República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(11) **PI9815832-5 B1**

BRPI9815832B1

(22) Data de Depósito: 15/07/1998
(45) Data da Concessão: 14/12/2010
(RPI 2084)

(51) Int.Cl.:
A23J 3/16
A23L 1/305
A23L 1/314
A23C 19/055
A23C 9/13
A23L 2/66

(54) Título: **PROCESSO PARA FORMAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNA VEGETAL CONTENDO UM MATERIAL DE PROTEÍNA VEGETAL EXAURIDO DE ISOFLAVONA COM UM MATERIAL CONTENDO ISOFLAVONA.**

(30) Prioridade Unionista: 15/03/1998 US 09/044.961

(73) Titular(es): Archer-Daniels-Midland Company, Protein Technologies International, Inc., Solae, LLC

(72) Inventor(es): Doyle H. Waggle, James L. Holbrook

"PROCESSO PARA FORMAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNA VEGETAL CONTENDO UM MATERIAL DE PROTEÍNA VEGETAL EXAURIDO DE ISOFLAVONA COM UM MATERIAL CONTENDO ISOFLAVONA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a composições de proteína vegetal contendo isoflavonas e, especificamente, a composições de proteína vegetal contendo um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona com um material contendo isoflavona disperso, e processos para produção das mesmas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Materiais vegetais que contém proteína são comercialmente processados para produzir materiais de proteína vegetal, tais como, concentrados de proteína vegetal e isolados de proteína vegetal. Materiais de proteína vegetal comumente produzidos incluem concentrados de proteína de soja, isolados de proteína de soja, materiais de proteína de ervilha e materiais de proteína derivados de legumes. Materiais de proteína vegetal são amplamente usados na indústria alimentícia como ingredientes de enriquecimento de proteínas ou como ingredientes funcionais em uma ampla variedade de alimentos. Por exemplo, materiais de proteína vegetal são usados em produtos alimentícios, tais como, carnes, bebidas nutricionais, sopas, queijos, produtos de panificação e iogurtes.

Diversas variedades de materiais vegetais contendo proteína também contém isoflavonas fitoestrogênicas em seu estado nativo, não processado. Isoflavonas são compostos fe-

nólicos que ocorrem naturalmente em vários tipos de plantas que servem para ajudar na fixação de nitrogênio nos sistemas de raízes de certas plantas, e para atuar como um protetor natural contra parasitas.

Na produção de materiais de proteína vegetal, tais como concentrados de proteína vegetal e isolados de proteína vegetal para uso em alimentos, o objetivo é obter um material que seja compreendido, primariamente de proteína. Na produção de materiais de proteína vegetal a partir de materiais vegetais contendo proteína e isoflavonas, uma porção substancial de isoflavonas é separada da proteína vegetal, resultando em um material rico em proteínas que foi exaurido de isoflavona. Por exemplo, concentrados de proteína vegetal são formados por lavagem de um material vegetal com um álcool aquoso ou uma solução ácida aquosa possuindo um pH ao redor do ponto isoelétrico da proteína. Vide, por exemplo, Soy Protein Products, Characteristics, Nutricional Aspects, And Utilization, páginas 3-6 (Pub. Soy Protein Council, 1987). O ácido aquoso ou lavagem com álcool remove materiais solúveis na lavagem, incluindo uma porção substancial das isoflavonas e carboidratos no material vegetal, alguma proteína e outros materiais insolúveis, tais como, materiais de fibra vegetal, deixando um material concentrado em proteínas que contém de 65% à 90% em peso de proteína, porém que é significativamente reduzido em concentração de isoflavona.

Isolados de proteína são formados por extração do material vegetal contendo proteína com água ou uma solução alcalina aquosa para solubilizar proteína e outros materiais

solúveis na solução aquosa, tais como, carboidratos e isoflavonas. O extrato contendo proteína solubilizada é separado do material de fibra vegetal insolúvel e, então, o pH do extrato é ajustado ao redor do ponto isoelétrico da proteína para precipitar a proteína. A proteína é então separada do extrato e dos materiais ainda solúveis no extrato, incluindo uma porção substancial de isoflavonas, para formar um material isolado de proteína contendo 90% ou mais em peso de proteína. O isolado de proteína é lavado com água para remover, adicionalmente, materiais solúveis em água a partir da proteína. Vide, por exemplo, Soy Protein Products, Characteristics, Nutricional Aspects, And Utilization, páginas 3-6 (Pub. Soy Protein Council, 1987). O isolado de proteína resultante é significativamente reduzido em concentração de isoflavona em relação ao material vegetal a partir do qual deriva-se o isolado de proteína.

A remoção de isoflavonas dos materiais de proteína vegetal na produção de concentrados de proteína e isolados de proteína vegetal tem sido um objetivo no processamento de tais materiais, uma vez que as isoflavonas tem sido associadas ao gosto amargo dos materiais de proteína vegetal, tais como, soja. Por exemplo, a Patente Japonesa número 59-232052A ensina um processo para remover isoflavonas de um material de proteína de soja, por contatar o material de proteína com uma resina adsorvente, para produzir uma proteína de soja de gosto melhor. A extração do álcool dos materiais de proteína vegetal para remover componentes solúveis em álcool da proteína é especificamente preferida, uma vez

que a extração de álcool produz um material de proteína vegetal de sabor melhor do que a extração aquosa, em parte porque o álcool é bastante eficaz na remoção dos compostos de isoflavona do material de proteína vegetal. Vide, por exemplo, Patente Japonesa número 63-245.648A.

Isoflavonas, contudo, tem sido recentemente implicadas como compostos que são responsáveis por vários benefícios de saúde aos seres humanos. Foi sugerido que as isoflavonas podem ser eficazes na prevenção ou retardo de certos canceres, tais como, câncer da próstata e câncer dos seios, conforme descrito nos artigos que se seguem: Genistein Inhibition of the Growth of Human Breast Cancer Cells, Independence from Estrogen Receptors and the Multi-Drug Resistance Gene, Peterson and Barnes, *Biochemical and Biophysical Research, Communications*, Vol. 179, Número 1, páginas 661-67 (30 de agosto de 1991); Genistein and Biochanin A Inhibit the Growth of Human Prostate Cancer Cells but not Epidermal Growth Factor Tyrosine Autophosphorylation, Peterson and Barnes, *The Prostate*, Vol. 22, páginas 335-45, (1993); e Soybeans Inhibit Mammary Tumors in Models of Breast Cancer, Barnes e outros, *Mutagens and Carcinogens in the Diet*, páginas 239-53 (1990). Foi postulado que a baixa incidência de câncer do seio em mulheres japonesas deve-se a uma dieta que contém grandes quantidades de isoflavonas. Soybean Phytoestrogen Intake and Cancer Risk, Herman e outros, *First International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*, páginas 757S-770S (20-23 de fevereiro de 1994). Acredita-se que as isoflavonas também reduzam ou

impeçam os sintomas da menopausa. Dietary Phyto-oestrogens and the Menopause in Japan, Adlercreutz e outros, *The Lancet*, Vol. 339, página 1233 (16 de maio de 1992). Adicionalmente, isoflavonas tem sido identificadas como agentes vasodilatadores em humanos e em primatas não humanos, com efeitos cardioprotetores correspondentes. Enhancement of Coronary Vasodilation by Soy Phytoestrogens and Genistein, Honoré e outros, *Circulation*, 92:1:349 (1995).

Esforços recentes em obter benefícios médicos de isoflavonas têm focalizado a separação e recuperação de isoflavonas a partir de materiais de planta. As patentes que se seguem descrevem vários processos de separação de isoflavonas a partir de materiais de planta, tais como, *pueraria lobata*, legumes e soja: Patentes U.S. números 4.428.876; 5.702.752; 5.679.806; 4.390.559; 4.366.248; 4.366.082; 4.264.509; 4.232.122; 4.157.984; Patentes Japonesas números 1-258669A; 5-170756A; 41-90720A; 62-126186A; 62-126186A; 62-126185A; e Pedido de Patente PCT número WO 93/23069. Os materiais de isoflavona separada podem ser utilizados nas composições farmacêuticas ou de suplemento dietético, conforme descrito nas Patentes U.S. números 5.516.528; 5.424.331; 5.569.459; 5.654.011 e Pedido de Patente PCT número WO 93/23069.

