

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Determinação de isoflavonas e capacidade antioxidante de
alimentos industrializados à base de soja e/ou produtos derivados
consumidos no Brasil

Marcela Roquim Alezandro

Dissertação para obtenção do título de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo
2009

Marcela Roquim Alezandro

Determinação de isoflavonas e capacidade antioxidante
de alimentos industrializados à base de soja e/ou
produtos derivados consumidos no Brasil

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Maria Inés Genovese
orientador/presidente

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado de uma longa caminhada, da qual muitas pessoas fizeram parte. Agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

De modo especial, agradeço a Deus pelo presente da vida e por todas as oportunidades que me julgou capaz de receber.

À minha família, principalmente à minha mãe, minha grande amiga, pelo apoio e amor. Sempre tão batalhadora, se fez capaz de prover o sustento da nossa família e garantir tudo o que foi necessário para a minha formação. Agradeço não somente as coisas materiais que foram conseguidas com o seu trabalho árduo, mas principalmente as noites mal dormidas, as preocupações, os conselhos, o colo, os abraços, as conversas... São tantas coisas que preciso agradecer, mas me faltam palavras. Você é o meu exemplo e tudo o que sou hoje, devo a você! Obrigada. À minha tia Irma que sempre me conforta com sábias palavras. À minha irmã Izabella, pelo bom humor, incentivo e carinho. Ao meu padrasto Ângelo, por sempre ter cumprido muito bem o seu papel de pai que lhe foi confiado por Deus. Muitos dos sonhos de vocês foram abdicados para que o meu se tornasse realidade!

À minha orientadora Prof. Dr. Maria Inés Genovese, por ter acreditado no meu potencial. Agradeço por tudo o que aprendi e por todas as oportunidades que me foram dadas. Também sou grata pelo seu exemplo como pesquisadora, pela dedicação, paciência, incentivo, confiança e amizade.

À Prof. Dr. Luciana Azevedo e à Prof. Elisabeth Pizzamiglio da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), que estiveram presentes nos meus primeiros passos durante a Iniciação Científica. Felizmente, foram capazes de despertar em mim o gosto pela pesquisa. Agradeço pela oportunidade, paciência e apoio.

À minha família paulistana (ou seria mato-grossense?): tia Maria, tio César, Any, Ta, Gu e Caio, pelo carinho, cuidado e respeito que sempre me trataram. Sou muito feliz pela oportunidade de ter cada um de vocês na minha vida.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Alexandra, Alexandre, Ana Cris, Any, Claudinéia, Débora, Dera, Diully, Fernanda, Gabriella, João Paulo, Juliana, Kátia, Lena, Luana, Lucile, Melina, Marcinha, Michele, Milana, Nelaine, Neuza, Roberta, Sandrinha, Sarah, Silvia, Talita e Tati. Alguns já não estão mais presentes no dia a dia, mas a contribuição de vocês é inesquecível. Obrigada pela colaboração, convívio e pelos momentos de descontração. Também agradeço à Lúcia Justino, Márcia Moraes, Tania Shiga e Aline Oliveira pelo constante auxílio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Eliana Bistriche Giuntini e à Prof. Inar Alves de Castro pela participação na banca do meu exame de qualificação. Não posso esquecer toda a paciência e empenho em me auxiliar. As contribuições de vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho. Aproveito para agradecer ainda aos outros professores do departamento, que de certa forma, contribuíram para a minha formação.

À Maria Cristina Lui, sempre tão solícita e gentil. Agradeço a constante disponibilidade e paciência para nos auxiliar na execução do projeto.

Muito obrigada aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Ao pessoal da secretaria do departamento, Cléo, Edilson e Mônica, e da secretaria de pós-graduação, Jorge e Elaine, pelo apoio sempre tão importante.

Agradeço ao CNPq (processo 471130/2007-9 e processo individual 382214/2007-2) e à Fapesp pelo suporte financeiro ao laboratório.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE QUADROS	II
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE ABREVIACÕES	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Alimentos funcionais	2
1.2 Compostos bioativos em alimentos	13
1.3 Capacidade antioxidante	17
1.3.1 <i>Espécies reativas de oxigênio</i>	18
1.3.2 <i>Métodos para determinação da capacidade antioxidante in vitro</i>	22
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Materiais	26
3.2 Métodos	27
3.2.1 <i>Determinação de umidade</i>	27
3.2.2 <i>Determinação do conteúdo protéico</i>	27
3.2.3 <i>Análise de isoflavonas</i>	27
3.2.3.1 EXTRAÇÃO	27
3.2.3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	28
3.2.4 <i>Determinação da capacidade antioxidante in vitro</i>	29
3.2.4.1 EXTRAÇÃO	29
3.2.4.2 REDUÇÃO DO REAGENTE DE FOLIN-CIOCALTEU (FENÓLICOS TOTAIS)	30
3.2.4.3 SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES DO DPPH•	30
3.2.4.4 CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC) .	31
3.2.5 <i>Determinação dos flavonóides</i>	33
3.2.5.1 EXTRAÇÃO	33

3.2.5.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	34
3.2.6	<i>Análise dos resultados</i>	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Alimentos industrializados contendo soja e/ou derivados	35
4.1.1	<i>Caracterização das amostras</i>	35
4.1.2	<i>Teor e perfil das isoflavonas</i>	41
4.1.3	<i>Determinação da capacidade antioxidante in vitro</i>	46
4.2	Condimentos e outros temperos	52
4.2.1	<i>Determinação da capacidade antioxidante in vitro</i>	52
4.2.2	<i>Determinação dos flavonóides</i>	58
4.3	Ingredientes industriais	61
4.3.1	<i>Determinação da capacidade antioxidante in vitro</i>	62
4.4	Refeições prontas	65
4.4.1	<i>Caracterização dos protótipos iniciais</i>	66
4.4.2	<i>Determinação da capacidade antioxidante in vitro</i>	69
4.4.3	<i>Determinação dos flavonóides</i>	76
4.4.4	<i>Caracterização dos protótipos definitivos</i>	78
4.4.5	<i>Determinação da capacidade antioxidante in vitro</i>	80
4.4.6	<i>Determinação dos flavonóides</i>	83
5.	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ANEXOS

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

Currículo Lattes

Ficha do Aluno

APÊNDICES

Cromatograma obtido por CLAE do produto doce de "leite" de soja.

Cromatograma obtido por CLAE do produto *nuggets* de soja.

Cromatograma obtido por CLAE do ingrediente isolado protéico de soja.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura geral das isoflavonas e do estradiol.	4
Figura 2	- Estrutura das isoflavonas da soja.	5
Figura 3	- Estrutura química das principais classes de flavonóides distribuídas na natureza.	15
Figura 4A	- Área de decaimento da amostra em relação ao controle.	32
Figura 4B	- Perda de fluorescência da fluoresceína na presença do antioxidante Trolox nas concentrações de 0,4 a 4,8 μ M.	32
Figura 5	- Conteúdo total e perfil de isoflavonas (% b.u.) dos produtos à base de soja e/ou derivados.	41
Figura 6	- Correlação entre o teor de proteína e o conteúdo total de isoflavonas dos produtos à base de soja e/ou derivados.	42
Figura 7	- Conteúdo total de isoflavonas (mg/100 g b.u.) dos derivados protéicos de soja utilizados como ingredientes em alguns dos produtos analisados.	44
Figura 8	- Perfil de distribuição das isoflavonas agliconas (%) nos produtos à base de soja e/ou derivados.	45
Figura 9	- Capacidade antioxidante total e das frações hidrofílica e lipofílica dos produtos contendo soja e/ou derivados, obtida por meio do método da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), expressa em μ moles equivalentes de Trolox/100 g de amostra (b.u.).	49
Figura 10	- Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de catequina/100 g b.u.) dos ingredientes industriais solubilizados em diferentes solventes.	63
Figura 11	- Capacidade sequestrante do DPPH (μ moles equivalentes de Trolox/100 g b.u.) dos ingredientes industriais solubilizados em diferentes solventes.	64
Figura 12	- Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de catequina/100 g b.u.) e capacidade	65

- sequestrante do DPPH (μ moles equivalentes de Trolox/100 g b.u.) dos ingredientes industriais empregados no processamento de alimentos funcionais.
- Figura 13** - Capacidade antioxidante da versão inicial dos protótipos determinada pelos métodos de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalente de catequina/100 g amostra b.u.) e capacidade sequestrante do DPPH• (μ moles equivalentes de Trolox/100 g amostra b.u.). 70
- Figura 14A** - Contribuição das frações hidro e lipofílica para a capacidade antioxidante total das refeições pela metodologia de extração E1. 72
- Figura 14B** - Contribuição das frações hidro e lipofílica para a capacidade antioxidante total das refeições pela metodologia de extração E2. 72
- Figura 14C** - Comparação da eficiência das extrações 1 e 2 para a capacidade antioxidante total das refeições. 72
- Figura 15** - Capacidade antioxidante da versão inicial dos protótipos determinada pelo método de capacidade de absorção do radical oxigênio (μ moles equivalentes de Trolox/100 g amostra b.u.). 73
- Figura 16** - Capacidade antioxidante da segunda versão dos protótipos determinada pelo método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalente de catequina/100 g amostra b.u.) e capacidade sequestrante do radical DPPH (μ moles equivalentes de Trolox/100 g amostra b.u.). 81
- Figura 17** - Capacidade antioxidante da segunda versão dos protótipos determinada pelo método de capacidade de absorção do radical oxigênio (μ moles equivalentes de Trolox/100 g amostra b.u.). 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de interesse biológico.	20
Quadro 2	- Listagem dos ingredientes empregados na formulação dos produtos à base de soja e/ou derivados protéicos e convencionais.	36
Quadro 3	- Nomes comuns e científicos e forma de apresentação comercial dos condimentos e temperos.	53
Quadro 4	- Caracterização da versão inicial dos protótipos.	67
Quadro 5	- Caracterização da segunda versão dos protótipos.	79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Conteúdo de umidade (%) e proteínas (% b. u.) dos produtos à base de soja e/ou derivados protéicos. 39
- Tabela 2** - Capacidade antioxidante dos produtos industrializados à base de soja e/ou derivados determinada por meio dos métodos de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de catequina/100 g amostra b.u.) e DPPH (μ moles equivalentes de trolox/100 g amostra b.u.). 47
- Tabela 3** - Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os diferentes métodos empregados para determinação da capacidade antioxidante dos alimentos à base de soja e/ou produtos derivados. 50
- Tabela 4** - Coeficientes de correlação de Pearson (r) obtidos entre a capacidade antioxidante determinada por diferentes métodos e o conteúdo de isoflavonas dos produtos contendo soja e/ou derivados protéicos. 51
- Tabela 5** - Capacidade redutora do reagente de Folin Ciocalteu, expressa em mg equivalentes de catequina/100 g b.u., dos condimentos desidratados (marcas A, B e C). 55
- Tabela 6** - Capacidade antioxidante (μ moles equivalentes de Trolox/100 g b.u.) dos condimentos desidratados (marca A, B e C) determinada pelo método do sequestro de radicais livres. 56
- Tabela 7** - Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre a capacidade redutora do Folin Ciocalteu e a capacidade antioxidante determinada pelo método do sequestro de radicais livres do DPPH nas diferentes marcas de condimentos analisadas. 57
- Tabela 8** - Conteúdo de flavonóides dos condimentos e temperos da marca A, expresso em mg/100 g b.u. 58
- Tabela 9** - Conteúdo de flavonóides dos condimentos e temperos da marca 59

B, expresso em mg/100 g b.u.

Tabela 10-	Conteúdo de flavonóides dos condimentos e temperos da marca C, expresso em mg/100 g b.u.	60
Tabela 11-	Conteúdo de umidade (%) e proteínas (% b.u.) dos protótipos na versão inicial das amostras.	68
Tabela 12-	Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os diferentes métodos utilizados para determinação da capacidade antioxidante dos protótipos das refeições prontas.	75
Tabela 13-	Conteúdo de flavonóides e ácido clorogênico identificados nos protótipos (versão inicial), expresso em mg/100 g b.u.	77
Tabela 14-	Conteúdo de umidade (%) e proteínas (% b.u.) dos protótipos na segunda versão das amostras.	80
Tabela 15-	Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os diferentes métodos de capacidade antioxidante.	83
Tabela 16-	Conteúdo de flavonóides e ácido clorogênico identificados nos protótipos (segunda versão), expresso em mg/100 g b.u.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

- % SRL** – Porcentagem de Sequestro de Radicais Livres
- AAPH** – 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato
- ABTS** – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)
- Ac** – Absorbância do Controle
- ADP** – Adenosina Difosfato
- Am** – Absorbância das Amostras
- ANOVA** – Análise de Variância
- Anvisa** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC** – *Association of Official Analytical Chemists*
- ASC** – Área Sob a Curva
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- BHT** – hidroxibutiltolueno
- b.u.** – Base Úmida
- CAT** – Catalase
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- Cu** – Cobre
- DAD** – *Diode Array Detector* (Detetor com Arranjo Diodo)
- DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- DPPH•** – Radical α, α -difeníl- β -picrilhidrazina
- EGCG** – Epigalocatequina Galato
- Embrapa** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ERN** – Espécies Reativas de Nitrogênio
- ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- GIP** – Polipeptídio Insulinotrópico Dependente de Glicose
- GLP1** – *Glucagon Like Peptide1*
- GPX** – Glutaciona Peroxidase
- HPLC** – *High Performance Liquid Chromatographic*
- IPI** – Isolado Protéico Isoelétrico

LSD – *Least Significant Difference*

N – Nitrogênio

ND – Não Determinado

ODS – *Octadecylsilica*

ORAC – *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

ORAC-H – Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (fração hidrossolúvel)

ORAC-L – Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (fração lipossolúvel)

PTFE – Politetrafluoretileno

Redox – Reações de Redução e Oxidação

RMCD – *Randomly Methylated Cyclo-Dextrin*

SBEM – Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

SOD – Superóxido Dismutase

TBCA/USP – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - USP

USDA – *United States Department of Agriculture*

UV – Ultravioleta

ALEZANDRO, M. R. – Determinação de isoflavonas e capacidade antioxidante de alimentos industrializados à base de soja e/ou produtos derivados consumidos no Brasil.

RESUMO

A soja contém alto conteúdo protéico e de lipídeos poliinsaturados e representa a principal fonte de isoflavonas. Por este grão não fazer parte da dieta brasileira, produtos contendo soja surgiram no mercado como fontes de isoflavonas, adaptados ao paladar da nossa população. Os condimentos também têm sido incorporados aos ditos “alimentos funcionais” pela sua relação com efeitos benéficos à saúde. Este trabalho objetivou determinar o teor de isoflavonas dos produtos contendo soja e/ou derivados, o teor de flavonóides de diferentes condimentos e marcas, e a capacidade antioxidante destas amostras. Os resultados mostram que o quibe vegetariano destaca-se como fonte de isoflavonas, e o chocolate pela capacidade antioxidante. Entre os condimentos, houve diferença significativa entre tipos e marcas. O orégano destacou-se quanto à capacidade antioxidante e a salsa quanto ao teor de flavonóides. Alimentos contendo soja ou derivados e os condimentos podem representar fontes de compostos bioativos para a população brasileira.

PALAVRAS-CHAVE: soja, derivados protéicos de soja, condimentos, capacidade antioxidante, flavonóides, isoflavonas.

ALEZANDRO, M. R. – Determination of isoflavones content and antioxidant capacity of industrialized foods containing soy and soy products consumed in Brazil.

ABSTRACT

Soy contains high protein and polyunsaturated lipids content and represents the main source of isoflavones. This grain is not part of the Brazilian diet, so some products containing soy emerged as sources of isoflavones, adapted to the taste of our population. Spices have also been incorporated into "functional foods" by their relation to health benefits. This study aimed to determine the isoflavone content of products containing soy and/or derivatives, flavonoids content in different brands and condiments, and antioxidant capacity of these samples. The results showed that vegetarian "quibe" is a good source of isoflavones, and chocolate had the highest antioxidant capacity. Among spices, there were significant differences between the types and brands. Oregano had the highest antioxidant capacity and parsley had the highest flavonoids content. Foods containing soy or derivatives and condiments may represent sources of bioactive compounds for Brazilian population.

KEY WORDS: soy, soy products, spices, antioxidant capacity, flavonoids, isoflavones.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa cultivada pelos chineses há cerca de cinco mil anos. No início do século XX, passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos e a introdução deste grão no Brasil ocorreu em 1908. Na década de 70, houve uma expressiva expansão agrícola da soja, decorrente do crescente interesse da indústria de óleo e da elevada demanda do mercado internacional. Os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais do grão, seguidos pelo Brasil, Argentina e China, os quais são responsáveis por cerca de 90% da produção total. No Brasil, os estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso contribuem com 65% dos grãos produzidos (SOUZA et al., 2000; ANDERSON, 1996).

A soja é um alimento bastante utilizado pelos orientais e seu consumo vem se estendendo pelo Ocidente. Trata-se de uma leguminosa caracterizada pela presença de elevado conteúdo de lipídeos poliinsaturados e de alto teor protéico (30-45%) de bom valor biológico. Outros componentes presentes na soja tais como minerais, vitaminas e compostos bioativos (isoflavonas, saponinas, fitatos, inibidores de proteases) a tornam uma opção alimentar saudável e popular para aqueles interessados em uma melhor qualidade de vida (FRIEDMAN; BRANDON, 2001).

Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado a reduzida incidência de câncer de mama, próstata e cólon nas populações asiáticas, nas quais o consumo *per capita* de soja é cerca de 20 a 50 vezes maior que nas populações ocidentais (CROUSE et al., 1999). Assim, a partir das evidências científicas, a agência reguladora de medicamentos e alimentos, Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, autorizou a alegação funcional de que “25 g de proteína de soja como parte de uma dieta baixa em gordura saturada e colesterol, podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares” (FDA, 1999). Da mesma forma, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou a alegação de propriedade funcional: “o consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (ANVISA, 2002 a).

Alguns estudos indicam que as isoflavonas também seriam as responsáveis pelos efeitos fisiológicos positivos da soja (CROUSE et al., 1999). No que se refere aos dizeres de rotulagem e o material publicitário dos produtos à base de soja, a Anvisa regulamenta que “não pode ser veiculada qualquer alegação em função das isoflavonas, seja de conteúdo (“contém”), funcional, de saúde e terapêutica (prevenção, tratamento e cura de doenças)” (ANVISA, 2002 b).

Os alimentos tradicionais à base de soja incluem tofu, miso, extrato e molhos de soja, entre outros (PSZCZOLA, 2002). Porém, no Brasil, o consumo da soja e seus produtos não é tão comum quanto o do feijão. Dessa forma, nos últimos anos, tem sido observado um interesse crescente das indústrias de alimentos em utilizar os derivados da soja como ingredientes na produção dos chamados “alimentos funcionais” (GENOVESE et al., 2007). Uma ampla variedade de alimentos enriquecidos com soja, tais como sucos, queijos e outros derivados de leite, massas e produtos cárneos começaram a ter destaque no mercado nacional. Isto possibilitou a criação de novas possibilidades de incorporação da soja na dieta brasileira, permitindo que a nossa população também se beneficie dos efeitos atribuídos a esse grão (PSZCZOLA, 2002).

1.1 Alimentos funcionais

O termo alimentos funcionais refere-se ao alimento ou ingrediente que apresenta alegação de propriedades funcionais ou de saúde. Podem, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999 a).

A soja é hoje o alimento que oferece maiores possibilidades para o desenvolvimento de produtos funcionais no Brasil, onde já existem algumas resoluções do Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, especificando que alimentos funcionais não podem ter indicação terapêutica, prometer cura ou prevenção de doenças (BRASIL, 1999 b).

O elevado conteúdo protéico de bom valor nutricional da soja, aliado ao seu baixo custo de produção e à alta produtividade, justifica o interesse no aumento do seu

consumo pela população. Nos países do Ocidente, o extrato de soja (“leite” de soja) tem sido utilizado como importante substituto do leite de vaca para as pessoas com intolerância à lactose e as alérgicas à proteína desse leite. Além disso, as evidências de efeitos benéficos associados à ingestão desta leguminosa têm contribuído para o aumento de consumo do extrato de soja, assim como de produtos derivados (ROSENTHAL et al., 2002).

O termo derivado protéico de soja refere-se aos produtos obtidos a partir do resíduo da extração do óleo. A farinha de soja pode ser integral ou desengordurada, tostada ou extrusada. O processo de desengorduramento não afeta o teor e o perfil das isoflavonas (ELDRIDGE; KWOLEK, 1983), mas interfere na solubilidade protéica por provocar desnaturação das proteínas (VISSER; THOMAS, 1987).

Os derivados protéicos da soja são amplamente empregados na produção de embutidos, pães, massas, bebidas, sopas e outros produtos (GENOVESE; LAJOLO, 2002). Entre os mais utilizados pela indústria estão as farinhas desengorduradas, proteína texturizada, isolados e concentrados protéicos, por esses apresentarem importantes propriedades físico-químicas, como geleificação, absorção de água e emulsificação (GENOVESE et al., 2007).

É importante considerar que a utilização da proteína texturizada de soja como ingrediente na indústria alimentícia para a fabricação de produtos cárneos, como hambúrgueres e salsichas, é permitida até 11,2% do peso seco. Dessa forma, o consumo de 100 g do produto final pode resultar em uma ingestão de 9,7 a 11,2 mg de isoflavonas. Considerando a quantidade e a frequência de consumo, esses resultados tornam evidente que a proteína texturizada de soja pode representar uma importante fonte de isoflavonas na dieta (GENOVESE; LAJOLO, 2002).

Atualmente, é crescente o interesse em incorporar ingredientes que possuam propriedades capazes de proporcionar efeitos benéficos à saúde (ARABBI, 2001). Nesse sentido, novos produtos alimentícios têm sido desenvolvidos por meio do avanço dos conhecimentos científicos, relacionando dieta e saúde, aliados aos custos elevados da saúde pública e aos interesses econômicos da indústria.

As isoflavonas são compostos químicos fenólicos, amplamente distribuídos no reino vegetal. As concentrações destes compostos são relativamente maiores nas

leguminosas e, em particular, na soja, sendo que as principais isoflavonas encontradas na soja e seus derivados são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína, as quais se apresentam como várias formas de conjugados glicosídicos, dependendo da extensão do processamento ou fermentação (WANG; MURPHY, 1994 a).

A estrutura química das isoflavonas agliconas é muito semelhante à do estrógeno 17 β -estradiol (Figura 1). As características que conferem a similaridade entre esses compostos são a presença do anel fenólico, imprescindível para que haja a ligação com o receptor, o peso molecular e a distância equivalente (11,5 Å) entre as hidroxilas 4' e 7 (CASSIDY et al., 2000; SONG et al., 1999).

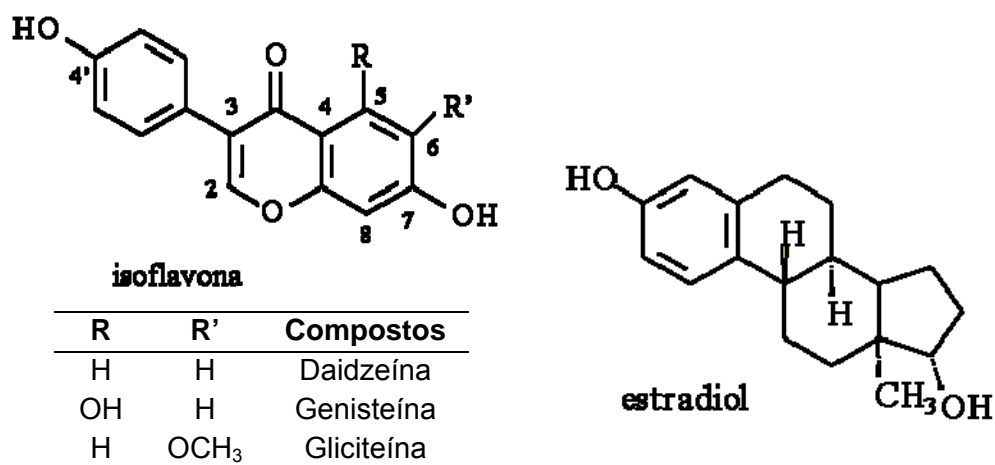
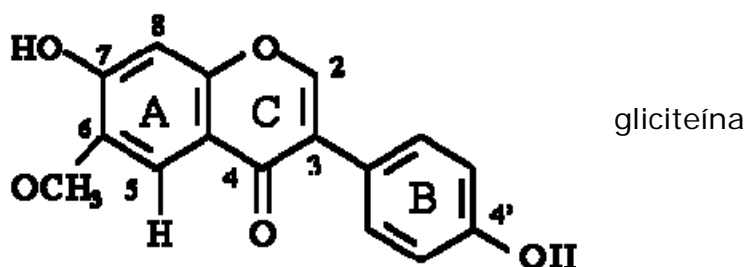
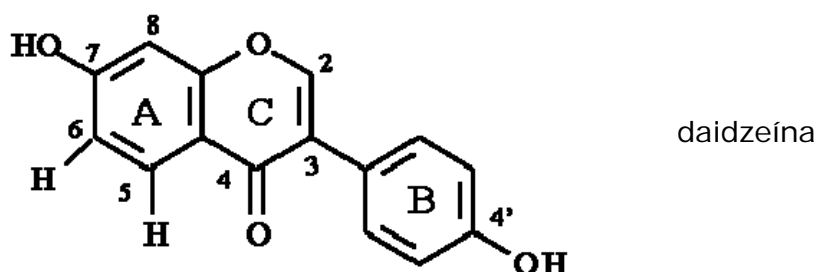
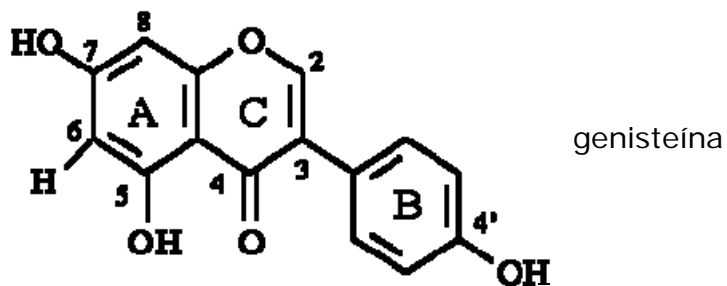


Figura 1 – Estrutura geral das isoflavonas e do estradiol (adaptado de Cassidy et al., 2000).

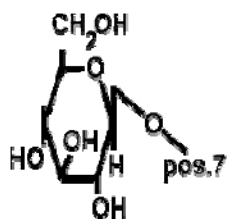
A soja possui três isoflavonas, que se apresentam em quatro formas químicas, somando assim 12 isômeros: as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína; os β -glicosídeos daidzina, genistina e glicitina; e os derivados glicosilados acetilados 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina; e glicosilados malonilados 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina (GRÜN et al., 2001; KUDOU et al., 1991; WANG et al., 1998; WANG; MURPHY, 1994 a, b) (Figura 2).

Agliconas:

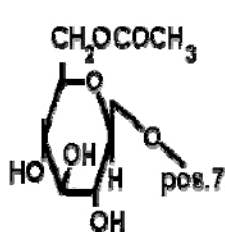


Glicosiladas:

β -glicosídeos



acetilglicosídeos



malonilglicosídeos

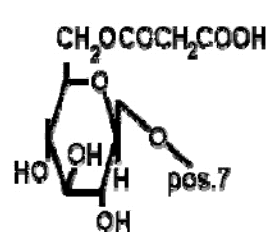


Figura 2 - Estruturas das isoflavonas da soja (adaptado de Wang e Murphy, 1994 b).

O teor das isoflavonas na soja é variável em função de diferenças genéticas entre as cultivares, além de sofrer influência da temperatura ambiental durante o desenvolvimento dos grãos (CASSIDY et al., 2000), assim como do período de estocagem, localização e época de plantio (PINTO et al., 2005). O processamento também é outro fator que interfere na concentração e no perfil das isoflavonas nos produtos derivados de soja e nos alimentos que os contêm como ingredientes (GENOVESE; LAJOLO, 2002).

