



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CRISTIANE CANAN

**QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE SOJA EM FRANGOS
MARINADOS ATRAVÉS DOS MÉTODOS INDIRETOS DO ÁCIDO FÍTICO
E ELISA**

LONDRINA
2004

CRISTIANE CANAN

**QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE SOJA EM FRANGOS
MARINADOS ATRAVÉS DOS MÉTODOS INDIRETOS DO ÁCIDO FÍTICO
E ELISA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elza louko Ida

LONDRINA
2004

CRISTIANE CANAN

**QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE SOJA EM FRANGOS
MARINADOS ATRAVÉS DOS MÉTODOS INDIRETOS DO ÁCIDO FÍTICO
E ELISA**

COMISSÃO EXAMINADORA

Londrina, 12 de março de 2004.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais que se estivessem
comigo, com certeza estariam felizes.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Elza Louko Ida pela valiosa orientação na elaboração deste trabalho, paciência, amizade e exemplo de profissionalismo.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Ministério da Educação - CAPES/MEC, pela bolsa de estudos concedida e auxílio financeiro deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Massami Shimokomaki pela inestimável colaboração e sugestões no desenvolvimento deste trabalho, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Mário Augusto Ono pela contribuição no desenvolvimento das análises imunológicas.

Ao Prof. Dr. Fábio Yamashita pelas consultas estatísticas.

A Prof^a. Dra. Adriana Lourenço Soares pela contribuição no desenvolvimento de parte deste trabalho.

A todos os docentes do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos desta Instituição pelos ensinamentos e pela atenção dispensada.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos desta Instituição pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

À Rosicler Balduino Nogueira e Volnei José Tondo Filho pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos desta Instituição pela atenção e disposição em ajudar sempre.

Ao Donizeti R. Belitardo pela ajuda nas coletas de sangue.

A bolsista de iniciação científica Karina Garcia Cotrin pela ajuda prestada durante os trabalhos práticos.

Ao Dr. Rubinson Olivo da empresa Globalfood Sistemas Ingredientes e Tecnologia para Alimentos pela doação dos ingredientes protéicos de soja.

À amiga Adriana Aparecida Droval pela companhia, amizade e apoio no decorrer do curso.

Aos meus amigos que me ajudaram com os coelhos e que sem eles não teria conseguido realizar parte do meu trabalho, Regiane Barbieri Mazzoni, Simone Fuji, Valéria Garcia Pereira, Sandriel Trindade Alves, Caroline Maria Calliari e Vanessa Dias Alves.

Aos demais colegas do Departamento de Tecnologia de Alimentos, que sempre colaboram para que as condições de trabalho fossem as melhores possíveis.

A Deus, sem ele eu não estaria aqui.

CANAN, Cristiane. **Quantificação de proteína de soja em frangos marinados através dos métodos indiretos do ácido fítico e ELISA**. 2004. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

Na indústria de produtos cárneos, os derivados protéicos de soja são amplamente utilizados por suas propriedades emulsificantes, estabilizantes e capacidade de aumentar a retenção de água com a subsequente melhora da textura do produto final. A adição de ingredientes protéicos em frangos inteiros congelados ou resfriados não é permitida e em marinados sua utilização como ingrediente é permitida legalmente. A inexistência de uma metodologia acessível que quantifique e controle o emprego destes ingredientes em carnes e derivados permite que ocorram abusos na sua utilização. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver e validar um método indireto através da quantificação do teor do ácido fítico presente na proteína de soja adicionada em frangos marinados e padronizar um método de ELISA indireto, a partir da produção de anticorpos policlonais anti-proteínas de soja para estimar o teor de proteínas de soja em frangos marinados e frangos inteiros resfriados ou congelados. A quantificação de proteínas de soja pelos métodos indiretos do ácido fítico e ELISA estimou o teor de proteínas de soja de seis frangos marinados de diferentes procedências, cujos valores foram respectivamente entre 0 e $9,87 \pm 0,32$ g de proteínas de soja em 100 g de frango marinado e 0 e $7,24 \pm 0,94$ g de proteínas de soja em 100 g de frango marinado em base seca. Foram analisados dez frangos inteiros congelados de diferentes marcas e somente em uma amostra foi quantificada proteína de soja de $3,22 \pm 0,06$ pelo método indireto do AF e de $2,08 \pm 0,45$ g de proteínas de soja em 100 g de frango pelo método ELISA indireto. Ambos métodos apresentaram uma alta correlação de 97%. O método indireto do ácido fítico para quantificação de proteínas de soja em produtos de frango foi mais vantajoso do que o método de ELISA devido a simplicidade, maior precisão e menor custo. Os dois métodos são válidos para estimar e detectar proteínas de soja e podem ser recomendados como métodos para detecção de fraudes em frangos marinados, frangos inteiros congelados ou resfriados.

Palavras-chave: quantificação de proteínas de soja, ácido fítico, ELISA, carne de frango, frangos marinados.

CANAN, Cristiane. **Soybean quantification in marinade chicken through indirect methods by phytic acid and ELISA**. 2004. 78p. Dissertation (Master Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

Soybean derived proteins in meat companies are largely used due to its emulsifier, stabilizer and also water holding capacity properties giving as consequence the texture improvement to the final product. On the other hand, addition of protein ingredients are not allowed to be used in the chicken carcass either refrigerated nor frozen. Conversely, they are legally permitted to be applied in chicken meat marinade products. The absence of a reliable technique in order to quantify and to control their use in meat and meat products indicates the possibility of having abuse in their application. Therefore the objectives of this work were to develop and to validate an indirect method through phytic acid quantitatively determination present in protein soybean preparation added in marinade chicken and refrigerated and frozen chicken carcasses. Also to standardize an indirect method of ELISA immunoassay by polyclonal antibodies anti soybean proteins in order to quantify soy proteins also in both samples. Six chicken marinade samples from different origins were analyzed for soybean protein by the two methods and phytic acid indirect method detected values between 0.0 to 9.87 ± 0.32 g/100 g of samples and indirect method of ELISA between 0.0 to 7.24 ± 0.94 g/100 g of sample both in dry weight basis. On the other hand, 10 frozen chicken carcasses from different origin were also analyzed for soybean protein by the two methods. Both Indirect methods only detected in one sample and phytic acid method detected the value of 3.22 ± 0.06 while ELISA method the value of 2.08 ± 0.45 g/100 of sample. Although these two methods presented a high correlation of 97.0%, our results indicated that the phytic acid indirect method has some advantages in relation to ELISA technique because it is simpler, more precise and lower cost. Finally, both methods are reliable to evaluate the quantity of soybean protein and they should be recommended in order to detect possible fraud in both chicken marinade and chicken frozen or fresh carcasses by food inspectors.

Keywords: soybean protein quantification, phytic acid, ELISA, refrigerated and frozen chicken carcass, marinade meat chicken

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura do ácido fítico em solução.....	26
FIGURA 2 - Estrutura básica da IgG1	31
FIGURA 3 - Desenvolvimento do método de ELISA indireto.....	34
FIGURA 4 - Método de ELISA indireto.....	34
FIGURA 5 - Esquema para desenvolvimento dos métodos indiretos do AF e ELISA para quantificação do teor de proteínas de soja em frangos marinados.....	40
FIGURA 6 - Esquema de imunização de coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia (n=3) com IPS para obtenção de anticorpos policlonais anti-proteína da soja.....	50
FIGURA 7 - Porcentagem de CPS adicionado (n=45) em peito de frango em Relação ao teor de AF estimado no peito de frango marinado.....	64
FIGURA 8 - Porcentagem de PIS adicionado (n=45) em peito de frango em relação ao teor de AF estimado no peito de frango marinado	65
FIGURA 9 - Correlação entre a porcentagem de CPS adicionado em peito de frango e teor de AF estimado no peito de frango marinado (n=45) ...	70
FIGURA 10 - Correlação entre a porcentagem de PIS adicionada em peito de frango e teor de AF estimado no peito de frango marinado (n=45) ..	70
FIGURA 11 - Resposta imune humoral (IgG) de coelhos imunizados com proteína de soja avaliado por ELISA indireto.....	74
FIGURA 12 - Curva padrão com peito de frango marinado contendo IPS pelo método de ELISA indireto.....	76
FIGURA 13 - Reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja (1:100) com 50 ng de CPS ou IPS	78
FIGURA 14 - Reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja (1:100) com marinados de frango sem e com aquecimento a 100°C durante 30 min. contendo 1% de IPS	79
FIGURA 15 - Correlação entre o teor estimado de proteína de soja em peito de frango marinado e frango inteiro congelado pelos métodos indiretos do AF e Elisa	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Teor de ácido fítico na soja e seus produtos derivados.....	24
TABELA 2 - Caracterização do peito de frango utilizado no preparo de amostras para desenvolvimento dos métodos indiretos do AF e ELISA.....	58
TABELA 3 - Caracterização do CPS e PIS utilizados na marinação de peitos de frango	59
TABELA 4 - Umidade e pH de frangos marinados de diferentes marcas comerciais	61
TABELA 5 - Umidade e pH de frangos inteiros congelados de diferentes marcas comerciais	61
TABELA 6 - Validação do método indireto do AF para estimativa do teor de proteínas de soja em produtos marinados com CPS (n=45).	63
TABELA 7 - Validação do método indireto do AF para estimativa do teor de proteínas de soja em produtos marinados com PIS (n=45).....	64
TABELA 8 - Estimativa do teor de proteína de soja em frango marinado pelo método indireto do AF	72
TABELA 9 - Estimativa do teor de proteína de soja em frango inteiro congelado pelo método de indireto do AF.....	72
TABELA 10 - Quantificação do teor de proteína de soja em frango marinado pelo método de ELISA indireto	80
TABELA 11 - Quantificação de proteína de soja em frangos inteiros congelados pelo método de ELISA indireto.....	80
TABELA 12 - Comparação entre os métodos indiretos do AF e ELISA para quantificar proteínas de soja em frangos marinados e frangos inteiros	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a - Inclinação da reta

Ac – Anticorpo

AF - Ácido Fítico

Ag - Antígeno

CPS Concentrado protéico de soja

CRA - Capacidade de retenção de água

CV% - Coeficiente de variação

DO - Densidade óptica

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay (Teste imunossorvente ligado à enzima)

IgG - Imunoglobulina G

M - Molar

mL - Mililitros

ng - Nanograma

nm Nanômetro

IPS - Isolado protéico de soja

PTS - Proteína texturizada de soja

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

TCB - Tampão carbonato-bicarbonato

TCBT - Tampão carbonato-bicarbonato com 0,05% de Tween 20

TFST - Tampão fosfato de sódio com 0,05% de Tween 20

μg - Micrograma

s - Desvio padrão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 A SOJA	19
3.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA DE SOJA EM ALIMENTOS PROCESSADOS	21
3.3 ÁCIDO FÍTICO	23
3.4 ANÁLISE IMUNOLÓGICA	27
3.4.1 Antígeno e imunógeno	28
3.4.2 Anticorpos	30
3.4.3 Adjuvantes imunológicos	32
3.4.4 Ensaios imunológicos	32
3.4.5 Quantificação de proteína de soja em produtos cárneos pelo método de ELISA indireto	35
3.5 PRODUTOS MARINADOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 MATERIAIS E REAGENTES	39
4.1.1 Materiais	39
4.1.2 Reagentes	39
4.2 METODOLOGIAS	39
4.2.1 Caracterização do peito de frango, concentrado protéico e proteína isolada de soja, marinados de frango e frangos inteiros congelados	41
4.2.2 Tumbleamento dos peitos de frango marinados	41
4.2.3 Extração e determinação do AF do CPS e PIS	42

4.2.4 Extração e determinação de AF em peito de frango marinado	43
4.2.5 Validação do método indireto do AF para estimativa do teor de proteína de soja em produtos marinados	43
4.2.5.1 Exatidão	44
4.2.5.2 Precisão	44
4.2.5.3 Especificidade	45
4.2.5.4 Linearidade.....	46
4.2.5.5 Limite de detecção e quantificação	46
4.2.6 Fator de correlação	47
4.2.7 Estimativa do teor de proteína de soja em marinados e frangos inteiros congelados pelo método indireto do AF	48
4.2.8 Determinação de proteínas de soja pelo método de ELISA indireto	49
4.2.8.1 Produção de anticorpos policlonais anti-proteína de soja	50
4.2.8.2 Avaliação do soro anti-proteína de soja	51
4.2.8.3 Título do soro anti-proteína de soja.....	51
4.2.8.4 Preparo da amostra para o ensaio imunológico	52
4.2.8.5 Método de ELISA indireto.....	53
4.2.8.6 Reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja com CPS e IPS	54
4.2.8.7 Reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína de soja com marinados	54
4.2.8.8 Comparação do teor estimado de proteína de soja pelos métodos indiretos do AF e ELISA	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PEITO DE FRANGO, CONCENTRADO PROTÉICO,PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA, MARINADOS DE FRANGO E FRANGOS INTEIROS CONGELADOS ...	56
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDIRETO DO AF PARA ESTIMATIVA DO TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA EM PRODUTOS MARINADOS.....	61
5.2.1 Exatidão e precisão	61
5.2.2 Especificidade	63

5.2.3 Linearidade.....	63
5.2.4 Limite de detecção e quantificação	66
5.2.5 Fator de correlação	67
5.3 ESTIMATIVA DO TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA EM MARINADOS E FRANGOS	
INTEIROS CONGELADOS PELO MÉTODO INDIRETO DO AF	70
5.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNA DE SOJA.....	72
5.5 DILUIÇÃO IDEAL DO SORO ANTI-PROTEÍNA DE SOJA	73
5.6 PREPARO DE AMOSTRA PARA APLICAÇÃO DO MÉTODO DE ELISA INDIRETO	74
5.7 REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNA DA SOJA COM CPS E IPS	76
5.8 REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNA DA SOJA COM MARINADOS	77
5.9 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA PELO MÉTODO DE ELISA INDIRETO	78
5.10 COMPARAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA PELOS MÉTODOS INDIRETOS DO AF E ELISA	80
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS	92
ANEXO 1 - CARACTERIZAÇÃO DO CPS E PIS UTILIZADOS PARA ELABORAÇÃO DE PEITOS DE FRANGO MARINADO	93
ANEXO 2 - CORRELAÇÃO ENTRE O TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA E AF EM PEITO DE FRANGO MARINADO	94
ANEXO 3 - LINEARIDADE DO MÉTODO INDIRETO DO AF PARA O CPS E PIS.....	94
ANEXO 4 - CURVA PADRÃO UTILIZANDO PEITO DE FRANGO MARINADO COM PIS PELO MÉTODO DE ELISA	95

ANEXO 5 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNA DA SOJA COM CPS E IPS	95
ANEXO 6 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNA DE SOJA COM MARINADOS.....	95
ANEXO 7 - COMPARAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA PELOS MÉTODOS INDIRETOS DO AF E ELISA.....	96
ANEXO 8 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS INDIRETOS DO AF E ELISA PARA QUANTIFICAR PROTEÍNAS DE SOJA EM FRANGOS MARINADOS E FRANGOS INTEIROS.....	97

1 INTRODUÇÃO

As carnes de aves vem assumindo um papel cada vez mais importante na alimentação humana, principalmente por ser um alimento saudável e de custo acessível (SPOTO *et al.*, 1999). O consumo *per capita* era de 15,7 kg/habitante em 1992 e aumentou para 33,8 kg/habitante em 2002. O setor produtivo das carnes de frango gerou 7.449.000 toneladas do produto em 2002, consolidando o Brasil como o segundo maior produtor mundial (AVISITE, 2003) e finalizou 2003 como o maior exportador mundial de carne de frango, próximos a US\$ 2 bilhões, correspondendo a aproximadamente 23% da produção mundial (ABEF, 2004).

Um dos maiores desafios para a indústria de carnes é oferecer produtos com características de maciez, suculência, sabor, cor agradáveis e estáveis durante o seu período de armazenamento e/ou exposição à venda com maior segurança e menor custo possível (DIRINCK *et al.*, 1996). Preocupadas com isso, as indústrias estão investindo cada vez mais em tecnologias e uma delas é a marinação, cujo objetivo é conferir maciez e suculência à carne e produtos cárneos, aumentando o seu consumo e lucros para as indústria (LEMOS *et al.*, 1999).

O alto custo da proteína animal e o elevado valor nutritivo das proteínas vegetais tornaram atrativa a produção de alimentos a base de proteínas de soja. Na indústria cárnea os derivados de soja são amplamente utilizados pelas suas propriedades emulsificantes, estabilizantes, capacidade de retenção de água e melhoraria da textura do produto final (MACEDO-SILVA *et al.*, 2001). São os ingredientes mais utilizados em produtos marinados desde os anos 70, tanto pelo aspecto econômico como pelas suas propriedades funcionais (FERREIRA, 1998).

Apresentam-se principalmente na forma de farinhas, concentrados ou isolados protéicos que contêm quantidades variáveis de proteínas dependendo do processo de obtenção (LIU, 1996).

A utilização de proteínas de soja isolada, concentrada, misturas de proteínas ou outras formas de ingredientes isolados ou em misturas tem sua adição proibida em carcaças e cortes de animais de açougue, comercializados na forma "in natura" proibida pela Portaria nº 15, de 26 abril de 2000 (BRASIL, 2000a).

A Portaria SDA nº 210, de 10 de novembro de 1998, estabelece o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carne de Aves (BRASIL, 1998) e determina o limite máximo de 8% de absorção de água pelo método de controle interno, após a passagem das carcaças de aves pelo pré-resfriamento (chiller), sendo considerado fraude o desvio que ultrapasse esse limite. As proteínas de soja assim como outros ingredientes têm sido aplicados para reter água em produtos marinados e não está descartada a possibilidade de seu uso em carcaças de frango e também em carnes de açougue.