Conquanto composições de isoflavona purificada possam ser úteis nas composições farmacêuticas e suplementos dietéticos para tratar e prevenir várias condições, estudos recentes indicaram que alguns benefícios a saúde disponíveis dos materiais de proteína vegetal contendo quantidades subs-

tanciais de isoflavonas não podem ser providos pelas isoflavonas sozinhas ou o material de proteína vegetal, quando o material de proteína vegetal está substancialmente exaurido de isoflavonas. A ingestão de materiais de proteína de soja contendo quantidades substanciais de isoflavonas demonstrou reduzir os fatores de colesterol total em doença coronária e colesterol de lipoproteína de densidade baixa (colesterol LDL) em primatas não humanos, onde é postulado que as isoflavonas de soja são responsáveis por até 70% do efeito hipocolesterolêmico, e parece ter o mesmo efeito em humanos possuindo níveis elevados de colesterol. Vide, por exemplo, s; Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids, Anderson e outros, N. Engl. J. Med., Vol. 333, número 5, páginas 276-82 (1995). A ingestão de comprimidos contendo isoflavonas purificadas da soja, contudo, mostrou não possuir efeito no colesterol total e colesterol LDL em mulheres em menopausa e climatério. Soy Isoflavones Improve Systemic Arterial Compliance but Not Plasma Lipids in Menopausal and Perimenopausal Women, Nestel e outros, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* Vol. 17, Número 12 (Dezembro de 1997). De forma semelhante, proteína de soja extraída com álcool, que contém quantidades mínimas de isoflavonas, mostrou possuir pouco ou nenhum efeito sobre o colesterol total e colesterol LDL.

Esforços têm sido feitos para maximizar os benefícios de saúde a partir das isoflavonas permanecendo nos materiais de proteína vegetal processados, tais como, concentrados de proteína vegetal ou um isolado de proteína vege-

tal, por conversão das isoflavonas que permanecem lá, em sua forma biologicamente mais ativa. Por exemplo, Patente U.S. número 5.637.562 provê um processo para produzir um concentrado de proteína vegetal de isoflavona aglucona, no qual os glicosídeos de isoflavona são convertidos em isoflavona aglucona mais biologicamente ativa por clivagem enzimática de uma porção de glicosídeo dos glicosídeos de isoflavona. O Pedido de Patente PCT Número PCT/US94/10697 revela um processo para produzir um isolado de proteína vegetal enriquecida com isoflavona aglucona por conversão de glicosídeos de isoflavona em isoflavonas aglucona antes de precipitar o material de proteína de um extrato contendo proteína solúvel e isoflavonas.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê uma composição de proteína vegetal contendo um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona e um material contendo isoflavona dispersa no material de proteína vegetal. A composição de proteína vegetal da presente invenção pode possuir qualquer quantidade selecionada de isoflavonas dispersas e, preferivelmente possui uma quantidade de isoflavonas dispersas lá para tornar a composição de proteína vegetal eficaz para tratar ou prevenir condições de saúde adversas alvo.

Em outro aspecto, a presente invenção é um processo para formação de uma composição de proteína vegetal, onde um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona e um material contendo isoflavona são providos, e o material con-

tendo isoflavona é disperso no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona.

Ainda em outro aspecto, a presente invenção é um processo para formação de uma composição de proteína vegetal onde o material vegetal contendo proteína e isoflavonas é provido e, é extraído com um extrator eficaz para solubilizar as isoflavonas, de modo a formar um extrato contendo isoflavonas. Um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona é então separado do extrato contendo isoflavonas, e um material contendo isoflavona é formado do extrato. O material contendo isoflavona é então disperso no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona.

Em uma concretização mais preferida, o material de proteína vegetal exaurido de isoflavona é um material de proteína vegetal extraído com álcool para prover um material de proteína vegetal possuindo um gosto agradável.

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES PREFERIDAS

A composição de proteína vegetal da presente invenção inclui um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona e um material contendo isoflavona que é disperso no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona.

Materiais de Proteína Vegetal Exauridos de Isoflavona

Materiais de proteína vegetal exauridos de isoflavona usados na composição são materiais de proteína vegetal que podem ser usados como ingrediente de enriquecimento de proteína em um material alimentício ou como um ingrediente funcional em um material alimentício. Materiais de proteína

vegetal que são usados como ingrediente enriquecedor de proteína em um material alimentício incluem materiais de proteína vegetal que são usados para prover suplemento de proteína em um material alimentício, bem como materiais de proteína vegetal que são usados para prover o teor de proteína total no material alimentício. Materiais de proteína vegetal que são usados como ingredientes funcionais, em um material alimentício incluem materiais de proteína vegetal, que são usados para prover propriedades de emulsão a um material alimentício, materiais de proteína vegetal que são usados para ligar gordura, óleos ou água em um material alimentício e materiais de proteína vegetal que são usados para prover propriedades de gelificação a um material alimentício.

Os materiais de proteína vegetal exauridos de isoflavona usados na composição da invenção são derivados de materiais vegetais que contém proteína e isoflavonas. Conforme usado aqui, o termo "isoflavona exaurida" refere-se a uma concentração de isoflavonas em um material de proteína vegetal em relação a concentração de isoflavonas em um material vegetal, a partir do qual deriva-se o material de proteína vegetal. Preferivelmente, o material de proteína vegetal exaurido de isoflavona é um material de proteína de soja, um material de proteína de tremoço, um material de proteína de legume ou um material de proteína de ervilha. Mais preferivelmente, o material de proteína vegetal exaurido de isoflavona é um material de proteína de soja.

Preferivelmente, o material de proteína vegetal exaurido de isoflavona é um concentrado de proteína vegetal

ou um isolado de proteína vegetal. Conforme usado aqui, o termo "concentrado de proteína vegetal" possui o mesmo significado que é convencionalmente associado ao termo concentrado de proteína vegetal, exceto que o concentrado de proteína vegetal é derivado de um material vegetal contendo ambos isoflavonas e proteína. Especialmente, o termo concentrado de proteína vegetal, conforme usado aqui, é um material derivado de um material vegetal contendo isoflavonas e proteína por lavagem ou extração do material vegetal com uma solução aquosa possuindo um pH ao redor do ponto isoelétrico da proteína no material vegetal ou com uma solução de álcool, e separando a solução de lavagem ou extrato do material vegetal, para prover o concentrado de proteína vegetal. Um concentrado de proteína vegetal, conforme usado na invenção, possui um teor de proteína de peso seco de cerca de 65% à cerca de 90% em peso.

Conforme usado aqui o termo "isolado de proteína vegetal" possui o mesmo significado convencionalmente associado ao termo isolado de proteína vegetal, exceto que o isolado de proteína vegetal é derivado de um material vegetal contendo ambos isoflavonas e proteína. Especificamente, o termo isolado de proteína vegetal, conforme usado aqui, é um material derivado de um material vegetal contendo isoflavonas e proteína por 1) extração do material vegetal com água ou uma solução aquosa alcalina possuindo um pH de cerca de 7 a cerca de 11 para solubilizar a proteína e isoflavonas no extrator; 2) separar o extrator dos materiais vegetais insolúveis; 3) precipitar a proteína a partir do extrato se-

parado, por ajuste do pH do extrato ao redor do ponto isoelétrico da proteína; 4) separar a proteína precipitada do extrato; e 5) opcionalmente, porém de forma preferida, lavar a proteína separada com água e/ou álcool. Um isolado de proteína vegetal, conforme utilizado na invenção, possui um teor de proteína em peso seco de, pelo menos 90% em peso.

Em uma concretização especificamente preferida, o concentrado de proteína vegetal ou isolado de proteína vegetal é um material extraído a álcool ou lavado, uma vez que a extração com álcool provê um material de proteína especialmente apropriado para uso em um material alimentício. Um concentrado de proteína vegetal pode ser extraído com uma solução de álcool na formação do concentrado de proteína vegetal, ou pode ser extraído com um álcool, após o concentrado de proteína vegetal ser formado por uma lavagem aquosa isoelétrica. Um isolado de proteína vegetal é extraído ou lavado com um álcool após ser precipitado e separado a partir do extrato alcalino aquoso. O concentrado de proteína vegetal ou isolado é preferivelmente extraído ou lavado com um álcool de grau alimentício, mais preferivelmente com uma solução aquosa de etanol contendo cerca de 55% a cerca de 90% de etanol.