Em trabalho realizado por Genovese et al. (2005), foram analisadas 14 variedades de soja desenvolvidas pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), em relação ao conteúdo e perfil de isoflavonas. O conteúdo de isoflavonas variou significativamente entre as variedades (57 a 188 mg de isoflavonas/100 g de grãos de soja), com valor médio de 116 ± 34 mg/100 g. Em relação ao perfil desses compostos, a maioria (90-95%) encontra-se na forma glicosilada. Os β -glicosídeos representam a principal forma (50-59%) seguidos pelos malonilglicosídeos (28-39%), os quais somam 82 a 91% do total de isoflavonas presentes no grão (GENOVESE et al., 2005).

O conteúdo total foi similar ao encontrado por Carrão-Panizzi et al. (1998), em estudo realizado com variedades de soja cultivadas no Paraná, cujo teor de isoflavonas foi de 54 a 147 mg/100 g. Barbosa et al. (2006 a) analisaram uma variedade de grãos de soja adquiridos no comércio de São Paulo. O teor de isoflavonas foi de 110 ± 2 mg/100 g, resultado similar ao encontrado em outros trabalhos. Entretanto, esses valores são inferiores aos obtidos em variedades americanas (116 – 274 mg/100 g) (GENOVESE et al., 2005). Choi et al. (2000) encontraram de 125 a 153 mg/100 g em variedades coreanas e Wang e Murphy (1994 a) encontraram um conteúdo variável entre 126 a 142 mg/100 g em variedades japonesas.

O calor empregado para a obtenção da farinha tostada ou extrusada é responsável por alterações no perfil das isoflavonas (COWARD et al., 1993). Por outro lado, promove efeitos favoráveis em relação ao valor nutricional, uma vez que inativa fatores antinutricionais, aumenta a digestibilidade protéica e reduz o “off-flavor”. Sabe-se que o aquecimento brando pode induzir uma pequena desnaturação protéica e conseqüente aumento da solubilidade (VISSER; THOMAS, 1987).

Resultados obtidos por Xu e colaboradores (2002) demonstraram que ocorre redução nos teores de glicosídeos desesterificados e formação de agliconas e acetilglicosídeos em aquecimento a 135°C. Os autores verificaram ainda que há diminuição drástica da forma glicosídica em temperatura superior a 185°C e degradação da forma aglicona em temperatura superior a 200°C.

A farinha de soja tostada ou extrusada, quando comparada ao grão, apresenta predominância de acetilglicosídeos em relação aos malonilglicosídeos, devido ao calor seco utilizado no processamento, o qual acarreta perda do dióxido de carbono (descarboxilação) dos malonilglicosídeos (FARAJ; VASANTHAN, 2004). A forma acetil pode ser convertida ainda, por desesterificação, em formas glicosídicas desesterificadas (COWARD et al., 1998).

O concentrado protéico é produzido a partir da farinha de soja e apresenta cerca de 70% de proteínas (ERICKSON, 1995). Para a obtenção deste produto, a farinha é submetida à extração para remoção dos carboidratos solúveis. Como solventes podem ser utilizados o álcool ou uma solução aquosa em pH 4,5. No entanto, a extração alcoólica resulta em perdas de grande parte das isoflavonas (FARAJ; VASANTHAN, 2004).

Em relação aos isolados protéicos de soja, existe uma ampla variedade de condições de processamento. A tecnologia empregada para a obtenção desses produtos permite o desenvolvimento de funcionalidade específica, otimizada para cada uma das aplicações indicadas, tais como, suplementos alimentares, panificação, produtos não-lácteos, entre outros (AGRAWAL et al., 2004).

Entre os derivados protéicos da soja, o isolado é a forma mais refinada, por apresentar em sua composição cerca de 90% de proteína. É obtido por meio do processo de extração aquosa da farinha em pH alcalino (6,8-10), para solubilização das proteínas, seguida da separação dos resíduos de fibras insolúveis do extrato por centrifugação ou filtração. O sobrenadante é submetido à acidificação (pH 4,5) para precipitação das proteínas, resultando em um produto denominado isolado protéico isoelétrico. Em seguida, por centrifugação, ocorre a separação dos açúcares solúveis. A etapa final do processo de obtenção do isolado é a secagem das proteínas por atomização (GARCIA et al., 1998).

O isolado protéico isoelétrico (IPI) apresenta baixa solubilidade em água e propriedades funcionais limitadas. Diferentes “proteínatos” podem ser obtidos por solubilização do IPI em água, neutralização com diferentes bases e secagem da solução ou suspensão resultante. Dependendo da base empregada para neutralização, podem ser formados “proteínatos” de sódio, potássio, amônio ou cálcio. Os três primeiros produtos são altamente solúveis em água, produzindo soluções com elevada viscosidade e capacidade de formação de espuma, gel e emulsificação. Já o “proteínato” de cálcio tem baixa solubilidade e é utilizado em formulações nas quais seja necessária a incorporação de altos níveis de proteína sem que haja viscosidade excessiva do produto (BERK, 1992).

Quanto ao perfil das isoflavonas, observa-se maior conteúdo de agliconas em relação aos glicosídeos desesterificados, devido à conversão de conjugados β -glicosídeos em agliconas por meio de uma reação catalisada por enzimas β -glicosidases endógenas da soja ou de origem microbiana (GENOVESE et al., 2007). Durante a hidratação dos grãos de soja, as β -glicosidases endógenas podem ser ativadas e atuar sobre os β -glicosídeos convertendo-os em agliconas (MATSUURA; OBATA, 1993). É importante considerar que o processo de secagem por atomização também é responsável por alteração no perfil das isoflavonas como resultado do aquecimento, o que provoca aumento do conteúdo de acetilglicosídeos e redução do teor de malonilglicosídeos (GENOVESE et al., 2007).

A proteína texturizada de soja pode ser obtida a partir da farinha, concentrado ou isolado protéico, os quais são submetidos a altas forças de corte em elevada temperatura e pressão, em um processo denominado extrusão. Assim, é formado um produto com uma estrutura laminar peculiar, expandido e poroso. Após a hidratação, este produto apresenta uma textura elástica e consistência parecida com a da carne. A principal razão para o emprego da proteína texturizada de soja em produtos cárneos refere-se à sua capacidade de absorver água e gordura, o que resulta em aumento da suculência do alimento. Além disso, por se tratar de um ingrediente barato, a adição da proteína texturizada de soja como substituto parcial da carne permite reduzir os custos de produção (BERK, 1992).

As propriedades físico-químicas das proteínas de soja estão relacionadas com parâmetros como composição e sequência de aminoácidos, conformação e estrutura quaternária, peso molecular e ponto isoelétrico, e depende da interação das proteínas com os componentes do alimento (água, íons, lipídeos, carboidratos, aromas) e das condições de temperatura, pH e força iônica do meio. As propriedades físico-químicas dos isolados protéicos são suscetíveis a alterações em decorrência das condições utilizadas em seu processamento para extração e remoção de lipídeos e para extração, isolamento e secagem das proteínas (MORR, 1990).

As propriedades nutricionais e físico-químicas são fatores determinantes para a aceitação de novos ingredientes protéicos pela indústria de alimentos. Além da melhoria das características nutricionais, vários estudos têm demonstrado a contribuição das proteínas da soja na melhoria de certas propriedades físico-químicas em sistemas alimentares (WANG et al., 2000).

Solubilidade ou dispersibilidade da proteína de soja é a primeira propriedade a ser estudada numa investigação sistemática, devido a sua influência em outras propriedades físico-químicas, como a geleificação e emulsificação. Estudos relatam que a solubilidade das farinhas de soja em água diminui de acordo com o grau de tratamento térmico recebido (KINSELLA, 1979).

A capacidade de formação de géis, que atuam como uma matriz que retém água, açúcares, lipídeos, aromas e outros ingredientes, é uma propriedade muito útil na elaboração de alimentos. Além disso, a capacidade de absorção e retenção de água das proteínas da soja é de grande importância em produtos cárneos, nos quais impedem a perda de umidade durante o cozimento, e em produtos de panificação, nos quais aumentam a vida de prateleira (KINSELLA, 1979).

As proteínas da soja são consideradas bons agentes espumantes ou aerantes. Portanto, elas são usadas funcionalmente na manufatura de muitos produtos alimentícios como suspiro, suflê, coberturas de bolos, sobremesas e sorvetes. Colaboram também na formação de emulsões óleo/água e na sua estabilização uma vez formadas. As proteínas ficam adsorvidas na interface óleo/água e diminuem a tensão superficial, facilitando a formação de emulsões (WANG et al., 2000).

A farinha de soja desengordurada é muito utilizada no enriquecimento protéico de pães, bolachas, tortas e outros tipos de alimentos de confeitaria. Por suas características físico-químicas, o isolado protéico de soja é um ingrediente importante no processamento de suplementos alimentares (misturas em pó), bebidas prontas para o consumo, panificação e produtos cárneos, tais como salsichas, linguiças, mortadelas, almôndegas, quibes e hambúrgueres. Outra consideração importante é que a adição de farinhas e concentrados protéicos de soja em porcentagem maior que 10% em produtos cárneos compromete as características do alimento relacionadas à textura e aroma, o que não ocorre com o isolado protéico (KINSELLA, 1979).

Segundo Garcia e colaboradores (1998), os concentrados protéicos são extensivamente empregados no processamento de produtos cárneos devido às suas propriedades físico-químicas. A sua aplicação é capaz de melhorar a estabilidade da emulsão, potencializar características como firmeza, flexibilidade e textura, promover incremento na qualidade nutricional, além de atuar como agente extensor reduzindo o encolhimento durante o cozimento. E ainda, apresentam baixo custo quando comparados às proteínas de origem animal.

Já as proteínas texturizadas de soja são amplamente consumidas como substitutos da carne e pela indústria alimentícia como ingrediente alimentar, uma vez que apresentam textura similar a tecidos musculares, elevada capacidade de hidratação e fácil incorporação de sabor e aroma (GENOVESE; LAJOLO, 2002).

Além da soja e seus derivados protéicos, outros ingredientes têm sido largamente utilizados nos chamados “alimentos funcionais”. Nesse sentido, os condimentos têm se destacado não apenas como agentes capazes de agregar características relacionadas ao sabor, aroma e cor às preparações, mas também devido ao seu reconhecido potencial de reduzir o risco de desenvolvimento de certas doenças. Muitos deles estão relacionados a inúmeros efeitos benéficos à saúde, tais como ação estimulante da digestão, atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antimutagênica, antioxidante, hipolipidêmica, entre outras (SU et al., 2007).

Os condimentos podem conter compostos fenólicos e contribuir para a ingestão de antioxidantes naturais, os quais promovem a proteção de componentes celulares importantes, como DNA, proteínas e membranas lipídicas contra a ação de espécies

reativas de oxigênio (SU et al., 2007). Os compostos fenólicos apresentam propriedades *redox*, as quais podem ser resultado de vários mecanismos: capacidade sequestradora de radicais livres, atividade quelante de metais de transição e/ou redutora de oxigênio singlete. Além disso, esses compostos também são conhecidos por seu papel na estabilização da peroxidação lipídica e inibição de inúmeros tipos de enzimas oxidantes (SHAN et al., 2005).

Os condimentos, assim como os vegetais e frutas, são conhecidos por apresentarem ampla variedade de propriedades e efeitos antioxidantes, os quais têm sido alvo de investigação nos últimos 50 anos. Pesquisas indicam que o alecrim e o orégano destacam-se pela elevada capacidade antioxidante (SHAN et al., 2005).

Nas últimas décadas, um grande número de substâncias fenólicas foi isolado de condimentos, as quais incluem ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido caféico, entre outros), flavonóides (quercetina, rutina, miricetina, luteolina, naringenina), óleos voláteis, além de outros compostos (SHAN et al., 2005).

A presença de antioxidantes no alecrim é bem conhecida e muitos compostos fenólicos têm sido associados à atividade antioxidante (OKAMURA et al., 1994). Alguns pesquisadores concordam que o alecrim é o condimento que mais se destaca em relação à capacidade antioxidante. Entretanto, outros estudos apontam que o orégano e o louro apresentam resultados mais expressivos para este mesmo parâmetro. Estas diferenças podem estar relacionadas ao genótipo das espécies, fatores ambientais (solo, temperatura, umidade), período de coleta das amostras, métodos analíticos, entre outros (SHAN et al., 2005).

Extratos brutos de frutas, ervas, vegetais, cereais e outros materiais vegetais ricos em fenólicos têm atraído o interesse das indústrias alimentícias, devido à sua capacidade de retardar a degradação oxidativa de lipídeos e assim, melhorar a qualidade e valor nutricional dos alimentos (KÄKHÖNEN et al., 1999). Recentemente, os estudos têm focado os efeitos sinérgicos dos fitoquímicos na regulação da expressão gênica e sua potencial utilização em “alimentos funcionais”. Os resultados desses estudos não apenas encorajam os consumidores a modificarem seu comportamento alimentar, mas também estimulam o desenvolvimento de ingredientes à

base de tais compostos obtidos de frutas e vegetais com efeitos benéficos à saúde (PSZCZOLA, 2002).

Recentemente, foram lançadas no mercado diversos chás e outras bebidas com ingredientes antioxidantes, principalmente o extrato de chá verde. Esse extrato é rico em polifenóis, os quais podem ter um importante papel como antioxidante (PSZCZOLA, 2002). Como ingrediente industrial, representa um concentrado de epigallocatequina galato (EGCG), possivelmente pelo seu maior teor entre as catequinas do chá verde. Este composto impediu o crescimento de tumores de fígado e intestino em ratos (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). É disponível em uma forma solúvel em água para ser empregado em alimentos e bebidas.

Estudos realizados nos últimos anos evidenciaram que os benefícios terapêuticos do tomate são resultantes de um sinergismo complexo dos fitonutrientes presentes no alimento e não de um composto isoladamente. Nesse sentido, está disponível para a indústria alimentícia um ingrediente composto por licopeno em combinação com azeite de oliva. Além dos benefícios à saúde associados ao próprio azeite, este também apresenta sinergismo com a oleoresina do licopeno. Outros carotenóides, como a luteína e o beta-caroteno também têm sido utilizados para o desenvolvimento de ingredientes funcionais (PSZCZOLA, 2002).

Pesquisadores sugerem que o consumo de alimentos da dieta mediterrânea, particularmente peixe, vegetais frescos, azeitona e azeite de oliva pode contribuir para a redução do risco do desenvolvimento de certas doenças. Voluntários portadores de artrite reumatóide submetidos a esse perfil alimentar mostraram redução na inflamação e aumento da mobilidade física e vitalidade. Esses efeitos são atribuídos especificamente à composição dos ácidos graxos do peixe e do azeite de oliva e aos polifenóis das frutas e azeitonas. Recentemente, foi desenvolvido um ingrediente derivado de uma fração aquosa de azeitonas, o qual demonstrou elevado potencial antioxidante e atividade anti-inflamatória (BITLER et al., 2007).

Nesse sentido, a introdução de extratos purificados de compostos bioativos em matrizes alimentares variadas pode representar uma alternativa interessante para aumentar o consumo destas substâncias e permitir que a população se beneficie dos efeitos positivos atribuídos a elas (BITLER et al., 2007).

1.2 Compostos bioativos em alimentos

Os alimentos fornecem não somente nutrientes essenciais necessários para a vida, mas também compostos bioativos que promovem benefícios à saúde e reduzem o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis. Esse efeito protetor tem sido atribuído, em grande parte, a propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividades antioxidante, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica de nutrientes como as vitaminas C, A e E, e de compostos fenólicos como os flavonóides. Entre estes podemos citar as catequinas do chá verde e do vinho, as antocianinas dos frutos vermelhos, os flavonóis das folhas e as isoflavonas da soja (RICE-EVANS et al., 1996; SEIFRIED et al., 2007). Peptídeos e aminoácidos livres, embora menos conhecidos, não são menos importantes (PARK et al., 1997). Estudos também têm relatado que proteínas de diferentes fontes apresentam atividade antioxidante. Segundo Tong et al. (2000), as proteínas são capazes de exercer esta atividade por sequestrarem metais de transição e/ou radicais livres pelos aminoácidos tirosina e cisteína.

Além dos compostos fenólicos e das vitaminas, os carotenóides, presentes de forma abundante na natureza, também têm demonstrado importante papel como antioxidantes. Precursores da vitamina A, o β -caroteno e seus derivados possuem um extenso sistema de duplas ligações conjugadas, e este sistema é responsável pela eficácia destes compostos antioxidantes (GERMAN; DILLARD, 1998).

Dados sobre o metabolismo do ácido clorogênico em humanos ainda são escassos. Em pesquisa realizada com indivíduos ileostomizados ingerindo ácido clorogênico e ácido cafeico para verificar a absorção destes compostos, foram sugeridos dois mecanismos para absorção do ácido clorogênico: o primeiro seria a absorção deste na sua forma molecular intacta, já que traços de ácido clorogênico foram encontrados na urina após sua ingestão. É provável que tenha sido intensamente metabolizado após sua absorção, visto que foram encontrados apenas traços na urina. O segundo mecanismo envolveria a hidrólise do ácido clorogênico no estômago e/ou intestino delgado em ácido cafeico e ácido quínico para então serem absorvidos

(OLTHOF et al., 2003). Estudos biológicos mostraram elevada capacidade antioxidante e propriedades anticarcinogênicas *in vitro* do ácido clorogênico (CLIFFORD, 2004).

Devido à incompleta eficiência de nosso sistema endógeno de defesa, a influência de fatores externos como fumo, poluição, radiação UV e alimentação, bem como a existência de alguns processos fisiopatológicos (envelhecimento, obesidade, inflamação e isquemia), está bem estabelecida a importância de compostos bioativos provenientes da dieta que podem ajudar a suprir esta deficiência e também promover proteção, prevenção ou redução dos efeitos causados pelo estresse oxidativo (HUANG et al., 2005; PIETTA, 2000).

Os compostos fenólicos representam um importante grupo entre os compostos bioativos. Representam a principal classe de metabólitos secundários presentes nas plantas e encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal. Eles são derivados das vias do ácido chiquímico e fenilpropanoídica e podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. Os três maiores grupos de fenólicos da dieta são os flavonóides, os ácidos fenólicos e os polifenóis (taninos) (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Os flavonóides são caracterizados estruturalmente como difenilpropanos (C6-C3-C6) com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis, identificados como A, B e C (HERTOG et al., 1992; KARAKAYA, 2004). Ocorrem naturalmente em frutas, vegetais, sementes, grãos e flores, sendo, portanto, componentes usuais da dieta humana (COOK; SAMMAN, 1996). A sua estrutura química permite sua classificação em flavanonas, flavonas, flavonóis, flavanóis (catequinas), dihidroflavonóis, isoflavonas e antocianinas (Figura 3). As diferenças individuais presentes em cada grupo são resultado da variação no número e no arranjo dos grupos hidroxilas, assim como a natureza e a quantidade de alquilações e/ou glicosilações destes grupos (RICE-EVANS et al., 1996; SCALBERT et al., 2005).

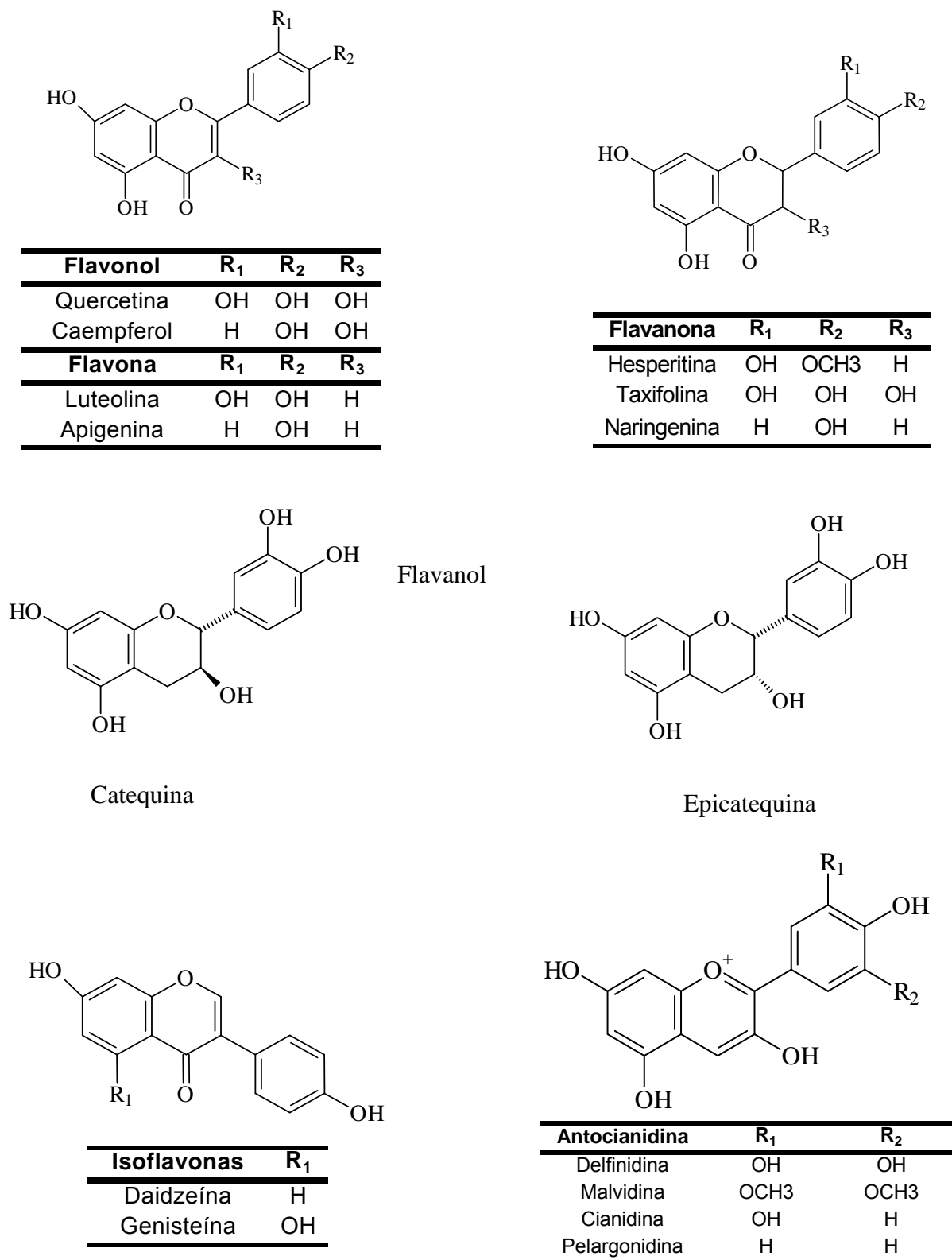


Figura 3 – Estrutura química das principais classes de flavonóides distribuídas na natureza.

Uma ampla variedade de flavonóides tem sido identificada em plantas e as diferenças relacionadas ao tipo e quantidade estão associadas às condições de crescimento e maturação das plantas. No entanto, apenas um número reduzido de espécies vegetais tem sido investigado quanto ao conteúdo desses compostos e a identificação e quantificação de todos os tipos de flavonóides consumidos pelos seres humanos ainda é incompleta (COOK; SAMMAN, 2000).

Os flavonóides estão associados com o comportamento ecológico de algumas plantas. Devido às cores vibrantes apresentadas por alguns flavonóides (flavonas e antocianinas), estes podem agir como atrativos para insetos polinizadores; além disso, a característica adstringente das catequinas e outros flavanóis representam um sistema de defesa contra alguns insetos. Os flavonóides também podem agir como protetores de células vegetais por sequestrar espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pela radiação UV necessária à fotossíntese (PIETTA, 2000).

Estudos *in vitro* têm mostrado que os flavonóides podem inibir e, às vezes, induzir diversas enzimas, envolvidas em importantes processos reguladores como a divisão e proliferação celular, agregação plaquetária, resposta inflamatória e imune do organismo humano e detoxificação (SEINFRIED et al., 2007; WILLIAMS et al., 2004).

A capacidade antioxidante demonstrada pelos flavonóides é uma das atividades biológicas que mais têm sido associadas com a redução do risco de enfermidades emergentes de países desenvolvidos, como doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (MARTÍNEZ-VALVERDE et al., 2000). No entanto, os mecanismos pelos quais estes compostos exerceriam sua atividade anticarcinogênica e reduziriam o risco de desenvolvimento de doenças ainda não estão definitivamente estabelecidos.

Arabbi e colaboradores (2004) analisaram diversos vegetais consumidos no Brasil quanto ao teor de flavonóides e estimaram o consumo desses compostos pela população brasileira (17-88 anos). Os resultados indicaram uma ingestão de cerca de 79 mg/dia para mulheres e 86 mg/dia para homens, sendo laranja (70%), cenoura (9%) e tomate (2,5%) as fontes alimentares mais expressivas.

Em um trabalho desenvolvido por Arai e colaboradores (2000), foi realizada uma estimativa da ingestão de flavonóis, flavonas e isoflavonas por mulheres japonesas. O cálculo foi baseado em uma tabela de composição de fitoquímicos em alimentos e

reflete a média da ingestão de três dias conforme descrito pelos voluntários em recordatório alimentar. O consumo de isoflavonas foi 47,2 mg/dia e o tofu foi o alimento que mais contribuiu como fonte desse fitoquímico (37%). A ingestão de isoflavonas foi superior a dos outros antioxidantes, como flavonóides (16,7 mg/dia), dada como a soma de flavonóis e flavonas, carotenóides (3,5 mg/dia) e vitamina E (8,2 mg/dia).

Outro estudo realizado com mulheres japonesas e chinesas indicou uma ingestão de isoflavonas de 50 e 77 mg/dia, respectivamente, o que confirma o valor estimado por Arai et al. (2000). Entre os homens chineses, a ingestão foi de 100 mg/dia (DJURIC et al., 2001). Informações de um trabalho realizado pela Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) que compilou dados de diversas pesquisas, apontam o consumo médio de isoflavonas em diversas populações. Os autores relatam que os orientais (japoneses, coreanos e chineses) ingerem cerca de 20 a 150 mg/dia, enquanto a dieta ocidental contém apenas 1 a 3 mg/dia (CLAPAUCH et al., 2002).

Entretanto, não há um controle sobre o cultivo e o armazenamento dos produtos fontes de isoflavonas, nem padronização das fórmulas de suplementos dietéticos, o que colabora para que haja variações significativas no teor de isoflavonas. Existe controvérsia sobre se os efeitos das isoflavonas estão relacionados à presença de outros componentes nos grãos integrais ou se podem ser obtidos por meio da ingestão isolada do composto. Além disso, recomenda-se associar a ingestão de isoflavonas a uma alimentação balanceada e hábitos saudáveis, como consumir mais frutas e hortaliças e menos gordura de origem animal, para que os efeitos benéficos associados às isoflavonas possam ser alcançados (CROUSE et al., 1999).

1.3 Capacidade antioxidante

Nos últimos anos, as pesquisas com antioxidantes naturais tiveram grande destaque junto à comunidade científica. As suspeitas de que os antioxidantes sintéticos sejam carcinogênicos têm direcionado os estudos para os compostos naturais, principalmente aqueles encontrados em plantas (SINGH et al., 2002). É crescente o interesse para que os antioxidantes naturais substituam os artificiais ou atuem em conjunto com os mesmos, reduzindo a sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002).

A oxidação provoca inúmeras alterações indesejáveis nos alimentos, as quais podem afetar as características sensoriais dos produtos ou reduzir o seu valor nutricional. Estas razões evidenciam que os antioxidantes apresentam um importante papel no processamento e estocagem dos alimentos (KLIMCZAK; PACHOLEK, 2002).

Em sistemas biológicos, as espécies reativas de oxigênio reagem com biomoléculas como proteínas e lipídeos, causando graves danos na membrana celular e em seu DNA. Há evidências de que esses processos estejam fortemente relacionados à carcinogênese e às degenerações relativas à idade (MADHUKITH; SHAHIDI, 2005).

O organismo humano é capaz de neutralizar a ação tóxica das ERO por meio de um efetivo sistema de defesa, o qual inclui enzimas com ação antioxidante (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase) (ISSA et al., 2006). Alguns componentes dos alimentos, como os compostos fenólicos, possuem atividade antioxidante e são coadjuvantes neste sistema de defesa (MENDIS et al., 2005).

