



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BEATRIZ CERVEJEIRA BOLANHO

**COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE
EM DERIVADOS DE SOJA**

Londrina
2010

BEATRIZ CERVEJEIRA BOLANHO

**COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE
EM DERIVADOS DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Adelaide Del Pino Beléia

Londrina
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

BOLANHO, Beatriz Cervejeira

Compostos bioativos e potencial antioxidante em derivados de soja / Beatriz Cervejeira Bolanho. Londrina-PR [s.n], 2010. 86f.

Orientadora: Dra. Adelaide Del Pino Beléia. DISSERTAÇÃO (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina.

1. Phenolics compounds, flavonoids, phytic acid, minerals. I. Beléia, Adelaide Del Pino. II. Universidade Estadual de Londrina.

BEATRIZ CERVEJEIRA BOLANHO

**COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM
DERIVADOS DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Adelaide Del Pino Beléia
UEL – Londrina – PR

Profª. Dra. Rúbia Casagrande
UEL – Londrina – PR

Profª. Dra. Neusa Fátima Seibel
UTFPR

Londrina, 31 de março de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José e Erides,
pelo exemplo de vida,
Minha eterna gratidão

A Deus por cuidar da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Adelaide Del Pino Beléia pela valiosa orientação, compreensão, paciência e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de estudos fornecida. A EMBRAPA pela amostra de soja, ao IAPAR pela análise de minerais.

Aos docentes do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – DCTA da Universidade Estadual de Londrina, pelo incentivo, atenção e conhecimentos transmitidos.

As professoras Dra. Marta de Toledo Benassi e Dra. Rúbia Casagrande por todo auxílio prestado durante a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Elza Youssef Youssef Matulaitis, aos técnicos Berenice Figueiredo, Marli Piologo Pereira Pinto, e em especial, a Neusa Cassula dos Santos e Nelson Heitor Fuzinato, pela imensa ajuda durante o trabalho no laboratório.

Aos amigos de mestrado, especialmente Talita, Flávia, Débora e Patrícia, pelo apoio, carinho e por tornar as longas horas de estudo em momentos agradáveis.

Aos companheiros de laboratório, por todo auxílio prestado: Vinícius, Mariana, Luiz Alexandre, Luiz Rodrigo e Rafael. A Michele, pela imensa ajuda dentro e fora do laboratório, por alegrar os meus dias e se tornar amiga para vida toda.

Aos meus queridos amigos da Química: Marcela, Paulo e Fábio, pelo apoio, força e carinho, por mostrar que o caminho árduo pode ser adorável quando se têm amigos.

A Amanda, pela amizade, atenção e por ser minha primeira e mais forte fonte de incentivo.

A Marcela Terhaag, por compartilhar seu apartamento comigo, pelo consolo e estímulos.

A toda minha família, em especial a meus pais, Erides e José, e ao meu irmão Guilherme por todo o amor, atenção, zelo, compreensão e por me preparem para chegar até aqui.

Em especial a Deus, por estar sempre comigo e não deixar que em momento nenhum o desânimo ou as dificuldades superassem a vontade de alcançar esse objetivo.

*Recebi a instrução como uma grande soma de prata,
e possuireis nela grande quantidade de ouro.
Que vossa alma se regozije na misericórdia de Deus!
E não sereis humilhados quando O louvardes.
Cumprí vossa tarefa antes que o tempo passe e,
no devido tempo, Ele vos dará a recompensa.*

(Eclesiástico 51, 36-38)

BOLANHO, Beatriz Cervejeira. **Compostos Bioativos e Potencial Antioxidante de Derivados de Soja**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A soja e seus derivados são fontes de nutrientes importantes, tais como proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais. Além disso, contém compostos fenólicos, flavonóides e ácido fítico (AF), considerados antioxidantes, pois interagem com radicais livres (RL) ou seus precursores, impedindo danos oxidativos às biomoléculas. O objetivo deste estudo foi avaliar como o processamento pode afetar o teor e o potencial dos compostos antioxidantes, analisando derivados comerciais de soja. Foram determinados compostos fenólicos totais, flavonóides totais, ácido fítico e minerais (fósforo, cobre e ferro). A atividade antioxidante (AA) foi avaliada pelos métodos ABTS⁺, DPPH[•], FRAP e peroxidação do ácido linoléico (PAL). A proteína micronizada (PMS), a farinha desengordurada (FDS) e proteína texturizada (PTS) apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos e maior AA avaliada pelos métodos ABTS⁺, DPPH[•] e FRAP, sendo que a PMS também demonstrou maior teor de flavonóides totais. Os tofus analisados apresentaram o menor teor de compostos bioativos e juntamente com o isolado protéico (IPS) e a fibra de soja (FIS) demonstraram menor AA. Pelo método PAL, a FDS, a PMS e os grãos de soja apresentaram as maiores porcentagens de inibição 85,6; 81,3 e 80,3%, respectivamente. Em relação ao AF, houve uma variação de 0,60 (fibra e gérmen de soja) a 2,45 g/100g (tofu marca 2). O teor de ferro variou de 6,85 mg/100g b.s. (extrato hidrossolúvel de soja marca 3) a 26,81 mg/100g b.s. (fibra e gérmen de soja), enquanto a concentração de cobre sofreu menor variação, de 0,77 mg/100g b.s. (FIS) a 1,94 mg/100g b.s. (IPS marca 1). Os resultados sugerem que a razão molar fitato-ferro (> 0,25) permite que o ferro seja totalmente quelado pelo AF, impedindo que este metal catalise as reações de peroxidação lipídica. Pela Análise de Componentes Principais, pôde-se notar que com exceção do IPS os produtos com elevado teor de proteínas (PMS, FDS, PTS, EHS e grãos de soja) foram caracterizados pelo maior teor de compostos fenólicos, flavonóides, cobre e elevada AA, indicando que alguns processamentos como moagem, desengorduramento e extrusão termoplástica preservam os compostos antioxidantes, enquanto a extração alcalina ou alcoólica causam perdas destes compostos, diminuindo a AA. Os produtos contendo fibra de soja se destacaram pelo alto teor de Fe e os tofus pela elevada concentração de AF. No entanto, apenas o tofu está pronto para o consumo, os demais produtos poderão ser diluídos ou passar por outros processamentos, o que afetará a concentração de compostos bioativos e potencial antioxidante dos mesmos.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Flavonóides. Ácido fítico. Minerais.

BOLANHO, Beatriz Cervejeira. **Bioactive Compounds and Antioxidant Potential of Soy Products**. 2010. 77 f. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Soy and soy products are a source of important nutrients, like proteins, lipids, vitamins and minerals. Furthermore, they have phenolics compounds, flavonoids and phytic acid (PA), considered antioxidants, because they interact with free radicals or with its precursors, preventing oxidative damage to biomolecules. The objective of this study was to estimate how the process can affect the content and the potential of antioxidants compounds, analyzing commercial soy products. The content of total phenolics, total flavonoids, phytic acid and minerals (phosphorus, copper and iron) were estimated. The antioxidant activity (AA) was determined by various tests: ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP and linoleic acid peroxidation (LAP). The micronized soy protein (MSP), defatted soy flour (DSF) and textured soy protein (TSP) showed the highest content of phenolics compounds and the highest AA, evaluate with ABTS^{•+}, DPPH[•] and FRAP methods and the PMS also showed the highest content of flavonoids. The lowest content of bioactive compounds was found in tofus and in isolated soy protein (ISP) and soy fiber (SFI), those products showed the lowest AA. In LAP test, DSF, MSP and soybeans showed the highest percentage of inhibition 85.6; 81.3 and 80.3%, respectively. The content of PA ranged between 0.60 (soy fiber and germ) and 2.45 g/100g (tofu brand 2). The concentration of iron and copper ranged between 6.85 mg/100g b.s. (aqueous extract of soybean brand 3) and 26.81 mg/100g b.s. (soy fiber and germ), and between 0.77 mg/100g b.s. (SFI) and 1.94 mg/100g b.s. (ISP brand 1), respectively. The results suggest that the molar ratio phytate-iron ($> 0,25$) allows the complete chelation of the iron by PA, hindering the catalization of lipidic peroxidation reaction. The Principal Component Analysis showed that with exception of ISP, the products with the highest protein content (MSP, DSF, TSP, aqueous extract and soybeans) were characterized by the highest content of phenolics, flavonoids, copper and highest AA, what indicate that some processes like milling, defating and thermoplastic extrusion, preserves the antioxidant compounds, while alkaline and alcoholic extraction cause loss of phenolics compounds, decreasing the AA. The products that contain soy fiber had the highest content of iron and the tofus had the highest concentration of PA. Tofu is the only product ready for consumption, the others will be diluted or reprocessed, what will affect the concentration of bioactive compounds and its potential antioxidant capacity.

Keywords: Phenolics compounds. Flavonoids. Phytic acid. Minerals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica dos flavonóides	22
Figura 2 – Estrutura química de isoflavona	24
Figura 3 – Estrutura do ácido fítico	27
Figura 4 – Análise de componentes principais a partir da composição e da atividade antioxidante: projeção das variáveis (A) e gráfico de amostras (B).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Teores de umidade (%), de fenólicos totais (mg EAG/100g b.s.) e de flavonóides totais (mg EQ/100g b.s.) na soja e produtos derivados.....	46
Tabela 2 –	Atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP (µmol de Trolox/g de amostra b.s.) na soja e produtos derivados	52
Tabela 3 –	Atividade antioxidante avaliada pelo método de peroxidação do ácido linoléico (% de inibição) e resíduo seco dos extratos (%) na soja e produtos derivados	56
Tabela 4 –	P total, P fítico, AF (g/100g b.s.) na soja e produtos derivados.....	58
Tabela 5 –	Teor de cinzas (g/100g b.s.), cobre e ferro (mg/100g b.s.) na soja e produtos derivados	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AF	ácido fítico
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
b.s.	base seca
b.u.	base úmida
BHT	Butilidroxitolueno
Ca	cálcio
Cu	cobre
DPPH	2,2 difenil-1- picrilhidrazil
EAG	equivalente ácido gálico
EC	equivalente catequina
EHS	extrato hidrossolúvel de soja
EQ	equivalente quercetina
EROS	espécies reativas de oxigênio
FC	Folin-Ciocalteu
FDS	farinha desengordurada de soja
Fe	ferro
FISO	farinha integral de soja orgânica
FIS	fibra de soja
FGS	fibra e gérmen de soja
Fl	flavonóide
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
g	grama
GDL	glucona-delta-lactona
HDL	lipoproteína de alta densidade
IPS	isolado protéico de soja
LDL	lipoproteína de baixa densidade
mg	miligrama
Mg	Magnésio
OMS	Organização Mundial da saúde

P	fósforo
PAL	Peroxidação do ácido linoléico
Pf	fósforo fítico
PM	peso molecular
PMS	proteína micronizada de soja
Pt	fósforo total
PTS	proteína texturizada de soja
r	coeficiente de correlação
RL	radical livre
rpm	rotação por minuto
TCA	ácido tricloroacético
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
UV	ultravioleta
Zn	zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	SOJA	18
3.2	COMPOSTOS PRESENTES NA SOJA ASSOCIADOS COM A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	20
3.2.1	Compostos Fenólicos	20
3.2.2	Flavonóides	21
3.2.2.1	Isoflavonas	24
3.2.3	Ácido Fítico	26
3.3	PRODUTOS À BASE DE SOJA E O PERFIL DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	29
3.4	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	31
3.4.1	Métodos Utilizados para a Determinação da Capacidade Antioxidante	32
3.4.2	Capacidade Antioxidante de Derivados de Soja	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	MATERIAL	37
4.2	MÉTODOS	37
4.2.1	Extração de Compostos Antioxidantes	37
4.2.2	Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais	38
4.2.3	Determinação do Teor de Flavonóides Totais	38
4.2.4	Determinação da Atividade Antioxidante	39
4.2.4.1	Atividade antioxidante avaliada pelo sequestro do radical livre DPPH	39
4.2.4.2	Atividade antioxidante avaliada pelo sequestro do radical livre ABTS ⁺	39
4.2.4.3	Atividade antioxidante avaliada pelo poder de redução do ferro FRAP	40
4.2.4.4	Atividade antioxidante avaliada pelo método de peroxidação lipídica	40
4.2.5	Determinação de Ácido Fítico	41
4.2.6	Determinação dos Minerais Fósforo, Cobre e Ferro	42
4.2.7	Determinação de Cinzas	42

4.2.8	Determinação de Umidade e Resíduo Seco.....	42
4.2.9	Análise Estatística.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS.....	44
5.2	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	50
5.3	ÁCIDO FÍTICO E MINERAIS	57
5.4	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	63
6	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor e consumidor de vegetais, sendo o segundo maior produtor mundial de soja. O principal interesse na produção desta leguminosa está relacionado com a produção de óleo e de proteínas, porém todos os demais componentes e fitoquímicos merecem atenção (DUXBURY, 1991). De 1992 até 2008, a venda de produtos a base de soja na América do Norte, apresentou um crescimento de \$ 300 milhões para aproximadamente \$ 4 bilhões. Esta tendência acompanha o surgimento de novos produtos no mercado e está relacionada aos possíveis efeitos benéficos à saúde dos consumidores (SANA, 2010).

A soja é uma importante alternativa para a nutrição humana, sendo uma excelente fonte de proteína, energia, vitaminas lipossolúveis (principalmente vitamina E), minerais (como ferro, cálcio e zinco) e antioxidantes. Além disso, é rica em ácidos graxos essenciais como o ácido linoléico, conhecido por auxiliar na redução do colesterol (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000).

A soja e seus derivados são fontes de compostos fenólicos, sendo que entre os flavonóides, predominam as isoflavonas. A concentração destes compostos é muito variada, pois depende da cultivar do grão, solo, clima, local onde foi cultivada e, principalmente, do tipo de processamento utilizado no preparo dos produtos (CARRÃO-PANIZZI et al., 1999; WANG; MURPHY, 1994b; BARBOSA et al., 2006; GENOVESE; LAJOLO, 2001).

Os derivados da soja, como farinhas desengorduradas, isolados, concentrados e texturizados protéicos são amplamente utilizados na indústria alimentícia em decorrência de suas propriedades funcionais. Além destes, o extrato hidrossolúvel de soja e o tofu estão conquistando cada vez mais o mercado, devido à melhoria nas suas características sensoriais. Esses produtos contêm quantidades significativas de isoflavonas, as quais têm mostrado em dados experimentais e clínicos que representam uma alternativa promissora na prevenção de muitas doenças hormônio-dependentes, incluindo câncer, sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares e osteoporose (ANDERSON; SMITH; WASHNOCK, 1999; AGUIAR, 2002).

Os compostos fenólicos presentes nestes produtos apresentam atividade antioxidante (AA). Atualmente tem-se atribuído aos radicais livres a origem de muitos problemas de saúde. Estas moléculas instáveis são formadas durante a utilização do oxigênio

pelo organismo, que podem iniciar uma reação em cadeia produzindo cada vez mais radicais livres (RL). Os antioxidantes interagem e estabilizam estas espécies reativas, possibilitando a prevenção de alguns danos causados ao corpo humano. O papel dos antioxidantes envolve a doação de elétrons ou a transferência de átomos de hidrogênio para os radicais livres, sem comprometer a estabilidade de suas moléculas. Além disso, são capazes de inibir a peroxidação lipídica *in vitro* através de sua ação sequestrante ou podem agir como quelante de metais (BARBOSA et al., 2006; OUFNAC, 2006). O ferro (Fe) e em menor extensão o cobre (Cu), são responsáveis por acelerar a oxidação lipídica, aumentando a concentração de radicais livres (MADHAVI; DESHPANDE; SALUNKHE, 1995).

Os grãos de soja ainda apresentam em sua composição, ácido fítico (AF), geralmente associado aos corpos protéicos, cuja concentração varia de 1 a 1,5% (LIU, 1997). O AF é considerado um agente quelante, com capacidade de interagir com o ferro bloqueando todas as suas possibilidades de ligação e impedindo que este mineral catalise a peroxidação lipídica, protegendo os alimentos contra a formação de radicais livres. Além disso, o poder quelante do AF está relacionado com efeitos benéficos à saúde, tais como redução de triglicerídeos e colesterol (ZHOU; ERDMAN, 1995).

Além do ácido fítico, os flavonóides podem agir quelando estes íons metálicos, e há evidências que os quelatos formados são mais efetivos no sequestro de RL que os flavonóides isolados (KOSTYUK et al., 2004; MALESEV; KUNTIC, 2007; MORIDANI et al., 2003).

Vários métodos são utilizados para caracterizar a capacidade antioxidante de alimentos. No entanto, ainda não foi estabelecido um método universal pelo qual a AA possa ser avaliada precisamente (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). A capacidade antioxidante dos derivados de soja foi estudada pelos ensaios de DPPH[•] (2,2 difenil-1- picrilhidrazil) (BARBOSA et al., 2006), co-oxidação β-caroteno/ácido linoléico (BARBOSA et al., 2006; PRATT; BIRAT, 1979), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (YEN; LAI, 2003) e FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power (BOLLING; BLUMBERG; CHEN, 2009). Outros métodos como ABTS^{•+} (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)) e peroxidação do ácido linoléico (PAL) também podem ser utilizados como alternativa para verificar a atuação dos componentes da soja como antioxidantes.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar os principais compostos bioativos presentes nos derivados de soja e avaliar seu potencial antioxidante, utilizando os métodos de sequestro de radicais livres DPPH[•] e ABTS^{•+}, poder de redução do ferro (FRAP) e peroxidação do ácido linoléico.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, ácido fítico, cobre e ferro, presente na soja e seus derivados e avaliar os potenciais antioxidantes dos produtos por diferentes métodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, ácido fítico, cobre e ferro na soja (BRS 267) e em amostras comerciais de farinha de soja (orgânica e desengordurada), proteína texturizada de soja, isolado protéico de soja, proteína micronizada de soja, extrato hidrossolúvel de soja e tofu, de diferentes marcas e lotes;
- Avaliar a capacidade antioxidante da soja e seus derivados comerciais através dos métodos DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP e peroxidação do ácido linoléico;
- Estabelecer correlações entre os compostos fenólicos, flavonóides, ácido fítico e minerais e as metodologias de avaliação da atividade antioxidante;
- Realizar análise de componentes principais para avaliar como os diferentes produtos podem ser diferenciados pelo conteúdo de compostos fenólicos, flavonóides, ácido fítico, minerais e capacidade antioxidante.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SOJA

A soja, uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem, foi introduzida no Ocidente no final do século XV e início do século XVI. Chegou aos Estados Unidos no ano de 1804, mas sua importância na produção de grãos aumentou somente a partir de 1941 (MORAIS; SILVA, 1996).