Materiais Contendo Isoflavona

Materiais contendo isoflavona usados na composição podem ser materiais separados de um material de planta contendo isoflavonas. Os materiais de planta contendo isoflavonas incluem, porém não estão limitados a, um ou mais dos seguintes materiais de planta: feijão de soja, grão de bico,

trevo dos prados, trevo subterrâneo, ervilha rasteira, variedade de astrágalo, ervilhaca, feijão "marama", feijão espada, feijão comum, feijão espada "seaside", feijão alfarroba, feijão de rama, "balu", feijão jacinto, ervilha silvestre, ervilhaca indiana, ervilha de jardim, feijão andu, feijão "goa", inhame, fava, ervilha da terra, lentilha, fava mexicana, alfafa, feijão aveludado, alfarroba africana, "inga", ervilhaca Chipre, "yebnut", "tallow tree", castanha da polinésia, raiz de Kudzu (Pueraria lobata), "oil bean tree", algarobo, tamarindo, alforva, alcaçuz, tubérculos comestíveis e derivados de tais materiais de plantas incluindo flocos de soja desengordurados, farinha de soja e carne de soja. Mais preferivelmente, o material contendo isoflavona é separado tanto do material de feijão de soja quanto um material de trevo, uma vez que estas plantas contêm concentrações especificamente altas de isoflavonas.

Em uma concretização, um material contendo isoflavona da composição é uma porção rica em isoflavona de um material de planta que é separado de outras porções do material de planta. Em uma concretização preferida, o material de planta é um material de soja e a porção rica em isoflavona do material de soja que é separada como o material contendo isoflavona é o hipocótilo do material de soja. Os hipocótilos da soja formam uma pequena proporção do peso total da soja intacta (aproximadamente 2%), porém são ricos em isoflavonas, especificamente daidzein. Os hipocótilos podem ser separados dos feijões de soja intactos por debulhamento do feijão de soja, e separando os hipocótilos do restante do

material de soja por passagem do material de soja por uma peneira de tamanho de poro suficiente para separar os hipocótilos relativamente pequenos do restante do material de soja. O material de hipocótilo separado é preferivelmente moído para produzir um pó, que pode ser usado como material contendo isoflavona na composição da presente invenção.

Em outra concretização, um material contendo isoflavona da composição da presente invenção pode ser um extrato de um ou mais dos materiais de planta listados acima, onde o(s) material(is) de planta é/são extraído(s) com um extrator onde as isoflavonas são solúveis, e o extrato contendo as isoflavonas é separado dos materiais de planta insolúveis. Extratores preferidos para formação de extrato de material contendo isoflavona incluem, porém não estão limitados a água, álcoois de peso molecular inferior incluindo metanol, etanol, álcool isopropila, propanol, álcool isobutila e butanol; acetato de etila; acetona; acetonitrila; clorofórmio e misturas dos mesmos. Mais preferivelmente, o extrator é um etanol aquoso ou extrator de metanol aquoso contendo cerca de 55% à cerca de 90% de álcool, em volume.

Em uma concretização preferida, o material contendo isoflavona da composição da presente invenção é um derivado de um ou mais dos extratos listados acima de um ou mais dos materiais de planta listados acima. Um derivado de um extrato, como o termo é usado aqui, refere-se a um material, tanto sólido quanto líquido, que pode ser recuperado de um extrato por submeter o extrato a condições que alteram a constituição física ou química do extrato. Por exemplo, um

derivado, conforme usado aqui, inclui uma forma condensada do extrato, um resíduo sólido recuperado do extrato, um material de isoflavona purificada, recuperado do extrato por cromatografia líquida de alto desempenho ("HPLC"), um material contendo isoflavonas que é recristalizado do extrato ou um material contendo isoflavonas que é extraído do extrato por outro extrator.

Em uma concretização preferida da invenção, o material contendo isoflavona é um derivado de um extrato de um material de planta contendo isoflavonas, onde o material contendo isoflavona é formado por concentração do extrato. O material contendo isoflavona formado por concentração do extrato pode ser um material líquido ou sólido, dependendo da extensão da concentração do extrato. Em uma concretização preferida da invenção, o material contendo isoflavona é um extrato de álcool aquoso, concentrado, de um trevo contendo isoflavona. Em outra concretização preferida da invenção, o material contendo isoflavona da invenção compreende solúveis de soja condensados, o qual é usado de acordo com seu significado convencional na técnica.

Ainda em outra concretização preferida da invenção, o material contendo isoflavona é um derivado de um extrato de um material de planta contendo isoflavona compreendendo um material contendo isoflavona recristalizado a partir do extrato. Preferivelmente, o material contendo isoflavona recristalizada é derivado de um extrato de álcool aquoso de um ou mais dos materiais de planta contendo isoflavona listados acima, onde o material de isoflavona recristalizado

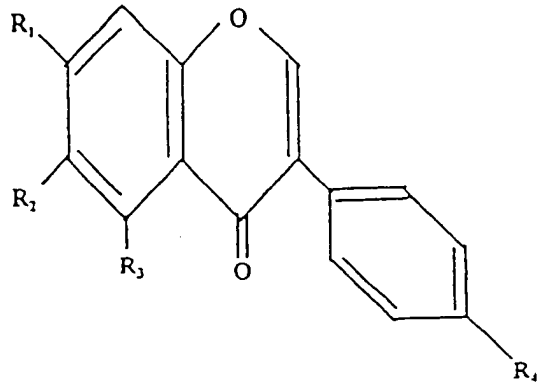
é recuperado do extrato por concentração do extrato, resfriamento do extrato concentrado para precipitar o material de isoflavona e separação da isoflavona precipitada contendo material do extrato.

Ainda em outra concretização preferida da invenção, o material contendo isoflavona é um derivado de um extrato de material de planta contendo isoflavona compreendendo um material contendo isoflavona, separado do extrato por HPLC ou por HPLC de fase inversa. O material contendo isoflavona pode ser derivado por HPLC ou HPLC de fase inversa por eluir um extrato de um material contendo isoflavona através de uma resina adsorvente que liga, de forma liberável, as isoflavonas e impurezas em uma maneira específica de composto com um eluente, onde as isoflavonas são solúveis, e coletando frações de eluente contendo as isoflavonas. As frações do eluente contendo as isoflavonas podem ser combinadas e concentradas para prover um material contendo isoflavona purificada. Em uma concretização preferida, o material contendo isoflavona é derivado de HPLC de fase inversa, onde o eluente é selecionado de etanol ou metanol aquoso, acetonitrila, acetato de etila, acetona ou combinações destes.

As isoflavonas existentes no material contendo isoflavona são isoflavonas que estão contidas, naturalmente, nos materiais de planta, embora concentrações relativas de conjugados de isoflavona, glicosídeos de isoflavona e isoflavonas aglucona possam ser alteradas de concentrações ocorrendo naturalmente destes materiais no material de plan-

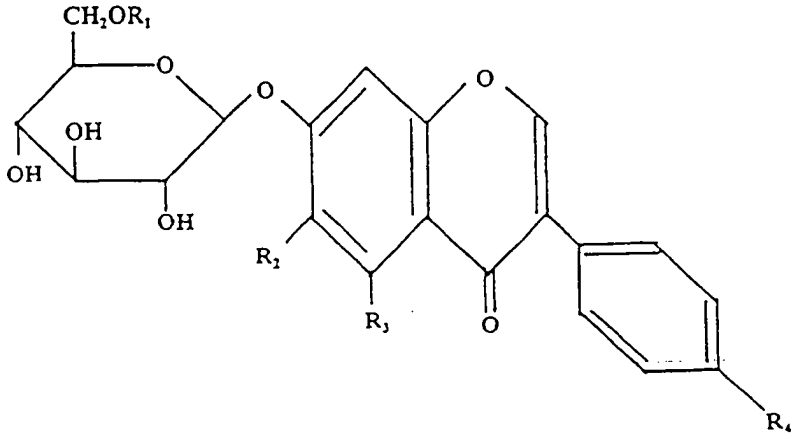
ta, a partir dos quais, as isoflavonas são separadas, tanto pelo processo de separação quanto pelo processo especificamente destinado a alterar as concentrações relativas destes materiais. Em uma concretização preferida o material contendo isoflavona apresenta, pelo menos, uma isoflavona aglucona selecionada de genistein, daidzein, glicitein, biochanin A, ou formononetin ou, pelo menos um dos glicosídeos de isoflavona genistin, daidzin ou glicitin ou, pelo menos um dos conjugados de isoflavona 6"-OMal genistin, 6"-OAc genistin, 6"-OMal daidzin, 6"-OAC daidzin ou 6"-OMal glicitin, ou misturas dos mesmos, onde "Mal" designa "malonil" e "Ac" designa "acetila". As estruturas para as isoflavonas aglucona, glicosídeos de isoflavona e conjugados de isoflavona são conhecidos nas Fórmulas 1 e 2 a seguir.

