos e pelas "aventuras no Aspázio" e pelos "lanchinhos" nas horas certas;

As minhas queridas, Dilza, Geice e Maria Helena, pela capacidade de ouvir e acolher em todos os momentos, pelo carinho, paciência, generosidade e pela amizade de ontem, hoje e sempre;

À minha querida Vera Sônia, pela alegria de sua amizade, carinho, incentivo constante, companheirismo e que mesmo nos momentos mais difíceis de sua vida encontrou forças para me apoiar incondicionalmente;

À prof[a] Dr[a] Débora de Queiroz Tavares, pela amizade, carinho, incentivo e pelos momentos enriquecedores;

Às "proteins girls", companheiras especiais, Duda, Lucia, Bete, Suzi, Noemi, Janai, Ivonete, Liz, Andréa e Mariza pela amizade, apoio, carinho, união, superação das dificuldades, troca de conhecimentos e pelos muitos momentos alegres;

A querida estagiária Alyne Avellar Marqueti, pela amizade, dedicação e auxílio fundamental;

Aos estagiários, Raquel S. Peres e Laércio G. F. A. Filho, pela amizade, convívio alegre e pela colaboração;

As Yara Fagnani e Maria Susana Corrêa Alves da Cunha, pela amizade e pelos momentos alegres, divertidos e inesquecíveis que juntas compartilhamos;

As amigas pesquisadoras que compartilharam as alegrias desta jornada, Rose, Cris, Kity, Beatriz, Adriane, Selma, Caroline Capitani, Carolina Souza, Renata Torrezan, Karina, Izabela, Renata, Patrícia Trevizam, e Maria Inês, pois onde existe harmonia existe prazer de estar junto;

À Brejeiro (Produtos Orlândia S/A.) pelo fornecimento dos grãos de soja.;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para realização deste trabalho. Cada um que passa na nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única. Mas não vai só, leva um pouco de nós e deixa um pouco de si. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que duas almas não se encontram por acaso.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas..... xx

Lista de Figuras..... xxii

Lista de abreviações..... xxiii

RESUMO..... xxv

SUMMARY..... xxviii

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 4
2.1. Soja..... 4
2.1.1. Proteínas da soja..... 6
2.2. Irradiação de alimentos..... 8
2.2.1. Radiação gama..... 11
2.2.2. Feixe de elétrons..... 12
2.2.3 Alterações dos alimentos pelo uso da radiação ionizante..... 13
2.3. Propriedades Funcionais 16
2.3.1. Solubilidade..... 16
2.3.2. Propriedade Emulsificante..... 18
2.3.3. Propriedade de gelificação..... 22
2.4. Alterações químicas dos grãos de soja durante armazenamento..... 25

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 28
3.1. Material..... 28
3.2. Métodos..... 28
3.2.1. Irradiação dos grãos de soja..... 28
3.2.2. Armazenamento dos grãos de soja..... 28
3.2.3. Obtenção das farinhas e isolados protéicos de soja..... 29
3.2.4. Caracterização dos grãos de soja..... 29
3.2.4.1 Composição centesimal..... 29
3.2.4.2. Atividade de água (Aw)..... 31

3.2.4.3. Teor de isoflavonas nos grãos de soja..... 31
3.2.4.4. Atividade antioxidante..... 31
3.2.4.5. Índice de acidez..... 32
3.2.5. Caracterização das farinhas e isolados protéicos de soja..... 33
3.2.5.1. Composição centesimal..... 33
3.2.5.2. Teor de fitato..... 33
3.2.5.3. Atividade dos inibidores de tripsina (AIT)..... 33
3.2.5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas solúveis dos isolados protéicos de soja..... 34
3.2.5.5. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV)..... 34
3.2.5.6. Grupos sulfidrila livres (SH)..... 35
3.2.5.7. Fluorescência Intrínseca..... 35
3.2.5.8. Cromatografia Liquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)..... 35
3.2.5.9. Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)..... 36
3.2.6. Propriedades Funcionais dos isolados protéicos de soja (IPSs)..... 36
3.2.6.1. Solubilidade protéica..... 36
3.2.6.2. Propriedade de gelificação..... 37
3.4.6.3. Propriedades emulsificantes..... 37
3.2.6.3.1. Capacidade emulsificante 37
3.2.6.3.2. Índice de atividade emulsificante..... 38
3.2.6.3.3. Estabilidade da emulsão..... 38
3.2.7. Análise Estatística..... 39

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 40
4.1. Caracterização dos grãos de soja 40
4.1.1. Condições de armazenamento dos grãos de soja..... 40
4.1.2. Composição centesimal e atividade de água e dos grãos..... 41
4.1.3. Teor de isoflavonas dos grãos..... 42
4.1.4. Atividade antioxidante dos grãos controle e irradiados durante o armazenamento..... 45
4.1.5. Teor de acidez dos óleos obtidos a partir dos grãos..... 46
4.2. Caracterização das farinhas desengorduradas de soja (FDSs)..... 47
4.2.1 Composição Centesimal..... 47
4.2.2. Fatores antinutricionais..... 48

4.3.	Caracterização dos isolados protéicos de soja (IPSs)	50
4.3.1.	Composição centesimal dos isolados protéicos de soja (IPSs).....	50
4.3.2.	Calorimetria diferencial de varredura (CDV) e grupos sulfidrila livres (SH) dos isolados protéicos de soja.....	51
4.3.3.	Cromatografia liquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR).....	53
4.3.4.	Cromatografia liquida de alta eficiência de exclusão-molecular (CLAE-EM).....	55
4.3.5.	Fluorescência Intrínseca.....	57
4.3.6.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas solúveis em diferentes sistemas de tampões.....	60
4.4.	Propriedades funcionais	67
4.4.1.	Solubilidade protéica.....	67
4.4.2.	Propriedades emulsificantes dos isolados protéicos de soja (IPSs).....	71
4.4.3.	Propriedade de gelificação. dos isolados protéicos de soja (IPSs).....	77
5.	**CONCLUSÕES.....**	**81**
6.	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....**	**82**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal aproximada do grãos de soja controle durante o armazenamento..... 41

Tabela 2. Variação da atividade de água (Aw) dos grãos de soja controle e irradiados durante o armazenamento..... 42

Tabela 3. Teor de isoflavonas totais (mg/100g) dos grãos de soja controle e irradiados durante o armazenamento..... 43

Tabela 4. Diferentes frações das isoflavonas dos grãos de soja controle e irradiados durante o armazenamento..... 44

Tabela 5. Composição das formas agliconadas das isoflavonas dos grãos de soja controle e irradiados durante o armazenamento..... 45

Tabela 6. Índice de antioxidação (IA) dos grãos controle e irradiados durante o armazenamento..... 46

Tabela 7. Acidez total (mg KOH/g de óleo) dos óleos obtidos grãos controle e irradiados durante o armazenamento..... 47

Tabela 8. Composição centesimal das farinhas desengorduradas de soja (FDSs)..... 48

Tabela 9. Teor de fitato (mg/g de proteína) nas farinhas desengorduradas de soja de grãos controle e irradiados durante o armazenamento..... 49

Tabela 10. Atividade dos inibidores de tripsina (UTI*/mg de proteína) nas farinhas desengorduradas de soja de grãos controle e irradiados durante o armazenamento..... 50

Tabela 11. Composição centesimal dos isolados protéicos de soja..... 51

Tabela 12. Entalpias de desnaturação (ΔH) em J/g de proteína a partir do termograma do CDV e grupos sulfidrila livres (μmoles/g proteína) dos isolados protéicos de soja..... 52

Tabela 13. Comprimento de onda de emissão máxima ($\lambda_{máx.}$) para os isolados protéicos de soja (IPSs) obtidos de grãos controle e irradiados..... 58

Tabela 14. Intensidade de fluorescência máxima para os isolados protéicos de soja (IPSs) obtidos de grãos controle e irradiados..... 58

Tabela 15. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S presentes nas proteínas solúveis em água destilada dos IPSs..... 63

Tabela 16. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S presentes nas proteínas solúveis em tampão Tris-Glicina dos IPSs..... 64

Tabela 17. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S presentes nas proteínas em tampão Tris-uréia-SDS dos IPSs..... 65

Tabela 17. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S presentes nas proteínas em tampão Tris-uréia-SDS dos IPSs..... 66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma para produção do isolado protéico de soja..... 30

Figura 2. Valores médios mínimos e máximos de temperatura (T) e umidade relativa (UR%) referente ao período de armazenamento dos grãos de soja controle e irradiados..... 40

Figura 3. Cromatogramas de CLAE-FR dos IPSs obtidos de grãos controle e irradiados correspondentes aos (a) zero; (b) quatro; (c) oito e (d) doze meses de armazenamento..... 54

Figura 4. Cromatogramas de CLAE-EM dos IPSs obtidos de grãos controle e irradiados correspondentes aos (a) zero; (b) quatro; (c) oito e (d) doze meses de armazenamento..... 56

Figura 5. Espectros de fluorescência intrínseca dos IPSs obtidos de grãos controle e irradiados correspondentes aos tempos (a) zero; (b) quatro, (c) oito e (d) doze meses de armazenamento..... 59

Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), em condições não redutoras, das proteínas solúveis dos IPSs obtidos de grãos controle e irradiados, em diferentes sistemas de solvente correspondentes aos (a) zero; (b) quatro; (c) oito; (d) doze meses de armazenamento. Coluna P: Padrão; Colunas (1;5;9;13): IPS-C; Colunas (2;6;10;14): IPS-2 kGy; Colunas (3;7;11;15): IPS-5 kGy; Colunas (4; 8;12;16): IPS-Acel..... 62

Figura 7. Solubilidade protéica dos isolados protéicos de soja (IPSs) em água e pH 3,0 (a); pH 5,0 (b) pH 7,0 (c))..... 69

Figura 8. Solubilidade protéica dos isolados protéicos de soja (IPSs) em NaCl 0,1 M e pH 3,0 (a); pH 5,0 (b) pH 7,0 (c) 90ºC/10'..... 70

Figura 9. Capacidade emulsificante (CE) dos isolados protéicos de soja (IPSs) em pH 3,0 (a) e em pH 7,0 (b)..... 72

Figura 10. Estabilidade da emulsão (EE) dos isolados protéicos de soja em pH 3,0 (a) e pH 7,0 (b)..... 74

Figura 11. Índice de atividade emulsificante (IAE) dos isolados protéicos de soja (IPSs) em pH 3,0 (a) e pH 7,0 (b)..... 76

Figura 12. Valores de dureza de géis de isolados protéicos de soja (IPSs)..... 77

Figura 13. Valores de elasticidade dos géis de isolados protéicos de soja (IPSs)..... 78

Figura 14. Valores de coesividade dos géis de isolados protéicos de soja (IPSs)..... 79

Figura 15. Capacidade de retenção de água (CRA) de géis do isolados protéicos de soja (IPSs)..... 80

LISTA DE ABREVIAÇÕES

λmáx	Emissão máxima
ΔH	Entalpia de desnaturação
AI	Atividade antioxidante
AIT	Atividade dos inibidores de tripsina
AW	Atividade de água
BAPNA	Benzoil-DL-arginina-p-nitro-anilida
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CDV	Calorimetria diferencial de varredura
CE	Capacidade emulsificante
CLAE-EM	Cromatografia liqüida de alta eficiência de fase reversa
CLAE-FR	Cromatografia liqüida de alta eficiência de exclusão molecular
CRA	Capacidade retenção de água
DAD	Detector de arranjo de diodo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	(*Ethylenediamine-tetra-acetic acid*) ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Estabilidade da emulsão
FDS	Farinha desengordurada de soja
$FeCl_3.6H_2O$	Cloreto de Ferro III Hexahidratado
HCl	Ácido clorídrico
IAE	Índice de atividade emulsificante
IPS	Isolado Protéico de soja
kDa	kilo Dalton
kGy	kilogray
KOH	Hidróxido de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PTFE	Politetrafluroetileno
SDS	(*sodium dodecyl sulfate*) dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	(*Polyacrylamide gel electrophoresis*) eletroforese em gel de poliacrilamida
SH	Sulfidrila livres
SP	Solubilidade protéica

Td	Temperatura de desnaturação
TFA	Ácido trifluroacético
UR	Umidade relativa
UTI	Unidade de tripsina inibida
UV/VIS	Ultravioleta/visível

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da irradiação e do tempo de armazenamento na composição química de grãos de soja e funcionais de seus isolados protéicos. Os grãos de soja foram divididos em quatro lotes, sendo que dois foram irradiados em fonte de ^{60}Cobalto, com doses de 2,0 ou 5,0 kGy, um lote foi irradiado em acelerador de elétrons com dose de 2,0 kGy e um lote foi utilizado como controle (não irradiado). Os lotes foram armazenados por um período de 12 meses. A cada quatro meses, uma porção de cada lote foi retirada para produção laboratorial de farinhas desengorduradas (FDSs) e isolados protéicos (IPSs). A composição centesimal nos grãos, FDSs e IPSs foi determinada. Nos grãos foram analisados a atividade de água, teor de isoflavonas e atividade antioxidante (IA) e nas FDSs, os teores de fitato e inibidores de tripsina (IT). O teor de acidez foi avaliado nos óleos obtidos do desengorduramento das farinhas. As características estruturais das proteínas dos IPSs obtidos foram avaliadas por análises de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condições não redutoras, das proteínas solúveis em diferentes sistemas, calorimetria diferencial de varredura (CDV), grupos sulfidrila livres (SH), fluorescência intrínseca (FI), cromatografia liqüida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) e cromatografia liqüida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM). As propriedades funcionais avaliadas foram: solubilidade, gelificação, capacidade de retenção de água (CRA), capacidade emulsificante (CE), índice de atividade emulsificante (IAE) e estabilidade de emulsão (EE). O teor das isoflavonas totais e o índice de antioxidação, analisados nos grãos, não diferiu significativamente ($p>0,05$) e permaneceu estável ao longo do armazenamento, independente do tipo ou dose de radiação. No entanto, houve aumento das concentrações relativas dos β-glicosídeos e diminuição dos malonil glicosídeos ao longo do armazenamento. O teor de acidez aumentou em até 81,6% no óleo de grãos irradiados com dose de 5 kGy e armazenados por doze meses. As FDSs de grãos irradiados apresentaram os menores valores dos inibidores de tripsina e fitato. As análises de calorimetria diferencial de varredura, fluorescência intrínseca e cromatografia liqüida de alta eficiência de exclusão molecular indicaram não ter ocorrido alterações estruturais importantes nos isolados protéicos devido à irradiação ou ao armazenamento. Entretanto, os grupos sulfidrila livres aumentaram nos IPSs de grãos irradiados, mas sofreram pouca alteração ao longo dos 12 meses de armazenamento. Houve aumento da proporção relativa de frações hidrofóbicas observadas por CLAE-FR em todos os isolados

após quatro meses de armazenamento dos grãos. Os IPSs de grãos irradiados apresentaram maior solubilidade protéica e capacidade emulsificante, enquanto que a estabilidade de emulsão e o índice de atividade emulsificante não diferiram significativamente ($p>0,05$). Os valores de dureza e capacidade de retenção de água dos géis dos IPSs não diferiram significativamente ($p>0,05$) em função do tratamento empregado. No entanto, os géis dos IPSs de grãos armazenados tiveram maiores valores de dureza. Os valores coesividade e elasticidade dos géis dos isolados, independente da dose e tipo de radiação, não diferiram significativamente ($p>0,05$). Nas condições estudadas, as radiações gama com doses de até 5 kGy e de feixe de elétrons com dose de 2 kGy podem ser utilizadas sem prejuízo as propriedades químicas de grãos e funcionais de seus isolados protéicos, durante o armazenamento.

Palavras-chave**:** irradiação gama, acelerador de elétrons, grãos; isolado protéico de soja, estocagem, propriedades funcionais; proteínas.

SUMMARY

The aim of this work was to study the effects of both irradiation and storage on the chemical composition of soybean grains and on the physicochemical and functional properties of their protein isolates. The soy grains were divided into four lots, two of them were irradiated with of ^{60}Cobalt source in doses of 2.0 or 5.0 kGy, a third one was irradiated with an electron beam at 2.0 kGy and another was used as control (non-irradiated). All the lots were stored for a maximum of 12 months. Every four months, a portion of each lot was removed to produce deffated soy flour (DFS) and soy protein isolate (SPI). The proximal compositions of the grains, FDSs and SPIs were determined. In the grains, the water activity, total isoflavone content and antioxidant index (AI) were measured and in DFSs, the phytate content and trypsin inhibitor activity (TIA). The acidity content was measured in the oil obtained from the whole flours. The structural characteristics of SPIs were evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) under non reducing conditions of the soluble proteins using different systems. Additionally, differential scanning calorimetry (DSC), free sulfhydryl groups (SH), intrinsic fluorescence (IF), reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and of size exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) were also used to evaluate the effects. The analyses of the functional properties in SPIs were: solubility, gelation, water holding capacity (WHC), emulsifying capacity (EC), emulsifying activity index (EAI) and emulsifying stability (ES). The total isoflavone content and antioxidant index analyzed in the grains did not differ significantly ($p>0.05$) and remained stable throughout storage, as a function of the dose or type of irradiation. However, there was an increase in the β-glycosides and decrease in the mean percentage of malonyl glycosides. The acidity content increased in the percentage of 81.6% in the oil grains irradiated with 5 kGy and stored for 12 months. DFSs of irradiated grains exhibited smaller values of the trypsin inhibitor and phytate. The analyses of differential scanning calorimetry, intrinsic fluorescence and size exclusion high performance liquid chromatography showed that no important structural alterations occurred in the protein isolates due irradiation or storage. However, the free sulfhydryl groups increased in SPIs of irradiated grains, without further significant changes along the storage. There was an increase of the proportion of the hydrophobic fractions, showed by reversed-phase high performance liquid chromatography profile, for all the isolated after four months of storage of the grains. SPIs of irradiated grains presented high solubility, emulsifying capacity while emulsifying stability and

emulsifying activity index did not differ significantly ($p>0.05$). The values of hardness and water holding capacity of the SPIs gels did not differ significantly ($p>0.05$) for all treatment. However, SPIs gels of stored grains had high values of hardness. The values cohesiveness and elasticity of the SPIs gels did not differ significantly ($p>0.05$), independent of the dose and type of irradiation. Under the studied conditions, gamma irradiation at doses of 5 kGy and of electron beam of 2 kGy can be used without damage to the grain composition or storage property or to the physicochemical properties of the protein isolates.

Key Words: gamma irradiation; electrons accelerator, grains; soy protein isolates, storage, functional properties, proteins

1. INTRODUÇÃO

A soja além da grande importância econômica para o Brasil apresenta características funcionais e nutricionais que fazem com que seja utilizada em vários tipos de alimentos. Produtos à base de soja desempenham papel importante na nova geração de alimentos funcionais, na prevenção de doenças do coração, obesidade, hipercolesterolemia, câncer, diabetes, doenças dos rins, osteoporose (GARCIA et al., 1997) e sintomas de menopausa (POTTER et al., 1998). Os efeitos funcionais da soja são atribuídos à proteína, oligossacarídeos, fibras e principalmente aos isoflavonóides (GINSBURG; PREVELIC, 2000).

A produtividade da soja no Brasil cresceu significativamente nos últimos dez anos e grande parte desse aumento deve-se ao melhoramento genético dos cultivares que contribuiu para a diminuição das perdas na área de plantio (LORINI, 2004). No entanto, o grão de soja é um produto facilmente atingido por insetos e fungos no campo durante a maturação, nos processos de secagem e armazenamento, sendo que as perdas durante o armazenamento chegam a 10% (CONAB, 2006).

A manutenção da qualidade dos grãos de soja após a colheita depende das condições ambientais como: local, umidade, temperatura e do tempo de estocagem. No armazenamento ocorrem alterações físico-químicas e bioquímicas tais como: escurecimento de superfície do grão, aumento do tempo de hidratação, redução do teor de sólidos e solubilidade protéica, decréscimo no conteúdo de fitatos, conversão estrutural das isoflavonas e oxidação de lipídeos (CAI; CHANG, 1999; HOU; CHANG, 2003; HOU; CHANG, 2004; THOMAS; MAN; MAN, 1989). Além dessas alterações, em condições de altas temperaturas e umidades relativa, durante o armazenamento de grãos pode ocorrer crescimento de insetos e microrganismos (ATHIÉ, 1998).

Atualmente, o controle de pragas e microrganismos nos grãos é realizado com uso de pesticidas químicos, alguns deles extremamente nocivos ao meio ambiente e à saúde, como o metildibromato e o dibrometo de etileno (ALFEREZ, 2004). Um método alternativo

ao tratamento químico é o uso da radiação, que além de conservar os alimentos, reduz a incidência de algumas doenças (ALVAREZ; FRAGA; ANDÚJAR, 1996).

O processamento por radiação ionizante é considerado um método seguro e eficiente para alguns alimentos, podendo reduzir o risco de infecção alimentar e preservá-los com o mínimo de impacto em seu valor nutricional (VIZEU, 2003). A irradiação é um processo físico comparável à pasteurização térmica, ao congelamento ou enlatamento, onde o alimento embalado ou não é submetido a um dos três tipos de energia ionizante: raios gama, raios X ou feixe de elétrons. (ALFEREZ, 2004). Em 1983, a Comissão do *Codex Alimentarius* concluiu que alimentos irradiados abaixo de 10 kGy não apresentam risco toxicológico e as organizações internacionais como o fundo das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) avaliaram várias destas pesquisas e concluíram que a irradiação de alimentos é segura e benéfica.

Diversos trabalhos abordam o efeito da radiação nas propriedades funcionais e estruturais das proteínas de soja (ABU-TARBOUSH, 1998; ALVAREZ; FRAGA; ANDÚJAR, 1996; BYUN; KANG, 1995; LACROIX et al., 2002). O processamento por radiação tem se mostrado eficiente na redução de oligossacarídeos, inibidores de tripsina e quimotripsina e melhora a produção de leite e tofu (BYUN; KANG; MORI, 1996; IYER et al., 1980; RAO; VAKIL, 1983). Outro estudo mostra que a irradiação pode aumentar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes na soja (VARYAR; LIMAYE; SHARMA, 2004). Por outro lado, a radiação ionizante pode induzir à formação de radicais livres e desencadear uma série de reações químicas que podem afetar a fração lipídica da soja que é susceptível à oxidação (ZEB; TAUFIQ, 2004). No entanto, na literatura, não foram encontrados relatos sobre o efeito da associação da irradiação e armazenamento nas características químicas e funcionais da soja.

Com a perspectiva de se obter mais informações relativas ao uso da radiação em grãos de soja e seu impacto no decorrer do armazenamento, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

a) Avaliar os efeitos dos tratamentos por radiação gama e por feixe de elétrons e do armazenamento na atividade antioxidante, nos teores de isoflavonas, fitato e

inibidores de tripsina nos grãos de soja e nas farinhas desengorduradas obtidas a partir desses grãos.

b) Estudar as características estruturais das proteínas dos isolados obtidos a partir dos grãos de soja irradiados e armazenados.

c) Avaliar as características funcionais dos isolados protéicos obtidos a partir dos grãos irradiados e armazenados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Soja

A soja representa aproximadamente 70% de todas as sementes de oleaginosas produzidas no mundo, sendo que a produção mundial da safra 2004/2005 foi de 216 milhões de toneladas. O complexo agroindustrial mundial desta leguminosa movimenta aproximadamente 215 bilhões de dólares por ano (CONAB, 2006).

Originada da China, a soja foi introduzida no Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, por volta de 1900 (RUEDELL, 2002). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, ultrapassado apenas pelos EUA, participando com aproximadamente 19,6% da produção mundial (TEIXEIRA, 2004; TOLEDO, 2004). A exportação brasileira de soja em grãos no ano-safra de 2005 foi de 22 milhões de toneladas (CONAB, 2006). Dessa forma é inegável a importância dos estudos de todo o sistema produtivo, desde a produção agrícola até a comercialização final dos subprodutos referentes a essa leguminosa.

A soja é um alimento rico em proteínas, fibras, óleo, importante fonte de minerais (sódio, potássio fósforo, ferro, magnésio, zinco e cálcio) e vitaminas, como tiamina (B_1), riboflavina (B_2), niacina (B_3) ácido nicotínico e ácido ascórbico. Além disso, produtos da soja desempenham função importante para saúde, além de serem utilizados por pessoas alérgicas ao leite e também por suas boas características tecnológicas (BAZINET et al., 1997; PUPPO; ANÕN, 1999).

Produtos contendo proteína de soja ganham espaço no mercado e são produzidos na forma de farinha, texturizados, isolados, substitutos de produtos lácteos, cárneos e panificação (PUPPO; ANÕN, 1999). Suas proteínas também são utilizadas em alimentos como ingredientes funcionais e nutricionais como substituto da proteína animal.

As principais propriedades funcionais da proteína de soja são: capacidade de retenção de água, de emulsificação, gelatinização e formação de espuma (GARCIA et al., 1997; QI; HETTIARACHCHY; KALAPATHY, 1997). As proteínas da soja são muito utilizadas no segmento cárneo (embutidos, apresuntados e presuntos) com objetivo de reduzir custos e melhorar características como uniformidade, textura e suculência. Outros produtos à base de soja como iogurte, requeijão, maionese e similares estão sendo desenvolvidos e a tendência é de que ocupem uma fatia importante do mercado (OKADA, 2000). Deste modo, a soja e seus derivados oferecem excelentes possibilidades para

serem empregados sob as mais variadas formas, no processamento de produtos alimentícios destinados ao consumo humano, com melhor valor nutritivo e custos reduzidos (TEIXEIRA, 2004).

Apesar de ser uma excelente fonte protéica, com uma das melhores composições de aminoácidos essenciais entre as proteínas de origem vegetal e alta digestibilidade (92-100%), a soja possui baixas quantidades de metionina e cisteína (KELLOR, 1974). Contudo, para uso em uma dieta normal, a proteína de soja não necessita ser suplementada com metionina quando destinada a adultos, ela só se faz necessária em quantidades reduzidas, apenas em formulados infantis (YOUNG, 1991).

Fatores antinutricionais podem afetar a qualidade nutricional de produtos à base de proteína de soja. Alguns destes fatores são parcialmente ou totalmente inativados pelo calor durante o processamento, tais como, os fatores antivitamínicos, as hemaglutininas e inibidores de tripsina (BARTH et al., 1993). Outros não são destruídos pelo calor como as saponinas, fitatos e fatores de flatulência, que também podem comprometer a qualidade nutricional da proteína de soja (LIENER, 1981; LUSAS; RIAZ, 1995).

O ácido fítico ou fitato ocorre naturalmente em produtos de origem vegetal e interfere na absorção de microelementos. A formação de complexos proteína-fitato-mineral durante o processamento da soja é associada à redução da biodisponibilidade de minerais como Ca, Zn, Mg e Fe, que também implica na redução da digestibilidade. No entanto, trabalhos sugerem que o ácido fítico possui propriedades anticarcinogênicas (ARAÚJO, 1995; CHERYAN, 1980; MESSINA; BARNES, 1991; RITTER; MOOR; THOMAS 1987). Benefícios do ácido fítico na prevenção de doenças do coração, cálculo renal têm sido largamente mencionados (LIENER, 1994). Na soja o teor de ácido fítico pode variar consideravelmente, em função do tipo de cultivar. No isolado protéico de soja os valores estão na faixa de 1,0-2,0 % (LUSAS; RIAZ, 1995). Um dos meios mais simples e efetivos para reduzir o fitato é pela ação da fitase endógena, que promove sua hidrólise enzimática sendo posteriormente separado pelo processo de ultracentrifugação. Outros métodos como cromatografia de troca iônica e diálise, desde que exista controle do pH e da concentração de cátions, podem remover até 90% de fitato das proteínas de soja (GARCIA et al., 1997; KINSELA, 1979).

As saponinas, pertencentes à família dos glucosídeos, se caracterizam por seu amargor e propriedades tensoativas; agem como agentes espumantes em soluções

aquosas e são hidrolisadas por enzimas de bactérias presentes no trato intestinal (ANDERSON; WOLF, 1995; KINSELLA, 1979). Efeitos hipocolesterolêmico e anticarcinogênicos têm sido atribuídos às saponinas, especificamente a uma subunidade da proteína e sua seqüência de aminoácidos (MESSINA; BARNES, 1991; WEST et al., 1984).

Em contrapartida, evidências têm comprovado que as isoflavonas, um tipo de fito-hormônio presente na soja, desempenham papel importante na prevenção de doenças crônico degenerativas e, particularmente, naquelas associadas com hormônios, reduzindo fortemente os efeitos indesejáveis da menopausa, em populações consumidoras de soja (KIM; PETERSON; BARNES, 1998), além de possuírem atividade antioxidante protegendo o organismo contra danos celulares, são compostos fenólicos, pertencentes à classe dos fitoestrógenos (CHOI; KWON; KIM, 1996). As principais isoflavonas encontradas na soja estão nas formas de agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), de glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina), de derivados glicosilados acetilados (6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilgenistina, 6"-O-acetilglicitina) e de glicosilados malonilados (6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilgenistina, 6"-O-malonilglicitina) (SETCHELL, 1998; WANG et al. 1998). O teor de isoflavonas varia segundo a cor da soja, sua parte morfológica (cotilédone, hipocótiledone e casca), a variedade (fatores genéticos) e as condições ambientais de cultivo (temperatura e umidade) (CARRÃO-PANIZZI, 1996).

Outros compostos benéficos da soja relacionados à sua ação antioxidante são os fosfolipídeos, tocoferóis, aminoácidos e peptídeos. Hidrolisados protéicos têm atividade antioxidante associada aos aminoácidos livres ou peptídeos de baixos pesos moleculares (HAYES; BOOKWALTER; BAGLEY, 1977). Seis peptídeos com propriedades antioxidantes já foram isolados da proteólise da β-conglicinina da proteína de soja, compostos de 5 a 16 resíduos de aminoácidos, incluindo aminoácidos hidrofóbicos, valina, leucina em posição N-terminal e prolina, histidina e tirosina (CHEN; MURAMOTO; YAMAUCHI, 1995).

2.1.1. Proteínas da soja

Há três tipos de proteínas na soja: as envolvidas no metabolismo, as estruturais e as de reserva, que não possuem atividade biológica (ZARKADAS et al., 1994). Aproximadamente 80 a 90% do total das proteínas são de reserva e podem ser divididas em albuminas (10%), solúveis em água e as globulinas (90%) solúveis em soluções salinas (FUKUSHIMA, 1991). As maiores frações que compõem a proteína da soja são: 2S

(15%), 7S (34%), 11S (41,9%) e 15S (9,1%), de acordo com seu coeficiente de sedimentação obtido por ultracentrifugação, quando dissolvidas em pH 7,6 e força iônica 0,5 (WOLF; COWAN, 1975). As frações 11S e 15S são denominadas glicinina e polímeros de glicinina, respectivamente (WOLF, 1970). A fração 7S é mais heterogênea, constituída das proteínas β-conglicinina, γ-conglicinina, lipoxigenase, α-amilase e hemaglutininas ou lectinas (NIELSEN, 1985). A fração 2S consiste dos inibidores Bowman-Birk e Kunitz, citocromo C e α-conglicinina (WOLF, 1970).

As frações 7S e 11S são os principais componentes protéicos da soja, constituídas de misturas de macromoléculas de tamanhos, densidades de carga e estruturas diferentes, sendo que suas quantidades relativas podem variar em função da propriedade de associação-dissociação dessas proteínas (KOSHIYAMA, 1972; KILARA; SHARKASI, 1986; MORI; NAKAMURA; UTSUMI, 1986).

A fração 7S (150 a 175 kDa) apresenta estrutura quaternária e é uma glicoproteína que contém carboidratos ligados a resíduos de ácido aspártico do lado N-terminal da molécula. Os carboidratos consistem de 38 resíduos de manose e 12 de glucosamina por molécula de proteína (KILARA; HARWALKAR, 1996). A globulina 7S é composta por quatro subunidades associadas através de ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (THANH; SHIBASAKI, 1978). O conteúdo de α-hélice, β-estrutura e "random coil" da estrutura secundária são 5, 35 e 60 %, respectivamente (KOSHIYAMA; FUKUSHIMA, 1973). As ligações dissulfídicas são limitadas pela presença de apenas 2 a 3 grupos cisteína por mol de proteína (WOLF, 1978).

A β-conglicinina, maior constituinte da fração 7S, é uma glicoproteína trimérica composta de três subunidades: α' (57-72 kDa), α (57-68 kDa) e β (45-52 kDa) (ARRESE et al., 1991) em sete diferentes combinações (βββ, ββα', ββα, βαα', βαα, ααα' e ααα) (YAMAUCHI et al., 1981). As subunidades são ligadas via interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio sem nenhuma ligação dissulfídica (THANH; SHIBASAKI, 1978). Em pH 5,0 e força iônica 0,5, a β-conglicinina apresenta estrutura trimérica (7S) enquanto que em força iônica 0,1 é predominante a estrutura hexamérica (9S) (KOSHIYAMA, 1968). Em pH 2,5 e força iônica menor que 0,1, a β-conglicinina dissocia-se reversivelmente em frações de 2-3S e 5-6S (WOLF; COWAN, 1975). O ponto isoelétrico da β-conglicinina é 4,64 (KOSHIYAMA, 1983).