Esta leguminosa foi inserida no Brasil no final do século XIX e a expansão das lavouras no país foi gradativa, atingindo maior proporção a partir da década de 60 nos estados do sul. As condições edafoclimáticas desta região e os estímulos à industrialização e à exportação, baseados em programas de incentivo fiscal e de modernização agrícola e agroindustrial, permitiram o crescimento da produção. O melhoramento genético e a adaptação de tecnologias possibilitaram a introdução da cultura em outras regiões, nas quais a produtividade média vem aumentando a cada ano (BARBOSA; ASSUMPCÃO, 2001; MORAIS; SILVA, 1996).

Atualmente, o Brasil ocupa a posição de segundo produtor mundial de soja, sendo Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul os principais estados produtores. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra de soja até fevereiro de 2010 totalizou uma produção de 66,7 milhões de toneladas, 16,7%, ou 9,6 milhões de toneladas superior a safra anterior e a área plantada foi de aproximadamente 23,2 milhões de hectares, sendo o maior crescimento observado no Paraná, seguido de Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Goiás (CONAB, 2010).

O aumento na produção de soja no Brasil se deve ao elevado valor econômico e agrícola desta *commodity*. Os fatores responsáveis por este crescimento são: adaptação em solos e climas diversos, efeitos benéficos à saúde e a ampla diversidade de usos que a soja possui, sendo utilizada na alimentação humana, animal e como matéria-prima para produtos não alimentícios, entre eles, tintas, resinas, óleos industriais, etc. (LIU, 1999).

Entre as leguminosas, a soja destaca-se por apresentar cerca de 40% de proteínas de alta qualidade, aproximadamente 20% de lipídeos com elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados, 34% de carboidratos, teores consideráveis de vitaminas do

complexo B e minerais como magnésio, fósforo, ferro e zinco (MORAIS; SILVA, 1996; CARRÃO-PANIZI; BORDIGNON, 2000).

As proteínas da soja são ricas em aminoácidos como leucina e lisina, porém, como as demais leguminosas, apresentam deficiência dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000). Entretanto, o PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score), método oficial da Organização Mundial de Saúde (OMS), que faz a correção da digestibilidade protéica levando-se em conta o escore de aminoácidos, demonstrou que a soja supre a necessidade de aminoácidos, inclusive os sulfurados, desde que ingerida em quantidade adequada, ou seja, acima de 0,6 g/kg de peso corporal/dia (FDA, 1991; MORAIS, 2001).

Anderson, Johnstone e Cook-Newell (1995) comprovaram a eficiência das proteínas da soja na diminuição do colesterol plasmático e no nível de triglicerídeos. Em 1999, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso do termo “*health claim*” para produtos derivados de soja, reconhecendo que o consumo diário de 25g de proteínas, associada a uma dieta com baixo consumo de gorduras saturadas e colesterol, são capazes de reduzir os riscos de doenças do coração (MESSINA, 1999; SETCHELL, 1998).

Os lipídeos presentes na soja compreendem cerca de 15% de ácidos graxos saturados e 85% de insaturados. Entre os ácidos graxos poliinsaturados destacam-se o ácido linoléico (57%) e o linolênico (7%), considerados essenciais (MORAIS; SILVA, 1996). No Brasil, o óleo de soja apresenta as maiores taxas de consumo entre todos os óleos consumidos (MOREIRA, 1999).

Em relação aos carboidratos a soja apresenta em sua composição carboidratos solúveis, dos quais 2,5 a 8,2% são sacarose, 0,1 a 0,9% rafinose e 1,4 a 4,1% estaquiose. Entre os carboidratos insolúveis, a celulose, hemicelulose, pectina e pequenos traços de amido são encontrados principalmente na parede celular (LIU, 1997). Em relação aos minerais, Moraes et al. (2006) afirmaram que os grãos de soja contêm cerca de 5% de cinzas, sendo que o potássio encontra-se em maior concentração, seguido pelo fósforo, magnésio, cálcio e ferro.

Além de todos os componentes citados acima, a soja contém substâncias com possibilidade de promover a saúde, sendo considerada um alimento funcional. Compostos fenólicos, como as isoflavonas, são caracterizados como fitoestrógenos, pois apresentam estrutura semelhante aos hormônios estrogênicos, podendo atuar de forma semelhante (HELFERICH, 1996).

3.2 COMPOSTOS PRESENTES NA SOJA ASSOCIADOS COM A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.2.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas durante o seu desenvolvimento normal e em resposta às condições de estresse, tais como infecção, radiação ultravioleta (UV), entre outros. Estes compostos são formados a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina e quimicamente são constituídos por anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilas substituintes. Enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Nos alimentos, os compostos fenólicos contribuem com o amargor, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Nos grãos de soja o teor de compostos fenólicos é variável. Xu e Chang (2007) ao utilizar diferentes solventes encontraram na soja preta uma variação de 3,73 a 6,18 mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g, enquanto a soja amarela apresentou teores entre 2,27 e 2,62 mg EAG/g. Já em outros legumes foram detectadas diferentes concentrações, variando de 1,13 a 1,67 mg EAG/g na ervilha amarela; 1,04 a 1,53 mg EAG/g na ervilha verde; 1,28 a 6,89 mg EAG/g no feijão preto; 1,54 a 1,81 mg EAG/g no grão de bico e 1,02 a 7,53 mg EAG/g na lentilha.

Alguns processamentos como a maceração, fervura e cozimento sob vapor podem causar mudanças no teor de compostos fenólicos, como demonstrado por Xu e Chang (2008). Ao analisar as perdas destes componentes em ervilha verde e amarela, grão de bico e lentilha, estes autores relataram uma diminuição de 2-38% durante a maceração, sendo que seguido do cozimento as perdas aumentaram para 40-68%. Além disso, a fervura sob pressão provocou maiores perdas de compostos fenólicos que o cozimento convencional. Segundo estes autores, as perdas se devem a passagem dos compostos fenólicos para a água de hidratação, bem como a quebra destes compostos durante o processamento.

Os compostos fenólicos são amplamente conhecidos por sua atividade antioxidante, que se deve às suas propriedades redutoras e estrutura química (SOUSA et al., 2007). Estes compostos pertencem à categoria de antioxidantes primários, ou seja, eles atuam na fase terminal da reação em cadeia, doando hidrogênio ou elétrons aos radicais livres,

convertendo-os em produtos mais estáveis. A presença de grupos doadores de elétrons nas posições *orto* e *para* do anel, aumenta a AA por um efeito indutivo, ou seja, elevam a densidade eletrônica da hidroxila, facilitando a interação com os radicais livres. Um dos fatores mais importantes ao avaliar a AA destes compostos é a estabilidade ou reatividade dos radicais antioxidantes formados após a abstração do hidrogênio, havendo a necessidade de deslocalização do elétron no anel aromático, gerando estruturas de ressonância. Estes compostos fenólicos são muito efetivos em baixas concentrações, porém em altas concentrações, eles perdem sua atividade e se tornam pró-oxidante devido a sua participação no processo de iniciação (MADHAVI; DESHPANDE; SALUNHE, 1995).

Além de atuarem como AA primários, Naczki e Shahidi (2004) afirmaram que estes compostos são capazes de interceptar oxigênio singlete, prevenir a iniciação da reação em cadeia sequestrando os primeiros radicais formados, tais como hidroxila, podem ainda quelar íons metálicos impedindo sua ação catalisadora e decompor os produtos primários da oxidação para espécies não reativas.

Em investigações de ácidos fenólicos presentes em grãos de soja, farinha de soja desengordurada, concentrado e isolado protéico de soja quatro apresentaram uma atividade antioxidante significativa: ácido clorogênico (encontrado em maior quantidade e com maior atividade antioxidante), caféico, p-cumárico e ferúlico (PRATT; BIRAC, 1979).

3.2.2 Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos formados a partir dos mesmos aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) e o ânion malonato. A estrutura básica dos flavonóides consiste em núcleo flavano, com 15 átomos de carbono dispostos em três anéis (C6-C3-C6), conforme mostra a Figura 1. As classes de flavonóides são definidas pelo nível de oxidação e o grau de substituição do anel central, enquanto os compostos individuais dentro de uma mesma classe são diferenciados pela substituição dos anéis A e B. Entre as classes de flavonóides, as mais importantes são flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonóis, flavan-3-ol e antocianidinas (PIETTA, 2000).

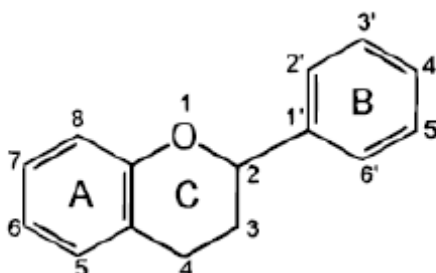


Figura 1 – Estrutura básica dos flavonóides (PIETTA, 2000)

Mais de 4000 flavonóides diferentes já foram identificados em plantas e há muitas variações no tipo e na quantidade, relacionadas ao estágio de desenvolvimento, grau de maturidade e condições ambientais (COOK; SAMMAN, 1996). Os flavonóides desempenham diversos papéis no desenvolvimento das plantas. Devido a suas cores atrativas, flavonas, flavonóis e antocianidinas podem agir como sinais visuais para a polinização por insetos. Catequinas e outros flavonóis conferem adstringência e por isso representam um sistema de defesa contra insetos ofensivos à planta. Os flavonóides agem como catalisadores na fotossíntese e/ou como reguladores do ferro na fosforilação, podem ainda funcionar como protetores do estresse em plantas através do sequestro de espécies reativas de oxigênio, produzidos pelo sistema transportador de elétrons fotossintético. Além disso, devido a sua capacidade de absorver a radiação UV, os flavonóides protegem as plantas contra a radiação solar e sequestram as espécies reativas de oxigênio (EROS) geradas pelo UV (PIETTA, 2000).

Xu e Chang (2007) ao utilizar diferentes solventes, encontraram teores de flavonóides na soja variando de 0,72 a 2,57 mg de equivalentes de catequina (EC)/g na variedade preta e de 0,25 a 0,50 mg EC/g na variedade amarela. No mesmo estudo outros legumes apresentaram diferentes concentrações, variando de 0,18 a 0,32 mg EC/g na ervilha amarela; 0,08 a 0,39 mg EC/g na ervilha verde; 0,98 a 3,21 mg EC/g no feijão preto; 0,18 a 3,16 mg EC/g no grão de bico e 0,72 a 2,21 mg EC/g na lentilha.

Segundo Ho et al. (2002), o perfil de flavonóides na soja é diferente das suas folhas. As folhas analisadas apresentaram na sua composição flavonóides, principalmente derivados do campferol, enquanto que nos grãos, estas estruturas não estavam presentes, sendo as isoflavonas as formas predominantes.

Malesev e Kuntic (2007) reportaram que estudos científicos conduzidos nos últimos anos geraram um crescente interesse no potencial dos flavonóides para manter a saúde

humana. Segundo os autores, um considerável número de plantas medicinais contém flavonóides, que podem atuar como bactericida, anti-inflamatório, anti-alérgico, anti-mutagênico, anti-viral, entre outros.

Uma das funções de maior destaque dos flavonóides é a sua habilidade em sequestrar radicais livres. Quando gerados em excesso estes RL podem ocasionar danos às biomoléculas, desencadeando várias doenças (MALESEV; KUNTIC, 2007). Os flavonóides podem atuar como antioxidantes primários, quelantes ou sequestrantes de ânions superóxido. A presença de grupos hidroxilas (OH) nas posições 3'-, 4'- e 5'- do anel B aumenta a AA quando comparada com apenas um grupo hidroxila. Além disso, a presença de um grupamento hidroxila na posição 3- conjugada a dupla ligação (2-3) no anel C parece ter efeito positivo nas propriedades antioxidantes (MADHAVI; DESHPANDE; SALUNHE, 1995).

Assim, a ação antioxidante dos flavonóides (Fl) ocorre pela doação de elétrons das hidroxilas livres presentes no núcleo, com a formação de um radical menos reativo, posteriormente estabilizado por ressonância (MALESEV; KUNTIC, 2007). De acordo com Packer, Hiramatsu e Yoshikawa (1999) esta habilidade de doar elétrons depende diretamente do potencial de redução dos seus radicais. Segundo Pietta (2000) tanto a doação de elétron $Fl-OH \rightarrow Fl-O\cdot + \text{elétron} + H^+$ como a doação de hidrogênio $Fl-OH \rightarrow Fl-O\cdot + H^+$, envolve a quebra da mesma ligação O-H. Assim dependendo da sua estrutura, o flavonóide terá maior ou menor potencial de oxidação, influenciando a atividade antioxidante.

A atividade antioxidante dos flavonóides está correlacionada com sua função fisiológica *in vivo*, pois o estresse oxidativo é conhecido por participar do processo inicial de desenvolvimento da aterosclerose, levando a doenças coronárias e outros eventos patofisiológicos (MALESEV; KUNTIC, 2007).

Em relação a inibição da peroxidação lipídica, os flavonóides atuam no estado inicial, sequestrando os ânions superóxido e hidroxilas. Além disso, eles agem na fase terminal da reação em cadeia, através da doação de átomos de hidrogênio para o radical peroxil, formando um radical flavonóide que pode ainda reagir com outros radicais livres, finalizando as reações. As propriedades antioxidantes dos flavonóides ainda podem estar relacionadas com ação quelante, interagindo com metais e impedindo a reação de Fenton, que é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (COOK; SAMMAN, 1996).

3.2.2.1 Isoflavonas

As isoflavonas são isômeros que se diferenciam das demais estruturas dos flavonóides por apresentarem o ciclo benzênico unido ao carbono 3 do heterociclo ao invés do carbono 2 (Figura 2) (MORAES et al., 2009). Ao contrário dos flavonóides, as isoflavonas são encontradas em poucas plantas, devido a limitada distribuição da enzima calcona isomerase que converte 2 (R)-naringenina (um flavonóide precursor) em 2-hidróxidaidzeína (LIU, 1997).

As isoflavonas estão presentes em leguminosas, sobretudo na soja. A sua distribuição nos grãos varia conforme a estrutura da semente. Dependendo da cultivar, as isoflavonas não estão presentes no tegumento da semente ou são detectadas apenas em quantidades traço (TSUKAMOTO et al., 1995). Segundo Tsukamoto et al. (1995), o teor de isoflavonas totais é de 5,5 a 6,0 vezes maior no hipocótilo da semente que nos cotilédones. No entanto, 80 a 90% do total de isoflavonas dos grãos de soja estão localizados nos cotilédones, considerando que o hipocótilo corresponde apenas a 2% do peso seco da semente. Ainda, de acordo com os autores, a gliciteína e seus conjugados ocorrem somente no hipocótilo.

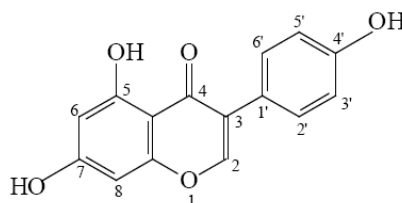


Figura 2 – Estrutura química de isoflavona genisteína (MORAES et al., 2009).

A soja possui três tipos de isoflavonas, cada uma em quatro formas químicas diferentes, totalizando 12 isômeros. As formas agliconas são chamadas de daidzeína, genisteína e gliciteína. Quando glicosiladas, ou seja, na forma de glicosídeos, são denominadas daidzina, genistina e glicitina. Existem também as isoflavonas β -glicosídicas conjugadas que podem ser classificadas em acetil glicosídeo e malonil glicosídeo. Estas podem ser sub-divididas em 6''-o-acetil daidzina, 6''-o-acetil genistina, 6''-o-acetil glicitina, 6''-o-malonil daidzina, 6''-o-malonil genistina e 6''-o-malonil glicitina (LIU, 1999).

Em relação à quantificação de isoflavonas, foi encontrada uma variação de 57 a 188 mg/100g em cultivares de soja brasileiras (GENOVESE; HASSIMOTTO; LAJOLO, 2005). Ribeiro et al. (2006) detectaram uma variação de 71,11 a 174,30 mg/100g no teor de isoflavonas presentes na soja de diferentes grupos de maturidade, sendo a maior proporção representada pelas formas malonil daidzina e malonil genistina (67%), enquanto que as formas β -glicosídicas e agliconas corresponderam a 31,0% e 2,0%, respectivamente. A concentração de agliconas foi significativamente maior nos grupos de maturidade precoce.

O teor de isoflavonas nos grãos de soja é variável em função de diferenças genéticas entre as cultivares, além disso, podem sofrer influência da temperatura do ambiente durante o desenvolvimento dos grãos (CARRÃO-PANIZZI, 1996a; LEE et al., 2003). Segundo Genovese e Lajolo (2001) a composição de isoflavonas nos derivados também está relacionada com as condições de processamento.

As propriedades biológicas das isoflavonas são conhecidas, incluindo atividade estrogênica, antifúngica, antimutagênica e antitumoral. São essenciais para a sobrevivência de plantas leguminosas, protegendo-as contra fitopatógenos pela ação antifúngica. As isoflavonas podem apresentar ainda atividade antioxidante (AGUIAR, 2002).

Estes compostos são caracterizados como fitoestrógenos, uma vez que apresentam estrutura e massa molar similar ao grupo de hormônios sexuais femininos conhecidos como estrógenos, que são secretados pelas células ovarianas (ADLERCREUTZ; MAZUR, 1997). As isoflavonas também são conhecidas por sua provável atividade antitumoral (mama e próstata), a qual é mais acentuada nas formas agliconas que glicosiladas. Estas formas conjugadas são hidrolizadas por enzimas β -glicosidases presentes no intestino, liberando as principais formas bioativas – as agliconas daidzeína e genisteína (SETCHELL, 2000).

A ingestão de isoflavonas juntamente com as proteínas da soja também está associada a uma possível redução dos riscos de doenças cardiovasculares, pela diminuição dos níveis de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) e da pressão sanguínea, promovendo maior vascularização no endotélio arterial (ANDERSON; SMITH; WASHNOCK, 1999).