Com base nesta preocupação, este trabalho visa desenvolver uma metodologia analítica indireta para detectar e estimar o teor de proteínas de soja em frango marinado a partir do ácido fítico que está presente somente nas proteínas de origem vegetal, neste caso, principalmente nos derivados protéicos da soja que comumente são utilizados em carnes marinadas e será padronizado um método de ELISA indireto, com anticorpos policlonais anti-proteína da soja. A técnica de ELISA é comumente utilizada pela indústria alimentícia e descrita pela AOAC (1995), com limitações quanto a sua aplicação. O desenvolvimento de metodologias para quantificação de proteína de soja em carnes contribuirá para o controle da adição deste ingrediente eliminando a fraude tanto na carcaça como nos produtos derivados de frango e outros produtos cárneos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e validar método indireto para estimar proteínas de soja de frangos marinados através da quantificação do teor de ácido fítico presente em proteínas de soja.
- Padronizar um método de ELISA indireto para quantificar proteínas de soja em frangos marinados.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar o teor do ácido fítico de concentrados, isolados protéicos de soja e peitos de frango marinados.
- Correlacionar o teor do ácido fítico com o teor de proteínas de soja adicionados em peitos de frango marinados.
- Produzir anticorpos policlonais anti-proteína da soja a partir do isolado protéico de soja.
- Avaliar a reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja com o concentrado e isolado protéico de soja.

- Padronizar o método de ELISA indireto para detectar e quantificar proteínas de soja em peitos de frango marinados.
- Comparar os métodos indiretos do AF e ELISA para quantificar o teor de proteína de soja em frangos marinados e frangos inteiros.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A SOJA

A soja tem um papel muito importante na agricultura, estima-se que a produção global seja de 137 milhões de toneladas (LIU, 1996), sendo os Estados Unidos os maiores produtores na safra de 2001, com produção de 75,38 milhões de toneladas, seguidos do Brasil com 35,5 milhões, Argentina com 26 milhões e China com 15,7 milhões (EMBRAPA, 2002). A produção nacional de 2003 registrou um significativo aumento de 17%, passando de 42 milhões de toneladas no ano de 2002 para 49 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2003).

A origem da soja foi descrita há cerca de 4000 – 5000 anos, proveniente das regiões norte e central da China e introduzida nos Estados Unidos em meados do século XVIII, sendo a produção oficial em larga escala ocorrida após o século XX (LIU, 1996).

A soja contém cerca de 35% de proteínas, 31% de carboidratos, 17% de óleo, 13% de água e 4% de cinzas. Sendo as proteínas juntamente com os lipídios os componentes de maior interesse comercial (NORMAN, 1978).

A maioria das proteínas da soja é obtida por descascamento, obtenção de tortas e desengorduramento por meio de extração com hexano, seguido de moagem para obtenção de farinhas desengorduradas ou farinhas com aproximadamente 50 a 54% de proteína. Para produção de concentrados protéicos com 65 a 70% de proteína, os açúcares e compostos responsáveis pelo sabor são eliminados através da extração com etanol ou ácido, ou ainda, a farinha de soja pode ser submetida à extração com

álcali, centrifugação para remoção das fibras, reprecipitação e secagem para obtenção de isolados protéicos contendo 90% de proteína (LUSAS e RIAZ, 1995).

As principais frações protéicas da soja são a 2, 7, 11 e 15S conforme o coeficiente de sedimentação. A fração 2S predomina durante o desenvolvimento da semente, a 7S representa um pouco mais de um terço das proteínas solúveis, a 11S corresponde a um terço do total de proteínas, enquanto que a fração 15S, representa somente um décimo do total protéico e pode ser polímero de outras proteínas (NORMAN, 1978).

O consumo de produtos protéicos da soja ocorre principalmente na forma de derivados ou ingredientes que são utilizados na fabricação de diversos produtos alimentícios, como em laticínios, produtos cárneos, produtos de panificação, cereais matinais, alimentos infantis e bebidas, sendo somente uma pequena quantidade consumida diretamente na dieta humana (LIU, 1996).

Alguns constituintes tradicionalmente considerados como antinutrientes, são encontrados na soja, tais como, inibidor de tripsina, ácido fítico, saponinas e isoflavonas. Estes, atualmente têm sido considerados como benéficos para a saúde humana, por reduzirem o colesterol sangüíneo, prevenirem cálculo renal, problemas cardíacos, câncer, entre outras doenças. Dentre estes constituintes, o ácido fítico tem recebido grande atenção devido a sua capacidade de quelar os minerais; como, Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} diminuindo a absorção destes micronutrientes (ANDERSON e WOLF, 1995) e por apresentar grande potencial antioxidante em produtos alimentícios (GRAF e EATON, 1990; LEE e HENDRICKS, 1995; PETERSON, 2000; BARRETO *et al.*, 2003).

Com o aumento populacional, a demanda por alimentos protéicos aumentou consideravelmente, levando a um grande incentivo do uso de proteínas

vegetais juntamente ao uso de tecnologias que tem possibilitado desenvolver formulações alimentares com custo reduzido e excelente qualidade nutricional. A preocupação com dietas saudáveis e os elevados preços da carne também têm motivado as grandes indústrias a investirem no aumento da produção de hambúrgueres de soja e outros produtos cárneos enriquecidos com proteínas vegetais que atualmente podem ser encontrados no mercado (LIU, 1996).

No Brasil, os derivados de soja têm seu padrão de identidade e qualidade estabelecido pela Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978 e seus limites de quantidade permitida para uso em produtos cárneos conforme os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade, publicados no Diário Oficial da União em 05/04/2000 (BRASIL, 2000) e 03/08/2000 (BRASIL, 2000b). Estes ingredientes protéicos de soja são amplamente utilizados como agentes extensores e por interagirem com água e gorduras. Os concentrados e isolados protéicos de soja também possuem importante propriedade geleificante para fornecer uma textura homogênea, emulsão estável e boa aparência dos produtos cárneos (PEARSON e GILLET, 1996).

3.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA DE SOJA EM ALIMENTOS PROCESSADOS

Alguns métodos têm sido propostos para quantificar e controlar o teor de proteínas vegetais em produtos cárneos. Lee *et al.* (1975) relataram um método quantitativo para determinação de proteína de soja em produtos cárneos frescos e cozidos pelo emprego de eletroforese em gel de acrilamida com dodecilsulfato de sódio

(SDS). Farinhas, concentrados ou isolados protéicos de soja adicionados em produtos cárneos foram detectados e quantificados pelo uso deste método. O método apresentou duas vantagens: facilidade da extração de proteína com incorporação de SDS na solução tampão e separação das proteínas com base no peso molecular. Porém, demonstrou ser ineficaz para amostras que contêm alta concentração de hemicelulose proveniente de isolado protéico de soja.

Outra alternativa para quantificar proteínas vegetais em produtos cárneos foi o uso do ácido fítico proposto por Kloczko e Rutkowski (1979), o qual está ligado às proteínas vegetais. O ácido fítico presente nas proteínas da soja não é separado durante o processamento de produtos cárneos. Neste método a amostra foi lavada com ácido tri-cloro-acético, posterior precipitação com cloreto férrico e lavagem com ácido clorídrico, em seguida, o precipitado foi lavado com ácido sulfúrico e submetido a oxidação por meio de peróxido de hidrogênio e leitura em espectrofotômetro para quantificação do ácido fosfórico. Os resultados demonstraram diferenças significativas no conteúdo de proteínas e fitatos provenientes de concentrados ou isolados protéicos de soja. Entretanto, estas diferenças foram menos relevantes quando se tratava do mesmo ingrediente. Em concentrados protéicos o teor de proteínas foi menor e a concentração de fitatos também foi menor, porém esta diferença não foi significativa quando relacionado com o teor de fósforo e proteína destes ingredientes, sendo que a relação fósforo-proteína variou de 6,1 a 6,5 para todas as amostras analisadas. O teor de ácido fítico em concentrados ou isolados protéicos depende do processo de produção destes ingredientes e é proporcional à concentração de proteínas, porém, esta metodologia analítica não foi viável para determinar o teor de proteína de soja em

produtos cárneos, devido a diferentes concentrações de ácido fítico proveniente de diferentes derivados protéicos de soja com teor de proteína variável.

A análise imunológica também tem sido utilizada para detecção e quantificação de proteínas vegetais em produtos cárneos. Baseia-se na produção de anticorpos e posterior interação antígeno-anticorpo (MACEDO-SILVA *et al.*, 2001), sem que ocorra reação cruzada com outras proteínas presentes no alimento (RAVESTEIN e DRIEDONKS, 1986). Devido à alta especificidade do anticorpo produzido, sensibilidade desta reação e facilidade de aplicação, o imunoensaio tem sido aplicado na área de alimentos (RITTENBURG *et al.*, 1987; MEDINA, 1988; MACEDO-SILVA *et al.*, 2001) e reconhecido como método oficial pela AOAC (1995). Entretanto, devido a padronização da técnica, obtenção de anticorpos e o seu elevado custo tem limitado a sua aplicação.

3.3 ÁCIDO FÍTICO

O ácido fítico (AF) comumente denominado ácido hexafosfórico mio-inositol ou 1,2,3,4,5,6 hexafosfato de hidrogênio mio-inositol (IUPAC – IUB, 1968) é um constituinte natural de vegetais, cujo teor é de 10 – 30 g/kg de peso seco de cereais, leguminosas e oleoginosas (BURBANO *et al.*, 1995). O fósforo do AF representa de 50 a 90% do fósforo total do grão (TALAMOND *et al.*, 1998) e seu conteúdo na soja e seus produtos (TABELA 1) podem diferir dependendo da variedade da soja e seus produtos derivados (ANDERSON e WOLF, 1995).

TABELA 1 - Teor de ácido fítico na soja e seus produtos derivados *

Produtos	Ácido fítico g em 100g de massa seca	Referências
Soja ¹	1,00-1,47	Lolas <i>et al.</i> (1976)
Soja ²	1,39-2,30	Raboy <i>et al.</i> (1984)
Casca ¹	0,12	Lehrfeld (1989)
Casca ²	0,50	Sutardi e Buckle (1985)
Hypocotilo	0,88	Thompson e Erdman (1982)
Cotilédones	1,58	Beleia <i>et al.</i> (1993)
Farinha	1,51-1,81	Ranhotra <i>et al.</i> (1974)
Farinha desengordurada	1,62-1,85	Ranhora <i>et al.</i> (1974)
Farinha desengordurada	1,30-1,63	Schuster e Bodwell (1980)
Farinha texturizada	1,10-2,02	Davies e Reid (1979)
Proteína vegetal texturizada ³	0,95-1,63	Harland e Oberleas (1977)
Concentrado protéico	1,25-2,17	Ranhotra <i>et al.</i> (1974)
Concentrado texturizado	1,48-1,50	Harland e Oberleas (1977)
Isolado protéico ⁴	0,97-1,69	Schuester e Bodwell (1980)
Isolado protéico	1,61-2,00	Honig <i>et al.</i> (1984)
Fibra isolada	1,48	O'Neill <i>et al.</i> (1980)

Fonte: * ANDERSON e WOLF (1995).

¹Quinze variedades.

²Trinta e oito variedades

³Autor não especifica se o produto foi obtido a partir da farinha, concentrado ou isolado protéico.

⁴Quinze amostras.

A estrutura química do AF foi proposta por Anderson (1914) citado por Erdman (1979). Johnson e Tate (1969) e Blank *et al.* (1971) utilizaram análises cristalográficas de raio X e destacaram a estrutura do AF como éster hexaortofosfato de mio-inositol com grupos fosfatos C1, 3, 4, 5 e 6 na posição axial e C2 na posição equatorial. Costello *et al.* (1976) empregaram ressonância nuclear magnética e

propuseram a conformação de cadeira do mio-inositol hexafosforilado em soluções (FIGURA 1).

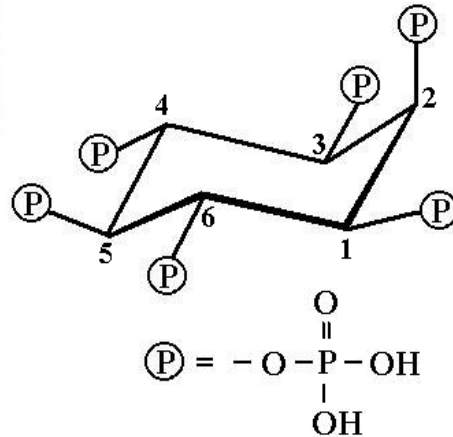


FIGURA 1 - Estrutura do ácido fítico em solução (COSTELLO *et al.*, 1976)

Durante a estocagem, fermentação, germinação, processamento de alimentos ou digestão, o AF pode ser hidrolisado por fitases a inositol penta-fosfatos (IP5), inositol tetra-fosfatos (IP4), inositol tri-fosfatos (IP3) e inositol di e mono-fosfatos (IP2 e IP1) (SANDBERG *et al.*, 1988; BURBANO *et al.*, 1995). Os inositol hexa-fosfatos (IP6) representam cerca de 84% do inositol fosfato presente em farinhas de soja, 14,0% de IP5; 1,8% de IP4 e IP3 em quantidades não detectáveis (KASIM e EDWARDS JR, 1998),

O fitato como um sal de cálcio, magnésio ou potássio do AF, é a principal fonte de fósforo da soja com cerca de 51,4 a 57,1% do total do fósforo da semente, porém o conteúdo total do AF de vegetais depende da variedade, condições de crescimento e condições de análise. O fitato além de atuar como fonte de fósforo na

germinação da semente afeta a biodisponibilidade de minerais e a solubilidade de proteínas nos alimentos (MAGA, 1982).

O AF é ionizável e interage fortemente com proteínas e íons metálicos. Em pH baixo, ocorre a interação iônica entre fitato-proteína e em pH alto são intermediadas por cátions formando complexos fitato-cátion-proteína, cuja interação reduz a solubilidade das proteínas, afetando o comportamento hidrodinâmico, dispersibilidade em água, capacidade espumante e emulsificante das proteínas (NOLAN e DUFFIN, 1987).

Os métodos quantitativos para análise do AF têm sido baseados na metodologia de Heubner e Stander, (1914) que extraíram o AF em meio ácido e subsequente precipitação do complexo fitato- Fe^{3+} seguido de adição de cloreto férrico. O fitato pode ser estimado também pela determinação de fósforo (Mc CANCE e WIDDOWSON, 1935), em complexos fitato ou indiretamente, baseando-se na determinação de ferro residual em solução após precipitação de fitato férrico e determinação da concentração do sal de ferro em solução ácida (YONG, 1936), determinação do ferro (WHEELER e FERREL, 1971) ou inositol (OBERLEAS, 1971).

Harland e Oberleas, (1977) introduziram o uso de cromatografia de troca iônica. Amostras após hidrólise ácida foram aplicadas e a partir da eluição foram separados e quantificados com um gradiente de 0 a 0,7 M de NaCl, o AF ou inositol fosfato e fosfato inorgânico foram separados e quantificados colorimetricamente.

March *et al.* (1995) quantificaram o AF pela liberação do fósforo após eluição em coluna de troca iônica seguido de hidrólise enzimática e posterior quantificação por espectrofotometria de acordo com o método descrito por Uppström e Svensson, (1980).

O método descrito por Latta e Eskin (1980) quantifica o AF através da eluição da amostra em coluna de troca iônica e posterior reação entre o AF e o Reagente de Wade (cloreto férrico e ácido sulfossilicílico) com formação do complexo *o*-hidroxihidroquinonafitato-Fe(III), com modificação da resina de troca iônica conforme o método de Ellis e Morris (1986). Fujita *et al.* (1986) afirmaram que a concentração de AF determinada por este método pode ser superestimada devido à presença de inositóis fosfato de pesos moleculares menores (IP3-5) e adenosina trifosfato (ATP), que podem estar associados ao inositol fosfato (IP6).

Outros métodos como espectrofotometria (ICP-AES) (PLAAMI e KUMPULAINEN, 1991), espectroscopia infra-vermelho (de BOEVER *et al.*, 1994), isotacoforese (BLANTY *et al.*, 1995) e cromatografia gasosa (de KONING, 1994) também foram utilizados na determinação do AF, entretanto estes métodos requerem equipamentos de elevados custos e procedimentos sofisticados (PLAAMI, 1997).

3.4 ANÁLISE IMUNOLÓGICA

Os ensaios imunológicos baseiam-se na especificidade dos anticorpos em reagir com um determinado antígeno e existem várias técnicas para determinar essa reação. A especificidade da interação antígeno-anticorpo é muito usada em análises clínicas para diagnosticar doenças infecto-contagiosas e monitorar drogas terapêuticas. Estes ensaios são sensíveis e econômicos quanto ao uso de reagentes (SAMARAJEEWA *et al.*, 1991; ROITT *et al.*, 2003). Em alimentos têm sido utilizados para identificar e quantificar constituintes naturais ou adicionados intencionalmente ou

não como, antibióticos, resíduos de pesticidas, hormônios, constituintes antinutricionais, microrganismos e seus produtos (SAMARAJEEWA *et al.*, 1991).

O método de ELISA (teste imunossorvente ligado à enzima) foi utilizado para quantificar proteínas de soja em produtos cárneos, empregando anticorpos anti-proteína denaturada da soja (HITCHCOCK *et al.*, 1981) ou anti-proteína “in natura” (MEDINA, 1988). Em ambos os casos, não foram verificadas reações cruzadas com outras proteínas, indicando alta especificidade dos ensaios. Ring *et al.* (1988) detectaram 0,25% de proteína de soja em salsicha. Como um método imunológico tem sido amplamente utilizado, uma vez que vários testes podem ser realizados simultaneamente em um período de tempo relativamente curto (ROITT *et al.*, 2003).