Os antioxidantes podem ser fisicamente classificados por sua solubilidade em: hidrofílicos, tais como a vitamina C e a maioria dos polifenóis, e lipofílicos, os quais incluem a vitamina E e os carotenóides. Assim como os antioxidantes hidrofílicos, os lipofílicos apresentam um importante papel em processos bioquímicos e fisiológicos. O principal interesse está em sua excelente atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Diferentemente dos hidrofílicos, os quais são excretados na urina, os antioxidantes lipofílicos se acumulam no corpo, penetram na membrana celular lipoprotéica mais facilmente e alcançam um alto grau de biodisponibilidade (HALLIWELL, 1996).

Embora esteja estabelecida a importância dos compostos lipofílicos, não é usual medir com precisão sua atividade antioxidante *in vitro*. Sem o conhecimento da eficácia real dos antioxidantes lipofílicos, os consumidores podem ser expostos a concentrações inseguras ou dosagens ineficientes desses compostos (HUANG et al., 2002).

1.3.1 Espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos capazes de possuir existência independente contendo um ou mais elétrons não-pareados em seu orbital. São altamente instáveis, com meia-vida curta e quimicamente muito reativos,

podendo causar danos por reagir com praticamente qualquer molécula que entra em contato (HALLIWELL; GUTTERIDGE,1998). O termo coletivo Espécie Reativa de Oxigênio/Nitrogênio é usado para identificar radicais e alguns não- radicais que se apresentam como agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais (HALLIWELL,1996). O Quadro 1 mostra alguns dos principais radicais livres de interesse biológico provenientes do metabolismo celular.

Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo celular liberados durante o processo de redução do oxigênio, utilizado para converter em energia os nutrientes absorvidos dos alimentos. Os organismos aeróbicos, durante a evolução, não apenas se adaptaram à existência de radicais livres, mas também desenvolveram mecanismos que permitiam o uso vantajoso destes radicais em vários processos fisiológicos nas células (VALKON et al., 2007).

Tanto espécies reativas de oxigênio (ERO) quanto espécies reativas de nitrogênio (ERN) são produzidas para ajudar na manutenção da homeostase celular ou regulação de reações de redução e oxidação (redox) em tecidos saudáveis (DEVASAGAYAM et al., 2004). Estes radicais, em baixas concentrações, podem atuar de maneira benéfica em defesa contra agentes infecciosos, formação de ATP através de ADP na mitocôndria, regulação do crescimento celular e produção de oxigenases (lipooxigenase e ciclooxigenase) para formação de prostaglandinas e leucotrienos.

A produção descontrolada de radicais e ERO ou a deficiência de mecanismos de defesa devido à desnutrição podem ser prejudiciais e, conseqüentemente, induzir a oxidação de lipídios de membrana, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA, prejudicando o equilíbrio e gerando o estresse oxidativo ou danos oxidativos (HALLIWELL, 1994; LANGSETH, 2000; PIETTA, 2000; VALKON et al., 2007). O dano causado a esses componentes celulares se acumula, com o passar dos anos, e contribui para a degeneração de células somáticas e indução de doenças crônicas não transmissíveis, especialmente associadas com o avanço da idade, destacando-se câncer, aterosclerose, doenças inflamatórias, mal de Parkinson, mal de Alzheimer e catarata. (LANGSETH, 2000; SCALBERT et al., 2005). Por isso, em sistemas biológicos existe um equilíbrio entre os fatores que promovem a oxidação e os mecanismos antioxidantes de defesa, incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Quadro 1 - Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de interesse biológico.

ESPÉCIES REATIVAS	SÍMBOLO	MEIA-VIDA (EM SEG)	REATIVIDADE
Espécies reativas de oxigênio:			
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6}	Gerado na mitocôndria, em sistema cardiovascular e outros.
Radical hidroxila	$\cdot OH$	10^{-9}	Altamente reativo, gerado durante sobrecarga de ferro e situações semelhantes em nosso corpo.
Peróxido de Hidrogênio	H_2O_2	Estável	Formado em nosso corpo pelo amplo número de reações, formando radicais potentes como $\cdot OH$.
Radical peroxila	$ROO\cdot$	Segundos	Reativo e formado de lipídios, proteínas, DNA, etc., durante o dano oxidativo.
Hidroperóxido orgânico	$ROOH$	Estável	Reage com íons metálicos formando espécies reativas
Oxigênio singlete	1O_2	10^{-5}	Altamente reativo formado por fotossensibilidade e reações químicas.
Ozônio	O_3	Segundos	Presente como poluente atmosférico, pode reagir com várias moléculas, produzindo 1O_2 .
Espécies reativas de nitrogênio:			
Óxido nítrico	$NO\cdot$	Segundos	Neurotransmissor e regulador da pressão sanguínea, pode gerar potentes oxidantes durante estados patológicos.
Peróxinitrito	$ONOO^-$	10^{-3}	Formado a partir do NO^- e superóxido, é altamente reativo.
Ácido peróxinitroso	$ONOOH$	Ligeiramente estável	Forma protonada do $ONOO^-$.
Dióxido de nitrogênio	NO_2	Segundos	Formado pela poluição do ar.

Fonte: DEVASAGAYAM et al., 2004.

Um antioxidante é uma substância sintética ou natural adicionada em produtos para prevenir ou retardar a deterioração dos mesmos pela ação do oxigênio presente no ar. Em bioquímica e medicina, os antioxidantes são enzimas ou outras substâncias orgânicas, como a vitamina E ou o β -caroteno, capazes de agir contra danos da oxidação em tecido animal (HUANG et al., 2005).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1998), os mecanismos de ação antioxidante incluem (a) suprimir a formação de espécies reativas tanto pela inibição enzimática ou por quelar elementos-traço envolvidos na produção de radicais livres, (b) eliminar espécies reativas de oxigênio e, (c) manter o mecanismo antioxidante de defesa regulado e protegido.

Os antioxidantes podem ser classificados em: **antioxidantes primários**, aqueles que interrompem a cadeia de reações envolvidas na oxidação lipídica através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres convertendo-os em produtos mais estáveis termodinamicamente, e **antioxidantes secundários**, aqueles compostos que reduzem ou retardam a taxa de iniciação da oxidação por decompor hidroperóxidos (SHAHIDI; NACZK, 2004). A presença destas moléculas não está relacionada diretamente com o dano, mas a sua formação indica que a oxidação já ocorreu e que sua decomposição por metais pode dar origem a espécies reativas como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) ou radical alcoxila ($\text{RO}\bullet$).

Os antioxidantes naturais ou sintéticos interferem na participação do oxigênio singlete e atuam, principalmente, como inibidores da reação, fazendo o papel ou de doadores de hidrogênio ou de receptores de radicais livres dos ácidos graxos. Os receptores de radicais livres (AH) reagem primeiramente com $\text{RO}_2\bullet$ e não com radicais $\text{R}\bullet$, favorecendo uma competição entre os antioxidantes e a propagação da reação em cadeia, na presença do ácido graxo (RH). Com isso, eles intervêm na fase de iniciação da reação, produzindo compostos estáveis que retardam o processo de oxidação (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

O mecanismo antioxidante de defesa contra radicais livres, desenvolvido pelos seres humanos, inclui a produção de alguns antioxidantes no organismo (endógenos) e outros obtidos da dieta (exógenos). Dentre os antioxidantes endógenos, destacam-se enzimas como a glutathiona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido

dismutase (SOD), que metabolizam superóxidos, peróxido de hidrogênio e peróxido de lipídios, prevenindo, deste modo, a formação de $\bullet\text{OH}$. Destacam-se também os antioxidantes não-enzimáticos, provenientes da dieta, como os inibidores de enzimas oxidativas (ciclooxigenase), alguns cofatores enzimáticos, sequestrantes de ERO/ERN e os quelantes de metais de transição (LANGSETH, 2000; PIETTA, 2000). Além disso, a capacidade antioxidante no interior de uma célula está atribuída principalmente ao sistema enzimático, enquanto que no plasma a capacidade antioxidante está relacionada com moléculas de baixo peso molecular, algumas provenientes da dieta, como as vitaminas e os compostos bioativos, e outras consideradas produtos de vias metabólicas, como urato e glutatona (FREI, et al. 1989; GHISELLI et al., 2000).

1.3.2 Métodos para avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

A medida de capacidade antioxidante reflete a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes em um extrato ou amostra biológica proporcionando, desta forma, uma análise de parâmetros integrados. A capacidade antioxidante pode ser considerada um marcador sensível e confiável para detectar mudanças no estresse oxidativo *in vivo*, fornecendo ajuda na elucidação de fatores fisiológicos e nutricionais importantes (GHISELLI et al., 2000).

Inúmeros experimentos acerca das propriedades antioxidantes de diferentes matrizes alimentares e ingredientes isolados têm sido conduzidos empregando diferentes métodos analíticos. Entretanto, a ampla variedade de sistemas de oxidação e de meios de mensuração da atividade antioxidante dificulta a comparação direta de diferentes estudos (SHAN et al., 2005).

Investigações recentes demonstram que existem diferenças entre os métodos para determinação da capacidade antioxidante. Dessa forma, recomenda-se a utilização de pelo menos dois deles (GAHLER et al., 2003).

É necessário enfatizar ainda que os ensaios realizados *in vitro* são limitados e às vezes pode não haver similaridade com sistemas biológicos reais. Os ensaios de capacidade antioxidante *in vitro* são importantes para verificar se há ou não correlação entre antioxidantes potentes e os níveis de estresse oxidativo (HUANG et al., 2005).

De acordo com as reações químicas envolvidas, a maior parte dos métodos empregados para avaliar a capacidade antioxidante pode ser dividida em duas categorias: (1) baseados na reação de transferência de elétrons, representados pelo método de Folin-Ciocalteu e sequestro de radicais livres, tais como o DPPH e (2) baseados na reação de transferência de átomos de hidrogênio, representado pelo ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e sistema β -caroteno/ácido linoléico (HUANG et al., 2005).

O modelo para avaliação da atividade antioxidante utilizando o DPPH• se fundamenta na habilidade de antioxidantes, presentes na amostra, se ligarem com esse radical estável. Alguns autores sugerem que o DPPH• reage com substâncias doadoras de H ($\text{DPPH}^\bullet + [\text{AH}]_n \rightarrow \text{DPPH-H} + [\text{A}^\bullet]_n$), incluindo compostos fenólicos (ROGINSKY; LISSI, 2005). É um método relativamente rápido comparado a outras técnicas (SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998) e não detecta agentes pró-oxidantes, sendo que determina apenas o poder redutor dos compostos analisados (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Os ensaios baseados em radicais estáveis como o DPPH• têm sido criticados já que estes, por serem estáveis, são estranhos aos sistemas biológicos, em contraste com os radicais de vida curta, como hidroxil e peroxil, que ocorrem como intermediários do processo oxidativo (BECKER et al., 2004).

A determinação da capacidade antioxidante por meio do método do Folin-Ciocalteu é muito bem aceita pela comunidade científica e amplamente utilizada, além de ser simples e reprodutiva. O reagente de Folin-Ciocalteu consiste do ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico e quando reage com os compostos fenólicos, em condições alcalinas, ocorre dissociação de um próton fenólico levando à formação do ânion fenolato. Esse ânion é capaz de reduzir o reagente, formando o complexo azul de molibdênio (GENOVESE et al., 2003; HUANG et al., 2005). Em estudos recentes, tem sido um dos métodos preconizados para avaliar a capacidade antioxidante através do poder redutor de extratos de amostras vegetais (PRIOR et al., 2005). Como ele não é específico para compostos fenólicos, existe a possibilidade de ser reduzido por outros compostos, como o ácido ascórbico, levando, portanto, a uma superestimação dos resultados (GENOVESE et al., 2003; HUANG et al., 2005).

O método de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) verifica a capacidade sequestradora de um antioxidante frente à formação de um radical peroxila induzido pelo 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloro (AAPH) a 37°C. Neste ensaio, o radical peroxila reage com um composto fluorescente formando um produto não fluorescente. O efeito protetor de um antioxidante é verificado calculando-se a área formada abaixo da curva de decaimento da fluorescência da amostra *versus* tempo, quando comparada ao branco, que não apresenta antioxidantes. Inicialmente, o composto fluorescente utilizado para reagir com o radical peroxila formado era a β -ficoeritrina. Entretanto, observou-se que a β -ficoeritrina interagiu com os compostos fenólicos, o que poderia induzir a erros neste método. Nesse sentido, Ou e colaboradores (2001) desenvolveram e validaram uma modificação do ORAC empregando a fluoresceína como composto fluorescente, a qual perde a fluorescência a medida em que reage com o radical peroxila. A fluoresceína apresenta excelente fotoestabilidade e não interage com antioxidantes. Além disso, a sua utilização implicou em redução dos custos deste experimento (OU et al., 2001).

Este método foi inicialmente destinado à determinação da capacidade antioxidante de substâncias hidrofílicas, devido à propriedade hidrofílica do gerador de radicais e do detector (EBERHARDT et al., 2005). No entanto, o aprimoramento da técnica aumentou sua sensibilidade, tornando possível a determinação do potencial antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (HUANG et al., 2005). Huang et al. (2002) descreveram este mesmo método empregando a β -ciclodextrina metilada randomizada, o que permitiu melhor solubilidade dos compostos lipofílicos em meio aquoso. Especificamente, as ciclodextrinas são oligossacarídeos de α -D-glico-piranosose unida por ligações α -1,4 de forma cíclica, as quais contêm uma cavidade central relativamente hidrofóbica e a superfície externa hidrofílica.

2. OBJETIVOS

- Determinar o teor e o perfil de isoflavonas em alimentos industrializados contendo soja e/ou derivados;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* desses produtos por diferentes métodos: Capacidade de Redução do Reagente de Folin-Ciocalteu, Capacidade de Sequestro de Radicais Livres (DPPH•) e Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC);
- Identificar fontes potenciais de compostos bioativos para aplicação no desenvolvimento de alimentos funcionais, através da determinação dos teores de flavonóides e capacidade antioxidante dos “novos ingredientes” e dos condimentos disponíveis no mercado;
- Avaliar o efeito da adição de compostos bioativos e outros ingredientes com alegação de propriedades funcionais em refeições prontas, através da determinação do teor de flavonóides e da capacidade antioxidante por diferentes métodos: Capacidade de Redução do Reagente de Folin-Ciocalteu, Capacidade de Sequestro de Radicais Livres (DPPH•) e Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os produtos industrializados à base de soja e/ou derivados foram obtidos no comércio local. Foram analisados 15 produtos: barra de cereais com soja e mel, chocolate à base de soja, biscoito do tipo *cookies* com soja (duas marcas comerciais), doce de “leite” de soja, empanado vegetal recheado com champignon, estrogonofe vegetal, hambúrguer vegetal, lasanha de soja, *nuggets* de soja (duas marcas comerciais), pão de soja *light*, quibe vegetal, ravioli de queijo com molho de proteína vegetal e salsicha vegetal, sendo três lotes de cada produto, com três amostras de cada lote. As amostras foram cortadas em pedaços, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Em seguida, foram trituradas, homogeneizadas em graal com pistilo e armazenadas a -20 °C (freezer) até o momento da análise.

Os condimentos e temperos (aipo, alecrim, alho poró, cebola, cebolinha, cenoura, cúrcuma, louro, manjeriço, orégano e salsa) foram fornecidos por três fabricantes do estado de São Paulo (São Paulo, Jaguaré e Itupeva). Apenas um lote de cada marca foi analisado. As amostras foram homogeneizadas em moinho analítico (modelo A10 S2, IKA Works Inc., Wilmington, NC) sob refrigeração e passadas em peneira 60 mesh (0,25 mm). Foram armazenadas a -20 °C até o momento da análise.

Foi avaliado somente um lote dos novos ingredientes (beta-caroteno, extrato de chá verde, extrato de azeitona, licopeno e luteína), os quais foram fornecidos pelos próprios fabricantes. As amostras (em pó) foram armazenadas conforme as instruções disponíveis na embalagem dos produtos.

Foram analisados os protótipos de duas refeições. São elas: amostra 1 (refeição composta de arroz com cenoura e vagem, creme de milho e filé de frango com molho de ervas) e amostra 2 (refeição composta de macarrão fusilli integral com molho à bolonhesa de proteína texturizada de soja e vegetais). Os protótipos foram produzidos em duas diferentes versões: uma amostra controle (sem adição de compostos bioativos ou outros ingredientes com alegação funcional) e uma amostra teste (consiste na mesma formulação da refeição controle, mas com adição de ingredientes com alegação

funcional). Estas amostras foram analisadas em dois momentos, devido à necessidade de modificações na formulação dos produtos. Os protótipos foram enviados para análise em nosso laboratório previamente liofilizados. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em graal com pistilo. Posteriormente, foram armazenadas a -20°C (freezer) até o momento da análise.

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico ou grau cromatográfico (HPLC) quando necessário. A poliamida em pó utilizada na extração em fase sólida foi obtida da Macherey-Nagel (Polyamide CC6, no catálogo 815.620).

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação de umidade

A determinação de umidade dos alimentos industrializados à base de soja e/ou derivados foi feita pesando-se cerca de 5 gramas de amostra, em liofilizador à vácuo (Dura-Top MP, Bulk Tray Dryer, FST Systems ®) durante 96 horas (AOAC, 1995). A determinação foi feita em triplicata, e os resultados foram expressos como percentual, na forma de média \pm desvio padrão.

3.2.2 Determinação do conteúdo protéico

As amostras dos produtos industrializados à base de soja e/ou derivados e das refeições prontas tiveram seu conteúdo protéico determinado por meio do método de micro-Kjeldahl ($\text{N} \times 6,25$) (AOAC, 1995). As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos como g por 100 g (b.u.), na forma de média \pm desvio padrão.

3.2.3 Análise de isoflavonas

3.2.3.1 EXTRAÇÃO

As amostras foram extraídas com metanol 80% (armazenado em freezer) na proporção de 1:20 (m/v), com Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica GnbH, Kriens-Luzern), por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo, segundo Genovese e Lajolo (2001 a, b). Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O resíduo foi re-extraído mais uma vez. Os derivados protéicos foram extraídos segundo Genovese e Lajolo (2002). Para concentração dos extratos foi utilizado Rotaevaporador (RE 120 - Büchi), em temperaturas de banho de 40°C (até ~8 mL). As amostras concentradas, livres de metanol, tiveram então seu volume ajustado com água para balão volumétrico de 10 mL e todo o volume foi passado em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição das isoflavonas foi feita com 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Foi utilizado manifold Visiprep 24 DL da Supelco. Após concentração (até ~0,4 mL) através de rotaevaporação, as amostras tiveram seu volume ajustado para 2 mL com metanol grau HPLC e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação das isoflavonas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência.

3.2.3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A separação e quantificação das isoflavonas e de suas formas conjugadas foi realizada em coluna C18 Synergi 4 µ Fusion RP (250 x 4,6 mm; 4 µm) (Phenomenex, EUA) de acordo com o método de Song et al. (1998), com algumas modificações. O cromatógrafo líquido utilizado foi o da Hewlett Packard (Palo Alto, EUA) série 1100, equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector com arranjo de diodos (DAD), controlado pelo software ChemStation. Alíquotas de 20 µL foram injetadas em fluxo de 1 mL/min, utilizando solvente A: 0,1% ácido acético, 5% de acetonitrila em água e solvente B: 0,1% ácido acético em acetonitrila. O gradiente linear foi iniciado com 10% do solvente B, passando para 14% em 10 minutos, para 17% em 20 minutos, atingindo 60% em 30 minutos e mantendo esta porcentagem até 33

minutos, decrescendo para 10% em 35 minutos. A calibração foi realizada com os padrões de daidzeína e genisteína da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA), daidzina e genistina da Apin Chemicals Ltd. (Abingdon, Reino Unido), glicitina e gliciteína da Fujicco Co. Ltd. (Kyoto, Japão), acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina foram obtidos da LC Laboratories (Woburn, EUA) injetados em triplicata, em cinco concentrações diferentes. A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção e dos espectros. As amostras foram injetadas em duplicata. Os resultados foram expressos como mg de isoflavonas (agliconas) por 100 g de amostra (b.u.). As formas das isoflavonas (β -glicosídeos, malonilglicosídeos, acetilglicosídeos e agliconas) foram expressas em % do total (p/p).

3.2.4 Determinação da capacidade antioxidante in vitro

3.2.4.1 EXTRAÇÃO

O procedimento foi realizado em triplicata homogeneizando-se cerca de 1 g de amostra em 20 mL de metanol/água na proporção de 70:30, para os produtos industrializados e refeições prontas. Para os condimentos e temperos, utilizou-se cerca de 0,5 g de amostra em 20 mL de metanol aquoso 70%. A extração foi realizada utilizando Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern), por um minuto em velocidade 4 e banho de gelo. Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar.

Na extração para determinação da capacidade antioxidante total pelo método do ORAC, foi utilizado 1 g de amostra em 10 mL de metanol/água na proporção de 70:30. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante. O resíduo da centrifugação foi seco ao abrigo da luz e submetido à extração com 10 mL de acetato de etila. O sobrenadante foi coletado e seco sob nitrogênio. Este extrato seco foi dissolvido com 1 mL de acetona e 3 mL de β -ciclodextrina metilada randomizada em uma solução a 7% (m/v) em acetona/água 1:1.

3.2.4.2 REDUÇÃO DO REAGENTE DE FOLIN-CIOCALTEU (FENÓLICOS TOTAIS)

A capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu foi determinado de acordo com o método de Singleton et al. (1999), com algumas modificações descritas a seguir. Alíquotas de 0,25 mL dos extratos metanólicos 80% foram adicionadas de 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Os tubos foram levados para o banho-maria a 37 °C por 30 minutos para desenvolver a coloração. Solução de catequina (0,2 mg/mL metanol) foi utilizada como padrão. As leituras de absorvância foram realizadas em 750 nm em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 (Palo Alto, EUA). Os resultados foram expressos como mg de catequina por 100 g de amostra (b.u.). As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.4.3 SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES DO DPPH•

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra, segundo descrito por Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• (0,05 mM) de forma a apresentar aproximadamente 0,4 de absorvância em 517 nm de comprimento de onda. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambrigde, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 250 µL da solução de DPPH•, 50 µL de metanol para o grupo controle, o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox (6-hidróxi-2, 5, 7, 8-tetrametil-2-ácido carboxílico, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e para os extratos obtidos das amostras, adequadamente diluídos, quando necessário. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 20 minutos, no escuro. As leituras das absorvâncias foram realizadas em 517 nm em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). A absorvância das amostras (Am) correlacionada à absorvância do controle (Ac) resulta na porcentagem de

sequestro de radicais livres (% SRL), que pode ser expressa através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ SRL} = \frac{(A_c - A_m) \times 100}{A_c}$$

A curva de calibração foi preparada com uma solução de Trolox (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) nas concentrações de 20 a 80 μM , e os resultados foram expressos em μmoles equivalentes de Trolox/100 g de amostra (b.u.). As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.4.4 CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC)

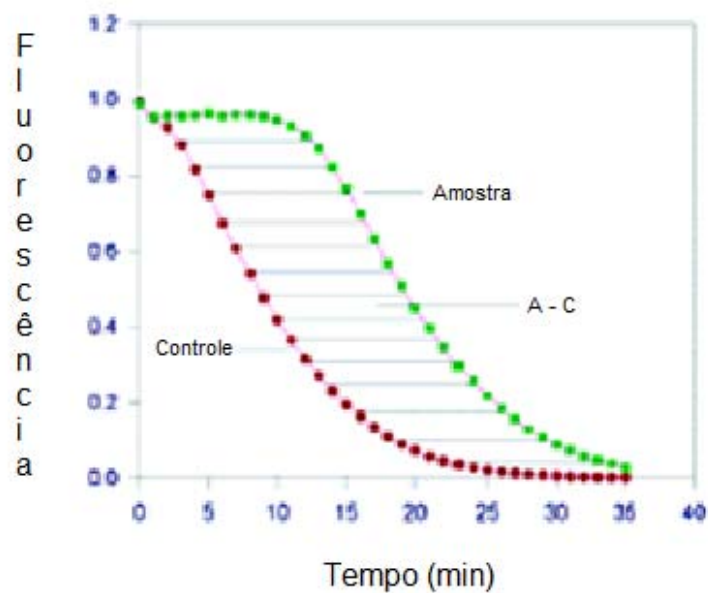
Utilizou-se a metodologia descrita por Dávalos e colaboradores (2004), adaptada para leitura em cubetas individuais. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4 e o volume final da mistura foi de 2 mL. Neste ensaio, 200 μL de amostra foram misturados a 1200 μL de uma solução de fluoresceína (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) a 70 nM e incubados a uma temperatura constante de 37°C por 15 minutos antes da adição de 600 μL da solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH, Wako Chemicals Inc., Richmond, EUA) a 24 mM, que dá início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nm ex / 525 nm em) foi verificada a cada 10 minutos durante 80 minutos em cubeta de quartzo. O tampão fosfato também foi usado para zerar o equipamento. Como controle da reação, adicionou-se 200 μL de metanol à solução de fluoresceína (HUANG et al., 2005; OU et al., 2001).

O cálculo da perda de fluorescência da fluoresceína, ou área sob a curva (ASC), foi efetuado com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\text{ASC} = 1 + f_1/f_0 + \dots + f_i/f_0 + \dots + f_{80}/f_0$$

onde f_0 é representado pela fluorescência obtida no tempo 0 e f_i a fluorescência obtida nos tempos intermediários entre 0 e 80 minutos.

4A



4B

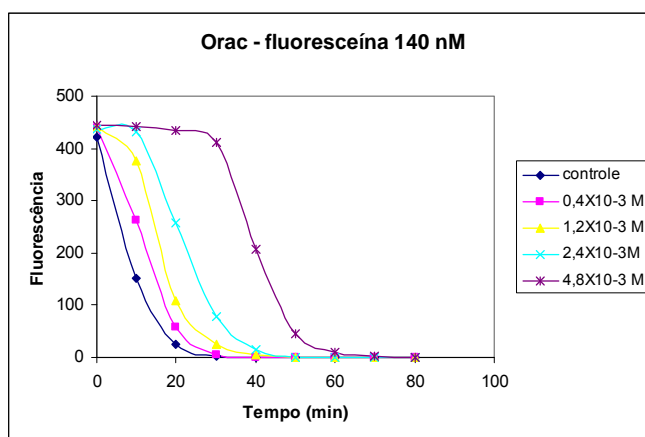


Figura 4 - Área de decaimento da amostra em relação ao controle (4A); Perda de fluorescência da fluoresceína na presença do antioxidante Trolox, nas concentrações de 0,4 a 4,8 μM (4B).

Os resultados foram expressos em μmoles equivalentes de trolox, utilizando-se curva padrão de Trolox, realizada a cada ensaio, nas concentrações de 0,4 a 4,8 μM . A área da perda de fluorescência de uma amostra foi calculada subtraindo-se a área correspondente à do controle, representada na Figura 4. A determinação de fluorescência foi realizada utilizando-se espectrofotômetro de fluorescência, marca HITACHI (Tóquio, Japão) modelo F-3010.

A determinação da capacidade antioxidante da fração lipofílica foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Prior e colaboradores (2003). A β -ciclodextrina metilada randomizada (7% RMCD) foi empregada para permitir a solubilização dos antioxidantes lipofílicos em meio aquoso. Essa solução foi utilizada para ressuspender o extrato lipofílico seco, solubilizar o padrão Trolox e como branco para o ensaio lipofílico. As diluições dos extratos, quando necessárias, também foram feitas com 7% RMCD. O preparo da fluoresceína e do AAPH, nas mesmas concentrações do ensaio hidrofílico, foi realizado com tampão fosfato 75 mM, pH 7,4.

Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox/100 g de amostra (b.u.).