Fórmula 1 - Isoflavona aglucona



Composto	R_1	R_2	R_3	R_4
Genistein	OH	H	OH	OH
Biochanin A	OH	H	OH	OCH_3
Formononetin	OH	H	H	OCH_3
Daidzein	OH	H	H	OH
Glycitein	OH	OCH_3	H	OH

Fórmula 2 - Conjugado de Isoflavona ou glicosídeos de isoflavona



Composto	R_1	R_2	R_3	R_4
Genistin	H	H	OH	OH
6"-OMal genistin	$COCH_2CO_2H$	H	OH	OH
6"-OAc genistin	$COCH_3$	H	OH	OH
Daidzin	H	H	H	OH
6"-OMal daidzin	$COCH_2CO_2H$	H	H	OH
6"-OAc daidzin	$COCH_3$	H	H	OH
Glycitin	H	OCH_3	H	OH
6"-OMal glycitin	$COCH_3$	OCH_3	H	OH

Materiais contendo isoflavona usados na composição da presente invenção podem também conter, ou ser, uma isoflavona preparada sinteticamente, selecionada do grupo de genistein, daidzein, glicitein, biochanin A, formononetin ou seus respectivos glicosídeos ou conjugados. A isoflavona preparada sinteticamente pode ser dispersa, diretamente, no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona da composição, ou pode se misturada em um veículo de grau alimentício, inerte, convencional, tal como, celulose, amido, farinha ou outros veículos comumente usados.

Genistein pode ser preparado de acordo com processos conhecidos de síntese, tais como, por processos providos por Baker e outros (*J. Chem. Soc.*, p.3115 (1928)); Narasimhachari e outros (*J. Sci. Ind. Res.*, Vol. 12, p.287 (1953)); Yoder e outros, (*Proc. Iowa Acad. Sci.*, Vol. 61, p. 271 (1954); e Zemplen e outros (*Acta. Chim. Acad. Sci. Hung.* Vol. 19, p. 277 (1959)), cada citação sendo incorporada aqui como referência. Genistin pode ser sinteticamente preparado pelo processo de Zemplen e outros (*Ber.*, Vol 76B, p.1110 (1943)), incorporado aqui como referência. Os conjugados de isoflavona de genistein, 6"-OMal genistein e 6"-OAC genistein podem ser preparados por saponificação convencional de genistin com acetato de malonila ou de acetila, respectivamente.

Daidzein pode ser sinteticamente preparado pelos processos providos por Baker e outros (*J. Chem. Soc.*, p.274 (1993)), Wesley e outros (*Ber.* Vol. 66, p.685 (1933)), Mahal e outros (*J. Chem. Soc.*, p. 1769 (1934)), Baker e outros (*J.*

Chem. Soc., p. 1852 (1953)), ou Farkas (*Ber.* Vol. 90, p. 2940 (1957)), cada citação sendo incorporada aqui como referência. Daidzin pode ser preparado sinteticamente pelo processo de Farkas e outros (Ber., Vol. 92, p. 819 (1959)), incorporado aqui como referência. Conjugados de isoflavona daidzein, 6"-OMal daidzin e 6"-OAC daidzin podem ser preparados por saponificação convencional de daidzin com um anidrido de malonila ou anidrido de acetila, respectivamente.

Formononetin pode ser sinteticamente preparado pelos processos providos por Wessely e outros (*Ber.* Vol. 66, p.685 (1933)), ou Kagel e outros (*Tet. Letters*, p. 593 (1962)), cada citação sendo incorporada aqui como referência.

A composição de proteína vegetal contém material contendo isoflavona suficiente, disperso em um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona para prover benefícios à saúde do ser humano que consome uma refeição ou bebida contendo a composição de proteína vegetal. Preferivelmente, a composição de proteína vegetal contém a quantidade mínima de material contendo isoflavona necessária para prover tais benefícios. Preferivelmente, a composição de proteína vegetal contém entre cerca de 2,5 mg a 100 mg das isoflavonas totais por grama de material de proteína vegetal exaurido de isoflavona, ou entre cerca de 1,5 mg à 85 mg de isoflavonas aglucona por grama de material de proteína vegetal exaurido de isoflavona.

Em outro aspecto, a invenção é um processo para formação de uma composição de proteína vegetal contendo um

material de proteína vegetal exaurido de isoflavona e um material contendo isoflavona. O processo compreende a provisão de material de proteína vegetal exaurido de isoflavona e provisão de material contendo isoflavona, além de dispersão do material contendo isoflavona no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona.

Provisão de um Material de Proteína Vegetal Exaurido de Isoflavona

Um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona é provido por: provisão de uma proteína contendo material vegetal e isoflavonas, e separação de um material de proteína do material vegetal, em uma maneira que reduz a quantidade de isoflavonas no material de proteína, em relação à concentração inicial de isoflavonas no material vegetal. Materiais vegetais que contém proteína e isoflavonas incluem feijão de soja, derivados de feijão de soja, tais como, flocos de soja com gordura plena ou isentos de gordura, farinha de soja, grão de soja e carne de soja, sementes oleosas tais, como, semente de colza, tremoço, legumes e diversas variedades de ervilhas e feijões, incluindo ervilha rasteira, grão de bico, ervilha silvestre, ervilha de jardim, ervilha da terra, feijão "marama", feijão espada, feijão comum, feijão alfarroba, feijão de rama, feijão jacinto, feijão em rama, feijão "goa", inhame, fava, fava mexicana, feijão aveludado. Os materiais de vegetal contendo proteína e isoflavonas podem estar em uma forma processada, tal como, farinha, grão, carne ou flocos.

O material de proteína pode ser separado do material vegetal de qualquer modo que forneça um material contendo uma concentração maior de proteína, em peso, do que o material vegetal e que reduza a quantidade de isoflavonas no material de proteína separado, em relação ao material vegetal. É especificamente preferido que os processos convencionais para formação de concentrados de proteína vegetal e isolados de proteína vegetal sejam usados para prover material de proteína vegetal exaurido de isoflavona.

Um concentrado de proteína vegetal exaurido de isoflavona pode ser provido por lavagem de um material vegetal contendo proteína e isoflavonas com uma solução aquosa, possuindo um pH ao redor do ponto isoelétrico da proteína ou com uma solução de álcool. Preferivelmente, o material vegetal inicial é um material vegetal processado que tenha sido transformado em flocos ou farinha e que possa ter sido processado para remover gordura do material vegetal. A lavagem remove carboidratos solúveis, isoflavonas, cinzas e outros materiais do material vegetal.

Caso uma lavagem aquosa seja usada, a lavagem pode ser preparada por ajuste do pH da água ao redor do ponto isoelétrico da proteína com um reagente ácido ou básico apropriado. Tipicamente, o ponto isoelétrico da proteína ocorre em um pH brandamente ácido, e preferivelmente uma solução aquosa é ajustada ao redor do ponto isoelétrico com um ácido mineral de grau alimentício, tal como ácido clorídrico.

Caso uma lavagem com álcool seja usada, a lavagem com álcool deve ser um reagente de grau alimentício e, preferivelmente, é uma solução de etanol aquoso. Uma solução de etanol aquoso pode conter cerca de 55% a cerca de 90% de etanol em volume. Uma lavagem com álcool é a lavagem preferida para formar um concentrado de proteína vegetal exaurido de isoflavona, uma vez que os concentrados de proteína vegetal formados por lavagem de álcool geralmente possuem um gosto melhor do que os concentrados de proteína vegetal formados por lavagem aquosa.

O material vegetal deverá ser contatado com solução de lavagem suficiente para formar um concentrado de proteína vegetal contendo entre 65% e 90% de proteína, por peso seco. A razão em peso de solução de lavagem para material vegetal pode ser de cerca de 2:1 a cerca de 20:1, e preferivelmente é de cerca de 5:1 à cerca de 10:1. Preferivelmente, o material vegetal é agitado na solução de lavagem por um período de tempo, de modo a facilitar a remoção de materiais solúveis na solução de lavagem a partir do material vegetal. A solução de lavagem é então decantada do material vegetal para prover o concentrado de proteína vegetal.