O imunoenensaio é um procedimento analítico que se baseia na ligação específica não-covalente, entre os sítios combinatórios da molécula do anticorpo e epítopos do antígeno. Para produzir soros em animais de laboratórios com anticorpos específicos; necessita-se purificar e verificar a especificidade do anticorpo obtido, bem como padronizar o ensaio para determinar o antígeno, utilizando uma fase sólida ou líquida (RITTENBURG e GROTHAUS, 1991).

3.4.1 Antígeno e imunógeno

O termo antígeno é amplamente utilizado para indicar qualquer molécula que possa ser reconhecida pelos elementos do sistema imune adaptativo, ou seja, células T, células B ou ambas (ROITT *et al.*, 2003). Imunógenos são substâncias capazes de promover uma resposta imunológica quando inoculadas em animais

(GAZZAZ *et al.*, 1992). Para induzir a produção de anticorpos os imunógenos devem apresentar peso molecular acima de 1.000 daltons, sendo ideal de 3.000 a 5.000 daltons. Moléculas pequenas são denominadas haptenos e não induzem a resposta imune e, portanto, são ligadas a macromoléculas tornando-as conjugadas (HEFLE, 1995). As proteínas, pela maior complexidade, são mais imunogênicas do que os carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios (GAZZAZ *et al.*, 1992).

Outra característica dos antígenos é a antigenicidade ou a capacidade de serem reconhecidos especificamente, pelos produtos da resposta imune humoral (anticorpos) e celular (receptores de linfócitos T). A especificidade antigênica é caracterizada pela capacidade do antígeno de ser reconhecido pelo anticorpo, em função de determinadas partes ou sítios da molécula. Esses sítios são denominados de determinantes antigênicos ou epítomos. Nas proteínas, os epítomos equivalem a uma seqüência de aproximadamente 5 a 7 aminoácidos (GAZZAZ *et al.*, 1992), que são reconhecidos pela sua seqüência na estrutura primária, em conjunto com a sua posição espacial na estrutura terciária ou quaternária. Portanto, as características do antígeno, como o peso molecular, a complexidade da estrutura tridimensional e solubilidade, têm grande importância na sua escolha como imuno-reagentes “*in vitro*”. Outros fatores também devem ser considerados para a escolha do antígeno, como as alterações que podem ocorrer com o mesmo na matriz onde se encontra, o processamento tecnológico empregado e a forma de preparo da amostra para a sua extração (RITTENBURG *et al.*, 1987).

É importante ressaltar que quanto mais impuro for o antígeno a ser inoculado no animal, mais etapas são necessárias para purificação dos anticorpos policlonais obtidos. Essa preocupação não existe quando se empregam anticorpos

monoclonais. Neste caso, a dificuldade está na escolha do anticorpo monoclonal ou o conjunto deles, que melhor represente a especificidade dos determinantes antigênicos envolvidos (MACEDO-SILVA *et al.*, 2001).

3.4.2 Anticorpos

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas presentes no soro e fluidos teciduais de todos os mamíferos (ROITT *et al.*, 2003) que apresentam peso molecular entre 150.000 e 900.000 daltons. São formadas por duas cadeias pesadas idênticas e duas leves ligadas por pontes de dissulfeto. As cadeias leves e pesadas apresentam porções variáveis (VL e VH) e constantes (CL e CH) (FIGURA 2). A variável fica na extremidade das duas cadeias e é responsável pela ligação com o antígeno. A especificidade da ligação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) é em função da seqüência e da conformação espacial dos aminoácidos dessa fração. Os sítios combinatórios do anticorpo são formados pela porção variável de uma cadeia pesada e uma leve e, portanto, são dois para cada unidade monomérica. De acordo com a composição dos domínios constantes da cadeia pesada, pode-se classificar as imunoglobulinas em IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A IgG é a classe de anticorpos mais utilizada em imunoenaios, que corresponde de 10 a 20% do soro hiperimune e usualmente de 1 a 10% dessas IgG correspondem aos anticorpos específicos contra o antígeno inoculado. Para obter uma concentração elevada de anticorpos as imunoglobulinas podem ser purificadas utilizando-se a precipitação com sulfato de amônio ou de sódio. Para separar a fração IgG são empregadas cromatografias de

troca iônica ou imunoafinidade. A cromatografia de imunoafinidade elimina os anticorpos indesejáveis como aqueles que apresentam reação cruzada que interfere na especificidade do imunoenensaio (GAZZAZ *et al.*, 1992).

Os anticorpos monoclonais, por sua vez, são uniformes, específicos e apresentam uma afinidade constante com um epítipo da molécula do antígeno. São derivados de um clone de hibridoma secretora de imunoglobulinas, que foi criada pela fusão de células do baço de camundongo com célula tumoral, geralmente mieloma. Um simples clone que é mantido “in vitro” pode produzir grandes quantidades de anticorpos de um isotipo e com uma única especificidade (GAZZAZ *et al.*, 1992). Entretanto, os anticorpos policlonais são mais utilizados devido a facilidade de obtenção, baixo custo e especificidades para diferentes epítipos antigênicos (MOTTAR, 1989).

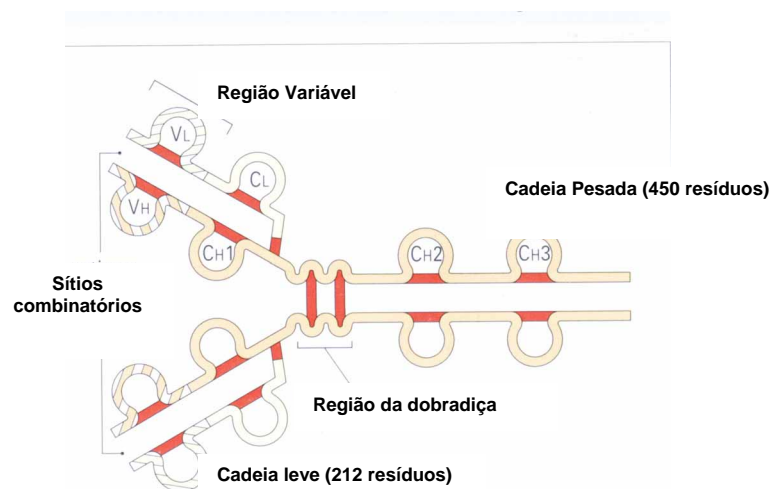


FIGURA 2 – Estrutura básica da IgG1 (ROITT *et al.*, 2003)

3.4.3 Adjuvantes Imunológicos

Os adjuvantes imunológicos são usados na imunização de animais com o objetivo de aumentar a resposta imunológica a um antígeno. São utilizados como adjuvantes emulsões de óleos, sais metálicos e lipossomas. O mais eficiente é o adjuvante completo de Freund que consiste de uma emulsão de água em óleo contendo células mortas de *Mycobacterium butyricum* ou *Mycobacterium tuberculosis*, para estimular subpopulações de células T, linfócitos e macrófagos que são responsáveis pela intensificação da resposta imunológica (GAZZAZ *et al.*, 1992).

3.4.4 Ensaio Imunológicos

Os ensaios imunológicos podem ser empregados para detecção de anticorpo (Ac) ou antígeno (Ag). Inicialmente os imunoenaios baseavam-se na precipitação e aglutinação do complexo Ag-Ac. A precipitação pode ser favorecida pelo uso de meio geleificado, onde a visualização do imunocomplexo Ag-Ac é facilitada. A aglutinação requer que o complexo Ag-Ac esteja insolubilizado na forma de células ou partículas inertes. Para que isso ocorra, as concentrações do Ag e Ac devem ser ideais, sem excesso de um ou de outro. Vários métodos foram propostos com o objetivo de otimizar e detectar o imunocomplexo formado e torná-lo mais sensível. Rittenburg *et al.* (1991) verificaram que foi possível detectar Ag ou Ac em soluções, mesmo em baixas concentrações, marcando um dos imuno-reagentes com alguma substância que

revelasse a interação Ag-Ac. Essas substâncias poderiam ser radioativas ou fluorescentes, quimioluminescentes ou enzimáticas.

O ensaio imunoenzimático tem sido o mais utilizado pela simplicidade e menor custo. É um procedimento analítico que utiliza a conversão, mediada por enzima de um substrato em um produto colorido, como meio de detectar o analito pesquisado. O emprego de enzima adsorvida no Ac ou Ag foi desenvolvido por Engvall e Perlman, (1971) e Van Weemen e Schurers, (1971) para substituir o radioisótopo como marcador. Diferentes enzimas podem ser empregadas como marcadores, sendo as mais comuns as peroxidases de rabanete, as fosfatases alcalinas e as β -galactosidases obtidas de microrganismos (GAZZAZ *et al.*, 1992).

Roitt *et al.* (2003) descreveram que no ELISA indireto o antígeno em solução salina é incubado em uma placa de poliestireno e pequenas quantidades são adsorvidas na superfície plástica. O antígeno livre é lavado e a placa pode ser bloqueada com excesso de proteína (gelatina) para impedir a subsequente ligação de proteínas inespecíficas. Em seguida, o anticorpo é adicionado e liga-se ao antígeno. Os anticorpos não ligados são lavados e adicionado o ligante que é uma molécula que pode detectar o anticorpo e está covalentemente acoplada a uma enzima como as peroxidases. Este complexo liga-se ao anticorpo teste e o ligante é lavado, enquanto que o ligante fixado é visualizado pela adição de um cromógeno que é um substrato incolor ativado pela porção da enzima do ligante, produzindo um produto final com cor (FIGURA 3). A quantidade de antígeno teste é quantificada pela determinação da quantidade de produto final colorido que é proporcional a sua concentração (FIGURA 4), através de um leitor de densidade óptica da placa.

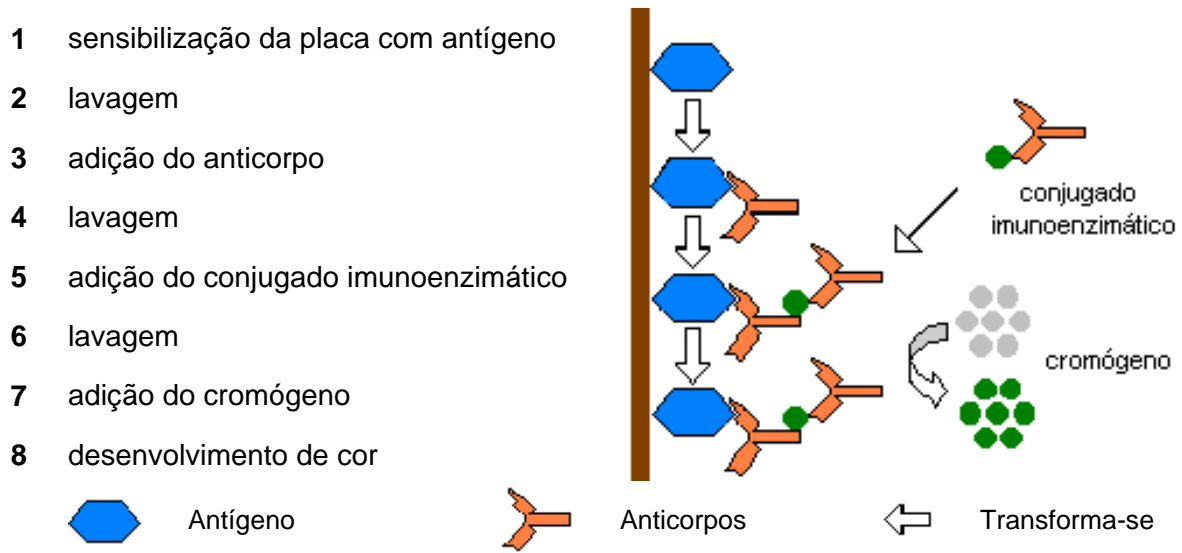


FIGURA 3 - Desenvolvimento do método de ELISA indireto (Baseado em ROITT *et al.*, 2003)



FIGURA 4 – Método de ELISA indireto (ROITT *et al.*, 2003)

3.4.5 Quantificação de proteína de soja em produtos cárneos pelo método de ELISA indireto

O ELISA competitivo tem sido usado por vários pesquisadores para quantificação de proteínas de soja em produtos cárneos. Hitchcock *et al.* (1981) produziram anticorpo específico para a proteína de soja renaturada com a finalidade de quantificar proteína de soja em produtos submetidos ao tratamento térmico. Para isso, a proteína de soja foi desnaturada com uréia e calor e depois renaturada por eliminação da uréia através de diálise. A proteína renaturada foi inoculada em coelhos para obter o anticorpo específico que foi utilizado no ensaio, sendo que a amostra (produto cárneo) foi submetida ao mesmo tratamento com uréia e concluíram que não ocorreu reação com outras proteínas do produto cárneo.

Griffiths *et al.* (1984) avaliaram “kits-ELISA” disponíveis comercialmente para detecção de proteína de soja em produtos cárneos e concluíram que os soros comerciais respondiam de forma semelhante ao do anticorpo padronizado segundo Hitchcock *et al.* (1981). Observaram que os anticorpos anti-proteína da soja renaturada e “in natura” reconheceram a amostra renaturada, não indicando vantagem em usar o soro anti-proteína da soja renaturada.

Um outro ensaio baseado no ELISA competitivo indireto, empregando anticorpo anti-glicina (fração da proteína da soja 11S) foi padronizado por Yasumoto *et al.* (1990). As amostras foram digeridas com tripsina antes de serem submetidas ao ensaio que quantificou de 0 a 20,8% de proteína de soja. As quantidades detectadas estavam próximas das obtidas nas salsichas, cuja proteína isolada de soja foi adicionada e utilizada como padrão.

Macedo-Silva *et al.* (2001) produziram anticorpos policlonais anti-proteína da soja a partir da fração protéica da soja 7S e padronizaram um método de ELISA indireto para aplicação em hambúrgueres. Verificaram que 30,8% das amostras estavam em desacordo com a legislação, ou seja, a proteína de soja texturizada (PTS) estava presente em quantidade superior a 7,5%.

3.5 PRODUTOS MARINADOS

O processo de marinação refere-se ao uso de salmoura ou qualquer outro líquido utilizado para amaciar e dar sabor às carnes (ORESKOVICH *et al.*, 1992). A marinação é utilizada pela indústria frigorífica com o objetivo de agregar valor aos produtos cárneos melhorando suas características sensoriais, conferindo maior maciez e suculência (LEMOS *et al.*, 1999).

Os fatores que afetam a capacidade de retenção de água (CRA) no tecido muscular são a contração das miofibrilas, pH e estado de desnaturação das proteínas (SGARBIERI, 1996). Quando se coloca um músculo inteiro em uma salmoura, a difusão do líquido dependerá da concentração de sólidos dissolvidos e do tempo de imersão ou contato do músculo com a salmoura, permitindo migração da água e dos solutos para o interior do músculo. As diferentes camadas de tecido conjuntivo (epimísio, perimísio e endomísio) se constituem em uma barreira para a migração dos solutos uma vez que as moléculas de alto peso molecular não atravessam estes tecidos com facilidade e o fluxo de água que penetra no músculo avança perpendicularmente ao eixo das fibras musculares e é necessário que atravesse as três camadas de tecido conjuntivo antes

de atingir o sarcolema que é a membrana celular das fibras musculares (ITAL, 2000). Desta forma, o processo de marinação permite o aumento da CRA que interfere na textura, suculência e maciez da carne e seus produtos através do uso de ingredientes e técnicas que permitem uma maior ligação de água pelo músculo (LEMOS *et al.*, 1999).

A marinação envolve a imersão, injeção, tambleamento, massageamento ou combinação destes. A imersão é um processo antigo onde se coloca a carne para descansar em uma solução que atua na fibra muscular, permitindo maior ligação de água pelo músculo, por um período de 1 a 24 horas para absorver a salmoura (PARDI *et al.*, 1996). Na imersão ocorre a difusão do líquido nos músculos da carne. Esta difusão depende da concentração de sólidos dissolvidos e do tempo de imersão (LEMOS *et al.*, 1999). Aplicando-se uma ação física neste processo obtém-se uma maior taxa de absorção (PARDI *et al.*, 1996).

O uso de sistemas injetáveis tem permitido uma melhor uniformidade e facilitado a distribuição dos ingredientes. O processo consiste em furar o músculo com agulhas e injetar a salmoura diretamente à carne (LEMOS *et al.*, 1999). São usados injetores com agulhas únicas ou múltiplas, dependendo do tipo ou corte de carne, para incorporar a solução diretamente nos pedaços de músculos mais grossos (PARDI *et al.*, 1996). A absorção da salmoura é determinada pela pressão da injeção e pela velocidade da esteira. O processo de injeção pode carrear patógenos para o interior da carne. Especificamente na carne de aves a marinação é realizada com injeção e tambleamento e ou massageamento ou uma delas, como é o caso das carcaças que utiliza a injeção e filé de peito o massageamento ou tambleamento (LEMOS *et al.*, 1999).