Em relação a capacidade antioxidante, os isoflavonóides glicosilados podem ser transformados por processos enzimáticos em agliconas como daidzeína e genisteína, cujas atividades antioxidantes têm sido superiores às das formas glicosiladas (daidzina e genistina), conforme demonstrado por Park et al. (2001a). Já entre as três agliconas, a genisteína apresentou a maior capacidade antioxidante, determinada pelo sistema β -caroteno/ácido

linoléico (PRATT; BIRAT, 1979). Estudos *in vitro* indicam que a genisteína pode atuar como antioxidante direta ou indiretamente, induzindo o aumento da AA de enzimas (ANDERSON; SMITH; WASHNOCK, 1999).

Apesar dos efeitos benéficos relatados na literatura, a quantidade de isoflavonas necessária para produzir efeitos biológicos no organismo humano ainda não foi estabelecida e com isso a preconização de ingestão permanece sem normalização (GÓES-FAVONI, 2007). Porém, com base em diferentes estudos e no consumo de populações orientais onde a soja constitui a base da alimentação, Setchell (1998) propôs que a ingestão de 30 a 50 mg de isoflavonas por dia seria o suficiente para desencadear reações clínicas positivas.

3.2.3 Ácido Fítico

O ácido fítico ou ácido *mio*-inositol hexafosfórico ou 1,2,3,4,5,6,- *hexakis* (diidrogeno fosfato) *mio*-inositol (IUPAC-IUB, 1968) é um composto cíclico (inositol) contendo 6 grupos fosfatos, 12 hidrogênios dissociáveis e cargas negativas em ampla faixa de pH, cuja estrutura pode ser observada na Figura 3 (TSAO; ZHENG; LU, 1997). Apesar do potencial energético inerente as seis ligações éster-fosfato, o AF é considerado inerte e muito estável (GRAF; EATON, 1990).

O AF está amplamente distribuído na natureza, na forma de ácido livre, fitato ou fitina dependendo do pH fisiológico e dos metais que formam os sais. Assim, os sais de sódio ou cálcio são denominados fitato e o sal de cálcio e magnésio é conhecido como fitina (TSAO; ZHENG; LU, 1997). O AF está presente em cereais, leguminosas e oleaginosas em concentrações que variam de 1 a 5% do seu peso e corresponde a 60-90% do total de fósforo. Na maioria dos cereais e oleaginosas, o fitato está localizado em corpos protéicos, complexado com as proteínas ou com minerais, principalmente os cátions potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe) e zinco (Zn) (MADHAVI; DESHPANDE; SALUNKHE, 1995; LIU, 1997; LIU, 2005).

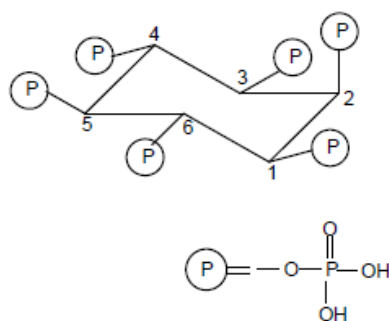


Figura 3 – Estrutura do ácido fítico (Costello et al., 1976)

Nos grãos de soja a concentração de fitato varia de 1 a 1,47% (base seca), o que equivale a 51,4-51,7% do total de fósforo presente. No entanto, a concentração detectada, depende não apenas da variedade, mas das condições de processamento e da metodologia empregada. Nos produtos derivados de soja, o teor de ácido fítico também é elevado como em farinhas (1,42%) e isolados protéicos (1,52%) (LIU, 1997).

A função fisiológica do fitato nas plantas é geralmente atribuída a reserva de fósforo para a germinação. Seu interesse em alimentos está relacionado ao efeito na bioviabilidade de minerais e na solubilidade de proteínas. A habilidade do ácido fítico quelar íons metálicos di e tri valentes, tais como Ca, Mg, Zn e Fe, possibilita a formação de compostos não muito solúveis, que não são totalmente absorvidos pelo intestino (LIU, 1997).

Durante o processamento dos alimentos e também no trato gastrointestinal, o inositol hexafosfato pode ser parcialmente defosforilado, formando penta, tetra e tri-fosfato, pela ação das fitases endógenas, que são encontradas na maioria das plantas (ZHOU; ERDMAN, 1995). Estes derivados têm capacidade de interagir com metais similar ao hexafosfato, porém a força da ligação depende do número de fosfatos desprotonados da molécula (PERSSON, 1998). Esta degradação é de suma importância nutricional, pois a diminuição da ligação do AF com minerais, promove maior solubilidade quando os grupos fosfatos são removidos do anel inositol, conseqüentemente aumenta a biodisponibilidade dos íons (SANDBERG, 2002).

Um alimento ao ser submetido a hidratação, cozimento, extrusão, irradiação, fermentação entre outros, tem seu teor de fitato diminuído, dependendo das condições de processamento. Como o AF é solúvel em água, a hidratação provoca uma redução no teor de AF se a água utilizada for descartada (REDDY; SATHE, 2002). Segundo Ma et al. (2005) a maceração provoca perdas de 6 a 28%, e quanto mais prolongado for o período de hidratação,

maiores são as perdas. Os autores também relatam que a trituração promove o contato das fitases endógenas com o AF que catalisam o processo de hidrólise. No entanto, a extrusão não provoca elevada degradação do AF (< 30%), pois o alimento é submetido a altas temperaturas por um curto tempo. Em muitos processamentos, a redução do fitato é incompleta, podendo haver ácido fítico restante, que causa alterações nas características funcionais do alimento (REDDY; SATHE, 2002).

O AF tem sido considerado um antinutriente devido ao seu efeito inibitório na bioviabilidade dos minerais, através do seu poder quelante. Porém, esta propriedade confere ao AF a função de antioxidante, devido a sua capacidade de quelar o ferro, bloqueando todas as suas possibilidades de ligação e impedindo que este mineral catalise a formação de hidroxilas. O Fe^{2+} é o responsável por produzir as EROS (espécies reativas de oxigênio) e causar a peroxidação lipídica, enquanto Fe^{3+} é relativamente inerte. Muitos processos biológicos resultam na formação de Fe^{2+} , a presença do AF pode acelerar a redução do ferro, originando o Fe^{3+} e inibindo a geração de OH. Portanto, o AF presente nos alimentos pode protegê-los contra a formação de radicais livres (ZHOU; ERDMAN, 1995).

Dessa forma, Zhou e Erdman (1995) sugerem que através das propriedades quelantes do AF muitos benefícios a saúde humana são conferidos, tais como diminuição do colesterol e triglicerídeos, prevenindo doenças do coração, cálculos renais, e certos tipos de câncer, como o de cólon.

Em relação às doenças coronarianas, sabe-se que uma alta proporção zinco/cobre está associado a hipocolesterolemia. Assim a ação quelante do ácido fítico, pode alterar esse balanço, afetando o nível de colesterol sérico. Outra maneira de prevenir estas doenças, está relacionada a quelação do Ca pelo AF, que poderia prevenir a calcificação da aorta (JENAB; THOMPSON, 2002).

Massey et al. (2005) afirmaram que alimentos a base de soja, contendo moderadas concentrações de fitato podem auxiliar na prevenção do risco de formação de cálculos renais, tanto por sua capacidade antioxidante, como pela habilidade de inibir a formação de cristais de cálcio.

Estudos relacionados à aplicação do ácido fítico em alimentos relatam que eles podem agir efetivamente como antioxidantes. Empson et al. (1991) verificaram que mesmo utilizando baixa concentração de ácido fítico (1mM) houve redução na taxa de degradação do ácido ascórbico e da peroxidação lipídica de emulsões óleo-água em frangos cozidos e congelados. Harbach et al. (2007) demonstraram que ao adicionar gérmen de milho

contendo ácido fítico a dieta de porcos manteve a performance da carcaça e inibiu em 63% a oxidação lipídica da carne.

3.3 PRODUTOS À BASE DE SOJA E O PERFIL DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

A utilização dos grãos de soja no Brasil é predominantemente para obtenção de óleo e ração para animais, a partir do farelo ou torta. Os derivados desta leguminosa como farinha de soja, proteína texturizada de soja (PTS), isolado protéico de soja (IPS) também têm sido amplamente empregados como ingredientes de vários produtos industrializados, o que introduziu a soja de forma indireta na alimentação humana (FREITAS; BARBOSA; FRANCA, 2000).

No Brasil ainda não há um consumo generalizado da soja. A falta de produtos com qualidade e o sabor característico que apresentam, tem limitado a sua aceitabilidade. Mas esta situação está mudando diante da disponibilidade de tecnologias que favorecem a melhoria do sabor, as quais incluem o tratamento térmico dos grãos no processamento, ou o melhoramento genético para a eliminação de lipoxigenase, responsável pelo desenvolvimento do sabor característico (CARRÃO-PANIZZI, 1996b). Segundo Moraes (2001), a ampliação do consumo de produtos de soja tem sido gradual e lenta, sendo estimulada pela atual comprovação de seu valor na prevenção e tratamento da desnutrição, quando suplementada a dieta de populações carentes.

A soja e seus derivados apresentam elevado teor de compostos fenólicos, como demonstrado por Barbosa et al. (2006) que encontraram 183 mg de equivalente de catequina (mg EC)/100g na farinha de soja integral, 222 e 200 mg EC/100g na farinha de soja desengordurada obtida em laboratório e comercial, respectivamente, 148 mg EC/100g na PTS e 101 mg de catequina/100g no IPS.

Entre os flavonóides, as isoflavonas são predominantes nos alimentos a base de soja, sendo que a quantidade e as formas químicas presentes dependem das condições de processamento, principalmente a temperatura em que o material é exposto (BARNES; KIRK; COWARD, 1994). Muitos processos como ebulição, fritura, cozimento em microondas e radiação gama podem alterar o conteúdo de isoflavonas presente nos produtos (AGUIAR, 2004).

Barnes, Kirk e Coward (1994) ao realizar a extração de isoflavonas em derivados de soja, constataram que os conjugados malonil são termicamente instáveis e podem sofrer reações de de-esterificação das ligações éster entre o grupo carboxila-malonato e o grupo 6-hidroxila da glicose, produzindo β -glicosídeos, ou sofrer reações de descarboxilação dando origem aos respectivos conjugados acetil glicosídeos. Durante os processos térmicos e fermentativos, os compostos glicosilados, presentes nos grãos de soja, são transformados em suas formas agliconas, que são acumuladas no produto final (PARK et al., 2001b).

Barbosa et al. (2006) constataram um teor de isoflavonas equivalente a 200 mg de agliconas/100g na farinha de soja integral e concentrações de 191 e 381 mg de agliconas/100g nas farinhas de soja desengorduradas (comercial e obtida em laboratório). Os mesmos autores reportaram um teor de 124,1 mg de isoflavonas agliconas/100g no IPS. Góes-Favoni et al. (2004) detectaram uma variação de 114 a 183 mg de isoflavonas/100g nas proteínas texturizadas e de 123 e 180 mg de isoflavonas/100g nos EHS (extrato hidrossolúvel de soja). Entre os produtos não fermentados, o tofu apresentou a menor concentração de isoflavonas totais (337 μ g/g) (WANG; MURPHY, 1994a).

Em relação ao teor de ácido fítico em produtos derivados de soja, Reddy e Sathe (2002) reportaram que quanto maior o conteúdo de proteínas, maior o teor de AF, uma vez que ele está incorporado nos corpos protéicos. Assim, Massey et al. (2005) ao analisar 30 produtos a base de soja, notaram que a PTS apresentou o maior teor de AF (1,88 g/100g b.u. na PTS). Já nas duas marcas de farinha de soja analisadas o teor de fitato foi menor, sendo equivalente a 1,10 e 1,40 g/100g b.u (base úmida).

Rosset (2007) observou uma variação de 0,73 a 1,69 g/100g b.s. e de 0,86 e 2,21 g/100g b.s. nos EHS e nos tofus obtidos a partir de diferentes variedades de soja. Enquanto Massey et al. (2005) verificaram quantidades de fitato entre 0,89 e 6,21 mg/g b.u. em 11 das 19 amostras de tofu.

O fitato é estável ao calor, não sofrendo grandes alterações durante o transporte e armazenamento dos grãos ou quando submetidos a processamentos que incluem calor. Porém sua solubilidade em água pode provocar grandes perdas, se a água utilizada for descartada (MA et al., 2005; REDDY; SATHE, 2002)

Dessa forma, o teor de compostos fenólicos, flavonóides (isoflavonas) e ácido fítico tende a variar entre os produtos, pois sofrem influência do processamento, sendo que a matéria prima em si pode apresentar diferentes concentrações destes compostos.

3.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Esta configuração faz dos RL moléculas altamente instáveis e quimicamente muito reativas (POMPELLA, 1997). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON; JOHNSTONE; COOK-NEWELL, 1995).

Os radicais livres importantes em organismos vivos incluem hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2^- \bullet$), óxido nítrico ($\text{NO} \bullet$) e peroxil ($\text{RO}_2 \bullet$). Peroxinitrito (ONOO^-), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio no estado singlete (frequentemente simbolizado como $^1\text{O}_2$) e ozônio O_3 não são radicais livres, porém podem facilmente sofrer reações, se transformando nas espécies reativas. A reatividade destas espécies é variada, sendo que uma vez formadas, elas podem reagir com outras moléculas por várias interações. A velocidade e a seletividade desses tipos de reações dependem de fatores como a concentração do radical e a localização do elétron desemparelhado. O termo “espécies reativas de oxigênio” (EROS) é frequentemente usado para incluir espécies de radicais cujo elétron desemparelhado encontra-se no átomo de oxigênio e também as espécies não radicais comentadas (ARUOMA, 1999).

A concentração dos radicais livres pode aumentar devido a maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres é denominado de estresse oxidativo (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

De maneira geral, os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato. Os antioxidantes não se tornam radicais pela doação de elétrons, pois eles são estáveis em ambas as formas. Agentes redutores, cuja função é transferir átomos de hidrogênio, como o ácido ascórbico, também são considerados antioxidantes. Algumas substâncias ainda são capazes de quelar íons metálicos, como cobre e ferro, os quais catalisam a oxidação lipídica (KAUR; KAPOOR, 2001).

Os antioxidantes podem exibir diferentes mecanismos de ação. O primeiro é caracterizado pela capacidade que possuem de impedir a formação de radicais livres, através

da inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Nesta classe de antioxidantes são encontrados as vitaminas C, E e A, os flavonóides e os carotenóides. O outro mecanismo está baseado no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os na forma inativa por ação de agentes redutores, inibindo a reação em cadeia através da captação de intermediários reativos como os radicais peroxila. Os antioxidantes sintéticos, as vitaminas A e E, e os compostos fenólicos são capazes de atuar desta maneira (POMPELLA, 1997).

Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos são encontrados uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (JACOB, 1995).

A importância relacionada ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos e doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção de outro (HALLIWELL et al., 1995).

3.4.1 Métodos Utilizados para a Determinação da Capacidade Antioxidante

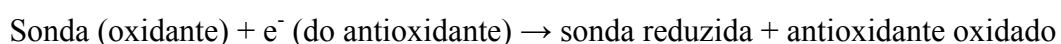
A determinação da capacidade antioxidante em produtos alimentícios é um grande desafio para os pesquisadores. Nos últimos dez anos, houve um aumento de 340% no número de artigos mencionando o termo “antioxidantes” (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Devido à falta de um método padrão, torna-se difícil comparar os resultados de diferentes pesquisas e a indústria química e nutracêutica não pode estabelecer um controle efetivo dos seus produtos contendo antioxidantes (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Alguns experimentos simples podem ser realizados para examinar diretamente a capacidade antioxidante *in vitro*. Esta investigação pode ser usada para excluir uma possível atividade antioxidante *in vivo*: um composto que é pouco efetivo *in vitro* provavelmente não terá melhor ação *in vivo* (ARUOMA, 1999).

De acordo com as reações envolvidas, os ensaios de atividade antioxidante podem ser divididos em duas categorias. O método direto ou de transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e o método indireto ou de transferência de elétrons (TE). Estes métodos estimam a capacidade de sequestrar o radical (ou oxidante) e há muitos métodos utilizando ambos os mecanismos (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Os ensaios de sequestro de radicais ABTS^{•+} (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) e o teste de redução do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) são geralmente classificados como reações de transferência de elétrons. No entanto, estes radicais podem ser neutralizados tanto por redução indireta via transferência de elétrons como por doação de hidrogênio (JIMENEZ et al., 2004).

Os métodos diretos (TAH) são baseados no estudo do efeito de um alimento contendo antioxidantes na degradação oxidativa de um sistema teste, sendo caracterizada por uma competição entre um substrato oxidável e o antioxidante pelos radicais. O substrato de oxidação pode ser lipídios, misturas lipídicas, proteínas, DNA, ou espécies relevantes biologicamente contendo lipídios, tais como, plasma sanguíneo, LDL e membranas biológicas. A peroxidação lipídica é considerada muito conveniente a este propósito devido a muitos estudos teóricos e experimentais já realizados (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Já os métodos indiretos ou de transferência de elétrons, são aplicados para verificar a capacidade do antioxidante em sequestrar alguns radicais livres, que não estão associados com a real degradação oxidativa. Neste caso, ocorre uma reação de oxi-redução entre o oxidante (geralmente uma sonda para monitorar a reação) e o antioxidante. Estão baseados na seguinte reação de transferência de elétrons:



A sonda ao ser reduzida pelo antioxidante sofre mudanças colorimétricas. A intensidade da mudança de cor é proporcional à atividade deste antioxidante ou à concentração do mesmo. Os ensaios TE incluem o método de Folin-Ciocalteu (FC), teste de redução do radical livre DPPH[•], ensaio de captura do radical livre ABTS^{•+} também conhecido como TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power ou Poder Redutor do Ferro) (TOMEI; SALVADOR, 2007).

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado por muitos anos para determinar o conteúdo total de fenólicos em produtos naturais. A reação ocorre por um mecanismo de oxidação/redução, e por isso pode ser empregada para determinar a capacidade antioxidante de uma amostra. Este ensaio tem muitas variações como a concentração dos reagentes e o tempo de incubação (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). A química do FC ainda não está bem

definida, porém este ensaio é conveniente, simples e reprodutivo. Além disso, um crescente número de publicações está encontrando excelentes correlações lineares entre o total de fenólicos e a atividade antioxidante. Esta correlação se deve às similaridades químicas presentes entre estes ensaios (TOMEI; SALVADOR, 2007). O sistema caracteriza-se por uma mistura de ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdico (coloração amarelada) em meio básico. Os fenóis contidos nas amostras são energeticamente oxidados em meio alcalino, resultando na formação do O_2^- , o qual reage com os ácidos formando compostos de coloração verde (óxidos), com uma intensa absorção próximo de 750 nm. Os fenólicos determinados por FC são frequentemente expressos em equivalente de ácido gálico (TOMEI; SALVADOR, 2007).