Um isolado de proteína vegetal exaurido de isoflavona pode ser provido por extração de um material vegetal contendo isoflavonas e proteína com água ou um extrator alcalino aquoso para solubilizar a proteína e isoflavonas no extrator, separando o extrato dos materiais vegetais insolúveis, tais como, fibras vegetais, precipitando a proteína do extrato por ajuste do pH do extrato para cerca do ponto iso-

elétrico da proteína e separando a proteína precipitada do extrato. Novamente, é preferido que o material vegetal inicial seja um material vegetal processado, que tenha sido transformado em forma de flocos ou farinha e, opcionalmente, tenha sido desengordurado.

O extrator é uma solução aquosa possuindo um pH de cerca de 7 à cerca de 11. Reagentes alcalinos convencionais podem ser empregados, caso desejado, para elevar o pH do extrator e reagentes alcalinos preferidos incluem hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e hidróxido de amônio. É mais preferido que o extrator tenha um pH de cerca de 9 a cerca de 10, uma vez que a proteína no material vegetal é mais solúvel nas soluções aquosas possuindo um pH relativamente alto. Extratores excessivamente alcalinos, por exemplo, possuindo um pH acima de 11, devem ser evitados, uma vez que as condições altamente alcalinas podem causar a formação de compostos lisinoalanina tóxicos a partir da proteína.

A razão em peso do extrator para material vegetal seria suficiente para extrair uma quantidade substancial de proteína a partir do material vegetal. Preferivelmente, a razão em peso do extrator para material vegetal é de cerca de 4:1 à cerca de 20:1 e, mais preferivelmente de cerca de 8:1 à cerca de 16:1.

A extração pode ser realizada por processos de extração convencionais. Em uma concretização, a extração é realizada por um processo de extração de contracorrente. Em outra concretização, a extração é uma extração dupla, onde o material vegetal é extraída com um primeiro volume de extra-

tor e então é extraído com um segundo volume de extrator, e os primeiro e segundo volumes de extrator são combinados.

O extrator é separado do material vegetal após a extração para separar a proteína solubilizada dos materiais vegetais insolúveis, tais como, fibras vegetais, celulose e hemiceluloses insolúveis. O extrator pode ser separado em uma maneira convencional a partir dos materiais vegetais insolúveis, tais como, decantação, centrifugação e remoção do sobrenadante dos materiais insolúveis ou filtração.

Após o extrator ser separado dos materiais vegetais insolúveis para formar um extrato contendo proteína solubilizada, a proteína no extrato é precipitada do extrato por ajuste do pH do extrato para cerca do ponto isoelétrico da proteína. Tipicamente, o ponto isoelétrico da proteína está em um pH brandamente ácido, por exemplo, a proteína da soja possui um ponto isoelétrico em pH 4,5, de modo que o pH do extrato é ajustado, por adição ao extrato de uma quantidade suficiente de um reagente ácido, de modo a precipitar a proteína. Reagentes ácidos preferidos são ácidos minerais de grau alimentício, tais como, ácido clorídrico e ácido fosfórico.

A proteína precipitada é então separada do extrato para formar o isolado de proteína vegetal exaurido de isoflavona. A separação da proteína do extrato separa a proteína de uma porção significante de isoflavonas, uma vez que uma porção significante das isoflavonas é solúvel no extrato, no ponto isoelétrico do material de proteína. A separação pode ser efetuada por meios convencionais para separar

um material sólido de um líquido, tal como, centrifugação e decantação do sobrenadante, ou filtração. O isolado de proteína separado contém, pelo menos, 90% de proteína, em peso.

O isolado de proteína exaurido de isoflavona separado pode ser lavado com água ou uma solução de álcool para remover, adicionalmente, água ou materiais solúveis em álcool que permanecem no isolado de proteína. A razão em peso da lavagem para o material isolado de proteína é preferivelmente de cerca de 2:1 à cerca de 15:1 e o material de proteína pode ser lavado, várias vezes, para assegurar remoção das impurezas. Em uma concretização preferida, a lavagem é uma lavagem com etanol aquoso, possuindo um teor de etanol de cerca de 55% a cerca de 90%, uma vez que a lavagem com álcool dos materiais de proteína vegetal geralmente fornece um material de proteína com gosto melhor do que a lavagem com água.

Provisão de um Material Contendo Isoflavona

Um material contendo isoflavona pode ser provido por separação do material contendo isoflavona de um material de planta contendo isoflavonas, ou por preparação sintética de uma ou mais isoflavonas para inclusão no material contendo isoflavona. Se isoflavonas sinteticamente preparadas forem incluídas no material contendo isoflavona, um dos procedimentos citados acima para preparação sintética dos compostos de isoflavona pode ser usado para prover a(s) isoflavona(s).

Se o material contendo isoflavona deve conter isoflavonas separadas de um material de planta, um material de

planta contendo isoflavonas é provido. Uma lista não exclusiva de alguns materiais de planta contendo isoflavonas é fornecida acima.

O material de planta pode ser preparado por separação do material contendo isoflavona por processamento do material de planta de modo a tornar as isoflavonas facilmente acessíveis a um extrator. O material de planta pode ser processado por moagem ou trituração da planta e por remoção dos compostos da planta que podem interferir com a separação das isoflavonas. Por exemplo, um material de feijão de soja pode ser moído e então desengordurado por extração com hexanos, para preparar o material de planta para separação de um material contendo isoflavona. Plantas com folhas que contêm quantidades substanciais de isoflavonas em suas folhas, tais como, trevos, podem não precisar ser moídos ou triturados antes da separação do material contendo isoflavona, contudo, é preferido que qualquer material de planta seja triturado antes para separação do material contendo isoflavona.

Um material contendo isoflavona é separado do material de planta por extração do material de planta com um extrator, no qual as isoflavonas são, pelo menos, parcialmente solúveis. Os extratores preferidos incluem, porém não estão limitados a: água, álcoois de peso molecular inferior, incluindo metanol, etanol, álcool isopropila, propanol, álcool isobutílico e butanol; acetato de etila; acetona; acetonitrila; clorofórmio; e misturas dos mesmos. Extratores especificamente preferidos são soluções de metanol aquoso e

etanol aquoso contendo cerca de 55% à cerca de 90% de álcool por volume.

A extração pode ser conduzida por procedimentos de extração convencionais. Em uma concretização, o material de planta e o extrator são agitados juntos, por um período de tempo de cerca de 30 minutos a 24 horas, em temperatura ambiente (22°C) para efetuar a extração das isoflavonas para o extrator. Em outra concretização, as isoflavonas são extraídas por aquecimento do material de planta e do extrator, por um período de cerca de 15 minutos à cerca de 5 horas, em uma temperatura de cerca de 35°C à temperatura de refluxo do extrator. Em uma concretização preferida, o material de planta é refluxado em uma solução de metanol aquosa de 60-85% por um período de cerca de 1 hora à cerca de 2 horas, em uma temperatura de cerca de 60°C à cerca de 70°C para extrair as isoflavonas na solução de metanol aquosa. Em outra concretização preferida, o material de planta é refluxado em uma solução de etanol aquosa de 60-85%, por um período de cerca de 1 hora à cerca de 2 horas, em uma temperatura de cerca de 70°C à cerca de 80°C, para extrair as isoflavonas na solução de etanol aquosa.

O extrator contendo as isoflavonas pode então ser separado do material de planta para prover um material contendo isoflavona que pode ser disperso no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona para prover a composição de proteína vegetal da presente invenção. A separação pode ser efetuada por procedimentos convencionais para separar um material sólido de um material líquido. Em uma con-

cretização, o extrator e o material de planta são centrifugados, e o extrato contendo isoflavona sobrenadante pode ser decantado do material de planta. Em outra concretização, o extrator e o material de planta são separados por filtração do material de planta do extrator e coleta do extrato enriquecido de isoflavona como o filtrado.