No tambleamento, geralmente a carne é primeiramente coberta ou injetada com solução de cura. Este é um tratamento físico relativamente severo, que envolve o uso de energia de impacto que é resultado do golpeamento da carne num tambor rotativo ou através de pás. O vácuo pode ou não ser usado. Este processo tornou-se mais comum nos últimos dez anos, resultando em vários produtos de carne marinados. O massageamento algumas vezes utilizado como sinônimo de tambleamento é um processo menos vigoroso e envolve energia de fricção, resultante do esfregaço entre duas superfícies que pode ser usada como alternativa ao tambleamento (LEMOS *et al.*, 1999). Muitos massageadores são encamisados e refrigerados através da circulação de gases, permitindo controlar a temperatura durante o processo e permitem ainda, a aplicação de vácuo. As vantagens deste processo são a absorção rápida e uniforme da salmoura pela carne com controle da temperatura, capacidade de marinar grandes quantidades e a versatilidade do equipamento que permite a marinação de diferentes produtos e pedaços no mesmo equipamento (ITAL, 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

4.1.1 Materiais

Foram utilizadas como matérias-primas peito de frango de ambos os sexos adquiridos de abatedouros da região de Londrina, concentrados protéicos de soja (CPS) e isolados protéicos de soja (IPS) fornecidos pela Globalfoods, frangos marinados e frangos inteiros congelados adquiridos nos supermercados da região.

4.1.2 Animais

Foram utilizados Coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia (n=3), com cerca de 3 meses de idade, adquiridos na Universidade Estadual de Maringá (UEM) para produção de anticorpo policlonal anti-proteína de soja.

Os demais reagentes nesta investigação foram de grau analítico de diferentes procedências.

4.2 Metodologias

O esquema para desenvolvimento dos métodos indiretos do AF e ELISA para quantificação do teor de proteínas de soja em frangos marinados está apresentado na Figura 5, demonstrando as etapas desenvolvidas nesta investigação.

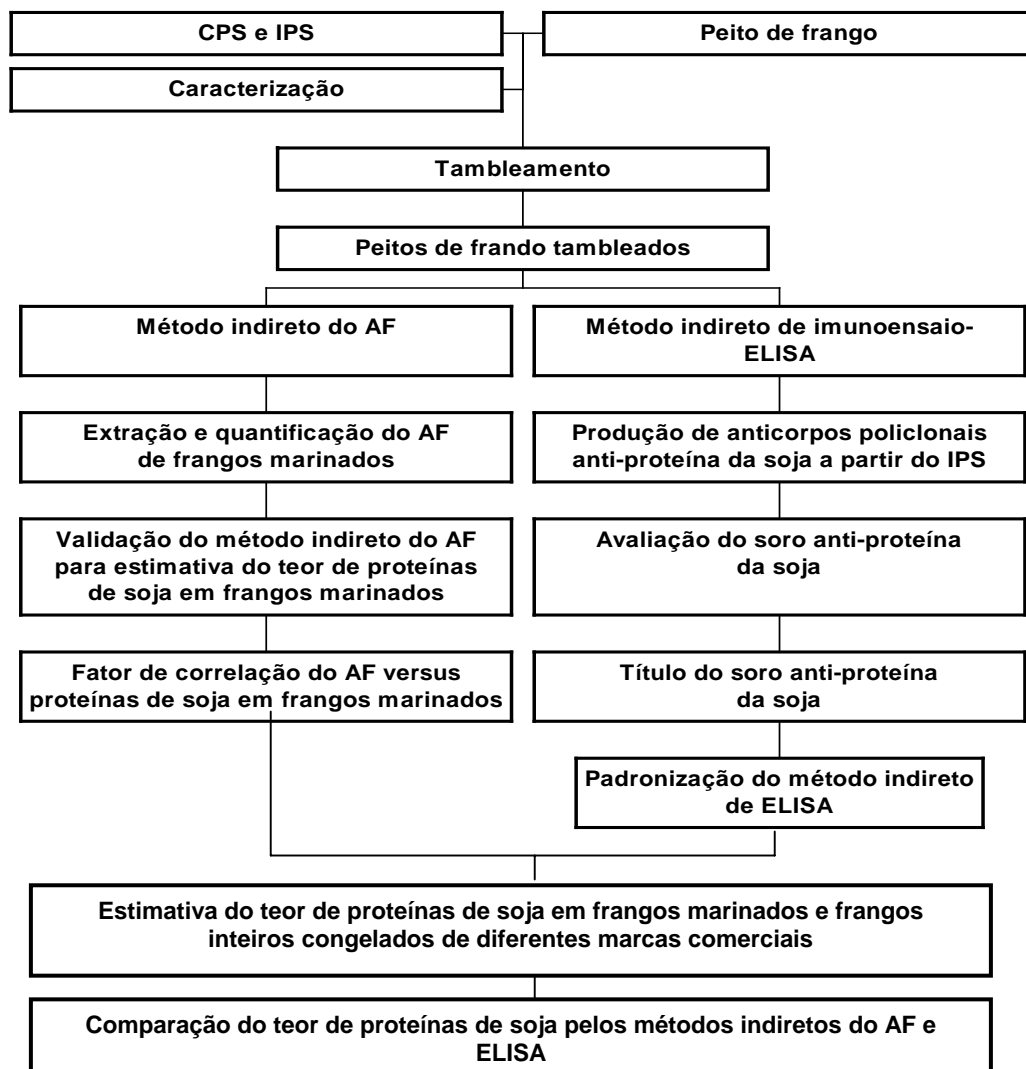


FIGURA 5 - Esquema para desenvolvimento dos métodos indiretos do AF e ELISA para quantificação do teor de proteínas de soja em frangos marinados

4.2.1 Caracterização do peito de frango, CPS, IPS, marinados de frango e frangos inteiros congelados

Todos os procedimentos para caracterização do peito de frango, CPS, IPS, marinados de frango e frangos inteiros congelados foram realizados em triplicata. Para o peito de frango, CPS e IPS foram determinados a umidade pelo método da AOAC (1995), utilizando estufa regulada a 105°C, o pH pelo método potenciométrico utilizando o pHmetro digital (TECNAL, Modelo Tec-3MP), determinação de proteína total por micro-kjeldahl (fator 6,25) conforme descrito na AOAC (1995) e determinado o teor de AF segundo Latta e Eskin (1980) com modificação da resina para DOWEX-AGX-4 conforme Ellis e Morris (1986) (item 4.2.3). Para os marinados de frango e frangos inteiros congelados foram realizadas as análises anteriormente descritas com exceção de proteína total por micro-kjeldahl.

4.2.2 Tumbleamento dos peitos de frango com CPS ou IPS

Os peitos de frango foram preparados a partir do tumbleamento (Tumbler DORIT VV-T-10) a vácuo por 18 minutos com soluções de CPS (diluição 1:3; p/v) ou IPS (diluição 1:6; p/v) em água filtrada, de tal forma que as concentrações fossem 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25 g de CPS ou IPS em 100 g de peito tumbleado que foram utilizados para aplicação do método indireto do AF para estimativa de proteínas de soja em produtos marinados. Foram tumbleados peitos de frango com 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g

de IPS em 100 g de peito de frango para aplicação do método de ELISA indireto. Após o tangleamento as amostras foram congeladas para posterior quantificação utilizando os dois métodos propostos.

4.2.3 Extração e determinação do AF do CPS e IPS

Para a extração e determinação do AF do CPS e IPS foi utilizado o método descrito por Latta e Eskin (1980) com modificação da resina para DOWEX-AGX-4 conforme Ellis e Morris (1986). Para a extração do AF do CPS e IPS foram utilizados a proporção de 1:10 (p/v) com 1 g de amostra e 10 mL de ácido clorídrico 0,8 M e agitados a 250 rpm durante 2h. Em seguida, o material foi centrifugado durante 10 minutos a 2000 rpm para obtenção do sobrenadante contendo o AF. O teor de AF foi quantificado a partir de 2 mL do sobrenadante que foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água destilada. Posteriormente, alíquota de 2 mL foi aplicada em uma coluna de vidro (altura de 15 cm e diâmetro de 1,4 cm) contendo 0,5 g de resina de troca iônica DOWEX-AGX-4. Esta coluna foi previamente tratada com 10 mL de água destilada, 10 mL de NaCl 0,7 M e novamente seguido de 10 mL de água destilada. A eluição inicial foi feita com 10 mL de NaCl 0,1 M e 10 mL de NaCl 0,7 M. Foram coletados de 10 mL de eluato foram coletados e 3 mL foram transferidos para tubos de ensaio em triplicata. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 1 mL do reagente de Wade (ácido sulfosalicílico e cloreto férrico), agitados e a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 500 nm.

Foi preparada uma curva padrão com 30 mg de AF (fitato dodecassódico, Sigma) em 100 mL de água destilada e mantida solução estoque para utilização como solução trabalho. A partir desta solução, foram retiradas alíquotas de 0,5 a 3,0 mL (22,5 a 135 $\mu\text{g/mL}$) e completadas para 3 mL com água destilada e adicionado 1 mL de reagente de Wade. Para o branco foi utilizado 3 mL de água destilada e 1 mL de reagente de Wade. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 500 nm. O teor de AF foi estimado a partir da curva padrão de AF versus densidade óptica (DO) considerando-se as diluições realizadas. Os resultados foram expressos em mg de AF/g de amostra em base seca.

4.2.4 Extração e determinação de AF em peito de frango marinado

Para extração de AF de peito de frango marinado foram utilizados a proporção de 1:3 (p/v) com 15 g de amostra e 45 mL de ácido clorídrico 0,8 M e agitados a 250 rpm durante 2h. Em seguida, o material foi centrifugado durante 10 minutos a 2000 rpm e obtido o sobrenadante contendo o AF. Para estas amostras foram transferidos 4 mL do sobrenadante para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água destilada. Em seguida utilizou-se o mesmo procedimento descrito no item 4.2.3 para quantificar o teor de AF.

4.2.5 Validação do método indireto do AF para estimativa do teor de proteína de soja em produtos marinados

Para validação do método indireto do AF para estimativa de proteínas de soja foram utilizados os critérios como: exatidão, precisão, especificidade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação conforme descrito na Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) e Nielsen (2003). Foram utilizadas amostras de peito de frango tambeado contendo concentrações crescentes de 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 e 1,25g de CPS ou IPS em 100 g de peito de frango.

4.2.5.1 Exatidão

A exatidão do método indireto do AF para estimativa de proteínas de soja em produtos cárneos foi determinada com base no teor de AF do CPS ou IPS e calculada a porcentagem de recuperação do AF em relação aos dois ingredientes adicionados em peitos de frango tambeados. Assim, a porcentagem de recuperação do AF foi expressa como:

$$\% \text{ recuperação do AF} = \frac{\text{Teor de AF do marinado}}{\text{Teor de AF do CPS ou IPS}} \times 100$$

4.2.5.2 Precisão

A precisão do método indireto do AF para estimativa de proteínas de soja em produtos cárneos foi medida pelo coeficiente de variação (*CV%*) através das determinações do teor de AF em peitos de frango tambeados com CPS ou IPS e seu desvio padrão (*s*). Para cada concentração de CPS ou IPS utilizada o coeficiente de variação (*CV%*) foi calculado, conforme segue:

$$CV\% = \frac{s}{\text{Teor de AF do marinado}} \times 100$$

Onde:

s = desvio padrão do teor de AF em peitos de frango tambeados com CPS ou IPS

4.2.5.3 Especificidade

A especificidade do método indireto do AF foi avaliada a partir da determinação em triplicata do teor de AF adicionado no peito de frango e comparado com amostra padrão de peito de frango controle sem a adição de AF e proteínas de soja. Foi adicionado solução padrão de AF (fitato dodecassódico, Sigma) na concentração de 0,1725 mg de AF/g de peito de frango que foi equivalente a adição de proteína de soja na concentração de 1 g em 100 g de peito de frango, conforme

descrito no item 4.2.2. Os resultados foram comparados com as amostras de peito de frango controle.

4.2.5.4 Linearidade

A linearidade do método indireto do AF para estimativa de proteínas de soja em carnes foi determinada através da quantificação do teor do AF do peito de frango tambleado contendo concentrações crescentes de 0,25 a 1,25 de CPS ou IPS em 100 g de peito de frango e porcentagem (%) de CPS ou IPS adicionado no peito de frango tambleado. A regressão linear foi aplicada utilizando o programa *STATISTICA for windows* versão 5.0 (STATSOFT, 1995). Assim, foram construídas duas curvas padrões, sendo uma para AF versus CPS e outra para AF versus IPS.

4.2.5.5 Limite de detecção e quantificação

A partir das equações de reta do tipo $y = ax + b$ foi calculado o limite de detecção e quantificação do respectivo método, onde:

y = % concentração de CPS e IPS em frango tambleado com estes
ingredientes

x = mg de AF/g de peito de frango tangleado com CPS ou IPS (base seca)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método indireto do AF para estimativa do teor de proteínas de soja em marinados foram determinados com base no desvio padrão do intercepto com o eixo y (s) e na inclinação da curva de calibração (a) (item 4.2.5.4) e foram expressos como:

$$LD = \frac{s}{a} \times 3,3$$

$$LQ = \frac{s}{a} \times 10$$

onde:

s = desvio padrão do intercepto com o eixo y da curva de calibração,

a = inclinação da curva de calibração

4.2.6 Fator de correlação

A partir da quantificação do teor do AF do peito de frango tangleado com diferentes concentrações de CPS ou IPS utilizados foi estabelecida uma correlação entre ambas medidas, aplicando a regressão linear com uso do programa STATISTICA

for windows versão 5.0 (STATSOFT, 1995). Foram construídas duas curvas de correlação, sendo uma para AF versus CPS e outra para AF versus IPS. A partir da inclinação da reta ($a = y/x$), o respectivo fator de correlação foi expresso como:

$$y = ax \quad (\text{equação da reta})$$

$$a = \frac{y}{x} \quad (\text{inclinação da reta})$$

onde:

x = % concentração de CPS ou IPS

y = mg de AF/g de peito de frango marinado (base seca)

a = inclinação da reta ou fator de correlação (f)

Desta forma, o fator de correlação (f) foi utilizado para estimar indiretamente o teor de proteínas de soja contida nos marinados, a partir da quantificação do teor do AF (mg de AF/g do marinado em base seca), conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ de proteínas de soja do marinado} = f \times \text{teor de AF do marinado}$$

4.2.7 Estimativa do teor de proteína de soja em marinados e frangos inteiros congelados pelo método indireto do AF

Uma vez estabelecida a correlação entre o teor do AF dos marinados e proteínas de soja adicionadas, aplicou-se o método de quantificação do teor do AF para estimar o teor de proteínas de soja em carnes de frango e marinados. Para simulação desta quantificação foram analisadas 10 amostras de frango inteiro congelado e 6 amostras de frango marinado de diferentes procedências comerciais disponíveis. O procedimento para quantificação do teor de AF foi o descrito no item 4.2.4.

4.2.8 Determinação de proteínas de soja pelo método de ELISA indireto

A determinação de proteína de soja pelo método de ELISA indireto foi realizada em amostras de frangos marinados e frangos inteiros congelados. Para padronizar este método foi necessário produzir anticorpos policlonais anti-proteína da soja a partir da inoculação do IPS em coelhos fêmeas. O CPS não foi utilizado devido ao menor teor protéico quando comparado ao IPS.

4.2.8.1 Produção de anticorpos policlonais anti-proteína da soja

Para a produção de anticorpo policlonal anti-proteína da soja foi seguido o procedimento descrito por Macedo-Silva *et al.* (2001), diferindo apenas na solução protéica, os quais utilizaram 1 mg da fração 7S da proteína da soja. O anticorpo policlonal anti-proteína da soja foi obtido pela imunização de coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia (n=3) e o esquema do procedimento de imunização com IPS está apresentado na Figura 6. Antes do início da imunização dos coelhos foi realizada uma sangria para obter o soro pré-imune que serviu como controle da resposta imune à IPS. Posteriormente, deu-se início as inoculações por via subcutânea em três pontos do dorso do animal durante 3 meses, em intervalos de 30 dias. A inoculação da primeira dose consistiu da emulsão de uma solução de 500 µg de IPS em 500 µL de tampão fosfato de sódio (TFS), pH 7,2 com 500 µL de adjuvante completo de Freund. As doses subseqüentes consistiram da mesma concentração de IPS, diferindo apenas no adjuvante de Freund, que foi o incompleto.

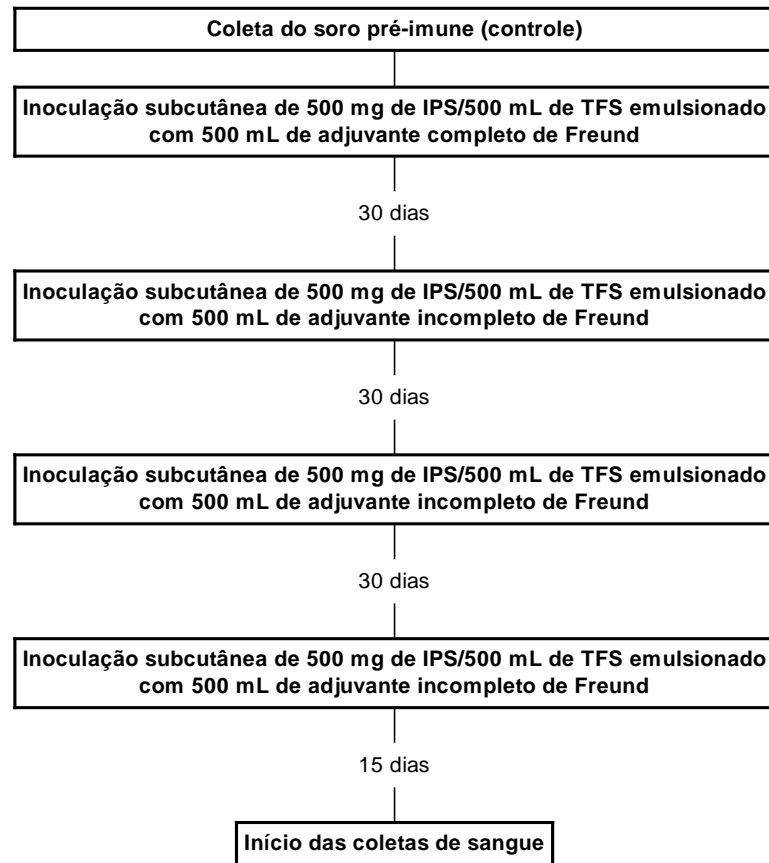


FIGURA 6 – Esquema de imunização de coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia (n=3) com IPS para obtenção de anticorpos policlonais anti-proteína da soja

4.2.8.2 Avaliação do soro anti-proteína da soja

Para acompanhamento da resposta imunológica foi colhido de cada animal 1 mL de sangue pela veia marginal da orelha, uma semana após cada inoculação. O material foi centrifugado e o soro obtido avaliado conforme o item 4.2.8.3. A resposta foi considerada positiva quando a absorbância do soro imune foi três vezes maior do que o soro pré-imune (controle).