A globulina 11S (glicinina) tem estrutura polimérica de massa molar na faixa de 350-380 kDa e é formada por polipeptídeos básicos e ácidos, unidos por ligações dissulfídicas (STASWICK; HERMODSON; NIELSEN, 1984). Pelos menos seis polipeptídeos ácidos ($A_{1,a}$, $A_{1,b}$, A_2-A_4 e A_5) e cinco polipeptídeos básicos ($B_{1,a}$, $B_{1,b}$, B_2-B_4) têm sido isolados (NIELSEN, 1985). Em temperatura ambiente e pH igual a 7,6, a glicinina forma complexos hexaméricos com massa molecular em torno de 360 kDa, enquanto que em pH igual a 3,8 forma como complexos triméricos (7S) com massa molar em torno de 180 kDa (LAKEMOND et al., 2000). O ponto isoelétrico da glicinina é 4,9 (KOSHIYAMA, 1983).

A glicinina possui baixas quantidades de metionina e altas de lisina. A proporção de aminoácidos hidrofóbicos (alanina, valina, isoleucina, leucina e fenilalanina) e aminoácidos hidrofílicos (lisina, histidina, arginina, ácido aspártico e ácido glutâmico) é de 23,5 e 46,7%, respectivamente (PENG et al., 1984). Nos estudos estruturais por dicroísmo circular realizado por Marcone; Kakuda e Yada (1998), a glicinina apresentou em sua estrutura secundária altos níveis de β-estruturas e baixos de α-hélice. Sua estrutura quaternária é estabilizada por interações hidrofóbicas e eletrostáticas, bem como as pontes dissulfetos entre os polipeptídeos ácidos e básicos (PENG et al., 1984).

2.2. Irradiação de alimentos

A radiação ionizante pode ser aplicada em diversos alimentos com diferentes objetivos, tais como: esterilização de materiais, retardo do amadurecimento de frutas, descontaminação de especiarias, conservação de carnes, de tubérculos, de grãos e controle de insetos (HACKWOOD, 1991). Essa tecnologia é aprovada em mais de 40 países, para mais de 50 diferentes alimentos (SOMMERS, 2004), mas no Brasil ainda é muito pouco utilizada, sendo praticamente restrita à descontaminação de ervas e especiarias, em substituição ao método de fumigação com gases esterilizantes como o óxido de etileno, que foi proibido na União Européia em 1991 e está sendo banido de vários outros países, inclusive no Brasil, por ser uma substância carcinogênica (HERNANDES; VITAL; SABAA-SRUR, 2003).

A palavra “radiação” é utilizada para designar a energia radiante que se move através do espaço na forma de ondas eletromagnéticas. A irradiação de alimentos emprega uma faixa de energia eletromagnética conhecida como radiação ionizante. Radiações ionizantes são partículas ou fótons com energia suficiente para produzirem

partículas eletricamente carregadas (íons) nos materiais com os quais entram em contato (HERNANDES; VITAL; SABAA-SRUR, 2003). Existem três tipos de energia radiante utilizada para a irradiação de alimentos: feixe de elétrons, raios X e raios gama. Os dois primeiros utilizam eletricidade como fonte de energia, enquanto para a radiação gama são utilizadas fontes radioativas como o cobalto 60 e o césio 137 (SAPTCHENCO, 2003).

O processo de irradiação é regulamentado pela Organização para a Agricultura e Alimentação (FAO), pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sendo que são limitadas em 0,66 e 1,33 MeV para raios gama emitidos pela desintegração radiotiva do ^{60}CO e ^{137}Cesio, inferior a 5 MeV para raios-X , inferior a 10 MeV para feixe de elétrons. (DIEHL, 1995)

No processo de irradiação, o alimento (a granel ou empacotado) é exposto a uma dose controlada de radiação em uma sala ou câmara especial de processamento por tempo determinado (RUIZ, 2000; ALFEREZ, 2004). Os produtos irradiados podem ser transportados, armazenados ou consumidos imediatamente após o tratamento. Entre os fatores que influenciam os efeitos da radiação destaca-se a dose de radiação, que é a quantidade de energia absorvida por uma determinada massa de alimento. A unidade internacional é o Gray (Gy) que corresponde à absorção de 1 joule por Kg de alimento (DIEHL, 1995). Em 1980, um comitê composto por representantes do fundo das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), do grupo consultivo Internacional para a irradiação de Alimentos (ICGFI), da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) foi formado para estudar as doses de irradiação em alimentos, sendo que este comitê concluiu que doses de radiação ionizante até 10 kGy são seguras para a maioria dos alimentos. Em 1983, a Comissão do *Codex Alimentarius* adotou os resultados e as recomendações da FAO/ICGFI/IAEA/OMS (SAPTCHENKO, 2003). Mais recentemente a Comissão do Codex *Alimentarius* revisou os padrões adotados para o uso da irradiação em alimentos e declarou que o nível máximo da dose utilizada não deve exceder 10 kGy, exceto quando realmente se fizer necessário a utilização de doses maiores (CAC, 2003).

No Brasil, existe regulamentação sobre a irradiação de alimentos desde 1973 e portarias complementares foram editadas em 1985 e 1989 (OLIVEIRA, 2000). A Portaria n.º 30 de 02/08/89, da Divisão de Alimentos do Ministério da Saúde, determinava limite superior de irradiação de 10 kGy e apresentava lista de produtos aprovados para

irradiação, suas respectivas doses e proibia a re-irradiação. Em 26/01/2001, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a Resolução (RDC) n.º 21, que não restringe quais alimentos podem ser irradiados e nem a dose máxima absorvida para se obter o fim desejado, desde que não haja prejuízo nas suas qualidades funcionais e sensoriais (ANVISA, 2001).

A radiação ionizante penetra no alimento e pode agir diretamente sobre os componentes essenciais da célula ou, indiretamente, proporcionando a formação de produtos radiolíticos, particularmente os radicais livres formados a partir da água. O DNA cromossômico é o alvo principal do processo de irradiação, embora os efeitos sobre a membrana citoplasmática também apresentem um papel adicional importante no dano celular causado pela irradiação (WORCMAN-BARNINKA; LANGRAF, 2003).

A reatividade dos radicais livres depende da sua capacidade de se difundir no meio. Em alimentos sólidos secos ou congelados, a difusão é bem restrita. Quando o material absorve umidade ou ocorre descongelamento, esses radicais começam a se movimentar reagindo entre si ou com os constituintes do alimento, resultando na formação de produtos finais estáveis. Embora este processo de formação de produtos estáveis seja realizado em fração de segundos, algumas reações continuam durante a estocagem do alimento (LAGUNAS-SOLAR, 1995).

Em Cuba, o controle de insetos com uso da irradiação, mostrou-se satisfatório durante armazenamento de farinha de trigo, milho, arroz, cacau e feijão de soja (ALVAREZ et al., 1996). Em Taiwan, alguns produtos como batata, batata doce, cebolinha, cebola, alho, gengibre, manga, mamão, arroz, feijão, soja, trigo, farinha e alguns condimentos são irradiados e testes de mercado realizados entre os consumidores confirmaram a aprovação do uso de alimentos irradiados (YANG, 1998). Em países como Argentina, Dinamarca, Estados Unidos, Finlândia, França, Hungria, Israel, Noruega e Iugoslávia se irradiam principalmente especiarias. No Brasil, existem três plantas industriais que podem irradiar alimentos e outros produtos; no entanto, a esterilização de equipamentos cirúrgicos responde por 90% dos produtos irradiados (TOSS; CORRÊA, 2004). A Empresa Brasileira de Radiações Ltda. (EMBRARAD), localizada em Cotia, no estado de São Paulo, opera com um irradiador Nordion JS-7500, a Tech Ion Industrial Brasil S.A, localizada em Manaus e a Companhia Brasileira de Esterilização (CBE), localizada em Jarinú irradiam vários produtos, entre eles alimentos e embalagens. Alguns institutos como o Instituto de

Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), o Centro de Energia Nuclear para a Agricultura da USP (CENA), o Instituto de Biociências e Escola de Farmácia da Universidade de São Paulo, o Instituto Biológico, a Universidade Estadual de Campinas, a Universidade Estadual Paulista de Botucatu, todos no estado de São Paulo, a Universidade do Rio de Janeiro, a Universidade Federal de Minas Gerais e a Universidade de Pernambuco desenvolvem estudos na área de irradiação de alimentos (ACI, 2006; CDTN, 2005; DEL MASTRO, 1999).

2.2.1. Radiação gama

Os raios gama são definidos como radiações eletromagnéticas produzidas durante o decaimento de certos radio-isótopos, como o ^{60}Cobalto ou ^{137}Cesio, sendo que a energia liberada pelos átomos é da ordem de 1,33 MeV e 0,66 MeV respectivamente (DIEHL, 1995; HACKWOOD, 1991). O ^{60}Co tem meia vida de 5,27 anos. Decai para o ^{60}Ni, níquel 60, que é estável, por meio da emissão de dois fótons gama (1,17 e 1,33 MeV) e de uma partícula beta (0,31 MeV). É produzido artificialmente, por meio da irradiação de barras de ^{59}Co (Cobalto 59) em reatores nucleares. As vantagens do uso do ^{60}Co como fonte de irradiação são: alto poder de penetração, boa uniformidade de dose, comercialmente disponíveis e baixo risco ambiental (HERNANDES; VITAL; SABAA-SRUR, 2003).

O mecanismo de ação da radiação gama e raios-X envolvem três processos principais: efeito fotoelétrico, produção de pares e efeito Compton. O efeito Compton é o principal mecanismo de transferência de energia em alimentos irradiados. Neste processo, um fóton incidente interage com o átomo e transfere sua energia, provocando a ejeção de elétrons. Os elétrons ejetados contêm energia suficiente para causar excitação e ionização nos átomos restantes. A radiação penetra profundamente no alimento e, por meios físicos, interage com átomos e moléculas, provocando transformações químicas e biológicas (URBAIN, 1986).

A interação da radiação com o alimento envolvem efeitos primários e secundários. No efeito primário, ocorre a ionização, dissociação e excitação dependendo da energia transferida e os produtos formados são extremamente reativos. Toda essa reatividade tem como conseqüência alguns efeitos secundários, que podem ser: recombinação, dimerização, captura de elétrons e desproporcionalização (HERNANDES; VITAL; SABAA-SRUR, 2003; SABINO, 2004).

A água, principal componente da maioria dos alimentos, absorve a radiação sofrendo radiólise, com formação de íons e radicais. O radical hidroxila formado é um poderoso agente oxidante e reage preferencialmente com compostos insaturados presentes nos alimentos, especialmente com polienos conjugados e com hidrogênio presente em ligações C-H e S-H. Elétrons hidratados reagem na maioria das vezes com compostos aromáticos, ácidos carboxílicos, cetonas, aldeídos e tióis. O hidrogênio interage com ligações C-H ou é adicionado a compostos olefínicos. Efeitos primários não são específicos, podendo ocorrer em qualquer tipo de molécula ou átomo. Em moléculas pequenas e simétricas a energia absorvida pode ser uniformemente distribuída, provocando quebra homogênea de ligações. Em moléculas maiores, a energia é distribuída desigualmente, produzindo quebra de ligações em apenas alguns sítios resultando diferentes produtos de degradação. Os radicais livres e íons formados pelos efeitos primários são muito reativos, podendo interagir entre si ou com constituintes do alimento. Estas reações ocorrem rapidamente e são denominadas de efeitos secundários, responsáveis por 80% dos efeitos provocados pela radiação. (SABINO, 2004; URBAIN, 1986).

2.2.2. Feixe de elétrons

O sistema de feixe de elétrons usa a eletricidade para gerar elétrons em um ponto central (SAPTCHENKO, 2003). Os elétrons são produzidos em aceleradores de elétrons, que podem ser definidos como sistemas onde se estabelece um potencial de alta voltagem entre um cátodo e um ânodo num tubo de vácuo. O cátodo emite feixe de elétrons, chamados raios catódicos ou feixes eletrônicos (RELA, 2003).

No sistema de feixe de elétrons, os produtos embalados são transportados por uma esteira onde são irradiados. A dose aplicada no produto pode variar com o ajuste na velocidade da esteira transportadora, controlando assim o tempo de exposição do produto. Os elétrons têm a capacidade de matar ou inativar bactérias, fungos, insetos e outros microorganismos ao quebrarem as ligações moleculares do DNA. A redução microbiana depende da dose aplicada ao produto. Doses típicas usadas para a inativação de organismos em carnes estão entre 1,0 e 2,0 kGy, dependendo da temperatura do produto e nível de redução exigido (SAPTCHENKO, 2003).

Uma importante diferença entre os raios gama e de feixe de elétrons é a capacidade de penetração nos materiais A capacidade de penetração do feixe de elétrons

é muito menor que a dos raios gama (HAYASHI, 1991). Tanto para a radiação gama como para feixe de elétrons, a espessura do material e a ser tratado e a sua densidade são fatores determinantes. Para um material com densidade de 1 g/cm^3 o poder de penetração do feixe de elétrons com energia de 10 MeV é de 5 cm, enquanto que para um irradiador gama com fonte de ^{60}Co com energia média de 1,25 MeV é de cerca de 50 cm (RELA, 2003).

2.2.3. Alterações dos alimentos pelo uso da radiação ionizante

Assim como outras técnicas de processamento de alimentos, a radiação induz certas alterações que podem modificar a composição química e o valor nutritivo dos alimentos. A natureza e extensão destas mudanças dependem da composição do alimento, principalmente do conteúdo de água, da dose de radiação e da temperatura e a presença ou ausência de oxigênio utilizados no processo (KILCAST, 1994; WIENDL, 1984).

Proteínas, carboidratos e lipídeos podem ser afetados pelo uso da radiação. A radiação gama induz mudanças nas propriedades físico-químicas das proteínas, dependendo de sua natureza e da dosagem da radiação (NISIZAWA, 1988). Transformações químicas de aminoácidos, tais como, quebra de ligações peptídicas, dissulfídicas, pontes de hidrogênio, bem como ligações cruzadas das cadeias protéicas podem acontecer, influenciando a estrutura terciária das proteínas e suas propriedades físico-químicas (CIÉSLA; ROOS; GLUSZEWSKI, 2000).

O desencadeamento de processos de auto-oxidação de lipídeos com a formação de peróxidos e compostos carbonil voláteis, que são responsáveis pela rancidez é um exemplo das possíveis alterações provocadas por processos de irradiação. Os ácidos graxos insaturados são mais facilmente oxidados que os saturados, embora o processo de oxidação possa ser amenizado pela eliminação de oxigênio durante o processo de irradiação (KILCAST, 1994; MERRITT, 1972). Propriedades físico-químicas do óleo extraído de grãos de soja irradiados com doses de até 10 kGy foram investigadas por Byun et al. (1996), sendo que nenhuma alteração foi observada no conteúdo de lipídeos totais, na composição de ácidos graxos e no índice de peróxidos. Por outro lado, Zeb e Taufiq (2004) verificaram que o uso de doses acima de 10 kGy, aplicadas em soja, girassol e palma podem afetar a qualidade físico-química de seus óleos, como aumento de ácidos graxos livres e índice de peróxido.

Nos carboidratos, o uso da irradiação, pode provocar a quebra em unidades menores. Este processo, por exemplo, é responsável pelo amaciamento de frutas e outros vegetais devido a quebra da parede celular. O efeito depende da variedade e estágio de maturação do vegetal (KILCAST, 1994). O uso da irradiação em frutas apresenta alguns inconvenientes, pois dependendo da dosagem, podem ocorrer escurecimento, amolecimento e aparecimento de depressões superficiais, amadurecimento anormal e perda de aroma e sabor dos produtos (CHITARRA; CHITARRA, 1990).

Os micronutrientes, especialmente as vitaminas, são sensíveis a qualquer tratamento, principalmente ao térmico. Na irradiação, algumas vitaminas, como a riboflavina, niacina e vitamina D, são bastante estáveis, enquanto outras como a tiamina e vitaminas A, C, E e K são relativamente lábeis (KILCAST, 1994;THOMAS et al., 1981). Efeitos da irradiação gama, com doses até 10 kGy, nos conteúdos de tiamina e vitamina B_6 foram investigados em duas variedades de feijões, Carioca (*Phaseolus vulgaris L.)* e Macaçar (*Vigna unguiculata (L.) Walp*). O conteúdo de tiamina diminui nos feijões Carioca tratados com doses acima de 2,5 kGy e não foi alterado nos feijões Macaçar independente da dose aplicada. O conteúdo de vitamina B_6 diminuiu com o aumento da dose de radiação para ambas variedades estudadas (VILLAVICENCIO et al., 2000 a).

Além das alterações ocorridas nos macro e micronutrientes, estudos mostram que a irradiação de alimentos de origem vegetal pode ser efetiva na redução de oligossacarídeos que causam flatulência e também dos inibidores de quimotripsina e tripsina, possivelmente devido à reações de desnaturação e agregação (IYER et al., 1980; RAO; VAKIL, 1983). Outros fatores antinutricionais como inibidores da α-amilase, hemaglutininas e ácido fítico também são reduzidos pelo uso da irradiação (SIDDHURAJU; MAKKAR; BECKER, 2002). Villavicencio et al. (2000 b), verificaram que o uso de radiação gama em duas variedades de feijões, Carioca (*Phaseolus vulgaris L.)* e Macaçar (*Vigna unguiculata (L.) Walp*), com doses de até 10 kGy promoveu redução de taninos. Por outro lado, os autores observaram que doses de até 5 kGy, não afetaram as concentrações das frações dos fosfatos inositois.

Por outro lado, a irradiação, assim como nos outros processos convencionais, pode ser utilizada para melhorar as propriedades funcionais de alimentos. Estudos mostraram aumento na solubilidade das proteínas de farinha de amendoim (RAHMA; MOSTAFA, 1988) e de feijão (*Phaseolus vulgaris*) gama radiados (DOGBEVI; VACHON; LACROIX, 2000). Modificações estruturais da proteína, como aumento da hidrofobicidade e reação de

desamidação, promovidos pela irradiação são possivelmente responsáveis pela maior solubilidade (DOGBEVI; VACHON; LACROIX, 2000).

Outras modificações benéficas obtidas pelo uso da irradiação foram observadas em grãos de soja destinados à produção de leite e tofu, onde um aumento da dose de radiação de 2,5 para 10 kGy provocou a redução dos tempos requeridos para o cozimento e maceração dos grãos que resultou no maior rendimento da produção de leite de soja e também na melhor qualidade do tofu que foi avaliada pela cor, textura e sabor (BYUN; KWON; MORI, 1993). Delincée; Villavicencio e Mancini-Filho (1998), observaram que o uso de radiação gama até 10 kGy, não alterou o teor protéico, o valor biológico e a digestibilidade de duas variedades de feijões Carioca (*Phaseolus vulgaris L.)* e Macaçar (*Vigna unguiculata (L.) Walp*).

O impacto da irradiação de alimentos sobre os nutrientes e principalmente na formação de compostos tóxicos tem sido o foco de muitas pesquisas. O processo de irradiação pode induzir à alteração química em alguns alimentos, sendo que nenhuma das conhecidas, até o presente momento, são consideradas danosas à saúde humana. As substâncias resultantes dessas reações são denominadas produtos radiolíticos e alguns deles, como a glicose, ácido fórmico, acetaldeído e dióxido de carbono, estão naturalmente presentes nos alimentos ou são produzidos a partir de outros processos, como o aquecimento. Já os radicais livres, que também são produzidos em outros tratamentos (fritura, torrefação) e durante a oxidação natural dos alimentos, são normalmente substâncias bastante reativas e instáveis, que reagem com outras substâncias para formarem produtos estáveis. Consequentemente, sua ingestão não causa nenhum dano ou efeito toxicológico. (IAEA, 2004).

Dentre estas substâncias, dois grupos de componentes que merecem atenção são os benzenos e seus derivados e as alcilclobutanonas (SMITH; PILLAI, 2004). Em carnes bovinas irradiadas com doses de 1,5 a 4,5 kGy podem ser encontrados níveis de aproximadamente 3 ppb de benzeno. Essa quantidade de benzeno é bem menor que a encontrada naturalmente em ovos (62 ppb) e hadoque (200 ppb) (MCNEAL et al., 1993). As alcilclobutanonas foram inicialmente identificadas em lipídeos irradiados, em um trabalho pioneiro realizado por Le Tellier e Nawar (1972). Estas substâncias tem sido encontradas exclusivamente em alimentos irradiados contendo gorduras e são consideradas como um importante marcador para identificação de alimentos irradiados

(NDIAYE et al., 1999). Estudo realizado por Delincée et al. (2002), evidenciou o potencial genotóxico das alcilciclobutanonas em cobaias e células do cólon em humanos. Por outro lado, Marchioni et al (2004) afirmam que, embora as pesquisas apontem para a toxidade e genotoxicidade das alcilclicobutanonas, os dados dos resultados experimentais podem ser inadequados para caracterizar o possível risco associado ao consumo de alimentos irradiados contendo gorduras. Os autores salientam que outros componentes presentes nos alimentos podem influenciar nas reações químicas com as alciciclobutanonas e que mais conhecimentos sobre a cinética e metabolismo dessas substâncias no organismo vivo são necessários.

2.3. Propriedades funcionais de proteínas

2.3.1. Solubilidade

As características de solubilidade de uma proteína são muito úteis na seleção das condições ótimas de extração a partir de suas fontes naturais. O comportamento da solubilidade fornece um bom índice do potencial e da limitação da aplicação das proteínas e também informações sobre a otimização dos processamentos (KINSELLA, 1976).

A solubilidade de uma proteína é a manifestação termodinâmica do equilíbrio entre a interação proteína-proteína e proteína-solvente e está relacionada ao seu balanço de hidrofilicidade/hidrofobicidade. As principais interações que influenciam na solubilidade das proteínas são de natureza hidrofóbica e iônica. Interações hidrofóbicas promovem ligações proteína-proteína que resultam em um decréscimo de solubilidade, enquanto interações iônicas promovem ligações proteína-água e resultam em um aumento da solubilidade (DAMODARAM, 1996). A composição em aminoácidos de uma proteína, particularmente, o número de resíduos ácidos (aspargil, glutamil) e básicos (histidil, arginil, lisil), os quais apresentam cargas, aumenta o número de interações eletrostáticas com a água, contribuindo para maior solubilidade das proteínas (BODERÍAS; MONTERO, 1988).

Os fatores que afetam a solubilidade das proteínas são: tipo de proteína, histórico de processamento, pH, distribuição de cargas, força iônica ou concentração de sais, temperatura, natureza do solvente e a presença de outros ingredientes. As proteínas são em geral mais solúveis em pHs baixos (ácidos) ou elevados (alcalinos) por causa do excesso de cargas positivas ou negativas nestes pHs. Excesso de cargas de mesmo sinal produz repulsão das moléculas, que contribui para maior solubilidade das proteínas. O pH

de menor solubilidade de uma proteína é chamado de ponto isoelétrico (pI), com igual número de cargas positivas e negativas nas moléculas. Por se compensarem intrinsecamente quanto às cargas, no pI as moléculas não se repelem, ocorre a diminuição da solubilidade e aumenta a tendência de formar precipitados. (DAMODARAM, 1996).

Para um grande número de proteínas o pI está entre pH 3,5 e 6,5. As proteínas da soja são insolúveis em soluções aquosas em pH 4,0 e 5,0, correspondente à região isoelétrica. No entanto, elas são solúveis em soluções aquosas em pH acima ou abaixo do ponto isoelétrico e a adição de $CaCl_2$ (0,3 N) ou NaCl (0,7 N) aumenta parcialmente sua solubilidade em pH 4,5 (WOLF, 1978).

Em forças iônicas ou concentrações salinas baixas (0,5 a 1,0 M), a solubilidade das proteínas tende a aumentar, porém, à medida que se eleva a concentração salina, as proteínas tendem a se insolubilizar e precipitar. Os íons salinos passam a competir pela água com as moléculas de proteína, destruindo a sua capa de hidratação e permitindo que as moléculas de proteínas se atraiam mutuamente, agregando-se e formando precipitados. (DAMODARAN; KINSELLA, 1982).

Em geral, a solubilidade das proteínas aumenta com o aumento da temperatura entre 40 a 50ºC. No entanto, em temperaturas acima de 50ºC pode haver a desnaturação da proteína. Em muitos casos a desnaturação é seguida por agregação e conseqüente diminuição de solubilidade (ENGLARD; SEIFFER, 1990).

Solventes polares possuem constantes dielétricas mais elevadas; portanto, aumentam a solubilidade das proteínas por diminuírem a força de atração entre as moléculas. A constante dielétrica da água é 80, sendo uma das mais elevadas. Os solventes orgânicos possuem constantes dielétricas mais baixas e por esse motivo, alguns deles são bons precipitantes de proteínas (OLLIS; WHITE, 1990). Cadeias apolares alifáticas dos lipídeos também podem interagir com regiões hidrofóbicas das proteínas e diminuir sua solubilidade em meio aquoso (VOJDANI, 1996).

A solubilidade das proteínas de soja está relacionada com outras propriedades funcionais, como capacidade de gelificação e emulsificação e é afetada pelos métodos de preparo de produtos comerciais. Entre estes, a alta pressão, a irradiação e tratamento térmico aplicado para remoção de solventes, destruição de fatores antinutricionais e inativação de enzimas podem modificar a solubilidade das proteínas (KINSELLA, 1979).

Geralmente, a diminuição da solubilidade ocorre pela desnaturação e agregação (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1993).

Isolados protéicos de soja tratados a 60ºC possuem 91% de solubilidade em NaCl (0,5 M), enquanto que a 90ºC, sua solubilidade é reduzida para 43% (FURUKAWA; OHTA, 1983). A solubilidade em água das proteínas das farinhas de soja diminui de acordo com o grau de tratamento térmico recebido e estruturalmente, as pontes dissulfeto, de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas parecem estar envolvidas na insolubilização da proteína (CLATTERBUCK; KEHRBERG; MARABLE, 1980).

Os isolados comerciais apresentam amplas variações na sua solubilidade. Wagner e Añon (1990) avaliaram as características de treze isolados comerciais e encontraram índices de solubilidade de nitrogênio em água entre 24 a 84% e em NaCl 0,2M (pH 7,0) entre 10 e 49%. Quando mais desnaturado o isolado, menor foi sua solubilidade em NaCl 0,2M.

Vários termos são empregados para se referir à solubilidade de uma proteína: Índice de nitrogênio solúvel (INS), proteína solúvel em água (PSA), proteína dispersa em água (PDA) e índice de dispersibilidade da proteína (IDP). Os IDP e INS, métodos oficiais da “American Oil Chemists Society” são os mais comumente utilizados. Normalmente, a determinação envolve a dispersão da proteína em água, agitação sob condições controladas de pH, temperatura e força iônica, seguida de centrifugação. O nitrogênio na fração solúvel pode ser determinado pelo método de Kjeldahl ou métodos espectrofotométricos (KILARA; SHARKASI, 1986).

2.3.2. Propriedade Emulsificante

Emulsões são definidas como misturas de dois líquidos imiscíveis, estando um deles disperso no outro em forma de minúsculas gotículas (DAS; KINSELLA, 1990). Nos alimentos, as fases imiscíveis são geralmente uma fase aquosa (soluções ou dispersões aquosas de macro ou micronutrientes) e uma lipídica (óleo ou gordura onde podem estar dissolvidas substâncias lipossolúveis) (WAGNER, 2000). Se o óleo é a fase dispersa e a água a fase contínua, tem-se uma emulsão de óleo em água (O/A), ao contrário, se a água formar a fase dispersa e o óleo a fase contínua, tem-se uma emulsão água em óleo (A/O). Como água e óleo são imiscíveis, há necessidade de agitação mecânica para que se forme uma dispersão homogênea dos dois líquidos (HILL, 1996). Contudo, esse sistema é

considerado termodinamicamente instável, devido à elevada área interfacial criada, acompanhada por uma alta tensão interfacial, gerando um aumento da energia livre do sistema (WAGNER, 2000).

Agentes emulsificantes favorecem a formação de emulsões, diminuindo a tensão superficial na interface água/óleo, conferindo estabilidade em curto prazo, pela formação de um filme protetor ao redor das gotículas dispersas. Desta forma, as proteínas, em virtude da natureza anfipática (sua estrutura química apresenta segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos), são capazes de se orientar de acordo com a interface polar e não polar, sendo, portanto considerados ótimos emulsificantes (PANYAM; KILARA, 1996).

A redução da tensão superficial, essencial para se obter a emulsão é governada por três processos: difusão das moléculas de proteína e sua incorporação na interface; desdobramento das moléculas de proteínas adsorvidas; e rearranjo molecular na superfície das moléculas adsorvidas (PEARCE; KINSELLA, 1978). As proteínas diferem significativamente em suas propriedades ativas de superfície. Essas diferenças não podem ser atribuídas somente aos seus resíduos hidrofóbicos/hidrofílicos, mas também estão relacionadas às diferenças em sua conformação, como estabilidade/flexibilidade da cadeia polipeptídica, meio no qual elas se encontram dispersas e a distribuição desses grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície da proteína (KLEMASZEWSKI; HAQUE; KINSELLA, 1989).

Na formação da emulsão, os sítios hidrofóbicos se orientam para a fase apolar (óleo) enquanto que os segmentos polares e/ou com cargas se orientam para contactar a fase aquosa; porém, a maior parte da molécula que ocupa a interface, interage com as moléculas vizinhas e confere força e viscolelasticidade ao filme (PHILLIPS, 1981). As propriedades mecânicas e reológicas dos filmes de proteínas são importantes na formação e estabilização das emulsões e dependem do tipo e concentração da proteína, do pH do meio, da força iônica e da temperatura do meio em que elas se encontram, grau de desnaturação e presença de agentes redutores de ligações dissulfídicas (GARCIA et al., 1997). Além de estabilizar as emulsões, as proteínas modificam a textura e são importantes para a retenção do sabor e aroma (KINSELLA, 1984).

As proteínas de soja exibem boa propriedade emulsificante quando comparadas com outras fontes protéicas (QI; HETTIARACHCHY; KALAPATHY, 1997). A atividade e estabilidade emulsificante das proteínas de soja são importantes para seu uso em vários

sistemas alimentícios, como em emulsões cárneas, sorvetes e maionese (MOLINA; PAPADOPOULOU; LEDWARD, 2001). Elas auxiliam na formação e na estabilização de emulsões por reduzirem progressivamente a tensão interfacial com o aumento de sua concentração (KINSELLA, 1979).

As proteínas de soja se difundem mais rapidamente em direção à interface em soluções salinas do que em soluções aquosas. A presença de sal também pode reduzir a repulsão de cargas entre as proteínas e aumentar as associações hidrofílicas na interface (KINSELLA, 1979). O efeito do pH na relação entre características hidrofílicas e hidrofóbicas e propriedades emulsificantes das proteínas de soja foi reportada por Elizalde, Bartholomai e Pilosof (1996). A capacidade emulsificante mínima foi observada em valor próximo ao ponto isoelétrico da proteína. Segundo os autores, a baixa solubilidade no ponto isoelétrico dificultou a formação de emulsões por impedir a migração das proteínas para a interface o que consequentemente não contribuiu na repulsão de cargas de superfície entre as gotículas de óleo, responsável por sua estabilização.

A atividade emulsificante (determinada por técnicas turbidimétricas) e a estabilidade das emulsões de proteínas de soja formadas pela fração 7S diminuem acentuadamente em pH igual a 5,0, enquanto que para a fração 11S isso ocorre em igual a pH 6,0, sendo que a baixa turbidez das emulsões no ponto isoelétrico dessas proteínas foi relacionada com o maior tamanho das partículas de óleo, no caso da 11S, e com a floculação de pequenas partículas de óleo, no caso da 7S (YAMAUCHI et al., 1982).

Voutsinas, Nakai e Harwalkar (1983) verificaram que o tratamento térmico do isolado protéico de soja provoca aumento da atividade emulsificante, porém a estabilidade das emulsões inicialmente aumenta, porém em seguida, diminui proporcionalmente com o aumento da temperatura empregada. A desnaturação parcial das proteínas aumenta a flexibilidade das moléculas e expõe seus grupamentos hidrofóbicos, consequentemente aumentando a interação das proteínas na interface óleo/água (PANYAM; KILARA, 1996).

Basicamente, três metodologias têm sido usadas para o estudo de propriedades emulsificantes: capacidade emulsificante (CE), índice da atividade emulsificante (IAE) e estabilidade da emulsão (EE) (PANYAM; KILARA, 1996).