O extrato enriquecido com isoflavona pode ser submetido a processamento adicional para produzir um material contendo isoflavona derivado do extrato. Em uma concretização da invenção, o extrato enriquecido com isoflavona pode ser concentrado por remoção de algum ou todo o solvente de extrato, para produzir um derivado concentrado do extrato. O extrato enriquecido com isoflavona pode ser concentrado por procedimentos convencionais. Por exemplo, o extrato pode ser concentrado por aquecimento para evaporar o solvente de extrato, por ser colocado sob pressão reduzida por um tempo suficiente para remover algum ou todo o solvente extraído ou, preferivelmente, por uma combinação de ambos.

Um material contendo isoflavona recristalizada pode também ser derivado de extrato enriquecido com isoflavona. Primeiro, o extrato pode ser concentrado conforme descrito acima. Então, opcionalmente, água fria, preferivelmente com temperatura de cerca de 4°C a cerca de 20°C pode ser adicionada ao extrato condensado. Se a água for adicionada ao extrato condensado, a razão em peso de água adicionada ao extrato condensado é preferivelmente de cerca de 0,5:1 à cerca de 4:1. O extrato é então resfriado a cerca de 0°C a cerca de 20°C para permitir que o material contendo isofla-

vona cristalize. O material contendo isoflavona recristalizada pode então ser recuperado por procedimentos convencionais para separar um material sólido de um líquido, e preferivelmente é filtrado do extrato restante.

Um material contendo isoflavona altamente purificada pode também ser derivado de extrato enriquecido de isoflavona por cromatografia, preferivelmente por HPLC. O extrato pode ser concentrado, caso desejado, ou o extrato pode ser utilizado sem concentração subsequente. O extrato, ou extrato condensado, é inicialmente filtrado para remover o material insolúvel que poderia tampar uma coluna de HPLC. Preferivelmente, o extrato é filtrado por passagem através de um filtro Whatman número 5, e então através de um filtro de 0,45 μ.

Uma coluna de HPLC é preparada por revestir uma coluna de HPLC convencional, comercialmente disponível, com um material adsorvente em partículas de isoflavonas de ligação liberável e impurezas de não isoflavona em um composto de maneira específica. O material adsorvente pode ser qualquer material de acondicionamento de HPLC de fase inversa, contudo, um material de acondicionamento preferido pode ser escolhido com base na capacidade de carga, eficácia de separação e custo. Um tal material de acondicionamento preferido são as contas Kromasil C18 16μm 100Å disponível da Eka Nobel, Nobel Industries, Suécia.

O extrato filtrado ou extrato concentrado, pode então ser passado através da coluna HPLC acondicionada, até todos os locais de ligação da coluna serem completamente sa-

turados com isoflavonas, que é detectada pela aparência das isoflavonas no efluente a partir da coluna. A coluna de HPLC pode então ser eluída com um eluente, tal como álcool aquoso, acetonitrila, acetato de etila, acetona, água ou combinações dos mesmos para efetuar a separação das isoflavonas de outros compostos no extrato.

Em uma concretização especificamente preferida, o eluente é uma solução de etanol aquosa. O etanol aquoso pode possuir um teor de álcool entre 10% e 90% de álcool em volume. Quando uma concentração simples de etanol é usada como o eluente, o etanol aquoso preferivelmente possui um teor de álcool de cerca de 50% em volume. É mais preferido, contudo, usar um gradiente escalonado de eluentes, onde a coluna é inicialmente eluída com um eluente de etanol aquoso possuindo um baixo teor de álcool, seguido por sucessivos eluentes de etanol aquoso contendo teor de álcool maior. Por exemplo, um primeiro eluente pode ser uma solução de etanol aquoso a 20%, um segundo eluente pode ser uma solução de etanol aquoso a 50%, e um eluente final pode ser uma solução de etanol aquosa a 80%.

As frações do material contendo isoflavona são coletadas do efluente da coluna. As frações de isoflavona contendo efluente são identificadas, preferivelmente por adsorção de UV em 262 nm, e separadas das frações do efluente materiais não-isoflavona. As frações coletadas do material contendo isoflavona são então combinadas para prover um material contendo isoflavona purificado. O eluente nas frações combinadas de materiais contendo isoflavona podem ser evapo-

radas por aquecimento, por pressão reduzida ou por uma combinação dos mesmos, para produzir um material contendo isoflavona purificada sólida.

Dispersão do Material Contendo Isoflavona no Material de Proteína Vegetal Exaurido de Isoflavona

O material contendo isoflavona pode ser disperso no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona, de acordo com os processos convencionais. Caso o material contendo isoflavona seja um líquido, o material contendo isoflavona pode se aspergido sobre o material de proteína vegetal conforme o material de proteína vegetal é agitado. Preferivelmente, um material contendo isoflavona líquido é atomizado conforme ele é aspergido sobre o material de proteína vegetal. Um material contendo isoflavona líquido pode também ser derramado no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona e misturado com o material de proteína.

Caso o material contendo isoflavona seja um sólido, o material sólido é preferivelmente moído em um pó antes de dispersar o material no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona. O pó pode então ser misturado diretamente com o material de proteína vegetal. O material em pó enriquecido com isoflavona e o material de proteína vegetal são preferivelmente agitados de modo a dispersarem uniformemente o material contendo isoflavona no material de proteína.

Se o material de proteína vegetal exaurido de isoflavona for disperso em um líquido, tanto uma pasta quanto uma solução, o material contendo isoflavona, se líquido ou

sólido, pode ser adicionado a e misturado à pasta ou solução de material de proteína vegetal exaurido de isoflavona. Preferivelmente, o material contendo isoflavona é misturado em uma pasta ou solução de material de proteína vegetal exaurido de isoflavona, por agitação da mistura, por exemplo, com uma pá de agitação.

Em outra concretização, um material contendo isoflavona sólida pode ser misturado com um agente de dispersão de líquido, preferivelmente óleo de soja ou lecitina e revestido no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona. O agente de dispersão líquido contendo o material contendo isoflavona pode ser aplicado por adição direta do agente de dispersão de líquido ao material de proteína vegetal e misturando, por exemplo, com um misturador de fita, ou por aspersão do agente de dispersão de líquido sobre o material de proteína vegetal, enquanto se agita o material de proteína.

Em outro aspecto, a presente invenção é um processo para formar uma composição de proteína vegetal contendo um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona e um material contendo isoflavona, onde o material de proteína vegetal exaurido de isoflavona e o material contendo isoflavona são derivados do mesmo material vegetal. O processo inclui as etapas de provisão de um material vegetal contendo proteína e isoflavonas, extração do material vegetal com um extrator eficaz para solubilizar isoflavonas de modo a formar um extrato contendo isoflavonas, separação do material de proteína vegetal exaurido de isoflavona das isoflavonas

contendo extrato, formação de um material contendo isoflavona a partir do extrato e dispersão do material contendo isoflavona no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona.

Um material vegetal contendo proteína e isoflavonas é provido, preferivelmente por seleção de um material vegetal dos materiais vegetais listados acima, que contêm isoflavonas e proteína. Em uma concretização preferida, o material vegetal é um material de feijão de soja, incluindo materiais de feijão de soja processados e não processados. Em uma concretização mais preferida, o material vegetal é um floco de soja, farinha de soja ou material de carne de soja.

O material vegetal é extraído com um extrator que é eficaz para solubilizar isoflavonas, onde uma lista não exclusiva de tais extratores é provida acima. Em uma concretização, o material vegetal é extraído com um extrator, conforme descrito acima no processo, para formar um concentrado de proteína vegetal, onde as isoflavonas são contidas no extrator, e a proteína é insolúvel no extrator. Em outra concretização, o material vegetal é extraído com um extrator, conforme descrito acima no processo, para formação de um isolado de proteína vegetal, onde as isoflavonas e proteína são contidas no extrator, e são separadas dos materiais vegetais que são insolúveis no extrator.

Um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona é então separado do extrato contendo isoflavonas. Em uma concretização, o material exaurido de isoflavona é um concentrado de proteína vegetal, que é separado do extrato,

ou lavagem, contendo as isoflavonas conforme descrito acima com relação aos concentrados de proteína vegetal. Em outra concretização, o material exaurido de isoflavona é um isolado de proteína vegetal, que é separado do extrato contendo isoflavonas, por precipitação do material de proteína vegetal do extrato e separando o material de proteína precipitado do extrato, conforme descrito acima, com relação aos isolados de proteína vegetal.