Após a quarta dose, na 13^a semana, iniciaram-se as coletas de sangue em apenas um dos coelhos, o qual apresentou resposta imune positiva, ou seja, absorvência 3 vezes superior ao soro pré-imune (controle) e os demais não apresentaram resposta satisfatória. Procedeu-se sangrias semanais ou quinzenais por punção cardíaca. Quando a perda de peso foi maior que 200 gramas, aguardou-se a recuperação do animal para nova coleta de sangue. Para cada 18 mL de sangue coletados o título foi determinado.

4.2.8.3 Diluição ideal do soro anti-proteína da soja

As diluições ideais de cada soro foram determinadas por ELISA. Neste procedimento em triplicata, foi adicionado às placas (Nunc Plate F - Poly Sorb, 96 poços) 50 ng de IPS para 100 µL de tampão carbonato bicarbonato (TCB) 10 mM e pH 9,8. Em seguida as placas foram incubadas em câmara úmida durante 16 horas a 4°C para permitir a adsorção da amostra na microplaca. Posteriormente, foi lavada 4 vezes com tampão fosfato salino (TFST) 12,25 mM e pH 7,2 com Tween 20 à 0,05% e adicionado 150 µL de solução de gelatina à 1% em TFST e incubada a 37°C durante 30 minutos para bloquear a microplaca. Após incubação, foi novamente lavada 4 vezes com TFST e inoculado 100 µL do soro anti-proteína da soja diluído a 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200 em TFST e incubada a 37°C durante 30 minutos, novamente lavada 4 vezes com TFST e em seguida, adicionou-se o anticorpo de cabra anti IgG de coelho marcado com peroxidase (1:5000) (SIGMA) e incubada a 37°C

durante 30 minutos, seguido de 4 lavagens com TFST. Após a última lavagem foram adicionados 100 µL da solução substrato-cromógeno, contendo 34 mg de ortofenilenodiamino (OPD) e 50 µL de peróxido de hidrogênio a 20 volumes em 100 mL de tampão citrato-fosfato 0,15 M e pH 5,0 até a formação de cor, ou seja, 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 12,5%. A diluição ideal de cada soro correspondeu a respectiva diluição cuja absorbância obtida a 490 nm foi de 1,0.

4.2.8.4 Preparo da amostra para o ensaio imunológico

Amostras de peitos de frango marinados contendo 0, 1, 2, 3 e 4 g de IPS em 100 g de peito de frango marinado (item 4.2.4), 6 amostras de frango marinado e 10 frangos inteiros congelados de diferentes procedências foram preparadas conforme procedimento descrito por Macedo-Silva *et al.* (2001). Cerca de 200g de amostra foram homogeneizados e alíquotas de 1g em triplicata foram submetidas à extração de proteína com 70 mL de tampão carbonato-bicarbonato (TCBT) 10 mM e pH 9,8 contendo 0,05% de Tween 20 com agitação mecânica (Heidolph DIAX 600) a 13.500 rpm/2minutos. O homogenato obtido foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com o mesmo tampão de extração. Em seguida, foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 42 e 1,5 mL de extrato foram distribuídos em microtubos e mantidos a -18°C.

O extrato de CPS utilizado no item 4.2.8.6 e o extrato de IPS utilizado no item 4.2.8.3 e 4.2.8.6 foram obtidos de 50 mg destes ingredientes em 100 mL de TCBT.

4.2.8.5 Método de ELISA indireto

A padronização do método de ELISA indireto foi desenvolvida conforme descrições de Macedo-Silva *et al.* (2001). Os extratos obtidos no item 4.2.6.4 foram diluídos na proporção de 1:200 (v/v) em TCB e colocados em triplicata na microplaca em volume de 100 μ L, ou seja, equivalente a 5 μ g de amostra. Em seguida, as placas foram incubadas em ambiente úmido durante 16 horas a 4°C para permitir a adsorção da amostra na microplaca. Posteriormente foi lavada 4 vezes com TFST e adicionado 150 μ L de solução de gelatina à 1%, em TFST e incubada a 37°C durante 30 minutos para bloquear a microplaca. Após a incubação, a microplaca foi novamente lavada 4 vezes com TFST e adicionado 100 μ L do soro anti-proteína da soja obtido no item 4.2.8.1, diluído 1:100 (v/v) em TFST e a microplaca foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Novamente lavada 4 vezes com TFST e posteriormente foi adicionado o anticorpo de cabra anti IgG de coelho-peroxidase (1:5000) (SIGMA) e incubada a 37°C durante 30 minutos, seguido de 4 lavagens com TFST. Após a última lavagem foram adicionados 100 μ L da solução substrato-cromógeno, contendo 34 mg de ortofenilenodiamino (OPD) e 50 μ L de peróxido de hidrogênio a 20 volumes em 100 mL de tampão citrato-fosfato 0,15 M e pH 5,0 até a formação de cor, ou seja, 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico 12,5%. O branco consistiu de 100 μ L de TCB para verificar a possível reação não-específica dos reagentes com a microplaca durante o ensaio. A leitura foi feita a 490 nm de absorvância. A cada ensaio foi incluída uma curva padrão obtida pelo programa

STATISTICA *for windows* versão 5.0 (STATSOFT, 1995) a partir de amostras de peito de frango marinado com IPS nas concentrações de 0, 1, 2, 3 e 4 g em 100 g de frango marinado. Os resultados foram expressos em g de proteínas de soja em 100 g de frango marinado.

4.2.8.6 Reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja com CPS e IPS

A reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja obtido no item 4.2.8.1 foi comparada em relação a 50 ng de CPS ou IPS em 100 µL de TCB. Para comparação dos resultados foi aplicado o teste *t* de *Student*.

4.2.8.7 Reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja com marinados

A reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja obtido no item 4.2.8.1 foi comparada com amostras de frango marinado contendo 1% de IPS antes e após aquecimento a 100°C durante 30 minutos. Para comparação dos resultados utilizou-se o teste *t* de *Student*.

4.2.8.8 Comparação do teor estimado de proteína de soja pelos métodos indiretos do AF e ELISA

Para comparação dos dois métodos foram analisadas 6 marcas de frango marinado e 10 marcas comerciais de frango inteiro congelado disponíveis no mercado. A precisão para ambas metodologias foi determinada com base nos seus respectivos coeficientes de variação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PEITO DE FRANGO, CPS, IPS, MARINADOS DE FRANGO E FRANGOS INTEIROS CONGELADOS

A caracterização do peito de frango foi realizada para verificar a qualidade do mesmo antes da elaboração de marinados. O teor de umidade foi 71,80%, proteína total de 21,40%, pH 5,95 e quanto ao teor de ácido fítico não foi constatado a sua presença, confirmando a ausência de qualquer ingrediente de origem vegetal (TABELA 2), uma vez que estes peitos foram posteriormente marinados com CPS ou IPS. O teor de umidade, proteína total e pH foram similares ao descrito por Fennema (2000), cujas carnes de frango de 6 a 8 horas *post mortem* apresentaram teor de umidade de 73%, proteína total entre 20 e 23% e pH entre 5,5 e 5,8. Segundo Bendall *et al.* (1988) o pH fisiológico do músculo é de 7,2 e após o abate diminui devido ao ácido láctico proveniente do metabolismo do glicogênio até atingir o pH normal, ou seja, ao redor de 5,6. Entretanto, em muitas ocasiões, devido a baixa concentração de glicogênio muscular, o pH estabiliza mantendo o valor igual ou superior a 6,0. O pH do peito de frango de 5,95, foi superior a 5,6, conforme descrito por Fennema (2000), devido a fatores fisiológicos, condições de abate e conservação. Entretanto, ainda pode ser considerado em condições para o consumo quando o pH apresentar valores entre 5,8 e 6,2, segundo Lanara (1981).

TABELA 2 - Caracterização do peito de frango utilizado no preparo de amostras para desenvolvimento dos métodos indiretos do AF e ELISA

	Umidade (%)	Proteína Total* (%)	pH	AF mg/g
Peito de frango desossado	71,80 (± 0,15)	21,40 (± 0,30)	5,95 (± 0,02)	ND

* Fator de conversão = 6,25

ND = não detectado

Tanto o CPS como o IPS são ingredientes muito utilizados na elaboração de produtos alimentícios, como agente de consistência para produtos derivados de carnes ou como fonte de proteínas.

A Tabela 3 apresenta a caracterização do CPS e IPS utilizados para elaboração de peitos de frango marinado, cujos constituintes foram comparados pelo teste *t* de *Student* (ANEXO 1).

O CPS e IPS foram caracterizados para verificar se atendiam os padrões de identidade e qualidade conforme a Resolução nº 14 , de 28 de junho de 1978 (BRASIL, 1978). O CPS e IPS apresentaram teor de umidade e proteína total distintos (TABELA 3), cujos valores foram respectivamente, 5,65% e 8,52% e 68,42% e 88,65%. O teor de umidade do IPS está acima dos valores descritos na Resolução nº 14, que estabelece um teor de umidade máximo de 8% para o IPS, enquanto que para o CPS o teor de umidade atendeu as especificações desta Resolução, com teor de umidade máximo de 6%. O CPS e IPS apresentaram teor de proteína total de 68,42% e 88,65%, respectivamente, estes valores estão dentro dos valores mínimos de proteína total de 68% para o CPS e 88% para o IPS, estabelecidos pela Resolução nº 14.

O CPS e IPS apresentaram pH de 6,65 e 7,28, respectivamente. A diferença de pH entre estes ingredientes é devido ao distinto processo de produção cujo pH está diretamente relacionado a solubilidade da proteína de soja. A menor solubilidade está no seu ponto isoelétrico entre pH 4,2 e 4,6, sendo que a região de maior solubilidade está em pH acima de 6,0 (LIU, 1996).

O teor do AF do CPS e IPS foram determinados com a finalidade de correlacionar este constituinte com o teor de proteínas de soja adicionadas em peitos de frango marinados. Na tabela 3, observa-se que o CPS e IPS apresentaram teor de AF que diferiram entre si com valores de 17,26 e 18,86 mg/g de amostra pelo teste *t* de Student ($p \leq 0,05$).

TABELA 3 - Caracterização do CPS e IPS utilizados no tampleamento de peitos de frango

	Umidade (%)	Proteína Total* (%)	pH	AF* (mg/g)
Concentrado Protéico	5,65 ^b (± 0,04)	68,42 ^b (± 0,49)	6,65 ^b (± 0,01)	17,26 ^b (± 0,23)
Proteína Isolada	8,52 ^a (± 0,07)	88,65 ^a (± 0,22)	7,28 ^a (± 0,01)	18,86 ^a (± 0,94)

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste *t* de Student ($p \leq 0,05$)

* base seca

A caracterização de marinados de frango e frangos inteiros congelados foi realizada para verificar o pH e umidade de amostras que foram utilizados para

estimativa do teor de proteína de soja. O pH dos marinados de frango variou de $5,87 \pm 0,01$ a $6,91 \pm 0,01$ e umidade de $71,67 \pm 0,09\%$ a $76,44 \pm 0,20\%$ (TABELA 4). Os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade para carnes e produtos cárneos (BRASIL, 2001) que estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade de pratos elaborados ou semi-prontos de origem animal não prescreve sobre pH e umidade. Entretanto, o pH superior ao da carne “in natura” observado em algumas amostras foi devido a adição de ingredientes como os polifosfatos (LEMOS *et al.*, 1999). O teor de umidade foi utilizado para expressar o teor de proteína de soja em base seca determinado pelos métodos indiretos do AF e ELISA. O pH dos frangos inteiros congelados variou de $5,84 \pm 0,06$ a $6,19 \pm 0,01$ (TABELA 5) e está dentro do limite descrito por Lanara (1981), que estabelece o pH de 5,8 a 6,2 para carne fresca em condições de consumo. O teor de umidade destes frangos inteiros foi de $73,18 \pm 0,05\%$ a $76,31 \pm 0,04\%$ (TABELA 5) e está acima do descrito por Fennema (2000), para carnes de frango com teor de umidade de 73%. Este excesso de umidade provavelmente foi devido a etapa de pré-resfriamento de carcaças de aves realizada em água resfriada. No Brasil o teor de umidade é fiscalizado pela Portaria SDA nº 210, de 10 de novembro de 1998 (BRASIL, 1998) que determina que a absorção de água de carcaças de aves submetidas ao pré-resfriamento por imersão em água resfriada, não deve ultrapassar a 8% de seus pesos. Este controle pode ser realizado a nível industrial pela diferença de peso de carcaças submetidas antes e após o resfriamento em água fria ou realizado pelo método de gotejamento (“Drip Test”), que consiste em escorrer a água da carcaça após descongelamento seguido de pesagem. Esta diferença de peso expressa em porcentagem (%) e a quantidade de água não deve ultrapassar o limite

de 6%. O teor de AF de frangos marinados e frangos inteiros congelados estão apresentados nas Tabelas 8 e 9.

TABELA 4 - Umidade e pH de frangos marinados de diferentes marcas comerciais

Frango marinado	pH	Umidade (%)
A	6,30 ± 0,01	76,36 ± 0,03
B	6,91 ± 0,01	75,13 ± 0,01
C	5,87 ± 0,01	75,57 ± 0,42
D	5,97 ± 0,01	76,44 ± 0,20
E	6,11 ± 0,02	71,94 ± 0,96
F	6,20 ± 0,03	71,67 ± 0,09

TABELA 5 - Umidade e pH de frangos inteiros congelados de diferentes marcas comerciais

Frango inteiro congelado	pH	Umidade
A	6,09 ± 0,01	76,31 ± 0,04
B	6,19 ± 0,04	74,55 ± 0,89
C	6,11 ± 0,11	75,29 ± 0,70
D	6,06 ± 0,12	75,22 ± 0,11
E	6,18 ± 0,06	74,64 ± 0,40
F	6,12 ± 0,08	73,60 ± 0,02
G	6,19 ± 0,01	76,25 ± 0,01
H	6,19 ± 0,03	73,56 ± 0,23
I	6,02 ± 0,12	73,18 ± 0,05
J	5,84 ± 0,06	74,56 ± 0,37

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDIRETO DO AF PARA ESTIMATIVA DO TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA EM PRODUTOS MARINADOS

Foram considerados na validação do método indireto do AF para estimativa de proteínas de soja os seguintes critérios: exatidão, precisão, especificidade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. Foi utilizado como referência as amostras de peito de frango marinado contendo concentrações crescentes de 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 e 1,25 g de CPS ou IPS em 100 g de peito de frango.

5.2.1 Exatidão e precisão

A exatidão do método indireto do AF para estimativa do teor de proteínas de soja em frangos marinados foi calculada pela porcentagem de sua recuperação em relação aos dois ingredientes adicionados em peitos de frango. Este método foi considerado satisfatório, uma vez que os resultados de recuperação do teor de AF para o CPS variou de $77,0 \pm 4,9\%$ a $87,3 \pm 1,1\%$ (TABELA 6) e para IPS de $68,9 \pm 5,5\%$ a $85,3 \pm 2,1\%$ (TABELA 7).

Para determinação da precisão foi considerado o teor de AF em marinados e seus respectivos desvios padrões (s) para todas as concentrações de CPS ou IPS adicionados, cujos coeficientes de variação ($CV\%$) variaram de 1,2 a 6,3% e 2,4 a 7,9% conforme apresentado nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Segundo

Pimentel-Gomes (2000) quanto menor o coeficiente de variação ($CV\%$) mais preciso o experimento, sendo considerado abaixo de 10% um bom coeficiente de variação ($CV\%$), ou seja, este método indireto para estimativa do teor de proteínas de soja em produtos marinados pode ser considerado um método químico preciso.