O teste de redução do radical DPPH[•] está sendo muito empregado para determinar a capacidade antioxidante devido a sua rapidez e facilidade. Este radical orgânico é um dos poucos radicais nitrogenados considerados estáveis e comercialmente eficazes (OUFNAC, 2006). O ensaio é iniciado pela adição do DPPH[•] e a amostra, em solução. A capacidade da amostra em reduzir o DPPH[•], ou seja, evitar sua oxidação é evidenciada pela porcentagem de DPPH[•] restante no sistema, que pode ser correlacionado com a concentração de antioxidante (TOMEI; SALVADOR, 2007).

O ensaio baseado na captura do radical ABTS^{•+}, também está sendo amplamente utilizado para estimar a capacidade antioxidante. Ao contrário do radical DPPH[•] que é obtido diretamente sem uma preparação prévia, o radical ABTS^{•+} precisa ser gerado, por meio de uma reação química, enzimática ou eletroquímica. Neste ensaio, o ABTS é oxidado pelo radical peróxido ou outros oxidantes para seu radical cátion, ABTS^{•+}, que é intensamente colorido, e a atividade antioxidante é medida pela capacidade que o composto em teste possui em decrescer a cor reagindo diretamente com o radical ABTS^{•+} (KUSKOSKI et al., 2005).

Este método é operacionalmente simples, podendo ser empregado solventes aquosos ou orgânicos e uma ampla faixa de pH. Termodinamicamente, um composto pode reduzir ABTS^{•+} quando apresentar um potencial redox menor que o seu (0,68V). Muitos compostos fenólicos têm baixos potenciais redox, possibilitando a reação (AWIKA et al., 2003).

O método de FRAP visa determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas. A reação mede a redução férrica de 2,4,6-

tripiridil -s- triazina (TPTZ) para um produto colorido, detectando compostos com potencial redox $< 0,7V$ (o potencial redox do Fe^{+3} -TPTZ). O poder redutor está relacionado com o grau de hidroxilação e com a extensão dos conjugados presente na estrutura dos flavonóides (PULIDO, BRAVO, SAURA-CALIXTO, 2000). Porém, o teste FRAP não pode detectar compostos que atuam bloqueando radicais pela transferência de H, particularmente proteínas. O ensaio de FRAP mede somente os mecanismos de transferência de elétrons, então em combinação com outros métodos pode ser útil na distinção de mecanismos antioxidantes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

É importante observar que resultados de FRAP podem diferenciar-se grandemente dependendo da escala de tempo de análise, devido a diferentes reatividades dos flavonóides. Porém, em comparação com outros ensaios, FRAP é simples, rápido, barato e robusto, não requerendo equipamentos especializados (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Thaipong et al. (2006) estimaram a atividade antioxidante total de extratos obtidos de frutos de goiaba, pelos métodos $ABTS^{++}$, $DPPH^{\bullet}$, FRAP e ORAC, e verificaram que FRAP foi a técnica mais reprodutível e aquela que apresentou uma elevada correlação com os teores de ácido ascórbico e grupos fenólicos.

Apesar da diversidade de métodos, não há ainda um método universal pelo qual a atividade antioxidante pode ser medida precisamente e quantitativamente. Segundo Prior, Wu e Schaich (2005) um teste adequado deve analisar compostos químicos que estão presentes naturalmente, utilizar uma fonte de radical relevante biologicamente, ter um mecanismo químico definido, instrumentação disponível e adaptável para ensaios de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos.

3.4.2 Capacidade Antioxidante de Derivados de Soja

Os seres humanos estão expostos a uma série de agentes oxidantes que podem causar danos oxidativos à biomoléculas, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, levando a um grande número de patologias incluindo câncer e arteriosclerose. Assim, presume-se que a ingestão de antioxidantes capazes de neutralizar os radicais livres possa ter um papel importante na prevenção destas doenças (FRITZ et al., 2003).

Esta possibilidade de prevenir doenças por meio da dieta tem atraído a atenção, tanto da comunidade científica como das indústrias alimentícias, com o objetivo

comum de desenvolver os atualmente conhecidos “alimentos funcionais” ou alimentos ricos em um ou mais compostos bioativos que apresentam efeitos positivos à saúde (BARBOSA et al., 2006).

Porém, alguns processamentos podem causar uma diminuição na capacidade antioxidante. Xu e Chang (2008) ao estudar o efeito de diferentes tratamentos na AA de legumes, tais como, ervilha verde e amarela, grão de bico e lentilha, demonstraram que a maceração, a fervura e o cozimento causam redução na AA. Os autores também constataram que a fervura e o cozimento sob pressão provocam o escurecimento dos legumes, provavelmente devido a formação de produtos da reação de Maillard, os quais podem ter contribuído para aumentar a AA. Além disso, há possibilidade do tratamento térmico ter quebrado a ligação da glicose com os flavonóides, formando agliconas, que são conhecidas por sua maior capacidade antioxidante.

Em relação aos derivados de soja, Pratt e Birat (1979) reportaram que farinha desengordurada, concentrado e isolado protéicos de soja apresentaram atividade antioxidante significativa pelo método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico. Além destes, os produtos de soja tradicionalmente usados no Japão, tais como miso, natto e tempeh, são ativos contra a peroxidação lipídica devido à presença de isoflavonas que estariam ligadas à atividade antioxidante.

Barbosa et al. (2006), ao avaliar a capacidade antioxidante da soja e seus derivados pelo método do DPPH^{*} e pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, demonstraram que os produtos com maior AA foram o suplemento a base de gérmen de soja (5,1 μ mol de Trolox/g e 0,78 μ mol de BHT/g) e a farinha desengordurada de soja (5,0 μ mol de Trolox/g e 0,85 μ mol BHT/g), e a menor AA foi encontrada no IPS (1,3 μ moles equivalentes de Trolox/g e 0,58 μ moles equivalentes de BHT/g). Também foi encontrada uma alta correlação, acima de 0,70, entre a atividade antioxidante avaliada pelos dois métodos e o teor de isoflavonas e fenólicos totais, o que demonstra a importância destes compostos como agentes antioxidantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A variedade de soja estudada BRS 267 foi fornecida pela EMBRAPA – Soja (Londrina- PR). A farinha desengordurada de soja (FDS), farinha integral de soja orgânica (FISO), fibra de soja (FIS), fibra e gérmen de soja (FGS), extrato hidrossolúvel de soja em pó (EHS), isolado protéico de soja (IPS), proteína texturizada de soja (PTS), proteína micronizada de soja (PMS) e tofu, foram adquiridos no comércio de Londrina – PR, sendo analisado dois lotes de cada produto.

O padrão Trolox (6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) foi obtido da Sigma Aldrich (EUA), a quercetina da Acros Organics e o padrão ácido gálico da Quimibrás. Os reagentes ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), foram obtidos da Sigma Aldrich (EUA), TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil-striazina) e persulfato de potássio da Acros Organics e o reagente de Folin-Ciocalteu da Laborclin. Os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Extração de Compostos Antioxidantes

A extração dos compostos fenólicos foi realizado de acordo com Hung et al. (2009). Um grama de amostra, previamente triturado e peneirado em tamis de 40 mesh, foi misturado com 10 mL de etanol 80% e agitado por 20 minutos em mesa agitadora (Shaker Marconi) a temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a suspensão (2500 g) (Jouan), sendo o sobrenadante (extrato contendo os compostos fenólicos) coletado. O resíduo foi re-extraído duas vezes com 10 mL de etanol 80% e os sobrenadantes combinados. Por último, concentrou-se o extrato obtido em rotavapor (Tecnal) e o volume foi completado para 10 mL com etanol e estocado a -12°C até o momento de sua utilização.

4.2.2 Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada por Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Swain e Hillis (1959), com algumas modificações. Para a reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 mL dos extratos devidamente diluídos foi adicionada de 2,5 mL de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-Maria a 50°C e posteriormente, a absorvância foi medida a 760 nm usando-se um branco como referência (espectrofotômetro UV-VIS Cintra 20). A concentração total de fenóis de cada extrato foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico e expresso como mg de equivalente de ácido gálico/100g de amostra (mg EAG/100g). A quantificação dos compostos fenólicos nos extratos das amostras foi realizada em triplicata.

4.2.3 Determinação do Teor de Flavonóides Totais

O teor de flavonóides totais foi determinado de acordo com Boateng et al. (2007), com algumas modificações. Assim, 0,5 mL dos extratos foram adicionados de 2 mL de água deionizada. A mistura reagiu com 150 µL de NaNO₂ (50 g/L), sendo incubada por 5 minutos. Logo após, foi adicionado 150 µL de AlCl₃ (100g/L) e decorrido mais 5 minutos, foi acrescentado 1 mL de NaOH (1M) e 1,5 mL de água deionizada. A solução foi agitada e a absorvância lida contra o branco a 415 nm. O teor de flavonóides totais foi calculado com base na curva padrão de quercetina e expresso em mg de equivalente de quercetina/100g (mg EQ/100g).

4.2.4 Determinação da Atividade Antioxidante

4.2.4.1 Atividade antioxidante avaliada pelo sequestro do radical livre DPPH

O ensaio de capacidade antioxidante DPPH[•] foi realizado segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas alterações. Em um tubo de ensaio foram misturados 1 mL de tampão acetato 100 mM, pH 5,5; 1 mL de etanol; 0,5 mL de solução etanólica de DPPH[•] 250 μ M e 50 μ L de amostra. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro e a absorvância lida a 517nm. O controle positivo não continha amostra e o branco foi constituído de 1 mL de tampão acetato e 1,5 mL de etanol. A capacidade de sequestrar os radicais livres foi calculada com base no decréscimo da absorvância observada para cada concentração. A curva de calibração foi preparada com uma solução de Trolox e os resultados expressos em μ mol de Trolox/g de amostra, sendo esta análise realizada em triplicata.

4.2.4.2 Atividade antioxidante avaliada pelo sequestro do radical livre ABTS^{•+}

A capacidade antioxidante dos extratos frente ao radical livre ABTS^{•+} foi realizada de acordo com Thaipong et al. (2006), com algumas modificações. O cátion ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS 7mM com 88 μ L da solução de persulfato de potássio 140mM. A mistura foi armazenada em frasco escuro e em temperatura ambiente por 12-16 horas antes do uso. No momento da análise, a mistura foi diluída com álcool etílico até uma absorvância de $0,70 \pm 0,5$ nm a 734 nm. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 μ L de cada diluição do extrato ou do padrão Trolox para 3 mL da solução ABTS^{•+}. Após homogeneizar em agitador de tubos, foi realizada a leitura em 734 nm após 6 minutos de reação, utilizando álcool etílico como branco. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de Trolox foram usadas para calibração. Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (μ mol de Trolox/g de amostra). A análise foi realizada em triplicata.

4.2.4.3 Atividade antioxidante avaliada pelo poder de redução do ferro FRAP

O poder de redução dos extratos foi avaliado de acordo com Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. O reagente de FRAP foi obtido a partir da combinação de 2,5 mL de uma solução 10 mM TPTZ em HCl 40 mM, 2,5 mL de cloreto férrico 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM pH 3,6 sendo utilizado imediatamente após o seu preparo. Para a avaliação da capacidade antioxidante uma alíquota de 90 µL de cada diluição do extrato foi transferida para tubos de ensaio, sendo acrescentado 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP preparado previamente. Após a homogeneização em agitador de tubos, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos e a leitura realizada a 595 nm. Soluções com diferentes concentrações de Trolox foram utilizadas para construir a curva de calibração. Assim, os resultados foram expressos em µmol de Trolox/g de amostra e as análises realizadas em triplicata.

4.2.4.4 Atividade antioxidante avaliada pelo método de peroxidação lipídica

Esta avaliação da atividade antioxidante foi realizada de acordo com Lingnert, Vallentin e Eriksson (1979), com algumas modificações. Preparou-se uma emulsão dissolvendo 0,02804 g de ácido linoléico e 0,02804 g de Tween 20 (Sigma) em tampão fosfato 0,1 M (10 mL pH 6,5), seguida de homogeneização. Um volume de 20 µL das amostras (sem diluição) foi misturado com 2 mL desta emulsão. Após agitação, os tubos foram incubados no escuro a 37°C, durante 8 horas. Transcorrido este período, adicionou-se 0,2 mL da mistura a 2 mL de metanol (absoluto) e 6 mL de metanol 60%. Em seguida os tubos foram agitados e a absorvância lida a 234 nm. A atividade antioxidante foi calculada da seguinte forma: $AA = (ABS_{234} \text{ do controle} - ABS_{234} \text{ da amostra}) / (ABS_{234} \text{ do controle})$. O controle não continha amostra e o branco não continha a amostra nem o ácido linoléico.

4.2.5 Determinação de Ácido Fítico

Para extrair P (fósforo) fitico dos grãos e produtos derivados de soja foi utilizado o procedimento descrito por Thompson e Erdman (1982). Dessa forma, 2 g das amostras foi misturado com 100 mL de uma solução TCA 3% + Na₂SO₄ 10% sob agitação mecânica por 2 h a 100 rpm (Shaker Marconi). Em seguida, filtrou-se em papel filtro qualitativo, sendo o extrato coletado e o material retido desprezado.

Em seguida, foram adicionados em um tubo de centrifuga 10mL do extrato, 10mL água deionizada e 12mL de FeCl₃. Os mesmos foram colocados em banho-Maria a 100°C por 75 minutos. Decorrido este período, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e centrifugados por 15 min a 5800 rpm (Jouan). O sobrenadante foi descartado (P inorgânico) e ao precipitado, adicionou-se 5mL HCl 0,6% + Na₂SO₄ 2,5% e centrifugou-se por 15 minutos, sendo este procedimento repetido mais 3 vezes, totalizando quatro lavagens. Após descartar o último sobrenadante, o precipitado foi lavado com 7 mL de solução digestora (HNO₃/HClO₄ 4:1), transferindo-o para tubos de ensaio de alta resistência.

Estes tubos foram colocados no bloco digestor (Tecnal – TE 007D) a 50°C, sendo a temperatura elevada gradativamente até 200°C. Após a digestão e diluição adequada das amostras, o fósforo fitico foi determinado colorimetricamente, segundo Chen, Toribara e Warner (1956) e foi utilizado o fator 3,55, referente aos 28,2% de P presente na molécula de AF, para converter o fósforo fitico em ácido fitico.

O procedimento consistiu na construção de uma curva padrão a partir de uma solução estoque (0,05 g de K₂HPO₄ em 200 mL H₂O) e solução de trabalho (2 mL da solução estoque em 10 mL H₂O), obtendo concentrações entre 0,9 e 9,0 µg de fósforo. Para a quantificação foi empregado o reagente de cor, constituído por uma solução de água deionizada, molibdato de amônio 2,5%, ácido ascórbico 10% e ácido sulfúrico 6N (2:1:1:1). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (820 nm), Cintra 20.

4.2.6 Determinação dos Minerais Cobre, Ferro e Fósforo

As concentrações de ferro e cobre foram analisadas para verificar sua relação com a atividade antioxidante. A determinação de P foi realizada por ser uma medida importante, pois representa a soma do teor de P orgânico e inorgânico, sendo que o P fítico está contido na fração orgânica.

A análise destes minerais foi realizada através da digestão nitroperclórica ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ /3:1). Após a diluição adequada, a leitura de Cu, Fe e P foi realizada por espectrometria de emissão de plasma (ICP- ICAP 61E, Thermo Jarrel Ash Corporation). As medidas de absorvância foram feitas no laboratório de Solos do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR, Londrina - PR).

4.2.7 Determinação de Cinzas

O teor de cinzas da soja e de seus derivados foi determinado conforme descrição da AOAC (1998) utilizando a incineração seguida da calcinação da amostra em mufla a 550°C.

4.2.8 Determinação de Umidade e Resíduo Seco

A umidade dos derivados de soja foi determinada por dessecação em estufa a 105°C até peso constante de acordo com o método da AOAC (1998), em triplicata. Para análise do teor de resíduo seco, os extratos foram evaporados em banho-Maria e depois dessecados em estufa (105°C) até peso constante.

4.2.9 Análise Estatística

As análises foram realizadas em triplicatas genuínas e os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio-padrão ($n = 3$). A comparação das médias foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguido do teste Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa Statistica versão 6.0. Com o auxílio do mesmo programa foi realizada a análise de componentes principais (ACP).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS

Os grãos de soja (BRS 267) apresentaram concentrações de compostos fenólicos e flavonóides totais equivalente a 187,8 mg EAG/100g b.s. e 94,3 mg EQ/100g b.s., (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com os valores relatados na literatura. Genovese, Hassimotto e Lajolo (2005), ao avaliar diferentes variedades de soja brasileiras, reportaram teores de compostos fenólicos entre 143 e 225 mg de catequina/100g b.s. Em relação ao conteúdo de flavonóides, Boateng et al. (2007) encontraram aproximadamente 90 mg de catequina/100g b.s., na variedade de soja americana estudada. Malencic et al. (2008) detectaram em grãos de soja da Sérvia, EUA e China, uma variação de 189,1 a 384,0 mg de catequina/100g b.s., e de 27,3 a 88,7 mg de rutina/100g b.s., para o teor de fenólicos e flavonóides, respectivamente.

A variação de compostos fenólicos e flavonóides nos grãos de soja pode ser atribuída a fatores como genótipo, condições ambientais, grau de maturidade e local de plantio (CARRÃO-PANIZZI et al., 1999; WANG; MURPHY, 1994b). A temperatura durante o desenvolvimento do grão é um dos fatores mais importantes, pois segundo Carrão-Panizzi et al. (1999), a soja plantada em regiões com temperaturas próximas a 20°C apresentaram concentração média de isoflavonas de 147,8 mg/100g (FTAbyara) e 180,1 mg/100g (IAS 5) e quando plantadas em regiões com temperatura média de 25°C estas variedades apresentaram 73,5 mg/100g e 85,5 mg/100g, respectivamente. A recuperação de isoflavonas também depende dos solventes utilizados na extração.