3.2.5 Determinação dos flavonóides

3.2.5.1 EXTRAÇÃO

As amostras foram extraídas com metanol 70% (armazenado em freezer) na proporção de 1:40 (m/v), com agitador magnético e barra magnética por 1 hora a 4 °C. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. Para concentração dos extratos foi utilizado Rotaevaporador (RE 120 - Büchi), em temperaturas de banho de 40°C (até ~2 mL). As amostras concentradas, livres de metanol, tiveram então seu volume ajustado com água para balão volumétrico de 5 mL. Todo o conteúdo foi passado em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição dos flavonóides foi feita com 50 mL de metanol seguido de 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Foi utilizado manifold Visiprep 24 DL da Supelco. Após concentração (até ~0,4 mL) por meio de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 2 mL de metanol (grau HPLC) e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 μ m de poro. As extrações foram

realizadas em triplicata e a quantificação dos flavonóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A separação dos flavonóides foi realizada em coluna Prodigy 5 μ ODS(3) 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltd, Reino Unido), de acordo com Arabbi et al. (2004). Foi utilizado um gradiente de solventes constituído por: **(A)** Água : Tetrahydrofurano : Ácido trifluoroacético (98 : 2: 0,1) e **(B)** Acetonitrila. A proporção do solvente B foi crescente e nas seguintes proporções, 17% por 2 minutos, 25% por 5 minutos, 35% por 8 minutos e 50% por 5 minutos, em fluxo de 1 mL/minuto a 25°C. Para limpeza da coluna, foi alterada a porcentagem inicial do solvente B para 90% e a seguir re-equilibrada nas condições iniciais por 10 minutos. A calibração foi realizada com os padrões luteolina, apigenina, caempferol, quercetina, rutina e ácido clorogênico foram obtidos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). O cromatógrafo líquido utilizado foi o Hewlett Packard série 1100, equipado com detector com arranjo de diodo (DAD). A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção e dos espectros das agliconas. As amostras foram injetadas em duplicata. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra (b.u.).

3.2.6 *Análise dos resultados*

Para a análise dos resultados foi utilizado o programa Statistica versão 5.0 da StatSoft (Tulsa, E.U.A.). A comparação das médias foi realizada por ANOVA ($p < 0,05$) e LSD (*least significant difference*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Alimentos industrializados contendo soja e/ou derivados

4.1.1 Caracterização das amostras

Recentemente, indústrias alimentícias de grande destaque no mercado nacional lançaram novas linhas de produtos à base de soja e/ou derivados. Inicialmente, alguns destes produtos foram desenvolvidos com o objetivo de atender a um pequeno número de consumidores, como os portadores de intolerância à lactose ou alergia à proteína do leite de vaca, assim como os vegetarianos.

Em produtos cárneos, os derivados protéicos de soja são empregados como matérias primas devido às suas propriedades físico-químicas. No entanto, é necessário que o percentual referente à carne seja no mínimo de 55% do total da massa do produto final. Alguns produtos, como salame, presunto e alguns tipos de linguiça (toscana e calabresa) são excluídos da permissão de utilizar a proteína texturizada de soja como ingrediente em sua formulação. Em produtos não caracterizados predominantemente como cárneos (molhos, pratos prontos, etc) é permitido o emprego de maior percentual de derivados protéicos da soja (BRASIL, 1978).

Atualmente, muitos alimentos tradicionais foram modificados para atender às exigências dos consumidores. Carne e leite são os principais ingredientes excluídos da formulação destes produtos, sendo substituídos por proteína texturizada de soja, isolado, concentrado protéico, entre outros. Estes alimentos contêm como matéria prima principal os derivados protéicos de soja e fazem parte da “nova geração dos alimentos de soja”. Eles têm a aparência e o sabor muito similares aos produtos convencionais. Entre eles estão os produtos “cárneos”, como hambúrgueres e salsichas, derivados de “leite”, incluindo sorvetes e iogurtes, e pratos prontos, como lasanha e estrogonofe (HUTABARAT et al., 2001).

Existem ainda os alimentos enriquecidos com soja, os quais representam um modo alternativo de aumentar a ingestão desse grão através da incorporação em

produtos consumidos habitualmente pela população, como pães, massas e cereais (PSZCZOLA, 2002).

O Quadro 2 apresenta as diferenças entre os produtos convencionais e aqueles produzidos a partir da soja e/ou derivados, no que se refere aos ingredientes utilizados em sua fabricação.

Quadro 2 – Listagem dos ingredientes empregados na formulação dos produtos à base de soja e/ou derivados protéicos e convencionais.

PRODUTOS	INGREDIENTES	
	VEGETAL	CONVENCIONAL
Barra de cereal com soja e mel	Flocos de soja (proteína isolada de soja , farinha de arroz, malte, sal), aveia em flocos, flocos de cevada, xarope de glicose, flocos de trigo, flocos de cereais (trigo, cevada e aveia), proteína isolada de soja , oleína de palma, mel, gordura vegetal, maltodextrina, carbonato de cálcio, estabilizantes, umectantes, aromatizantes e antioxidantes.	Xarope de glicose, aveia em flocos, flocos de cevada, açúcar, flocos de trigo, banana, flocos de cereais (trigo, cevada e aveia), oleína de palma, mel, gordura vegetal, sal, estabilizantes, umectantes aromatizante, acidulante ácido cítrico, regulador de acidez bicarbonato de sódio, antioxidante e corantes naturais.
Chocolate à base de soja	Açúcar demerara orgânico, manteiga de cacau, líquido de cacau, extrato de soja , lecitina de soja, emulsificante e aromatizantes.	Açúcar, cacau, leite em pó integral, soro de leite em pó, gordura vegetal, gordura anidra de leite, emulsificantes e aromatizante.
Biscoito do tipo <i>Cookies A</i>	Açúcar orgânico, farinha de trigo, farinha de trigo integral, gordura vegetal, farelo de trigo, aveia em flocos, açúcar invertido, proteína isolada de soja , mel, carbonato de cálcio, sal, canela, fermentos químicos, aromatizante e emulsificante lecitina de soja.	Farinha de trigo, gotas de chocolate ao leite, açúcar, gordura vegetal, açúcar invertido, sal, estabilizante, lecitina de soja, aromatizantes e fermentos químicos.
Biscoito do tipo <i>Cookies B</i>	Farinha de trigo integral orgânica, farinha de trigo especial orgânica, gordura de palma orgânica, melado de cana orgânico, açúcar mascavo orgânico, açúcar demerara orgânico, fécula de mandioca orgânica, farinha de soja orgânica , mel orgânico, maltodextrina, sal, agentes de crescimento e lecitina de soja.	
Doce de “leite” de soja	Açúcar, água, óleo de palma, maltodextrina, extrato de soja , amido modificado, sal, aromatizantes, corante e estabilizante.	Leite, açúcar, xarope de glicose, sal e estabilizante.

Quadro 2 – Listagem dos ingredientes empregados na formulação dos produtos à base de soja e/ou derivados protéicos e convencionais (continuação).

PRODUTOS	INGREDIENTES	
	VEGETAL	CONVENCIONAL
Empanado vegetal recheado	Proteínas (texturizada de soja e hidrolisada vegetal), água, fibra alimentar, óleo de milho, glicose, amido modificado, sal hipossódico, condimentos naturais. Recheio: champignons, margarina, sal, farinha de trigo, água e condimentos. Cobertura: farinha de rosca, amido.	Peito de frango, sal, condimentos naturais, estabilizante, realçador de sabor, especiarias e antioxidante. Recheio: champignons, margarina, sal, farinha de trigo, leite e especiarias. Cobertura: farinha de rosca, amido.
Estrogonofe Vegetal	Proteína de soja , leite em pó, champignon, creme de leite, catchup, polpa de tomate, óleo de soja, amido modificado, farinha de trigo, cebola, molho inglês, alho, sal, açúcar.	Carne bovina, creme de leite, champignon, margarina, leite, sal, catchup, polpa de tomate, proteína isolada de soja, farinha de trigo, estabilizante, corante e especiarias.
Hambúrguer Vegetal	Água, proteínas (concentrada texturizada e isolada de soja), óleo de soja, glúten de trigo, clara de ovo em pó, leite em pó, condimentos naturais, sal, maltodextrina, proteína vegetal hidrolisada, pimenta, estabilizante, aromas naturais e de fumaça, realçador de sabor e corante.	Carne bovina e de ave, gordura bovina, água, proteína vegetal, condimentos naturais, sal, especiarias, realçador de sabor e antioxidante.
Lasanha de soja	Proteína de soja , polpa de tomate, farinha de trigo, queijo mussarela, amido modificado, leite, ovos, cebola, queijo tipo parmesão, óleo de soja, margarina, sal, alho, açúcar e noz moscada.	Água, carne bovina, polpa de tomate, farinha de trigo, presunto (proteína de soja e aroma de pimenta), ovo, mussarela, leite, gordura vegetal, parmesão, amido modificado, cebola, óleo de soja, sal, alho, pimenta, louro, manjerição, noz moscada, aipo, realçador de sabor e corante.
Nuggets de soja A	Água, farinha de rosca, gordura vegetal hidrogenada, proteína concentrada texturizada de soja , óleo de soja, proteína isolada, glúten de trigo, clara de ovo em pó, leite em pó, farinha de trigo, maltodextrina, sal, amido de milho, proteína vegetal hidrolisada, condimentos naturais, caldo de legumes, estabilizante, realçador de sabor e espessante.	Carne de frango, farinha de rosca, pele de frango, gordura vegetal, água, farinha de arroz, margarina, farinha de trigo, proteína isolada de soja, sal, proteína texturizada de soja, amido, leite em pó, vinagre, estabilizante, aromatizantes, antioxidante eritorbato de sódio, realçador de sabor, espessante e corantes naturais.
Nuggets de soja B	Proteína texturizada de soja , água, fibra alimentar, óleo de milho, glicose, amido modificado, sal hipossódico, condimentos naturais, proteína hidrolisada vegetal, pimenta. Cobertura: farinha de rosca, amido.	Carne de frango, proteína vegetal, sal, condimentos naturais, estabilizante, realçador de sabor, especiarias, soro de leite, antioxidante. Cobertura: farinha de rosca, amido.

Quadro 2 – Listagem dos ingredientes empregados na formulação dos produtos à base de soja e/ou derivados protéicos e convencionais (continuação).

PRODUTOS	INGREDIENTES	
	VEGETAL	CONVENCIONAL
Pão de soja <i>light</i>	Farinha de trigo, farelo de trigo, grão de soja , glúten, fibra alimentar, proteína de soja , sal, emulsificantes, conservantes e edulcorante.	Farinha de trigo, açúcar, sal, gordura vegetal, fosfatos monocalcico e tricalcico, vitaminas, emulsificantes e conservante.
Quibe Vegetal	Água, proteína texturizada de soja , trigo integral, fibra alimentar, óleo de milho, condimentos naturais, sal hipossódico, proteína hidrolisada vegetal, óleo de gergelim.	Carne bovina, trigo integral, proteína vegetal, sal, água, condimentos naturais e especiarias.
Ravioli de queijo com molho de proteína Vegetal	Molho (polpa de tomate, condimentos naturais, proteína texturizada concentrada de soja , azeite de oliva, sal, proteína vegetal hidrolisada, caldo de legumes, amido modificado, condimentos e glutamato monossódico. Ravioli de queijo (farinha de trigo, queijos mussarela e parmesão, requeijão, ovo, leite em pó, farinha de rosca, batata em pó, condimento natural, glutamato monossódico, conservador e corante betacaroteno e queijo mussarela.	Farinha de trigo, água, queijo mussarela, ricota, ovo, farinha de rosca, leite em pó integral, requeijão catupiry, gordura vegetal hidrogenada, batata em pó, queijo parmesão, sal, farinha de trigo, creme de leite em pó, aroma idêntico ao natural de queijo, condimento natural, beta-caroteno (pró-vitamina A), realçador de sabor glutamato monossódico e conservante.
Salsicha vegetal	Proteína texturizada de soja , água, óleo de milho, amido modificado, proteína hidrolisada vegetal, sal hipossódico, açúcar, glúten de trigo, condimentos naturais, cebola, curry, pimenta, cominho, óleo de gergelim, aroma de fumaça e corante.	Carne mecanicamente separada de ave, pele suína, carne suína, gordura de ave, miúdos suínos, água, proteína texturizada de soja, amido, sal, alho, estabilizante, aromatizantes, realçador de sabor, conservador, antioxidante e corante.

Fonte: as informações disponíveis nesta tabela foram obtidas nos rótulos dos produtos e correspondem aos dados fornecidos pelos próprios fabricantes.

As informações apresentadas no Quadro 2 demonstram que os produtos analisados neste trabalho, designados pelo termo “vegetal”, contêm a soja ou seus derivados como substitutos de ingredientes potencialmente fontes de proteína. No caso dos produtos “cárneos” e dos pratos prontos, como hambúrguer e estrogonofe, houve a substituição da carne pelos derivados da soja. No entanto, outros ingredientes protéicos, como queijo, leite e ovos ainda foram utilizados.

No chocolate e no doce de “leite”, o extrato de soja foi empregado como um substituto para o leite de vaca. Já no pão e na barra de cereais, a soja foi incorporada

no sentido de enriquecer o produto, já que não houve substituição parcial ou total de nenhum dos ingredientes por este grão.

Os produtos contendo soja e/ou derivados descritos no Quadro 2 foram analisados em relação ao seu conteúdo de umidade e proteína. Esses dados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Conteúdo de umidade (%) e proteínas (% b. u.) dos produtos à base de soja e/ou derivados protéicos.

PRODUTOS	UMIDADE	PROTEÍNA
Barra de cereal com soja e mel	4,2 ± 0,3 ^a	15,5 ± 0,2 ^e
Chocolate à base de soja	1,7 ± 0,1 ^a	4,9 ± 0,3 ^a
<i>Cookies</i> de soja A	25 ± 1 ^b	4,0 ± 0,1 ^a
<i>Cookies</i> de soja B	28 ± 2 ^b	3,7 ± 0,2 ^a
Doce de “leite” de soja	23 ± 1 ^b	3,9 ± 0,2 ^a
Empanado vegetal recheado com champignon	41 ± 1 ^c	11,1 ± 0,3 ^{b,c}
Estrogonofe vegetal	79 ± 1 ^g	5,0 ± 0,2 ^a
Hambúrguer vegetal	50,8 ± 0,1 ^d	8,9 ± 0,1 ^b
Lasanha de soja	66 ± 1 ^f	8,8 ± 0,3 ^b
<i>Nuggets</i> de soja A	50 ± 3 ^d	11,4 ± 0,2 ^{b,c}
<i>Nuggets</i> de soja B	52 ± 2 ^d	13,6 ± 0,3 ^{c,d,e}
Pão de soja <i>light</i>	39 ± 1 ^c	12,4 ± 0,4 ^{c,d}
Quibe vegetal	60 ± 1 ^e	14 ± 1 ^{c,d,e}
Ravioli de queijo com molho de proteína vegetal	70 ± 4 ^f	8,5 ± 0,3 ^b
Salsicha vegetal	59,6 ± 0,2 ^e	14,7 ± 1 ^{d,e}

Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata).

Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os valores relativos à umidade dos produtos foram comparados aos dados disponíveis na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da USP (TBCA-USP, 2008) para os mesmos alimentos em suas versões convencionais, já que não existem dados na literatura para produtos à base de soja e/ou derivados.

Os dados obtidos para biscoito *cookies* (marcas A e B), chocolate, doce, *nuggets* (marcas A e B), pão, quibe, salsicha e estrogonofe são similares aos encontrados na tabela consultada. Já os teores referentes a barra de cereais, empanado recheado, hambúrguer, lasanha e ravioli estão abaixo dos valores de referência. No entanto, essas variações eram esperadas por se tratarem de produtos diferentes. Além disso, foram empregados métodos distintos para determinação da umidade. As informações da tabela consultada são referentes ao método de secagem em estufa a 105°C, o que poderia implicar em resultados diferentes dos obtidos por liofilização.

Quanto ao conteúdo protéico, os valores encontrados estão de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante disponíveis nas embalagens dos produtos.

Comparados aos produtos cárneos, alguns produtos contendo soja e/ou derivados apresentaram um conteúdo protéico similar às versões convencionais. São eles: chocolate, quibe e salsicha. A maioria dos produtos apresentou um teor de proteína diferente dos produtos convencionais. Barra de cereal, lasanha e pão apresentaram um conteúdo protéico superior, com aumento de 34 a 59%. Os demais produtos, tais como biscoito *cookies* (marcas A e B), doce de "leite", empanado, estrogofone, hambúrguer, *nuggets* (marcas A e B) e ravioli, apresentaram um conteúdo de proteína inferior comparado aos produtos convencionais, com redução de 8 a 54%.

Devido à alegação funcional aprovada pela FDA e Anvisa de que 25 g de proteína de soja podem ajudar a reduzir o colesterol e o risco de doenças cardiovasculares, é importante salientar que alguns produtos se destacaram em relação ao conteúdo protéico. São eles: barra, *nuggets*, quibe e salsicha. Para atingir o aporte de proteína recomendado pela alegação de funcionalidade, é necessário o consumo diário de cerca de seis barras de cereal, oito unidades de *nuggets*, oito unidades de quibe e três unidades de salsicha.

Em relação ao tipo de derivado da soja utilizado como fonte protéica, observa-se grande variação entre as amostras. Foram empregados a soja em grãos, a farinha de soja, o isolado protéico, o extrato hidrossolúvel e a proteína texturizada, a qual aparece como ingrediente em nove dos 15 produtos analisados.

Os derivados da soja também são matérias-primas largamente empregadas como ingredientes em produtos cárneos, pães, bebidas, molhos, sopas e outros

alimentos (GÓES-FAVONI et al., 2004). As proteínas texturizadas de soja são amplamente consumidas como substitutos da carne e pela indústria alimentícia como ingrediente alimentar, uma vez que apresentam textura similar aos tecidos musculares, elevada capacidade de hidratação e fácil incorporação de sabor e aroma (GENOVESE; LAJOLO, 2002).

4.1.2 Teor e perfil das isoflavonas

Os produtos analisados neste trabalho também foram caracterizados em relação ao conteúdo de isoflavonas e o seu perfil de distribuição. Os cromatogramas estão em anexo (Apêndice 1). A Figura 5 apresenta os resultados referentes ao teor de isoflavonas presente nas amostras.

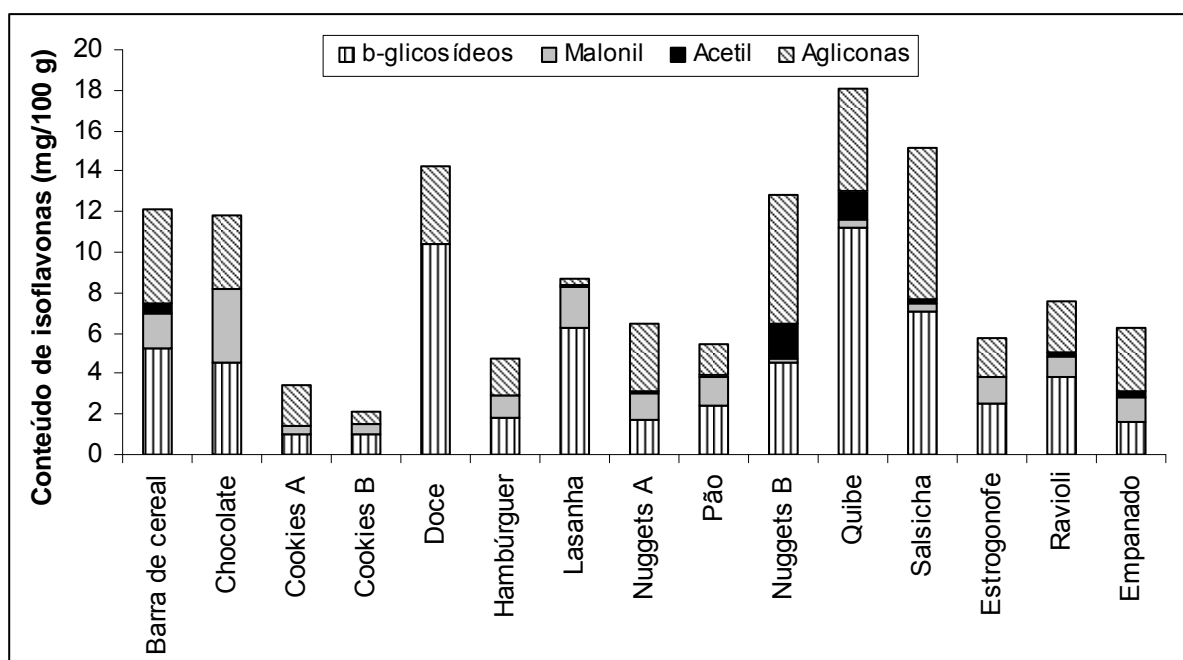


Figura 5 – Conteúdo total e perfil de isoflavonas (% b.u.) dos produtos à base de soja e/ou derivados.

Quibe e salsicha foram as amostras que apresentaram maiores teores de isoflavonas. Através do teste de correlação, obteve-se um $r = 0,60$, podendo-se afirmar que houve uma correlação positiva entre o teor de isoflavonas e o conteúdo protéico dos produtos (Figura 6).

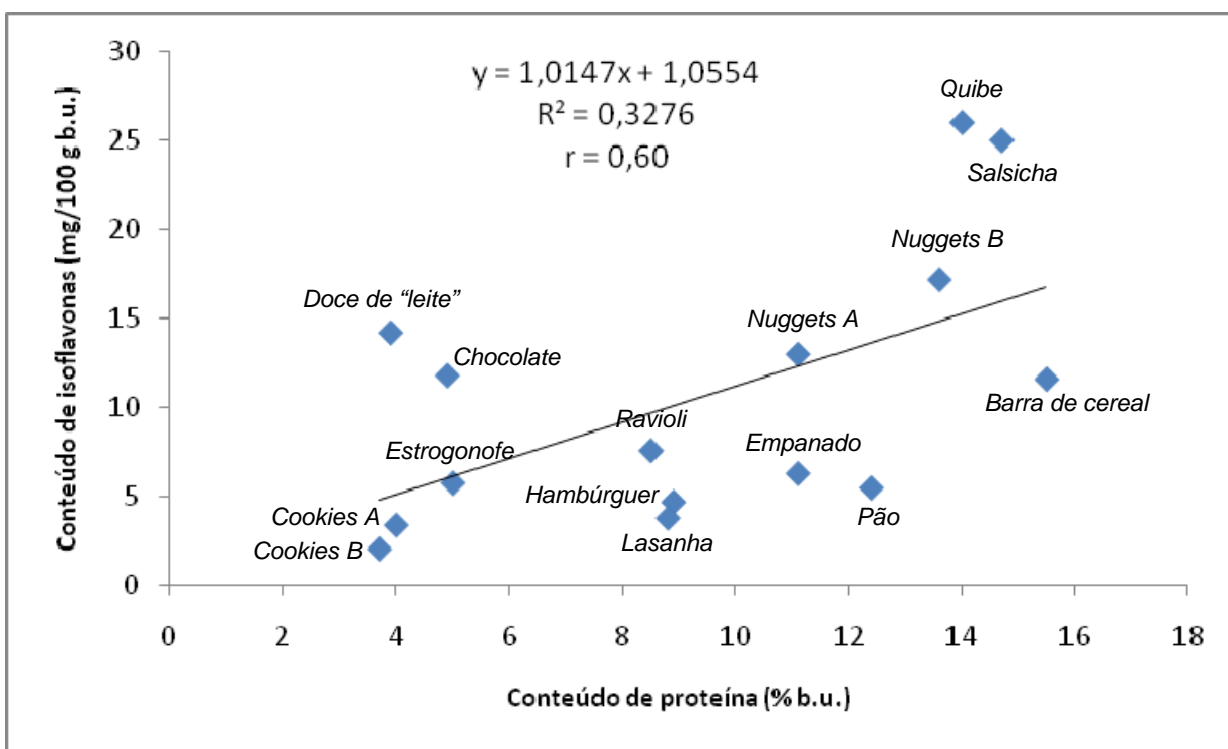


Figura 6 – Correlação entre o teor de proteína e o conteúdo total de isoflavonas dos produtos à base de soja e/ou derivados.

Em produtos à base de soja, espera-se que haja alta correlação linear entre conteúdo protéico e teor de isoflavonas. Isso porque, em geral, a maior parte da proteína presente nestes alimentos provém dos derivados da soja, os quais também são ricos em isoflavonas. No entanto, em alguns produtos analisados neste trabalho, como a lasanha e o ravioli, houve a adição de outros ingredientes fontes de proteína, como queijo, leite e ovo, além dos derivados da soja, o que poderia contribuir para uma diminuição no coeficiente de correlação de Pearson entre essas variáveis.

Além disso, foram utilizados diferentes derivados de soja (como concentrado, isolado, proteína texturizada) na formulação desses produtos, os quais são as principais fontes de proteína nesses alimentos, mas apresentam concentração de isoflavonas bastante variável. Essa variação ocorre em função da matéria-prima e do processamento empregados na fabricação dos derivados da soja.

Embora seja utilizada a proteína texturizada de soja como ingrediente na maioria dos produtos, a variação no teor de isoflavonas poderia ser explicada pela diferença no

conteúdo desses compostos na matéria-prima (GENOVESE; LAJOLO, 2002). Coward et al. (1998) afirmam que a presença e a concentração das isoflavonas nos derivados protéicos da soja dependem das condições de processamento, principalmente a temperatura de tratamento do material. Além disso, estudos sugerem que as formas químicas e o teor de isoflavonas têm um impacto significativo sobre a biodisponibilidade e os efeitos biológicos atribuídos a esses compostos (ZHANG et al., 2003).

A barra de cereais, o hambúrguer e o biscoito do tipo *cookies* da marca A são produzidos a partir da proteína isolada de soja (Quadro 2). O percentual de agliconas (25-38%) determinado nesses produtos foi similar ao encontrado por Genovese et al. (2007) no isolado protéico (31%). O elevado conteúdo desses compostos é resultado da ação das β -glicosidases endógenas do grão durante o processo de extração, as quais hidrolisam os β -glicosídeos transformando-os em agliconas.

Em relação aos *nuggets* (marcas A e B) quibe e salsicha, produzidos a partir da proteína texturizada de soja, foram obtidos teores de acetilglicosídeos entre 2 e 13%. Esses compostos são comumente formados durante a tostagem da farinha de soja ou a extrusão para obtenção da proteína texturizada (GENOVESE; LAJOLO, 2002). O conteúdo de acetilglicosídeos é menor (cerca de 6%) quando este ingrediente é obtido a partir de um concentrado protéico e é maior (cerca de 33%) se o produto for produzido a partir do hipocótilo. Considerando o perfil encontrado, pode-se inferir que os produtos citados foram produzidos a partir de uma proteína texturizada obtida de um concentrado protéico de soja. O teor de agliconas (49 - 52%) obtido para esses produtos também foi similar ao relatado por Genovese et al. (2007) (44 - 59%).

Genovese et al. (2007) analisaram diversos produtos texturizados de soja obtidos da farinha desengordurada, concentrado protéico e da farinha do hipocótilo. Observou-se que entre as amostras produzidas a partir do concentrado protéico, há predomínio das agliconas sobre as outras formas glicosiladas. Para as amostras produzidas a partir da farinha desengordurada, predominam os β -glicosídeos. A farinha de hipocótilo texturizada apresenta um perfil de isoflavonas diferenciado em comparação aos outros tipos de texturizados, com um conteúdo total de isoflavonas muito superior, baixo teor de agliconas, elevado teor de β -glicosídeos e expressivo conteúdo de acil conjugados.

A Figura 7 apresenta o conteúdo de isoflavonas de alguns dos ingredientes utilizados como matéria-prima na fabricação dos produtos.