Capacidade emulsificante é definida como o volume de óleo (mL) que pode ser emulsionado por grama de proteína, antes que haja a inversão ou colapso das fases. A

capacidade máxima de emulsificação de uma proteína é determinada no ponto em que se verifica o colapso ou quebra da emulsão. A quebra da emulsão poderá ser percebida de três maneiras diferentes: visualmente, pela separação de fases; pelo som produzido em conseqüência da separação de fases; pela queda de condutividade (aumento da resistência elétrica) medida em um amperímetro (PANYAM; KILARA, 1996). Este método, como todos, tem seus inconvenientes como tempo total de emulsificação e o volume total da emulsão não são constantes; o valor de CE é dependente da velocidade de formação de agregados e da geometria do homogeneizador (WAGNER, 2000). Quando a viscosidade da emulsão é muito alta, a determinação do ponto de inversão é dificultada, pois a mistura do óleo na emulsão pode ser ineficiente e incompleta e erros nos valores da capacidade emulsificante são observados (PEARCE; KINSELLA, 1978).

A atividade emulsificante refere-se à área máxima interfacial por grama de proteína de uma emulsão estabilizada (DAMODARAN, 1996). Os métodos utilizados para determinação desta propriedade, diferem na técnica empregada para medir ou estimar esta área interfacial, que podem ser: por dispersão de luz (PEARCE; KINSELLA, 1978), por microscopia ótica ou eletrônica (KLEMASZEWSKI; HAQUE; KINSELLA, 1989) ou por contador de partículas (WALSTRA; OORTWING, 1969). No método descrito por Pearce e Kinsella (1978), a atividade emulsificante, expressa pelo índice de atividade emulsificante (IAE, em m^2/g) é definida como a área interfacial criada e estabilizada pela concentração de proteína e é estimada a partir da turbidez da emulsão em comprimento de onda de 500 nm. A turbidez produzida por uma dispersão de partículas é proporcional à área interfacial do filme de proteína que envolve a gotícula de óleo emulsificada (WAGNER, 2000).

O valor do índice de atividade emulsificante depende do volume da emulsão, tipo de homogeneizador, velocidade e duração da homogeneização, concentração de proteína, forma de diluição, classe e quantidade de óleo. Por ser uma medida turbidimétrica, deve-se evitar a formação de ar, formação de flóculos e variação de tempo entre as sucessivas diluições durante a análise (WAGNER, 2000).

O estudo da estabilidade de uma emulsão consiste em analisar a capacidade de uma proteína manter uma emulsão por um certo período de tempo, sob determinadas condições (PEARCE; KINSELLA, 1978). Curt (1994) classifica os métodos de estudo da estabilidade de uma emulsão em dez grupos segundo a técnica empregada: medida volumétrica ou gravimétrica da quantidade de óleo e água separados de uma emulsão;

extração de óleo por solventes; medidas reológicas; medidas óticas; medidas de tamanho das partículas; ressonância magnética; medida da temperatura após a irradiação com microondas; medidas condutimétricas; ultra-som e propriedades dielétricas.

Outra classificação pode ser feita em relação aos estudos dos mecanismos de desestabilização de uma emulsão (floculação, coalescência, desproporção e inversão) (WAGNER, 2000). O método comumente utilizado na medida de estabilidade é descrito por Pearce e Kinsella (1978), onde é utilizada a mesma técnica descrita para a atividade emulsificante (formação da emulsão, diluição de uma solução estabilizadora e medida de turbidez) com a inclusão de ensaios com a emulsão armazenada por um determinado período de tempo depois de sua preparação.

A estabilidade de uma emulsão é afetada por diversos fatores como a distribuição do tamanho da gotícula (geralmente entre 0,1-100 μM), a viscosidade da fase continua, a temperatura, a diferença de densidade entre fases, a relação volumétrica entre fases, as propriedades da película interfacial e o trabalho mecânico (agitação) a que a emulsão é submetida. Estes fatores indicam que as condições de formação e armazenamento de uma emulsão influenciam a estabilidade e se tornam úteis para a avaliação desta propriedade (WAGNER, 2000).

2.3.3. Propriedade de gelificação

A capacidade de formar géis sob condições específicas é uma importante característica de muitas proteínas. Os géis protéicos são compostos de uma matriz tridimensional, de rede cruzadas e de associação entre as cadeias polipeptídicas que ocorrem de maneira ordenada e são capazes de imobilizar uma grande parte de água. Os géis são caracterizados pelo aumento da viscosidade, plasticidade e elasticidade (KINSELLA; WHITEHEAD, 1989).

A formação do gel protéico usualmente requer aquecimento da proteína e o processo de gelificação acontece em duas etapas, envolvendo inicialmente a desnaturação da proteína nativa com desdobramento da cadeia polipeptídica, que gradualmente se associam e, nesta fase, o chamado “progel” é formado (FIORA PILOSOF; BARTHOLOMAI, 1990). O segundo passo é a associação de moléculas desnaturadas para formar uma matriz de gel capaz de reter água, lipídeos, açúcar, “flavors” e outras substâncias. As propriedades de textura dos géis estão intimamente

relacionadas ao tipo de rede na matriz (WANG; DAMODARAN, 1990). Quando aquecidos em torno de 100ºC, o gel passa do estágio “progel “ em “metasol” devido à degradação térmica das estruturas terciárias e secundárias das proteínas (GARCIA et al., 1997).

Os géis podem ser classificados como termo-reversíveis e termo-irreversíveis. Nos termo-reversíveis, os géis de proteínas são transformados em condições de pró-gel no aquecimento, passando a gel no resfriamento, que pode ser revertido ao estado de pró-gel com subsequente aquecimento, sugerindo que o passo de agregação é termo-reversível. Nos géis termo-irreversíveis, uma vez formados não revertem ao estado pró-gel se submetidos ao aquecimento. As forças de ligação predominantes são diferentes de acordo com o tipo de gel. Nos termo-reversíveis a estrutura é estabelecida basicamente por pontes de hidrogênio, as quais se rompem facilmente no aquecimento. Já os géis irreversíveis são formados por ligações dissulfídicas. (OAKENFULL, 1987).

Do ponto de vista microestrutural podem ser encontrados vários tipos de géis protéicos: os formados por uma rede de finos filamentos e os agregados ou particulados. Os primeiros são formados por uma associação ordenada de moléculas de proteína sendo que a espessura dos filamentos é muito pequena, de tal forma que os géis são transparentes. Esta é uma estrutura típica de muitos polissacarídeos e pouco comum nos géis protéicos, salvo os de gelatina. Estes géis retêm muita água e são termo-reversíveis. Para as proteínas globulares, as moléculas se associam de forma covalente e não covalente formando filamentos de pequenas partículas tipo “colar de pérolas”. A formação de géis agregados ocorre em pHs próximos do ponto isoelétrico, por desnaturação parcial da proteína ou pela presença de sais. Os géis agregados são opacos e possuem menor capacidade de retenção de água. (PILOSOF, 2000).

No caso de géis de proteína, a rede formada é considerada como resultante de um equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-solvente e as forças repulsivas e de atração entre as moléculas. Entre as forças atrativas se encontram fundamentalmente as interações hidrofóbicas maximizadas por temperaturas elevadas, forças eletrostáticas, iônicas, pontes de hidrogênio e dissulfeto. O grau de contribuição de todas essas forças varia, dependendo da natureza da proteína, do meio formador do gel e das várias etapas do processo de gelificação (CLARK; LEE-TUFFNEL, 1986). A concentração de proteína na dispersão é um dos fatores mais importantes que determina as características finais dos géis. A maioria das proteínas apresenta uma concentração mínima para que ocorra o

processo de gelificação. A formação e as características dos géis também são afetados pela intensidade do tratamento térmico, pH, tipo e concentração dos sais, açúcares e outros componentes como os polissacarídeos (RENKEMA et al., 2000; SHIMADA; CHEFTEL, 1988).

De um modo geral, em pH afastado do ponto isoelétrico, ocorre maior repulsão entre as moléculas e não se forma gel de maneira ordenada. Entretanto, no pH isoelétrico, as moléculas se atraem e o gel formado é opaco, pouco elástico e menos consistente (DOI, 1993). Os géis estabilizados por pontes de hidrogênio tendem a ser termicamente reversíveis, enquanto que os estabilizados por pontes dissulfetos são termicamente irreversíveis. Com o aquecimento, verifica-se um aumento de formação de pontes dissulfeto e um fortalecimento das interações hidrofóbicas. Contudo, a formação de pontes de hidrogênio ocorre principalmente no resfriamento (CLARK; LEE-TUFFNEL, 1986).

É importante a ação de agentes redutores e oxidantes sobre a formação de géis, uma vez que esses agentes afetam o número de pontes dissulfeto, tão fundamentais na interação proteína-proteína (SINGH, 1991). Essas reações são utilizadas amplamente para introduzir mudanças na firmeza e/ou consistência dos géis para diversas finalidades. Enzimas têm sido utilizadas para introduzir ligações cruzadas, inter e intramolecular em proteínas de soja, caseína e outras proteínas lácteas para aumentar a capacidade de formação de gel dessas proteínas (NIO, MOTOKI; TAKINAMI, 1985; NONAKA et al., 1992; NONAKA et al., 1994).

A gelificação de dispersões de proteína de soja pode ser promovida pelo aquecimento e resfriamento ou pela adição de cálcio. Dispersões protéicas de soja no estado “sol” mudam para o “progel” sob condições de aquecimento, sendo que o gel é formado no resfriamento. O aquecimento inicial causa a dissociação irreversível dos polipeptídeos das globulinas, que sob resfriamento agregam em uma rede estabilizada por pontes de hidrogênio e interações iônicas (KINSELLA, 1979).

Tanto a glicinina como a β-conglicinina da soja tem capacidade de formar redes ordenadas consistindo de filamentos grossos (HERMANSSON, 1986). Os géis de soluções de glicinina são formados por estruturas regulares cilíndricas e ocas. A 85ºC, na presença de NaCl, a glicinina forma géis com estruturas agregadas. Os géis de β-conglicinina são formados por estruturas mais irregulares, agregadas na forma de “duplos espirais”. A

adição de sal não afeta a microestrutura dos géis de β-conglicinina como acontece com os de glicinina. (HERMANSSON, 1986). As características dos géis obtidos de isolados protéicos de soja, onde a glicinina e a β-conglicinina estão presentes, são melhores que os obtidos com as frações protéicas separadas (YAO; TANTEERATARM; WEI, 1990).

Os géis de glicinina são mais firmes e mais elásticos do que os da β-conglicinina (SHIMADA; MATSUSHITA, 1980). Diferenças na estabilidade térmica da glicinina e β-conglicinina, especialmente na presença de várias concentrações de sal, pode promover géis com diferentes propriedades físicas (FURUKAWA; OHTA; YAMAMOTO, 1979).

Kang, Matsumura e Mori (1991) avaliaram os géis produzidos de dispersões de precipitados ácidos de proteínas de soja em temperaturas de 80 a 100ºC e nas concentrações de 18 a 20% e observaram que géis formados em altas temperaturas e concentrações de proteínas eram firmes, duros e pouco quebradiços. Por outro lado, estes autores observaram que a elasticidade dos géis não foi afetada pela variação de concentração, porém foi menor para os géis obtidos em altas temperaturas.

Os géis podem ser caracterizados do ponto de vista macroestrutural ou microestrutural. A avaliação macroestrutural envolve as propriedades físicas e químicas do sistema e pode ser realizada através das análises de viscoelasticidade, de textura, de propriedades de fluxo (viscosidade) e de retenção de água. A caracterização em nível molecular do sistema requer avaliação das propriedades relacionadas às transformações moleculares que ocorrem durante a formação do gel. Entre a avaliação macroestrutural e a molecular, se pode definir uma região chamada de “microestrutural”. Esta avaliação envolve as reações e mudanças físicas que não podem ser observadas visualmente. Dos tipos de análises microestruturais podem ser destacadas: a microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia ótica e calorimetria diferencial de varredura (CDV) ou DSC. (PILOSOF, 2000).

2.4. Alterações químicas dos grãos de soja durante armazenamento

Após a colheita, a soja geralmente é armazenada até ser processada e longos períodos de estocagem e condições ambientais inadequadas podem afetar negativamente sua qualidade (HOU; CHANG, 1998). A manutenção da qualidade da soja é dependente do tempo de estocagem, temperatura, teor de umidade, presença de injúria mecânica, variedade dos grãos, presença de microorganismos e ataque de insetos (LIU, 1997).

Estudos sobre armazenamento de grãos têm mostrado que a umidade inicial é o fator mais importante na manutenção da qualidade, principalmente quando armazenados em temperatura ambiente, sendo indicada umidade entre 12 a 15% (em base seca) (RIOS; ABREU; CORRÊA, 2003; AFONSO; CORRÊA; QUEIROZ, 2000; CHANG et al., 2004; LIU, 1997). Afonso, Corrêa e Queiroz (2000) também salientam que a longevidade das sementes de soja durante o armazenamento dependerá da umidade relativa do local devido à sua característica de higroscopicidade. No entanto, Carvalho e Nakagawa (1988) relatam que a umidade do ar intergranular e a temperatura são fatores determinantes na qualidade fisiológica do grão durante o armazenamento e que a umidade relativa do ar, estritamente relacionada ao teor de umidade da semente, influenciará nos diferentes processos metabólicos que podem ocorrer no grão.

Dependendo das condições e do tempo de estocagem, os macronutrientes dos grãos, tais como as proteínas, lipídeos, carboidratos e vitaminas podem ser afetados. As α e β-amilases convertem o amido em dextrinas e maltose, principalmente em grãos armazenados com alto teor de umidade. Normalmente, grãos armazenados por longos períodos contêm dextrinas e uma grande quantidade de açucares redutores e diminuição dos não redutores. Em grãos armazenados com umidade acima de 15% pode ocorrer a fermentação de carboidratos com produção de álcool e ácido acético, resultando em odores indesejáveis, além da perda de seu valor nutritivo (ATHIÉ et al., 1998).

Quando os grãos apresentam alto teor de umidade ou são armazenados em ambiente com alta umidade, os lipídeos são hidrolisados pelas lipases em ácidos graxos livres e glicerol. Essa alteração é acelerada pelo crescimento fúngico e a hidrólise dos lipídeos ocorre muito mais rapidamente do que a das proteínas e carboidratos. As alterações deteriorativas nos lipídeos dos grãos também podem ser oxidativas resultando em odor e sabor ranço (ATHIÉ et al., 1998).

As alterações que ocorrem no armazenamento dos grãos de soja podem levar à perdas funcionais e nutricionais e, consequentemente, reduzir seu valor comercial. Estas alterações estão principalmente associadas às proteínas, seu maior componente (THOMAS, MAN; MAN, 1989; LAMBRECHT et al., 1996). Estudos mostram que o armazenamento de grãos de soja em temperaturas e umidades relativas acima de 20ºC e 65% respectivamente, resulta na diminuição da solubilidade, decréscimo na digestibilidade

"*in vitro*" das proteínas e no aumento dos aminoácidos livres (THOMAS, MAN; MAN, 1989; ATHIÉ et al., 1998; HOU; CHANG, 1998).

Poucas alterações no teor de minerais ocorrem em grãos armazenados de maneira adequada. A maior parte do fósforo nos grãos está presente na forma de fitato e a sua disponibilidade pode aumentar durante a estocagem, devido à ação da fitase, uma enzima endógena do grão (ATHIÉ et al., 1998).

Perdas de carotenos e tocoferóis, principalmente em milho e sorgo, ocorrem durante o armazenamento e especialmente em temperaturas elevadas. As perdas de tiamina (vitamina B_1) e riboflavina (vitamina B_2) dependem das condições de estocagem. Perdas de outras vitaminas do complexo B são menores em grãos armazenados em condições adequadas (ATHIÉ et al., 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram utilizados grãos de soja do cultivar Embrapa 48, fornecidos pela "Brejeiro" (Produtos Orlândia S/A, SP, Brasil), cultivados na região de Nuporanga-SP e colhidos no mês de março de 2003.

Os reagentes utilizados foram de grau analítico (p.a.) e cromatográfico de várias procedências. Os equipamentos usados foram específicos para cada método.

3.2. Métodos

3.2.1. Irradiação dos grãos de soja

A irradiação dos grãos de soja foi realizada no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) localizado na cidade de São Paulo (SP, Brasil). Os grãos de soja foram divididos em quatro lotes, sendo que dois lotes, embalados em sacos de papel, foram submetidos à radiação gama com doses de 2,0 e 5,0 kGy respectivamente, com fonte de ^{60}Cobalto, Gammacell 220 (Atomic Energy of Canada Ltd., Canadá) com atividade aproximada de 5669 Ci. A taxa de dose empregada foi de 4,68 kGy/h. Um terceiro lote foi embalado em sacos plásticos com altura máxima de 7,0 mm e irradiado com dose de 2,0 kGy, utilizando feixe de elétrons, Dynamitron II Electron Beam Acelerador (Radiation Dynamics, Inc., N.Y. EUA), com taxa de dose de 4,47 kGy/s. Foram realizadas duas passadas sob o feixe de elétrons. Após a irradiação com feixe de elétrons, os grãos foram transferidos para sacos de papel. Um quarto lote foi utilizado como grupo controle (não irradiado).

3.2.2. Armazenamento dos grãos de soja

Todos os lotes, embalados em sacos de papel (tratados com raios gama, feixe de elétrons e o grupo controle) foram armazenados por doze meses em condições ambiente. Medidas da temperatura máxima e mínima e umidade relativa do local de armazenamento foram realizadas diariamente utilizando-se um termo-higrômetro (Incoterm, RS, Brasil). A amostra dos lotes foi retirada a cada quatro meses para realização das análises.

3.2.3. Obtenção das farinhas e isolados protéicos de soja

Os grãos irradiados e não irradiados foram decorticados, usando-se o descascador mecânico para grãos e triturados em moinho de facas com câmara termostatizada (mod. MA-630, Marconi Ltda, SP, Brasil). O óleo foi extraído em extrator tipo Soxlet e a dessolventização dos grãos triturados foi feita em capela. Os grãos triturados foram moídos em moinho de facas com câmara termostatizada obtendo-se as farinhas com granulometria de 30 mesh. Os isolados foram produzidos a partir das farinhas desengorduradas de acordo com método descrito por Petrucelli e Ãnón (1995). O fluxograma do processo pode ser observado na Figura 1. As farinhas (FDS) e os isolados protéicos (IPS) obtidos de grãos irradiados e controle foram denominados da seguinte forma: FDS-C e IPS-C (obtidos de grãos não irradiados); FDS-2,0 kGy e IPS-2 kGy (obtidos de grãos gama irradiados com dose de 2 kGy); FDS-5 kGy e IPS-5 kGy (obtidos de grãos gama irradiados com dose de 5 kGy); FDS-Acel e IPS-Acel (obtidos de grãos irradiados com dose de 2 kGy utilizando-se feixe de elétrons).

3.2.4. Caracterização dos grãos de soja

3.2.4.1. Composição centesimal

Teor de umidade, proteína e cinzas foram determinados segundo A.O.A.C (1990) e de lipídeos pelo método descrito por Bligh e Dyer (1959). Para conversão de nitrogênio em proteína, o teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator 6,25.

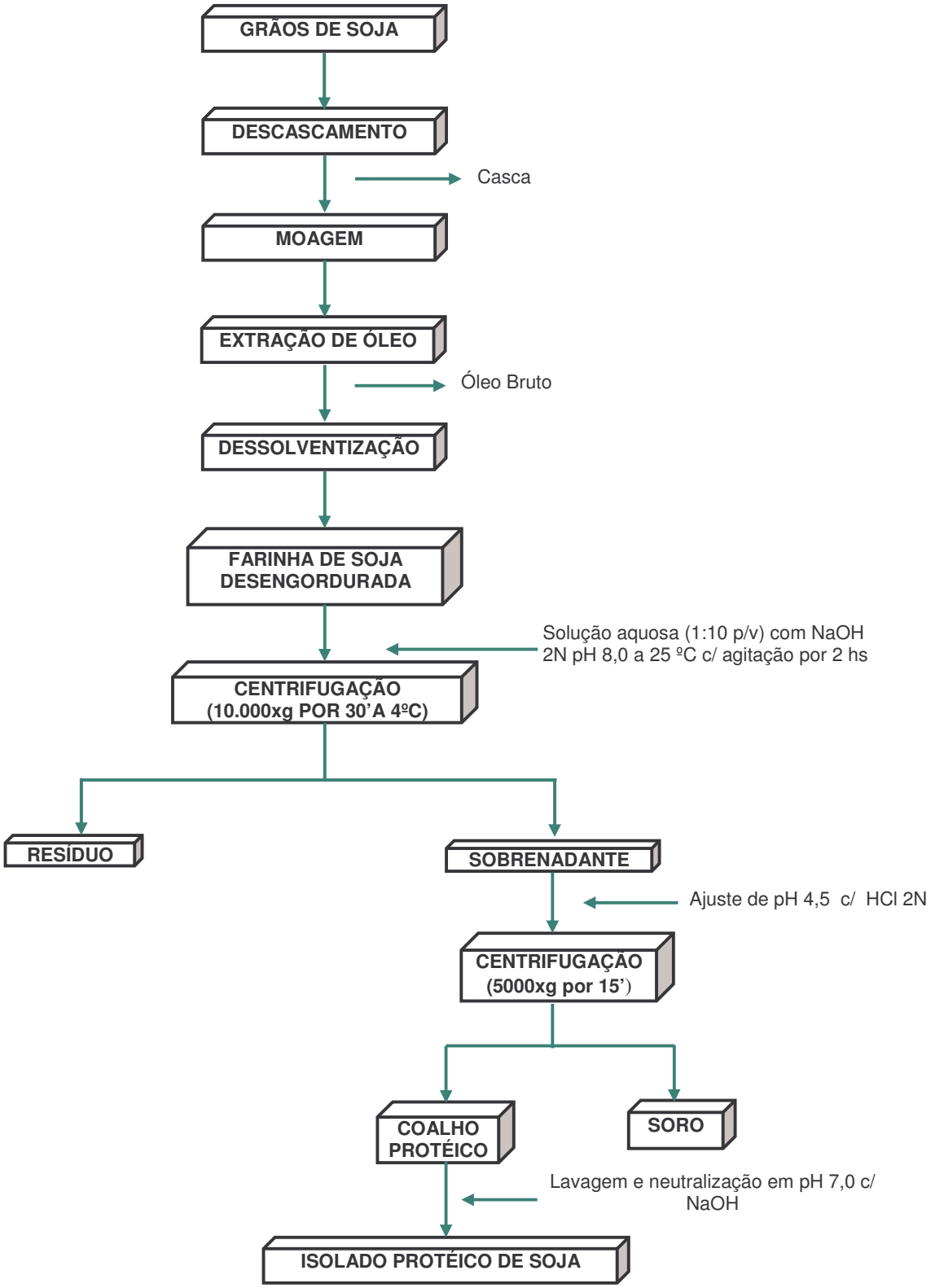

Figura 1. Fluxograma para produção da farinha desengordurada e isolado protéico de soja.

3.2.4.2. Atividade de água (Aw)

A atividade de água dos grãos de soja foi medida em equipamento Aqua-Lab, serie 3TE (Decagon Devices, Inc. Pullman, Washington, EUA) conforme especificações do fabricante. A análise foi realizada em triplicata.

3.2.4.3. Teor de isoflavonas nos grãos de soja

Os grãos de soja foram moídos em moinho Janke e Kunkel A-10 (Wilmington, USA) sob refrigeração (4 ± 1ºC) e peneirados em peneira de 0,25 mm. Amostra de 1 g foi homogeneizada em 20 mL de solução de metanol 80% sob agitação magnética por 2 horas à 4ºC (GENOVESE; LAJOLO, 2001). Os extratos metanólicos foram filtrados em papel Whatman nº 6 e concentrados para eliminação do metanol em evaporator rotativo (Rotavapor® RE 120-Buchi, Flawil, Sweden) a 40 ± 1ºC. O volume foi ajustado com metanol (grau cromatográfico) para se obter concentração final de 80% de metanol. Alíquotas de 20 μL, previamente filtradas em membrana PTFE (politetrafluroetileno) 0,22 μM da Millipore Ltda (Billerica, MA, EUA), foram injetadas automaticamente em cromatógrafo liquido da Hewlett Packard (EUA) série 1100, com detetor de arranjo de diodos (DAD) e coluna C18 NovaPaK (Waters, Milford, EUA) (30cm x 4,6 mm). As condições cromatográficas foram: fluxo de 1 mL/min; a fase móvel foi com gradiente de aumento linear de 18 a 60% de acetonitrila e ácido acético 0,1%; a detecção foi feita a 255 nm. A curva padrão foi obtida com daidzeína e genisteína da SIGMA Chemicals Company (St. Louis, MO, EUA), daidzina e genistina da Apin Chemicals LTD. (Abingdon, Reino Unido), glicitina e gliciteína da Fujicco Co. Ltd (Kyoto, Japão). As curvas obtidas normalizadas considerando-se as diferenças de peso molecular das formas glicosiladas, multiplicando-se a massa de cada derivado pela razão entre o peso molecular da respectiva aglicona e o peso molecular da forma glicosilada, de acordo com Song et al. (1998).

3.2.4.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo sistema de oxidação do β-caroteno e ácido linoléico segundo metodologia descrita por Hammerschmidt e Pratt (1978). Amostras de 40 g de grãos de soja foram moídas em moinho de facas com câmara termostatizada (mod. MA-630, Marconi Ltda, SP, Brasil), obtendo-se grânulos de 30 mesh. Os grãos moídos foram homogeneizados em 200 mL de metanol, com agitador magnético, por 3

horas à temperatura ambiente e filtrados em papel filtro Whatman nº 42. As soluções obtidas foram evaporadas utilizando-se evaporador rotativo (mod. TE120, Tecnal Ltda., SP, Brasil) a 40ºC até obter-se volume de 12 mL, e estocados a –20ºC até serem analisados.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 60 mg de ácido linoléico (SIGMA Chemicals Company, St. Louis, MO, EUA), 200 mg de Tween 40, 5 mg de β-caroteno (SIGMA Chemicals Company, St. Louis, MO, EUA) e 5 mL de clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado em evaporador rotativo a 50ºC. Adicionou-se 50 mL de água deionizada e oxigenada sob agitação vigorosa. Alíquotas de 1 mL desta mistura foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de água deionizada e oxigenada e 0,5 mL do filtrado, preparado na etapa anterior. A leitura da absorbância foi realizada a 470 nm no tempo zero e em intervalos de 60 minutos, por 3 horas. A reação de oxidação foi conduzida à 40ºC. Brancos foram preparados sem o filtrado. A taxa de branqueamento do β-caroteno foi determinada pela diferença entre as absorbâncias inicial e final, dividido pelo tempo de incubação. A atividade antioxidante, segundo Pratt e Birac (1979), é medida pelo índice de antioxidação e este foi determinado de acordo com a equação 1, onde TBC é a taxa de branqueamento do controle e TBG é a taxa de branqueamento de cada grupo.

$$\text{Índice de antioxidação} = \frac{TBC}{TBG} \qquad \text{(equação 1)}$$

3.2.4.5. Índice de acidez

O índice de acidez foi determinado no óleo obtido no processo de desengorduramento da farinha integral de soja de acordo com a A.O.C.S (1988). Índice de acidez é definido como a massa de hidróxido de potássio, em miligramas, gasta na neutralização dos ácidos livres presentes em 1 g de óleo. A análise foi realizada em triplicata. O índice de acidez foi calculado através da equação 2.

$$\text{Acidez Total (mg KOH)} = \frac{VxFxNx56{,}1}{m} \qquad \text{(equação 2)}$$

Onde:

V= volume NaOH (0,1N) gasto (mL); F= fator de padronização da solução de NaOH; m= massa da amostra (g); N= normalidade da solução do NaOH.

3.2.5. Caracterização das farinhas e isolados protéicos de soja

3.2.5.1. Composição centesimal

A composição centesimal foi determinada nas farinhas desengorduradas e isolados protéicos de soja seguindo o procedimento descrito no item 3.2.4.1.

3.2.5.2. Teor de fitato

O teor de fitato foi determinado, em triplicata, segundo o método de Latta e Eskin (1980). O fitato presente na farinha desengordurada foi extraído em solução de HCl (0,65 N). A solução foi filtrada (papel filtro Whatman nº 42) e diluída com água destilada para posterior eluição em coluna de troca iônica, AG1-X8 da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA) com NaCl 0,1M e 0,7M. Ao extrato contendo fitato, foi adicionado o reagente Wade (0,03% $FeCl_3.6H_2O$ e 0,3% ácido sulfosalicílico em água destilada) e a leitura da absorbância foi realizada a 500 nm. Para determinação da concentração de fitato nas amostras, foi feita uma curva padrão com ácido fítico nas concentrações de 0 a 100 μg/mL.

3.2.5.3. Atividade dos inibidores de tripsina (AIT).

A atividade dos inibidores de tripsina foi determinada nas farinhas desengorduradas segundo o método de Kakade et al. (1974), utilizando-se BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitro-anilida) (SIGMA Chemicals Company, St. Louis, MO, EUA) como substrato para a enzima tripsina do pâncreas bovino (SIGMA Chemicals Company, St. Louis, MO, EUA). Amostra (1g) foi suspensa em 100 mL de solução de NaOH 0,01 M. Após agitação mecânica (3 horas em temperatura ambiente) a suspensão foi centrifugada (9000 x *g*/15' à temperatura ambiente). O sobrenadante foi diluído e alíquotas de 0,2 a 1,0 mL foram pipetadas em tubos de ensaio e o volume ajustado para 2,0 mL com água destilada. A cada tubo, previamente acondicionado em banho-maria a 37ºC, adicionou-se 1,0 mL da solução de tripsina (0,05 mg/mL de HCl 0,001M) e após 10 minutos adicionou-se em cada tubo 7,0 mL do BAPNA (0,3 mg/mL de Tampão Tris 0,05M, pH 8,2 contendo $CaCl_2$ 0,02M), previamente aquecido a 37ºC. A reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 1 mL de solução de ácido acético 30% e a absorbância lida a 410 nm, contra os brancos da reação, aos quais adicionou-se o ácido acético antes do BAPNA. Por definição, uma

unidade de tripsina é o aumento de 0,01 unidades de absorbância a 410 nm em 10 mL da mistura de reação. A atividade do inibidor de tripsina foi calculada como o número de unidades de tripsina inibida (UTI). Foram realizadas duas extrações de inibidor de tripsina e cada extração foi analisada em triplicata.

3.2.5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas solúveis dos isolados protéicos de soja

Os isolados protéicos (1% p/v) foram dispersos em água destilada, tampão Tris-Glicina pH 8,0 (0,086 M de Tris base; 0,09 M glicina e 4 mM de EDTA), tampão Tris-Uréia-SDS (Tampão Tris-Glicina com 6M de úreia e 0,5% SDS) e Tris-DTT (Tampão Tris-Glicina com 6 M de uréia e 0,5% SDS com 10 mM de ditiotreitol), de acordo com o descrito por Shimada e Cheftel (1988). As dispersões foram homogeneizadas por 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 35000x*g*/15 min a 25ºC. Alíquotas dos sobrenadantes foram diluídas em tampão contendo Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, 10% de glicerol e 0,1% de azul de bromofenol. A determinação do perfil eletroforético das proteínas solúveis dos isolados de soja em diferentes tampões foi realizada utilizando-se o sistema SDS-PAGE (LAEMMLI,1970) em condições não redutoras. O gel foi corado em solução contendo Coomassie Brilliant Blue 0,2% em metanol-ácido acético-água destilada (5:1:5 v/v), seguindo-se a descoloração em solução metanol-ácido acético-água destilada. Os pesos moleculares aproximados foram determinados utilizando-se padrão de massa molar da Pharmacia (NY, EUA): fosforilase b (94kDa); albumina bovina (67 kDa); ovalbumina (43 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20 kDa) e α-lactoglobulina (14,4 kDa).

3.2.5.5. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV)

Os IPSs foram dispersos em água destilada (20% p/v) e alíquotas 10-15 mg colocados em cápsulas de alumínio hermeticamente seladas. As amostras foram aquecidas de 25 a 100ºC com rampa de temperatura de 10ºC/min. Uma cápsula vazia foi usada como referência (SORGENTINI et al., 1991). A temperatura de desnaturação foi correspondente ao pico do termograma. A entalpia de desnaturação (ΔH) e a temperatura de desnaturação (Td) foram calculadas utilizando-se o software do equipamento DSC 2010 da TA Instruments (New Castle, DE, EUA). Após a corrida, as cápsulas foram perfuradas e

colocadas em estufa a 105ºC para secagem e determinação da massa de proteína em base seca.