TABELA 6 - Validação do método indireto do AF para estimativa do teor de proteínas de soja em produtos marinados com CPS (n=45)

g de CPS /100g de peito de frango	mg de AF/g de marinado	Recuperação do AF em marinados		
		mg de AF/g de marinado	% de recuperação média do AF e s	$CV\%$
0,25	0,041	0,031 ± 0,002	77,0 ± 4,9	6,3
0,50	0,081	0,065 ± 0,003	80,3 ± 4,6	5,7
0,75	0,122	0,101 ± 0,003	82,7 ± 3,0	3,6
1,00	0,163	0,140 ± 0,002	85,8 ± 1,5	1,3
1,25	0,203	0,177 ± 0,002	87,3 ± 1,1	1,2

s = desvio padrão

$CV\%$ = coeficiente de variação

TABELA 7 - Validação do método indireto do AF para estimativa do teor de proteínas de soja em produtos marinados com IPS (n=45)

g de IPS/100g de peito de frango	mg de AF/g de marinado	Recuperação do AF em marinados		
		mg de AF/g de marinado	% de recuperação média do AF e s	$CV\%$
0,25	0,043	0,029 ± 0,002	68,9 ± 5,5	7,9
0,50	0,086	0,061 ± 0,003	69,8 ± 4,0	5,7
0,75	0,129	0,099 ± 0,003	77,0 ± 3,0	3,8
1,00	0,172	0,146 ± 0,003	84,7 ± 2,3	2,7
1,25	0,216	0,183 ± 0,003	85,3 ± 2,1	2,4

s = desvio padrão

$CV\%$ = coeficiente de variação

5.5.2 Especificidade

A especificidade do método indireto do AF para estimativa do teor de proteínas de soja em marinados foi avaliada a partir da determinação do teor de AF adicionado no peito de frango (n=3) utilizando uma solução padrão de AF na concentração de 0,1725 mg de AF/g de peito de frango e comparada com amostras de peito de frango controle sem adição de AF ou proteínas de soja. A recuperação do AF adicionado na amostra de peito de frango foi de $86,47 \pm 2,2\%$, cujo valor foi próximo aos marinados de $85,8 \pm 1,5\%$ e $84,7 \pm 2,3\%$ com 1 g de CPS ou IPS em 100 g de frango marinado, respectivamente. Não foi detectada a presença de AF nas amostras controle, indicando assim, uma boa especificidade do método. Estes resultados demonstraram que a recuperação do AF não foi afetada pela matriz cárnea.

5.2.3 Linearidade

A linearidade do método indireto do AF para estimativa de proteínas de soja em frangos marinados foi determinada a partir da construção das curvas de calibração utilizando peitos de frango marinados com concentrações crescentes de 0,25 a 1,25 g de CPS ou IPS em 100 g de peito de frango versus mg de AF/g do marinado. As curvas de calibração podem ser observadas nas Figuras 7 e 8, respectivamente. As regressões lineares foram significativas ($p \leq 0,05$). Os coeficientes de correlação (r) 0,9845 e 0,9828, ou seja, 98,45% e 98,28% das variações foram explicadas pelo

modelo com um bom ajuste aos dados experimentais, respectivamente (ANEXO 2). As equações de retas obtidas não interceptaram a origem indicando que existe uma concentração mínima de CPS ou IPS adicionados em peitos de frango marinados cuja concentração de AF não foi detectado. Neste método, as concentrações mínimas de CPS ou IPS adicionadas em peito de frango marinados foram correspondentes ao valor de b (intercepto da origem), ou seja, de 0,067 ($\pm 0,021$) e 0,113 ($\pm 0,020$), respectivamente. A adição de CPS ou IPS nestas concentrações não são usuais em frangos marinados.

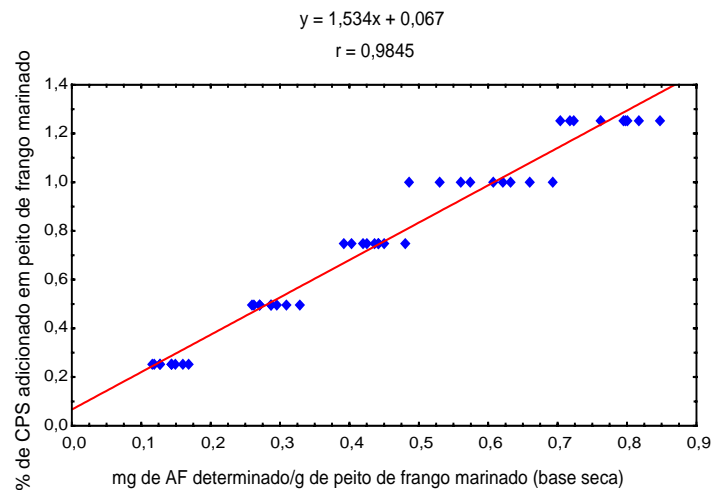


FIGURA 7 – Porcentagem de CPS adicionado (n=45) em peito de frango em relação ao teor de AF estimado no peito de frango marinado

A equação de reta obtida (FIGURA 7) para o peito de frango marinado com CPS versus mg de AF/g de frango marinado está apresentada conforme segue:

$$y_{CPS} = 1,534 (\pm 0,042)x + 0,067 (\pm 0,021) + (\pm 0,063) \quad (\text{equação 1})$$

onde:

y = % de CPS adicionada em peito de frango marinado

x = mg de AF/g de peito de frango marinado (base seca)

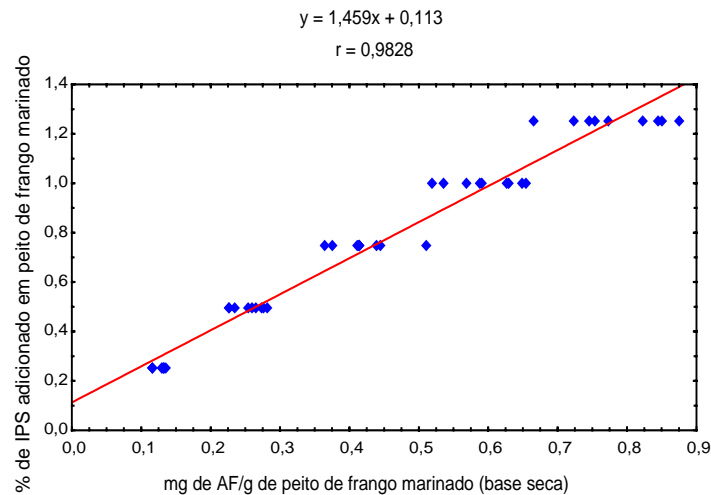


FIGURA 8 – Porcentagem de IPS adicionado (n=45) em peito de frango em relação ao teor de AF estimado no peito de frango marinado

A equação de reta obtida (FIGURA 8) para o peito de frango marinado com IPS versus mg de AF/g de frango marinado está apresentada conforme segue:

$$y_{PIS} = 1,459 (\pm 0,041)x + 0,113 (\pm 0,020) + (\pm 0,067) \quad (\text{equação 2})$$

onde:

y = % de IPS adicionada em peito de frango marinado

x = mg de AF/g de peito de frango marinado (base seca)

5.2.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método indireto do AF foram determinados com base nos respectivos desvios padrões (s) e nas inclinações das curvas de calibração construídas a partir de peitos de frango marinados conforme o item 5.2.3.

Os limites de detecção (LD) do AF em marinados com CPS ou IPS foram similares e iguais a 0,045 mg de AF/g de frango marinado, que multiplicado pelo fator de correlação (f) de 1,65 (item 5.2.5) corresponderam a 0,074 g de CPS ou IPS em 100 g de frango marinado, conforme segue:

Limite de detecção para marinados (LD)

$$LD_{CPS} = 0,021 \times 3,3 / 1,534 = 0,045 \text{ mg de AF/g de marinado}$$

$$LD_{IPS} = 0,020 \times 3,3 / 1,459 = 0,045 \text{ mg de AF/g de marinado}$$

Os limites de quantificação (LQ) para o AF em marinados com CPS ou IPS foram similares e iguais a 0,137 mg de AF em 100 g de frango marinado, que multiplicado pelo fator de correlação (f) de 1,65 (item 5.2.5) corresponderam a 0,23 g de CPS ou IPS em 100 g de frango marinado.

Limites de quantificação para marinados (LQ)

$$(LQ)_{CPS} = 0,021 \times 10 / 1,534 = 0,137 \text{ mg de AF/g de marinado}$$

$$(LQ)_{PIS} = 0,020 \times 10 / 1,459 = 0,137 \text{ mg de AF/g de marinado}$$

5.2.5 Fator de correlação

O fator de correlação (f) do método indireto do AF para estimativa do teor de proteínas de soja em marinados foi determinado a partir da construção de curvas de calibração e utilização de peitos de frango marinados com concentrações crescentes de 0,25 a 1,25 g de CPS ou IPS em 100 g de peito de frango versus mg de AF/g do marinado. Os resultados podem ser observados nas Figuras 9 e 10. As equações de retas obtidas do tipo $y = ax$, onde a inclinação da reta (a) correspondeu ao fator de correlação (f) que foi utilizado para quantificação indireta de proteínas de soja a partir do AF de marinados. Pelas regressões lineares foram obtidas as equações de reta que passam pela origem, conforme segue:

Para o CPS:

$$y_{CPS} = 1,6534 (\pm 0,021) x \quad (\text{equação 3})$$

Para o IPS:

$$y_{IPS} = 1,6587 (\pm 0,027) x \quad (\text{equação 4})$$

onde:

x = AF em mg/g em base seca de peito de frango marinado

y = proteína de soja em peito de frango marinado

Verificou-se que as regressões lineares foram significativas ($p \leq 0,05$) e os coeficientes de correlação (r) foram de 0,9845 e 0,9828, ou seja, 98,45% e 98,28% das variações foram explicadas pelos modelos com um bom ajuste aos dados experimentais, respectivamente.

Embora as concentrações do teor do AF do CPS ou IPS adicionados em marinados foram distintas e maior no IPS, a sua recuperação foi menor em marinados com este ingrediente. Assim, as inclinações das retas $a = x/y$ para CPS e IPS corresponderam aos fatores de 1,6534 e 1,6587, respectivamente, sendo considerado 1,65 o fator médio utilizado para estimar indiretamente as proteínas de soja adicionadas em frangos marinados (ANEXO 3).

Kloczko e Rutkowski (1979) não observaram em produtos cárneos contendo 2, 4, e 6% de concentrados e isolados protéicos de soja uma correlação entre o fósforo total e o teor de proteínas de soja adicionadas. Enquanto que o teor de ácido fítico variou significativamente nos derivados protéicos de soja e não foi possível correlacionar ácido fítico e proteínas de soja adicionadas em produtos cárneos.

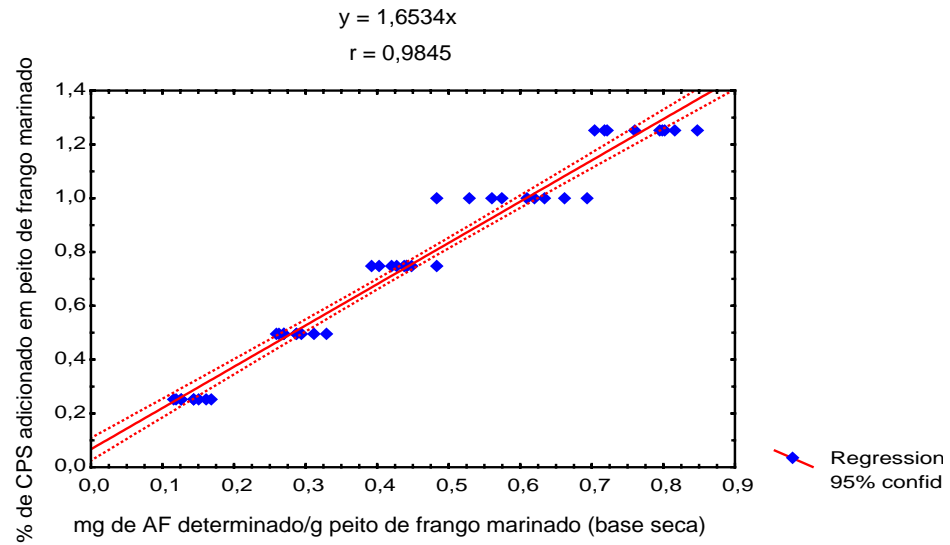


FIGURA 9 – Correlação entre a porcentagem de CPS adicionado em peito de frango e teor de AF estimado no peito de frango marinado (n=45)

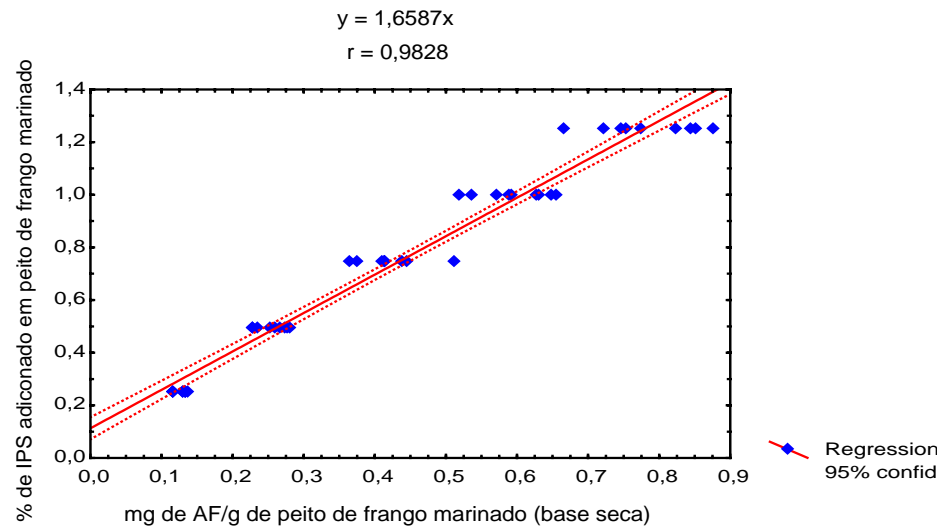


FIGURA 10 - Correlação entre a porcentagem de IPS adicionada em peito de frango e teor de AF estimado no peito de frango marinado (n=45)

5.3 ESTIMATIVA DO TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA EM MARINADOS E FRANGOS INTEIROS CONGELADOS PELO MÉTODO INDIRETO DO AF

Uma vez estabelecida a correlação entre o teor do AF dos marinados e proteínas de soja adicionadas, aplicou-se o método indireto do AF para estimar o teor de proteínas de soja em carnes de frango e marinados. Para simulação desta estimativa foram analisadas 10 amostras de frango inteiro congelado e 6 amostras de frango marinado de diferentes procedências comerciais disponíveis. O procedimento para quantificação do teor de AF foi o descrito no item 4.2.4.

Os resultados da estimativa do teor de proteína de soja pelo método indireto do AF de 06 amostras de frango marinados e 10 frangos inteiros congelados estão apresentados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

A partir da aplicação do método indireto do AF de 06 amostras de frangos marinados obteve-se teor distinto que variaram de $0,11 \pm 0,02$ a $1,48 \pm 0,19\%$ de AF (TABELA 8). Na Tabela 9, observa-se que das 10 amostras de frango inteiro congelado, uma apresentou teor de AF de $0,41 \pm 0,09$ mg/g, enquanto que nas 9 amostras restantes não foi detectada a adição de proteína de soja.

TABELA 8 - Estimativa do teor de proteína de soja de frango marinado pelo método indireto do AF

Frango marinado	Teor de AF* (mg/g)	Proteína de soja* (%)
A	0,14 ± 0,01	1,01 ± 0,03
B	1,48 ± 0,19	9,87 ± 0,32
C	0,14 ± 0,02	0,92 ± 0,05
D	0,11 ± 0,02	0,79 ± 0,05
E	0,30 ± 0,01	1,82 ± 0,01

* base seca

TABELA 9 - Estimativa do teor de proteína de soja de frango inteiro congelado pelo método indireto do AF

Frango inteiro congelado	Teor de AF* (mg/g)	Proteína de soja* (%)
A (n=1)	0,41 ± 0,09	3,22 ± 0,06
Demais amostras (n=9)	ND	-

*base seca

n = número de amostras

ND = não detectado

Considerando o fator de conversão do teor de AF para proteína de soja igual a 1,65 (equação 3 e 4) do item 5.2.5 para CPS e IPS, multiplicou-se pelo teor do AF e foi obtido o teor estimado de proteína de soja em frangos marinados (TABELA 8) e frangos inteiros congelados (TABELA 9).

Observa-se na Tabela 8 que o teor de proteína de soja adicionada em frangos marinados de diversas marcas variou de 0,79 ± 0,05 a 9,87 ± 0,32 g em 100 g de frango marinado. Todos os rótulos informaram que continham proteína de soja,

porém sem informação da sua concentração. Do ponto de vista legal quanto a rotulagem, 5 amostras de frangos marinados atenderam a especificação ao informarem o ingrediente adicionado. Enquanto que uma amostra não atendeu o descrito no rótulo, embora a quantificação do teor de AF tenha sido efetuada várias vezes, não foi detectado a sua presença, que indicaria a possível adição do ingrediente de soja. Desta forma, para este produto o consumidor estaria sendo enganado.

Na legislação brasileira para frangos marinados a adição de proteínas de soja como um ingrediente é opcional e em frangos inteiros não é permitida. Já é reconhecida a importância da adição de proteínas de soja como ingrediente para atender a sua funcionalidade em diversos produtos de origem animal. Entretanto, a legislação deveria estabelecer um limite de adição para evitar fraudes quanto ao abuso de utilização destes ingredientes. Para os frangos inteiros e congelados a Portaria Nº 15, de 26 abril de 2000 (BRASIL, 2000a) prescreve que é proibido a adição de ingredientes de soja. Em uma amostra de frango inteiro foi detectada a adição de proteína de soja, ao redor de 3 g em 100 g de amostra em base seca, indicando que o produto está sendo comercializado na forma fraudulenta.

5.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNA DA SOJA

A produção de anticorpos policlonais anti-proteína da soja do coelho (C1) apresentou absorvância doze vezes superior ao pré-imune (controle) após a quarta inoculação (13^a semana). O soro do coelho C2 e C3 foram descartados devido a baixa resposta ao antígeno IPS, uma vez que a absorvância do soro do C2 foi igual a três

vezes a absorvância do soro pré-imune e o C3 foi similar ao soro pré-imune (FIGURA 12). Posteriormente, foram coletas cerca de 18 mL de sangue do C1 em períodos que variaram de 1 a 2 semanas para recuperação do peso do animal. Desta forma, o soro de C1 foi empregado para a padronização do método de ELISA indireto para quantificar as proteínas de soja de frangos marinados.