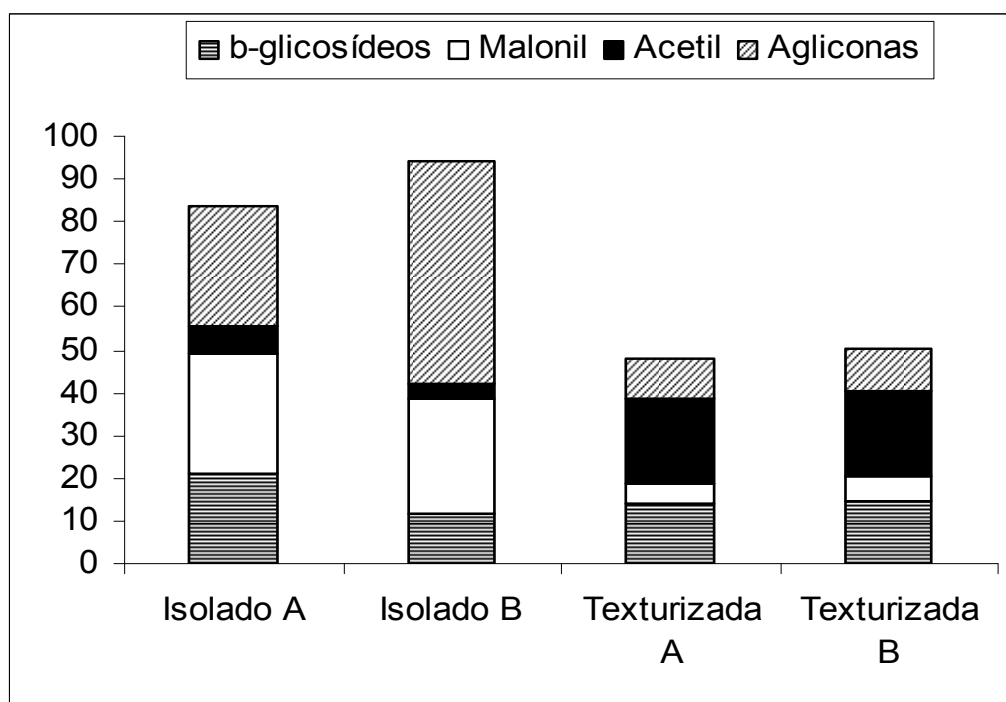


Figura 7 - Conteúdo total de isoflavonas (mg/100 g b.u.) dos derivados protéicos de soja utilizados como ingredientes em alguns dos produtos analisados.

A proteína vegetal hidrolisada aparece como ingrediente em vários dos produtos analisados. Pode ser obtida a partir do milho, da soja ou do trigo e é decomposta em aminoácidos mediante um processo de hidrólise ácida ou enzimática. Sua função como matéria-prima relaciona-se à incorporação de sabor em produto salgados. A análise deste ingrediente demonstrou que o seu emprego não interfere no conteúdo ou no perfil de isoflavonas, já que estes compostos não foram detectados no produto.

É importante considerar que além do processamento para a produção dos derivados da soja utilizados como matéria-prima, os produtos foram submetidos a condições diversas em seus diferentes processos de fabricação, as quais também poderiam contribuir para alterações no perfil das isoflavonas.

Genovese e Lajolo (2002) relatam que o teor reduzido de malonilglicosídeos e elevado de agliconas, como foi encontrado nos *nuggets* (marca B), no quibe e na salsicha, indicam condições de processamento mais drásticas. Quando o perfil contrário

é observado, no caso da lasanha, presume-se que as condições de processamento do produto foram menos drásticas.

Zhang et al. (2003) encontraram um perfil de distribuição das isoflavonas semelhante em amostras de pão à base de soja, com predomínio dos β -glicosídeos. Embora as isoflavonas não sejam destruídas pelo calor empregado no processamento dos alimentos, o aquecimento causa alterações no perfil das isoflavonas nos produtos (WANG; MURPHY, 1996). O tratamento térmico utilizado na fabricação do pão promove a conversão (desesterificação) dos malonilglicosídeos em β -glicosídeos, compostos mais termoestáveis (FARAJ; VASANTHAN, 2004).

Em relação à distribuição das agliconas, os derivados de genisteína, seguidos pelos de daidzeína, predominaram em todos os produtos. O mesmo perfil foi encontrado por Barbosa e colaboradores (2006 a), em todos os derivados protéicos analisados. Esses dados são apresentados na Figura 8.

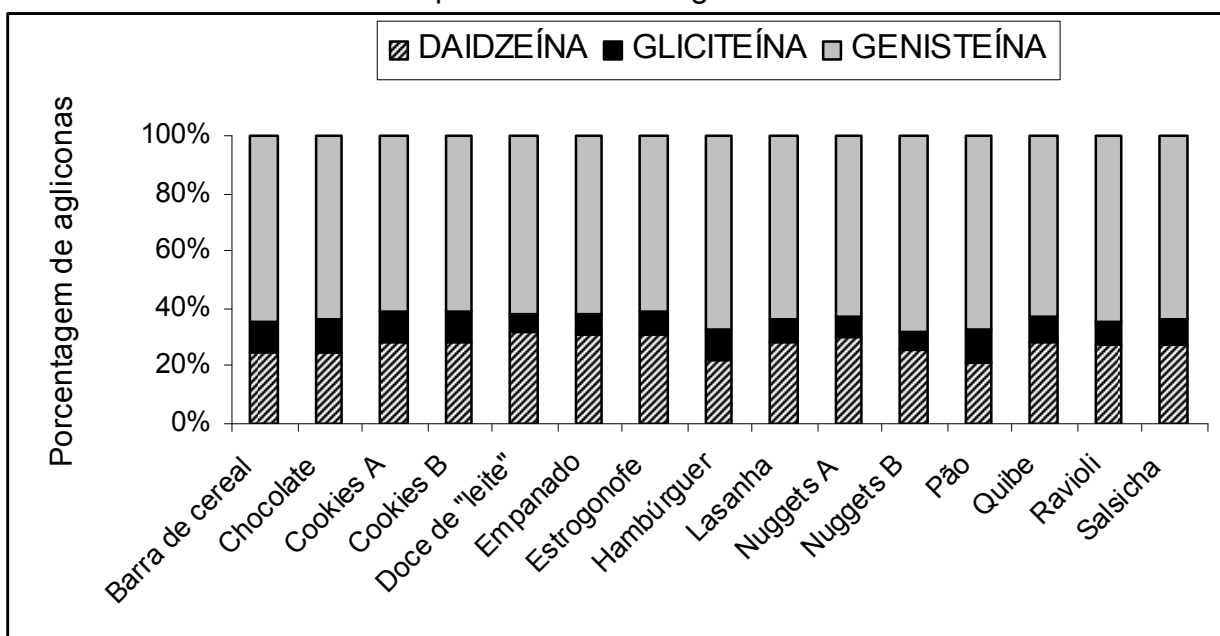


Figura 8 - Perfil de distribuição das isoflavonas agliconas (%) nos produtos à base de soja e/ou derivados.

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2007) foi responsável pela publicação da primeira base de dados contendo informações referentes ao conteúdo de isoflavonas de diversos alimentos.

Quanto à salsicha e aos *nuggets*, os valores disponíveis na tabela consultada são inferiores aos encontrados em nosso trabalho. Tal diferença pode ser atribuída à composição dos produtos analisados pelo USDA, os quais apresentam a proteína de soja como substituto parcial da carne. Dessa forma, espera-se que o teor de isoflavonas seja menor que o encontrado em produtos contendo somente a proteína vegetal como fonte protéica.

O hambúrguer analisado pelo USDA não apresenta carne em sua composição (substituição total por proteína de soja). O seu conteúdo de isoflavonas foi o dobro do encontrado em nossa amostra, a qual contém apenas derivados da soja como fonte protéica. Wang e Murphy (1994 a) afirmam que a variedade do grão, a época de colheita e a localização geográfica afetam o teor de isoflavonas e contribuem para a variabilidade no conteúdo desses compostos nos alimentos contendo soja ou seus derivados. Além disso, o hambúrguer contém como ingrediente o isolado protéico e a proteína concentrada texturizada. Dados disponíveis na tabela da USDA demonstram que o concentrado protéico obtido por extração alcoólica apresenta cerca de 90% menos isoflavonas que o obtido por extração em solução aquosa (USDA, 2007). Assim, se o concentrado protéico utilizado como ingrediente no hambúrguer foi obtido por meio de extração alcoólica, a sua contribuição no teor de isoflavonas seria muito pequena, o que explicaria o baixo teor desses compostos no produto analisado.

O teor de isoflavonas nesses produtos é consideravelmente menor do que em outros derivados da soja. Esse perfil era esperado em virtude da utilização de diversos ingredientes, além da soja, na produção desses alimentos. A adição desse grão ou seus derivados pode ocorrer em substituição à proteína animal, ou ainda, para reduzir o conteúdo de gordura dos produtos. No entanto, o emprego desses ingredientes deve ser limitado visando à manutenção da similaridade aos produtos convencionais (HUTABARAT et al., 2001).

4.1.3 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante dos alimentos industrializados contendo soja e/ou seus derivados protéicos foi avaliada por meio de três métodos diferentes: capacidade

reduzora do Folin-Ciocalteu, sequestro de radicais livres do DPPH e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). Os resultados referentes aos dois primeiros métodos citados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Capacidade antioxidante dos produtos industrializados à base de soja e/ou derivados determinada por meio dos métodos de capacidade reduzora do Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de catequina/100 g amostra b.u.) DPPH (μ moles equivalentes de trolox/100 g amostra b.u.).

AMOSTRAS	FOLIN CIOCALTEU	DPPH
Barra de cereal com soja e mel	118 \pm 5 ^b	81 \pm 4 ^c
Chocolate à base de soja	575 \pm 28 ^a	998 \pm 10 ^a
Cookies de soja A	65 \pm 2 ^e	30 \pm 1 ^g
Cookies de soja B	51 \pm 1 ^f	24 \pm 1 ^h
Doce de “leite” de soja	71 \pm 3 ^d	59 \pm 5 ^e
Empanado vegetal recheado com champignon	57 \pm 2 ^f	31 \pm 1 ^g
Estrogonofe vegetal	32 \pm 2 ^h	20 \pm 2 ^h
Hambúrguer vegetal	43 \pm 2 ^g	11 \pm 1 ⁱ
Lasanha de soja	67 \pm 2 ^e	31 \pm 1 ^g
Nuggets de soja A	46 \pm 2 ^{f,g}	18 \pm 1 ^h
Nuggets de soja B	57 \pm 2 ^f	11 \pm 1 ⁱ
Pão de soja <i>light</i>	89 \pm 3 ^c	38 \pm 3 ^f
Quibe vegetal	72 \pm 4 ^d	87 \pm 1 ^b
Ravióli com molho de soja	38 \pm 1 ^{g,h}	21 \pm 1 ^h
Salsicha vegetal	59 \pm 1 ^f	75 \pm 4 ^d

Resultados expressos como média \pm desvio-padrão (triplicata).

Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

De modo geral, observa-se que o chocolate apresentou a maior capacidade antioxidante entre todas as amostras. Em relação à capacidade reduzora do Folin-Ciocalteu, a do chocolate também foi a maior, cerca de cinco vezes superior à da barra de cereais, a qual também se destacou em relação aos outros produtos.

Os métodos analíticos para a determinação da capacidade antioxidante são numerosos e podem estar sujeitos a interferências, além de se basearem em fundamentos diversos. Dessa forma, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005).

O método do DPPH foi primeiramente descrito por Brand-Williams et al. (1995). Baseia-se na habilidade redutora dos antioxidantes, presentes na amostra, sobre o DPPH•, um radical orgânico estável, através de uma reação de transferência de elétrons, a qual é medida através do decréscimo da absorbância a 517 nm.

Em relação aos ingredientes protéicos, a proteína vegetal hidrolisada e a proteína texturizada foram avaliadas quanto à capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e capacidade sequestrante do radical DPPH•. Foram encontrados valores expressivos para a proteína vegetal hidrolisada para os dois métodos de determinação da capacidade antioxidante (1684 ± 15 mg equivalentes de catequina/100 g e 2640 ± 40 μ moles equivalentes de Trolox/100 g, respectivamente). Para a proteína texturizada, os valores foram $40,9 \pm 0,3$ mg equivalentes de catequina/100 g e 46 ± 2 μ moles equivalentes de Trolox/100 g, respectivamente.

É importante considerar que o reagente de Folin-Ciocalteu, também empregado para determinar o conteúdo de fenólicos totais, não é específico para esses compostos e pode ser reduzido por outros, tais como o ácido ascórbico, aminas alifáticas terciárias, Cu (I), açúcares redutores, aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), formando o complexo azul de molibdênio (GAHLER et al., 2003).

Foi realizada ainda a determinação da capacidade antioxidante de dois produtos convencionais, hambúrguer e salsicha, para verificar o impacto da substituição da carne por derivados protéicos da soja sobre este parâmetro. Observou-se que as amostras apresentaram a capacidade redutora do Folin-Ciocalteu similar (71 ± 1 e 61 ± 1 mg equivalentes de catequina/100 g b.u., respectivamente) à maioria dos produtos à base de soja e/ou derivados analisados. Quanto à capacidade sequestrante do DPPH•, os produtos convencionais apresentaram valores maiores (144 ± 2 e 129 ± 1 μ moles equivalentes de Trolox/100 g b.u., respectivamente) do que todos os produtos contendo

soja e/ou derivados, com exceção do chocolate (Tabela 4). Este fato pode ser atribuído à adição de eritorbato de sódio, um antioxidante utilizado comumente em produtos cárneos. Esse composto é um isômero sintético da vitamina C e é utilizado nas concentrações de 0,05% a 0,25%, as quais, conforme verificado, interferem no método de Folin-Ciocalteu e reduzem o DPPH•.

Na Figura 9 estão apresentados os dados de capacidade antioxidante obtidos pelo método de ORAC. Este método foi desenvolvido por Glazer (1988) e modificado por Cao et al. (1993). Em 1995, o método de ORAC foi semiautomatizado utilizando o sistema COBAS FARA II por Cao e colaboradores (1995). É um método muito sensível e verifica a capacidade sequestradora de um antioxidante frente à formação de um radical peroxila induzido pelo AAPH a 37°C. O radical peroxila reage com um composto fluorescente e forma um produto não fluorescente. O efeito protetor de um antioxidante é verificado calculando-se a área sob a curva de decaimento da fluorescência da amostra *versus* tempo, comparada ao controle, que não apresenta antioxidante (Figura 4B).

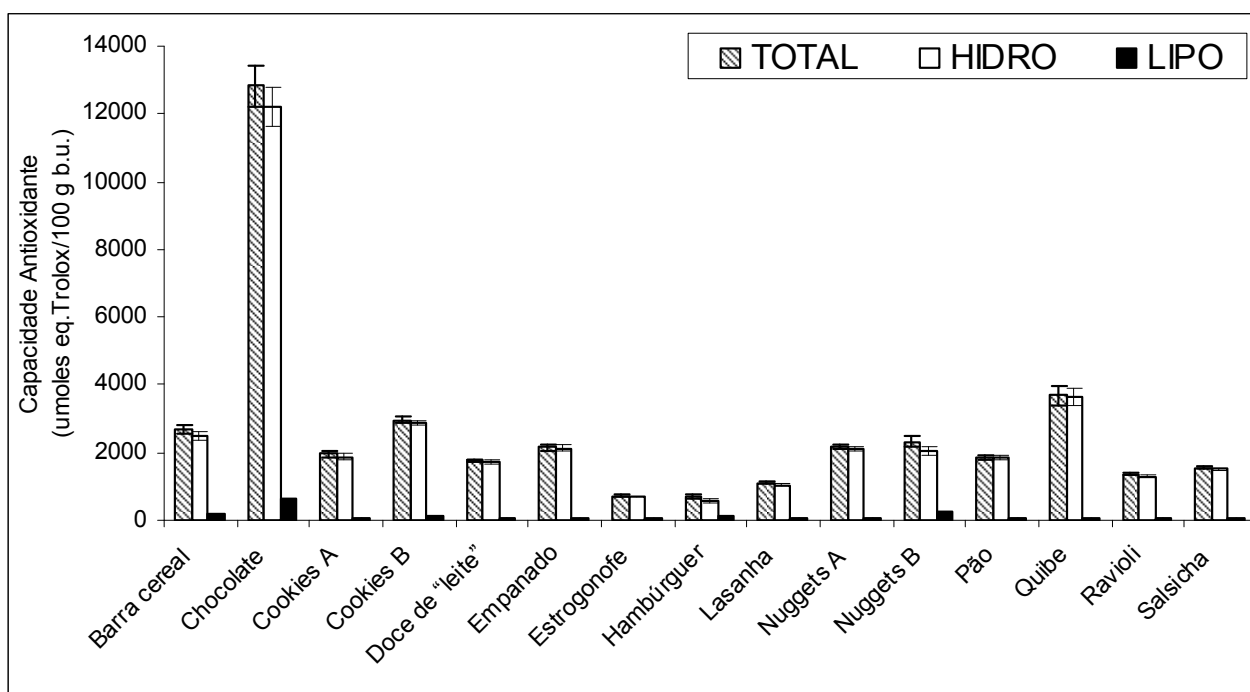


Figura 9 - Capacidade antioxidante total e das frações hidrofílica e lipofílica dos produtos contendo soja e/ou derivados, determinada por meio do método da capacidade de absorção do radical oxigênio (μ moles equivalentes de Trolox/100 g de amostra b.u.).

O método do ORAC, no entanto, foi recentemente automatizado e requer para tanto um sistema multicanal para a dispensação de reagentes acoplado a um leitor de fluorescência de microplaca com 96 cavidades. Dessa forma, a análise torna-se extremamente cara e possível em apenas poucos laboratórios (CAO et al., 1995). Neste estudo, o método foi adaptado para uso manual com leitura em espectrofotômetro de fluorescência simples, e comprovou ser extremamente sensível e passível de ser utilizado em pequenos laboratórios de pesquisa.

Em relação aos resultados obtidos por meio desse ensaio, chocolate foi a amostra que mais se destacou.

Os antioxidantes hidrofílicos correspondem a mais de 85% do total de compostos antioxidantes dos vegetais (PRIOR, 2003). Nos produtos analisados, a fração hidrofílica correspondeu a 84-99% da capacidade antioxidante total. O mesmo perfil foi observado em estudo realizado por Eberhardt e colaboradores (2005), em que os compostos hidrofílicos corresponderam a 76-92% da capacidade antioxidante total.

De modo geral, houve uma correlação significativa entre os valores de capacidade antioxidante determinados pelos métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH e ORAC. A Tabela 3 apresenta os coeficientes de correlação entre os métodos testados, incluindo as frações hidrofílica (ORAC-H) e lipofílica (ORAC-L) do ensaio do ORAC.

Tabela 3 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os diferentes métodos empregados para determinação da capacidade antioxidante dos alimentos à base de soja e/ou produtos derivados.

METODOLOGIAS	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Folin-Ciocalteu x DPPH	0,99
Folin-Ciocalteu x ORAC	0,97
Folin-Ciocalteu x ORAC-H	0,97
Folin-Ciocalteu x ORAC-L	0,92
DPPH x ORAC	0,97
DPPH x ORAC-H	0,97
DPPH x ORAC-L	0,91

Várias publicações apresentam correlação linear excelente entre a capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante, obtida pelo método do DPPH•. Este fato se deve principalmente à similaridade entre os mecanismos de ação envolvidos nos dois métodos, ou seja, a transferência de elétrons (HUANG et al., 2005).

Já o método de ORAC se baseia na transferência de átomos de hidrogênio do antioxidante para o radical AAPH (PRIOR et al., 2005). Esse ensaio foi originalmente desenvolvido para mensurar a capacidade antioxidante hidrofílica, uma vez que é empregado um gerador de radical hidrofílico e um detector hidrofílico. Modificações têm sido feitas para melhorar a sensibilidade do método por meio da utilização de um novo indicador e um componente específico para potencializar a solubilidade de antioxidantes lipofílicos, proporcionando uma estimativa mais completa da capacidade antioxidante total das amostras. Entretanto, espera-se que a fração lipofílica (ORAC-L) não demonstre boa correlação com outros métodos de determinação da capacidade antioxidante, pelo fato de que estes não são aptos a mensurar a capacidade antioxidante dos compostos lipossolúveis (EBERHARDT et al., 2005).

Alguns trabalhos relatam também a correlação existente entre o conteúdo de isoflavonas e a capacidade antioxidante em alimentos à base de soja. A Tabela 4 apresenta os valores de coeficiente de correlação de Pearson entre esses parâmetros.

Tabela 4 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) obtidos entre a capacidade antioxidante determinada por diferentes métodos e o conteúdo de isoflavonas dos produtos contendo soja e/ou derivados protéicos.

METODOLOGIAS	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Isoflavonas x DPPH	0,24
Isoflavonas x Folin-Ciocalteu	0,22
Isoflavonas x ORAC	0,25

Não houve correlação entre estas variáveis nas amostras analisadas. Este fato pode ser explicado pela presença de outros ingredientes na composição destes alimentos, os quais também são ricos em compostos fenólicos com atividade

antioxidante. Entre eles, podem ser destacados o líquido de cacau e condimentos, além de antioxidantes sintéticos empregados como conservantes.

4.2 Condimentos e outros temperos

Tradicionalmente, os alimentos são desenvolvidos com o objetivo de atender às exigências dos consumidores, relacionadas ao sabor, aparência, valor de mercado e praticidade de preparo/consumo. O desenvolvimento de produtos para conferir benefícios à saúde é uma tendência relativamente nova e reflete a crescente aceitação do papel da dieta na redução do risco de doenças crônicas (STEPHEN, 1998).

Nos últimos anos, é crescente o interesse das indústrias alimentícias em incorporar ingredientes com propriedades benéficas à saúde (ARABBI, 2001). Entre estes ingredientes, destacam-se os condimentos, conhecidos pelo potencial de agregar características relacionadas ao sabor, aroma e cor aos alimentos (SU et al., 2007).

Pesquisas recentes demonstraram alguns dos efeitos benéficos atribuídos aos condimentos, os quais são conhecidos desde a antiguidade (PSZCZOLA, 2001). Importantes atividades biológicas estão associadas a esses ingredientes, como anti-inflamatória, antioxidante, hipolipidêmica, entre outras. Eles podem conter compostos fenólicos e contribuir para a ingestão de antioxidantes naturais, juntamente com frutas e vegetais (SU et al., 2007).





4.2.1 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

Os alimentos, principalmente os de origem vegetal, contêm agentes antioxidantes, tais como as vitaminas C e E, a clorofilina, os flavonóides, carotenóides, curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres. Os compostos fenólicos podem inibir os processos de oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (BIANCHI; ANTUNES, 1999).








Diferentes partes de plantas têm se tornado, nos últimos anos, o principal foco de interesse de pesquisas científicas devido à ocorrência natural de antioxidantes. Extratos de alecrim ou sálvia, outras ervas, condimentos, cereais, raízes têm sido as fontes naturais de compostos com atividade antioxidante mais investigadas atualmente. Tais compostos incluem os tocoferóis, fosfolípidos, aminoácidos, compostos fenólicos, entre outros (MATTHÄUS, 2002).

Neste trabalho, objetivou-se identificar as principais fontes de compostos bioativos e capacidade antioxidante entre os condimentos habitualmente consumidos pela população brasileira. O Quadro 3 apresenta os nomes comuns e científicos dos condimentos e temperos analisados, assim como a forma de apresentação comercial.

Quadro 3 - Nomes comuns e científicos e forma de apresentação comercial dos condimentos e temperos.

NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	FORMA DE APRESENTAÇÃO
Aipo	<i>Apium graveolens</i> L.	 Pó desidratado
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	 Folhas desidratadas
Alho poro	<i>Allium porrum</i> L.	 Pó desidratado
Cebola	<i>Allium cepa</i> L.	 Pó desidratado

Quadro 3 – Nomes comuns e científicos e forma de apresentação comercial dos condimentos e temperos (continuação).

NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	FORMA DE APRESENTAÇÃO
Cebolinha	<i>Allium fistulosum</i> L.	 Flocos desidratados
Cenoura	<i>Daucus carota</i> L.	 Pó desidratado
Cúrcuma	<i>Curcuma longa</i> L.	 Pó desidratado
Louro	<i>Laurus nobilis</i> L.	 Folhas desidratadas
Manjericão	<i>Ocimum basilicum</i> L.	 Flocos desidratados
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> L.	 Flocos desidratados
Salsa	<i>Petroselinum crispum</i> L.	 Flocos desidratados

Os condimentos e temperos foram analisados em relação à capacidade antioxidante por meio de dois métodos: capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e sequestro de radicais livres do DPPH. A Tabela 5 apresenta a capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu das três marcas analisadas.

Tabela 5 – Capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu, expressa em mg equivalentes de catequina/100 g b.u., dos condimentos desidratados (marcas A, B e C).

AMOSTRA	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE		
	MARCA A	MARCA B	MARCA C
Aipo	110 ± 2 ^{h, B}	1210 ± 30 ^{f, A}	6,5 ± 0,3 ^{g, C}
Alecrim	22000 ± 200 ^{b, A}	5930 ± 30 ^{c, B}	5400 ± 100 ^{b, B}
Alho poro	1700 ± 30 ^{f, g, A}	689 ± 3 ^{g, B}	500 ± 10 ^{f, B}
Cebola	145 ± 2 ^{h, C}	293 ± 4 ^{h, B}	325 ± 4 ^{f, A}
Cebolinha	2400 ± 100 ^{e, f, B}	722 ± 1 ^{g, C}	3050 ± 30 ^{c, A}
Cenoura	107 ± 4 ^{h, B}	281 ± 1 ^{h, A}	290 ± 10 ^{f, A}
Cúrcuma	3210 ± 40 ^{e, A}	1400 ± 100 ^{e, C}	2900 ± 100 ^{c, B}
Louro	12800 ± 200 ^{c, A}	5250 ± 20 ^{d, B}	2500 ± 200 ^{d, C}
Manjeriço	5100 ± 300 ^{d, B}	6180 ± 40 ^{b, A}	2580 ± 30 ^{d, C}
Orégano	30800 ± 200 ^{a, A}	9310 ± 140 ^{a, B}	6600 ± 100 ^{a, C}
Salsa	1050 ± 10 ^{g, C}	1248 ± 4 ^{f, B}	1400 ± 30 ^{e, A}

Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata).

Médias na mesma coluna com letras diferentes (minúsculas) são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Médias na mesma linha com letras diferentes (maiúsculas) são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os dados apresentados na Tabela 6 demonstram que a capacidade redutora do Folin-Ciocalteu variou entre os tipos de condimentos e também entre as marcas. No entanto, o orégano foi a amostra que mais se destacou. Também foram obtidos valores expressivos para este parâmetro para o alecrim, louro e manjeriço. Aipo, cebola e cenoura foram as amostras com menor capacidade redutora.

Shan e colaboradores (2005) analisaram 26 especiarias diferentes em relação à capacidade redutora do Folin-Ciocalteu. Os resultados deste estudo são similares aos encontrados em nosso trabalho, confirmando a elevada capacidade redutora do

orégano. Foram encontrados valores maiores para o cravo-da-índia e a canela comparados ao orégano, mas estes não foram analisados neste trabalho.

A cúrcuma destaca-se por ser fonte de um importante antioxidante natural, a curcumina, também utilizada como corante de alimentos. Este composto tem sido extensivamente investigado pela sua capacidade de sequestrar os radicais livres e inibir a peroxidação lipídica, agindo na proteção celular das macromoléculas celulares, incluindo o DNA, dos danos oxidativos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Segundo Scalbert e Williamson (2003), a população ocidental consome cerca de 1 g/dia de compostos fenólicos. Nossos resultados sugerem que os condimentos podem ser importantes fontes e contribuir para a ingestão desses compostos. A Tabela 6 apresenta a capacidade antioxidante das três marcas de condimentos analisadas.

Tabela 6 - Capacidade antioxidante (μ moles equivalentes de Trolox/100 g b.u.) dos condimentos desidratados (marca A, B e C) determinada pelo método do sequestro de radicais livres.