3.2.5.6. Grupos sulfidrila livres (SH)

Foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Beveridge; Toma e Nakai (1974). Amostras com 100 mg de isolado protéico de soja foram dissolvidas em 10 mL de tampão contendo 0,086 M de Tris-HCl, 0,09 M Glicina, 0,004 M de EDTA e 8 M de uréia, pH 8,0. Após completa homogeneização, centrifugou-se a 10000x*g*/10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em membrana 0,45 μM da Millipore (Billerica, MA, USA). Trinta μL do reagente de Ellman (4 mg/mL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico em tampão Tris-HCl-Glicina-EDTA, pH 8,0) foi adicionado em 3 mL de alíquota. A absorbância foi lida a 412 nm. Foram realizadas duas extrações e cada extração foi analisada com três repetições.

3.2.5.7. Fluorescência Intrínseca

As medidas de fluorescência dos isolados protéicos de soja (0,5 mg/mL em 0,01 M de tampão fosfato pH 7,4) foram realizadas utilizando-se fluorímetro (Hitachi Instrument Company, modelo F-4500, Tóquio, Japão), segundo metodologia descrita por Kalapathy, Hettiarachchy e Rhee, (1997). O λ de excitação foi de 280 nm e os de emissão na faixa de 300-450 nm. As curvas obtidas foram normalizadas em função das concentrações das proteínas dos isolados. As concentrações das proteínas foram determinadas espectrofotometricamente em 280 nm utilizando-se o coeficiente de extinção molar $E^{1\%}_{1cm}$ de 1,204.

3.2.5.8. Cromatografia Liqüida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

O perfil de hidrofobicidade/hidrofilicidade das proteínas dos isolados de soja foi determinado utilizando-se a técnica de CLAE-FR, segundo metodologia descrita por Oomah; Voldeng e Fregeau-Reid (1994). Foi utilizado o cromatógrafo líqüido mod. 9075, injetor mod. 9012, detector UV/VIS mod. 9050 e coluna C18 FR100 (5 μm, 4,6 mm X 25,0 cm), todos da Marca Varian (Palo Alto, Califórnia, EUA). A análise foi realizada à temperatura ambiente e as proteínas eluídas em um gradiente linear de 20 a 65% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluroacético (TFA) no tempo de 60 minutos com fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 280 nm (0,02 AUFS). Para fins de análise, os cromatogramas foram

divididos em três regiões: região I, de 0 a 8 min de eluição (eluente com 0 - 20% de acetonitrila e 0,1% TFA); região II, de 8 a 16 min de eluição (eluente com 20 - 35% de acetonitrila e 0,1% TFA); região III de 16 a 40 min (eluente com 35 - 65% de acetonitrila e 0,1% TFA). Foram realizadas duas extrações e cada extrato foi analisado em duplicata.

3.2.5.9. Cromatografia líqüida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)

O perfil de distribuição da massa molar das proteínas dos isolados de soja foi determinado utilizando-se a técnica de CLAE-EM, de acordo com a metodologia descrita por Kalapathy, Hettiarachchy e Rhee (1997). Foi utilizado o cromatógrafo líquido mod. 9075, injetor mod. 9012, detector UV/VIS mod. 9050 e coluna RES-ELUT SEC (7 μm, 7,75 mm X 300 mn), todos da Marca Varian (Palo Alto, Califórnia, EUA). A análise foi realizada em temperatura ambiente e as proteínas de soja foram eluídas isocraticamente em tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,8) contendo 0,15 M NaCl no tempo de 20 minutos com fluxo de 0,8 mL/min, temperatura ambiente e detecção a 280 nm (0,02 AUFS). A curva padrão foi obtida com os seguintes marcadores de proteína da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA): tiroglobulina bovina (670 kDA), gama globulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B-12 (1,35 kDa).

3.2.6. Propriedades Funcionais dos isolados protéicos de soja (IPSs)

3.2.6.1.Solubilidade protéica

A solubilidade foi determinada de acordo com Morr et al. (1985). Dispersões de 1% (p/v) de proteína dissolvidas em NaCl 0,1N e em água destilada nos pHs, 3,0, 5,0 e 7,0, foram mantidas sob agitação por 1 hora e em seguida centrifugadas (20.000x*g*/30 min) a 4ºC. Após filtração em papel Whatman nº1, alíquotas foram tomadas e o conteúdo de proteína solúvel determinado pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1990). A solubilidade protéica foi calculada de acordo com a equação 3:

$$SP(\%) = \frac{Cs.50}{(m.Ca)}.1000 \qquad \text{(equação 3)}$$

Onde:

Cs = concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL); m= massa da amostra (mg); Ca = concentração de proteína na amostra (%)

3.2.6.2. Propriedade de gelificação

Os géis foram preparados segundo a metodologia descrita por Voutsinas, Nakai e Harwalkar (1983). Dispersões com concentração de proteína de 14% e pH 7,0 foram distribuídas em tubos de vidro (1,0 cm de diâmetro X 5 cm de altura), aquecidas a 95ºC por 30 min e resfriadas a 8ºC por 12 horas. Após esse período, os géis foram retirados dos tubos e cortados (1,0 cm de diâmetro X 1,0 cm de altura).

O perfil de textura foi avaliado utilizando-se texturômetro TA-XT_2 (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, UK). Foram avaliados os parâmetros dureza, coesividade e elasticidade como descrito por Bourne (1978), utilizando-se as seguintes condições: probe modelo SM70; calibração do probe de 20 mm; velocidade pré-teste de 3mm/s; velocidade no gel e pós-teste de 1 mm/s; taxa de compressão de 50%; força aplicada de 5 g. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25ºC±1) e o probe foi previamente lubrificado com silicone de baixa viscosidade.

A capacidade de retenção de água dos géis foi medida segundo método descrito por Beuschel et al. (1992). Amostras do gel (1 a 2 g) foram pesadas em papel de filtro Whatman nº 2 e centrifugadas a 746x *g*/10 min a 6ºC. A umidade retirada do gel foi calculada pela diferença de massa entre o papel de filtro seco e úmido. A análise foi realizada em triplicata. A porcentagem de capacidade de retenção de água dos géis foi calculada pela equação 4.

% CRA= 100 - (% de umidade retirada por centrifugação) (equação 4)

3.2.6.3. Propriedades emulsificantes

3.2.6.3.1. Capacidade emulsificante

A capacidade emulsificante (CE) foi determinada segundo método descrito por De Kanterewicz et al. (1987) utilizando-se homogeneizador (UltraTurrax, IKA T18 basic, IKA

WORKS do Brasil). Dispersões protéicas de 0,5% (p/v) em água destilada contendo óleo de soja com 0,05% de corante Sudan III foram homogeneizadas a 10000 rpm sob adição constante de óleo até que ocorresse a inversão da emulsão. A capacidade de emulsão foi definida como a máxima quantidade de óleo que é emulsificada antes da inversão (quebra da emulsão). A determinação foi feita em duplicata.

3.2.6.3.2. Índice de atividade emulsificante

O índice de atividade emulsificante (IAE) foi determinado segundo método descrito por Pearce e Kinsella (1978). Em 30 mL de solução protéica (0,5% p/v) foram adicionados 10 mL de óleo de soja. A mistura foi homogeneizada em homogeneizador UltraTurrax (IKA T18 basic IKA WORKS do Brasil) a 20.000 rpm por 30 segundos. Logo após a formação da emulsão, foram retiradas alíquotas (1mL) para diluição (1/100) em solução de docecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 500 nm e o índice de atividade emulsificante foi calculado pela equação 5, segundo Pearce e Kinsella (1978).

$$I.A.E. = \frac{2.T.D}{\phi.C.1000} \qquad \text{(equação 5)}$$

onde:

IAE= índice de atividade emulsificante (m^2/g) ; T (turbidez)= (2,303 x A)/l; D= fator de diluição; l= distância percorrida pela luz na cubeta (1 cm); A= Absorbância; ϕ= fração volumétrica do óleo; C= concentração na solução.

3.2.6.3.3. Estabilidade da emulsão

A estabilidade da emulsão (EE) foi determinada segundo método descrito por Acton e Safle (1970). As emulsões (50 mL de óleo e 50 mL de dispersão de proteína a 0,5% (p/v)) foram homogeneizadas a 10.000 rpm por 3 min. Alíquotas de 10 mL foram colocadas em tubos de ensaio e deixadas por 24 horas à temperatura ambiente (25ºC±1). A seguir, foram retirados alíquotas de 5 mL para determinação da umidade em estufa a 105ºC. A estabilidade da emulsão (EE) foi calculada de acordo com a equação 6.

$$EE = \frac{100 - U24hs}{100 - Uoriginal} x100 \qquad \text{(equação 6)}$$

Onde:

EE= Estabilidade de emulsão; U^{24hs} = porcentagem da umidade da emulsão após 24 hs de repouso; $U_{original}$ = porcentagem da umidade da emulsão imediatamente após preparo

3.2.7. Análise Estatística

As médias foram comparadas por análise de variância utilizando o teste de Tukey ao nível de significância de 5% (COCKRAN; COX, 1957), com o programa STATISTICA (versão 5.0) (StaSoft, Inc,Tulsa, OK, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos grãos de soja

4.1.1. Condições de armazenamento dos grãos de soja

A Figura 2 pode-se observar os valores médios mensais, mínimos e máximos de umidade relativa (UR) e temperaturas monitoradas durante o período de armazenagem. A UR se manteve abaixo de 60%, com exceção dos meses de dezembro (66,5%) e maio (63,3%) e as temperaturas abaixo de 27ºC.

As condições de armazenamento são essenciais para a preservação da qualidade do grão, sendo o teor de umidade do grão, umidade relativa do ar e temperatura de armazenamento, os parâmetros mais críticos (POPINIGIS, 1975). A maioria dos estudos sobre estocagem de grãos de soja é realizada em condições de temperaturas e umidades relativa do ar elevadas ou então sob refrigeração, o que dificulta a extrapolação dos resultados para condições reais de estocagem. Por outro lado, de acordo com os resultados obtidos, as condições de armazenamento, com as devidas variações, são condições essenciais para a boa conservação dos grãos, segundo Rocha et al. (1996).

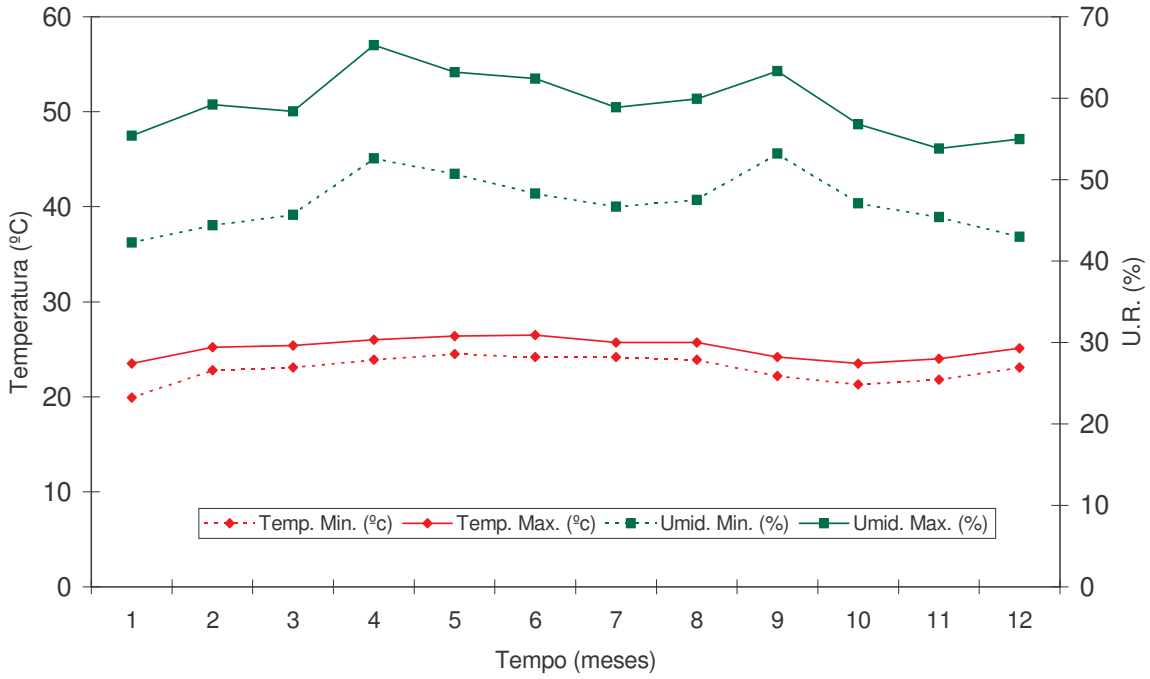

Figura 2. Valores médios mínimos e máximos de temperatura (T) e umidade relativa (UR%) referente ao período de armazenamento dos grãos de soja controle e irradiados.

4.1.2. Composição centesimal e atividade de água dos grãos

A composição centesimal dos grãos não irradiados (controle) durante o armazenamento está apresentada na Tabela 1. Os valores de proteína variaram de 37,9 a 38,1%, de lipídeos de 24,6 a 25,3% e cinzas apresentaram-se em torno de 4,3%, sendo semelhantes aos encontrados por Perkins (1995). O teor de umidade dos grãos de soja controle oscilou durante a estocagem, variando de 8,54 a 9,18%.

Tabela 1. Composição centesimal dos grãos de soja não irradiados (controle) durante o armazenamento.

Tempo de armazenamento (meses)	Proteína*	Lipídeos	Umidade	Cinzas
0	$37,94 \pm 0,31^{a}$	$24,61 \pm 0,21^{b}$	$8,61 \pm 0,03^{b}$	$4,31 \pm 0,02^{a}$
4	$37,95 \pm 0,37^{a}$	$24,73 \pm 0,21^{ba}$	$9,18 \pm 0,07^{a}$	$4,37 \pm 0,06^{a}$
8	$38,05 \pm 0,31^{a}$	$24,99 \pm 0,12^{ba}$	$8,94 \pm 0,11^{a}$	$4,32 \pm 0,05^{a}$
12	$37,85 \pm 0,10^{a}$	$25,29 \pm 0,09^{a}$	$8,54 \pm 0,16^{b}$	$4,33 \pm 0,04^{a}$

Média ± desvio padrão, em base seca.
Letras minúsculas (colunas) diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).
*N x 6,25

Por outro lado, na Tabela 2, pode-se observar que após quatro meses de armazenamento, os grãos apresentaram maiores teores de umidade e atividade de água, explicada pela maior umidade relativa do ar no período (Figura 2). Observou-se ainda que embora as oscilações de umidade tenham sido significativas, seus teores mantiveram-se sempre abaixo de 10%. Segundo D'Arce (2002) e Dhingra e Acuña (1997), grãos com umidade acima de 13% e Aw de 0,67 a 0,73 estão sujeitos à degradação de proteínas, carboidratos e fosfolipídeos, afetando a cor, odor e sabor.

Tabela 2. Variação da atividade de água (Aw) dos grãos de soja controle e irradiados durante o armazenamento.

Tempo de armazenamento (meses)	controle	2,0 kGy	5,0 kGy	Acel
0	$0,542 \pm 0,007^{b\ B}$	$0,548 \pm 0,001^{b\ C}$	$0,568 \pm 0,001^{a\ B}$	$0,550 \pm 0,001^{b\ C}$
4	$0,628 \pm 0,003^{a\ A}$	$0,627 \pm 0,008^{a\ A}$	$0,622 \pm 0,003^{a\ A}$	$0,621 \pm 0,003^{a\ A}$
8	$0,546 \pm 0,008^{b\ B}$	$0,562 \pm 0,003^{a\ B}$	$0,556 \pm 0,002^{a\ b\ C}$	$0,556 \pm 0,002^{a\ b\ B}$
12	$0,520 \pm 0,002^{b\ C}$	$0,520 \pm 0,001^{b\ D}$	$0,528 \pm 0,001^{a\ D}$	$0,530 \pm 0,002^{a\ D}$

Média ± desvio padrão.
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (coluna) diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p<0,05$).

4.1.3. Teor de isoflavonas nos grãos

Neste estudo, não foi possível a avaliação do teor de isoflavonas no tempo zero de armazenamento. No entanto, foram realizadas análises nos meses posteriores e os resultados estão apresentados na Tabela 3. O teor total de isoflavonas encontrado no presente estudo, na faixa de 93 a 98 mg/100g, diferiu dos valores encontrados por Genovese, Hassimotto e Lajolo (2003) para diferentes tipos de grãos de soja cultivados no Brasil. Das quatorze cultivares e três apresentaram concentrações na faixa de 57 a 85 mg/100g e onze na faixa de 105 a 188 mg/100g. Segundo, Wang e Murphy (1994), a quantidade total de isoflavonas é afetada pelo tipo de cultivar, local de plantio, tipo de solo, clima e ano da safra.

Não houve diferença significativa entre o teor total de isoflavonas nos grãos irradiados e não irradiados ($p>0,05$). Variyar, Limaye e Sharma (2004) reportaram decréscimo no conteúdo total de isoflavonas de grãos de soja com aumento da dose de irradiação gama de 0,5 a 5 kGy, no entanto, os autores não esclareceram de que forma a irradiação afetou o total de isoflavonas.

Observou-se também que teor total de isoflavonas permaneceu estável ao longo do armazenamento, independente da dose e tipo de irradiação aplicada nos grãos. Hou e Chang (2002) também não observaram mudança nos teores totais de isoflavonas de grãos de soja após período de doze meses de armazenamento sem controle de temperatura e umidade relativa.

Tabela 3. Teor de isoflavonas totais (mg/100g) dos grãos de soja controle e irradiados durante o armazenamento.

Tempo de armazenamento (meses)	controle	2,0 kGy	5,0 kGy	Acel
4	98,0 ± 5,0$^{a\,A}$	95,0 ± 4,0$^{a\,A}$	97,0 ± 7,0$^{a\,A}$	98,0 ± 8,0$^{a\,A}$
8	98,0 ± 4,0$^{a\,A}$	95,0 ± 8,0$^{a\,A}$	98,0 ± 4,0$^{a\,A}$	97,0 ± 6,0$^{a\,A}$
12	98,0 ± 2,0$^{a\,A}$	96,0 ± 1,0$^{a\,A}$	94,0 ± 2,0$^{a\,A}$	93,0 ± 2,0$^{a\,A}$

Média ± desvio padrão.
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (coluna) diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).
O teor de isoflavonas totais foi expresso como agliconas.

A composição das diferentes frações das isoflavonas presentes nos grãos irradiados, não irradiados durante o armazenamento pode ser observado na Tabela 4. As formas β-glicosídeos e de malonil glicosídeos representam mais de 90% do total de isoflavonas contido nos grãos. As formas agliconas e acetil glicosídeos representam em média somente 3,8 e 0,9% respectivamente. Esta distribuição das formas de isoflavonas em grãos de soja está em concordância com os trabalhos de Hou e Chang (2002); Genovese, Hassimotto e Lajolo (2003) e Kim et al. (2005) onde as formas β-glicosídeos e de malonil glicosídeos também foram as formas predominantes.

Não houve diferença significativa na composição relativa das isoflavonas em função das doses e tipo de irradiação aplicado nos grãos. No entanto, ao longo do armazenamento, para todos os tratamentos, houve aumento médio de 23% dos β-glicosídeos e diminuição em 18,9% dos malonil glicosídeos. As formas agliconas e acetil glicosídeos permaneceram relativamente estáveis. Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Hou e Chang (2002), onde grãos de soja estocados por período de 18 meses sob umidade relativa de 57% e temperatura de 20ºC apresentaram aumento dos glicosídeos de 12 para 31% e redução de manonil glicosídeos de 87 para 66%. Condições de alta umidade relativa e temperatura durante longos períodos de estocagem da soja podem favorecer a conversão dos β-glicosídeos, malonil glicosídeos e acetil glicosídeos em formas agliconadas, pela ação da enzima endógena β-glicosidade cuja atividade ótima ocorre em temperaturas acima de 45ºC (LEE et al., 2003).

Tabela 4. Diferentes frações das isoflavonas dos grãos de soja controle e irradiados durante o armazenamento

Tempo de armazenamento (meses)	Frações (%)	Controle	2,0 kGy	5,0 kGy	Acel
4	β-glicosídeos	$40,0 \pm 6,0^{a\,C}$	$39,0 \pm 7,0^{a\,B}$	$40,0 \pm 7,0^{a\,B}$	$42,0 \pm 6,0^{a\,B}$
	Malonil glicosídeos	$56,0 \pm 5,0^{a\,A}$	$56,0 \pm 6,0^{a\,A}$	$56,0 \pm 6,0^{a\,A}$	$54,0 \pm 5,0^{a\,A}$
	Acetil glicosídeos	$0,7 \pm 0,1^{a\,A}$	$0,7 \pm 0,1^{a\,A}$	$0,6 \pm 0,2^{a\,A}$	$0,4 \pm 0,3^{a\,A}$
	Agliconas	$3,0 \pm 1,0^{a\,B}$	$4,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$3,0 \pm 1,0^{a\,B}$	$3,0 \pm 1,0^{a\,B}$
8	β-glicosídeos	$48,0 \pm 6,0^{aB}$	$51,0 \pm 6,0^{aA}$	$48,0 \pm 5,0^{aA}$	$50,0 \pm 6,0^{a\,A}$
	Malonil glicosídeos	$47,0 \pm 6,0^{a\,b\,B}$	$50,0 \pm 6,0^{aA}$	$47,0 \pm 5,0^{a\,b\,B}$	$44,0 \pm 7,0^{b\,B}$
	Acetil glicosídeos	$1,0 \pm 0,1^{a\,A}$	$1,0 \pm 0,1^{a\,A}$	$0,9 \pm 0,2^{a\,A}$	$0,9 \pm 0,2^{a\,A}$
	Agliconas	$4,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$4,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$4,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$4,0 \pm 1,0^{a\,A}$
12	β-glicosídeos	$50,0 \pm 6,0^{aA}$	$50,0 \pm 1,0^{aA}$	$49,0 \pm 1,0^{aA}$	$49,0 \pm 1,0^{a\,A}$
	Malonil glicosídeos	$44,0 \pm 1,0^{a\,B}$	$45,0 \pm 1,0^{aB}$	$45,0 \pm 1,0^{a\,B}$	$46,0 \pm 1,0^{a\,B}$
	Acetil glicosídeos	$1,0 \pm 0,1^{a\,A}$	$1,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$2,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$1,0 \pm 1,0^{a\,A}$
	Agliconas	$4,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$4,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$4,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$4,0 \pm 1,0^{a\,A}$

Média ± desvio padrão.
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (coluna) diferentes, para a mesma fração indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).

Por outro lado, Hou e Chang (2002) afirmam que condições amenas de armazenamento, umidade relativa de 57% e temperatura de 20ºC, promovem a desesterificação dos conjugados malonil glicosídeos e acetil glicosídeos para os respectivos β-glicosídeos. Como as condições de estocagem dos grãos utilizada no presente estudo, com temperaturas médias entre 20 a 26,5ºC e umidades relativas médias de 43 a 66,5% não favoreceriam a ação das enzimas endógenas, a conversão das formas conjugadas das isoflavonas possivelmente está relacionada com a ocorrência de reações de desesterificação.

Na Tabela 5 pode-se observar a distribuição das formas agliconadas das isoflavonas dos grãos não irradiados, irradiados durante o armazenamento. Não foram observadas diferenças nos percentuais das formas agliconadas em função da dose ou tipo de irradiação. A forma genisteína, que variou entre 53 a 60%, foi a predominante dentre as formas agliconadas das isoflavonas, para todos os tratamentos empregados. Segundo Setchell et al. (2001), dentre as formas agliconadas, a genisteína é a que possui maior

atividade biológica. Variyar, Limaye e Sharma (2004), para grãos de soja irradiados com 0,5 a 5 kGy, observaram aumento no teor da genisteína de 61% para a dose de 5kGy e redução das formas daidzeína e gliciteína em função da dose aplicada, principalmente da gliciteína. Segundo esses autores, das formas agliconadas, a gliciteína parece ser a mais sensível à radiação gama.

Após quatro meses de armazenamento, nos grãos irradiados com 5,0 kGy e 2 kGy com feixe de elétrons, observou-se redução percentual média de 8% da genisteína, enquanto a daidzeína apresentou aumento significativo ($p<0,05$) para os grãos irradiados com 2 kGy. Durante o armazenamento, possivelmente ocorreu a maior e/ou menor conversão entre as genistina, daidzina e glicitina em suas respectivas formas, genisteína, daidzeína e gliciteína.

Tabela 5. Composição das formas agliconadas das isoflavonas dos grãos de soja controle e irradiados durante o armazenamento**.**

Tempo de armazenamento (meses)	Formas agliconadas (%)	Controle	2,0 kGy	5,0 kGy	Acel
4	Genisteína	$58,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$59,0 \pm 3,0^{a\,A}$	$60,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$58,0 \pm 1,0^{a\,A}$
	Daidzeína	$36,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$36,0 \pm 2,0^{a\,B}$	$35,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$36,0 \pm 1,0^{a\,A}$
	Gliciteína	$6,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$6,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$5,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$6,0 \pm 1,0^{a\,A}$
8	Genisteína	$54,0 \pm 6,0^{a\,A}$	$54,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$54,0 \pm 1,0^{a\,B}$	$53,0 \pm 1,0^{a\,B}$
	Daidzeína	$38,0 \pm 6,0^{a\,A}$	$42,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$37,0 \pm 3,0^{a\,A}$	$38,0 \pm 2,0^{a\,A}$
	Gliciteína	$8,0 \pm 6,0^{a\,A}$	$10,0 \pm 2,0^{a\,A}$	$9,0 \pm 2,0^{a\,A}$	$9,0 \pm 2,0^{a\,A}$
12	Genisteína	$54,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$54,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$54,0 \pm 1,0^{a\,B}$	$55,0 \pm 1,0^{a\,C}$
	Daidzeína	$38,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$38,0 \pm 1,0^{a\,A\,B}$	$38,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$38,0 \pm 1,0^{a\,A}$
	Gliciteína	$8,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$7,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$8,0 \pm 1,0^{a\,A}$	$7,0 \pm 1,0^{a\,A}$

Média ± desvio padrão.
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (coluna), para a mesma fração, indicam diferenças significativas entre as médias ($p <0,05$).

4.1.4. Atividade antioxidante dos grãos controle e irradiados durante o armazenamento

Independente das doses, tipo de tratamento e do tempo de armazenamento, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) na atividade antioxidante dos grãos de soja (Tabela 6). Variyar, Limaye e Sharma (2004), ao contrário, verificaram aumento na

atividade antioxidante de soja quando processadas por radiação gama com 0,5 a 5 kGy. Segundo os autores, a atividade antioxidante apresentada pela soja está fortemente relacionada à presença das isoflavonas e principalmente pela conversão, promovida pela irradiação, da forma glicosil isoflavonas em agliconas, as quais têm maior atividade antioxidante. Como no presente trabalho não houve variação na composição relativa das formas agliconadas (Tabela 4), em função das doses, tipo de tratamento ou tempo de armazenamento, explica-se a estabilidade encontrada nos índices de atividade antioxidante.

Tabela 6. Índice de antioxidação (IA) dos grãos controle e irradiados durante o armazenamento

Tempo de armazenamento (meses)	IA			
	controle	2,0 kGy	5,0 kGy	Acel
0	$0,93 \pm 0,09^{aA}$	$0,94 \pm 0,08^{aA}$	$0,94 \pm 0,04^{aA}$	$0,96 \pm 0,02^{aA}$
4	$1,07 \pm 0,04^{aA}$	$1,06 \pm 0,07^{aA}$	$1,02 \pm 0,07^{aA}$	$1,07 \pm 0,07^{aA}$
8	$1,08 \pm 0,07^{aA}$	$0,96 \pm 0,01^{aA}$	$0,96 \pm 0,01^{aA}$	$0,95 \pm 0,01^{aA}$
12	$1,13 \pm 0,06^{aA}$	$1,01 \pm 0,08^{aA}$	$0,89 \pm 0,09^{aA}$	$1,01 \pm 0,03^{aA}$

Média ± desvio padrão.
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (coluna) diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).

4.1.5. Teor de acidez dos óleos obtidos a partir dos grãos

O índice de acidez dos óleos obtidos a partir dos grãos de soja com diferentes tratamentos, em função do tempo de armazenamento pode ser observado na Tabela 7. No tempo zero, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) em função da dose aplicada nos grãos. Quando compara-se os óleos obtidos de grãos da radiação gama e de feixe de elétrons também não observou-se diferença significativa ($p>0,05$). Na irradiação, espécies reativas são formadas e iniciam reações químicas que resultam na degradação dos óleos e gorduras (ZEB;TAUFIQ 2004). Segundo Hasselmann e Marchoni (1991), a formação de compostos a partir da degradação de óleo e gorduras depende da composição dos lipídeos, da dose da irradiação e presença e ausência de oxigênio.

No quarto mês observou-se aumento de 31,4% na acidez do óleo de grãos controle e de até 40,8% na do óleo de grãos irradiados. Aos doze meses, o maior teor de acidez, de 0,89 mg KOH/g de óleo, foi observado para o óleo obtido de grãos radiados com dose de

5kGy. O aumento da acidez nos grãos é resultado da hidrólise dos lipídeos com liberação e oxidação de ácidos graxos livres (BYUN et al. 1996; HOU; CHANG, 1998). Durante o armazenamento de grãos, os lipídeos são passíveis de sofrerem hidrólise pelas lipases em ácidos graxos livres e glicerol, especialmente em altos valores de temperaturas e umidade (SAIO et al. 1980). Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que no decorrer do armazenamento houve maior aumento da acidez nos óleos obtidos de grãos de soja irradiados.

Tabela 7. Acidez total (mg KOH/g de óleo) dos óleos obtidos de grãos controle e irradiados durante o armazenamento.

Tempo de armazenamento (meses)	Acidez total (mg KOH/g de óleo)			
	controle	2,0 kGy	5,0 kGy	Acel
0	$0,51 \pm 0,01^{a\,B}$	$0,49 \pm 0,03^{aC}$	$0,49 \pm 0,02^{a\,D}$	$0,50 \pm 0,01^{a\,C}$
4	$0,67 \pm 0,02^{a\,A}$	$0,69 \pm 0,01^{a\,B}$	$0,67 \pm 0,01^{a\,C}$	$0,55 \pm 0,01^{b\,C}$
8	$0,67 \pm 0,05^{b\,A}$	$0,76 \pm 0,01^{aA}$	$0,76 \pm 0,02^{a\,B}$	$0,73 \pm 0,03^{a\,b\,B}$
12	$0,67 \pm 0,02^{c\,A}$	$0,76 \pm 0,02^{b\,A}$	$0,89 \pm 0,02^{a\,A}$	$0,76 \pm 0,02^{b\,A}$

Média ± desvio padrão.
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (coluna) diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).

4.2. Caracterização das farinhas desengorduradas de soja (FDSs)

4.2.1. Composição centesimal

Na Tabela 8 pode-se observar a composição centesimal das farinhas desengorduradas obtidas de grãos irradiados e não irradiados e armazenados, em função do tempo de armazenamento. A umidade das FDS obtidas de grãos irradiados e não irradiados variou de 6,2 a 13,2%. Os valores de proteína, 51,0 a 56,1%, estão dentro da faixa relatada por Santos et al (1978) para farinhas de soja produzidas laboratorialmente. Os teores de lipídeos, 2,07 a 6,37%, estão acima dos valores encontrados por Singh, Singh e Chauhan (1994) e Garcia et al. (1998) para farinhas desengorduradas. Apesar da padronização das condições de extração do óleo das farinhas, granulometria, relação sólido-solvente e tempo de desengorduramento, as farinhas obtidas apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) em sua composição centesimal.

Tabela 8. Composição centesimal das farinhas desengorduradas de soja (FDSs).