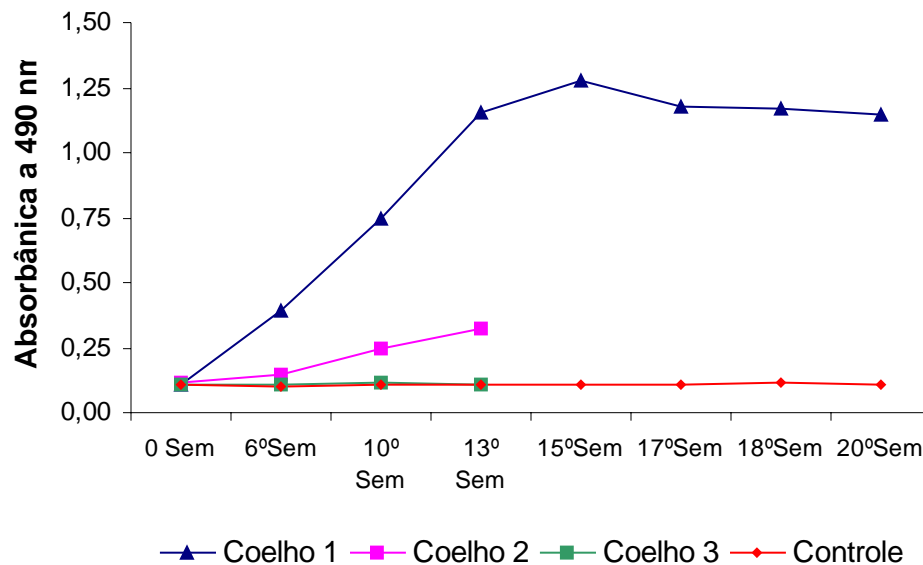


FIGURA 11 – Resposta imune humoral (IgG) de coelhos imunizados com proteína de soja avaliada por ELISA indireto

5.5 Diluição Ideal do Soro Anti-Proteína da Soja

A diluição ideal do soro determinada por ELISA foi 1:100 em relação a 50 ng de IPS, cuja absorvância foi ao redor de 1,0. Este foi utilizado para padronização do método de ELISA indireto. Tukur *et al.* (1996) utilizaram diferentes frações protéicas da

soja em ensaios imunológicos para detecção de proteínas de soja em produtos cárneos e observaram que a fração 7S foi a mais imunogênica. Macedo-Silva *et al.* (2001) investigaram a produção de anticorpos policlonais a partir da fração 7S da soja para quantificar o teor de proteína de soja adicionada em hambúrgueres e obteve o título de 1:500 em relação a 40 ng da fração 7S. Assim, foi possível produzir anticorpos policlonais anti-proteína da soja e devido a sua elevada especificidade de reconhecer estas proteínas não foi necessário a sua purificação.

5.6 PREPARO DE AMOSTRA PARA APLICAÇÃO DO MÉTODO ELISA INDIRETO

A curva padrão (FIGURA 12) obtida a partir de diferentes concentrações de IPS adicionadas em peito de frango marinado com finalidade de simular as mesmas condições das amostras que foram analisadas apresentou uma regressão linear significativa ($p \leq 0,05$) e o coeficiente de correlação (r) igual a 0,9851, indicando que 98,51% da variação foi explicada pelo modelo, ou seja, houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais (ANEXO 4). A Figura 10 apresenta a curva padrão de absorbâncias a 490 nm (soro 1:100) cujas leituras estão entre 0,335 e 0,562 para diferentes concentrações de IPS adicionados em peitos de frango marinados. Macedo-Silva *et al.* (2001) construíram duas curvas padrões, com proteína texturizada de soja (PTS) e hambúrguer com proteína de soja e observaram que para quantificação de proteínas de soja em produtos cárneos os resultados foram afetados quando utilizaram as duas curvas distintas, sendo que a curva com as amostras de hambúrguer

adicionado de PTS apresentou resultados reais, devido a similaridade entre padrão e amostra. Porém, ao utilizar como padrão PTS o resultado foi superior ou superestimado, uma vez que não ocorreu uma possível competição na adsorção à microplaca de poliestireno entre as proteínas da soja e proteínas dos produtos cárneos. Desta forma, nesta investigação foi utilizada a curva padrão construída a partir de peito de frango marinado contendo concentrações crescentes de até 4% de IPS, que refletiu as condições similares das amostras. A partir da regressão linear foi obtida a seguinte equação:

$$y = 0,056x + 0,333 \quad (\pm 0,101) \quad \text{(equação 5)}$$

onde:

y = absorvância a 490nm

x = % de proteína de soja adicionada em marinados de frango

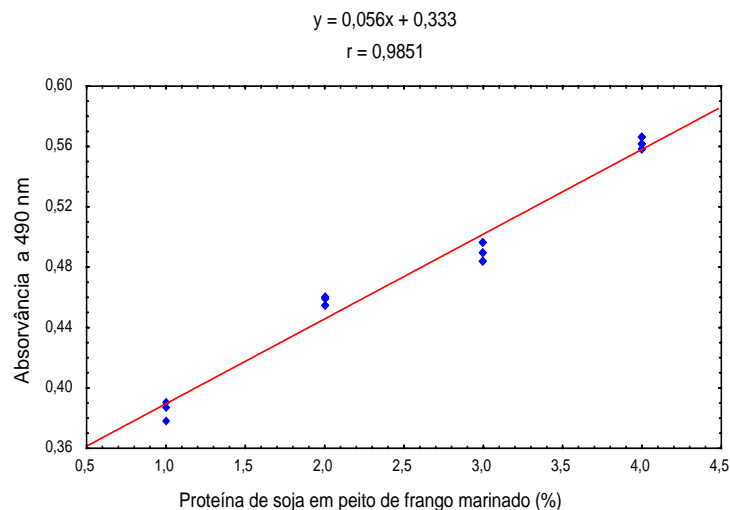


FIGURA 12 – Curva padrão com peito de frango marinado contendo IPS pelo método de ELISA indireto

5.7 REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNA DA SOJA COM CPS E IPS

A reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja produzidos em relação ao CPS e IPS foi confirmada através do método de ELISA indireto. A relação de reatividade de IPS e CPS foi 1:1,08, respectivamente e os resultados estão apresentados na Figura 13. Pelo teste *t* de *Student* indicou que as amostras CPS e IPS nas concentrações de 50 ng (ANEXO 5) apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$), devido a diferença no teor de proteínas presentes nestes ingredientes, ou seja, de 68% e 88%, respectivamente. Macedo-Silva *et al.* (2001) compararam a reatividade do IPS com a PTS cuja relação foi de 1:2,04 e esta diferença também foi atribuída a diferentes concentrações de proteínas de 90 e 50%, respectivamente. Hitchcock *et al.* (1981) determinaram que a relação da reatividade do soro produzido a partir de proteína de soja renaturada para IPS e CPS foi 1:1,30, respectivamente. A relação de reatividade do IPS e CPS de 1:1,08 indicaram que os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios. A produção de anticorpos policlonais anti-proteína da soja a partir do IPS é simples, viável e uma vez produzido é estável e pode ser utilizado para quantificar simultaneamente proteínas de soja pelo método de ELISA indireto.

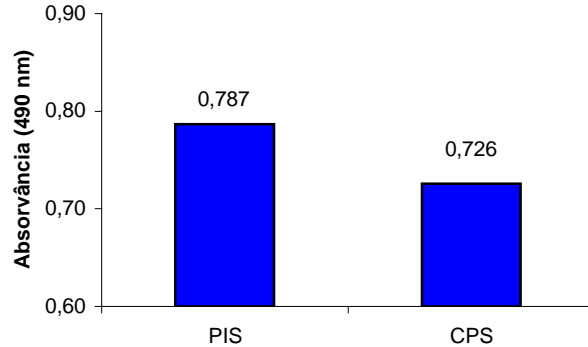


FIGURA 13 - Reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja (1:100) com 50 ng de CPS ou IPS

5.8 REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNA DA SOJA COM MARINADOS

A reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja produzidos foi comparada em relação a frangos marinados contendo 1% de IPS ou aquecidos a 100°C durante 30 minutos e os resultados estão apresentados na Figura 14. A comparação das duas amostras utilizando o teste *t* de *Student* (ANEXO 6) indicou que as absorvâncias não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$), demonstrando que nas condições do tratamento térmico do marinado a reatividade do imunoenensaio não foi afetada, indicando que o anticorpo produzido também poderá ser útil para reconhecer as proteínas de soja de produtos cozidos. Porém, Griffiths *et al.* (1984) ao investigarem a reatividade de amostras de produtos cárneos verificaram que a reatividade foi afetada quando submetidas a 121°C durante 30 minutos.

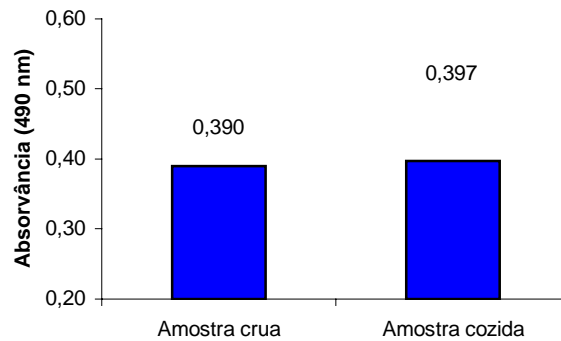


FIGURA 14 - Reatividade dos anticorpos policlonais anti-proteína da soja (1:100) com marinados de frango sem e com aquecimento a 100°C durante 30 min. contendo 1% de IPS

5.9 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA PELO MÉTODO DE ELISA INDIRETO

Os resultados da estimativa do teor de proteína de soja pelo método de ELISA indireto de 06 amostras de frango marinados e 10 frangos inteiros congelados estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

A partir da aplicação do método de ELISA indireto de 06 amostras de frangos marinados obteve-se teor de proteína de soja distintos que variaram de $1,03 \pm 0,11$ a $7,24 \pm 0,94$ g de proteína de soja em 100 g de frango marinado (TABELA 10). Na tabela 11, observa-se que das 10 amostras de frango inteiro congelado, uma continha proteína de soja com teor de $2,08 \pm 0,45$ g de proteína de soja em 100 g de amostra, enquanto que nas 9 amostras restantes não foi detectado a sua presença.

TABELA 10 - Quantificação do teor de proteína de soja em frango marinado pelo método de ELISA indireto

Frango marinado	Proteína soja* (%)
A	1,03 ± 0,11
B	7,24 ± 0,94
C	1,35 ± 0,14
D	1,23 ± 0,35
E	1,63 ± 0,15

* base seca

Dos 10 frangos inteiros congelados analisados, em uma amostra foi detectada a presença de proteína de soja de $2,08 \pm 0,45$ g de proteínas de soja em 100 g de frango, embora não descrita no rótulo. Assim, este método de ELISA indireto também pode ser utilizado para detectar ou quantificar proteínas de soja em produtos cárneos atendendo o consumidor quanto ao aspecto legal de rotulagem e padrão de identidade e qualidade.

TABELA 11 – Quantificação de proteína de soja em frangos inteiros congelados pelo método de ELISA indireto

Frango inteiro congelado	Proteína de soja* (%)
A (n=1)	2,08 ± 0,45
Demais amostras (n=9)	ND

* base seca
n = número de amostras
ND = não detectado

5.10 COMPARAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA PELOS MÉTODOS INDIRETOS DO AF E ELISA

Os resultados da estimativa do teor de proteína de soja pelos métodos indiretos do AF e ELISA de 06 amostras de frango marinado e 10 frangos inteiros congelados foram comparados (TABELA 12). Destas, uma amostra de frango marinado e nove amostras de frango inteiro congelado não foram detectadas proteínas de soja por ambas metodologias. A Tabela 12 apresenta a estimativa do teor de proteína de soja em frango marinado pelos métodos indiretos do AF e ELISA. A precisão dos métodos foi medida pelos seus coeficientes de variação (*CV%*). Na metodologia do AF o coeficiente de variação (*CV%*) médio foi de 3,39% e para o método de ELISA indireto foi de 17,32%, indicando que o método indireto do AF apresentou menor variabilidade e portanto, considerado como o mais preciso. O método de ELISA indireto apresentou coeficiente de variação (*CV%*) inferior a 20% e segundo Pimentel-Gomes (2000) os métodos biológicos podem ser considerados como precisos considerando a variabilidade das condições do ensaio. Pelo teste *t* de *Student* quatro amostras analisadas (TABELA 12) pelos dois métodos apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) (ANEXO 7).

TABELA 12 - Comparação entre os métodos indiretos do AF e ELISA para quantificar proteínas de soja em frangos marinados e frangos inteiros

Frango marinado Diversas marcas	Proteína de soja-AF* g/100 de amostra	CV%	Proteína de soja-ELISA* g/100g de amostra	CV%
A	1,01 ± 0,03 ^a	2,97	1,03 ± 0,11 ^a	10,68
B	9,87 ± 0,32 ^a	3,24	7,24 ± 0,94 ^b	12,98
C	0,92 ± 0,05 ^b	5,43	1,35 ± 0,14 ^a	10,37
D	0,79 ± 0,05 ^b	6,32	1,23 ± 0,35 ^a	28,46
E	1,82 ± 0,01 ^a	0,54	1,63 ± 0,15 ^a	9,20
Frango inteiro	3,22 ± 0,06 ^a	1,86	2,08 ± 0,45 ^b	21,64

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste *t* de *Student* a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

* base seca

A partir dos resultados dos dois métodos verificou-se que a regressão linear foi positiva e o coeficiente de correlação (r) foi de 0,9713, ou seja, 97,13% das variações foram explicadas pelos modelos com um bom ajuste aos dados experimentais conforme apresentado na Figura 15 e Anexo 8. Observa-se também que houve uma correlação positiva entre ambos os métodos.

Para estimar o teor de proteínas de soja pelo método indireto do AF de cinco amostras de frango marinados de diversas marcas necessita-se previamente de uma curva padrão construída com frangos marinados adicionados de concentrações conhecidas de proteínas de soja para obtenção do seu fator de correlação. A limitação para aplicação deste método é que as indústrias de produtos cárneos utilizam ingredientes de proteínas de soja de várias procedências ou diferentes tipos ou misturas que podem conter também diferentes concentrações de AF. Este método

também é importante uma vez que analiticamente pode detectar ausência ou presença de proteínas de soja adicionados em produtos cárneos conforme estabelecido na legislação ou para detecção de fraude.

A vantagem dos dois métodos está na especificidade de detectar proteínas de soja, embora, não identifica a origem se concentrado, isolado, texturizado ou misturas destas fontes protéicas. Os dois métodos podem ser considerados válidos para estimar proteínas de soja em frangos marinados. Entretanto, considerando o custo/benefício, velocidade, obtenção de resultados, variabilidade do método, precisão e exatidão, o método indireto do AF foi o mais vantajoso. Embora, o método de ELISA indireto apresenta vantagens de analisar simultaneamente várias amostras após padronização das condições de ensaio.

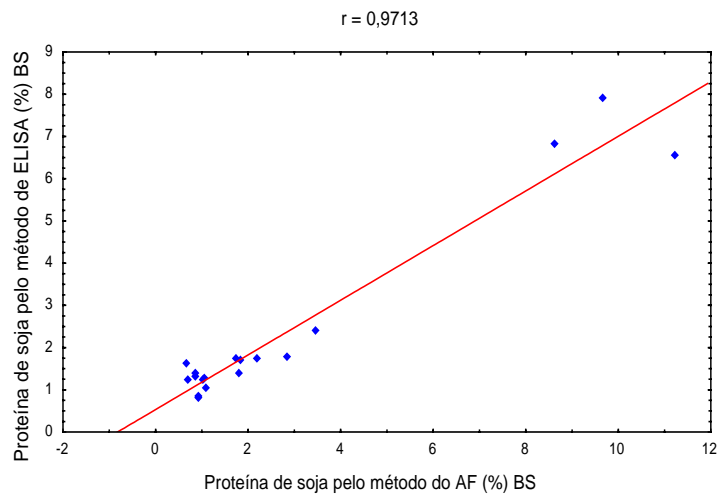


FIGURA 15 - Correlação entre o teor estimado de proteína de soja em peito de frango marinado e frango inteiro congelado pelos métodos indiretos do AF e Elisa

6 CONCLUSÕES

O método indireto do ácido fítico foi desenvolvido e validado para estimar proteínas de soja de frangos marinados através da quantificação do teor do ácido fítico presente nas proteínas de soja adicionadas em frangos marinados.

Os anticorpos policlonais anti-proteína da soja reconhecem as proteínas de soja em frangos marinados com ou sem aquecimento.

O método de ELISA indireto foi padronizado para detectar e quantificar proteínas de soja em frangos marinados.

A concentração de proteínas de soja determinada pelos métodos indiretos do ácido fítico e ELISA de seis frangos marinados de diferentes procedências variou respectivamente, entre 0 e $9,87 \pm 0,32$ g de proteínas de soja em 100 g de frango marinado e 0 e $7,24 \pm 0,94$ g de proteínas de soja em 100 g de frango marinado em base seca.

Aplicando os métodos indiretos do ácido fítico e ELISA para quantificação de proteínas de soja em dez frangos inteiros congelados de diferentes marcas, verificou-se que nove amostras não continham proteínas de soja e apenas uma amostra apresentou o teor de $3,22 \pm 0,06$ g de proteínas de soja em 100 g de frango e $2,08 \pm 0,45$ g de proteínas de soja em 100 g de frango, respectivamente.