Ao comparar o teor de compostos fenólicos de alguns vegetais provenientes dos EUA e extraídos com solvente semelhante ao utilizado neste estudo (etanol 80%), nota-se menores concentrações na ervilha verde (134 mg EAG/100g b.s.) e no grão de bico (154 mg EAG/100g b.s.) do que na soja analisada (187,8 mg EAG/100g b.s.), ao contrário da lentilha (244 mg EAG/100g b.s.) e do feijão preto (320 mg EAG/g na lentilha b.s.) (XU; CHANG, 2007). Entre os cereais, apenas o milho apresentou maior teor de compostos fenólicos totais que a soja (263 mg EAG/100g), sendo os valores menores para o trigo (135,92 mg EAG/100g), aveia (111,09 mg EAG/100g) e arroz (94,6 mg EAG/100g) (ADOM; LIU, 2002).

De acordo com os mesmos autores, a concentração de flavonóides totais encontrada na ervilha verde (19 mg EC/100g b.s.), no milho (48,76 mg EC/100g), no trigo (35,99 mg EC/100g), na aveia (33,67 mg EC/100g) e no arroz (26,70 mg EC/100g) foi menor que o teor obtido para a soja estudada (BRS 267) (94,3 mg EC/100g b.s.). Valores superiores foram detectados no feijão preto (119 mg EC/100g) e na lentilha (122 mg EC/100g b.s.) (ADOM; LIU, 2002; XU; CHANG, 2007).

Nos produtos derivados de soja houve uma grande variação no teor de compostos fenólicos e flavonóides totais, como mostra a Tabela 1. A proteína micronizada, farinha desengordurada e proteína texturizada (marcas 2 e 3), apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos. A PMS também demonstrou o maior teor de flavonóides totais (126,6 mg EQ/100g b.s.), provavelmente devido ao processamento que consiste em uma dupla moagem, em moinho de martelo e em moinho de rolos, sendo ainda submetido a um aquecimento (80°C) até a umidade final de 6 a 8%. Assim, a granulometria fina que favorece a extração de compostos bioativos, pode ser uma das causas do elevado teor encontrado, quando comparado com os demais produtos.

Tabela 1 – Teores de umidade (%), fenólicos totais (mg EAG/100g b.s.) e flavonóides totais (mg EQ/100g b.s.) na soja e produtos derivados

Produto/Marca	Umidade	Fenólicos totais	Flavonóides totais
Soja (BRS 267)	8,4 ± 0,2 ^c	187,8 ± 0,7 ^f	94,3 ± 1,7 ^c
Farinha desengordurada de soja	6,8 ± 0,1 ^{d,e,f}	242,3 ± 5,7 ^a	104,1 ± 1,6 ^b
Farinha integral de soja orgânica	6,5 ± 0,3 ^{d,e,f,g}	186,1 ± 8,3 ^f	101,0 ± 1,7 ^b
Extrato hidrossolúvel de soja 1	6,2 ± 0,1 ^{f,g}	194,2 ± 4,2 ^f	66,3 ± 3,5 ^{f,g}
Extrato hidrossolúvel de soja 2	5,8 ± 0,1 ^{g,h}	204,2 ± 5,7 ^e	55,5 ± 2,3 ^h
Extrato hidrossolúvel de soja 3	5,8 ± 0,2 ^{g,h}	230,2 ± 5,4 ^b	71,4 ± 3,4 ^{e,f}
Proteína texturizada de soja 1	7,3 ± 0,2 ^{d,e}	222,9 ± 2,4 ^{b,c}	102,8 ± 2,9 ^b
Proteína texturizada de soja 2	7,3 ± 0,3 ^d	241,1 ± 4,0 ^a	99,8 ± 2,8 ^{b,c}
Proteína texturizada de soja 3	6,3 ± 0,5 ^{f,g}	243,1 ± 2,2 ^a	100,1 ± 2,4 ^{b,c}
Proteína texturizada de soja 4	6,4 ± 0,01 ^{e,f,g}	215,6 ± 3,1 ^{c,d}	78,9 ± 2,8 ^d
Proteína micronizada de Soja	6,9 ± 0,1 ^{d,e,f}	243,5 ± 3,5 ^a	126,6 ± 1,7 ^a
Isolado protéico de soja 1	4,8 ± 0,1 ⁱ	138,4 ± 3,3 ^h	78,8 ± 2,0 ^d
Isolado protéico de soja 2	5,0 ± 0,1 ^{h,i}	136,4 ± 3,5 ^h	83,1 ± 2,5 ^d
Fibra de soja	7,0 ± 0,2 ^{d,e,f}	144,2 ± 1,2 ^h	72,3 ± 1,6 ^e
Fibra e gérmen de soja	6,8 ± 0,2 ^{d,e,f}	213,9 ± 1,1 ^d	104,2 ± 1,6 ^b
Tofu 1	83,8 ± 0,6 ^b	104,3 ± 6,3 ⁱ	27,9 ± 2,6 ⁱ
Tofu 2	87,2 ± 0,9 ^a	171,3 ± 4,4 ^g	62,2 ± 3,1 ^g
Tofu 3	87,2 ± 0,3 ^a	163,5 ± 2,2 ^g	54,6 ± 2,5 ^h

As letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$).

A farinha desengordurada de soja apresentou maior teor de compostos fenólicos totais (242,3 mg EAG/100g b.s.) que a farinha integral de soja orgânica (186,1 mg EAG/100g b.s.). Barbosa et al. (2006) encontraram valores equivalentes a 200 e 222 mg de catequina/100g b.s., em farinhas de soja desengorduradas, e na farinha de soja integral 183 mg de catequina/100g b.s. A diferença entre estes produtos pode estar associada ao desengorduramento, que promove uma maior concentração de compostos fenólicos na fração não lipídica (GÓES-FAVONI et al., 2004).

Ao analisar a presença de flavonóides em diferentes marcas de farinhas de soja comerciais Góes-Favoni et al. (2004) encontraram uma variação de 65 a 168 mg de isoflavonas totais/100g, sendo a forma malonil-genistina a mais abundante. Os resultados obtidos demonstram que o teor de flavonóides totais nas farinhas integral e desengordurada não diferiu significativamente (101,0 e 104,1 mg EQ/100g b.s., respectivamente). Uma vez que estes produtos são de diferentes marcas, outros fatores além da remoção dos lipídios podem estar associados, tais como a variedade de soja empregada e as condições de processamento (WANG; MURPHY, 1996).

Em relação aos produtos protéicos, nota-se que o teor de compostos fenólicos totais foi maior nas PTS (valor médio 230,7 mg EAG/100g b.s.) do que nos IPS (valor médio 137,4 mg EAG/100g b.s.), como também demonstrado por Barbosa et al. (2006). O teor de flavonóides totais encontrado nas PTS e nos IPS de diferentes marcas variou de 78,9 a 102,8 e de 78,9 a 83,1 mg EQ/100g b.s., respectivamente (Tabela 1). Ao analisar as isoflavonas, Góes-Favoni et al. (2004) também reportaram diferenças entre os quatro tipos de PTS estudados, havendo uma variação de 68 a 112 mg/100g. Em relação ao IPS, Barbosa et al. (2006), detectaram valor superior (124 mg de isoflavonas/100g de amostra) ao encontrado no presente estudo.

As diferenças encontradas em relação ao conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides nas diferentes marcas de PTS podem ser atribuídas às condições de processamento, uma vez que podem ser obtidas a partir de farinha de soja tostada, desengordurada, ou ainda a partir de concentrados ou isolados protéicos (GENOVESE; LAJOLO, 2002). Durante a obtenção da PTS, a extrusão termoplástica promove uma desnaturação e reorientação das proteínas da soja. Apesar das condições drásticas empregadas neste processamento, que associa alta temperatura, pressão e cisalhamento, Singletary et al. (2000) observaram uma redução não significativa de 9% em relação a matéria-prima (concentrado protéico de soja), indicando que as isoflavonas não foram degradadas durante a extrusão. Além disso, como as isoflavonas estão associadas a compostos solúveis, principalmente proteínas, o maior teor deste nutriente (50%), justifica a concentração elevada de compostos fenólicos e flavonóides totais na PTS (WANG; MURPHY, 1996).

Apesar da elevada concentração de proteínas no IPS (90%), Wang e Murphy (1996) reportaram que este produto contém baixos teores de isoflavonas devido às perdas ocasionadas durante a extração, pois o pH alcalino pode modificar as cargas das moléculas de proteínas e alterar as ligações com as isoflavonas. Ao realizar a obtenção de IPS por extração em pH 9,0 a 55°C, Lui et al. (2003) notaram que o sobrenadante apresentava

mais da metade das isoflavonas presente na matéria prima (farinha desengordurada de soja) e o resíduo insolúvel, composto por fibras, continha cerca de 12% de isoflavonas. Ainda segundo estes autores a obtenção de concentrados ou isolados protéicos de soja por extração alcoólica gera uma diminuição no conteúdo de isoflavonas (cerca de 90%), pois são muito solúveis nestas soluções. Assim, as perdas decorrentes do processamento causaram uma diminuição no teor de compostos fenólicos e flavonóides nos IPS, em comparação com os demais produtos.

Os EHS analisados apresentaram diferenças tanto em relação aos compostos fenólicos totais (194,2 a 230,2 mg de EAG/100 g de amostra) como os flavonóides totais (55,5 a 71,4 mg EQ/100 g amostra b.s.). Ao analisar os flavonóides de maior destaque na soja, as isoflavonas, Góes-Favoni et al. (2004), encontraram uma variação de 123 a 180 mg de isoflavonas/100g em produtos brasileiros, enquanto Wang e Murphy (1994) ao estudar os EHS americanos detectaram valores entre 100 e 118 mg isoflavonas agliconas/100g. Nestes estudos a metodologia empregada (cromatografia líquida de alta eficiência) pode ser um dos fatores responsáveis pelas diferenças encontradas.

Além da metodologia, o processamento pode acarretar em mudanças no teor de compostos bioativos. Algumas marcas de EHS são formuladas a partir do IPS, farinha desengordurada, entre outros. Porém, segundo os fabricantes, os produtos analisados foram obtidos a partir dos grãos de soja. O EHS marca 2 foi preparado a partir de grãos descascados e micronizados, fator que pode ter contribuído para o maior teor de compostos fenólicos e flavonóides, em relação a marca 1. Os demais fabricantes não forneceram informações sobre seu processamento.

Durante a obtenção do EHS, compostos solúveis em água são separados do resíduo insolúvel (okara) após cozimento e filtragem. Wang e Murphy (1996) analisaram os constituintes químicos presentes no okara e observaram quantidades insignificantes de isoflavonas, indicando que elas estão mais associadas a proteínas solúveis do que aos carboidratos insolúveis. Assim, o modo de obtenção do EHS utilizado pelos autores, não alterou significativamente o teor de isoflavonas presente neste produto (194 mg isoflavonas agliconas/100g) quando comparado com os grãos de soja empregados (217,2 mg isoflavonas agliconas/100g).

A fibra de soja e o formulado fibra e gérmen de soja apresentaram valores de 144,2 e 213,9 mg EAG/100g b.s., para o teor de fenólicos totais e 72,3 e 104,2 mg EQ/100g b.s., em relação aos flavonóides totais, respectivamente. Estes valores estão relacionados com o baixo teor destes compostos presente na fibra, mas que podem ser

suplementados com a adição de gérmen de soja. Esta porção do grão, denominada hipocótilo, possui alta concentração de isoflavonas, sendo encontradas quantidades de 5,5 a 6 vezes maiores que no cotilédone (TSUKAMOTO et al., 1995). Segundo Barbosa et al. (2006) o suplemento comercial de isoflavonas, a base de gérmen de soja, apresentou elevado teor de compostos fenólicos totais (413 mg catequina/100g b.s.) e isoflavonas (711 mg de isoflavonas agliconas/100g).

Entre os produtos analisados, os tofus apresentaram menor teor de compostos fenólicos, e no caseiro (marca 1) também foi detectado a menor concentração de flavonóides totais (27,9 mg EQ/100g b.s.). Entre as três marcas de tofu analisadas, a segunda continha o maior teor de flavonóides totais (62,2 9 mg EQ/100g b.s.), 55% a mais que o tofu caseiro (marca 1). A variação entre as marcas pode ser devido ao processamento, bem como os diferentes coagulantes empregados.

Wang e Murphy (1996) ao analisar derivados de soja, como tofu, miso e tempeh, detectaram teores de isoflavonas correspondente a 33,7; 29,4 e 62,5 mg/100g b.s., respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados por Coward et al (1998) para o tofu (32,3 mg/100g), sendo que o preparado a partir do EHS desengordurado apresentou menor teor de isoflavonas (26,09 mg/100 g). De acordo com estes autores, a etapa de coagulação do EHS, é a maior responsável pela diminuição do teor de isoflavonas, havendo uma redução para 33% do conteúdo presente nos grãos de soja. Ainda segundo este estudo, o aquecimento não provocou diminuição no teor de isoflavonas, mas elas foram fracionadas entre o okara e o soro, sendo as perdas na água de maceração pequenas (WANG; MURPHY, 1996).

Segundo Wang e Murphy (1996) a presença e a concentração das isoflavonas nos produtos a base de soja dependem das condições de processamento. Os produtos não-fermentados têm concentrações de isoflavonas duas a três vezes superiores que os fermentados, entretanto, ocorre uma diferente distribuição dos constituintes nestes dois grupos: os produtos fermentados apresentam predominantemente agliconas enquanto os produtos não-fermentados têm maiores concentrações de β -glicosídeos (COWARD et al., 1993). Portanto, a concentração de compostos fenólicos e flavonóides tende a variar entre os produtos, bem como as formas presentes, o que pode resultar em diferenças na capacidade antioxidante dos mesmos.

Pesquisas recentes comprovam que a administração de isoflavonas purificadas produz efeitos biológicos menos significativos quanto a redução do risco de doenças que aqueles produzidos pelo consumo de isoflavonas associadas às proteínas da soja (BADGER et al., 2002). Atualmente, preconiza-se que a ingestão de 25 g de proteínas de soja

juntamente com cerca de 30 a 50 mg de isoflavonas diariamente são capazes de reduzir o colesterol sérico (SETCHELL, 1998). Considerando que as isoflavonas são as formas predominantes dentro do grupo dos flavonóides na soja (WANG; MURPHY, 1994), pode-se inferir que os grãos de soja e a farinha integral de soja orgânica, que contém aproximadamente 40% de proteínas e a farinha desengordurada de soja contendo 50% de proteínas, contribuiriam com 58,9; 59,0 e 48,5 mg de flavonóides totais, respectivamente, se a recomendação de consumo de proteínas (25 g) fosse obedecida. As PTS e a PMS têm em média 50% de proteína e o consumo de 25 g diárias deste nutriente, pode contribuir entre 36,9 e 58,9 mg de flavonóides totais.

Considerando a diluição do EHS (30 g de produto para um copo de 250 mL) e o teor de proteínas (40%), seria necessário aproximadamente 2 copos de EHS para atender o consumo necessário de proteínas (25 g), que forneceria o teor recomendado de isoflavonas (32,7 a 42,0 mg de flavonóides totais).

Em relação aos IPS, cujo teor de proteínas é elevado (90%), mas há menor concentração de flavonóides, seria necessário ingerir cerca de 39 g do produto para obter o mínimo de flavonóides totais (30 mg). Da mesma forma, a fibra de soja (40% de proteína), tem baixo teor destes compostos, sendo necessário ingerir 44,6 g para atingir o teor de isoflavonas recomendado. Em contraste, para atender o consumo de proteínas (25 g) através do produto fibra e gérmen de soja, contendo menor teor deste nutriente (20%), seria necessário um consumo de 125 g do mesmo, o que forneceria um elevado teor de flavonóides totais (121,4 mg). O mesmo ocorre nos tofus, que contêm baixo teor de proteínas (7,5 a 10%), exigindo um consumo muito elevado (250 a 333 g), sem ainda suprir a quantidade necessária de flavonóides.

Portanto, a escolha de um único produto para atingir os níveis recomendados deve ser cautelosa, sendo que a ingestão de vários alimentos a base de soja facilita a obtenção do teor de proteínas e flavonóides necessário para conferir os benefícios desejados.

5.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A soja e seus derivados apresentaram diferenças em relação a atividade antioxidante avaliada pelos métodos de sequestro de radicais livres DPPH^{*} e ABTS^{**} e pelo

poder de redução do ferro (FRAP), como mostra a Tabela 2. Sabe-se que a AA de um alimento depende da natureza e concentração dos antioxidantes naturais presentes e que certos compostos podem agir em sinergismo (ALONSO et al., 1999).

A PMS demonstrou maior AA pelo método FRAP, não diferindo da PTS 2 ($p < 0,05$) no ensaio DPPH^{*}, e das PTS 2 e 3 ($p < 0,05$) no método ABTS^{•+} (Tabela 2), provavelmente devido ao elevado teor de compostos fenólicos e flavonóides encontrados nestes alimentos a base de soja (Tabela 1). Além disso, os extratos etanólicos destes produtos apresentaram maiores valores de resíduo seco, variando de 1,42 a 1,57% (Tabela 3), indicando que houve uma maior eficiência na extração dos compostos responsáveis pela AA. Apesar de todos os produtos passarem por tamises de 40 mesh antes da extração, o processamento da PMS, que consiste em uma dupla moagem, e a extrusão termoplástica que origina a PTS, com modificações na orientação das proteínas, pode ter facilitado a ação do solvente.

Os resultados obtidos estão de acordo com Barbosa et al. (2006) que ao avaliar a atividade antioxidante pelo método DPPH^{*}, encontraram valores semelhantes para os grãos de soja (3,7 μmol de Trolox/g de amostra b.s.), IPS (1,3 μmol de Trolox/g de amostra b.s.) e farinha desengordurada de soja (4,2 a 5,0 μmol de Trolox/g de amostra b.s.). Já a farinha de soja integral apresentou maior AA (4,0 μmol de Trolox/g de amostra b.s.) do que a farinha integral de soja orgânica analisada neste estudo (2,9 μmol de Trolox/g de amostra b.s.), o que demonstra que a variedade de soja, bem como o processamento, são fatores que podem influenciar a AA.