Tempo de armazenamento (meses)	Componentes (%)	FDS-C	FDS -2,0 kGy	FDS -5,0 kGy	FDS –Acel
0	Proteína *	51,34 ± 0,32$^{c\,C}$	51,83 ± 0,19$^{b\,B}$	52,38 ± 0,13$^{a\,B}$	52,56 ± 0,12 $^{a\,B}$
	Lipídeos	4,82 ± 0,08 $^{a\,B}$	5,04 ± 0,19 $^{a\,B}$	4,25 ± 0,07 $^{b\,B}$	5,09 ± 0,09 $^{a\,A}$
	Umidade	8,97 ± 0,02 $^{c\,B}$	10,91 ± 0,09 $^{a\,A}$	8,94 ± 0,03 $^{c\,B}$	10,17 ± 0,08 $^{b\,B}$
	Cinzas	5,45 ± 0,31 $^{a\,A}$	5,55 ± 0,02 $^{a\,A\,B}$	5,52 ± 0,02 $^{a\,B}$	5,41 ± 0,04 $^{a\,C}$
4	Proteína *	52,01 ± 0,28$^{a\,b\,B}$	52,84 ± 0,11$^{a\,B}$	51,60 ± 0,45$^{a\,b\,B}$	51,00 ± 0,35$^{b\,C}$
	Lipídeos	5,83 ± 0,06 $^{b\,A}$	6,37 ± 0,10 $^{a\,A}$	6,19 ± 0,08 $^{a\,A}$	5,05 ± 0,18 $^{c\,A}$
	Umidade	13,17 ± 0,24 $^{a\,A}$	10,96 ± 0,21 $^{b\,A}$	10,14 ± 0,43 $^{c\,A}$	10,58 ± 0,09 $^{b\,A}$
	Cinzas	5,28 ± 0,03 $^{a\,A}$	5,25 ± 0,03 $^{a\,B}$	5,25 ± 0,06 $^{a\,C}$	5,28 ± 0,04 $^{a\,D}$
8	Proteína *	54,20 ± 0,20$^{b\,A}$	55,36 ± 0,05$^{a\,A}$	55,82 ± 0,34$^{a\,A}$	55,87 ± 0,22$^{a\,A}$
	Lipídeos	3,71 ± 0,13 $^{b\,D}$	4,28 ± 0,08 $^{a\,C}$	3,65 ± 0,26 $^{b\,C}$	3,01 ± 0,18 $^{c\,B}$
	Umidade	6,76 ± 0,22 $^{a\,D}$	6,54 ± 0,38 $^{a\,B}$	6,17 ± 0,07 $^{b\,C}$	6,49 ± 0,22 $^{a\,b\,D}$
	Cinzas	5,39 ± 0,10 $^{c\,A}$	5,47 ± 0,08 $^{b\,A\,B}$	5,53 ± 0,09 $^{a\,B}$	5,54 ± 0,06 $^{a\,B}$
12	Proteína *	53,88 ± 0,14$^{b\,A}$	55,73 ± 0,13$^{a\,A}$	55,92 ± 0,23$^{a\,A}$	56,12 ± 0,39$^{a\,A}$
	Lipídeos	4,42 ± 0,03 $^{a\,C}$	2,28 ± 0,04 $^{c\,D}$	2,43 ± 0,03 $^{b\,D}$	2,07 ± 0,07 $^{d\,C}$
	Umidade	7,24 ± 0,07 $^{d\,C}$	10,73 ± 0,14 $^{a\,A}$	9,95 ± 0,13 $^{b\,A}$	9,82 ± 0,18 $^{c\,C}$
	Cinzas	5,47 ± 0,02 $^{a\,A}$	5,91± 0,36 $^{a\,A}$	5,68 ± 0,02 $^{a\,A}$	5,71 ± 0,01 $^{a\,A}$

Média ± desvio padrão, em base seca
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (coluna) diferentes, para o mesmo componente, indicam diferenças significativas entre as médias (p <0,05).
*N x 6,25

4.2.2. Fatores antinutricionais

Na Tabela 9 observa-se os teores de fitato das FDS obtidos a partir dos grãos controle e irradiados em função do tempo de armazenamento. No tempo zero, as FDSs de grãos irradiados apresentaram redução percentual de 20 a 25% nos teores de fitato. A FDS obtida de grãos irradiados com feixe de elétrons apresentou diferença significativa (p<0,05) nos teores de fitato, quando comparada com a de grãos processados por radiação gama na mesma dose de 2kGy. Sattar, Neelofar e Akhtar (1990) observaram redução no teor de fitato de soja tratada com irradiação de até 1,0 kGy, seguida de lavagem dos grãos. Villavicencio et al. (2000 a) somente observaram variação no teor de fitato nas amostras cruas de feijões (*Phaseolus vulgaris L*. var. Carioca*)* irradiados com doses de 10 kGy. A redução de fitato ocorre pela degradação química do fitato em fosfato inositol e inositol pela

ação dos radicais livres produzidos pela irradiação (SATTAR, NEELOFAR; AKHTAR, 1990) No armazenamento, verificou-se uma leve tendência de aumento nos teores de fitato nas FDS de grãos obtidos por radiação gama enquanto para FDS dos grãos controle e irradiados por feixe de elétrons os teores de fitato tenderam a permanecer constantes. O fitato tem a característica de se ligar às proteínas através dos grupos amino terminal das proteínas e ésteres fosfatos aniônicos do ácido fítico formando um complexo binário insolúvel (DOMÍNGUEZ; GÓMEZ; LÉON; 2002; GRYNSPAN; CHERYAN, 1989; HOU; CHANG; 2003). Desta forma, a variabilidade nos teores de fitato nas farinhas obtidas de grãos irradiados e não irradiados pode estar relacionada à maior ou menor interação fitato-proteína, que pode influenciar em sua quantificação (DOMINGUEZ; GÓMEZ; LEON, 2002).

Tabela 9. Teor de fitato (mg/g de proteína) nas farinhas desengorduradas de grãos controle e irradiados durante o armazenamento.

Tempo de armazenamento (meses)	Teor de fitato (mg/g de proteína)			
	FDS-C	FDS-2,0 kGy	FDS-5,0 kGy	FDS-Acel
0	$6,75 \pm 0,17^{a\,A\,B}$	$5,39 \pm 0,37^{b\,A\,B}$	$5,19 \pm 0,16^{b\,A\,B}$	$6,57 \pm 0,09^{a\,A}$
4	$5,98 \pm 0,11^{a\,B\,C}$	$4,53 \pm 0,14^{b\,B}$	$4,15 \pm 0,19^{b\,B}$	$6,18 \pm 0,16^{a\,A}$
8	$6,78 \pm 0,09^{a\,A\,C}$	$6,42 \pm 0,17^{a\,A}$	$5,80 \pm 0,23^{a\,A}$	$6,12 \pm 0,29^{a\,A}$
12	$6,97 \pm 0,24^{a\,A}$	$6,66 \pm 0,11^{a\,A}$	$6,80 \pm 0,06^{a\,A}$	$6,67 \pm 0,23^{a\,A}$

Média ± desvio padrão
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (coluna) diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).

A atividade dos inibidores de tripsina (AIT) nas FDSs de grãos irradiados, não irradiados em função do tempo de armazenamento podem ser observados na Tabela 10. No tempo zero de armazenamento, o efeito da irradiação nos valores de AIT foi significativo apenas quando a dose foi de 5 kGy, que resultou em redução de 14% em relação ao obtido para a FDS de grão não irradiado. Estes resultados estão em concordância com os reportados por Abu-Tarboush (1998) e Hafez et al. (1985), que observaram redução de 14,3 e 21,5%, respectivamente, no teor dos inibidores de tripsina de grãos de soja gama irradiados com doses de 5 kGy. Hafez et al. (1985) também verificaram que a redução da AIT foi maior nos grãos irradiados contendo teores de umidade, acima de 15%. Segundo esses autores, a maior umidade dos grãos intensifica o efeito da irradiação gama devido à radiólise. Os radicais hidroxil formados durante o processo de irradiação podem interagir estruturalmente com os inibidores de tripsina promovendo sua redução e/ou inativação. Siddhurajul, Makkar e Beccker (2002) sugeriram

que a inativação dos inibidores de tripsina de grãos irradiados pode ser atribuída à destruição dos grupos dissulfeto presentes em seu sítio ativo.

Tabela 10. Atividade dos Inibidores de tripsina (UTI*/mg de proteína) nas farinhas desengorduradas de grãos controle e irradiados durante o armazenamento

Tempo de armazenamento (meses)	AIT (UTI*/mg de proteína)			
	FDS-C	FDS-2,0 kGy	FDS-5,0 kGy	FDS-Acel
0	$85,14 \pm 2,14^{a\,A}$	$80,92 \pm 0,42^{a\,A}$	$71,20 \pm 0,95^{b\,A}$	$82,85 \pm 0,42^{a\,A}$
4	$84,14 \pm 1,29^{a\,A}$	$78,67 \pm 0,25^{a\,A}$	$71,73 \pm 0,95^{b\,A}$	$78,98 \pm 1,07^{a\,A\,B}$
8	$82,22 \pm 0,93^{a\,A}$	$79,40 \pm 1,01^{a\,b\,A}$	$76,02 \pm 0,52^{b\,A}$	$81,27 \pm 0,27^{a\,A\,B}$
12	$81,79 \pm 0,79^{a\,A}$	$79,94 \pm 0,92^{a\,A}$	$76,87 \pm 1,94^{a\,A}$	$79,21 \pm 0,97^{a\,B}$

Média ± desvio padrão.
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (coluna) diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).
* Unidades de tripsina inibida.

Não foram observadas alterações significativas nos valores de AIT no decorrer do armazenamento quando medido nas farinhas, embora ao longo do armazenamento tenha sido observada leve tendência à diminuição para todos os tratamentos, excetuando-se para a FDS-5,0 kGy, que teve aumento de até 8%. Kovács et al (1991) também não observaram alterações no teor do AIT de grãos processados por radiação gama e estocados por oito meses em condições semelhantes às do presente trabalho.

4.3. Caracterização dos isolados protéicos de soja (IPSs)

4.3.1. Composição centesimal dos isolados protéicos de soja (IPSs)

A composição dos IPSs obtidos dos grãos irradiados e armazenados apresentou-se bastante semelhante (Tabela 11). Aos 4 meses de armazenamento, quando comparados ao IPS obtido de grãos não irradiados, os isolados obtidos de grãos tratados com feixe de elétrons e 5,0 KGy apresentaram maior teor protéico. Da mesma forma, após 8 meses foi o IPS-Acel e aos doze meses para todos IPSs irradiados. Os teores de lipídeos e umidade foram semelhantes para todos os tratamentos. O teor de proteínas, lipídeos, carboidratos e umidade em isolados protéicos dependem de vários fatores como cultivar, condições físico-químicas dos grãos e principalmente do tipo de processamento utilizado (HOU; CHANG, 1998). Como um mesmo lote de grãos foi utilizado, as variações observadas neste trabalho podem ser resultado de possíveis alterações nos componentes dos grãos devido à

irradiação e/ou armazenamento ou variações no processo de obtenção do isolado que refletiram na sua composição final.

Tabela 11. Composição centesimal dos isolados protéicos de soja

Tempo de armazenamento (meses)	Componentes (%)	IPS-C	IPS-2,0 kGy	IPS-5,0 kGy	IPS-Acel
0	Proteína*	$85,03 \pm 0,16^{bC}$	$85,37 \pm 0,75^{b\,C}$	$86,99 \pm 0,59^{a\,C}$	$84,31 \pm 0,45^{c\,D}$
	Lipídeos	$2,40 \pm 0,24^{b\,B}$	$3,23 \pm 0,30^{a\,B}$	$2,26 \pm 0,55^{b\,A}$	$2,57 \pm 0,13^{b\,A}$
	Umidade	$2,60 \pm 0,06^{d\,C}$	$3,37 \pm 0,13^{b\,B\,C}$	$3,09 \pm 0,12^{c\,C}$	$3,93 \pm 0,27^{a\,B}$
	Cinzas	$3,13 \pm 0,05^{a\,A}$	$2,67 \pm 0,05^{d\,C}$	$2,97 \pm 0,05^{c\,D}$	$3,03 \pm 0,05^{b\,C}$
4	Proteína*	$84,07 \pm 0,63^{c\,D}$	$82,61 \pm 0,50^{d\,D}$	$87,07 \pm 0,36^{b\,C}$	$88,35 \pm 0,71^{a\,C}$
	Lipídeos	$2,95 \pm 0,46^{b\,A}$	$3,87 \pm 0,23^{a\,A}$	$2,67 \pm 0,35^{b\,A}$	$2,26 \pm 0,16^{c\,B}$
	Umidade	$3,05 \pm 0,09^{d\,B}$	$3,31 \pm 0,10^{c\,C}$	$4,36 \pm 0,14^{b\,B}$	$5,99 \pm 0,14^{a\,A}$
	Cinzas	$2,84 \pm 0,02^{d\,A}$	$2,94 \pm 0,02^{c\,B}$	$3,17 \pm 0,01^{a\,C}$	$3,01 \pm 0,02^{b\,C}$
8	Proteína*	$89,33 \pm 0,76^{c\,A}$	$88,49 \pm 0,56^{c\,B}$	$91,29 \pm 0,16^{b\,B}$	$95,02 \pm 0,01^{a\,B}$
	Lipídeos	$1,32 \pm 0,17^{b\,D}$	$1,71 \pm 0,05^{a\,C}$	$1,66 \pm 0,16^{a\,B}$	$1,24 \pm 0,08^{b\,D}$
	Umidade	$2,75 \pm 0,22^{b\,C}$	$3,48 \pm 0,05^{a\,B}$	$2,71 \pm 0,04^{b\,D}$	$3,49 \pm 0,02^{a\,C}$
	Cinzas	$3,51 \pm 0,02^{c\,A}$	$3,42 \pm 0,01^{d\,A}$	$3,62 \pm 0,02^{b\,A}$	$3,67 \pm 0,02^{a\,A}$
12	Proteína*	$87,71 \pm 0,72^{c\,B}$	$96,36 \pm 0,34^{a\,b\,A}$	$96,79 \pm 0,68^{a\,A}$	$96,08 \pm 0,54^{b\,A}$
	Lipídeos	$1,96 \pm 0,28^{a\,C}$	$1,34 \pm 0,18^{b\,D}$	$1,29 \pm 0,15^{b\,B}$	$1,40 \pm 0,17^{b\,C}$
	Umidade	$3,89 \pm 0,12^{d\,A}$	$4,47 \pm 0,16^{c\,A}$	$5,98 \pm 0,16^{a\,A}$	$5,67 \pm 0,31^{b\,A}$
	Cinzas	$3,56 \pm 0,04^{a\,A}$	$3,37 \pm 0,04^{a\,A}$	$3,42 \pm 0,03^{a\,B}$	$3,38 \pm 0,01^{a\,B}$

Média ± desvio padrão, em base seca
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (coluna) diferentes, para o mesmo componente, indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).
*N x 6,25

4.3.2. Calorimetria diferencial de varredura (CDV) e grupos sulfidrila livres (SH) dos isolados protéicos de soja.

Os valores de entalpia de desnaturação (ΔH) e do teor de grupos sulfidrila livres das proteínas dos isolados obtidos de grãos irradiados e não irradiados em função do tempo de armazenamento estão apresentados na Tabela 12.

Os valores de ΔH, de 14,76 a 17,52 J/g (Tabela 12), são semelhantes aos reportados por Murray et al. (1985), para proteínas de soja. A entalpia é um parâmetro termodinâmico que informa as mudanças ocorridas na proteína, como ruptura de pontes de

hidrogênio, de interações hidrofóbicas e agregação (ARNTFIELD; MURRAY, 1981). Valores mais altos de entalpia estão associados a maiores porcentagens de proteína nativa ou pouco desnaturada (WAGNER; AÑÓN, 1990). No tempo zero de armazenamento, os IPSs de grãos irradiados apresentaram maiores valores das entalpias quando comparados ao IPS-C, no entanto, entre as doses e tipo de radiação, as diferenças não foram significativas ($p>0,05$). Byun e Kang (1994) avaliaram o efeito da irradiação gama nas proteínas de grãos de soja e somente observaram redução de 25% nos valores de entalpia, quando foram utilizadas doses de irradiação acima de 5 kGy. Após doze meses de armazenamento, somente o IPS-2 kGy apresentou resultado significativamente ($p<0,05$) menor que os demais isolados de 9%.

Tabela 12. Entalpia de desnaturação (ΔH) da proteína a partir do termograma do CDV e grupos sulfidrila livres (µmoles/g proteína) dos isolados protéicos de soja

Tempo de armazenamento (meses)	IPS			
	IPS-C	IPS-2,0 kGy	IPS-5,0 kGy	IPS-Acel
	ΔH (J/g)			
0	$15,72 \pm 0,52^{b\ B}$	$16,21 \pm 0,50^{b\ cA}$	$17,41 \pm 0,48^{a\ cA}$	$17,05 \pm 0,48^{c\ A}$
4	$17,31 \pm 0,27^{a\ A}$	$16,03 \pm 0,50^{b\ A}$	$15,74 \pm 0,48^{b\ B}$	$15,65 \pm 0,36^{b\ B}$
8	$17,52 \pm 0,45^{a\ A}$	$16,40 \pm 0,52^{b\ A}$	$15,62 \pm 0,18^{c\ B}$	$16,65 \pm 0,38^{b\ A}$
12	$16,53 \pm 0,32^{a\ B}$	$14,76 \pm 0,20^{b\ B}$	$16,26 \pm 0,13^{a\ B}$	$16,71 \pm 0,42^{a\ A}$
	Grupos sulfidrila livres (µmoles/g proteína)			
0	$2,69 \pm 0,11^{b\ A}$	$3,24 \pm 0,18^{a\ A\ B}$	$3,52 \pm 0,04^{a\ A\ B}$	$3,56 \pm 0,38^{a\ A\ C}$
4	$2,95 \pm 0,16^{b\ A}$	$3,40 \pm 0,12^{a\ A}$	$3,30 \pm 0,19^{a\ B}$	$3,34 \pm 0,20^{a\ b\ A\ C}$
8	$2,94 \pm 0,01^{b\ A}$	$3,00 \pm 0,04^{b\ B}$	$3,93 \pm 0,33^{a\ A}$	$3,90 \pm 0,35^{a\ A}$
12	$2,80 \pm 0,06^{c\ A}$	$3,29 \pm 0,05^{a\ A\ B}$	$2,99 \pm 0,09^{b\ B}$	$2,97 \pm 0,09^{b\ c\ B\ C}$

Média ± desvio padrão.
Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (Coluna) diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p<0,05$).

O teor de grupos SH encontrados estão dentro da faixa reportada por Wagner e Añon (1990), de 0,48 a 5,9 µMol de SH/g de proteína para isolados protéicos de soja. No tempo zero de armazenamento, o teor dos grupos SH dos isolados, quando comparado ao IPS de grãos controle aumentou em até 32% com a irradiação, não sendo observadas diferenças entre as doses e tipo de radiação ($p<0,05$). Grupos sulfidrila livres das proteínas

são sensíveis à irradiação, podendo haver quebra de ligações dissulfeto e/ou oxidação dos grupos sulfidrila (SIMIC, 1983; GROLICHOVÁ et al. 2004). Lynn e Raoult (1976) e Siddhruraju, Markkar e Becker (2002) atribuem aos compostos radiolíticos, gerados no processo de irradiação, como radicais OH, pelo ataque preferencial aos grupamentos sulfidrilas e ligações dissulfeto. A oxidação dos grupos sulfidrila e formação de pontes dissulfeto também têm sido atribuídas ao armazenamento (HOSHI; YAMAUCHI; SHIBASAKI, 1982).

Os teores de grupos sulfidrila livres dos isolados permaneceram basicamente constantes no decorrer do armazenamento, com diminuição observada aos 12 meses para os IPSs obtidos dos grãos irradiados com 5 kGy e por feixe de elétrons (2 kGy). Hou e Chang (2004) observaram que sob condições de armazenamento mais severas, 84% de umidade relativa e 30ºC, decréscimo de 62% (1,82-0,69 µMol SH/g proteína), enquanto que o armazenamento sob condições amenas, 57% de umidade relativa e 20ºC, resultaram na diminuição de 16% dos teores de SH livres.

4.3.3. Cromatografia liqüida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

Na Figura 3 estão apresentados os perfis cromatográficos dos IPSs obtidos de grãos não irradiados e irradiados e armazenados. No tempo zero de armazenamento não foram observadas diferenças entre os perfis dos IPSs, independente da dose ou tipo de radiação aplicada nos grãos. Após quatro meses de armazenamento, para todos os tratamentos, foi observada diminuição do número e da altura dos picos da região I, mais hidrofílica, concomitante ao aumento da altura dos picos na região III, mais hidrofóbica. Aos 8 e 12 meses de armazenamento, não foram observadas alterações importantes no perfil dos isolados, mantendo-se as características observadas aos quatro meses. Como os isolados não foram totalmente solubilizados no eluente, estes resultados sugerem que houve formação de agregados insolúveis, formados principalmente pelas frações mais hidrofílicas.

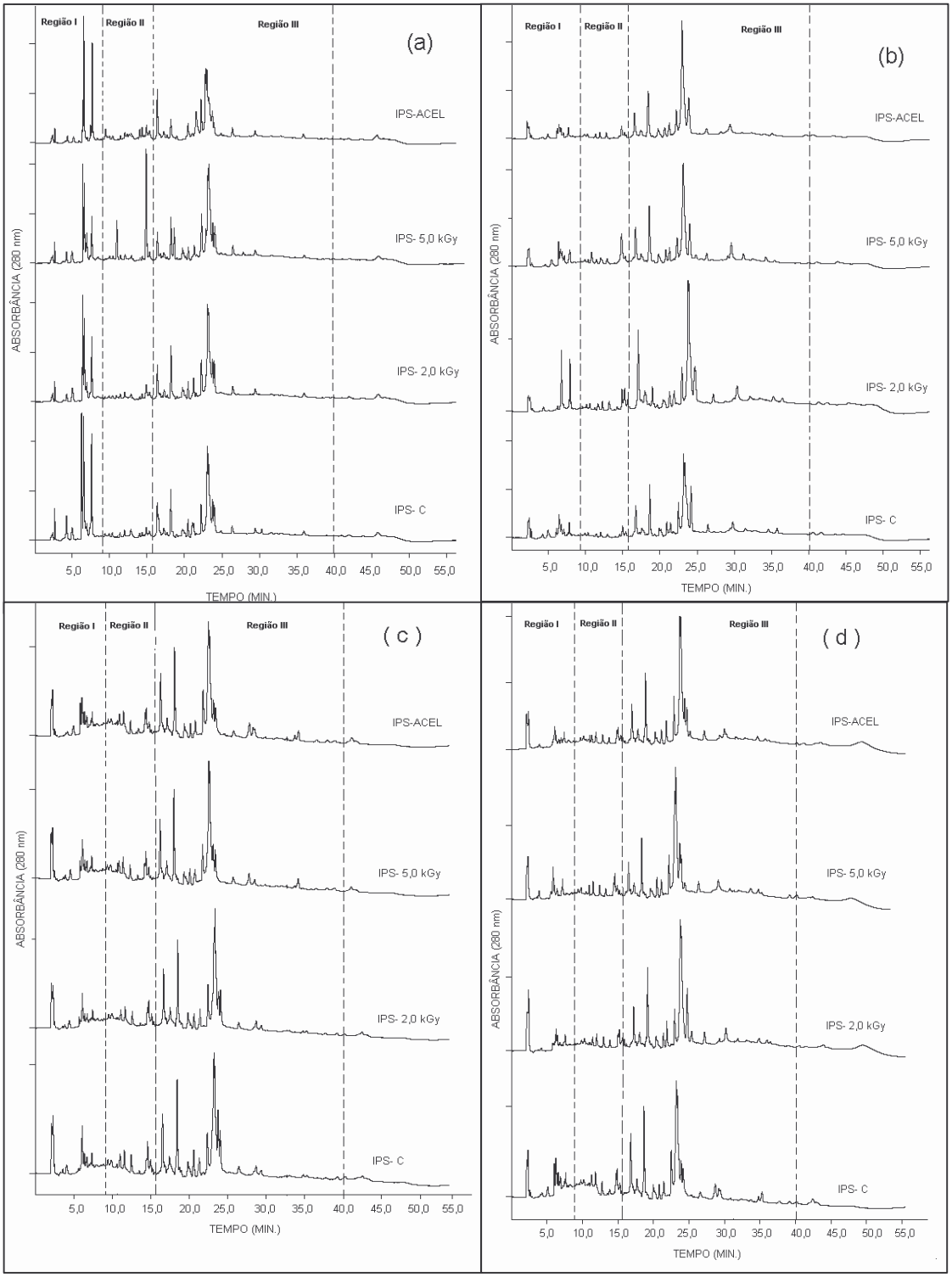

Figura 3. Cromatogramas obtidos por CLAE-FR dos IPSs obtidos de grãos controle e irradiados correspondentes aos (a) zero; (b) quatro; (c) oito e (d) doze meses de armazenamento.

4.3.4. Cromatografia liqüida de alta eficiência de exclusão-molecular (CLAE-EM)

Os cromatogramas dos isolados protéicos obtidos de grãos não irradiados, irradiados e armazenados são apresentados na Figura 4. No tempo zero de armazenamento, independente da dose e tipo de radiação os cromatogramas foram similares (Figura 4a), indicando que a irradiação aplicada nos grãos não alterou a massa molar aparente dos seus isolados protéicos.

Os IPSs dos grãos armazenados também apresentaram cromatogramas similares indicando que as condições de estocagem dos grãos utilizadas neste estudo não afetaram a massa molecular aparente dos isolados protéicos. Hou e Chang (2004) também não encontraram diferenças no perfil de massa molar da fração glicinina isolada de grãos de soja estocados em condições de 84% de umidade relativa e 30ºC após 8 meses de armazenamento.

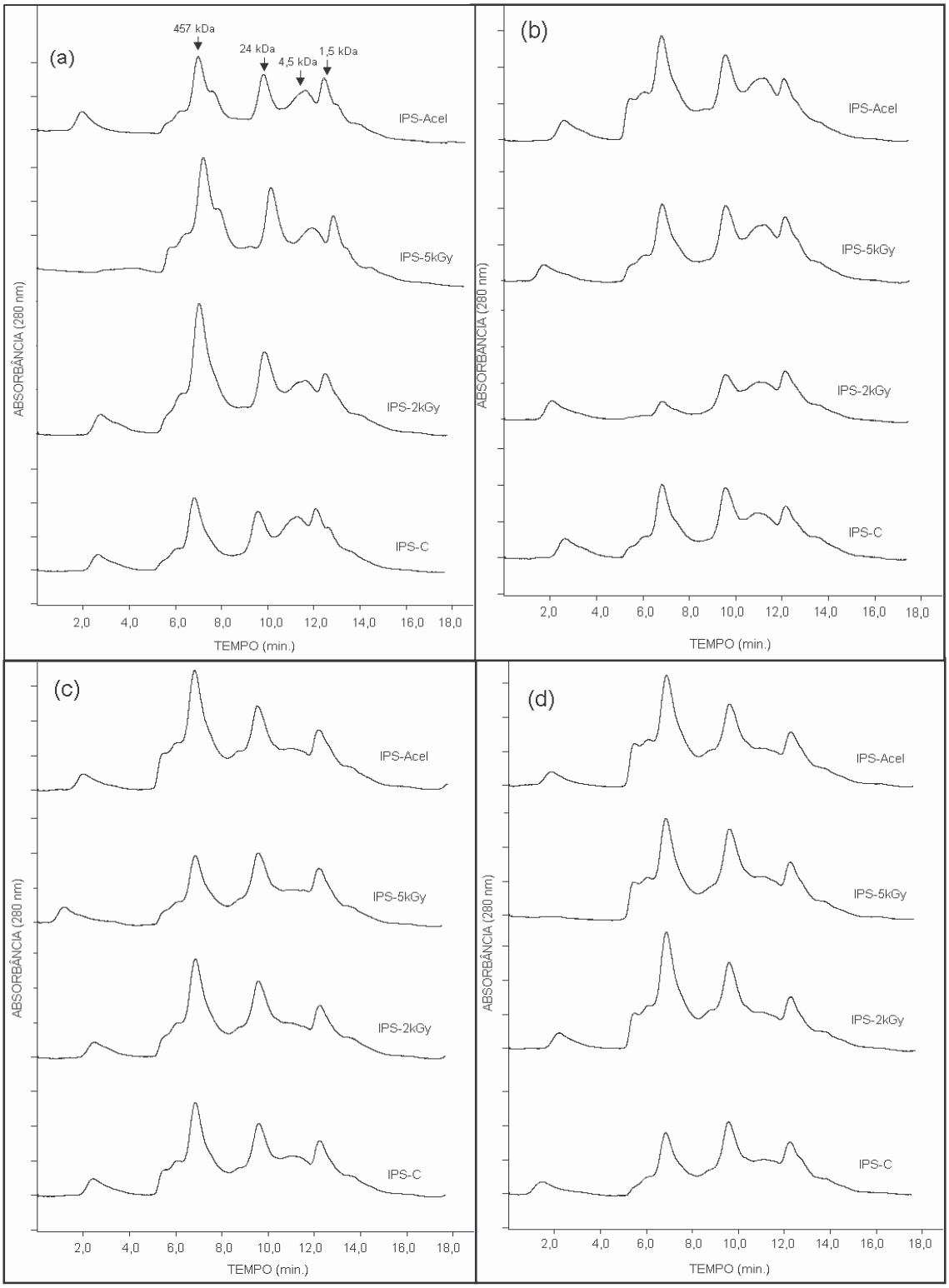

Figura 4. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM dos IPSs obtidos de grãos controle e irradiados correspondentes aos (a) zero; (b) quatro; (c) oito e (d) doze meses de armazenamento.

4.3.5. Fluorescência Intrínseca

Os espectros de fluorescência intrínseca, comprimento de onda de emissão máxima e intensidade de fluorescência dos isolados protéicos obtidos dos grãos irradiados e armazenados podem ser observados nas Tabelas 13 e 14 e na Figura 5. Não houve deslocamento da emissão máxima dos espectros de fluorescência, independentemente da dose, tipo de radiação e tempo de armazenamento. No tempo zero de armazenamento, a intensidade de fluorescência do IPS-2kGy foi menor que a dos demais isolados.

A intensidade de fluorescência, de forma geral, mostrou pequeno decréscimo após quatro e oito meses de armazenamento, voltando, aos doze meses, a apresentar valores próximos aos obtidos no início da estocagem.

Os resultados sugerem, através análise de fluorescência intrínseca, que não ocorreram alterações importantes na estrutura molecular das proteínas da soja, seja devido ao tratamento de irradiação ou ao armazenamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Byun e Kang (1994) que não observaram alterações nos espectros de emissão máxima das proteínas de grãos soja irradiados com doses de 0 a 10 kGy, constatando diminuição da intensidade de fluorescência com doses de irradiação de 20 kGy. Segundo os autores, esta diminuição pode ser resultado do rompimento de pontes de hidrogênio e quebra de ligações dissulfídicas, entre outras reações, provocadas por altas doses de irradiação.

Tabela 13. Comprimento de onda de emissão máxima ($\lambda_{máx.}$) para os isolados protéicos de soja (IPSs) obtidos de grãos controle e irradiados.

Tempo de armazenamento (meses)	$\lambda_{máx.}$(nm)			
	IPS-C	IPS-2,0 kGy	IPS-5,0 kGy	IPS-Acel
0	$336,0 \pm 0,39^{a\,A}$	$335,2 \pm 0,26^{a\,A}$	$335,2 \pm 0,00^{a\,A}$	$335,2 \pm 0,00^{a\,A}$
4	$336,8 \pm 0,00^{a\,A}$	$336,8 \pm 0,00^{a\,A}$	$335,2 \pm 0,00^{a\,A}$	$335,2 \pm 0,00^{a\,A}$
8	$336,8 \pm 0,00^{a\,A}$	$335,2 \pm 0,00^{a\,A}$	$336,8 \pm 0,00^{a\,A}$	$333,6 \pm 0,00^{a\,A}$
12	$335,2 \pm 0,00^{a\,A}$	$335,7 \pm 0,65^{a\,A}$	$336,8 \pm 2,26^{a\,A}$	$336,0 \pm 1,13^{a\,A}$

Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (Coluna) diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p<0,05$).

Tabela 14. Intensidade de fluorescência máxima para os isolados protéicos de soja (IPSs) obtidos de grãos controle e irradiados.

Tempo de armazenamento (meses)	Intensidade de fluorescência			
	IPS-C	IPS-2,0 kGy	IPS-5,0 kGy	IPS-Acel
0	$2237 \pm 2,12^{a\,A}$	$1700 \pm 4,24^{d\,B}$	$2096 \pm 0,00^{c\,B}$	$2137 \pm 0,00^{b\,B}$
4	$1692 \pm 0,00^{c\,D}$	$1696 \pm 0,00^{b\,B}$	$1614 \pm 0,00^{d\,D}$	$1744 \pm 0,00^{a\,D}$
8	$1846 \pm 0,00^{c\,C}$	$1781 \pm 0,00^{d\,C}$	$1854 \pm 0,00^{b\,A\,C}$	$2095 \pm 0,00^{a\,C}$
12	$2051 \pm 0,00^{d\,B}$	$1952 \pm 0,00^{c\,A}$	$2163 \pm 0,00^{b\,A}$	$2199 \pm 0,00^{a\,A}$

Letras minúsculas (linha) e maiúsculas (Coluna) diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p<0,05$).