Um material contendo isoflavona é então formado do extrato. O material contendo isoflavona é um derivado do extrato, onde o material contendo isoflavona pode ser derivado do extrato por concentração do extrato, recristalização do material contendo isoflavona do extrato ou purificação do material contendo isoflavona do extrato, conforme descrito acima, com relação a provisão de um material contendo isoflavona de um extrato. Nesta concretização da invenção, o material contendo isoflavona poderia não ser o extrato por si, uma vez que a recombinação do extrato com o material de proteína vegetal exaurido de isoflavona formado pela extração recombinará todos os componentes do material vegetal inicial, e não resultará em um material de proteína vegetal possuindo gosto aperfeiçoado ou propriedades funcionais.

O material contendo isoflavona pode então ser disperso no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona. O material contendo isoflavona pode ser disperso no material de proteína vegetal conforme descrito acima.

A composição de proteína vegetal da presente invenção pode ser usada em uma variedade de alimentos, de modo

a prover fortalecimento nutricional e propriedades funcionais. Por exemplo, a composição de proteína vegetal pode ser adicionada aos alimentos incluindo, porém não limitado a, carnes, carnes moídas, carnes emulsificadas, carnes marinadas; bebidas, tais como, bebidas nutricionais, bebidas para desportistas, bebidas fortificadas com proteína, sucos, leite, alternativos do leite e bebidas para perda de peso; barras alimentícias nutricionais; queijos, tais como, queijos duros e macios, queijo em creme e queijo tipo ricota; sobremesas geladas, tais como, sorvetes, leite gelado, sobremesas congeladas de gordura baixa e sobremesas congeladas não dietéticas, iogurtes; sopas; pudins; produtos de pastelaria; acompanhamentos para saladas; molhos e correlatos, tais como, maionese e molhos para aperitivos.

As Formulações 1-4 que se seguem ilustram alimentos e bebidas que podem ser formados usando uma composição de proteína vegetal da presente invenção. A composição de proteína vegetal usada nas formulações é um isolado de proteína de soja possuindo um material contendo isoflavona disperso lá, onde o material contendo isoflavona contém vários compostos de isoflavona da Fórmula 1 e/ou Fórmula 2. A composição de proteína vegetal nos exemplos que se seguem contém, tipicamente entre cerca de 2,5 à cerca de 5 miligramas de isoflavonas totais por grama de proteína.

Formulação 1

Bebida pronta para beber

Uma bebida pronta para beber é constituída dos seguintes componentes:

Ingredientes	% em peso da composição
Água	80-85
Composição de proteína vegetal	10-15
Sacarose	5-8
Cacau	0,1-1
Vitaminas/Minerais	0,1-1
Aromatizante	0,1-1
Celulose em gel	0,1-0,5

A bebida pronta para beber pode ser servida em porções de 226,90 g (8 ounce) contendo cerca de 20 gramas de composição de proteína vegetal incluindo cerca de 50 à cerca de 100 miligramas de compostos de isoflavona.

Formulação 2

Bebida em Pó

Uma bebida em pó é constituída dos componentes que se seguem:

Ingredientes	% em peso da composição
Composição de Proteína vegetal	85-90
Sacarose	8-15
Maltodextrina	1-5
Vitaminas/Minerais	0,5-2
Aspartame	0-0,5
Aromatizante	0-0,5

30 gramas da formulação da bebida em pó podem ser adicionados à água para formar uma porção contendo cerca de 25 gramas da composição de proteína vegetal incluindo cerca de 62 à cerca de 125 miligramas dos compostos de isoflavona.

Formulação 3

Barra alimentícia

Uma barra alimentícia é constituída pelos elementos que se seguem:

Ingredientes	% em peso da composição
Composição de proteína vegetal	20-30
Xarope de milho	35-45
Sólido de xarope de arroz	7-14
Glicerina	1-5
Cacau	2-7
Revestimento de composto	15-27

A barra alimentícia pode ser servida em porções de 70 gramas contendo cerca de 15 gramas de composição de proteína vegetal possuindo cerca de 37 à cerca de 75 miligramas dos compostos isoflavona aqui.

Formulação 4

Iogurte

Um iogurte é constituído pelos componentes que se seguem:

Ingredientes	% em peso da composição
Água	65-75
Composição de proteína vegetal	5-15
Sacarose	3-8
Amido de milho	1-5
Dextrina	0,3-1
Celulose em gel	1-3
Cultura (iogurte)	0,01-0,1

Fruta	10-20
Vitaminas/Minerais	0,05-0,3

O iogurte pode ser servido em porções de 170 gramas contendo cerca de 8 gramas da composição de proteína vegetal possuindo cerca de 20 à cerca de 40 miligramas dos compostos isoflavona aqui.

Os exemplos não limitantes que se seguem ilustram a composição de proteína vegetal da presente invenção e processos para produção da composição.

EXEMPLO 1

Em um primeiro experimento é formado um isolado de proteína de soja exaurido de isoflavona. 68,03 kg (100 lbs.) de flocos de soja desengordurados são transformados em pasta em 680,38 kg (1500 lbs.) de água aquecida à uma temperatura de 33°C em um tanque de extração. Hidróxido de cálcio suficiente (cerca de 1,3% em peso) é adicionado à pasta de flocos de feijão de soja para ajustar o pH da pasta para 9,7. Os flocos de soja são extraídos por um período de 30 minutos, após o que a solução aquosa é separada dos flocos extraídos por centrifugação. O extrato aquoso é mantido, enquanto o resíduo em flocos extraído é redisperso em 408,23 g (900 lb.) de água aquecida a temperatura de 33°C. O pH da pasta de flocos extraída neste ponto é de 9,0. Um segundo extrato aquoso é coletado por centrifugação, e os primeiro e segundo extratos são combinados. Aos extratos aquosos combinados, ácido fosfórico a 85% é adicionado para ajustar o pH para 4,5 (o ponto isoelétrico da proteína da soja) para pre-

cipitar a proteína. A proteína precipitada é então separada dos extratos aquosos combinados e é lavada com 45,35 kg (100 lbs.) de etanol aquoso (80%) para formar o isolado de proteína exaurido de isoflavona.

EXEMPLO 2

Em um segundo experimento, um concentrado de proteína de soja exaurida de isoflavona é formado. 45,35 kg (100 lbs.) de flocos de soja desengordurados são colocados em um tanque de mistura com 453,59 kg (1000 lbs.) de etanol aquoso (80%) aquecido a 35°C. Os flocos e etanol aquoso são agitados no tanque de mistura por 30 minutos. O extrato de álcool aquoso é removido do material de soja em flocos por centrifugação e decantação do sobrenadante para prover o concentrado de proteína de soja exaurido de isoflavona.

EXEMPLO 3

Um isolado de proteína de soja exaurido de isoflavona é formado a partir de um concentrado de proteína de soja exaurido de isoflavona. Um concentrado de proteína de soja exaurido de isoflavona extraído álcool é formado, conforme descrito no Exemplo 2. O concentrado de proteína de soja extraído com álcool é transformado em pasta em 317,51 kg (700 lbs.) de água aquecida a uma temperatura de 33°C, em um tanque de extração. Hidróxido de cálcio suficiente é adicionado à pasta para ajustar o pH da pasta para 9,7. A pasta é extraída por um período de 45 minutos, após o que um extrato aquoso contendo proteína de soja solubilizada é separado dos materiais insolúveis na pasta por centrifugação. O extrato aquoso é mantido, enquanto os materiais insolúveis

extraídos são redispersos em 204,11 kg (450 lbs.) de água aquecida à temperatura de 33°C. Um segundo extrato aquoso é coletado por centrifugação, e os primeiro e segundo extratos são combinados. Ácido clorídrico suficiente é adicionado aos extratos combinados para ajustar o pH dos extratos combinados para 4,5 de modo a precipitar a proteína solubilizada. A proteína precipitada é então separada dos extratos combinados, e é lavada com 31,75 kg (70 lbs.) de água para formar um isolado de proteína de soja exaurido de isoflavona.

EXEMPLO 4

Um material contendo isoflavona é formado a partir de material de soja em flocos. 45,25 kg (100 lbs.) de um material de soja em flocos, desengordurado, são colocados em um tanque de mistura contendo 453,59 kg (1000 lbs.) de etanol aquoso (80%) aquecido a 35°C. Os flocos e o etanol aquoso são agitados no tanque de mistura por 30 minutos. O extrato de etanol aquoso, enriquecido com isoflavonas, é separado do material de soja em flocos por centrifugação. O extrato de etanol aquoso é concentrado por aquecimento do extrato a 45°C, sob pressão reduzida, até substancialmente todo o álcool no extrato ser removido. O extrato concentrado contém cerca de 50% de sólidos em peso e é um material contendo isoflavona.