Utilizando o método DPPH^{*}, Xu e Chang (2007) analisaram o potencial antioxidante dos grãos de soja das variedades amarela e preta, encontrando teores de 1,96 e 13,39 μmol de Trolox/g b.s., respectivamente. As diferenças encontradas estão relacionadas aos maiores teores de compostos fenólicos e flavonóides na variedade de soja preta. No mesmo estudo nota-se que a soja analisada (BRS 267) apresentou maior potencial antioxidante que a ervilha verde (0,26 μmol de Trolox/g b.s.), ervilha amarela (2,60 μmol de Trolox/g b.s.) e grão de bico (2,06 μmol de Trolox/g b.s.), porém menor que o demonstrado pela lentilha (12,92 μmol de Trolox/g b.s.) e feijão preto (14,50 μmol de Trolox/g b.s.).

Em todos os ensaios, a fibra de soja apresentou menor AA que a fibra e gérmen de soja. Segundo Monje et al. (2006) o gérmen de soja apresenta maior capacidade de sequestrar radicais DPPH^{*} que o cotilédone, devido ao acúmulo de isoflavonas nesta porção do grão, visando proteger a planta contra patógenos. Entre os produtos que demonstraram menor AA pelo método DPPH^{*}, a fibra de soja, isolado protéico de soja e tofu também

apresentaram menor conteúdo de compostos fenólicos. Em concordância com Huang, Fu e Ho (2003), as marcas de tofu apresentaram em média 50% da capacidade antioxidante dos grãos de soja analisados, o que indica que as perdas de compostos fenólicos e flavonóides durante o processamento, acarretam em uma diminuição na atividade antioxidante.

Tabela 2 – Atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH[•], ABTS^{•+} e FRAP (μmol de Trolox/g de amostra b.s.) na soja e produtos derivados

Produto/Marca	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	FRAP
Soja (BRS 267)	4,0 ± 0,1 ^{e,f,g}	7,1 ± 0,2 ^f	8,4 ± 0,05 ^{e,f}
Farinha desengordurada de soja	4,2 ± 0,2 ^{d,e,f}	9,2 ± 0,3 ^b	9,5 ± 0,1 ^c
Farinha integral de soja orgânica	2,9 ± 0,1 ⁱ	5,4 ± 0,4 ^g	6,7 ± 0,2 ^{h,i}
Extrato hidrossolúvel de soja 1	3,5 ± 0,1 ^g	7,7 ± 0,1 ^{e,f}	6,5 ± 0,3 ^{h,i,j}
Extrato hidrossolúvel de soja 2	3,8 ± 0,2 ^{f,g}	8,1 ± 0,3 ^{d,e}	8,9 ± 0,2 ^{d,e}
Extrato hidrossolúvel de soja 3	4,4 ± 0,2 ^{d,e}	8,9 ± 0,3 ^{b,c}	6,3 ± 0,3 ^{i,j}
Proteína texturizada de soja 1	4,7 ± 0,3 ^{c,d}	8,7 ± 0,2 ^{b,c}	7,3 ± 0,3 ^g
Proteína texturizada de soja 2	6,3 ± 0,3 ^a	10,5 ± 0,2 ^a	10,9 ± 0,1 ^b
Proteína texturizada de soja 3	5,4 ± 0,6 ^b	10,2 ± 0,2 ^a	9,1 ± 0,2 ^{c,d}
Proteína texturizada de soja 4	5,1 ± 0,1 ^{b,c}	8,4 ± 0,4 ^{c,d}	8,2 ± 0,1 ^f
Proteína micronizada de soja	6,6 ± 0,2 ^a	10,0 ± 0,2 ^a	12,4 ± 0,3 ^a
Isolado protéico de soja 1	1,9 ± 0,2 ^{i,j}	5,6 ± 0,2 ^g	6,1 ± 0,2 ^{i,j}
Isolado protéico de soja 2	1,7 ± 0,1 ^j	4,1 ± 0,3 ^h	6,0 ± 0,5 ^{i,k}
Fibra de soja	1,8 ± 0,3 ^j	4,1 ± 0,1 ^h	3,1 ± 0,1 ^m
Fibra e gérmen de soja	3,4 ± 0,2 ^g	7,6 ± 0,5 ^{e,f}	5,5 ± 0,3 ^k
Tofu 1	1,7 ± 0,1 ^j	0,8 ± 0,1 ^j	3,8 ± 0,2 ^l
Tofu 2	2,7 ± 0,2 ^h	3,4 ± 0,2 ⁱ	7,4 ± 0,5 ^g
Tofu 3	2,4 ± 0,1 ^{h,i}	3,4 ± 0,2 ⁱ	7,0 ± 0,4 ^{g,h}

As letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, p<0,05).

Valores superiores de AA foram detectados pelo método ABTS^{•+}. Entre os produtos analisados, a PMS e a PTS (marcas 2 e 3) apresentaram maior capacidade antioxidante (superior a 10 μmol de Trolox/g de amostra b.s.), seguida da farinha de soja desengordurada e demais marcas de PTS. As marcas de EHS apresentaram AA variando de

7,7 a 8,9 μmol de Trolox/g de amostra b.s., estando próximo ao valor encontrado para o produto fibra e gérmen de soja (7,6 μmol de Trolox/g de amostra b.s.) e superior ao detectado no IPS (valor médio 4,85 μmol de Trolox/g de amostra b.s.). Os demais produtos, fibra de soja e tofu, apresentaram menor capacidade de sequestrar o radical livre $\text{ABTS}^{\bullet+}$, bem como a menor porcentagem de resíduo seco 0,69 e 0,60%, respectivamente, indicando que além do processamento causar diminuição no teor de compostos fenólicos e flavonóides, a matriz do alimento dificultou a extração destes compostos, proporcionando uma menor atividade antioxidante.

Em relação a capacidade antioxidante determinada pelo ensaio FRAP os produtos que apresentaram maior atividade foram a proteína micronizada, proteína texturizada (marca 2) e farinha desengordurada. A fibra de soja apresentou menor poder de redução do ferro, seguida do tofu (marca 1) e do isolado protéico de soja (marca 2). Bolling, Blumberg e Chen (2009) reportaram que o isolado protéico de soja, a farinha integral de soja e o concentrado protéico de soja estão em ordem crescente de poder de redução do ferro (FRAP).

Os grãos de soja apresentaram AA pelo ensaio de FRAP correspondente a 8,4 μmol de Trolox/g de amostra b.s. Este valor está acima do encontrado por Bolling, Blumberg e Chen (2009), cujos valores foram 0,24 (variedade amarela) e 3,87 μg de Fe^{2+} /g de amostra b.s. (variedade preta). Porém, como os autores utilizaram como padrão para a curva de calibração sulfato ferroso, resultados diferentes eram esperados.

Boateng et al. (2007) ao realizarem o método FRAP para vários grãos, incluindo a soja, demonstraram que os compostos fenólicos totais diminuem após a maceração, mas aumentam depois da torra. A maceração leva ao amaciamento da parede celular dos tecidos que é usualmente acompanhada pela solubilização dos flavonóides ligados a esta estrutura, conseqüentemente é provável que estes compostos possam ser lixiviados pela água durante o processamento. Entretanto, durante o aquecimento ocorre a ruptura celular ou a quebra de compostos insolúveis, facilitando a extração dos mesmos. Além disso, de acordo com Siddhuraju (2006) e Xu e Chang (2008), a estabilidade dos compostos antioxidantes durante o aquecimento pode ser devido a formação de produtos da reação de Maillard como o hidrometilfurfural (HMF) que possui alta capacidade antioxidante. Estes fatores explicam a maior AA das PTS e da PMS, que foram submetidas a um tratamento térmico e mantiveram um alto teor de compostos fenólicos e flavonóides totais.

No presente estudo os compostos fenólicos apresentaram uma alta correlação com os métodos $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($r = 0,93$; $p < 0,05$), DPPH^{\bullet} ($r = 0,89$; $p < 0,05$) e FRAP ($r = 0,74$; $p < 0,05$). O método de Folin determina o teor de fenólicos totais, mas como consiste em

um mecanismo básico de oxidação/redução, pode ser considerado uma avaliação da atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). É provável que os compostos medidos por Folin, ácidos fenólicos, flavonóides, entre outras substâncias, estejam envolvidos com o sequestro dos radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•] e em menor extensão com o poder redutor do ferro. Awika et al. (2003) ao avaliar a AA de sorgos, também encontraram elevados coeficientes de correlação entre compostos fenólicos totais e os métodos de ABTS^{•+} ($r^2 = 0,97$) e DPPH[•] ($r^2 = 0,96$).

Foi observado que a correlação com flavonóides totais foi menor para ambos os métodos, ABTS^{•+} ($r = 0,69$; $p < 0,05$), DPPH[•] ($r = 0,62$; $p < 0,05$) e FRAP ($r = 0,58$; $p < 0,05$). Estes dados indicam que não apenas os flavonóides, mas outros compostos fenólicos contribuem para AA da soja e seus derivados, bem como substâncias não incluídas neste grupo, tais como ácido fítico, peptídeos, entre outras ainda não identificadas.

Cos et al. (2003) reportaram que a genisteína foi menos eficiente nos ensaios de DPPH[•] e peroxidação do ácido linoléico que outros compostos fenólicos, pertencentes as classes do ácido cinâmico, ácido benzóico, proantocianidinas e estilbenos. Além disso, a ligação da glicose com a aglicona reduz a atividade antioxidante das isoflavonas em 50 a 100 vezes (NAIM, 1976). De acordo com Sakthivelu et al. (2008) é possível que ácidos fenólicos e alguns outros compostos presentes na soja sejam responsáveis pela atividade sequestrante do DPPH[•].

Os principais ácidos fenólicos encontrados nos derivados de soja são ácido clorogênico, caféico, p-cumárico e ferúlico (PRATT; BIRAC, 1979). Sua atividade antioxidante se deve aos grupos hidroxilas presentes nos anéis A e/ou B, que possibilitam a transferência de elétrons ou hidrogênio para os radicais livres. As isoflavonas são os compostos predominantes no grupo dos flavonóides e sua capacidade antioxidante depende do número e da posição dos grupos hidroxilas, bem como do grau de substituição. Entre as isoflavonas, a genisteína possui maior AA, devido a presença de hidroxilas na posição 5 do anel A e 4 do anel B (MADHAVI; DESHPANDE; SALUNHE, 1995; PRATT; BIRAT, 1979).

Em relação aos métodos de avaliação da atividade antioxidante, o DPPH[•] e ABTS^{•+} apresentaram uma alta correlação ($r = 0,88$; $p < 0,05$), visto que ambos detectam a capacidade de sequestrar radicais livres. Em relação ao ensaio FRAP, as correlações com os métodos DPPH[•] e ABTS^{•+} também foram consideráveis, $r = 0,82$; $p < 0,05$ e $r = 0,71$ $p < 0,05$; respectivamente. O ensaio FRAP consiste em um mecanismo de ação caracterizado exclusivamente por troca de elétrons, enquanto os métodos DPPH[•] e ABTS^{•+} podem detectar

tanto transferência de elétrons como de átomos de hidrogênio (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

De acordo com Awika et al. (2003) os sorgos marrons, apresentaram diferenças mínimas entre os valores de ABTS^{•+} e DPPH[•]. Segundo os autores, o método ABTS^{•+} tem maior flexibilidade e pode ser utilizado em diferentes níveis de pH, ao contrário do DPPH[•], que é sensível ao pH ácido. Além disso, o reagente ABTS^{•+} é solúvel em solventes orgânicos e aquosos e o tempo de reação é menor. Em geral, estes dois métodos estão fortemente relacionados (ABTS^{•+} e DPPH[•]). Assim, ambos podem ser igualmente úteis no acompanhamento da AA de extratos naturais, desde que não haja interferência de pigmentos.

Os resultados obtidos sugerem que os produtos derivados de soja podem agir como inibidores de radicais livres ou sequestrantes, agindo provavelmente como antioxidantes primários. Sua ação contra os radicais livres, particularmente os radicais peroxil, que são os maiores propagadores da autoxidação em cadeia dos lipídeos, finalizaria a reação (FRANKEL, 1991; YANG et al., 2000).

Assim a atividade antioxidante também foi avaliada pela interceptação dos radicais livres provenientes da peroxidação do ácido linoléico (método direto), sendo os valores relatados na Tabela 3. A farinha desengordurada, a proteína micronizada e os grãos de soja apresentaram maior porcentagem de inibição, 85,6; 81,3 e 80,3%, respectivamente (Tabela 3). Esta AA foi semelhante entre as marcas de PTS e EHS analisadas, variando de 63,5 a 77,9%. Os demais produtos apresentaram menor capacidade de inibição.

Yang et al. (2000) ao testar o efeito antioxidante de caldo de soja (soybean broth), conhecida como uma bebida muito saudável no Taiwan, demonstraram uma inibição máxima de ácido linoléico de 85% (sem diluição). Segundo os autores esta atividade pode ser devido a redução dos hidroperóxidos formados, inativação de radicais livres, complexação com íons metálicos, ou uma combinação destes fatores.

Barbosa et al. (2006) ao realizar o ensaio de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico, comprovaram que a farinha desengordurada de soja, grãos de soja e PTS têm maior capacidade antioxidante que a farinha integral e IPS. Genovese, Hassimotto e Lajolo (2005) utilizando o mesmo método, observaram que as variedades de soja brasileira apresentam uma variação de 37,8 a 48,9% de inibição do descolorimento do β -caroteno, sendo encontrada uma baixa correlação entre a AA e o total de fenólicos ($r = 0,26$) e isoflavonas ($r = 0,06$). Estes valores demonstram que apesar da semelhança entre as amostras analisadas, o método de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico confere resultados diferentes, dificultando a comparação.

Tabela 3 – Atividade antioxidante avaliada pelo método de peroxidação do ácido linoléico (% de inibição) e resíduo seco dos extratos (%) na soja e produtos derivados

Produtos	% Inibição	Resíduo seco
Soja (BRS 267)	80,3 ± 1,4 ^{a,b}	1,1 ± 0,04 ^e
Farinha desengordurada de soja	85,6 ± 0,8 ^a	1,0 ± 0,04 ^e
Farinha orgânica de soja	69,9 ± 0,8 ^{d,e}	1,1 ± 0,03 ^f
Extrato hidrossolúvel de soja 1	65,3 ± 3,5 ^{e,f}	1,3 ± 0,05 ^{c,d}
Extrato hidrossolúvel de soja 2	70,4 ± 4,0 ^{d,e}	1,3 ± 0,10 ^c
Extrato hidrossolúvel de soja 3	73,6 ± 3,6 ^{c,d}	1,3 ± 0,06 ^c
Proteína texturizada de soja 1	63,5 ± 2,3 ^f	1,2 ± 0,04 ^{d,e}
Proteína texturizada de soja 2	69,1 ± 1,0 ^{d,e}	1,5 ± 0,04 ^b
Proteína texturizada de soja 3	77,9 ± 2,2 ^{b,c}	1,6 ± 0,06 ^a
Proteína texturizada de soja 4	65,2 ± 3,8 ^{e,f}	1,5 ± 0,04 ^{a,b}
Proteína micronizada de Soja	81,3 ± 3,1 ^{a,b}	1,4 ± 0,01 ^b
Isolado protéico de soja 1	40,0 ± 2,1 ⁱ	1,1 ± 0,03 ^e
Isolado protéico de soja 2	45,5 ± 1,5 ^h	1,1 ± 0,02 ^e
Fibra de soja	45,5 ± 1,4 ^h	0,7 ± 0,03 ^g
Fibra e gérmen de soja	53,3 ± 2,8 ^g	1,1 ± 0,04 ^e
Tofu 1	40,8 ± 2,7 ^{h,i}	0,6 ± 0,02 ^g
Tofu 2	52,4 ± 2,8 ^g	1,0 ± 0,04 ^f
Tofu 3	53,9 ± 2,8 ^g	1,1 ± 0,05 ^e

As letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Neste estudo uma alta correlação entre compostos fenólicos e AA avaliada pelo ensaio de peroxidação do ácido linoléico foi encontrada ($r = 0,82$; $p < 0,05$), assim como nos demais ensaios de AA, a correlação deste método com o teor de flavonóides totais foi menor ($r = 0,55$; $p < 0,05$), o que confirma que os compostos fenólicos estão estritamente relacionados com a AA em produtos a base de soja. O método de PAL ainda apresentou correlações semelhantes com os métodos ABTS⁺⁺ ($r = 0,78$; $p < 0,05$); DPPH[•] ($r = 0,77$; $p < 0,05$) e FRAP ($r = 0,74$; $p < 0,05$).

Dessa forma, os produtos derivados de soja retêm compostos bioativos presentes no grão, que atuam como antioxidantes tanto sequestrando radicais livres já

formados no meio (ABTS^{•+} e DPPH[•]), como transferindo elétrons (FRAP) ou impedindo a propagação da reação em cadeia através da interceptação de radicais livres gerados durante a oxidação de um substrato lipídico.

Apesar do objetivo dos ensaios de atividade antioxidante consistir em prever a eficiência biológica dos antioxidantes, um método só é considerado apropriado se estiver correlacionado com a eficiência *in vivo* deste antioxidante. Devido ao complexo conjunto de fatores que influencia o acesso e a resposta do antioxidante as diferentes espécies reativas é difícil prever o valor verdadeiro da atividade antioxidante de uma amostra baseada em apenas um ensaio. Além disso, apenas a atividade antioxidante não explica o efeito potencial de um composto *in vivo*, uma vez que outras propriedades tais como modificação da atividade enzimática ou sinalização celular são possíveis (AWIKA, 2003). Há expectativas que mais dados epidemiológicos e biológicos relacionados aos antioxidantes se tornem disponíveis, assim um melhor discernimento será obtido em relação a relevância dos dados *in vitro*.

5.3 ÁCIDO FÍTICO E MINERAIS

Os grãos de soja (BRS 267) e produtos derivados apresentaram diferentes teores de P total, P fítico e ácido fítico (Tabela 4). Nos grãos de soja (BRS 267) as concentrações de P total, P fítico e ácido fítico corresponderam a 0,79; 0,55 e 1,94 mg/100g b.s., estando próximo aos valores encontrados por Rosset (2007) ao analisar a mesma variedade de soja 0,77; 0,46 e 1,63 mg/100g b.s., respectivamente.

Os tofus marcas 2 e 3 apresentaram os maiores níveis de ácido fítico (2,45 e 2,34 g/100g b.s., respectivamente), aproximadamente 30% a mais que o tofu marca 1 (1,68 g/100g b.s.), no qual também foi detectado menores teores de P total e P fítico (Tabela 4). Estes altos valores, quando comparados com os demais produtos, podem ocorrer devido à extração do ácido fítico durante o preparo do EHS, que precipita com as proteínas na fase de coagulação (LIU, 1997).