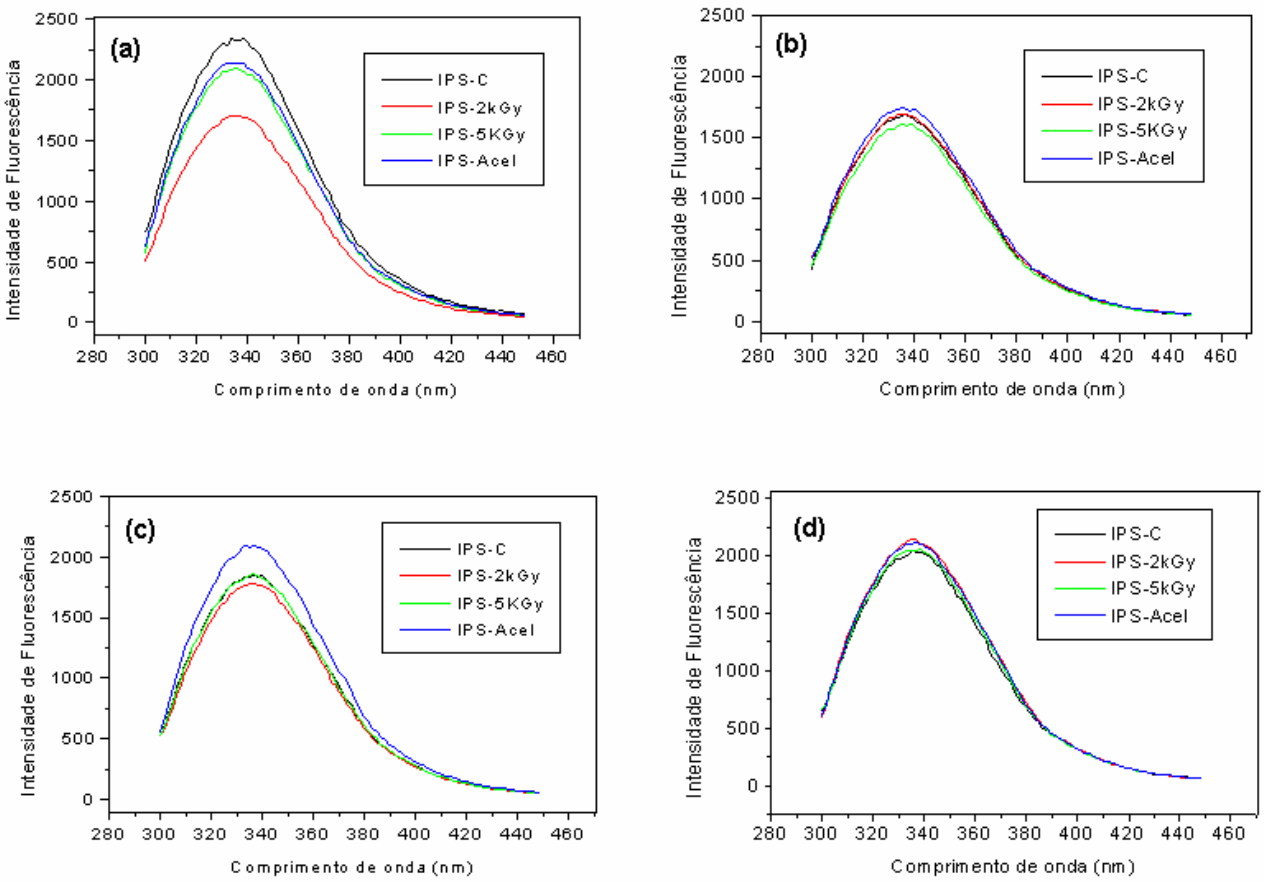

Figura 5. Espectros de fluorescência intrínseca dos IPSs obtidos de grãos controle e irradiados correspondentes aos (a) zero; (b) quatro; (c) oito e (d) dozes meses de armazenamento.

4.3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas solúveis em diferentes sistemas de tampões

Na Figura 6 observa-se os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE), em condições não redutoras (amostras não tratadas com β-mercaptoetanol), das proteínas solúveis dos isolados protéicos de grãos irradiados e não irradiados (controle) e armazenados, em diferentes sistemas de solventes: água; tampão-Tris (Tris-glicina-EDTA, pH 8); tampão-uréia (tampão-SDS-uréia 6 M); tampão-DTT (tampão-SDS-úreia-DTT 10 mM).

As principais frações identificadas nos isolados protéicos de soja foram a 7S com suas subunidades α, α´, β e 11S com suas subunidades ácida e básica. A composição relativa de cada fração protéica solúvel nos diferentes solventes, determinada por densitometria, encontra-se nas Tabelas 15 a 18.

No tempo zero de armazenamento, os perfis eletroforéticos dos IPSs de grãos irradiados e de não irradiados, no mesmo sistema de solvente, foram similares, indicando que o tipo e dose de radiação empregada não foram relevantes na formação de agregados (Figura 6a), embora aumento dos grupos sulfidrila tenha sido detectado em função do aumento da dose da radiação. Byun e Kang (1994) avaliaram o perfil eletroforético, em condições não redutoras, das proteínas solúveis em tampão fosfato obtidas de grãos gama irradiados com doses de 2,5 a 20 kGy e verificaram que o perfil eletroforético das proteínas não se modificou em função da irradiação.

Ao longo do tempo de armazenamento houve alteração do perfil das proteínas solúveis em água e tampão-Tris, enquanto que os dos sistemas tampão-uréia e tampão-DTT mostraram-se inalterados. Nos sistemas água e tampão-Tris, a subunidade básica da fração 11S foi observada nos perfis eletroforéticos obtidos nos tempos 4 e 8 meses, não estando presente aos zero e 12 meses de armazenamento (Tabela 15 e 16). Possivelmente, durante o armazenamento ocorreram reações de dissociação e agregação protéica por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas que determinaram a presença da subunidade básica da 11S na fração solúvel. Como esta subunidade está presente nos perfil obtidos no sistema tampão Uréia e tampão-DTT, isto indica que esta fração participou na formação de agregados insolúveis, principalmente devido à interações hidrofóbicas e/ou formação de pontes dissulfeto. Resultados semelhantes foram encontrados por Chunping et al. (2000) para grãos de soja estocadas sem controle de temperatura e UR 80% por 2

meses. O perfil eletroforético das proteínas solúveis em água mostrou que a proporção das subunidades 11S/7S decresceu durante a estocagem.

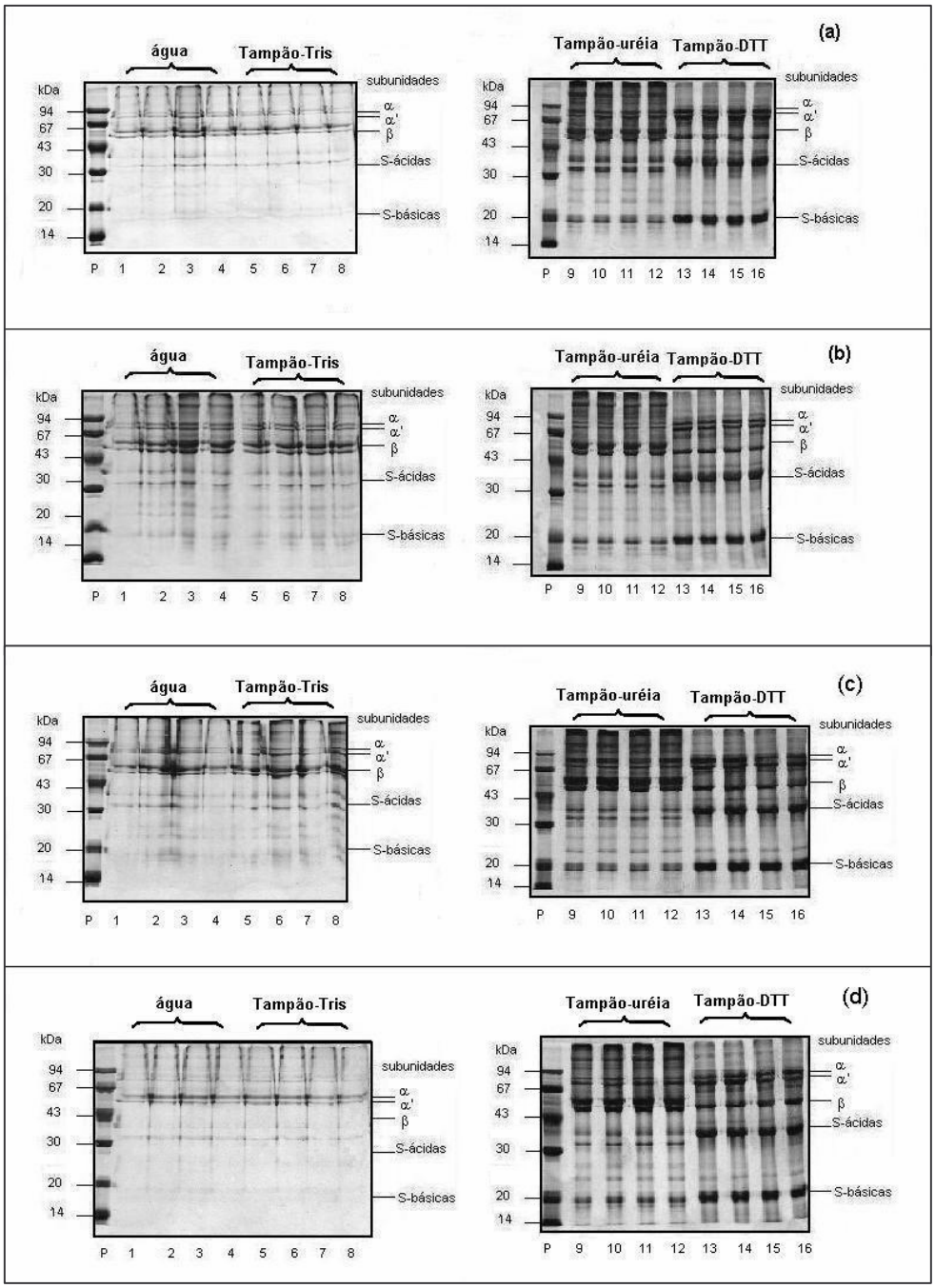

Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), em condições não redutoras, das proteínas solúveis dos IPSs obtidos de grãos controle e irradiados, em diferentes sistemas de solvente correspondentes aos (a) zero; (b) quatro; (c) oito; (d) doze meses de armazenamento. Coluna P: Padrão; Colunas (1;5;9;13): IPS-C; Colunas (2;6;10;14): IPS-2 kGy; Colunas (3;7;11;15): IPS-5 kGy; Colunas (4; 8;12;16): IPS-Acel.

Tabela 15. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S das proteínas solúveis em água destilada dos IPSs[1].

Tempo de armazenamento (meses)	IPS	7S			11S	
		α'	α	β	Ácido	Básico
0	IPS-C	25,9	24,1	22,4	27,6	0,0
	IPS-2,0 kGy	20,0	24,6	24,6	30,8	0,0
	IPS-5,0 kGy	24,2	24,2	24,2	29,0	0,0
	IPS-Acel	22,2	23,8	22,2	31,7	0,0
4	IPS-C	14,8	25,0	19,6	19,6	21,0
	IPS-2,0 kGy	19,5	16,9	19,5	20,8	23,4
	IPS-5,0 kGy	19,0	16,0	19,0	23,0	23,0
	IPS-Acel	14,4	21,6	14,4	19,6	29,9
8	IPS-C	14,0	20,3	20,8	22,8	22,0
	IPS-2,0 kGy	12,2	20,3	20,3	23,0	24,3
	IPS-5,0 kGy	15,2	18,5	19,6	22,8	23,9
	IPS-Acel	15,0	20,3	20,8	21,8	22,1
12	IPS-C	24,6	23,1	24,6	27,7	0,0
	IPS-2,0 kGy	17,5	28,6	23,8	30,2	0,0
	IPS-5,0 kGy	19,7	23,0	29,5	29,5	0,0
	IPS-Acel	15,4	29,2	24,6	30,8	0,0

[1]Os valores representam a porcentagem da área das subunidades em relação à área total da globulina 7S e globulina 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese.

Tabela 16. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S das proteínas solúveis em tampão Tris-Glicina dos IPSs[1].

Tempo de armazenamento (meses)	IPS	7S			11S	
		α'	α	β	Ácido	Básico
0	IPS-C	27,2	16,7	28,8	27,3	0,0
	IPS-2,0 kGy	22,6	25,9	25,4	26,2	0,0
	IPS-5,0 kGy	17,5	19,3	31,6	31,6	0,0
	IPS-Acel	19,7	27,9	26,2	26,2	0,0
4	IPS-C	17,3	17,3	19,2	20,2	26,0
	IPS-2,0 kGy	15,4	16,5	17,6	26,4	24,2
	IPS-5,0 kGy	14,3	16,5	16,5	24,2	28,5
	IPS-Acel	13,1	20,2	15,5	25,0	26,2
8	IPS-C	18,2	19,8	19,8	20,2	22,0
	IPS-2,0 kGy	19,7	20,3	18,7	18,3	23,0
	IPS-5,0 kGy	18,2	19,8	19,5	20,2	22,3
	IPS-Acel	19,7	18,3	19,6	20,3	22,1
12	IPS-C	18,5	24,1	22,2	35,2	0,0
	IPS-2,0 kGy	17,5	24,6	28,1	29,8	0,0
	IPS-5,0 kGy	17,5	24,6	28,1	29,8	0,0
	IPS-Acel	20,3	28,1	23,4	28,1	0,0

[1] Os valores representam a porcentagem da área das subunidades em relação à área total da globulina 7S e globulina 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese.

Tabela 17. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S das proteínas em tampão Tris-uréia-SDS dos IPSs[1].

Tempo de armazenamento (meses)	IPS	7S			11S	
		α'	α	β	Ácido	Básico
0	IPS-C	17,0	19,3	15,9	21,6	26,1
	IPS-2,0 kGy	18,6	17,6	19,6	21,6	22,5
	IPS-5,0 kGy	18,0	17,5	20,6	22,4	21,5
	IPS-Acel	17,5	16,5	20,4	22,3	23,3
4	IPS-C	17,0	19,3	19,3	19,3	25,0
	IPS-2,0 kGy	18,1	12,4	17,1	23,8	28,5
	IPS-5,0 kGy	12,9	17,8	18,8	16,8	33,7
	IPS-Acel	16,3	24,4	16,3	22,1	20,9
8	IPS-C	14,4	19,2	17,8	21,8	26,8
	IPS-2,0 kGy	13,0	20,0	17,0	25,0	25,0
	IPS-5,0 kGy	18,9	22,2	21,1	16,7	21,1
	IPS-Acel	12,2	20,9	16,5	22,6	27,8
12	IPS-C	15,5	17,5	16,5	24,7	25,8
	IPS-2,0 kGy	15,8	20,0	13,7	27,4	23,2
	IPS-5,0 kGy	11,1	22,2	15,2	26,3	25,3
	IPS-Acel	12,3	24,5	14,2	26,4	22,6

[1] Os valores representam a porcentagem da área das subunidades em relação à área total da globulina 7S e globulina 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese.

Tabela 18. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S das proteínas em tampão Tris-DTT dos IPSs[1].

Tempo de armazenamento (meses)	IPS	7S			11S	
		α'	α	β	Ácido	Básico
0	IPS-C	14,4	15,2	18,4	23,2	28,8
	IPS-2,0 kGy	13,7	15,8	15,8	25,2	29,5
	IPS-5,0 kGy	12,0	15,6	16,3	28,4	27,7
	IPS-Acel	12,4	15,2	19,3	24,8	28,3
4	IPS-C	9,6	15,4	16,9	23,5	34,6
	IPS-2,0 kGy	11,9	17,0	16,3	25,9	28,9
	IPS-5,0 kGy	14,7	14,7	16,8	25,2	28,7
	IPS-Acel	11,8	15,3	17,4	23,6	31,9
8	IPS-C	12,3	15,9	16,7	27,5	27,5
	IPS-2,0 kGy	13,1	17,7	16,9	24,6	27,7
	IPS-5,0 kGy	12,5	15,4	16,9	25,7	29,4
	IPS-Acel	10,7	16,4	20,7	25,7	26,4
12	IPS-C	10,1	19,3	17,6	26,9	26,1
	IPS-2,0 kGy	11,0	20,3	22,0	28,0	18,6
	IPS-5,0 kGy	14,4	16,2	22,5	27,0	19,0
	IPS-Acel	13,4	15,7	17,3	25,2	28,3

[1]Os valores representam a porcentagem da área das subunidades em relação à área total da globulina 7S e globulina 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese.

4.4. Propriedades Funcionais

4.4.1. Solubilidade Protéica

A solubilidade é considerada um dos mais importantes atributos funcionais das proteínas devido à sua influência em outras propriedades como emulsificação, formação de espuma e gelatinização (DAMODARAN, 1997). Os resultados da solubilidade protéica, em água e em solução de NaCl (0,1M) dos isolados obtidos de grãos irradiados e não irradiados estão apresentados nas Figuras 7 e 8. Observa-se que, para todos os tratamentos, os isolados apresentaram, tanto em água como em solução NaCl (0,1M), alta solubilidade (>50%) nos pH 3,0 e 7,0. Próximo ao ponto isoelétrico, pH 5,0, comportamento típico, ou seja, baixa solubilidade foi observado. Verificou-se ainda que todos os isolados, nos pHs 3,0 e 7,0, apresentaram maior solubilidade em água do que em solução NaCl (0,1M). Por outro lado, no pH 5,0, todos os IPSs apresentaram maior solubilidade em solução NaCl (0,1M) do em água.

Em pH abaixo e acima do ponto isoelétrico, as proteínas possuem excesso de cargas de mesmo sinal, o que aumenta a força eletrostática repulsiva entre as moléculas que são maiores que as forças atrativas de Van der Waals, que previnem a agregação, aumentando a solubilidade (DAMODARAN, 1997). No pI, o número de cargas positivas e negativas na molécula se igualam e, por não existir forças repulsivas, a solubilidade diminui (FENEMA, 1989). No entanto em baixas concentrações de sais (baixa força iônica) e próximo ao pI, os íons salinos tendem a se associar às proteínas contribuindo para uma maior repulsão das moléculas, portanto aumentando a solubilidade (salting-in). Ao contrário, em pHs abaixo ou acima do pI, os íons salinos competem com a proteína pela água ocasionando atração mútua entre as moléculas devido às forças eletrostáticas, diminuindo a solubilidade (salting-out) (FENEMA, 1989).

No tempo zero de armazenamento, a solubilidade protéica dos IPSs em água, excetuando-se em pH 5,0, aumentou 13-22% com a irradiação (Figura 7). Em solução salina, em todos pHs, o aumento médio da solubilidade dos IPSs de grãos irradiados ficou na faixa de 13,1-18,1%. Em solução salina, dentre os IPSs de grãos irradiados, o IPS-5 kGy foi o que apresentou maior solubilidade, o que pode estar relacionado ao aumento dos grupos sulfidrila livres (Tabela 13). Segundo Donadel e Prudencio-Ferreira (1999), a ruptura das ligações dissulfeto aumenta a flexibilidade das moléculas, favorecendo a

solubilidade. Dogbevi, Vachon e Lacroix (2000) observaram aumento de 5% na solubilidade de proteína de feijões (*Phaseolus vulgaris*) irradiados com dose de até 4 kGy.

De forma geral, ao longo do armazenamento, principalmente aos doze meses, os isolados, em água e em sal, apresentaram diminuição da solubilidade. Em água, o IPS-C teve um comportamento diferente dos demais isolados, apresentando aumento significativo ($p<0,05$) de 23,3% (pH 3) e 10,4% (pH 7) nos oito primeiros meses de armazenamento. Visser e Thomas (1987) também relataram diminuição da solubilidade das proteínas de grãos de soja durante o armazenamento e atribuíram este efeito à formação de agregados insolúveis por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e também por pontes dissulfídicas. Como não foi observado diminuição dos grupos SH, a redução da solubilidade, deve-se possivelmente à formação de agregados por interações hidrofóbicas.

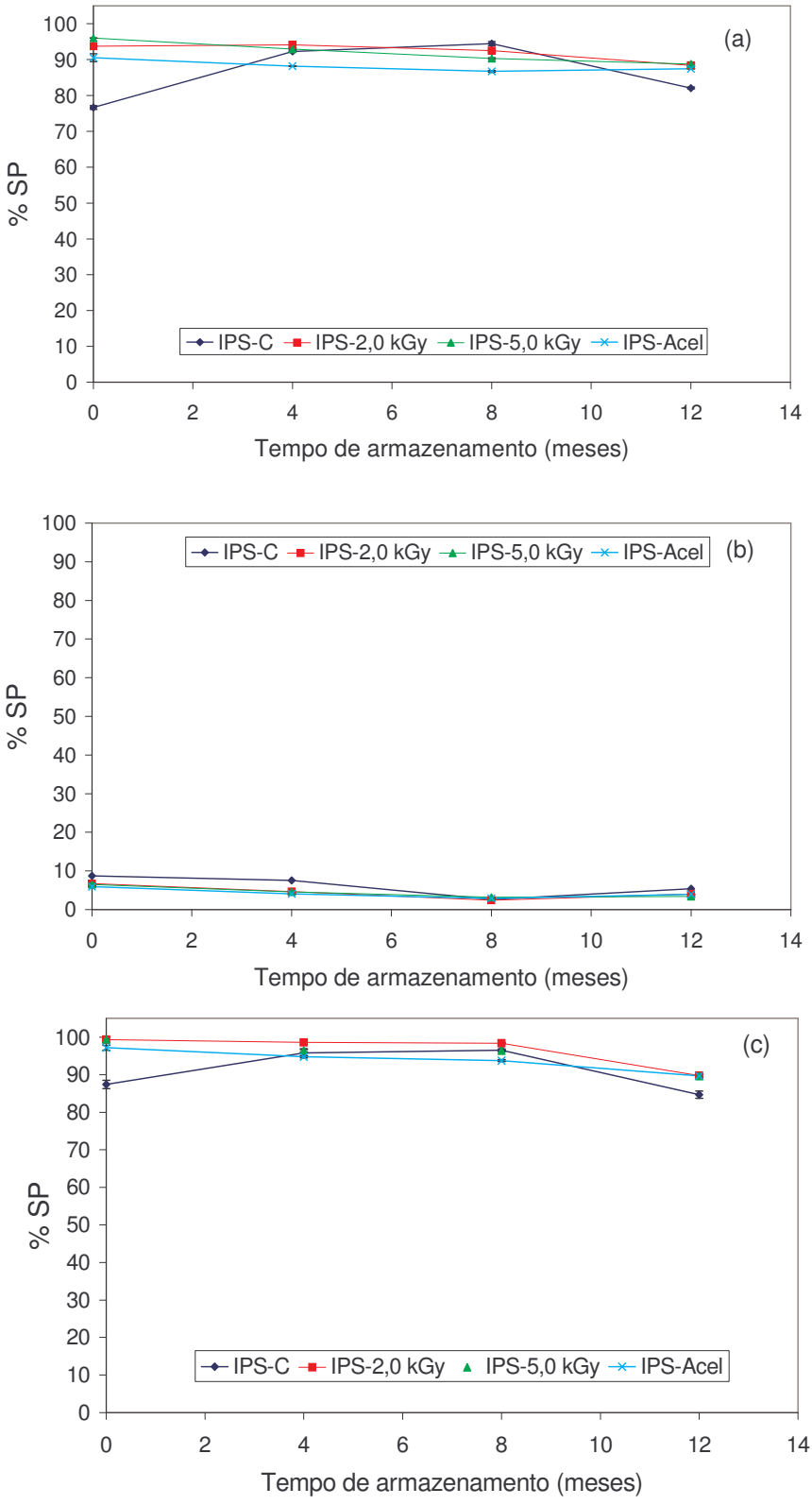

Figura 7. Solubilidade dos isolados protéicos de soja (IPSs) em água e pH 3,0 (a); pH 5,0 (b) pH 7,0 (c)

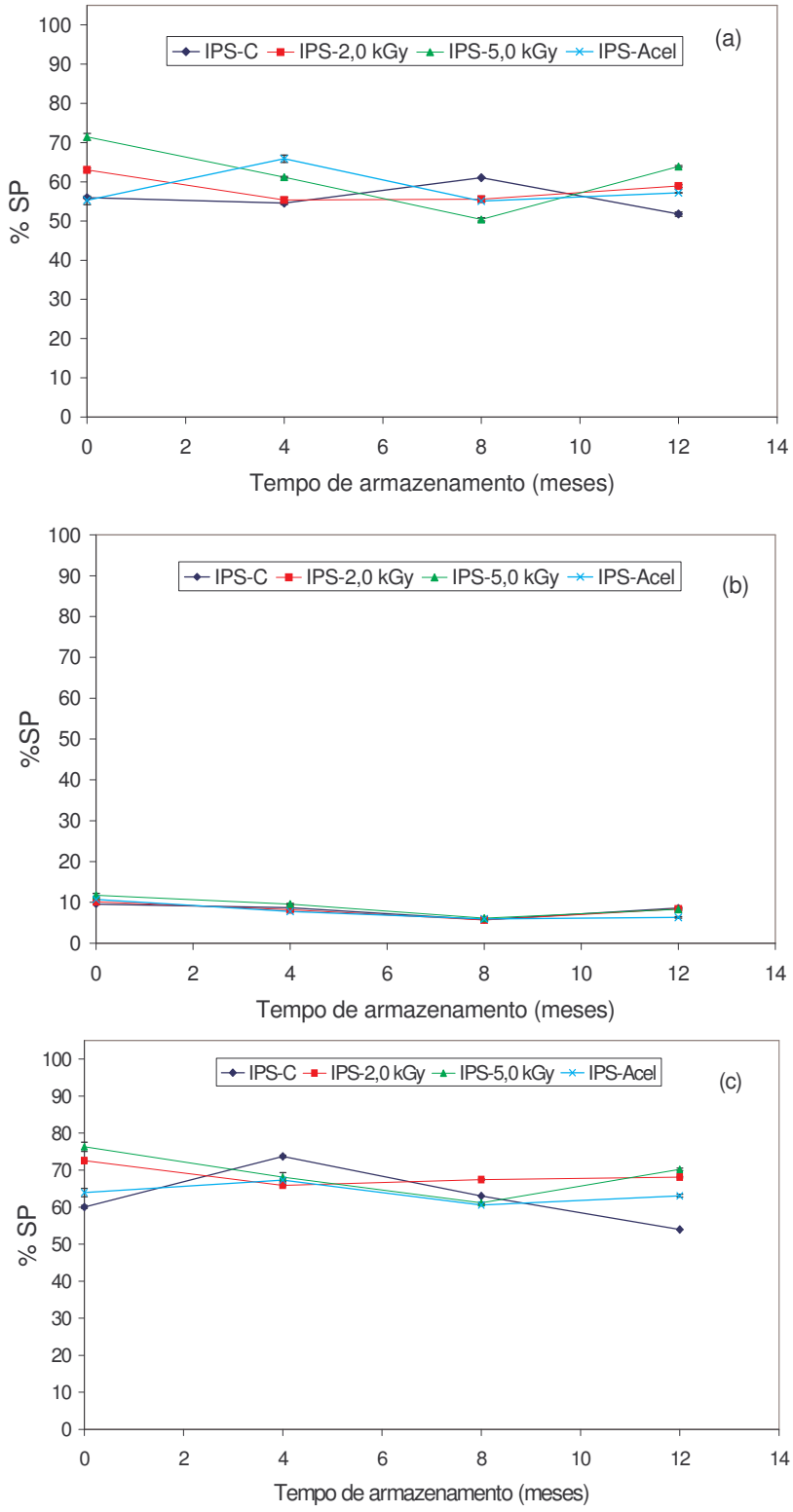

Figura 8. Solubilidade dos isolados protéicos de soja (IPSs) em NaCl 0,1 M e pH 3,0 (a); pH 5,0 (b) pH 7,0 (c)

4.4.2. Propriedades emulsificante dos isolados protéicos de soja (IPSs)

Os resultados da capacidade emulsificante (CE) dos isolados protéicos obtidos de grãos irradiados e não irradiados e armazenados estão apresentados na Figura 9. Todos os isolados protéicos, apresentaram maior capacidade emulsificante em pH 3,0 que em pH 7,0. O efeito do pH do meio sobre a proteína está associado à desprotonação dos grupos laterais da molécula, resultando numa carga líquida com maior ou menor afinidade em interagir com o solvente, afetando seu comportamento ativo na interface da emulsão. Em pH 7,0, as proteínas de origem vegetal apresentam uma carga liquida negativa, que provoca um desequilíbrio de natureza hidrofóbica, diminuindo a adsorção da proteína na interface, causando redução da capacidade de emulsificação (ELIZALDE; BARTHOLOMAI; PILOSOF**,** 1996).

No tempo zero de armazenamento, para ambos os valores de pH estudados, a CE dos IPSs de grãos irradiados apresentaram valores mais elevados que os de grãos não irradiados, sendo que a CE do IPS-5 kGy foi 20 e 13% superior à do IPS-C para os pHs 3,0 e 7,0 respectivamente. A CE entre os IPS-Acel e IPS-2kGy não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$). No presente trabalho, os IPSs de grãos irradiados que apresentaram maiores teores de SH livres (Tabela 13), também apresentaram maiores CE. Vários autores correlacionam o aumento dos grupamentos sulfidrilas livres de uma proteína com aumento de sua propriedade emulsificante (PETRUCELLI; AÑÓN, 1994; SANTIAGO; BONALDO; GONZÁLEZ, 2004; WONG; KITTS, 2002). Segundo Li-Chan; Nakai e Wood (1984), a exposição de grupos funcionais, como grupos SH, na superfície da proteína aumenta a flexibilidade molecular, que se manifesta pela melhoria de suas propriedades emulsificantes.

Após 12 meses de armazenamento, observou-se redução significativa ($p<0,05$) da CE dos isolados de grãos irradiados, para ambos os valores de pH estudados, enquanto que para os isolados de grãos controle não foram observadas alterações. A diminuição da CE nos últimos meses de armazenamento pode estar relacionada à diminuição da solubilidade (Figura 7). É conhecido que as propriedades interfaciais não dependem somente dos grupos SH mas também da hidrofobicidade superficial e outras características estruturais da proteína, assim como da solubilidade inicial (KINSELLA, 1976). Quanto mais proteína solubilizada, mais moléculas poderão participar da interface entre as fases óleo e água da emulsão (QI; HETTIARACHCHY; KALAPATHY, 1997).

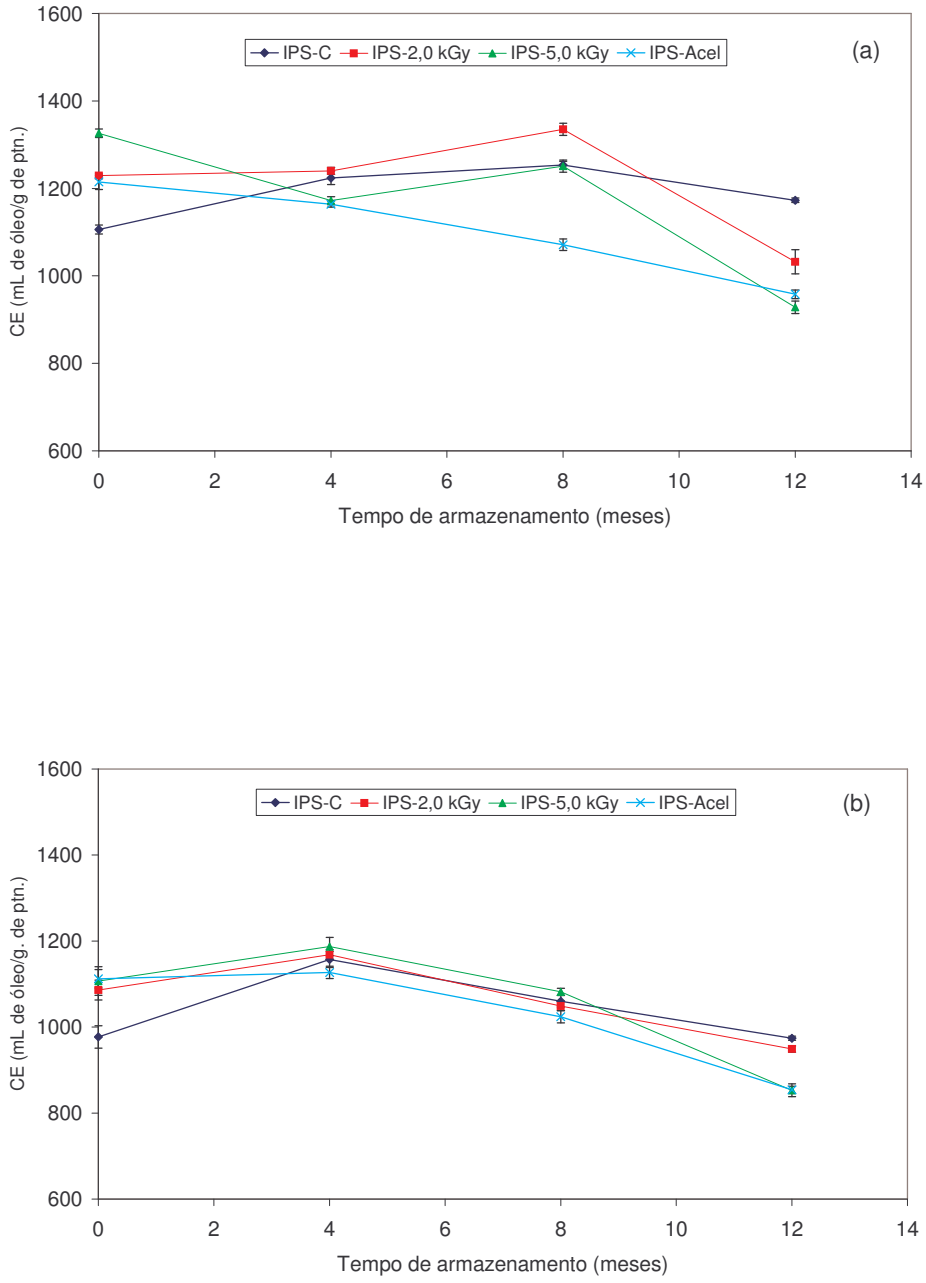

Figura 9. Capacidade emulsificante (CE) dos isolados protéicos de soja (IPSs) em pH 3,0 (a) e pH 7,0 (b).