AMOSTRA	CAPACIDADE SEQUESTRANTE DO DPPH		
	MARCA A	MARCA B	MARCA C
Aipo	190 \pm 3 ^{g, B}	4710 \pm 40 ^{e, A}	156 \pm 4 ^{j, C}
Alecrim	101000 \pm 1000 ^{b, A}	36000 \pm 1000 ^{b, B}	13600 \pm 200 ^{c, C}
Alho poro	1890 \pm 20 ^{f, g, A}	1280 \pm 30 ^{f, B}	780 \pm 20 ^{i, C}
Cebola	170 \pm 10 ^{g, C}	550 \pm 10 ^{f, B}	1500 \pm 100 ^{h, A}
Cebolinha	3220 \pm 30 ^{f, A}	1200 \pm 100 ^{f, B}	1300 \pm 10 ^{h, B}
Cenoura	204 \pm 4 ^{g, C}	797 \pm 4 ^{f, B}	1800 \pm 100 ^{g, A}
Cúrcuma	16100 \pm 300 ^{e, A}	9000 \pm 200 ^{d, B}	4400 \pm 200 ^{e, C}
Louro	64800 \pm 200 ^{c, A}	34000 \pm 1000 ^{c, B}	15700 \pm 100 ^{b, C}
Manjeriçã	26500 \pm 300 ^{d, B}	37000 \pm 3000 ^{b, A}	6200 \pm 200 ^{d, C}
Orégano	130000 \pm 2000 ^{a, A}	58000 \pm 1000 ^{a, B}	16400 \pm 200 ^{a, C}
Salsa	1000 \pm 30 ^{g, C}	1900 \pm 100 ^{f, B}	3700 \pm 100 ^{f, A}

Resultados expressos como média \pm desvio-padrão (triplicata).

Médias na mesma coluna com letras diferentes (minúsculas) são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Médias na mesma linha com letras diferentes (maiúsculas) são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Entre todos os condimentos analisados, o orégano foi o que mais se destacou em relação à capacidade antioxidante. Shan e colaboradores (2005) também verificaram o expressivo potencial antioxidante do orégano entre os 26 condimentos analisados neste estudo.

Apesar de ter se destacado tanto no conteúdo de compostos fenólicos quanto na capacidade antioxidante, o orégano tem seu uso limitado como ingrediente em alimentos funcionais. Essa limitação está associada ao fato desse condimento ser uma espécie geneticamente heterogênea, devido à polinização cruzada, o que pode provocar uma grande variedade no conteúdo de compostos bioativos e capacidade antioxidante (CHUN et al., 2005).

A diferença no conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante entre as marcas pode ser atribuída ao genótipo das plantas, variações ambientais, período de coleta das amostras, entre outros fatores (SHAN et al., 2005).

Os resultados dos testes de correlação entre o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante para as marcas analisadas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre a capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e a capacidade antioxidante determinada pelo método do sequestro de radicais livres do DPPH nas diferentes marcas de condimentos analisadas.

MARCAS	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Marca A	0,99
Marca B	0,99
Marca C	0,80

Shan et al. (2005) analisaram 26 condimentos quanto à capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e capacidade sequestrante do DPPH. Verificou-se elevada correlação linear entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($r = 0,9613$). Nesse sentido, é possível inferir que os compostos fenólicos têm grande importância no comportamento antioxidante de extratos de condimentos e contribuem significativamente para a capacidade antioxidante total.

Entretanto, alguns estudos realizados com condimentos e outros materiais de origem vegetal não obtiveram boa correlação (KÄHKÖNEN et al., 1999). Se a diferença entre os maiores e os menores valores para a capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e para a capacidade sequestrante do DPPH for muito pequena, torna-se difícil obter boa correlação entre os resultados (SHAN et al., 2005).

4.2.2 Determinação de flavonóides

A composição e o teor de flavonóides presentes nos condimentos e temperos foram determinados por CLAE. Os flavonóides são normalmente encontrados como derivados glicosilados. Neste estudo, os teores foram expressos em concentração equivalente das respectivas agliconas. Observou-se que os teores de flavonóides variaram significativamente, entre os tipos de condimentos e as marcas.

As Tabelas 8, 9 e 10 apresentam os resultados referentes ao teor de flavonóides dos condimentos das três marcas analisadas.

Tabela 8 - Conteúdo de flavonóides dos condimentos e temperos da marca A, expresso em mg/100 g b.u.

AMOSTRA	LUTEOLINA	QUERCETINA	CAEMPFEROL	APIGENINA	TOTAL	ÁCIDO CLOROGÊNICO
Aipo	3,68 ± 0,02 ^d	2,0 ± 0,1 ^f	ND	26,7 ± 0,2 ^d	32,4 ± 0,3 ^f	4,49 ± 0,02 ^f
Alecrim	6,74 ± 0,01 ^c	ND	ND	231 ± 3 ^b	238 ± 3 ^c	305 ± 2 ^b
Alho poro	ND	9,8 ± 0,1 ^e	18 ± 2 ^a	ND	28 ± 2 ^f	ND
Cebola	ND	51,92 ± 0,01 ^c	ND	ND	51,92 ± 0,01 ^e	ND
Cebolinha	ND	32,2 ± 0,1 ^d	13,33 ± 0,03 ^b	6,89 ± 0,01 ^g	52,4 ± 0,2 ^e	14,86 ± 0,01 ^d
Cenoura	ND	ND	ND	8,9 ± 0,1 ^f	8,9 ± 0,1 ^g	10 ± 1 ^e
Cúrcuma	ND	ND	ND	ND	-	ND
Louro	ND	250,0 ± 0,1 ^a	9,75 ± 0,01 ^c	16,1 ± 0,1 ^e	275,8 ± 0,2 ^b	6,52 ± 0,01 ^f
Manjeriço	ND	86,5 ± 0,3 ^b	ND	ND	86,5 ± 0,3 ^d	231 ± 1 ^c
Orégano	45 ± 1 ^a	ND	ND	43 ± 1 ^c	88 ± 2 ^d	360 ± 5 ^a
Salsa	34 ± 1 ^b	ND	ND	560 ± 3 ^a	594 ± 4 ^a	ND

ND não detectado.

Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata).

Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Alecrim, louro, manjeriço, orégano e salsa foram os condimentos que mais se destacaram em relação ao conteúdo total de flavonóides na marca A. É importante ressaltar que nenhum flavonóide foi identificado na cúrcuma.

No entanto, a cúrcuma contém um importante composto fenólico, denominado curcumina. Este é o componente responsável pela cor amarelada do curry indiano, um tempero à base de várias especiarias. São atribuídas a este composto inúmeras propriedades, como a atividade antioxidante, antiinflamatória e inibição da peroxidação lipídica (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os glicosídeos de quercetina e apigenina e o ácido clorogênico foram os compostos mais frequentes entre as amostras. Os maiores teores foram encontrados em louro, alecrim e orégano.

Tabela 9 - Conteúdo de flavonóides dos condimentos e temperos da marca B, expresso em mg/100 g b.u.

AMOSTRA	LUTEOLINA	QUERCETINA	CAEMPFEROL	APIGENINA	TOTAL	ÁCIDO CLOROGÊNICO
Aipo	244 ± 7 ^a	ND	ND	ND	244 ± 7 ^b	ND
Alecrim	30 ± 1 ^e	ND	ND	183 ± 10 ^b	213 ± 11 ^c	218 ± 17 ^b
Alho poro	ND	11,48 ± 0,01 ^c	29,4 ± 0,1 ^a	2,16 ± 0,01 ^e	43,0 ± 0,1 ^f	10,20 ± 0,01 ^e
Cebola	ND	ND	ND	9,3 ± 0,1 ^d	9,3 ± 0,1 ⁱ	ND
Cebolinha	ND	ND	8 ± 1 ^b	12 ± 1 ^c	20 ± 2 ^h	21 ± 2 ^d
Cenoura	ND	ND	ND	ND	-	8,6 ± 0,5 ^e
Cúrcuma	ND	ND	ND	7,4 ± 0,1 ^d	7,4 ± 0,1 ⁱ	ND
Louro	53 ± 3 ^c	71 ± 6 ^a	0,172 ± 0,002 ^c	ND	124 ± 9 ^d	ND
Manjeriço	12 ± 0,1 ^f	41 ± 2 ^b	ND	ND	53 ± 2 ^e	190 ± 7 ^c
Orégano	37 ± 1 ^d	ND	ND	ND	37 ± 1 ^g	300 ± 11 ^a
Salsa	64 ± 6 ^b	9,4 ± 0,1 ^d	ND	708 ± 32 ^a	781 ± 38 ^a	ND

ND não detectado.

Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata).

Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Em relação à marca B, alecrim, manjeriço, orégano e salsa foram os condimentos que mais se destacaram em relação ao conteúdo total de flavonóides.

Luteolina e apigenina foram os flavonóides presentes com mais frequência entre os condimentos, além do ácido clorogênico entre os ácidos hidroxicinâmicos.

Tabela 10 - Conteúdo de flavonóides dos condimentos e temperos da marca C, expresso em mg/100 g b.u.

AMOSTRA	LUTEOLINA	QUERCETINA	CAEMPFEROL	APIGENINA	TOTAL	ÁCIDO CLOROGÊNICO
Aipo	0,61 ± 0,04 ^d	ND	ND	3,29 ± 0,03 ^d	3,9 ± 0,1 ^f	ND
Alecrim	39,1 ± 0,2 ^a	ND	ND	19,4 ± 0,2 ^b	58,5 ± 0,4 ^c	351 ± 2 ^a
Alho poro	ND	0,7 ± 0,1 ^d	0,91 ± 0,05 ^b	ND	1,6 ± 0,2 ^h	4,4 ± 0,1 ^d
Cebola	ND	2,8 ± 0,2 ^c	0,065 ± 0,002 ^d	ND	2,9 ± 0,2 ^g	ND
Cebolinha	ND	50 ± 1 ^b	0,56 ± 0,01 ^c	0,11 ± 0,01 ^e	51 ± 1 ^d	1,1 ± 0,1 ^e
Cenoura	ND	ND	ND	0,69 ± 0,01 ^e	0,69 ± 0,01 ⁱ	0,128 ± 0,001 ^f
Cúrcuma	ND	ND	ND	ND	-	ND
Louro	ND	122,9 ± 0,1 ^a	11,13 ± 0,02 ^a	14,9 ± 0,2 ^c	148,9 ± 0,3 ^b	ND
Manjeriço	ND	51,6 ± 0,4 ^b	ND	ND	51,6 ± 0,4 ^d	175 ± 1 ^b
Orégano	5,91 ± 0,01 ^c	ND	ND	2,7 ± 0,1 ^d	8,6 ± 0,1 ^e	32,0 ± 0,2 ^c
Salsa	24 ± 1 ^b	ND	ND	525 ± 4 ^a	549 ± 5 ^a	ND

ND não detectado.

Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata).

Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Quanto à marca C, foram detectados teores mais elevados de flavonóides no alecrim, louro, manjeriço e salsa. A apigenina e o ácido clorogênico foram os compostos mais frequentes entre os condimentos analisados. O caempferol também foi detectado em várias amostras, mas em concentrações muito baixas (menos que 1 mg/100 g, com exceção do louro).

De modo geral, nas três marcas analisadas, alecrim, louro, manjeriço, orégano e salsa se destacaram quanto ao conteúdo total de flavonóides.

Em estudo realizado por Crozier e colaboradores (1997), foram identificados apenas os glicosídeos de quercetina em amostras de cebola. O mesmo perfil foi observado por Arabbi et al. (2004). Na marca A foram encontrados somente glicosídeos de quercetina e na marca C foram detectadas também pequenas quantidades de caempferol. Já na marca B, foram identificados glicosídeos de apigenina.

Em trabalho realizado por Hertog e colaboradores (1992), foram determinadas quantidades significativas de apigenina e luteolina em extrato de aipo. Já os glicosídeos de quercetina e caempferol não foram encontrados em quantidades detectáveis. O mesmo perfil foi encontrado na marca C, mas na marca A apenas a luteolina foi identificada. Na marca B foram detectadas pequenas quantidades de quercetina e ácido clorogênico, além da luteolina e apigenina.

Justesen e Knuthsen (2001) também analisaram os flavonóides da salsa, manjeriço, orégano e alecrim. O maior conteúdo foi encontrado na salsa, tendo destaque pelo alto teor de apigenina. Ainda foram detectadas quantidades menores de quercetina e luteolina. Foram identificadas a luteolina no alecrim, apigenina e luteolina no orégano. No entanto, nenhum flavonóide foi encontrado no manjeriço.

O termo ácido clorogênico é usado para designar uma família de ésteres formados pelas diferentes conjugações entre alguns ácidos *trans*-cinâmicos e o ácido quínico, sendo o ácido 5-O-cafeoilquínico o mais comumente encontrado. O ácido clorogênico é considerado o composto fenólico mais abundante na dieta humana e as principais fontes destes compostos são frutas, café, hortaliças, tubérculos, cereais e especiarias (CLIFFORD, 1999).

Ensaio para investigar a capacidade antioxidante de ameixas demonstrou que os ácidos clorogênicos, presentes em grandes quantidades nesta fruta, foram os maiores responsáveis por sua ação antioxidante seguidos das antocianinas (CHUN et al., 2003). Quanto maior a quantidade destes compostos na fruta maior foi sua atividade antioxidante, tendo as ameixas apresentado maior grau desta atividade comparada à nectarina e ao pêsego (GIL et al., 2002). E ainda, diversos outros experimentos *in vitro* indicaram o ácido clorogênico como um potente antioxidante (GARAMBONE; ROSA, 2007).

4.3 Ingredientes industriais

Antioxidantes naturais obtidos a partir de extratos de plantas têm atraído o interesse da comunidade científica devido à segurança questionável que envolve o uso de antioxidantes sintéticos em alimentos (KÄHKÖNEN et al., 2001). Testes que

envolvem o uso de antioxidantes naturais em matrizes alimentares têm obtido bons resultados, como as catequinas do chá que são capazes de retardar significativamente a oxidação lipídica em carne de frango (TANG et al., 2002).

4.3.1 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

Foi avaliada a capacidade antioxidante *in vitro* dos ingredientes com alegação funcional por dois diferentes métodos: capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e sequestro de radicais livres do DPPH.

Inicialmente, foram testados alguns solventes para o preparo de uma solução dos ingredientes. Foram testados água, metanol, metanol/água (70:30 v/v), acetato de etila e hexano. Não foi possível a solubilização dos ingredientes nos dois últimos solventes citados e por isso, não se procedeu à análise da capacidade antioxidante nesses casos. Em água, beta-caroteno, extrato de azeitona, licopeno e luteína formaram soluções turvas, as quais também não foram analisadas. Dessa forma, foram analisadas as soluções preparadas com metanol e metanol aquoso 70%. De modo geral, todos os ingredientes apresentaram maior capacidade antioxidante quando preparados com metanol/água (70:30 v/v), exceto o beta-caroteno. As Figuras 10 e 11 apresentam os resultados de capacidade antioxidante dos ingredientes industriais solubilizados em diferentes solventes.

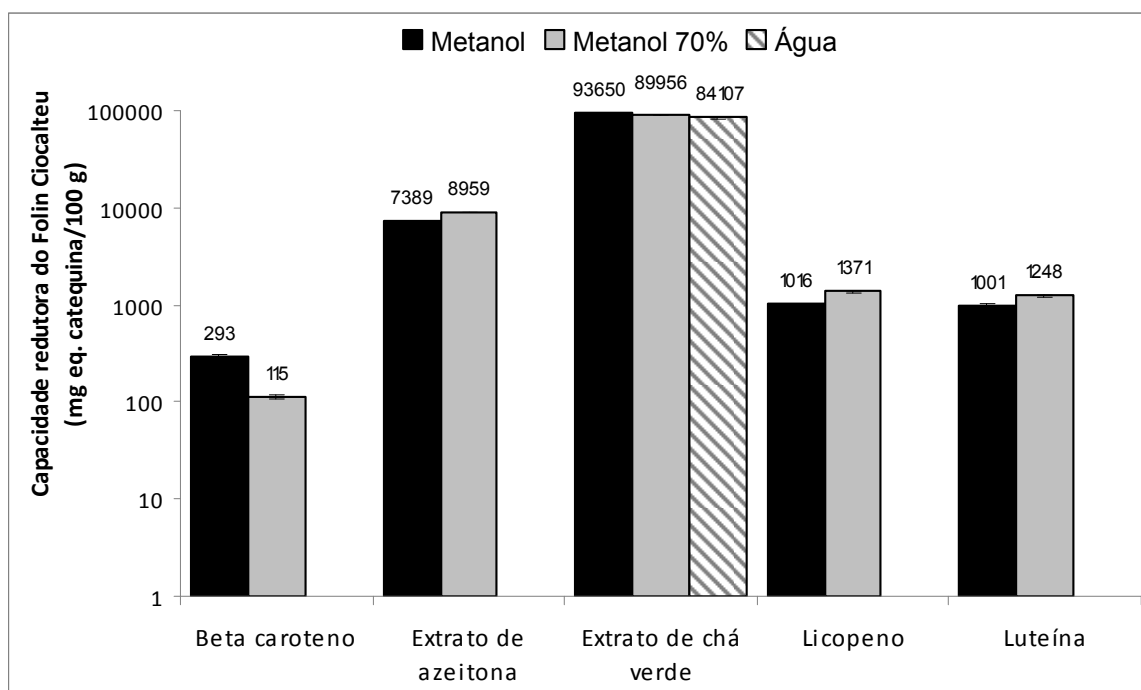


Figura 10 - Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de catequina/100 g b.u.) dos ingredientes industriais solubilizados em diferentes solventes.

Alguns ingredientes, como extrato de azeitona, licopeno e luteína, apresentaram uma maior capacidade redutora do Folin-Ciocalteu quando solubilizados em metanol aquoso 70%. Em relação ao extrato de chá verde, a capacidade antioxidante das soluções em diferentes solventes foi similar. Já o beta-caroteno foi o único ingrediente que apresentou melhor resultado quando disperso em metanol.

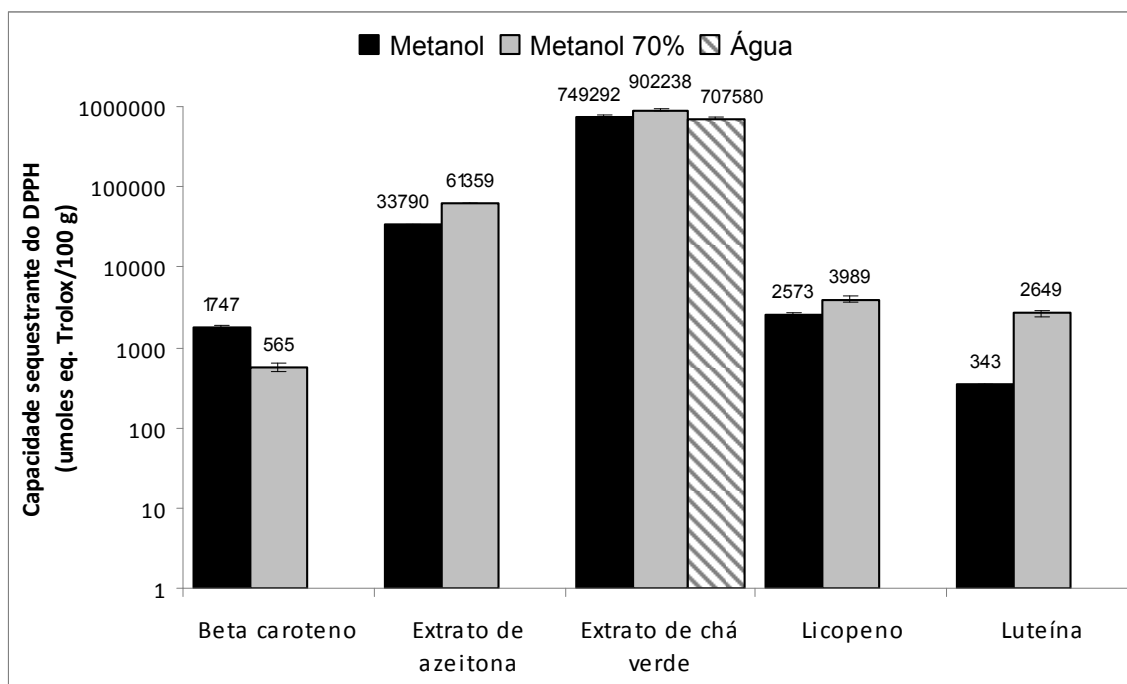


Figura 11 - Capacidade sequestrante do DPPH (μ moles equivalentes de Trolox/100 g b.u.) dos ingredientes industriais solubilizados em diferentes solventes.

Quanto à capacidade de sequestro dos radicais livres do DPPH, todos os ingredientes apresentaram maior capacidade antioxidante quando solubilizados em metanol aquoso 70%, exceto o beta-caroteno.

A Figura 12 apresenta a capacidade antioxidante dos extratos dos cinco ingredientes preparados em metanol aquoso 70%.

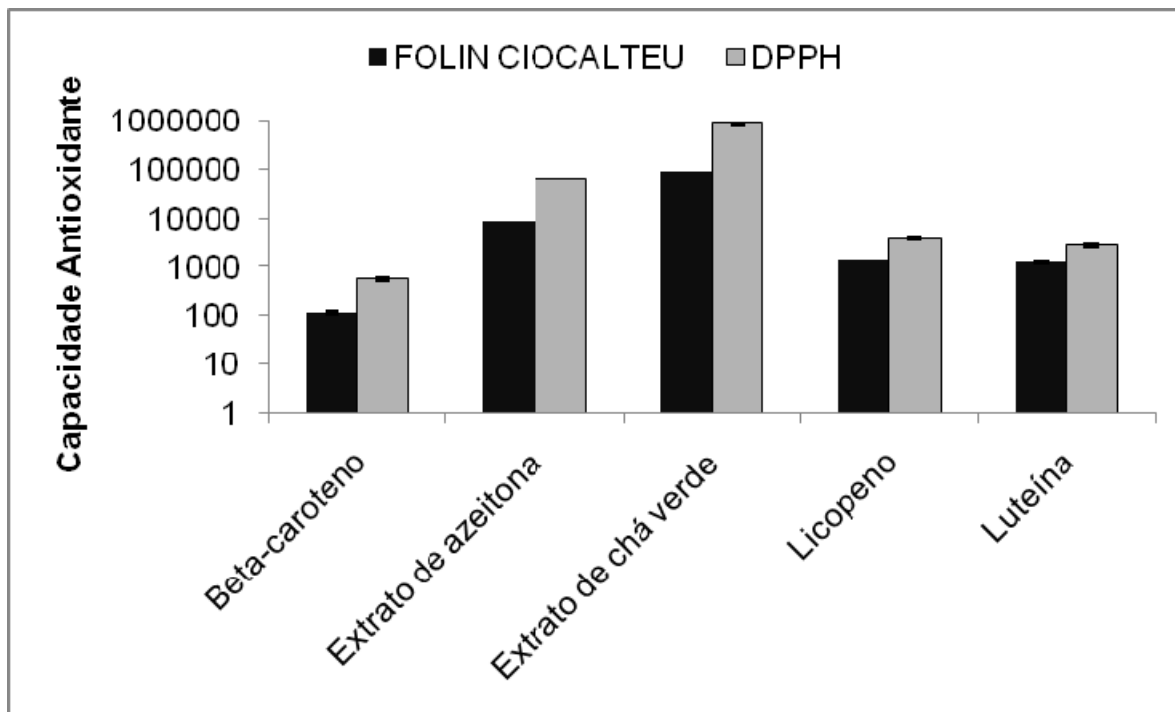


Figura 12 - Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de catequina/100 g b.u.) e capacidade sequestrante do DPPH (μ moles equivalentes de Trolox/100 g b.u.) dos ingredientes industriais empregados no processamento de alimentos funcionais.

O extrato de azeitona e o extrato de chá verde são os ingredientes com maior potencial para serem utilizados em alimentos funcionais. O extrato de chá verde, em especial, quando incorporado em alimentos consumidos habitualmente, pode representar uma alternativa interessante para aumentar o consumo das catequinas e permitir que a população brasileira se beneficie dos efeitos positivos atribuídos a elas. Já os carotenóides não demonstraram expressiva habilidade de aumentar a capacidade antioxidante quando adicionados aos alimentos.

4.4 Refeições prontas

Pesquisas recentes tornam evidente a relação entre dieta e saúde, o que tem levado a indústria alimentícia ao desenvolvimento de novos produtos cujas funções pretendem ir além do fornecimento de nutrientes básicos e da satisfação do paladar do consumidor. Esses produtos são conhecidos como “alimentos funcionais” e têm como

principal função a redução do risco de doenças crônicas não-transmissíveis (BEHRENS et al., 2001).

Em resolução publicada pelo Ministério da Saúde (Resolução nº18 de 30 de abril de 1999), foi definido que “o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (BRASIL, 1999 a).

4.4.1 Caracterização dos protótipos iniciais

Segundo a *Leatherhead Food Research Association* (Reino Unido), alimentos com alegações de benefícios à saúde representarão nos próximos anos cerca de cinco por cento do mercado mundial de alimentos, com um faturamento próximo a US\$ 100 bilhões. No Brasil, este mercado é ainda incipiente, porém com um grande potencial, considerando-se a disponibilidade de fontes naturais, a capacidade produtiva da indústria local e o tamanho do mercado consumidor (BEHRENS; DA SILVA, 2004).

Nesse contexto, foram formulados dois protótipos de refeições prontas visando à possibilidade de alegação funcional em um projeto denominado "Ampliação da funcionalidade dos alimentos", por meio de um convênio firmado por nosso grupo de pesquisa juntamente com a Sadia S. A., CNPq e FINEP (convênio 01.07.0037.00). Os protótipos das refeições foram produzidos na planta piloto da Sadia S.A. (cidade de São Paulo), de acordo com as boas práticas de fabricação e higiene. O desenvolvimento dos produtos foi baseado na observação do comportamento de 110 pessoas em restaurantes do segmento *self-service* por quilo da cidade de São Paulo em maio de 2007. Essas informações foram importantes para a determinação de características como a quantidade em gramas a ser oferecida pelo prato e valor energético da refeição. Para cada um dos protótipos foram elaboradas uma versão controle e outra teste. O Quadro 4 apresenta as informações referentes à composição dos produtos.

Quadro 4 – Caracterização da versão inicial dos protótipos.

CARACTERÍSTICA	PROTÓTIPO 1		PROTÓTIPO 2	
	CONTROLE	TESTE	CONTROLE	TESTE
Ingrediente bioativo	Não foi adicionado nenhum ingrediente bioativo	- Extrato de chá verde; - Fibra solúvel; - Luteína.	Não foi adicionado nenhum ingrediente bioativo	- Beta-caroteno; - Extrato de azeitona; - Fibra solúvel; - Licopeno; - Luteína.
Descrição	Arroz com cenoura e vagem, creme de milho e filé de frango ao molho de ervas		Macarrão fusilli integral com molho à bolonhesa de proteína de soja e vegetais	

Os requisitos específicos para utilização de novos ingredientes e registro de novos alimentos da Anvisa estabelecem que a adição de isoflavonas isoladas caracteriza o produto como suplemento e, dessa forma, não pode ser realizada em alimentos. Nesse sentido, optou-se por empregar um derivado da soja, a proteína texturizada, como fonte de isoflavonas. No entanto, existe uma limitação no que se refere ao controle do conteúdo de isoflavonas presente nos alimentos contendo soja e/ou derivados protéicos. Essa limitação deve-se à variação nos teores desses compostos no próprio grão ou ingrediente empregado como matéria-prima. Por essa razão, a presença das isoflavonas está associada à adição da proteína texturizada de soja e o seu conteúdo poderá variar em função do lote do produto.

A Anvisa, em regulamento técnico considera que substâncias bioativas são, "além dos nutrientes, os não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica". Entre as diversas classes, estão os carotenóides, os flavonóides e os polifenóis (BRASIL, 2002).

A adição do extrato de chá verde visou à incorporação de EGCG, um composto ao qual são atribuídas importantes propriedades antioxidante e antiproliferativa (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). Já o extrato de azeitona é um ingrediente rico em ácido clorogênico, reconhecido pela atividade antioxidante e anti-inflamatória (BITLER et al., 2007). Os carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína) são utilizados

como aditivos em alimentos, em geral, devido à sua capacidade de melhorar a cor das preparações, tais como molhos e massas. Eles são corantes naturais presentes em frutas e vegetais, como tomate, cenoura, manga, mamão, espinafre, entre outros. A sua estrutura química é composta por ligações duplas conjugadas, as quais são responsáveis por sua cor e por algumas de suas atividades biológicas (SHAMI; MOREIRA, 2004). A utilização desses compostos nos protótipos teve como objetivo não apenas a aparência dos pratos, mas também um incremento na capacidade antioxidante dos mesmos. Diversos estudos demonstram a relação entre o aumento na ingestão de alimentos ricos em carotenóides e a redução no risco de desenvolvimento de uma série de doenças. Segundo Olson (1999), os carotenóides sequestram o oxigênio singlete, removem os radicais peróxidos, modulam o metabolismo carcinogênico, inibem a proliferação celular, estimulam a comunicação entre células (junções gap), e elevam a resposta imune.