EXEMPLO 5

Um material contendo isoflavona recristalizada é formado. 90,7 kg (200 lbs.) de um extrato de etanol aquoso, concentrado, são formados de acordo com o Exemplo 4. 81,63 kg (180 lbs.) de água fria possuindo temperatura de 13°C são

adicionados ao extrato concentrado. O extrato concentrado/mistura de água é mantido em 7°C, por 24 horas, e o material contendo isoflavona é recuperado como um material sólido cristalizado a partir da solução.

EXEMPLO 6

É formado um material contendo isoflavona purificada. 408,23 kg (900 lbs.) de extrato de etanol aquoso são formados de acordo com o Exemplo 4, exceto que o extrato não é concentrado após ser separado dos flocos de soja. O extrato é filtrado, e então carregado em uma coluna HPLC acondicionada com contas Kromasil C18 16μm 100Å disponível da Eka Nobel, Nobel Industries, Suécia. A coluna é eluída com 3 volumes de coluna de etanol aquoso a 30%, seguido por 3 volumes de coluna de etanol aquoso a 50%, seguido por 3 volumes de coluna de etanol aquoso a 80%. As frações de eluente contendo isoflavona são coletadas do efluente da coluna, onde as isoflavonas são detectadas por absorção de UV em 262 nm. As frações de eluente contendo isoflavona são combinadas, e são concentradas em um resíduo sólido por aquecimento das frações a 50°C sob pressão reduzida. O resíduo sólido é coletado para prover um material contendo isoflavona purificada.

EXEMPLO 7

Um material contendo isoflavona é formado a partir de trevo dos prados. O trevo dos prados é seco e colocado em um tanque de mistura com uma solução de etanol aquoso (75%) aquecido a 80°C. O trevo e a solução de etanol aquosa são misturados por um período de 10 horas, enquanto mantendo a

temperatura da mistura em 80°C. Após o trevo e o extrato terem sido misturados, um extrato enriquecido com isoflavona é recuperado por centrifugação da mistura e decantação do sobrenadante enriquecido com isoflavona. O extrato enriquecido com isoflavona é concentrado por aquecimento a 60°C sob pressão reduzida, por um tempo suficiente para remover o extrato e deixar um resíduo enriquecido com isoflavona.

EXEMPLO 8

Uma composição de proteína vegetal da presente invenção é formada por dispersão de qualquer um dos materiais contendo isoflavona formados nos Exemplos 4-8 no isolado de proteína de soja formado no Exemplo 1. O isolado de proteína de soja é colocado em um tanque de mistura, e o material contendo isoflavona é adicionado à proteína de soja. O isolado de proteína de soja e o material contendo isoflavona são misturados por um período de 30 minutos, após o que a composição de proteína vegetal é recuperada.

EXEMPLO 9

Uma composição de proteína vegetal da presente invenção é formada por dispersão de qualquer um dos materiais contendo isoflavona formados nos Exemplos 4-8 no concentrado de proteína de soja formado no Exemplo 2. O concentrado de proteína de soja é colocado em um tanque de mistura e o material contendo isoflavona é adicionado ao concentrado de proteína de soja. O concentrado de proteína de soja e o material contendo isoflavona são misturados por um período de 30 minutos, após o que a composição de proteína vegetal é recuperada.

EXEMPLO 10

Uma composição de proteína vegetal da presente invenção é formada por dispersão de qualquer um dos materiais contendo isoflavona formados nos Exemplos 4-8 no isolado de proteína de soja formado no Exemplo 3. O isolado de proteína de soja é colocado em um tanque de mistura, e o material contendo isoflavona é adicionado à proteína de soja. O isolado de proteína de soja e o material contendo isoflavona são misturados por um período de 30 minutos, após o que a composição de proteína vegetal é recuperada.

Deve ser entendido que os precedentes são concretizações meramente preferidas da invenção e que várias mudanças e alterações podem ser feitas, sem fugir do espírito e aspectos mais amplos da mesma conforme descritos nas reivindicações anexas, que devem ser interpretadas de acordo com os princípios da lei de patentes incluindo a Doutrina de Equivalências.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para formação de uma composição de proteína vegetal compreendendo um material contendo isoflavona disperso em um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona, o qual é um concentrado ou um isolado de proteína vegetal, o processo sendo **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender as seguintes etapas:

extração do material vegetal contendo proteína e isoflavonas com um extrator eficaz para solubilizar isoflavonas de modo a formar um extrato contendo isoflavonas;

separação de um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona contendo 65% de proteína por peso seco do dito extrato contendo isoflavonas;

formação de um material contendo isoflavona a partir do dito extrato;

dispersão do dito material contendo isoflavona no dito material de proteína vegetal exaurido de isoflavona.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de o dito material de proteína vegetal contendo proteína e isoflavonas compreender um material de soja.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato do material de soja ser selecionado de flocos de soja, farinha de soja, grãos de soja ou carne de soja.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do dito extrator ser selecionado de

água; álcool de peso molecular inferior, incluindo metanol, etanol, álcool isopropilílico, propanol, butanol e álcool isobutila; acetato de etila, acetona, acetonitrila e misturas dos mesmos.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da razão em peso do extrator para o dito material vegetal ser de 2:1 à 16:1.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do material de proteína vegetal exaurido de isoflavona ser separado do dito extrato contendo isoflavonas, por centrifugação do material vegetal e do dito extrator, e decantando o extrato do material de proteína vegetal.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do material de proteína vegetal exaurido de isoflavona ser separado do extrato contendo isoflavonas, por filtração do extrato do dito material de proteína vegetal.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do extrator ser um extrator alcalino aquoso, eficaz para solubilizar a dita proteína e as isoflavonas no dito material vegetal.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender a etapa de separar o dito extrator alcalino aquoso, dos materiais vegetais insolúveis, antes de separar o dito material de proteína exaurido de isoflavona do dito extrato contendo isoflavonas.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato da separação do material de proteína exaurido de isoflavona do extrato contendo isoflavonas compreender o ajuste do pH do dito extrator alcalino aquoso para o ponto isoelétrico da proteína no extrator, para precipitar o material de proteína exaurido de isoflavona, e separando o dito material de proteína exaurido de isoflavona precipitado do dito extrator aquoso, em um pH correspondente ao ponto isoelétrico da proteína para produzir um isolado de proteína vegetal e um extrato contendo isoflavonas.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do material vegetal ser extraído com um extrator de álcool aquoso e um concentrado de proteína vegetal ser separado do dito extrato contendo isoflavonas.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do dito material vegetal ser extraído com uma solução aquosa ácida possuindo um pH ao redor do ponto isoelétrico da dita proteína no dito material vegetal, e um concentrado de proteína vegetal ser separado do extrato contendo isoflavonas.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do material contendo isoflavona ser formado a partir do extrato por concentração do extrato.

14. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do material contendo isoflavona ser formado do dito extrato por recristalização do material contendo isoflavona no extrato, e separando o material contendo isoflavona recristalizada do extrato.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do material contendo isoflavona ser formado a partir do dito extrato, por contato do extrato com um material adsorvente, capaz de ligar de forma liberável as isoflavonas e compostos não contendo isoflavona em um composto de matéria específica, e após contatar o extrato com o material adsorvente, eluindo o dito material adsorvente com um eluente, no qual as ditas isoflavonas são solúveis, e coletando frações do dito eluente contendo um material de isoflavona purificada.

RESUMO

"PROCESSO PARA FORMAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNA VEGETAL CONTENDO UM MATERIAL DE PROTEÍNA VEGETAL EXAURIDO DE ISOFLAVONA COM UM MATERIAL CONTENDO ISOFLAVONA"

A presente invenção refere-se a uma composição de proteína vegetal. A composição de proteína vegetal contém um material de proteína vegetal exaurido de isoflavona e um material contendo isoflavona que é disperso no material de proteína vegetal exaurido de isoflavona. A composição pode ser usada em alimentos para prover os benefícios nutricionais do material de proteína vegetal exaurido de isoflavona, conquanto provendo os benefícios à saúde do material contendo isoflavona. A invenção também inclui processos para formação de tais composições de proteína vegetal.