Enquanto a formação da emulsão depende de uma rápida adsorção, desdobramento na interface e reorientação, a estabilidade de uma emulsão é determinada pelo decréscimo da energia livre interfacial e dependente da habilidade da proteína de manter a homogeneidade da emulsão que é influenciada pela solubilidade, força iônica, pH e propriedades de superfície da proteína (ELIZALDE et al., 1988; DAMODARAN, 1989). Os resultados para a estabilidade das emulsões (EE) são apresentados na Figura 10. Observa-se que a faixa de valores médios, para EE dos isolados de grãos controle e irradiados foram de 56,43-76,39% no pH 3,0 e 51,57-65,59% no pH 7,0. A menor EE foi observada no pH igual a pH 7,0 devido possivelmente ao excesso de carga liquida negativa que causou redução da estabilidade.

No tempo zero de armazenamento, independente do pH, apesar do IPS-C apresentar maior EE que os isolados obtidos de grãos irradiados, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) pelo teste de Tukey. De forma geral, ao longo do armazenamento, a EE em pH 3,0 diminuiu enquanto que em pH 7 não foi observada variação significativa ($p>0,05$). Em pH 3,0 após doze meses de armazenamento, a redução foi de até 14,4% para os IPS-C e de 9,4% para o IPS-2kGy. A redução da EE dos IPSs pode ser atribuída à menor solubilidade destes isolados.

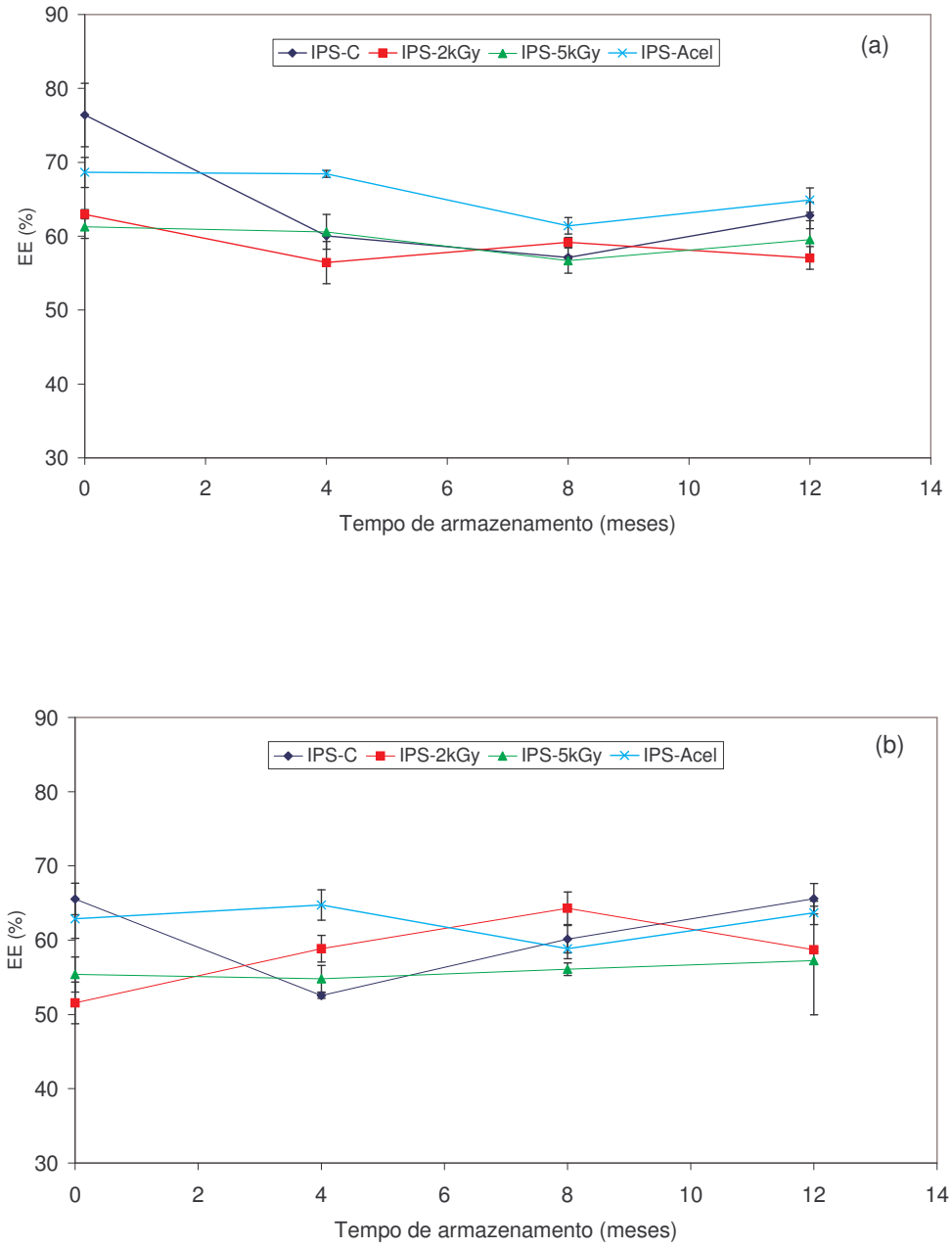

Figura 10. Estabilidade da emulsão (EE) dos isolados protéicos de soja (IPSs) em pH 3,0 (a) e pH 7,0 (b).

O índice de atividade emulsificante (IAE), em pH 3,0 e 7,0 dos isolados protéicos de soja de grãos controle e irradiados pode ser observado na Figura 11. O IAE fornece a extensão (m^2) da interface protéica que envolve os glóbulos de lipídeos da emulsão. Quanto maior for a área envolvida por massa (g) de proteína, melhor sua funcionalidade (PANYAM; KILARA, 1996). Observa-se que o valor do IAE, para todos os isolados, foi maior em pH 7,0 que em pH 3,0. Os maiores valores de IAE em pH 7,0 apresentados pelos isolados estão possivelmente relacionados à sua maior solubilidade (Figura 11b).

No tempo zero de armazenamento não foi observada influência da dose e tipo de radiação dos grãos nos valores do índice de atividade emulsificante em pH 3,0. Em pH 7,0, somente o IPS-Acel diferiu significativamente ($p<0,05$) dos demais isolados.

Ao longo do armazenamento, os isolados apresentaram comportamentos distintos para os valores IAE em pH 3,0 e 7,0. Após doze meses de armazenamento todos os isolados apresentaram redução significativa ($p<0,05$), nos valores de IAE (pH 7,0) e, em pH 3, somente os IPS-2 kGy e IPS-Acel. A redução do IAE, em pH 7,0 pode ser atribuída ao fato das proteínas tornarem-se menos solúveis ao longo do armazenamento (Figura 7a e 7b), pois solubilidade e hidrofobicidade superficial são os maiores fatores que determinam a atividade emulsificante (NAKAI, 1983).

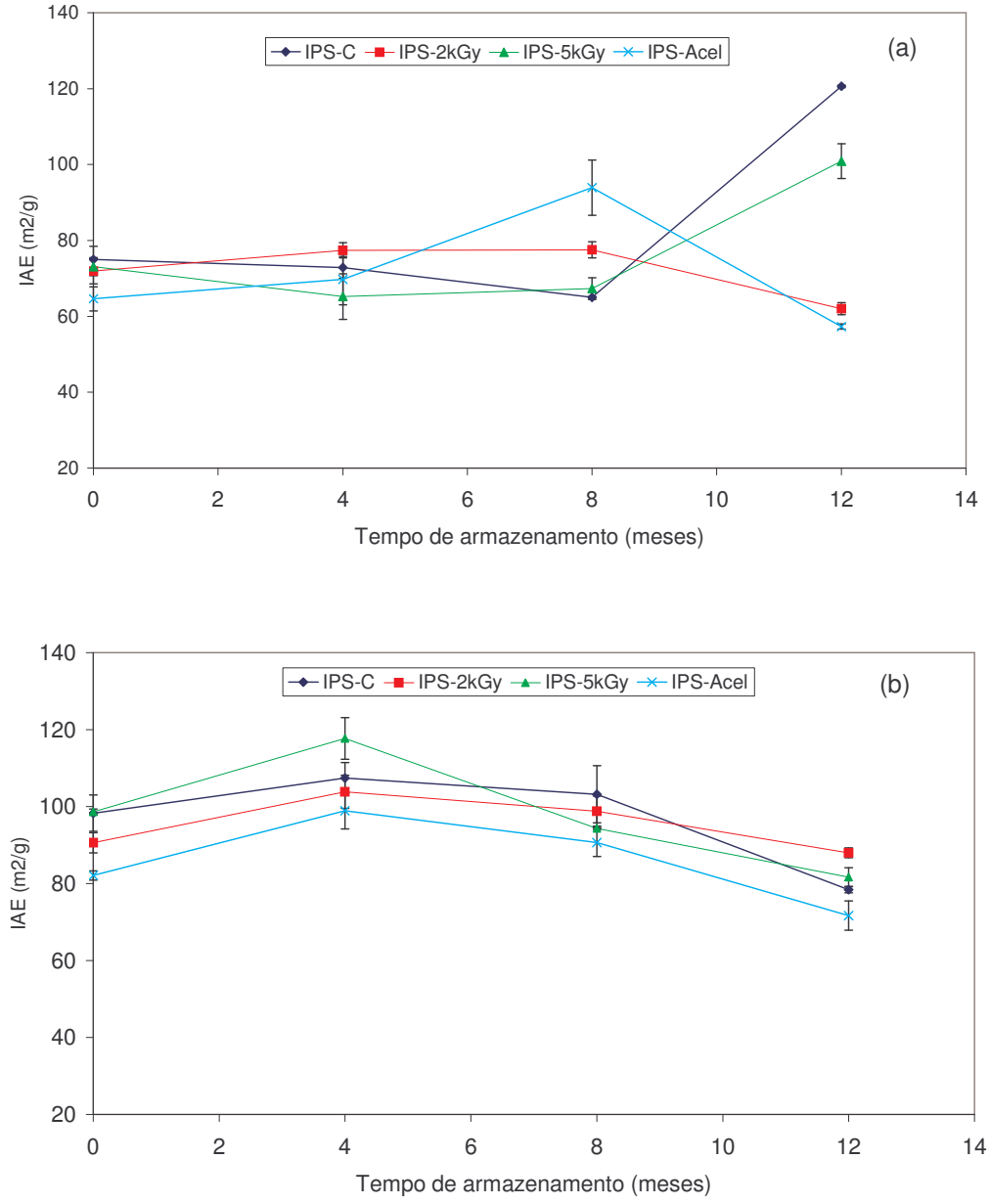

Figura 11. Índice de atividade emulsificante (IAE) dos isolados protéicos de soja (IPSs) em pH 3,0 (a) e pH 7,0 (b).

4.4.3. Propriedade de gelificação dos isolados protéicos de soja (IPSs)

A Figura 12 mostra os valores médios de dureza dos géis de isolados protéicos obtidos de grãos irradiados e não irradiados. No tempo zero de armazenamento, apesar dos géis obtidos dos IPS-C apresentarem menores valores de dureza, estes não diferiram significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Tukey, daqueles obtidos de isolados de grãos irradiados.

Aos oito e doze meses de armazenamento, todos os isolados apresentaram aumento na dureza dos géis. Os géis de maior dureza foram aqueles obtidos de isolados que continham maior teor de grupos sulfidrila livres (Tabela 12), o que possibilitou a formação de ligações dissulfídicas no processo de geleificação e que são essenciais para a manutenção da rede, além das pontes de hidrogênio (UTSUMI; KINSELA 1985a). Para Furukawa e Otha (1982) e Kang; Matsumura e Mori (1991), a maior dureza e elasticidade dos géis dependem da formação de ligação dissulfídicas.

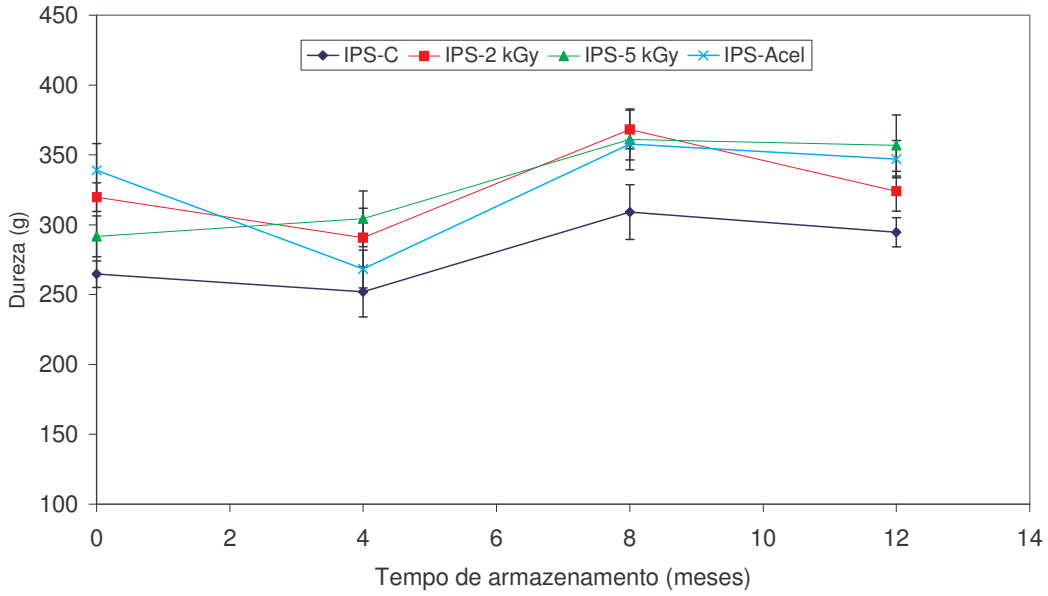

Figura 12. Valores médios de dureza de géis de isolados protéicos de soja (IPSs)

No perfil de textura, a definição de elasticidade é a velocidade com que um material deformado recupera sua forma original, após ser removida a força deformante (ROSENTHAL, 1999). Segundo Morr e Há (1993), valores de elasticidade próximos a 1,0 podem indicar a recuperação da forma original logo após a compressão.

No tempo zero de armazenamento, não houve diferença significativa, pelo teste de Tukey ($p>0,05$), nos valores de elasticidade dos géis obtidos de IPSs de grãos irradiados e controle (Figura 13). Embora a elasticidade dos géis, de pH 7,0 seja fortemente relacionada à formação de ligações disulfídicas intermoleculares (SHIMADA; CHEFTEL, 1989), no presente trabalho não foi observada esta relação. Os isolados de grãos irradiados apesar de apresentarem maiores teores dos grupos sulfidrilas livres, não formaram géis mais elásticos.

Até o quarto mês de armazenamento, todos os géis de isolados apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) médio de 11%, nos valores de elasticidade e foram também os que tiveram menores valores de dureza (Figura 12). Após esse período, nenhuma mudança significativa foi observada.

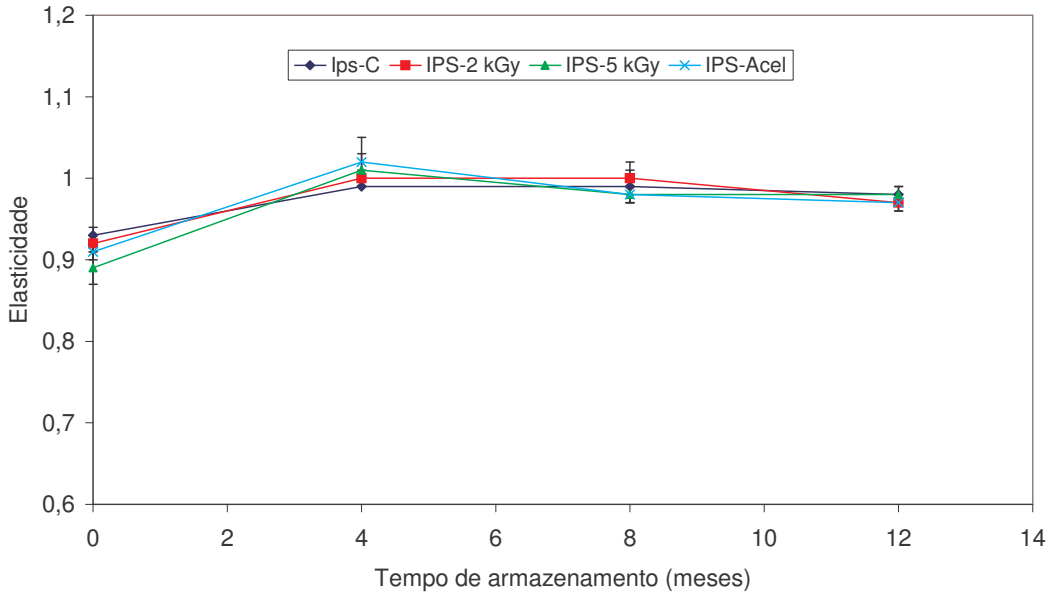

Figura 13. Valores de elasticidade dos géis de isolados protéicos de soja (IPSs).

A coesividade relaciona as forças envolvidas nas ligações internas do produto (ROSENTHAL, 1999) e indica o quanto a estrutura do gel permaneceu intacta após a primeira compressão (HANDA; TAKAHASHI; FRONING, 1998). O índice de coesividade teve o mesmo comportamento do índice de elasticidade. Os valores de coesividade dos géis, no tempo zero de armazenamento, independente do tratamento aplicado nos grãos, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 14). No quarto mês de armazenamento, todos os géis de isolados, excetuando-se o do IPS-2kGy, apresentaram aumento significativo ($p<0,05$), nos valores de coesividade quando comparados ao tempo zero. Aos 8 e 12 meses, os valores de coesividade para todos os géis não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$). Assim como na adesividade, a coesividade é um parâmetro de textura que depende da maior ou menor formação de ligações hidrofóbicas, força iônica e pontes de hidrogênio (DAMODARAN, 1996).

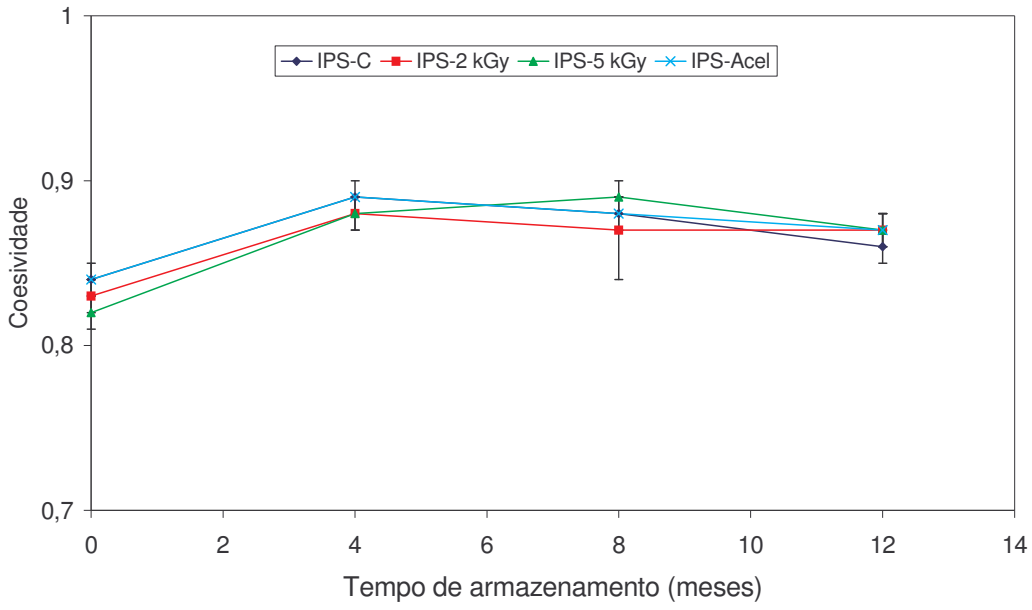

Figura 14. Valores de coesividade dos géis de isolados protéicos de soja (IPSs)

Os resultados relativos à capacidade de retenção de água (CRA) dos géis estão apresentados na Figura 15. No tempo zero, a CRA do géis de IPSs de grãos controle e irradiados variou de 79 a 83%, não sendo observada diferença significativa ($p>0,05$) pelo teste de Tukey. Resultados semelhantes foram reportados por Byun e Kang (1995), que não observaram alterações na capacidade de retenção de água de tofus produzidos de grãos gama irradiados na faixa de 2 a 5 kGy. Segundo os autores, em doses acima de 10 kGy, a capacidade de retenção de água de tofu diminuiu devido à desnaturação parcial das proteínas, que fez com que se formasse uma matriz protéica fraca. Após 8 meses de armazenamento, observou-se diminuição significativa ($p<0,05$) nos valores da CRA, para todos os tratamentos.

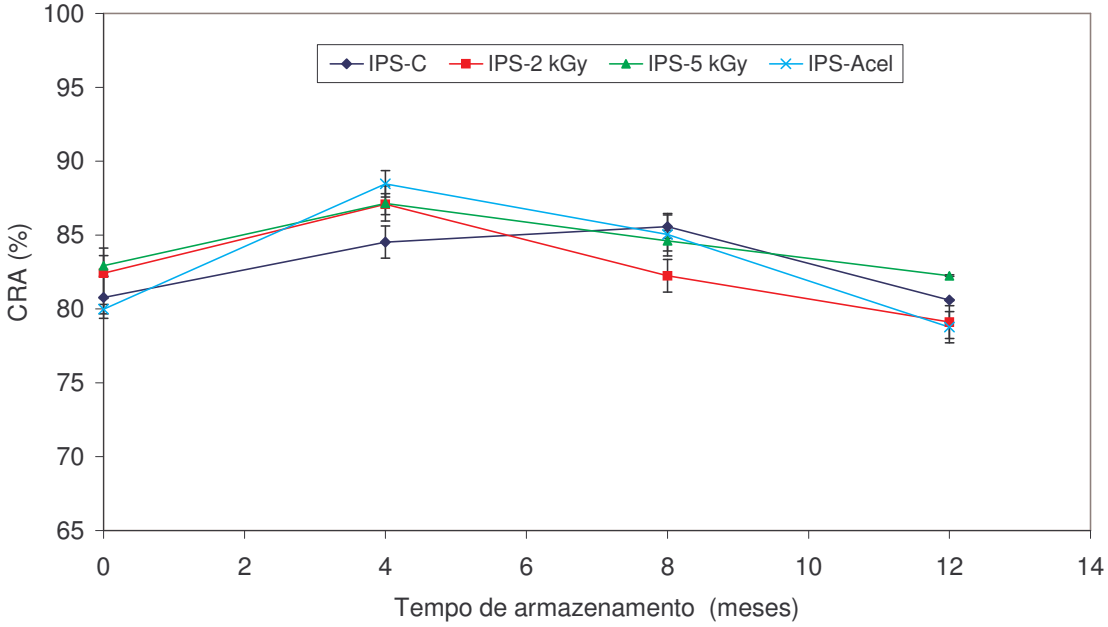

Figura 15. Valores médios da capacidade de retenção de água (CRA) de géis do isolados protéicos de soja (IPSs)

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

1. Os tratamentos com radiação gama e feixe de elétrons, nas doses utilizadas, não levaram a alterações no índice de antioxidação e no teor total de isoflavonas dos grãos de soja. No entanto, o perfil de isoflavonas sofreu alterações no decorrer do armazenamento, com aumento proporcionais dos β-glicosídeos e diminuição dos malonil glicosídeos.

2. A radiação gama e a de feixe de elétrons, nas doses utilizadas, contribuíram para o aumento da acidez dos óleos obtidos de grãos de soja, durante o armazenamento.

3. A irradiação favoreceu a redução dos teores de fitato e inibidores de tripsina nas farinhas desengorduradas de soja, sendo que na mesma dose de radiação, o tratamento por radiação gama foi mais efetivo que o de feixe de elétrons.

4. A irradiação dos grãos resultou em aumento do conteúdo de sulfidrila livres dos isolados protéicos e o armazenamento, em alterações estruturais das proteínas com formação de agregados de alto peso molecular mantidos possivelmente por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

5. De modo geral, a irradiação dos grãos de soja afetou positivamente as propriedades funcionais dos isolados protéicos de soja. No entanto, no armazenamento, houve perdas de funcionalidade, igualando todos os tratamentos ao final de 12 meses.

A irradiação gama e a de feixe de elétrons, nas condições estudadas, podem ser utilizadas sem prejuízo as propriedades físico-químicas de grãos e funcionais de seus isolados protéicos, durante o armazenamento, indicando assim a utilização da radiação ionizante como método de conservação de grãos de soja.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-TARBOUSH, H. M. Irradiation inactivation of some antinutritional factors in plant seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 7, p. 2698-2702, 1998.

ACI-Assessoria de Comunicação e imprensa. Journal da Unesp. Disponível em <http://www.unesp.br/aci/jornal/180/geral3.htm>. Acesso em: 28 Ago. 2006.

ACTON, J. C.; SAFLE, R. L. Stability of oil-water emulsion 1. Effects of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 35, n. 9, p. 852-855, 1970.

AFONSO; P. C. A.; CORRÊA, P. C.; QUEIROZ, D. M. Armazenamento e processamento de produtos agrícolas. Modelamento da perda de qualidade de sementes de soja, em função das condições iniciais e da atmosfera no armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agricóla e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 403-408, 2000.

ALFEREZ.- **Consultoria e Assessoria Radiologia- Nós e as radiações. Informativo CRTR06**. Disponível em: <http://usuários.cultura.com.br/rezendaf/diversos/esterização.htm>. Acesso em: 06 Abr. 2004.

ALVAREZ, M.; FRAGA, R.; ANDÚJAR, G. Control de insectos en la harina de soja por irradiacion. **Alimentaria**, Madrid, v. 276, p. 43-46, 1996.

ALVAREZ, M.; PRIETO, E.; MESA, J.; FRAGA, R.; FUNG, V. Desinfectación del fríjol de soja por irradiación. **Alimentaria**, Madrid, v. 276, p. 39-41, 1996.

ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 3, p. 581S-588S, 1995.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução- RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001. **Publicada no Diário Oficial da União**, de 29 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico para irradiação de alimentos, revogando a Portaria nº 09 DINAL/MS de 1985 e Portaria nº 30 de 1989. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/21_01rdc.htm> acesso em:06 ago. 2006.

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**.15 ed. Washington, 1990.

A.O.C.S. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official and tentative methods** , 3 ed. Champaing, 1988.

ARAÚJO, J. M. **Química de alimentos**. 2 ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 1995. 335 p.

ARRESE, E. L.; SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Electrophoretic, solubility, and functional properties of commercial soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.39, n.6, p.1029-1032, 1991.

ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E. D. The influence of processing parameters on food protein functionality. I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 289-294, 1981.

ATHIÉ, I.; CASTRO, M.F.P.M.; GOMES, R. A.R.; VALENTINI, S. R. T. **Conservação de grãos**. Campinas: Fundação Cargill, 1998, 236p.

BARTH, C. A.; LUNDING, B.; SCHMITZ, M.; HAGEMEISTER, H. Soybean trypsin inhibitors reduce absorption of exogenous and increase loss of endogenous protein in miniature pigs. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 12, p. 2195S-2200S, 1993

BAZINET, L.; LAMARCHE, R.; TOUPIN, R.; BOULET, M.; IPPERSIELL, D. Electroacidification of soybean for production of isolate. **Food Technology,** Chicago, v. 51, n. 9, p. 52-60, 1997.

BEUSCHEL, B.C.; CULBERTSON, J. D.; PARTRIDGE, P. A.; SMITH, D. M. Gelation and emulsification properties of partially insolubilized whey protein concentrates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 3, p. 605-609, 1992.

BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J.; NAKAI, S. Determination of SH- and SS-groups in some Food Proteins using Ellman's reagent. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 39, n. 1, p. 49-51, 1974.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BORDERÍAS, A. J.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteinas en alimentos. **Revista Agroquímica y Tecnológica de Alimentos**, Valencia, v. 28, n. 2, p. 159-169,1988.

BOURNE, M. C. texture profile analysis. **Food Technology**, Chicago, v. 32, n. 5, p.62-72, 1978.

BYUN, M. W.; KANG, IL-JUN. Effect of gamma irradiation on soya bean proteins. **Journal of the Science and Food and Agriculture**, Sussex, v. 66, n. 1, p. 55-60, 1994.

BYUN, M. W.; KANG, IL-JUN. Properties of soya milk and tofu prepared with gamma irradiated soya beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex , v. 67, n. 4, p. 477-483, 1995.

BYUN, M. W.; KANG, IL-JUN; KNOW, JOONG-HO, HAYASHI, Y.; MORI, T. Physicochemical properties of soybean oil extracted from γ-irradiated soybeans **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 301-304, 1996.

BYUN, M. W.; KNOW, JOONG-HO; MORI, T. Improvement of physical properties of soybeans by gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 42, n. 1-3, p.313-317, 1993.

BYUN, M. W.; KANG, IL-JUN; MORI, T. Effect of γ-irradiation on the water soluble components of soybeans. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 47, n. 1, p.155-160, 1996.

CAI, T.; CHANG, K.C. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington , v. 47, n. 2, p. 720-727, 1999.

CAC. Revised Codex General Standard for irradiated Foods In: **Codex Alimentarius Commission**. Rome, 2003 (CODEX STAN 106-1983). Disponível em:< **ftp://ftp.fao.org/codex/standard/en/CXS_106e_1.pdf.**> Acesso em 26 Nov. 2004.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Avaliação de cultivares de soja quanto aos teores de isoflavonoídes. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v. 31, n. 10, p. 691-698, 1996.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.

CDTN - Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear. **CDTN, FUNED e UFMG pesquisam irradiação de alimentos**. 2005. Disponível em <http://www.cdtn.br> Acesso em: 01 Abr. 2005.

CHANG, S. K. C.; LIU, Z. S.; HOU, H. J.; WILSON, L. A. Influence of storage on the characteristics of soybean, soymilk and tofu. In: VII World Soybean Research Conference/ IV International Soybean Processing and Utilization Conference/ III Congresso Brasileiro de Soja, Foz do Iguaçu. **Anais**. Londrina: Embrapa, 2004, p. 977-983.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D.. Aminoácidos, péptidos y proteínas. In: FENNEMA, O. R. (Ed). **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. Cap. 5, p.275-414.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β-conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 3, p. 574-578, 1995.

CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **CRC Critical Review in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 13, n. 4, p. 297-335, 1980.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**, Lavras: FAEPE, 1990, 293 p.

CHOI, J. S. C.; KWON, T. W.; KIM, J. S. Isoflavone contents in some varieties of soybean. **Foods and Biotechonology**, Seoul v. 5, n. 2, p. 167-169, 1996.

CHUNPING, D.; TRUONG, T. B.; YUTAKA, H. Change of storage protein in soybean during storage for long time. In: THE THIRD INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE (ISPUC-III). Tsukuba. **Anais**. Tsukuba, 2000, p. 159-160.

CIÉSLA, K.; ROOS, Y.; GLUSZEWSKI, W. Denaturation processes in gamma irradiated proteins studied by differential scanning calorimetry. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 233-243, 2000.

CLARK, A. H.; LEE-TUFFNEL, C. D. Gelation of globular proteins. In: MITCHELL, J. R.; LEDWARD, D. A. **Functional properties of food macromolecules**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986, p. 203-272

CLATTERBUCK, K. L.; KEHRBERG, N. L.; MARABLE, N. L. Solubility and in vitro digestibility of soy flours, concentrates and isolates. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 45, n. 5, p. 931-935,1980.

COCKRAN, W. G., COX, G. M. **Experimental design.** 2 ed. New York: John Wiley, 1957. 611 p.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em:<http://www.conab.gov.br> Acesso em: 08 Abr. 2006

CURT, C. Revue: méthodes d'évaluation de la stabilité des émulsions. Principe, applications, avantages et incovénients. **Sciences des Aliments**, Lassay-Les-Chateaux, v. 14, n. 6, p. 699-724, 1994.