Todos os extratos estão disponíveis na forma de pó hidrossolúveis, o que facilita a sua incorporação aos alimentos.

Os primeiros protótipos foram analisados em janeiro de 2008 quanto ao conteúdo de umidade e teor protéico. A Tabela 11 apresenta os resultados dessa análise.

Tabela 11 - Conteúdo de umidade (%) e proteínas (% b.u.) dos protótipos na versão inicial das amostras.

AMOSTRA	UMIDADE	PROTEÍNA
Frango controle	73,1	7,0 ± 0,3
Frango teste	73,9	7,2 ± 0,3
Macarrão controle	77,6	7,1 ± 0,4
Macarrão teste	76,1	7,0 ± 0,2

Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata).

Não houve variação expressiva dos valores de umidade e proteína entre as amostras. Em relação aos valores diários de referência recomendados para uma dieta de 2000 kcal (adequada para um adulto com peso aproximado de 70 kg), o consumo de uma porção de 400 g deste produto (uma embalagem) fornece cerca de 28 g de proteína, o que corresponde a 5,6% da necessidade diária.

Uma refeição adequada com aporte energético similar ao oferecido pelos protótipos, composta por três colheres de sopa de arroz, três colheres de sopa de feijão, uma porção média de carne bovina e uma porção média de legumes cozidos poderia oferecer a mesma quantidade de proteína.

4.3.2 Determinação da capacidade antioxidante in vitro

Dados experimentais e observacionais sugerem fortemente que o consumo habitual de frutas e vegetais reduz o estresse oxidativo (JOSHIPURA et al., 2001). Estudos clínicos têm demonstrado uma correlação inversa entre a ingestão de compostos antioxidantes e o risco de câncer gástrico, tanto na porção distal quanto na porção cárdica do estômago (SERAFINI et al., 2002). Além da presença de vegetais, condimentos e outros ingredientes naturalmente ricos em compostos antioxidantes, as amostras testes foram adicionadas de substâncias com alegação de propriedade funcional, as quais também possuem atividade antioxidante. Dessa forma, as refeições prontas foram submetidas à análise da capacidade antioxidante por meio de três diferentes métodos: capacidade redutora do Folin-Ciocalteu, sequestro de radicais livres do DPPH• e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). Os resultados referentes aos dois primeiros métodos citados estão apresentados na Figura 13.

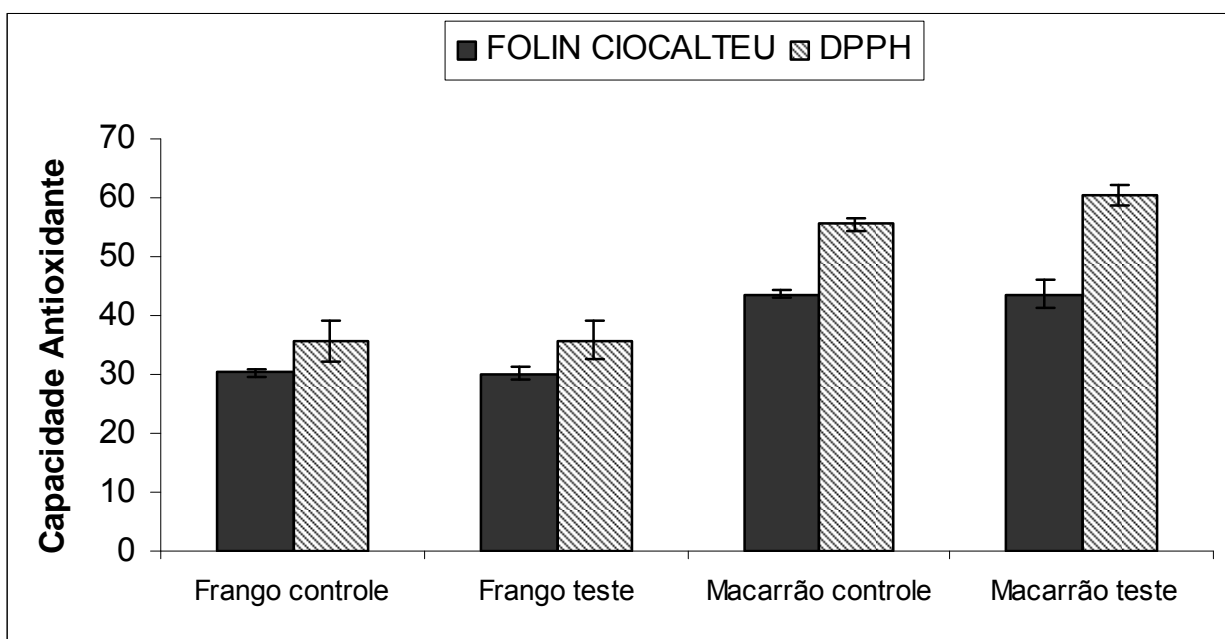


Figura 13 – Capacidade antioxidante da versão inicial dos protótipos determinada pelos métodos de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalente de catequina/100 g amostra b.u.) e capacidade sequestrante do DPPH• (μmoles equivalentes de Trolox/100 g amostra b.u.).

O protótipo à base de macarrão apresentou uma capacidade antioxidante maior comparado ao protótipo à base de filé de frango, nos dois métodos utilizados para análise. Alguns produtos à base de soja e/ou derivados que foram analisados neste trabalho pertencem ao segmento de pratos prontos, como estrogonofe, lasanha e ravioli. Comparados a esses produtos, ambos os protótipos apresentaram uma capacidade redutora do Folin-Ciocalteu similar aos outros alimentos disponíveis no mercado. No entanto, quanto à capacidade redutora do DPPH, o protótipo à base de frango apresentou uma capacidade antioxidante similar aos produtos contendo soja e/ou derivados protéicos e o protótipo à base de macarrão apresentou uma capacidade antioxidante superior a todos os outros produtos, com exceção do chocolate.

Percebe-se também que não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras controle e teste para as duas refeições. Isto sugere que a adição de tais compostos, alguns deles conhecidos por suas atividades antioxidantes, não afetou a

capacidade de reduzir o radical DPPH. O mesmo foi observado em relação à capacidade redutora do Folin-Ciocalteu.

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método do ORAC, foram testadas duas diferentes formas de extração. Inicialmente, realizou-se a extração por meio da metodologia proposta por Prior et al. (2003), a qual utiliza hexano para obtenção da fração lipofílica seguida da extração com acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5 v/v) para a hidrofílica (E1).

Outra metodologia, descrita por Arnao et al. (2001), utiliza metanol/água na proporção 70:30 (v/v) para extração dos compostos hidrossolúveis. O resíduo seco é então re-extraído com acetato de etila para a obtenção da fração lipofílica (E2).

A análise estatística dos resultados de capacidade antioxidante obtidos pelos diferentes métodos de extração permite inferir que houve diferença estatisticamente significativa, tanto no que se refere às frações hidro e lipofílica isoladas, quanto em relação ao conteúdo total. Esse perfil é apresentado na Figura 14.

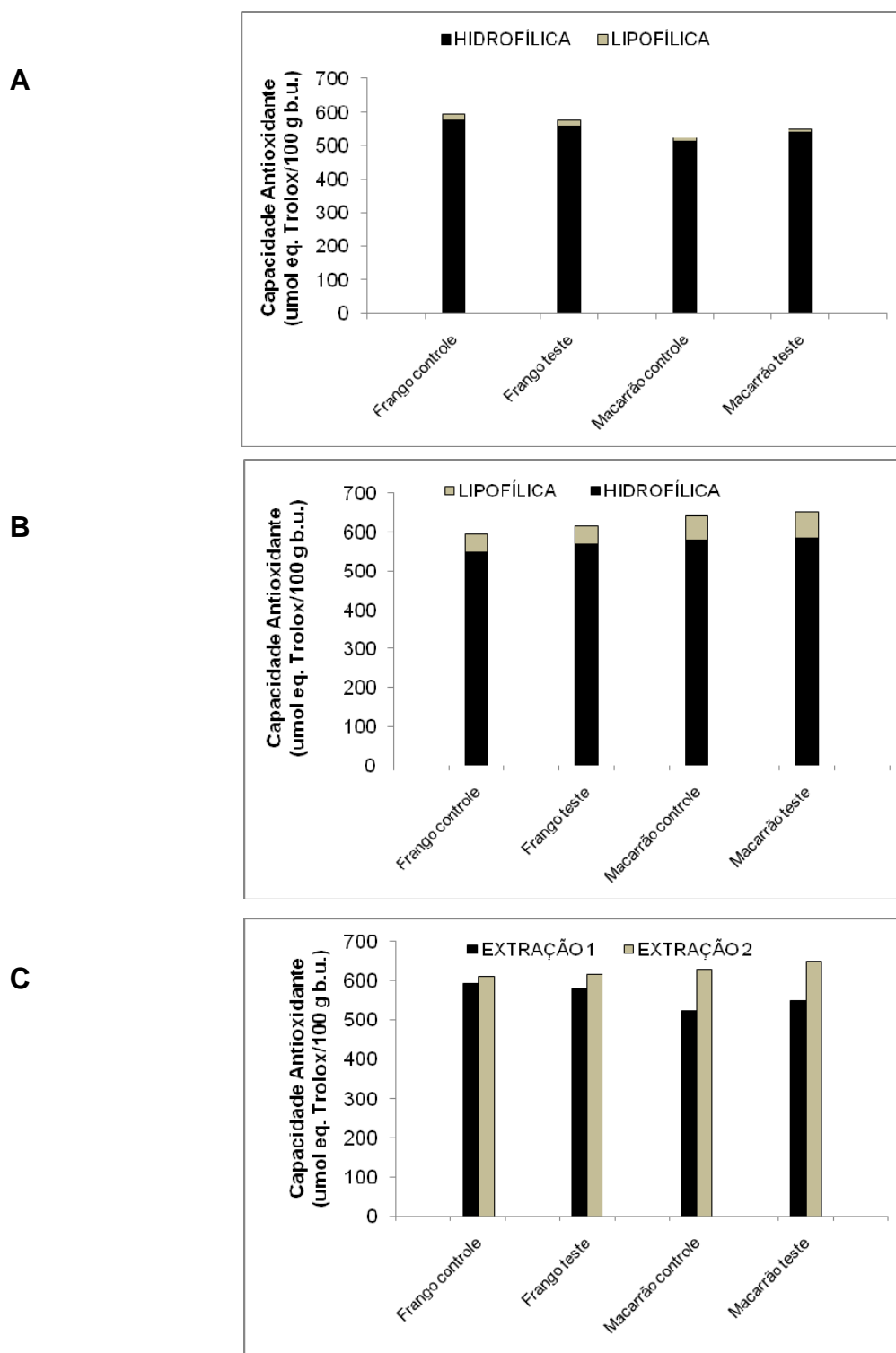


Figura 14 – Contribuição das frações hidro e lipofílica para a capacidade antioxidante total das refeições pela metodologia de extração E1 (A); Contribuição das frações hidro e lipofílica para a capacidade antioxidante total das refeições pela metodologia de

extração E2 (B); Comparação da eficiência das extrações 1 e 2 para a capacidade antioxidante total das refeições (C).

A metodologia E2 realizada inicialmente com metanol aquoso seguida de acetato de etila potencializou a extração dos compostos antioxidantes, em especial aqueles com características lipossolúveis, para todas as amostras analisadas (Figuras 14A e 14B). Sendo assim, os valores de capacidade antioxidante total determinados para os extratos obtidos por esse método são também superiores aos obtidos pela metodologia E1 (Figura 14C).

A Figura 15 apresenta o resultado de capacidade antioxidante total das refeições obtida pelo método ORAC.

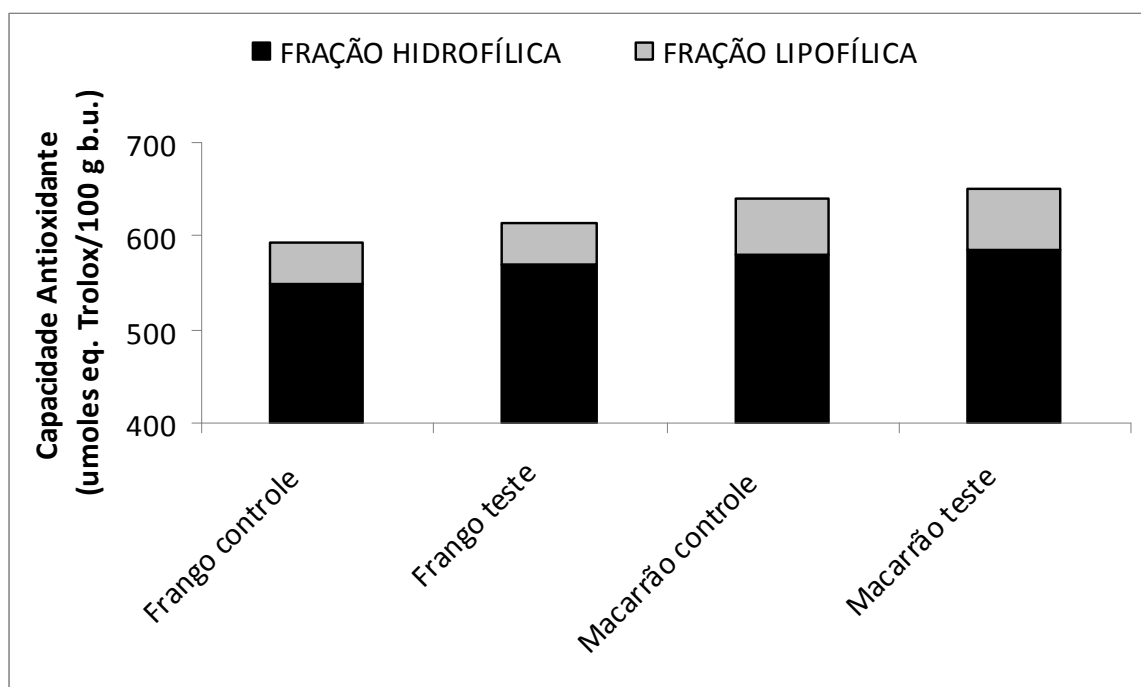


Figura 15 – Capacidade antioxidante da versão inicial dos protótipos determinada pelo método de capacidade de absorção do radical oxigênio (μ moles equivalentes de Trolox/100 g amostra b.u.).

Embora as amostras testes tenham apresentado valores levemente maiores que os controles, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Recentemente, alguns grupos de pesquisa têm se concentrado em avaliar a capacidade antioxidante de matrizes alimentares (OU et al., 2002). Mas infelizmente, os

métodos utilizados nesses estudos são diferentes e a fonte do radical empregada no ensaio pode ter um efeito importante sobre a capacidade antioxidante observada. Tal fato está associado a uma resposta diferenciada dos diversos tipos de compostos antioxidantes frente a uma fonte geradora de radical. Desse modo, a utilização de fontes de radical que tenham relevância no sistema biológico humano tem sido preconizada na análise de alimentos. O radical peroxila é o radical livre mais comum, mas o radical hidroxila, o oxigênio singlete e o radical superóxido também estão presentes em sistemas biológicos. Entretanto, em alguns métodos utilizados para medir a capacidade antioxidante de alimentos, têm sido empregados radicais estranhos ao organismo humano, tais como DPPH• e ABTS (PELLEGRINI et al., 2003).

O ORAC é baseado na inibição da oxidação induzida pelo radical peroxila iniciada pela decomposição térmica de azo-compostos, tais como o AAPH. Os antioxidantes reagem com os radicais peroxila e retardam a degradação da fluoresceína, a qual provê a fluorescência do meio de reação (TEOW et al., 2007).

O ensaio ORAC tem sido amplamente aplicado como um método de escolha em pesquisas e até mesmo em indústrias alimentícias e de suplementos para quantificar a capacidade antioxidante. De fato, uma base de dados está sendo desenvolvida pela aplicação do ORAC em combinação com outros ensaios para determinação do teor de fenólicos totais (WU et al., 2004). A vantagem do método ORAC está na habilidade de se mensurar a capacidade antioxidante dos compostos hidro e lipossolúveis, o que resulta em uma estimativa mais fidedigna da capacidade antioxidante total (PRIOR et al., 2003).

Eberdardt e colaboradores (2005) afirmam que os compostos hidrossolúveis contribuem majoritariamente para a capacidade antioxidante total dos alimentos. Em estudo realizado com diferentes variedades de brócolis, a fração hidrofílica correspondeu a 76-92% do total. Em nosso trabalho, a fração hidrofílica contribuiu com cerca de 90-93% da capacidade antioxidante total dos protótipos.

Inúmeros estudos têm abordado a correlação existente entre os resultados de capacidade antioxidante determinada por diferentes metodologias, assim como a correlação entre estes métodos e a concentração de fitoquímicos em várias matrizes alimentares (TEOW et al., 2007). A Tabela 12 apresenta os coeficientes de correlação

para todos os métodos utilizados na determinação da capacidade antioxidante dos protótipos.

Tabela 12 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os diferentes métodos utilizados para determinação da capacidade antioxidante dos protótipos das refeições prontas.

METODOLOGIAS	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Folin-Ciocalteu x DPPH	0,99
Folin-Ciocalteu x ORAC	0,91
Folin-Ciocalteu x ORAC-H	0,98
Folin-Ciocalteu x ORAC-L	0,83
DPPH x ORAC	0,93
DPPH x ORAC-H	0,99
DPPH x ORAC-L	0,88

Houve correlação positiva e significativa entre todos os métodos utilizados para determinação da capacidade antioxidante dos protótipos das refeições prontas. No entanto, não era esperado que houvesse correlação entre a capacidade antioxidante dos compostos presentes na fração lipofílica e hidrofílica. Vários autores têm demonstrado de forma conclusiva que existe uma forte correlação positiva entre o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante de matrizes alimentares, enquanto outros autores não têm evidenciado esse fato. A composição química e a estrutura química do componente ativo do extrato são fatores importantes que influenciam a eficácia do antioxidante natural (MELO et al., 2006).

Existe uma ampla variedade de métodos *in vitro* para determinação da atividade antioxidante de substâncias isoladas ou de um alimento. Todos os ensaios, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, possuem vantagens e desvantagens. É importante considerar que não existe um método universal simples pelo qual a capacidade antioxidante possa ser mensurada de forma precisa (NIKI, 2001). Este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com mecanismo de ação diferente (MELO et al., 2006).

Pesquisas sugerem, ainda, que a capacidade antioxidante pode ser influenciada pelo substrato a ser oxidado no ensaio, a técnica e o solvente extrator utilizados no método (FRANKEL, 1993). No que se refere aos solventes orgânicos, o metanol destaca-se pela habilidade de extrair grande quantidade de compostos bioativos e tem sido apontado como o mais efetivo (ECONOMOU et al., 1991).

Nos ensaios *in vitro*, os compostos antioxidantes da amostra são testados frente à capacidade de reduzir a taxa de oxidação dos ácidos graxos, fluidos biológicos e radicais gerados, quimicamente, ou por ação de enzimas. Essa capacidade é comparada a um sistema de referência, no qual foi adicionado um antioxidante conhecido, como BHT (hidroxibutiltolueno) ou Trolox, um produto sintético hidrossolúvel análogo à vitamina E (MANCINI-FILHO; CINTRA, 2001).

Segundo Melo et al. (2006), a capacidade antioxidante de um alimento não pode ser explicada somente pelo seu conteúdo de fenólicos totais, mas também pela natureza química desses compostos. A posição e o número de hidroxilas presentes na molécula dos fenóis são fatores muito importantes para a atividade antioxidante. Acredita-se que a orto-dihidroilação contribui para a atividade antioxidante do composto.

4.4.3 Determinação dos flavonóides

A presença dos flavonóides nas plantas está associada ao crescimento e desenvolvimento adequados das espécies, além de atuarem na defesa contra infecções e injúrias. A habilidade desses compostos de agirem como antioxidantes relaciona-se ao fato de serem capazes de estabilizar os radicais peroxila formados após reação com radicais lipídicos. Estas propriedades permitem que a molécula exerça a função de agentes redutores, doadores de hidrogênio, sequestradores do oxigênio singlete, ou ainda, potenciais queladores de metais (MATTHÄUS, 2002).

Realizou-se a determinação do conteúdo de isoflavonas e outros flavonóides presentes nas refeições. A composição e o teor desses compostos na versão inicial dos protótipos são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Conteúdo de flavonóides e ácido clorogênico identificados nos protótipos (versão inicial), expresso em mg/100 g b.u.

COMPOSTOS	FRANGO	FRANGO	MACARRÃO	MACARRÃO
	CONTROLE	TESTE	CONTROLE	TESTE
Isoflavonas	0,28 ± 0,08 ^a	0,29 ± 0,02 ^a	0,17 ± 0,02 ^b	0,18 ± 0,04 ^b
Quercetina	2,2 ± 0,6 ^b	2,2 ± 0,5 ^b	7,1 ± 0,7 ^a	7,2 ± 0,7 ^a
Apigenina	1,10 ± 0,03 ^a	1,05 ± 0,02 ^a	0,43 ± 0,04 ^b	0,42 ± 0,04 ^b
Ácido clorogênico	0,063 ± 0,003 ^b	0,049 ± 0,005 ^c	0,181 ± 0,008 ^a	0,198 ± 0,002 ^a

Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata).

Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as refeições controle e as adicionadas de ingredientes funcionais em relação ao conteúdo de flavonóides.

O protótipo à base de filé de frango (controle e teste) destacou-se em relação ao conteúdo de isoflavonas e apigenina. Os glicosídeos de quercetina e o ácido clorogênico estão presentes em quantidades maiores no protótipo à base de macarrão (controle e teste).

Em relação às isoflavonas, não era esperado que houvesse um teor maior desses compostos no protótipo frango. Nesse prato, foi utilizado um derivado de soja denominado comercialmente como proteína de soja para injeção, uma mistura desenvolvida a partir de proteínas vegetais (soja) que possui alto poder de retenção de água, sem alterar as características do produto. No protótipo macarrão foi utilizada a proteína texturizada de soja. Embora tenham sido empregados derivados da soja nos dois protótipos, a quantidade de ingrediente adicionado ao macarrão foi superior ao frango. Pode-se sugerir, então, que este resultado pode ser decorrente de diferenças no conteúdo de isoflavonas dos próprios ingredientes.

A adição do extrato de chá verde, um concentrado de epigallocatequina galato (EGCG), não foi capaz de incorporar este composto ao protótipo, na quantidade adicionada. A EGCG não foi encontrada na amostra teste do protótipo frango, embora

tenha sido detectada na análise do ingrediente isoladamente. O mesmo ocorreu com o extrato de azeitona, cuja utilização não promoveu incremento no conteúdo de ácido clorogênico.

Rossi e colaboradores (2006) afirmam que a ingestão alimentar de algumas classes de flavonóides (isoflavonas, antocianidinas, flavonas e flavonóis) está associada com uma redução no risco de desenvolvimento de câncer colorretal.

Tomates são reconhecidos como boas fontes de ácidos hidroxinâmicos, sendo o ácido clorogênico um dos mais abundantes, com uma quantidade de 13 a 38 mg por kg de tomate vermelho inteiro. Em uma pesquisa que investigou a biodisponibilidade de alguns compostos antioxidantes do tomate na sua forma *in natura* e cozida, foi demonstrado um significativo aumento nos níveis de ácido clorogênico no plasma humano 2 h após o consumo de tomates cozidos, com pico máximo em 6 horas. O consumo de tomates frescos não promoveu alteração importante dos níveis de ácido clorogênico no plasma dos voluntários, o que demonstra que o cozimento moderado é capaz de aumentar a biodisponibilidade desta substância. Dados na literatura científica quanto à absorção do ácido clorogênico na sua forma intacta são ainda isolados e incompletos, sendo este o primeiro estudo mostrando a presença deste no plasma (BUGIANESI et al., 2004).

4.4.4 Caracterização dos protótipos definitivos

Diante dos dados expostos, foi possível verificar que a adição de ingredientes com alegação funcional nos níveis aqui testados não foi eficaz para promover um incremento na capacidade antioxidante e no teor de flavonóides das refeições (amostra controle em relação a teste). Dessa forma, os protótipos foram reformulados de modo a modificar os parâmetros analisados sem comprometer os atributos sensoriais dos produtos. O Quadro 5 apresenta as características dos novos protótipos.

Quadro 5 – Caracterização da segunda versão dos protótipos.

CARACTERÍSTICA	PROTÓTIPO 1		PROTÓTIPO 2	
	CONTROLE	TESTE	CONTROLE	TESTE
Ingrediente bioativo	Não foi adicionado nenhum ingrediente bioativo	- Fibra solúvel; - Luteína; - Condimentos (manjeriçã e alecrim)	Não foi adicionado nenhum ingrediente bioativo	- Beta-caroteno; - Licopeno; - Luteína; - Fibra solúvel.
Descrição	Arroz com cenoura e vagem, creme de milho e filé de frango ao molho de ervas		Macarrão fusilli integral com molho à bolonhesa de proteína de soja e vegetais	

No protótipo 1, o extrato de chá verde foi retirado da formulação, pois não houve efeito sobre a capacidade antioxidante ou teor de flavonóides na quantidade utilizada. Por se tratar de um ingrediente com sabor residual amargo, a adição de uma quantidade maior poderia comprometer as características organolépticas do produto. Na amostra teste, foi mantida a adição de inulina e luteína. Além disso, na amostra controle foram utilizados apenas salsa, alho e cebola como condimentos. Já na teste, foram adicionados manjeriçã e alecrim, além dos outros três citados anteriormente.

É importante ressaltar que o filé de frango utilizado no protótipo 1 foi adicionado de um antioxidante sintético, o eritorbato de sódio. A sua aplicação em carnes frescas permite estabilizar a cor e a vida útil do alimento. Em carnes curadas, a adição do eritorbato de sódio visa reforçar o efeito conservante do nitrito de sódio e melhorar as características organolépticas do produto por mais tempo. Esse composto é um isômero sintético da vitamina C e assim como o ácido ascórbico, o eritorbato de sódio é um forte agente redutor, capaz de interferir no método de Folin- Ciocalteu e reduzir o radical DPPH•. Embora houvesse a interferência desse composto nos métodos de capacidade antioxidante, foi necessária a sua utilização, uma vez que as carnes adicionadas de

antioxidantes naturais (como extrato de alecrim) não apresentavam perfil sensorial equivalente e descaracterizavam o produto.

Em relação ao protótipo à base de macarrão, foi retirado o extrato de azeitona por esse não ter efeito sobre a capacidade antioxidante ou teor de flavonóides na quantidade utilizada. Assim como o extrato de chá verde, o extrato de azeitona também apresenta sabor residual amargo e a adição de uma quantidade maior poderia comprometer as características organolépticas do produto. Foi mantida a adição de inulina, luteína, beta-caroteno e licopeno.

Após a reformulação dos protótipos, as amostras foram novamente submetidas às mesmas análises realizadas inicialmente. A Tabela 14 apresenta o conteúdo de umidade e proteína das amostras.

Tabela 14 - Conteúdo de umidade (%) e proteínas (% b.u.) dos protótipos na segunda versão das amostras.

AMOSTRA	UMIDADE	PROTEÍNA
Frango controle	75,3	7,5 ± 0,4
Frango teste	72,0	7,1 ± 0,6
Macarrão controle	77,8	5,9 ± 0,3
Macarrão teste	75,8	6,0 ± 0,3

Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata).

Não houve variação significativa em relação ao teor de umidade e ao conteúdo protéico da segunda versão dos protótipos, o que era esperado, uma vez que as modificações realizadas não envolveram ingredientes com contribuição importante para esses parâmetros.

4.3.5 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

As modificações realizadas incluíram ingredientes importantes do ponto de vista da capacidade antioxidante. Portanto, fez-se necessária a análise das amostras pelos mesmos métodos empregados anteriormente: capacidade redutora do Folin-Ciocalteu, sequestro de radicais livres do DPPH• e capacidade de absorção do radical oxigênio.