Tabela 4 – P total, P fítico, AF (g/100g b.s.) na soja e produtos derivados

Produtos	P total	P fítico	AF
Soja (BRS 267)	0,79 ± 0,01 ^{d,e}	0,55 ± 0,01 ^f	1,94 ^f
Farinha desengordurada de soja	0,83 ± 0,04 ^{a,b,c}	0,58 ± 0,02 ^{c,d}	2,08 ^{c,d}
Farinha orgânica de soja	0,63 ± 0,00 ^h	0,43 ± 0,02 ^h	1,51 ^h
Extrato hidrossolúvel de soja 1	0,62 ± 0,02 ^h	0,42 ± 0,01 ^{h,i}	1,48 ^{h,i}
Extrato hidrossolúvel de soja 2	0,61 ± 0,02 ^h	0,42 ± 0,01 ^h	1,50 ^h
Extrato hidrossolúvel de soja 3	0,63 ± 0,02 ^h	0,40 ± 0,02 ⁱ	1,41 ⁱ
Proteína texturizada de soja 1	0,76 ± 0,03 ^f	0,55 ± 0,02 ^f	1,95 ^f
Proteína texturizada de soja 2	0,79 ± 0,01 ^{d,e,f}	0,56 ± 0,02 ^{e,f}	1,99 ^{e,f}
Proteína texturizada de soja 3	0,77 ± 0,01 ^{e,f}	0,55 ± 0,01 ^f	1,96 ^f
Proteína texturizada de soja 4	0,76 ± 0,03 ^{e,f}	0,55 ± 0,03 ^f	1,95 ^f
Proteína micronizada de Soja	0,80 ± 0,03 ^{c,d}	0,60 ± 0,02 ^c	2,13 ^c
Isolado protéico de soja 1	0,83 ± 0,04 ^{a,b,c}	0,56 ± 0,01 ^{d,e,f}	2,00 ^{d,e,f}
Isolado protéico de soja 2	0,84 ± 0,01 ^{a,b}	0,58 ± 0,01 ^{c,d,e}	2,07 ^{c,d,e}
Fibra de soja	0,48 ± 0,01 ⁱ	0,32 ± 0,01 ^j	1,15 ^j
Fibra e gérmen de soja	0,37 ± 0,02 ^j	0,17 ± 0,02 ^k	0,60 ^k
Tofu 1	0,69 ± 0,00 ^g	0,47 ± 0,02 ^g	1,68 ^g
Tofu 2	0,81 ± 0,05 ^{b,c,d}	0,69 ± 0,02 ^a	2,45 ^a
Tofu 3	0,85 ± 0,01 ^a	0,66 ± 0,02 ^b	2,34 ^b

As letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Segundo Anderson e Wolf (1995), os teores de AF em diferentes tipos de tofus variaram de 1,5 a 2,9 g/100g b.s. Rosset (2007) encontrou valores de AF entre 0,86 e 2,21 g/100g b.s. em tofus obtidos a partir de diferentes variedades de soja. Estes dados indicam que as variedades de soja empregadas, bem como o processamento, proporcionam diferentes níveis de AF nos tofus. Além disso, as três marcas de tofus analisadas, foram fabricadas com coagulantes diferentes, sulfato de magnésio (marca 1), sulfato de cálcio (marca 2) e glucona-delta-lactona (marca 3), fator que pode ter contribuído com as diferenças encontradas, como também demonstrado por Mahfuz et al. (2004).

Nos produtos protéicos foram detectados níveis semelhantes de ácido fítico, equivalente a 2,13 g/100g b.s. na PMS, 2,00 e 2,07 g/100g b.s nas duas marcas de IPS, e uma pequena variação de 1,95 a 1,99 g/100g b.s. nas quatro marcas de PTS estudadas. Massey et

al. (2005) detectaram um teor de 1,88 g/100g b.u. para a PTS. Reddy e Sathe (2002) reportaram que quanto maior o conteúdo de proteínas, maior o teor de AF, uma vez que este está incorporado nos corpos protéicos dos grãos e permanece associado após o processamento.

A farinha integral apresentou menor teor de AF (1,51 g/100g b.s.) que a farinha desengordurada (2,08 g/100g b.s.), provavelmente devido ao desengorduramento, que promove a concentração de compostos não gordurosos, diferenças na matéria prima e no processamento. Massey et al. (2005) encontraram teores de fitato equivalentes a 1,10 e 1,40 g/100g b.u., nas duas marcas de farinha de soja analisadas.

As menores concentrações de AF variaram de 1,41 a 1,50 g/100g nas diferentes marcas de EHS, 1,15 g/100g na fibra de soja e 0,60 g/100g na fibra e gérmen de soja (Tabela 4). Beléia, Ida e Lethi (1990) detectaram um teor de 1,06 mg/g b.s. para o EHS analisado e Rosset (2007) observou uma variação de 0,73 a 1,69 g/100g b.s. nos EHS obtidos a partir de diferentes variedades de soja. O baixo teor de ácido fítico encontrado nos produtos contendo fibra de soja, ou resíduo insolúvel, pode ser devido a alta solubilidade do AF na água de maceração (LESTIENNE et al., 2005).

O AF apresentou correlação significativa, porém muito baixa com o ensaio de DPPH• ($r = 0,14$). Segundo Filgueiras et al. (2009) o AF extraído de gérmen de milho não apresentou capacidade de doação de elétrons ao DPPH•. Já em relação ao método de redução do ferro (FRAP) notou-se neste estudo uma correlação maior ($r = 0,48$ $p < 0,05$), indicando que o AF pode estar envolvido nesta ação dos antioxidantes. Os demais métodos não apresentaram correlações significativas.

Em relação ao teor de cinzas, ferro e cobre houve diferenças entre os produtos analisados, como mostra a Tabela 5. Os grãos de soja (BRS 267) apresentaram 1,5 mg/100g b.s. e 10,97 mg/100g b.s., em relação ao cobre e ferro, respectivamente (Tabela 5). Estes valores estão próximos aos relatados na literatura. Ciabotti et al. (2006) detectaram teores de cobre e ferro correspondentes a 1,35 e 7,99 mg/100g na variedade de soja BRS 133 e 1,05 e 8,70 mg/100g b.s., nos grãos de soja BRS 213. Rosset (2007) ao analisar o teor de ferro na mesma variedade de soja estudada, BRS 267, detectou 9,2 mg/100g b.s.

Entre os derivados de soja, o IPS (marca 1) apresentou o maior teor de cobre (1,94 mg/100g b.s.), seguido da marca 2 (1,80 mg/100g b.s) e demais produtos protéicos, PMS (1,76 mg/100g b.s.) e PTS (valor médio de 1,63 mg/100g b.s.). A farinha desengordurada de soja novamente apresentou maior teor de cobre (1,74 mg/100g b.s.) que a farinha integral (1,47 mg/100g b.s.).

Os EHS e os tofus analisados apresentaram teores de cobre entre 1,20 e 1,32 mg/100g b.s. e entre 0,86 e 1,26 mg/100g b.s., respectivamente. Ciabotti et al. (2006) detectaram valores semelhantes para o tofu (1,19 a 1,32 mg/100g b.s.) e superiores para o EHS, variando de 2,42 a 2,88 mg/100g b.s. Os demais produtos fibra de soja e fibra e gérmen de soja apresentaram as menores concentrações de cobre correspondentes a 0,77 e 1,11 mg/100g b.s., respectivamente.

Tabela 5 – Teor de cinzas (g/100g b.s.), cobre e ferro (mg/100g b.s.) na soja e produtos derivados

Produtos	Cinzas	Cu	Fe
Soja (BRS 267)	5,6 ± 0,1 ^g	1,50 ± 0,01 ^{e,f}	10,97 ± 0,16 ^g
Farinha desengordurada de soja	6,1 ± 0,1 ^{d,e,f}	1,74 ± 0,06 ^{b,c}	10,31 ± 0,95 ^{h,i}
Farinha integral de soja orgânica	4,6 ± 0,1 ⁱ	1,47 ± 0,01 ^f	13,41 ± 0,80 ^f
Extrato hidrossolúvel de soja 1	4,4 ± 0,1 ⁱ	1,32 ± 0,08 ^g	7,56 ± 0,50 ^j
Extrato hidrossolúvel de soja 2	4,4 ± 0,2 ⁱ	1,31 ± 0,10 ^g	7,07 ± 0,61 ^j
Extrato hidrossolúvel de soja 3	5,0 ± 0,1 ^h	1,20 ± 0,01 ^{h,i}	6,85 ± 0,28 ^j
Proteína texturizada de soja 1	6,2 ± 0,1 ^{d,e}	1,57 ± 0,05 ^{d,e}	9,59 ± 0,94 ⁱ
Proteína texturizada de soja 2	6,6 ± 0,1 ^b	1,64 ± 0,02 ^d	20,18 ± 0,93 ^b
Proteína texturizada de soja 3	6,5 ± 0,0 ^{b,c}	1,66 ± 0,03 ^{c,d}	15,23 ± 0,51 ^e
Proteína texturizada de soja 4	6,2 ± 0,2 ^{c,d}	1,64 ± 0,06 ^d	17,80 ± 0,90 ^c
Proteína micronizada de Soja	7,4 ± 0,1 ^a	1,76 ± 0,07 ^b	16,47 ± 0,54 ^d
Isolado protéico de soja 1	3,8 ± 0,1 ^j	1,94 ± 0,01 ^a	20,52 ± 0,74 ^b
Isolado protéico de soja 2	3,7 ± 0,1 ^j	1,80 ± 0,13 ^b	20,08 ± 0,49 ^b
Fibra de soja	4,6 ± 0,1 ⁱ	0,77 ± 0,04 ^j	13,90 ± 0,96 ^f
Fibra e gérmen de soja	4,5 ± 0,1 ⁱ	1,11 ± 0,01 ⁱ	26,81 ± 0,84 ^a
Tofu 1	3,1 ± 0,0 ^k	0,86 ± 0,03 ^j	9,56 ± 0,71 ⁱ
Tofu 2	5,9 ± 0,2 ^{e,f}	1,26 ± 0,02 ^{g,h}	9,33 ± 0,81 ⁱ
Tofu 3	5,9 ± 0,2 ^f	1,24 ± 0,04 ^{g,h}	9,32 ± 0,95 ⁱ

As letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Em relação ao teor de ferro, a fibra e gérmen de soja apresentou maior valor (26,81 mg/100g b.s.), 51,8% superior a fibra de soja (13,9 mg/100g b.s.). Entre os produtos protéicos, PMS, IPS e PTS houve uma grande variação de 9,59 a 20,08 mg/100g b.s. A

farinha integral apresentou maior teor de ferro (13,41 mg/100g b.s.) que a farinha desengordurada (10,31 mg/100g b.s.). Estes dados implicam que o ferro sofre mais variações que o cobre, de acordo com a matéria-prima e o processamento.

No entanto, o conteúdo de ferro entre as marcas de EHS e tofu sofreram menores variações, de 6,85 a 7,56 mg/100g b.s. e de 9,32 a 9,56 mg/100g b.s., respectivamente. Em concordância com o presente estudo Rosset (2007) detectou valores entre 5,7 e 7,2 mg/100g b.s. em EHS e uma variação de 6,2 a 9,8 mg/100g b.s. em tofus. Ciabotti et al. (2006) relatou uma diminuição no teor de ferro durante o processo de branqueamento seguido da maceração dos grãos de soja para obtenção do EHS e tofu.

O ferro é um micronutriente essencial para a maioria dos organismos, devido a sua habilidade de existir em dois estados de oxidação (Fe^{2+} e Fe^{3+}), podendo catalisar inúmeras reações bioquímicas. Porém, quando presente na forma livre (Fe^{2+}) participa da reação de Fenton, originando espécies reativas de oxigênio, que podem causar danos as proteínas, lipídeos e até mesmo ao DNA (MINIHANE; RIMBACH, 2002). O ferro catalisa a formação de hidroxila ($\bullet\text{OH}$) a partir do ânion superóxido (O_2^-) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo necessário haver pelo menos um sítio de ligação disponível ou ocupado por uma molécula facilmente dissociável, como a água (GRAF et al., 1984).

A forte afinidade entre o ácido fítico e o ferro permite a formação de um quelato, ocupando todos os sítios de ligação do Fe, impedindo a formação de $\bullet\text{OH}$ e diminuindo a velocidade de peroxidação lipídica (GRAF et al., 1984). Poucos quelantes possuem a habilidade de formar quelatos estáveis a ponto de tornar os metais não reativos. O ácido fítico apresenta esta função quando encontrado em razões molares fitato-ferro de 0,25; sendo que acima deste valor a formação de $\bullet\text{OH}$ é totalmente bloqueada (GRAF; EMPSON, 1987). Assim, calculando a razão molar (mg AF:PM AF / mg Fe:PM Fe) foi possível constatar que todos os produtos analisados, incluindo os grãos de soja, apresentaram razões molares superiores a 0,25; indicando que o alto teor de AF em relação a concentração de ferro, permite sua atuação como quelante, impedindo que este metal forme EROS e catalise as reações de peroxidação lipídica.

Apesar do cobre ter menor efeito na oxidação lipídica que o ferro (MIZUSHIMA; TAKAMA; ZAMA, 1997) ele é mais efetivo que o Fe na oxidação do LDL (PIETTA, 2000) e do ácido ascórbico, um antioxidante importante (EMPSON; LABUZA; GRAF, 1991). Empson, Labuza e Graf (1991) demonstraram que o AF foi capaz de inibir apenas parcialmente a oxidação do ácido ascórbico catalisada pelo cobre, enquanto Graf et al.

(1987) comprovaram a total eficiência do AF em bloquear esta oxidação catalisada pelo ferro. Isso pode ser explicado pela maior afinidade do AF com ferro em detrimento do cobre.

Contudo, deve-se lembrar que estes íons metálicos são essenciais para o desempenho de muitas funções fisiológicas, pois são constituintes de hemoproteínas e cofatores de diferentes enzimas, incluindo aquelas envolvidas na defesa antioxidante, tais como o ferro para catalase, cobre para ceruloplasmina e Cu e Zn para a superóxido dismutase (PIETTA, 2000).

A correlação entre o teor do cobre com os ensaios de atividade antioxidante foram significativos ($p < 0,05$), sendo a maior correlação encontrada com o método de redução do ferro (FRAP) $r = 0,64$, seguido dos ensaios de ABTS^{•+} $r = 0,49$; DPPH[•] $r = 0,40$ e PAL $r = 0,35$, indicando que de alguma forma o aumento do teor de cobre proporciona maior AA. Em contraste, o teor de ferro não apresentou correlação com os ensaios de atividade antioxidante, com exceção do ensaio de PAL $r = -0,26$. Esta correlação negativa indica que elevados teores de ferro, catalisam a reação de peroxidação lipídica, formando mais radicais livres, o que dificulta a ação dos compostos antioxidantes.

A atividade antioxidante dos flavonóides parece estar relacionada não só com sequestro de radicais livres, mas também com a capacidade de quelar metais. Assim, íons metálicos, como Fe e Cu que catalisam reações de oxidação, também podem ser quelados por flavonóides e alguns estudos têm demonstrado que os quelatos formados são mais efetivos no sequestro de radicais livres que os flavonóides isolados (KOSTYUK et al., 2004; MALESEV; KUNTIC, 2007; MORIDANI et al., 2003). Segundo Kostyuk et al. (2004), os flavonóides rutina, taxifolina, (-)-epicatequina e luteolina tiveram maior potencial sequestrante quando complexado com os metais Cu^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} . Entre estes complexos, os mais efetivos foram os formados com o cobre. Os mesmos autores demonstraram que os flavonóides complexados sofreram menor oxidação que os flavonóides livres, indicando que a presença do metal forma o centro ativo mais efetivo no sequestro do ânion superóxido. Resultados semelhantes foram encontrados por Moridani et al. (2003), que demonstraram que os complexos do tipo 2:1 flavonóide-metal, formado por Cu^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} , foram mais efetivos do que os respectivos flavonóides (rutina, catequina, taxifolina, luteolina, fisetina, quercetina, caempferol), no sequestro de radicais superóxidos, gerado por um sistema enzimático.

Dessa forma, o conteúdo de flavonóides nos produtos a base de soja, apresentou correlação com os metais cobre ($r = 0,59$ $p < 0,05$) e ferro ($r = 0,47$ $p < 0,05$), indicando que a presença destes minerais, principalmente do cobre, pode ter contribuído com a ação antioxidante dos flavonóides na soja e nos derivados.

5.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de Componentes Principais (ACP) foi utilizada para verificar a relação entre a atividade antioxidante e composição de compostos fenólicos, flavonóides, ácido fítico, cobre e ferro nos diferentes produtos analisados. Os dois primeiros componentes principais explicaram 74,69% da variância total. As figuras 4A e 4B mostram as projeções das análises realizadas e dos produtos estudados, respectivamente, sobre o plano fatorial (CP 1 x CP 2).

O CP 1 mostrou-se correlacionado com o teor de compostos fenólicos, flavonóides, cobre e pelas medidas de AA (ABTS^{•+}, DPPH[•], PAL e FRAP) (Figura 4A). Apesar dos métodos de avaliação da atividade antioxidante apresentarem diferentes mecanismos, todos caracterizaram as amostras de forma semelhante. Já o CP 2 foi caracterizado pelo teor de Fe e AF, não estando correlacionados com a atividade antioxidante.