D'ARCE, M.A.B. R. Pós colheita e armazenamento de grãos. In: **Tecnologia de Produtos Agropecuários II**. Piracicaba, 2002, 17 p.

DAMODARAN, S.; KINSELLA, J. E. Effect of conglycinin on the thermal aggregation of glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, n. 5, p. 812-817, 1982.

DAMODARAN, S. Interrelationships of molecular and functional propeties of food proteins. In: KINSELLA, J. E.; SOUCIE, W. G. (Ed.). **Food Proteins**. New York, Marcel Dekker, 1989, p. 21-51.

DAMODARAM, S. Functional Properties. In: NAKAI, S.; MODLER, H. W. (Ed). **Food Proteins properties and characterization**, New York, Marcel Dekker 1996, 544p.

DAMODARAN, S. Food proteins: An overview. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Ed). **Food proteins and their applications**. New York, Marcel Dekker, Inc. 1997. Cap. 1, p. 1-24.

DAS, K. P.; KINSELLA, J. E. Effect of heat denaturation on the adsorption of beta lactoglobulin at the oil-water interface and on coalescence stability of emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 139, n. 2, p. 551-560, 1990.

DE KANTEREWICZ, R. J.; ELIZALDE, B. E.; PILOSOF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Water-oil absorption index (WOAI): A simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 52, n. 5, p. 1381-1383, 1987.

DEL MASTRO, N. L. Development of food irradiation in Brazil. **Progress in nuclear energy**, Great Britain, v. 35, n. 3-4, p. 229-248, 1999.

DELINCÉE, H.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J. Protein quality of irradiated Brazilian beans. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 52, n. 1/6, p. 43-47, 1998.

DELINCÉE, H.; SOIKA, C.; HORVATOVICH, P.; RECHKEMMER, G.; MARCHIONI, E. Genotoxicity of 2-alkylcyclobutanones, markes for na irradiation treatment in fat-containing foo-Part I: cyto-ande genotoxic potential of 2-tetradecylcyclobutanone. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 3-6, p. 431-435, 2002.

DIEHL, J. F. **Safety of irradiated foods**. New York: Marcel Deckker, 1995, 454p.

DHINGRA, O. D.; ACUÑA, R. S. **Patologia de semente de soja**. Viçosa: Ed. UFV, 1997. 119 p.

DOGBEVI, M. K.; VACHON, C.; LACROIX, M. Effect of gamma irradiation on the microbiological quality and on the functional properties of proteins in dry red Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 57, n. 3-6, p. 265-268, 2000.

DOI, E. Gels and gelling of globular-proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Cambrigde, v. 4, n. 1, p. 1-5, 1993.

DOMINGUES, B. M.; GÓMEZ, M. V. I.; LEÓN, F. R. Ácido fítico: aspectos nutricionais e implicaciones analíticas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricíon**, Caracas, v. 52, n. 3, p. 219-231, 2002.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 380-386, 1999.

ELIZALDE, B. E.; BARTHOLOMAI, G. B.; PILOSOF, A. M. R. The effect of pH on the relationship between hydrophilic/lipophilic characteristics and emulsification properties of soy proteins. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, London, v. 29, n. 4, p.334-339, 1996

ELIZALDE, B. E.; KANTEREWICZ, R. J. G. B.; PILOSOF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Physicochemical properties of food proteins related to their ability to stabilize oil in water emulsions. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 53, p. 845-849, 1988.

EMBRARAD, 2005. Disponível em:<http://www.embrarad.com.br/alimentos.> Acesso em: 02 Jun.. 2005.

ENGLARD, S.; SEIFFER, S. Precipitation techniques. In: **Methods in enzymology**. Vol. 182. Guide to protein purification: ed. M. P. Deutscher, Academic Press Inc., New York. Sección VI, 22, p. 285-300, 1990.

FARKAS, J. **Irradiation of dry food ingredients**. Boca Raton:CRC Press, 1988, 153 p.

FENEMA, O. R. **Introducion a la ciencia dos alimentos**. Barcelona: Reverté, 1989, 445p.

FIORA, F. A.; PILOSOF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Physicochemical properties of soybean proteins related to flow, viscoelastic, mechanical and water-holding characteristics of gels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 133-136, 1990.

FUKUSHIMA, D. Recent progress on biotechnology of soybean proteins and soybean protein food products. **Journal Food Biotechnology**, Connecticut, v. 8, n. 2-3, p. 83-135, 1991.

FURUKAWA, T.; OTHA, S. Mechanical and water-holding properties of heat-induced soy proteins gels as related to their structural aspects. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v. 13, n. 1, p. 59-69, 1982.

FURUKAWA, T.; OTHA, S. Solubility of isolated soy protein in ionic environments and an approach to improve its profile. **Agricultural Biology Chemistry**, Tokyo, v. 47, n., p. 751-755, 1983.

FURUKAWA, T.; OHTA, S.; YAMAMOTO, A. Texture-structure relationships in heat-induced soy protein gels. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v. 10, n. 1, p. 333-346, 1979.

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

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

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 86-93, 2001.

GENOVESE, M. I.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties. **Food Science and Technology International**, London, v. 11, n. 3, p. 205-2111, 2003.

GINSBURG, J.; PRELEVIC; G. M Lack of significant hormonal effects and controlled trials of phyto-oestrogens. **The Lancet,** New York, n. 355, p. 163-164, 2000

GRYNSPAN, F.; CHERYAN, M. Phytate-calcium interactions with soy protein. **Journal of the Americam Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 66, n. 1, p. 93-97, 1989.

GROLICHOVÁ, M., DVORAK, P., MUSILOVA, H. Employing ionizing radiation to enhance food safety- a Review. **Acta Veterinaria Brunensis**. v. 73, n. 1, p.143-149, 2004. Disponível em <http://www.vfucz/acta-vet/vol73/73-143.pdf > Acesso em : 02 Jan. 2005.

HACKWOOD, S. An introduction to the irradiation processing of food. In: THORNE, S. **Food irradiation**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1991, p.1-18.

HAFEZ, Y. S.; MOHAMED, A. I.; SINGH, G.; HEWEDY, F. M. Effect of gamma irradiation on protein and fatty acids of soybean**. Journal of Food Science,** Chicago, v. 50, n. 5, p. 1271-1274, 1985.

HAFEZ, Y. S.; MOHAMED, A. I.; PERERA, P. A.; SINGH, G.; HUSSEIN, A. S. Effects of microwave heating and gamma irradiation on phytate and phospholipid contents of soybean (*Glycine max. L.*). **Journal of Food Science,** Chicago, v. 54, n.4, p. 958-962, 1989.

HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 43, n. 2, p. 556-559, 1978.

HANDA, A.; TAKAHASHI, N.K.; FRONING, G.W. Heat-induced egg white gels as affected by pH. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 63, n. 3, p. 403-407, 1998.

HASSELMANN;C.; MARCHIONI, E. Physicochemical methods for the detection of food irradiation. In: STUART THORNE (Ed.) **Food Irradiation**. London:Elsevier, 1991, p.129-168.

HAYASHI, T. Comparative effectiveness of gama-rays and electron beams in food irradiation. In: STUART THORNE (Ed.) **Food Irradiation**. London:Elsevier, 1991, p.169-206.

HAYES, R. E.; BOOKWALTER, G. N.; BAGLEY, E. B. Antioxidant Activity of soybean flour and derivatives- A Review. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, n.6, p.1527-1532, 1977.

HERMANSSON, A. M. Soy protein gelation. **Journal of the Americam Oil Chemists' Society**, Champaign, v.63, n.5, p. 658-666, 1986.

HERNANDES, N. K.; VITAL, H. C.; SABAA-SRUR, A. U. O. Irradiação de Alimentos: Vantagens e Limitações. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 154-159, 2003.

HILL, S. E. Emulsions. In: HALL, G. M. (Ed). **Methods of testing protein functionality**, London: Chapman & Hall. 1996. Cap 6, p. 153-185.

HOSHI, Y.; YAMAUCHI, F.; SHIBASAKI, K. Effects of relative humidity on aggregation of soybean 7S and 11S globulins. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.46, p.1513-1517, 1982.

HOU, H.J.; CHANG, K.C. Yield and quality of soft tofu as affected by soybean physical damage and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n. 12, p. 4798-4805, 1998.

HOU, H.J.; CHANG, K.C. Interconversions of isoflavones in soybeans as affected by storage. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 67, n. 6, p. 2083-2089, 2002.

HOU, H.J.; CHANG, K.C. Yield and textural properties of tofu as affected by the changes of phytate content during soybean storage. **Journal of Food Science,** Chicago**,** v. 68, n. 4, p. 1185-1191, 2003.

HOU, D.H.J.; CHANG, K.C. Structural characteristics of purified glycinin from soybeans stored under various conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington , v. 52, n. 12, p. 3792-3800, 2004.

IAEA. International Atomic Energy Agengy. Disponível em: <http://www.iaea.or.at/wordatom>. Acesso em: 06 out. 2004.

IYER, V; SALUNKHE, D. K.; SATE, S. K.; ROCKLAND, L. B. Quick-cooking beans (*Phaseolus Vulgaris L.*) I Investigations on quality. **Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition,** Netherlands, v. 30, n.1, p. 27-43,1980

IWABUCHI, S. YAMAUCHI, F. Determination of Glycinin and β-Conglycinin in soybean proteins by immunological methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 35, n. 2, p. 200-205, 1987.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 51, n. 3, p. 376-382, 1974.

KANG, II. J.; MATSUMURA, Y.; MORI, T. Characterization of texture and mechanical properties of heat-induced soy protein gels. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 68, n. 5, p. 339-345, 1991.

KALAPATHY, U.; HETTIARACHCHY, N. S.; RHEE, K. C. Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign v. 74, n. 3, p. 195-199, 1997.

KILARA, A.; SHARKASI, T. Y. Effects of temperature on food proteins and its implications on functional properties. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.23, n.4, p. 323-395, 1986.

KILARA, A.; HARWALKAR, V.R. Denaturation. In Nakai, S. and Modler, H.W (Ed.) **Food Proteins: Properties and Characterization**. New York: VCH Publishers, 1996. p. 71-165.

KILCAST, D. Effect of irradiation on vitamins. **Food Chemistry**, Great Britain, v. 49, n. 2, p. 157-164, 1994.

KELLOR, R.L. Deffatted soy flour and grits. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 51, n. 1, p. 77A-80A, 1974.

KINSELLA, J. E. Functional properties in foods: A survey. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton , v. 7, n. 3, p. 219-280, 1976.

KINSELLA, J.E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the Americam Oil Chemists Society**. Champaign, v. 56 , n. 3, p. 242-25, 1979.

KINSELLA, J.E. Milk proteins: physical and functional properties. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton v. 21, n. 3, p. 197-262, 1984.

KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D. M. **Protein in Whey: Chemical, Physical and Functional Properties**. In: Advances in Food and Nutrition Research (Kinsella, J. E. ed), p. 343-438, Academic Press, 1989

KIM, H.; PETERSON, T. G.; BARNES, S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling

pathways. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6, p.1418S-1425S, Suppl. S, 1998.

KIM, J.H.; AHN, H. J.;KIM, D. H.; JO., C., YOOK, H.S., H.J. PARK, BYUN, M.W. Irradiation effects on biogenic amines in korean fermented soybean paste during fermentation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 1, p. 80-84, 2003.

KIM, J.J.; KIM, S. H.; HAHN, S, J.; CHUNG, I. M. Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. **Food Research International**, Amsterdam, v. 38, n. 4, p. 435-444, 2005.

KLEMASZEWSKI, J.L.; HAQUE, Z.; KINSELLA, J. E. An Electronic Imaging system for determining droplet size and dynamic breakdown of protein stabilized emulsions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, n. 2, p. 440-445,1989.

KLEMASZEWSKI, J.L.; DAS, K. P.; KINSELLA, J. E. Formation and coalescence stability of emulsions stabilized by different milk proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 2, p. 100-107, 1992.

KOSHIYAMA, I Chemical and physical properties of a 7S protein in soybean globulins. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 45, n. 5, p. 394-404, 1968.

KOSHIYAMA, I. Newer method for isolation of 7S globulin in soybean seeds. **Agricultural and biological Chemistry**, Tokyo, v. 36, n. 12, p.2255-2257, 1972.

KOSHIYAMA, I. Storage proteins of soybean. In : GOTTSCHALK, W. ; MULLER, H. P. **Seed proteins biochemistry, genetics, nutritive value**. The Hague: Martinus Nijhoff/Dr. W.Junk Publisher, 1983, p.427-450.

KOSHIYAMA, I.; FUKUSHIMA, D. Comparison of conformations of 7S and 11S soybean globulins by optical-rotatory dispersion and circular-dichroism studies. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 50, n. 1, p. 114-121, 1973.

KOVÁCS, E. LAM, N. D.; BECEZNER, J.; KISS, I. Effect of irradiation and dielectric heating on soybean ultrstructure, trpsin inhibitor, and lipoxygenase activities. **Food Structure**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 217-227, 1991.

LACROIX, M.; LE, T. C.; QUATTARA, B.; YU, H.; LETENDRE, M.; SABATO, S. F.; MATEESCU, M. A.; PATTERSON, G. Use of gamma irradiation to produce films from whey, casein and soya proteins: structure and functionals characteristics. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 3-6 p. 827-832, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, n. 227, p. 680-685, 1970.

LAGUNAS-SOLAR, M.C. Radiation Processing of foods: An overview of scientific principles and current status**. Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 2, p.186-192, 1995.

LAKEMOND, C. M. M.; DE JONGH, H. H. J.; HESSING, M.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A. G. J. Soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure

at ambient temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 6, p. 1985-1990, 2000.

LAMBRECHT, H. S.; NIELSEN, S. S.; LISKA, B. J.; NIELSEN, N. C. Effect of soybean storage on tofu and soymilk production. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v. 19, n. 3, p. 189-202, 1996.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 6, p. 1313-1315, 1980.

LEE, S. J.; AHN, K.; KIM, S. H., KIM, J. T., HAN, S. J., JUNG, M. Y.; CHUNG, I. M. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 11, p. 3382-3389, 2003.

LE TELLIER, P. R.; NAWAR, W. W. 2-Alkylcyclobutanones from the radiolysis of triglycerides. **Lipids**, Champaign, v. 7, n.1, p. 75-76, 1972.

LI-CHAN, E.; NAKAI, S.; WOOD, D. F. Hydrophobicity and solubility of meat peoteins and their relationship to emulsifying properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 345-350, 1984.

LIENER, I. E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. **Journal of the American Oil chemists Society**, Champaign, v. 58, n. 3, p. 406- 415, 1981.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **CRC Critical Review of Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.

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

LORINI, I. **Como manejar as pragas de grãos armazenados**. Disponível em:<http://www.snagricultura.org.br/artec-armazem.htm>. Acesso em:02 Abr. 2004.

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

LYN, K. R.; RAOULT, A. P. D. Irradiation of lima bean protease inhibitor in dilute aqueous solutions. **Radiation Research**, Washington, v. 65, n. 1, p. 41-49, 1976.

MARCONE, M. F.; KAKUDA, Y.; YADA, R. Y. Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. **Food Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 265-274, 1998.

MARCHIONI, E.; RAUL, F.; BURNOUF, D.; MIESCH, M.; DELINCCÉ, H.; HARTWIG, A.; WERNER, D. Toxicological study on 2-alkylcyclobutanones-results of a collaborative study. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 71, n. 1-2, p. 145-148, 2004.

MCNEAL, T. P.; NYMAN, P.J.; DIACHENKO, G. W.; HOLLIIFIELD, H. C. Survey of benzene in foods by using headspace concentration techniques and capillary gas chromatography**. Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 76, n. 6, p. 1213-1219, 1993.

MERRITT, C. Quantitative and qualitative aspects of trace volatile components in irradiated foods and food substances. **Radiation Research Review**, Amsterdam, v. 3, n. 4, p. 353-368, 1972.

MESSINA, M.; BARNES, S. The role of soy products in reducing risk of cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 38, n. 8, p. 541-546, 1991.

MOLINA, E.; PAPADOPOULOU, A.; LEDWARD, D. A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. **Food Hydrocolloids**, Netherlands, v. 15, n. 3, p. 263-269, 2001.

MORI, T.; NAKAMURA, T.; UTSUMI, S. Behavior of intermolecular bond formation in the large stage of heat induced gelation of glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 34, n. 1, p. 33-36, 1986.

MORR, C. V., GERMAN, B., KINSELLA, J. E., REGENSTEINS, J. M., VAN BUREN, J. M., KILARA, A., LEWIS, B. A., MANGINO, M. E., A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

MORR, C. V.; HA, Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

MURRAY, E. D.; ARNTFIELD, S. D.; ISMOND, M. A. H. The influence of processing parameters on food protein funcionality II. Factors affecting thermal properties as analyzed by differencial scanning calorimetry. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, Ottawa, v. 18, n. 2, p. 158-162, 1985.

NAKAI, S. Structure function relationship of food protein with emphasis on the importance of protein hydrophobicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 31, n. 1, p. 672-678, 1983.

NARAYAN, R.; CHANHAN, G. S.; VERMA, N.S. Changes in the quality of soybean during storage. Part 1- Effect of storage on some physico-chemical properties of soybean. **Food Chemistry,** Oxford, v. 27, n. 1, p. 13-23, 1988.

NDIAYE, B.; JAMET, G.; MIESCH, M.; HASSELMANN, C.; MARCHIONI, E. 2-Alkylcyclobutanones as markes for irradiated foodstuffs II. The CEN (Europen Committe for Standardization) method: field of aplication and limit of utilization. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 437-445, 1999.

NIELSEN, N. C. Structure of soy proteins. In: ALTTSCHUL, A. M.; WILCKE, H. L. **New proteins foods, vol. 5. Seed storage proteins**. Orlando: Academic Press, 1985, p. 27-64.

NIO, N.; MOTOKI, M.; TAKINAMI, M. gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. **Agricultural and biological Chemistry**, Tokyo, v. 49, n. 8, p. 2283-2286, 1985.

NISIZAWA, M. Studies on irradiation of agar agar in the solid-state - on the changes of water holding capacity of agar agar hydrogel produced by irradiation. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 36, n. 7, p. 1673-1676, 1988.

NONAKA, M.; SAKAMOTO, H.; TOIGUCHI, S.; KAWAJIRI, H.; SOEDA, T.; MOTOKI, M. Sodium caseinate and skin milk gels formed by incubation with microbial transglutaminase. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 5, p. 1214-1218, 1992.

NONAKA, M.; TOIGUCHI, S.; SAKAMOTO, H.; KAWAJIRI, H.; SOEDA, T. Changes caused by transglutaminase on physical properties of thermally induced soy protein gels. **Food Hydrocolloids**, Netherlands, v. 8, n. 1, p. 1-8, 1994.

OAKENFULL, D. Gelling agents. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 26, n. 1, p. 1-25, 1987.

OKADA, M. Produção e Aplicação de proteína isolada de soja. In: SIMPÓSIO ALIMENTOS FUNCIONAIS PARA O NOVO MILÊNIO QUALIDADE E SAÚDE, 2000, Campinas. **Anais**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2000: 24 p.

OLIVEIRA, L. C. Present situation of food irradiation in South America and the regulatory perspectives for Brazil**. Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 57, n. 3/6, p. 249-252, 2000.

OLLIS, D.; WHITE, S. Protein crystallization. In: DEUTSCHER, M.P., **Methods in enzymology**. Volume 182. Guide to protein purification. New York: Academic Press Inc.,1990, p 646-659.

OOMAH, B. D.; VOLDENG, H.; FREGEAU-REID, J.A. Characterization of soybean proteins by HPLC. **Plants Foods for Human Nutrition,** The Netherlands, v. 45, p. 251-263, 1994.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 7, n. 4, p. 120-124, 1996.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 3, p. 716-723, 1978.

PENG, I. C.; QUASS, D. W.; DAYTON, W. R.; ALLEN, C. E. The physicochemical and functional properties of soybean 11S globulin-A Review. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 61, n. 6, p. 480-490, 1984.

PERKINS, E. G. Composição da soja e de produtos da soja. In: ERICKSON D.R. (Ed.) **Manual prático de processamento e utilização da soja**. Champaign: AOCS Press and United Soybean Board, 1995, p.9-28.

PETRUCCELLI, S.; ÃNÓN, M. C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 10, p. 2161-2169, 1994.

PETRUCCELLI, S.; ÃNÓN, M. C. Thermal aggregation of soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 12, p. 3035-3041, 1995.

PHILLIPS, M. C. Protein Conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. **Food Technology**, Chicago, v. 35, n.1, p. 50-57, 1981.

PILOSOF, A. M. R. Gelification. In: PILOSOF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. (EGS). **Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas**. Buenos Aires: Eudeba, 2000. Cap. 4, p. 75-94.

POPINIGIS, F. **Qualidade fisiológica de sementes**. Semente (1). Brasília: AGIPLAN, 1975, p. 65-80.

POTTER, S. M.; BAUNG, J. A.; TENG, H.; STILLMAN, R.J.; SHAY, N.F.; ERDWAN, J.W. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6, p. 1375S-1379S, Suppl. S, 1998.

PRAT, D. A.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, n. 6, p. 1720-1722, 1979.

PUPPO, M. C.; AÑÓN, M. C. Soybean protein dispersions at acid pH. Thermal and rheological properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 1, p. 50-56, 1999.

QI, M.; HETTIARACHCHY, N.S.; KALAPATHY, U. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 6, p. 1110-1115, 1997.

RAHMA, E. H.; MOSTAFA, M. M. Functional properties of peanut flour as affected by different heat treatments. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 25, n. 1 p. 11-15, 1988.

RAO, V. S.; VAKIL, V. K. Effects of gamma irradiation on flatulence-causing oligosaccharides in green grown (phaseolus, aureus). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n. 6, p. 1791-1795, 1983.

RELA, P. R. **Desenvolvimento de dispositivo de irradiação para tratamento de efluentes industriais com feixe de elétrons**. São Paulo, 2003. 131p. Tese de Doutorado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.

RENKEMA, J. M. S.; LAKEMOND, C. M. M.; JONGH, H. H. J. GRUPPEN, H.; VLIET, T. V. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. **Journal of Biotechnology**, Washington, v. 79, p. 223-230, 2000.

RIOS, A. O.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D. Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, (supl.), p. 39-45, 2003.

RITTER, M. A.; MOOR, C. V.; THOMAS, R. L. *In vitro* digestibillity of phytate-reduced and phenolics-reduced soy proteins isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.2, p.325-327, 341, 1987.

ROCHA, V. S.; OLIVEIRA, A. B.; SEDIYAMA, T.; GOMES, J. L. L.; SEDIYAMA, C. S.; PEREIRA, M. G. **A qualidade da semente de soja**. Viçosa: Ed. UFV, 1996, 76p.

ROSENTHAL, A. J. Relation between instrumental and sensory measures of food texture**.** **In: Food texture Measurement and Perception** 1 ed. Gaithersburg: Aspen publishers, 1999. Cap. 1, p. 1-17.

RUEDELL, J. Cultivo da soja no Brasil. Evolução e inquietação do mercado no que se refere a tecnologias genéticas e certificação. **Evangelische Akademie Loccum**, v. 21, n. 23, 2001.

RUIZ, S. Irradiação de Alimentos. **Alimentos & Tecnologia**, São Paulo, v.87, p. 34-36, 2000.

SABINO, C. V. S. **Irradiação de Alimentos; uma perspectiva de vida para os químicos.** Disponível em: <http://usuários.cultura.com.br/rezendaf/diversos/esterização.htm> Acesso em: 02 Abr. 2004.

SAIO, K.; NIKKUNI, I.; ANDO, Y.; OTSURU, M.; TERAUCHI, Y.; KITO, M. Soybean quality changes during model storage studies. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.57, n. 2, p. 77-82, 1980.

SANTIAGO, L. G.; BONALDO, A. G.; GONZÁLEZ, R. J. Influence of salt level and pH on the stability of oil-in-water emulsions containing untreated heat and reduced treated soy protein isolate as emulsifier. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n. 2, p.179-186, 2004.

SANTOS, L. C.; COSTA, S. I.; ARCKOOL, D. B.; VITALI, A. A. Produção de concentrado e isolados protéicos de soja. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 9, p. 85-103, 1978.

SAPTCHENCO, N. As Tecnologias de Feixe de Életrons e Raios-X da Surebeam In: 1º SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS, 2003, Campinas. **Anais**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2003. p. 58-70.

SATTAR; A.; NEELOFAR, AKHTAR, M. A. Irradiation and germination effects on phytate, protein and amino acids of soybean **Plants Food for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 40, n. 3, p. 185-194,1990.

SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6, p.1333S-1346S, 1998.

SETCHELL, K. D. R., BROW, N. M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B. E.; BRASHEAR, W. T.; KIRSCHNER, A. S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J. E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, n. 4, p.1362S-1375S, 2001.

SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Texture characteristics, protein solubility and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 5, p. 1018-1025, 1988.

SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 37, n. 1, p. 161-168, 1989.

SHIMADA, K.; MATSUSHITA, S. Gel formation of soybean 7S and 11S proteins. **Agriculture and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 44, p. 637-641, 1980.

SIDDHURAJU, P.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The effect of ionising radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. **Food Chemistry,** Oxford v. 78, n. 2, p.187-205, 2002.

SIMIC, M.G. Radiation chemistry of water-soluble food components. In: JOSEPHSON, E. S., PETERSON, M.S..(Ed. CRC Press), **Preservation of food by ionizing radiation**. Boca Raton, 1983, v. 2, p. 2-70.

SMITH, J. S.; PILLAI, S. Irradiation and food safey. **Food Technology**, Chicago, v. 58, n. 11, p. 22, 2004.

SINGH, H. Modification of food protein by covalent crosslinking. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 2, n. 8, p. 196-200, 1991.

SINGH, M.; SINGH, D.; CHAUHAN, G. S. Effects of defatting, coagulants and coagulation pHs on soy protein isolates. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 31, n. 6, p. 117-121, 1994.

SOMMERS, C. H.; SCHIESTI, R. H. 2-Dodecylcyclobutanone does not induce mutations in the *Salmonella* mutagenicity test or intrachromosomal recombinations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 6, p. 1293-1298, 2004.

SONG, T.T BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P.A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6, 1474S-1479S, 1998.

SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R.; ARESSE, E.; AÑÓN, M. C. Water imbibing capacity of soy protein isolates: influence of protein denaturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 8, p. 1386-1391, 1991.

STASWICK, P.E.; HERMODSON, M. A.; NIELSEN, N. C. Identification of the cystines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 259, n. 21, p. 3431-3435, 1984.

TEIXEIRA, C. G. **A soja na alimentação humana.** Disponível em:<http://www.vegetarianismo.com.br/soja1.html>. Acesso em: 15 Jan. 2004.

THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of β-conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 3, p. 692-695, 1978.

THOMAS, M. H.; ATWOOD, B. M.; WIERBIEKI, E.; TAUB, I. A. Effect of radiation and conventional processing on the thiamin content of pork. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, n. 3, p. 824-828, 1981.

THOMAS, R.; MAN, J. M.; MAN, L. Soybean and Tofu properties as influenced by soybean storage conditions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 66, n. 6, p. 777-782, 1989.

TOLEDO, J., F., F. Conferência Mundial de Pesquisa da soja no brasil. **Revista Agrosoft**, Juiz de Fora, v.7. Disponível em: <http://www.agrosoft.com.br/revista/> Acesso em 16 Fev. 2004.

TOSS, D.M.; CORREA, G. L. **Irradiador gama**. Disponível em <http://www.inin.mx/dinvtx/irradiador_gamma/irradiador_gamma.htm> Acesso em:30 Jan. 2004.

URBAIN, W. M. (Ed.). **Food Irradiation.** Food Science and Technology-A series of monographs. Florida: Academic Press Inc., 1986, 351p.

UTSUMI, S.; KINSELA, J. E. Forces involved in soy protein gelation: effects of reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S and soy isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 3, p. 1278-1282, 1985 a.

UTSUMI, S.; KINSELA, J. E. Structure-function relationships in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S and soy isolate proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 33, n. 2, p. 297-303, 1985 b.

VARYAR, P. S; LIMAYE, A.; SHARMA, A. Radiation –Induced enhancement of antioxidant contents of soybean (*Glycine max Merril*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 11, p. 3385-3388, 2004.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCÉE, H.; BOGNÁR, A. Effect of gamma irradiation on the thiamine, riflavin and vitamin B_6 content in two varieties of Brazilian beans. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 57, n. 3/6, p.299-303, 2000a.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCÉE, H.; GREINER, R. Effect of irradiation on anti-nutrients (total phenolics, tannins and phytate) in Brazilian beans. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 57, n. 3/6, p. 289-293, 2000 b.

VISSER, A.; THOMAS, A. Review: soya protein products-their processing, functionality and application aspects. **Food Review International**, Washington, v. 3, n.1 p. 1-32, 1987.

VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G. M. (Ed.). **Methods of testing protein functionality**. London: Chapman & Hall, 1996, p.11-61.

VOUTSINAS, L. P.; NAKAI, S.; HARWALKAR, V. R. Relationships between protein hydrophobicity and thermal functional properties of food proteins. **Canadian Institute Food Science and Technology,** Ottawa, v. 16, n. 3, p. 185-190, 1983.

WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 3, p. 765-770, 1990.

WAGNER, J. R. Propiedades superficiales. In: PILOSOF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. (EGS). **Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas**. Buenos Aires: Eudeba, 2000. Cap. 3, p. 41-47.

WALSTRA, P. J.; OORTWING, H. Estimating globule-size distribution of oil-in-water emulsions by Coulter Counter. **Journal of Colloid and Interface Science,** San Diego, v. 9, n. 3, p. 263-270, 1969.

WANG, C. H.; DAMODARAN, S. Thermal gelation of globular proteins: weight-average molecular weight dependence of gel strength. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 11, p. 1157-1164, 1990.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iwoa: effects of variety, crop, year and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 8, p. 1674-1677, 1994.

WANG, C.; MA, Q.; PAGADALA, S.; SHERRARD, M. S.; KRISHNAN, P.G. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 75, n. 3, p. 337-341, 1998.

WEST, C. E.; BEYNEN, A. C.; SCHOLZ, K. E; TERPSTRA, A. H. M.; SCHUTTE, J. B.; DEURING, K.; VANGILS, L. G. M. Treatment of dietary casein with formaldehyde reduces its hypercholesterolemic effect in rabbits. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.114, n.1, p.17-25, 1984.

WIENDL, F. M. A salubridade dos alimentos irradiados**. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v.18, n. 1, p. 48-56, 1984.

WOLF, W. J. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 18, n. 6, p. 969-976, 1970.

WOLF, W. J.; COWAN, J. C. **Soybean as food source food uses of soybean proteins**. Ed. Revisada. Cleveland: CRC Press, INC, 1975.101p.

WOLF, W. J. **Soybean**: Chemistry and technology. vol.1 Proteins. AVI Publishig. Co., Westport, CT, p. 93, 1978.

WONG, P. Y. Y.; KITTS, D. D. A comparison of the buttermilk solids functional properties to nonfat dried milk, soy protein isolate, dried egg white and egg yolk powders. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 3, p. 746-754, 2003.

WORCMAN-BARNINKA, D.; LANGRAF, M. Irradiação de carnes. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n.1, p. 22-27, 2003.

YAMAUCHI, F; SATO, M.; SATO, W.; KAMATA, Y.; SHIBASAKI, K. Isolation and idenfication of new type of β-conglicinin in soybean globulins. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, n. 12., p. 2863-2869, 1981.

YAMAUCHI, F.; OGAWA, Y.; KAMATA, Y.; SHIBASAKI, K. Emulsifying properties of soybean β-conglycinin and glycinin: evaluation by turbidimetry. **Agriculture Biology Chemistry**, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 615-621, 1982

YANG, J. S. Effects of gamma irradiation on the flavor composition of food commodities. **Process-Induced Chemical Changes in Food Advances in Experimental Medicine and Biology,** New York, v. 434, p. 277-284, 1998.

YAO, J. J.; TANTEERATARM, T.; WEI, L. S. Effects of maturation and storage on solubility, emulsion stability and gelation properties of isolated soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 67, n. 12, p. 974-979, 1990.

YOUNG, V. R. Soy protein in relation human protein and amino acid nutrition. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 91, n. 7, p. 828-823, 1991.

ZARKADAS, C. G.; YU, Z.; VOLDENG, H. D.; HOPE, H. J.; AMADOR, M. A.; ROCHEMONT, J. A. Comparison of the protein-bound and free amino acid contents of two northern adapted soybean cultivars, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 1, p. 21-26, 1994.

ZEB, A.; TAUFIQ, A. The high dose irradiation affect the quality parameters of edible oils. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.7, n.6, p. 943-946, 2004. Disponível em: < www.ansinet.org/detail_issue.php> Acesso em: 20 Abr. 2005.