A Figura 16 apresenta a capacidade antioxidante determinada pelos métodos de Folin-Ciocalteu e sequestro de radicais do DPPH dos protótipos após a reformulação.

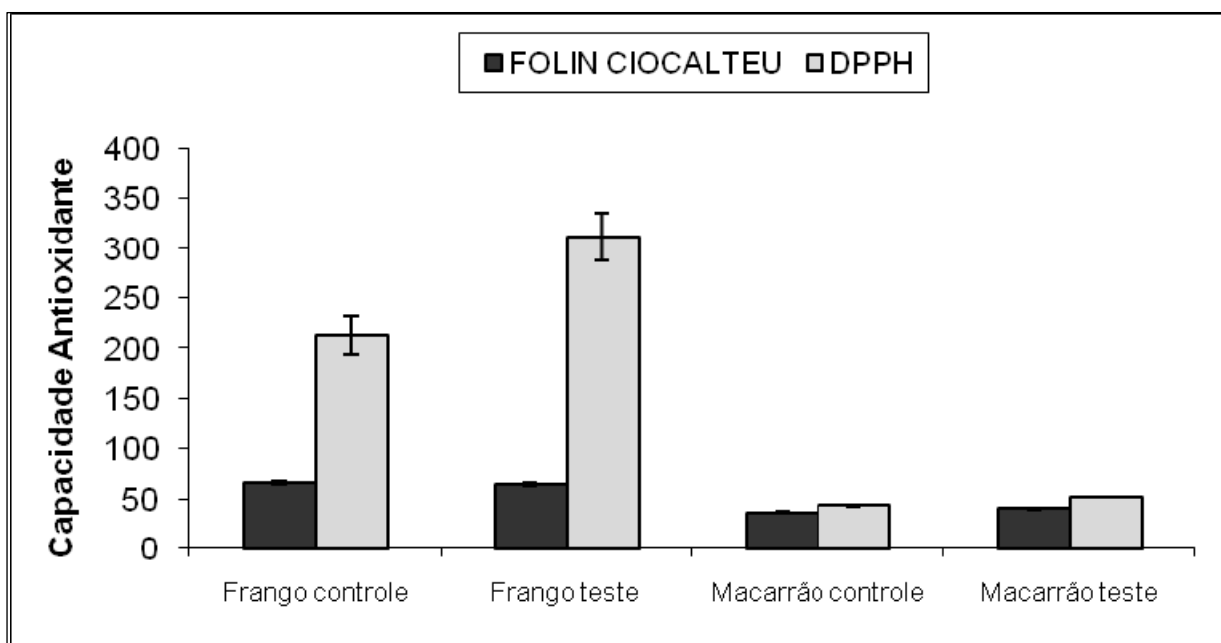


Figura 16 – Capacidade antioxidante da segunda versão dos protótipos determinada pelo método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalente de catequina/100 g amostra b.u.) e capacidade sequestrante do radical DPPH (μ moles equivalentes de Trolox/100 g amostra b.u.).

Devido às modificações realizadas na composição dos protótipos no que se refere ao tipo e à quantidade de ingrediente adicionado, a capacidade antioxidante da segunda versão das amostras diferiu grandemente, o que era esperado. Destaca-se, entretanto, um aumento expressivo da capacidade antioxidante do protótipo frango determinada pelo método do sequestro de radicais do DPPH, o que pode ser atribuído a influência do antioxidante sintético, o eritorbato de sódio, nos resultados obtidos por este método.

Em relação à capacidade redutora do Folin-Ciocalteu, não houve diferença entre a amostra teste e a amostra controle, tanto para o protótipo frango quanto para o macarrão. Quanto à capacidade sequestrante do DPPH, não houve diferença entre controle e teste para o macarrão. Porém, para o protótipo frango, a amostra teste foi estatisticamente diferente do controle. No entanto, ao considerar o desvio padrão essa

diferença torna-se pouco expressiva e portanto, não é possível afirmar que essa diferença será significativa caso esses protótipos sejam produzidos em escala industrial.

Sugere-se que a quantidade adicionada dos ingredientes industriais não tenha sido suficiente para promover um incremento na capacidade antioxidante das amostras. Além disso, pode-se inferir que a forma de incorporação destes ingredientes não tenha sido adequada.

A capacidade antioxidante total dos protótipos determinada pelo método ORAC é apresentada na Figura 17.

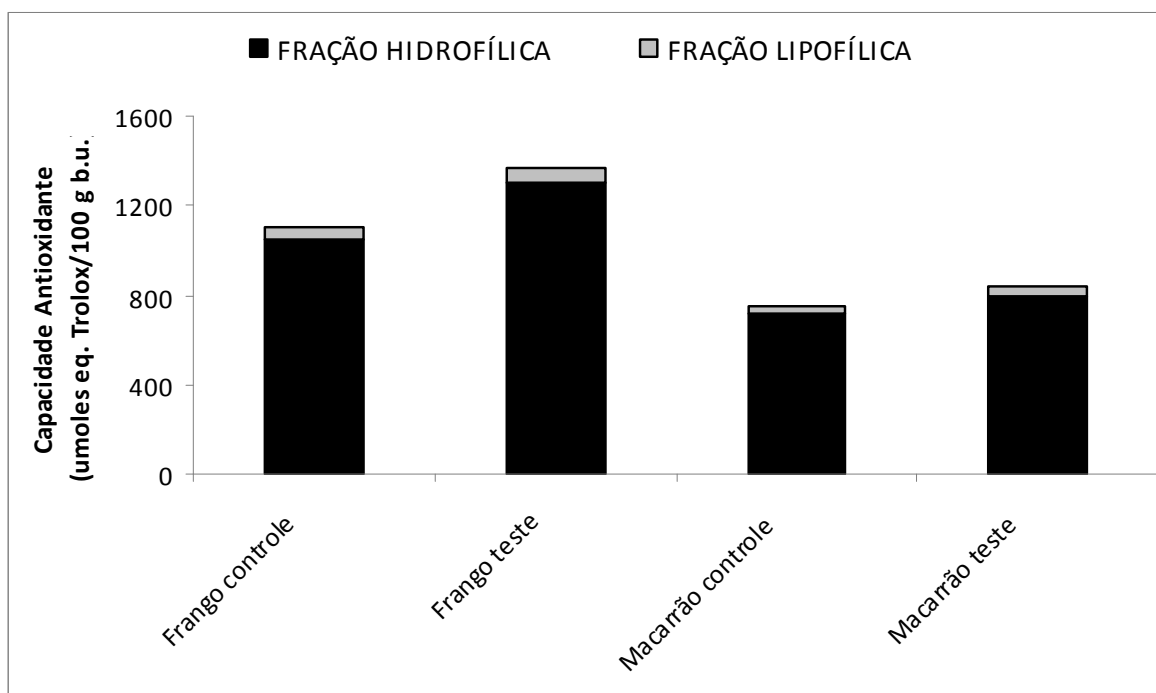


Figura 17 – Capacidade antioxidante da segunda versão dos protótipos determinada pelo método de capacidade de absorção do radical oxigênio (μ moles equivalentes de Trolox/100 g amostra b.u.).

A análise da capacidade antioxidante total pelo método ORAC demonstrou que, em relação à versão inicial, houve um aumento da capacidade antioxidante para todas as amostras. O aumento mais expressivo, assim como nos outros métodos de determinação da capacidade antioxidante, ocorreu no protótipo à base de frango, com um incremento de cerca de duas vezes. Foi verificada diferença estatisticamente

significativa entre as amostras. Repetindo o mesmo perfil dos outros métodos, o protótipo à base de frango apresentou capacidade antioxidante maior do que o protótipo à base de macarrão. No entanto, apesar de existir uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras controle e teste, esta diferença não é tão expressiva e pode ser mascarada quando estes produtos forem fabricados em escala industrial.

Estudos clínicos demonstraram claramente que o *status* antioxidante *in vivo* pode ser alterado pela dieta, mas a resposta depende de fatores como a capacidade antioxidante dos alimentos, a quantidade consumida, o tipo de fitoquímicos e o seu conteúdo na matriz alimentar, a absorção e o metabolismo dos compostos antioxidantes no organismo (PRIOR et al., 2007).

A Tabela 15 apresenta os coeficientes de correlação de Pearson entre os métodos de capacidade antioxidante e mostra que houve forte correlação entre todos os métodos empregados na determinação da capacidade antioxidante das amostras.

Tabela 15 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os diferentes métodos de capacidade antioxidante.

METODOLOGIAS	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
Folin-Ciocalteu x DPPH	0,99
Folin-Ciocalteu x ORAC	0,96
Folin-Ciocalteu x ORAC-H	0,96
Folin-Ciocalteu x ORAC-L	0,86
DPPH x ORAC	0,95
DPPH x ORAC-H	0,94
DPPH x ORAC-L	0,85

4.3.6 Determinação dos flavonóides

Em relação aos flavonóides, a reformulação dos protótipos provocou algumas modificações não apenas no teor, mas também no tipo dos compostos encontrados. A Tabela 16 apresenta o conteúdo de flavonóides e ácido clorogênico presentes na segunda versão das amostras.

Tabela 16 - Conteúdo de flavonóides e ácido clorogênico identificados nos protótipos (segunda versão), expresso em mg/100 g b.u.

COMPOSTOS	FRANGO	FRANGO	MACARRÃO	MACARRÃO
	CONTROLE	TESTE	CONTROLE	TESTE
Quercetina	0,28 ± 0,01 ^d	0,61 ± 0,01 ^c	1,62 ± 0,03 ^b	2,02 ± 0,01 ^a
Apigenina	1,36 ± 0,02 ^b	2,3 ± 0,2 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	2,16 ± 0,03 ^a
Ácido clorogênico	0,038 ± 0,002 ^c	0,155 ± 0,003 ^b	0,78 ± 0,05 ^a	0,86 ± 0,01 ^a
Caempferol	0,088 ± 0,006 ^b	0,112 ± 0,002 ^a	1,22 ± 0,01 ^a	1,220 ± 0,003 ^a

Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata).

Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre as refeições, sendo encontrado um maior teor de flavonóides nas amostras testes, conforme esperado. Comparando o teor desses compostos nas duas versões dos protótipos, é possível perceber que as isoflavonas presentes na versão inicial não foram detectadas na segunda versão. Tal fato pode estar associado a uma limitação do derivado protéico (proteína de soja) utilizado como ingrediente. O contrário ocorreu em relação ao caempferol, o qual foi encontrado apenas nos protótipos reformulados.

O conteúdo de quercetina foi maior nos protótipos iniciais, enquanto o teor de apigenina foi maior na segunda versão dos protótipos. Estas diferenças devem-se, provavelmente, às variações inerentes à matéria-prima empregada. A época em que uma planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas, por exemplo, variações sazonais no teor de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, taninos, ácidos fenólicos, flavonóides, glicosídeos cianogênicos, entre outras (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Entre os flavonóides, flavonas (i.e. apigenina), flavonóis (i.e. quercetina, caempferol) e seus glicosídeos são os compostos mais comuns (BRAVO, 1998). Evidências recentes obtidas em modelos de oxidação *in vitro* relacionados às doenças cardiovasculares têm demonstrado que alguns flavonóides, como a quercetina são antioxidantes mais potentes que as vitaminas (CROZIER et al., 1997). Percebe-se

ainda, que apesar de apresentarem valores expressivos de capacidade antioxidante, essas refeições não são fontes potenciais de flavonóides.

5. CONCLUSÕES

Os alimentos industrializados à base de soja e/ou derivados não apresentam um conteúdo expressivo de isoflavonas quando comparados ao grão. Porém, podem representar fontes alternativas desses compostos, uma vez que a soja não faz parte do hábito alimentar da população brasileira.

Os condimentos e temperos são fontes importantes de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos e os flavonóides. Alecrim, louro, manjerição e orégano apresentaram alta capacidade antioxidante. A salsa foi o condimento de maior destaque no que se refere ao conteúdo de flavonóides. Foram encontrados principalmente os glicosídeos de luteolina e apigenina.

Foram observadas diferenças significativas entre as marcas de condimentos, no que se refere à capacidade redutora do Folin-Ciocalteu, capacidade sequestrante do DPPH e teor de flavonóides. Estas variações podem ser atribuídas ao genótipo das plantas, fatores ambientais, época de colheita, local de plantio, período de coleta das amostras, entre outros. Portanto, para uso em alimentos funcionais, há necessidade de padronização destes ingredientes.

A adição de ingredientes bioativos foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante dos protótipos, sendo este incremento mais expressivo no protótipo 1 (frango). Embora esses produtos apresentem alta capacidade antioxidante, não representam boas fontes de flavonóides para a dieta da população em geral.

Em suma, este trabalho mostrou que os produtos à base de soja e/ou derivados, assim como os condimentos, também podem ser considerados boas fontes de compostos bioativos, apresentando, portanto, potenciais efeitos benéficos sobre a saúde humana e justificando a ampliação dos estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. **Process Biochem.**, v. 40, p. 1131-1136, 2004.
- ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy intake on the serum lipids. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, p. 276-82, 1996.
- ANVISA, 2002 a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 2 de 07 de janeiro de 2002. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Disponível em: www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm. Acesso em: 28 de julho de 2008.
- ANVISA, 2002 b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 2 de 07 de janeiro de 2002. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Disponível em: www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_alimentos.htm. Acesso em: 18 de outubro de 2008.
- AOAC (1995). **Official Methods of Analysis**, Association of Official Analytical Chemists. 16ed., Washington, DC., 1995.
- ARABBI, P. R. Alimentos funcionais: aspectos gerais. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v. 21, p. 82-102, 2001.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J Agric Food Chem**, v. 52, p. 1124-113,1 2004.
- ARAI, Y.; WATANABE, S.; KIMIRA, M. SHIMOI, K.; MOCHIZUKI, R.; KINAE, N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration, **J. Nutr.**, v. 130, p. 2243–2250, 2000.
- ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 73, p. 239-244, 2001.
- BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Teores de Isoflavonas e Capacidade Antioxidante da Soja e Produtos Naturais, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, p. 921-926. 2006 a.
- BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 561-571, 2004.

- BEHRENS, J. H.; ROIG, S. M.; DA SILVA, M. A. A. P. Aspectos de funcionalidade, de rotulagem e de aceitação de extrato hidrossolúvel de soja fermentado e culturas lácteas probióticas. **Boletim SBCTA**, v. 34, n. 2, p. 99-106, 2001.
- BEHRENS, J. H.; DA SILVA, M. A. A. P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, p. 431-439, 2004.
- BERK, Z. **Technology of production of edible flours and protein products from soybeans: Isolated soybean protein** (1992). Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e07.htm>. Acesso em: 13 de outubro de 2008.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BITLER, C. M.; MATT, K.; IRVING, M.; HOOK, G.; YUSEN, J.; EAGAR, F.; KIRSCHNER, K.; WALKER, B.; CREA, R. Olive extract supplement decreases pain and improves daily activities in adults with osteoarthritis and decreases plasma homocysteine in those with rheumatoid arthritis. **Nutrition Research**, v. 27, p. 470-477, 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT, Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 115, de 15 de julho de 1978. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1 agosto 1978.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 maio 1999 a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos funcionais e ou novos ingredientes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 maio 1999 b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução RDC n. 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 julho 2002.
- BUGIANESI, R.; SALUCCI, M.; LEONARDI, C.; FERRACANE, R.; CATASTA, G.; AZZINI, E.; MAIANI, G. Effect of domestic cooking on human bioavailability of

- naringenin, chlorogenic acid, lycopene and β -carotene in cherry tomatoes. **Eur. J. Nutr.**, v. 6, n. 43, p. 1-6, 2004.
- CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p.303-311, 1993.
- CAO, G.; VERDON, C. P.; WU, A. H. B.; WANG, H.; PRIOR, R. L. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 1738-1744, 1995.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K.; BELEIA, A. D.; OLIVEIRA, M. C. N. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybeans cultivars. **Breeding Sci.**, v. 48, p. 409-413, 1998.
- CASSIDY, A.; HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Isoflavones, lignans and stilbenes: origins, metabolism and potential importance to human health. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 1044-1062, 2000.
- CHOI, Y. S.; LEE, B. H.; KIM, J. H.; KIM, N. S. Concentration of phytoestrogens in soybeans and soybean products in Korea. **J Sci Food Agric**, v. 80, p. 1709-1712, 2000.
- CHUN, O. K.; KIM, D. O.; LEE, C. Y. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 27, p. 8067-72, 2003.
- CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, 2005.
- CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R. M. R.; JULIÃO, M. A. S. G.; LOUREIRO, C. K. C.; GIARODOLI, P. B.; PINHEIRO, S. A.; HARRIGAN, A. R.; SPRITZER, P. M.; PARDINI, D. P.; WEISS, R. V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L. A.; PÓVOA, L. C. Fitoestrógenos: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, p. 679-695, 2002.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Planta Medica**, v. 70, p. 1103-1114, 2004.
- CLIFFORD, M. N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. **J Sci Food Agric**, v. 79, p. 362-372, 1999.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

- COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets., **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, p. 1961-1967, 1993.
- COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68, p.1486S-1491S, 1998.
- CROUSE, J. R.; MORGAN, T.; TERRY, J. G.; ELLIS, J.; VITOLINS, M.; BURKE, G. L. A randomized trial comparing the effects of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentration of lipids and lipoproteins. **Arch. Intern. Med.**, v. 159, p. 2070-2076, 1999.
- CROZIER, A.; LEAN, M. E. J.; MCDONALD, M. S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 590-595, 1997.
- DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance (ORAC) assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 48-54, 2004.
- DEVASAGAYAM, T. P. A.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free radical and antioxidant in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, 2004.
- DJURIC, Z.; CHEN, G.; DOERGE, D. R.; HEILBRUN, L. K.; KUCUK, O. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. **Cancer Letters**, v. 172, p. 1-6, 2001.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 26, p. 446-452, 2006.
- EBERHARDT, M. V.; KOBIRA, K.; KECK, A. S.; JUVIK, J. A.; JEFFERY, E. H. Correlation analysis of phytochemical composition, chemical, and cellular measures of antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. italic). **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 7421-7431, 2005.
- ECONOMOU, K. D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 68, n. 2, p. 109-113, 1991.
- ELDRIDGE A. C., KWOLEK, W. F. Soybean isoflavones: effects of environment and variety on composition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 31, p. 394-396, 1983.

- ERICKSON, D. R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Saint Louis: AOAC Press, United Soybean Board, 1995. 584 p.
- FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits. **Food Rev. Inter.**, v. 20, p. 51-75, 2004.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. **Food labeling: Health claims; soy protein and coronary heart disease**. October 26, 1999. Disponível em: <http://www.fda.gov/> Acesso em: 28 de julho de 2008.
- FRANKEL, E. N.; KANNER, J.; GERMAN, J. B.; PARKS, E.; KINSELLA, J. E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substance in red wine. **Lancet**, v. 341, p. 454-457, 1993.
- FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v. 86, p. 6377-6381, 1989.
- FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Review: nutritional and health benefits of soy proteins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 1069-1086, 2001.
- GAHLER, S.; OTTO, K.; BOHM, V. Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 7962-7968, 2003.
- GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alim. Nutr.**, v. 18, n. 2, p. 229-235, 2007.
- GARCIA, M. C.; MARINA, M. L.; LABORDA, F.; TORRE, M. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**, v. 62, p. 325-331, 1998.
- GENOVESE, M. I.; BARBOSA, A. C. L.; PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M. Commercial soy protein ingredients as isoflavone sources for functional foods, **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, p. 53-58, 2007.
- GENOVESE, M. I.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties, **Food Sci Tech Int**, v. 11, p. 205-211. 2005.
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake, **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5987-5993, 2002.
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, p. 86-93. 2001 a.

- GENOVESE, M. I. LAJOLO, F. M. Isoflavonas da soja: fatores que influem nos tipos e teores em alimentos. **Food Ingredients**, v. 11, p. 62-64. 2001 b.
- GENOVESE, M. I.; PINTO, M. S.; BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M. Avaliação do teor de isoflavonas de “suplementos nutricionais à base de soja”, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 159-167, 2003.
- GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J. Phytochemicals and Targets of Chronic Disease. In: **Phytochemicals – a new paradigm**. BIDLACK, W. R., OMAYE, S. T, MESKIN, M. S., JAHNER, D. Pennsylvania: Technomic Publishing Company Inc, 1998. **Chemistry**, v. 53, p. 1370 -1373, 2005.
- GHISELLI, A., SERAFINI, M., NATELLA, F., SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p.1106-1114, 2000.
- GIL, M. I.; TOMS-BARBERN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A. A. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 17, p. 4976-4982, 2002.
- GLAZER, A. N. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: A protective role for creatinine. **FASEB Journal**, v. 2, p.2487-2491, 1988.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, 374-381, 2007.
- GÓES-FAVONI, S. P.; BALÉIA, A. D.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, p. 582-586, 2004.
- GRÜN, I. U.; ADHIKARI, K.; LI, C.; LI, Y.; LIN, B.; ZHANG, J.; FERNANDO, L. N. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 2839-2843, 2001.
- HALLIWELL, B. Free radical and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, p. 253-265, 1994.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health: experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v.25, p. 57-74, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press: Oxford, U.K., 1998.

- HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. **J. Agric. Food Chem.**, v.40, p. 2379-2383, 1992.
- HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 1815-1821, 2002.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- HUTABARAT, L. S.; GREENFIELD, H.; MULHOLLAND, M. Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 43-58, 2001.
- ISSA, A. Y.; VOLATE, S. R.; WARGOVICH, M. J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: new directions and perspectives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 405-419, 2006.
- JOSHIPURA, K. J.; HU, F. B.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; RIMM, E. B.; SPEIZER, F. E.; COLDITZ, G.; ASCHERIO, A.; ROSNER, B.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W. C. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. **Ann. Intern. Med.**, v. 134, n. 12, p. 1106-1114, 2001.
- JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. **Food Chemistry**, v. 73, p. 245-250, 2001.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J. P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 4076-4082, 2001.
- KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 453-464, 2004.
- KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 56, p. 242-258, 1979.
- KLIMCZAK, M. M.; PACHOLEK, B. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. **Nahrung**, v. 46, p. 184-186, 2002.

- KUDOU, D.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, p. 2227-2233, 1991.
- LANGSETH, L. Antioxidants and their effect on health. In: SCHMIDL, M.K.; LABUZA, T.P. **Essential of functional foods**. Maryland: Aspen Publication, 2000.
- MADHUJITH, T.; SHAHIDI, F. Antioxidant potential of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v. 70, p. s85-s90, 2005.
- MANCINI-FILHO, J.; CINTRA, R. M. G. C. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos *in vitro* e *in vivo*. **Nutrire**, v. 22, p. 49-62, 2001.
- MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50, p. 5-18, 2000.
- MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **J. Food Sci.**, v. 58, p. 144-147, 1993.
- MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, p. 401-407, 2006.
- MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 3444-3452, 2002.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.
- MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 581-587, 2005.
- MORR, C. V. Current status of soy protein functionality in food systems. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 67, p. 265-271, 1990.
- NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v. 18, n. 6, p. 524-525, 2001.
- OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; HASHIMOTO, K.; YAGI, A. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. **Phytochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1463-1466, 1994.
- OLSON, J. A. Carotenoids and human health. **Arch Latinoam Nutr**, v. 49, n. 3, p. 7-11, 1999.

- OLTHOF, M. R. HOLLMAN, P. C. H.; BUIJSMAN, M. N. C. P.; VAN AMELSVOORT, J. M. M.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **J. Nutr.**, v. 133, n. 6, p. 1806-1814, 2003.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 4619-4629, 2001.
- OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 3122-8, 2002.
- PARK, Y. K.; KOO, M. H.; CARVALHO, P. O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim SBCTA**, v. 31, p. 2000-2006, 1997.
- PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; RIO, D. D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy by three different in vitro assays. **J. Nutr.**, v. 133, p. 2812-9, 2003.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Effect of storage temperature and water activity on the content and profile of isoflavones, antioxidant activity, and in vitro protein digestibility of soy protein isolates and defatted soy flours, **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 6340-6346, 2005.
- PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 78 (suppl), p. 570S-8S, 2003.
- PRIOR, R. L.; GU, L.; WU, X.; JACOB, R. A.; SOTOUDEH, G.; KADER, A. A.; COOK, R. A. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 170-181, 2007.
- PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

- PSZCZOLA, D. E. 2001: a spice odyssey. **Food Technology**, v. 55, p. 36-44, 2001.
- PSZCZOLA, D. E. Evolving ingredients components offer specific health value. **Food Technology**, v. 56, p. 50-59, 2002.
- RIBEIRO, E. P; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Editora Edgar Blücher: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. 184p.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.
- ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; CABRAL, L. M. C.; CABRAL, L. C.; FARIAS, C. A. A.; DOMINGUES, A. M. Effect of enzymatic treatment and filtration on sensory characteristics and physical stability of soymilk. **Food Control**, v. 14, p. 187-192, 2002.
- ROSSI, M.; NEGRI, E.; TALAMINI, R.; BOSETTI, C.; PARPINEL, M.; GNAGNARELLA, P.; FRANCESCHI, S.; DAL MASO, L.; MONTELLA, M.; GIACOSA, A.; LA VECCHIA, C. Flavonoids and colorectal cancer in Italy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, p. 1555-8, 2006.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J Sci Food Agric**, v. 76, p. 270-276, 1998.
- SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, v. 180, 2073S-2085S, 2000.
- SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 567- 579, 2007.
- SERAFINI, M.; BELLOCCO, R.; WOLK, A.; EKSTROM, A. M. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. **Gastroenterology**, v. 123, p. 985-99, 2002.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. CRC Press, p. 403-427, 2004.

- SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E, A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, 2004.
- SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 7749-7759, 2005.
- SINGH, R. P.; MURTHY, K. N. C.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 81-86, 2002.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.
- SONG, T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P. A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 1607-1610, 1999.
- SOUZA, G.; VALLE, J. L. E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. **Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Alim.**, v. 34, p. 61-69, 2000.
- STEPHEN, A. M. Regulatory aspects of functional products. In: MAZZA, G. **Functional foods: biochemical & processing aspects**. Technomic, 1998. p. 403-437.
- SU, L.; YIN, J. J.; CHARLES, D.; ZHOU, K.; MOORE, J.; YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and venging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, v. 100, p. 990-997, 2007.
- TANG, S. Z.; KERRY, J. P.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D. J. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry**, v. 76, p. 45-51, 2002.
- TBCAUSP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Disponível em: www.fcf.usp.br/tabela/index.asp. Acesso em: 13 de setembro de 2008.
- TEOW, C. C., TRUONG, V. D., MCFEETERS, R. F., THOMPSON, R. L., PECOTA, K. V., YENCHO, G. C. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. **Food Chemistry**, 103, 829-838, 2007.
- TONG, L. M.; SASAKI, S.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 1473-1478, 2000.

- USDA – United States Department of Agriculture, 2007. **USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods**. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>. Acesso em: 07 de agosto de 2008.
- VALKON, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44- 84, 2007.
- VISSER, A.; THOMAS, A. Review: soya protein products – their processing, functionality and application aspects. **Food Rev. Int.**, v. 3, p. 1-32, 1987.
- WANG, C.; MA, Q.; PAGADALA, S.; SHERRARD, M. S.; KRISHNAN, P. G. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 75, p. 337-341, 1998.
- WANG, H., MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing . **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 2377-2383, 1996.
- WANG, H., MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **J. Agric. Chem.**, v. 42, p. 1674-1677, 1994 a.
- WANG, H., MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1666-1673, 1994 b.
- WANG, S. H.; MAIA, L. H.; CABRAL, L. C.; GERMANI, R.; BORGES, J. T. S. Influência da proporção arroz: soja sobre a solubilidade e as propriedades espumantes dos mingaus desidratados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 20, p. 83-89, 2000
- WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 838-849, 2004.
- WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 4026-37, 2004.
- XU, Z.; WU, Q.; GODBER, S. J. Stabilities of daidzin, glycitin, genistin and generation of derivatives during heating. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 7402-7406, 2002.
- ZHANG, Y. C.; ALBRECHT, D.; BOMSER, J.; SCHWARTZ, S. J.; VODOVOTZ, Y. Isoflavone Profile and Biological Activity of Soy Bread. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 7611-7616, 2003.