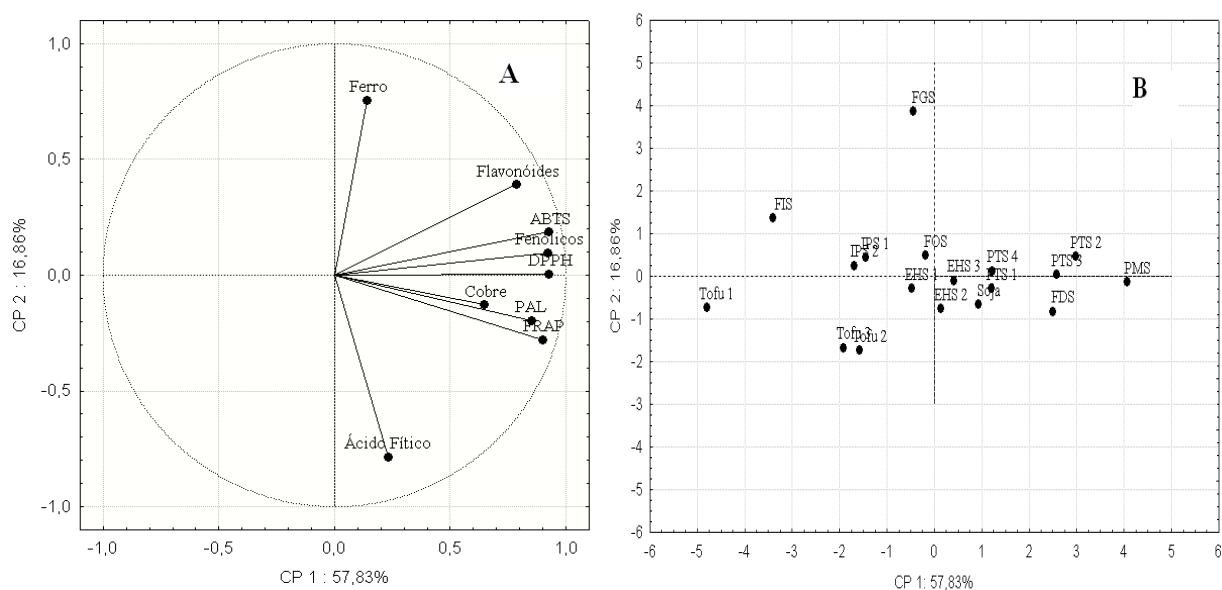


Figura 4 – Análise de componentes principais a partir da composição e da atividade antioxidante: projeção das variáveis (A) e gráfico de amostras (B).

O gráfico das amostras revela que os produtos que apresentaram maior atividade antioxidante encontram-se a direita, os quais também apresentaram maior teor de compostos fenólicos, flavonóides e cobre. Estes alimentos a base de soja são caracterizados pelo alto teor de proteínas, confirmando que os compostos bioativos estão associados ao

conteúdo protéico. Nota-se que os produtos PTS, EHS e as farinhas de soja (orgânica e desengordurada) foram localizadas próximas a variedade de soja estudada (BRS 267), indicando que apesar de haver diferenças na matéria prima, o processamento não provocou alterações bruscas no teor de compostos fenólicos e flavonóides, e a atividade antioxidante foi mantida. O distanciamento da PMS em relação a estes produtos, consequência do maior teor de compostos bioativos e elevada AA, pode ser devido a concentração destes compostos, uma vez que os lipídeos e os carboidratos presente nos grãos, são parcialmente eliminados, como ocorre em outros produtos. Além disso, a facilidade de extração, proporcionada pela fina granulometria da PMS, pode ter contribuído para os maiores valores encontrados, como já citado anteriormente.

No entanto, apesar do alto conteúdo protéico do IPS (90%), as duas marcas analisadas foram alocadas mais à esquerda do gráfico, demonstrando que o modo de obtenção (extração alcalina ou alcoólica) remove os compostos bioativos, consequentemente diminui a capacidade antioxidante.

Os tofus apresentaram-se a esquerda do gráfico, devido ao menor teor de compostos relacionados com a AA. Porém sua localização na parte inferior do gráfico indica maior concentração de ácido fítico, que é um importante quelante de íons metálicos responsáveis por acelerar a peroxidação lipídica, além de oferecer outros benefícios à saúde humana. O produto fibra e gérmen de soja foi alocado mais acima do gráfico, devido a presença de elevada concentração de ferro. A localização da fibra de soja também revela um teor considerável de ferro, e juntamente com o tofu marca 1, é caracterizado como um dos produtos com menor teor de compostos antioxidantes. Portanto, estes alimentos a base de soja não apresentaram teor de compostos fenólicos e flavonóides apreciáveis, nem atividade antioxidante elevadas, porém se destacaram pela presença de outras substâncias importantes para o organismo.

Ainda é importante ressaltar que com exceção do tofu, os produtos analisados serão diluídos no momento do consumo, ou passarão por outros processamentos, pois podem ser utilizados para diversos fins. Isto afetará a concentração final dos compostos bioativos, bem como seu potencial antioxidante. Assim, a soja e seus derivados constituem fontes de antioxidantes, porém a real quantidade destes compostos no momento do consumo e o real aproveitamento pelo organismo ainda não foram estimados.

6 CONCLUSÕES

- Os produtos derivados de soja conservam diversos compostos antioxidantes presente nos grãos;
- As maiores concentrações de compostos fenólicos totais foram encontrados na farinha desengordurada (242,3 mg EAG/100g b.s.), proteínas texturizadas marcas 2 (241,1 mg EAG/100g b.s.) e 3 (243,1 mg EAG/100g b.s.) e proteína micronizada (243,5 mg EAG/100g b.s.), sendo que esta ainda apresentou o maior teor de flavonóides totais (126,6 mg EQ/100g b.s.);
- A PMS demonstrou maior AA pelo método FRAP, não diferindo da PTS 2 ($p < 0,05$) no ensaio DPPH^{*}, e das PTS 2 e 3 ($p < 0,05$) no método ABTS^{*+};
- Em relação ao teste de peroxidação do ácido linoléico, a FDS, a PMS e os grãos de soja apresentaram maior porcentagem de inibição, 85,6; 81,3 e 80,3%, respectivamente;
- Houve uma variação de 0,60 a 2,45 g/100g, em relação ao teor de AF, sendo que a concentração de ferro variou de 6,85 a 26,81 mg/100g b.s. e de cobre 0,77 a 1,94 mg/100g b.s. (IPS marca 1);
- Pela ACP, pôde-se notar que com exceção do IPS os produtos com elevado teor de proteínas foram caracterizados pelo maior teor de compostos fenólicos, flavonóides, cobre e elevada AA, já os produtos contendo fibra de soja se destacaram pelo alto teor de Fe e os tofus pela elevada concentração de AF;
- Portanto, os produtos a base de soja analisados possuem vários compostos, que contribuem de diferentes formas para o desempenho da atividade antioxidante. Porém a real concentração destes compostos e seu potencial no momento do consumo dependerão do modo de preparo destes produtos.

REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. Phyto-estrogens and western diseases. **Annals of Medicine**, v. 29, n. 2, p. 95–102, 1997.

ADOM, K. K.; LIU, R.H. Antioxidant Activity of Grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6182-6187, 2002.

AGUIAR, C. L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 323-334, 2002.

AGUIAR, C. L. **Transformação física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine max L.*)**. 2004. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ALONSO, P.D. et al. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes de los alimentos. **Revista Cubana Alimentación y nutrición**, v.13, n.2, p.104-111, 1999.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **The New England Journal of Medicine**, v. 133, n. 5, 1995.

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

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

ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pacific Journal Clinical Nutrition**, v. 8, n.1, p. 53-63, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC . **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 20. ed. Airlington, 1998.

AWIKA, J. M. et al. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6657-6662, 2003.

BADGER, T. M. et al. The health consequences of early soy consumption. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 559S-565S, 2002.

BARBOSA, A. C. L. et al. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v. 26, n.4, p. 921-926, 2006.

BARBOSA, M. Z.; ASSUMPÇÃO, R de. Ocupação territorial da produção e da agroindústria da soja no Brasil, nas décadas de 80 e 90. **Informações Econômicas**, v.31, n.11, 2001.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 2466-2474, 1994.

BELÉIA A.; IDA, E. I.; LETHI, T. T. Distribuição de fósforo e ácido fítico durante o processamento de extrato hidrossolúvel de soja. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33, n. 3, p. 623-629, 1990.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n.1, 70-76, 1996.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p. 123-130, 1999.

BOATENG, J. et al. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus spp. L.*). **LWT**, v.20, p. 1-8, 2008.

BOLLING, B. W.; BLUMBERG, J.B.; CHEN C.Y.O. Extraction methods determine the antioxidant capacity and induction of quinone reductase by soy products in vitro. **Food Chemistry**, n.116, p. 351-355, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28. p.25-30. 1995.

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

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Modificações químicas, funcionais e nutricionais obtidas por melhoramento genético da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 24., 1996, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, p. 10-11, 1996b.

CARRÃO-PANIZZI, M.C. Melhoramento genético da soja para obtenção de cultivares mais adequados ao consume humano. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 15, n. 2, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M.C. et al. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1787-1795, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDIGNON, J.R. Activity of betaglucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 873–878, 2000.

CHEN, P. S.; TORIBARA, T. Y.; WARNER, H. Microdetermination of Phosphorus. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 1756-1758, 1956.

CIABOTTI, S. et al. Avaliações Químicas e Bioquímicas dos Grãos, Extratos e Tofus de Soja Comum e de Soja Livre de Lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 920-929, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB . 5º Levantamento de Avaliação da safra 2009/2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em: 16 fev 2010.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

COS, P. et al. Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, p.1291–1297, 2003.

COWARD, L. et al. Genistein, daidzein, and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1961-1967, 1993.

COWARD, L et al. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1486S- 1491S, 1998.

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

EMPSON, K. L.; LABUZA, P. L.; GRAF, E. Phytic acid as a food antioxidant. **Journal of Food Science**, v.56, n. 2, p.560-563, 1991.

FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits. **Food Reviews International**, v. 20, n. 1, p. 51-75, 2004.

FILGUEIRAS, C. T. et al. Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1787-1791, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. Food labeling: general requirements for health claims for food. **Federal Registry**, v. 56, p. 60537-66, 1991.

FRANKEL, E. N. Recent advances in lipid oxidation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.54, p. 495-511, 1991.

FREITAS, S. M. de; BARBOSA, M. Z.; FRANCA, T. J. F. Cadeia de produção de soja no Brasil: o caso do óleo. **Informações Econômicas**, v.30, n. 12, p.30-40, 2000.

FRITZ, K. L. et al. The *in vivo* antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. **Nutrition Research**, v. 23, n. 4, p. 479-487, 2003.

GENOVESE, M. I.; HASSIMOTTO, N.M.A. LAJOLO, F. M. Isoflavone profile and antioxidant activity of brazilian soybean varieties. **Food Science and Technology**, v.11, n.3, p. 205–211. 2005.

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

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5987-5993, 2002.

GÓES – FAVONI, S.P. de. **Proteína texturizada de soja com maior teor de isoflavonas agliconas obtida de cotilédones de soja termo-hidratados**. 2007. Tese (Doutorado)– Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

GÓES-FAVONI, S. P. et al. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 582-586, 2004.

GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 61-69, 1990.

GRAF, E.; EMPSON, K. L. Phytic acid: a natural antioxidant. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 24, p. 11647-11650, 1987.

GRAF, E. et al. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 6, p. 3620-3624, 1984.

HALLIWELL, B. et al. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HARBACH, A.P.R. et al. Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1630-1633, 2007.

HELFERICH, B. Dietary estrogens: A balance of risk and benefits. **International Food Technology**, v. 50, n. 9, p. 158, 1996.

HO, H. M. et al. Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 289-295, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p.1841-1856, 2005.

HUANG, T. C.; FU, H. Y.; HO, C. T. Comparative studies on some quality attributes of firm tofu sterilized with traditional and autoclaving methods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, 254-259, 2003.

HUNG, P. V. et al. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. **Food Research International**, v. 42, p. 185-190, 2009.

JACOB, R.A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v.15, n.5, p.755-766, 1995.

JENAB, M.; THOMPSON, L. U. Role of Phytic Acid in Cancer and Other Diseases. In: REDDY, N. R.; SATHE, S. K. (Ed.). **Food Phytates**. Florida: CRC Press, 2002.

JIMENEZ A. et al. Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols. **Organic Letter: American Chemical Society**, v. 6, p. 4583-4586. 2004.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables: the millenniums health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 703-725, 2001.

KAWAKAMI, Y. et al. Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 205-212, 2005.

KIM, E. H. et al. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different Conditions. **European Food Research Technology**, v. 222, p. 201–208, 2006.

KOSTYUK, V.A. et al. Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase. **Biochemistry and Biophysics**, v. 428, p. 204–208, 2004.

KUSKOSKI, E.M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LEE, S. J. et al. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3382-3389, 2003.

LESTIENNE, I. et al. Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc, and phytate contents. **Food Chemistry**, v. 89, p. 421-425, 2005.

LINGNERT, H.; VALENTIN, K.; ERICKSON, C.E. Measurement of antioxidative effect in model system. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 3, p. 87-104, 1979.

LIU, J.; CHANG, S.K. C.; WIESENBORN D. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2333-2340, 2005.

LIU, K. Current constraints in soybean food utilization and efforts to overcome them. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 6., 1999, Chicago.. **Proceedings...**Chicago, p. 409-418, 1999.

LIU, K. S. **Soybeans: chemistry, technology and utilization.** New York: IPT, 2007. p. 83-93.

LIU, Z.; CHENG, F.; ZHANG, G. Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar and environment and its relation to protein content. **Food Chemistry**, v. 89, p.49–52, 2005.

LUI, M.C.Y. et al. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v. 23, supl., p. 206-212, 2003.

MA, G. et al. Phytate, Calcium, Iron and Zinc Contents and Their Molar Ratios in Foods Commonly Consumed in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 10285-10290, 2005.

MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food Antioxidants: technological, toxicological and health perspectives.** New York: Marcel Dekker, 1995.

MAHFUZ, A. A.; TSUKAMOTO, C.; ONO, T. The Decrease Mechanism of Undesirable Astringent Taste in Soymilk during Tofu Curd Formation. In: INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4., 2004, Foz do Iguaçu.. **Proceedings...** Foz do Iguaçu, 2004. p. 1039-1046.

MALENCIC, D. et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6688–6691, 2008.

MALEŠEV, D.; KUNTIC, V. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids *via* metal–flavonoid complexing reactions. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.72, n.10, p. 921–939, 2007.

MASSEY, L. K. et al. Oxalate and phytate of soy foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5670-5674, 2005.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutrition profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70S, p. 439-450, 1999.

MINIHANE, A. M.; RIMBACH, G. Iron absorption and the iron binding and anti-oxidant properties of phytic acid. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 741-748, 2002.

MIZUSHIMA, Y.; TAKAMA, K.; ZAMA, K. Effect of copper, iron and hemin on lipid oxidation in fish flesh homogenate. **Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University**, v. 28, n. 4, p. 207-211, 1977.

MONJE, M.C. et al. Antioxidant capacity of cotyledons and germs of soybean in relation to their isoflavone content. **Food Technology Biotechnology**, 44, n. 4, p. 493–498, 2006.

MORAES, R. M. A. et al. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 725-729, 2006.

MORAES, C.S. et al. **Isoflavonas de soja e suas atividades biológicas**. São Paulo: Livraria Varela, p. 31-28, 2009.

MORAIS, A. A. C. Uso da soja em medicina. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 1., 2001, Londrina. **Anais ...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 15-18.

MORAIS, A.A.C.; SILVA, A.L. **Soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1996. 259 p.

MOREIRA, M. A. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: CONGRESSO brasileiro de soja. Londrina, p. 99-104, 1999.

MORIDANI, M. Y. et al. Dietary flavonoid iron complexes as citoprotective superoxide radical scavengers. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 2, p. 243–253, 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v.95, p.1054, 2004.

NAIM, M. et al. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, p. 1174–1177, 1976.

OUFNAC, D. S. **Determination of antioxidant capacity in corn germ, wheat germ and wheat bran using solvent and microwave-assisted solvent extraction**. 2006. Thesis (Master's of Science) - Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, 2006.

PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. **Antioxidant food supplements in human health**. Orlando: Academic Press, 1999. p. 183-269

PARK, Y.K. et al. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, n. 3, p. 156–160, 2001a.

PARK, Y.K. et al. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal beta-glicosidase. **Food Science and Industry**, v.34, n.4, p. 14-19, 2001b.

PERSSON, H. et al. Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} to Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 46, p. 3194. 1998

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63. p. 1035-102, 2000.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybean and soy products. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 6, p. 1720-1722, 1979.

PRIOR R.L.; WU X.; SCHAICH K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.48, p. 3396- 3402, 2000.

RIBEIRO, M.L.L. et al. Isoflavone content and b-glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 19–24, 2007.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92, p.235- 254, 2005.

ROSSET, M. **Distribuição de Ácido Fítico e Minerais durante o Processamento de Extrato Hidrossolúvel de Soja e Tofu**. 2007. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

SAKTHIVELU, G. et al. Isoflavone Composition, Phenol Content, and Antioxidant Activity of Soybean Seeds from India and Bulgaria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.2090–2095, 2008.

SANDBERG, A. S. *In vitro* and *In vivo* Degradation of Phytate. In: REDDY, N. R.; SATHE, S. K. (Ed.) **Food Phytates**, Florida: CRC Press, 2002. p. 139-155.

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

SETCHELL, K. D. R. Absorption and metabolism of soy isoflavones: from food to dietary supplements and adults to infants. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 654S-655S, 2000.

SIDDHURAJU, P. The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts. **Food Chemistry**, v. 99, n.1, p.149-157, 2006.

SINGLETARY, K. et al. Effect of extrusion on isoflavone content and antiproliferative bioactivity of soy/corn mixtures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3566-3571, 2000.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

SOY FOODS ASSOCIATION OF NORTH AMERICA - SANA. **Soyfood Sales and Trends**. Disponível em: <<http://www.soyfoods.org/products/sales-and-trends>>. Acesso em: 08 fev. 2010.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* - the quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.669-675, 2006.

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

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M.J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. UNIVAP, 2007.

TSAO, G. T.; ZHENG, Y.; LU, J. Adsorption of heavy metal ions by immobilized phytic acid appl. **Biochemistry and Biotechnology**, v. 63, p. 731-741, 1997.

TSUKAMOTO, C. et al. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1184-1192, 1995.

WANG, H-J.; MURPHY, P.A. Isoflavone Composition of american and japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n.8, p. 1674-1677, 1994b.

WANG, H-J.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1666-1673, 1994a.

WANG, H-J.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2377- 2383, 1996.

XU, B.; CHANG, S.K.C. A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 159 - 166, 2007.

XU, B.; CHANG, S.K.C. Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 1-13, 2008.

YANG, J. H. et al. Antioxidant properties of fermented soybean broth. **Food Chemistry**, v. 71, p. 249-254, 2000.

YEN, G. C.; LAI, H. H. Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 7892-7900, 2003.

ZHOU, J. R.; ERDMAN, J. W. jr. Phytic acid in health and disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 495-508, 1995.