Os dois métodos indiretos para quantificação de proteínas de soja em frangos marinados, frangos inteiros congelados ou resfriados apresentaram uma alta correlação de 97% e sem diferenças significativas entre si.

O método indireto do ácido fítico para quantificação de proteínas de soja em produtos de frango foi mais vantajoso do que o método de ELISA indireto devido a

simplicidade, maior precisão e menor custo, uma vez que a maioria dos equipamentos, vidrarias e reagentes utilizados na execução deste método eram de uso comum ao laboratório. Não foram necessários equipamentos sofisticados e climatização de ambientes, podendo facilmente ser implementado em qualquer laboratório de controle de qualidade ou inspeção de alimentos.

Os dois métodos são válidos para estimar e detectar proteínas de soja e podem ser recomendados como métodos para detecção de fraudes em frangos marinados, frangos inteiros congelados ou resfriados.

REFERÊNCIAS

ABEF, 2003. Associação Brasileira de Exportadores de Frangos. Disponível em <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em 06 jun. 2003.

ABEF, 2004. Associação Brasileira de Exportadores de Frangos. Disponível em <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em 18 fev. 2004.

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.3S, p.581S-588S, 1995.

AOAC Official Methods of Analysis, 1995. AOAC Official Method 998.10, **Soy Protein in Raw and Heat-Processed Meat Products – Enzyme-linked Immunosorbent Assay**, First Action, 1995.

AVISITE, 2003. Estatísticas e preços. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br>>. Acesso em 19 fev. 2003.

BARRETO, A. C. S. ; IDA, E. I. ; SILVA, R. S. F. ; TORRES, E. A. F. S. ; SHIMOKOMAKI, M. Empirical models for describing poultry meat lipid oxidation inhibition by natural antioxidants. **Journal of Food Composition and Analysis**, n.16, p.587-594, 2003.

BENDALL, J. R. ; SWATLAND, H. J. A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. **Meat Science**, v.24, n.2, p.85-126, 1988.

BLANK, G. E. ; PLETCHER, J. ; SAX, M. The structure of myo-inositol hexaphosphate dodecasodium salt octatriacontahydrate: a single crystal X-ray analysis. **Biochemistry Biophysical Community**, v.44, p.319-325, 1971.

BLANTY, P. ; KVASNICKA, F. ; KENNDLER, E. Determination of phytic acid in cereal grains, legumes and feeds by capillary isotachopheresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.129-133, 1995.

BRASIL. (1978). Leis, Decretos, etc. **Portaria nº 115, de 25 de julho de 1978**. Diário Oficial da União, Brasília, 01/08/1978.

BRASIL. (1998). Leis, Decretos, etc. **Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998**. Diário Oficial da União, Brasília, 26/11/1998.

BRASIL. (2000) **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade para Carnes e Produtos Carneos**, em conformidade com os anexos da Instrução Normativa publicada no Diário Oficial da União, Brasília, em 05/04/2000.

BRASIL. (2000a). Leis, Decretos, etc. **Portaria nº 15, de 26 de abril de 2000**. Diário Oficial da União, Brasília, 28/04/2000.

BRASIL. (2000b). **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade para Carnes e Produtos Cárneos**, em conformidade com os anexos da Instrução Normativa publicada no Diário Oficial da União, Brasília, 03/08/2000.

BRASIL. (2001). **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade para Carnes e Produtos Cárneos**, em conformidade com os anexos da Instrução Normativa publicada no Diário Oficial da União, Brasília, 19/02/2001.

BRASIL. (2003). **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, em conformidade com a Resolução nº. 899, de 29 de maio de 2003 publicada no Diário Oficial da União, Brasília, 02/06/2003.

BURBANO, C. ; MUZQUIZ, M. ; OSAGIE, A. ; AYET, G. ; CUADRADO, C. Determination of phytate and lower inositol phosphate in Spanish legumes by HPLC Methodology. **Journal Food Chemistry**, v.52, p.321-325, 1995.

COSTELLO, A. J. ; GLONEK, T. ; MYRES, T. C. 31P nuclear magnetic resonance-pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. **Carbohydrate Research**, v.46, n.2, p.159-171, 1976.

De BOEVER, J. L. ; EECKHOUT, W. ; BOUCQUE, C. V. The possibilities of near infrared reflection spectroscopy to predict total-phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in vegetable feedstuffs. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, n.42, p.357-369, 1994.

De KONING, A. J. Determination of myo-inositol and phytic acid by gas chromatography using scyllitol as internal standard. **Analyst**, n.119, p.1319-1323, 1994.

DIRINCK, P. ; DE WINNE, A. ; CASTEELS, M. ; FRIGG, M. Studies on vitamin E and meat quality. 1. Effect of feeding high vitamin E levels on time-related pork quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.65-68, 1996.

ELLIS, R. ; MORRIS, R. Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. **Cereal Chemistry**, v.63, n.1, p.58-59, 1986.

EMBRAPA, 2002. Soja – Safra 2000/01, Produção Mundial. Disponível em <<http://www.embrapa.gov.br/soja/safra.2001-01.htm>>. Acesso em 01 de outubro de 2002.

EMBRAPA, 2003. Área, Produtividade e Produção de Soja em Diversos Países. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/html>>. Acesso em 30 de novembro de 2003.

ENGVALL, E. ; PERLMAN, P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of IgG. **Immunochemistry**, v.8, p.871-874, 1971.

ERDMAN, JR. J. W. Oilseed phytates: Nutricional Implications. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.56, p.736-741, 1979.

FENNEMA, O. R. **Química de los Alimentos**. Editora Acribia, S.A., p.249-250, 2000.

FERREIRA, M.A. Aditivos: a irresistível tendência dos blends. **Revista Nacional da Carne**, n.8, p.18-30, 1998.

FUJITA, Y. ; MORI, I. ; TANAKA, T. ; KOSHIYAMA, Y. ; KAWABE, H. **Application of o-hydroxyhydroquinonephthalein-iron(III) complex to determination of organic compounds containing phosphorus**. Chemical Pharmaceutical Bulletin, v.34, p.2236-2238, 1986.

GAZZAZ, S. S. ; RASCO, B. A. ; DONG, F. M. Application if immunochemical assays to food analysis. **Critical review in Food Science and Nutrition**, v.32, n.3, p.197-229, 1992.

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

GRIFFITHS, N. M. ; BILLINGTON, M. J. ; CRIMES, A. A. ; HITCHCOCK, C. H. S. An assessmente of commercially available reagents for an enzyme-linked immnosorbent assay (ELISA) of soya protein in meat products. **Journal of Science of Food Agriculture**, v.35, p.1255-1260, 1984.

HARLAND, B. F. ; OBERLEAS, D. A modified method for phytate analysis using in íon-exchange procedure: Application to textured vegetable proteins. **Cereal Chemistry**, n.54, p.827-832, 1977.

HEFLE, S. L. Immunoassay Fundamentals. **Food Technology**, v.49, n.2, p.102-107, 1995.

HEUBNER, W. ; STANDLER, H. Uber eine titrationmethode zur Bestimmung des Phytins. **Biochemical Zeitschrift**, n.64, p.422-437, 1914.

HITCHCOCK, C. H. S. ; BAILEY, F. J. B. ; CRIMES, A. A. ; DEAN, D. A. G. ; DAVIS, P. J. Determination of soy proteins in food using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. **Journal of Food Science and Agriculture**, London, n.32, p.157-165, 1981.

ITAL, 2000. Seminário e Curso Teórico – Prático “Agregando Valor à Carne de Aves”. **Centro de Tecnologia de Carnes - CTC**. Campinas, 2000.

IUPAC – IUB. **The nomenclature of cyclitols**. European Journal of Biochemistry, v.5, p.1, 1968.

- JOHNSON, L. F. ; TATE, M. E. Structure of "phytic acids". **Canadian Journal of Chemistry**, v.47, p.63-73, 1969.
- KASIM, A. B. ; EDWARDS JR, H. The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.76, p.1-9, 1998.
- KLOCZKO, I. ; RUTKOWSKI, A. Studies on Usability of Acid Determination for Estimation of Soybean Content in Meat Products. **Acta Alimentaria Polonica**, v.5, Part 4, p.331-335, 1979.
- LANARA. (1981). **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes**, 1981.
- LATTA, M. ; ESKIN, M. A simple and rapid method for phytate determination. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.28, n.6, p.313-315, 1980.
- LEE, B. J. ; HENDRICKS, D. G. Phytic acid protective effect against beef round muscle lipid peroxidation. **Journal of Food Science**, v.60, n.2, p.241-244, 1995.
- LEE, Y. B. ; RICKANSRUD, D. A. ; HAGBERG, E. C. ; BRISKEY, E. J. Quantitative determination of soybean protein in fresh and cooked meat-soy blends. **Journal of Food Science**, v.40, p.380-383, 1975.
- LEMOES, A. L. S. C. ; NUNES, D. R. M. ; VIANA, A. Optimization of the still-marination process of chicken parts. **Meat Science**, v.52, p.227-234, 1999.
- LIU, K. **Soybeans – Chemistry, Technology and Utilization**, Chapman & Hall, p.532, 1996.
- LUSAS, E. ; RIAZ, M. N. Soy Protein Products: Processing and Use. **The Journal of Nutrition**, n.125.1, p.577-579, 1995.
- Mc CANCE, R. A. ; WIDDOWSON, E. M. Phytin in human nutrition. **Biochemical Journal**, n.29, p.2694-2699, 1935.
- MACEDO-SILVA, A. ; SHIMOKOMAKI, M. ; VAZ, A. J. ; YAMAMOTO, Y. Y. ; TENUTA-FILHO, A. Textured Soy Protein Quantification in Commercial Hamburger. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.469-478, 2001.
- MAGA, J. A. Phytate: its Chemistry, Occurrence, Food Interactions, Nutritional Significance, e Methods of Analysis. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.30, n.1, p1-9, 1982.
- MARCH, J. G. ; VILLACAMPA, A. I. ; GRASES, F. Enzymatic-spectrophotometric determination of phytic acid with phytase from *Aspergillus ficuum*. **Analytica Chimica Acta**, n.300, p.269-272, 1995.

- MEDINA, M. B. Extraction and quantification of soy protein in sausage by ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.766-771, 1988.
- MOTTAR, J. Immunochemical techniques in the analysis of foodstuffs. **Journal Food Chemistry Biotechnology**, v.44, n.4, p.115-124, 1989.
- NIELSEN, S. S. **Food Analysis**. Editora S. Suzanne Nielsen, Purdue University-Indiana. 3^a Edição, p.557, 2003.
- NOLAN, K. B. ; DUFFIN, P. A. Effects of Phytate on Mineral Bioavailability. In vitro Studies on Mg²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ (also Cd²⁺), Solubilities in the Presence of Phytate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.40, p.79-85, 1987.
- NORMAN, A. G. **Soybean Physiology, Agronomy, and Utilization**. Editora Academic Press. Nova Iorque, São Francisco, London, 1978.
- OBERLEAS, D. The determination of phytate and inositol phosphates. **Methods of Biochemical Analysis**, New York. p.87-101, 1971.
- ORESKOVICH, D. D. ; BECHTEL, P. J. ; Mc KEITH, F. K. ; NOVAKOFSKI, J. ; BASGALL, E. J. Marinade pH affects textural properties of beef. **Journal of Food Science**, v.57, n.2, p.305-311, 1992.
- PARDI, M. C. ; SANTOS, I. F. ; SOUZA, E. R. ; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Editora UFG. v.2, p.588-1110, 1996.
- PEARSON, A. M. ; GILLET, T. A. **Processed Meats**. Chapman & Hall. 3^o Edição. p.65-90, 1996.
- PETERSON, D. M. Oat Antioxidants. **Journal of Cereal Science**, n.33, p.115-129, 2000.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. Editora F. Pimentel-Gomes, USP-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 14^a Edição, p.477, 2000.
- PLAAMI, S. ; KUMPULAINEN, J. Determination of phytic acid in cereals using ICP-AS to determine phosphorus. **Journal of the AOAC**, n.74, p.32-36, 1991.
- PLAAMI, S. Myoinositol phosphates: Analysis, Content in Foods and Effects in Nutrition. **Technology**, n.30, p.633-647, 1997.
- RAVESTEIN, P. ; DRIEDONKS, R. A. Quantitative immunoassay for soya protein in raw and sterilized meat products. **Journal Food Technology**, v.21. n.19, 1986.
- RING, C. ; JENNISSEN, H. P. ; PUFF, A. Affinity chromatography. A reliable method for purification of anti-soy protein serum. **Fleischwirtschaft**, v.69, p.1206-1207, 1988.

RITTENBURG, J. H. ; ADAMS, A. ; PALMER, J. ; ALLEN, J. C. Improved enzyme-linked immunosorbente assay for determination of soy protein in meat products. **Journal Association Official Analytic Chemistry**, v.70. n.3, p.582-587, 1987.

RITTENBURG, J. H. ; GROTHAUS, G. D. Immunoassays: formats and applications. In Food safety and quality assurance: applications of immunoassay system. **Elsevier Science**, p.3-10, 1991.

ROITT, I. ; BROSTOFF, J. ; MALE, D. **Imunologia**. Editora Manole, 2003, 481p.

SAMARAJEEWA, U. ; WEI, C. I. ; HUANG, T. S. ; MARSHALL, M. R. Application of immunoassay in the food industry. **Critical Review in Food Science and Review**, v.29, n.6, p.403-434, 1991.

SANDBERG, A-S. ; ANDERSSON, H. Effect of dietary phytase on the digestion of phytate in the stomach and small intestine of humans. **Journal of Nutrition**, v.118, p.469-473, 1988.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. Editora Varela, p.517, 1996.

SPOTO, M. H. ; GALLO, C. R. ; DOMARCO, R. E. ; ALCARDE, A. R. ; WALDER, J. M. M. ; BLUMER, L. Radiação gama na redução da carga microbiana de filés de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.3, 1999.

STATSOFT, Inc., 1995. STATISTICA for windows (Computer program manual).Tulsa, Oklahoma, USA.

TALAMOND, P. ; GALLON, G. ; TRECHE, S. Rapid and sensitive liquid chromatographic method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food. **Journal of Chromatography A**, n.805, p.143-147, 1998.

TUKUR, H. M. ; LALLÈS, J. P. ; PLUMB, G. W. ; MILLS, E. N. C. ; MORGAN, M. R. A. ; TOULLEC, R. Investigation of the relationship between in vitro ELISA measures of immunoassay globulins and in vivo effects of soy products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.44, p.2155-2161, 1996.

UPPSTRÖM, B. ; SVENSSON, R. Determination of phytic acid in rapessed meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.31, p.651-656, 1980.

Van WEEMEN, B. K. ; SCHURERS, A. H. W. M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.15, p.232-236, 1971.

WHEELER, E. L. ; FERREL, R. E. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. **Cereal chemistry**, n.48, p.312-320, 1971.

YASUMOTO, K. ; SUDO, M. ; SUZUKI, T. Quantification of soya protein by enzyme linked immunosorbent assay of its characteristic peptide. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.50, p.377-389, 1990.

YONG, L. The determination of phytic acid. **Biochemical Journal**, n.30, p.252-257, 1936.

ANEXOS

ANEXO 1 - CARACTERIZAÇÃO DO CPS E PIS UTILIZADOS PARA ELABORAÇÃO DE PEITOS DE FRANGO MARINADO

Teste *t* de *Student*

Umidade do CPS e PIS

Grouping: GRUPO (umidade.sta)

Group 1: G_1:0

Group 2: G_2:1

Mean	Mean			Valid N		Valid N	
Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p	p	G_1:0	G_2:1	
G_1:0	G_2:1	t-value	df				
G_1:0	G_2:1	variancs	variancs				
5,654033	8,522267	-61,3102	4	,000000	3	3	,042070
,069252	2,709675	,539131					

pH do CPS e PIS

Grouping: GRUPO (ph.sta)

Group 1: G_1:0

Group 2: G_2:1

Mean	Mean			Valid N		Valid N	
Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p	p	G_1:0	G_2:1	
G_1:0	G_2:1	t-value	df				
G_1:0	G_2:1	variancs	variancs				
7,276667	6,646667	66,82159	4	,000000	3	3	,015074
,015275	7,000000	,250000					

AF do CPS ou IPS

Grouping: GRUPO (af_bs.sta)

Group 1: G_1:0

Group 2: G_2:1

Mean	Mean			Valid N		Valid N	
Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p	p	G_1:0	G_2:1	
G_1:0	G_2:1	t-value	df				
G_1:0	G_2:1	variancs	variancs				
18,85707	17,26273	2,851635	4	,046319	3	3	,940451
,230892	16,59032	,113699					

Proteína Total do CPS ou PIS

Grouping: GRUPO (ptn.sta)

Group 1: G_1:2

Group 2: G_2:1

Mean	Mean			Valid N		Valid N	
Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p	p	G_1:2	G_2:1	
G_1:2	G_2:1	t-value	df				
G_1:2	G_2:1	variancs	variancs				
88,42567	68,32048	94,18345	4	,000000	3	3	,220154
,490512	6,045127	,251127					

ANEXO 2 - CORRELAÇÃO ENTRE O TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA E AF EM PEITO DE FRANGO MARINADO

Para o CPS

Regression Summary for Dependent Variable: cps
 R= ,98453555 R²= ,96931025 Adjusted R²= ,96859654
 F(1,43)=1358,1 p<,00000 Std.Error of estimate: ,06336

	BETA	St. Err. of BETA	B	St. Err. of B	t(43)	p-level
Intercpt	,002537		,066719		,020808	3,20636
AF	,984536 ,000000	,026715	1,534453		,041637	36,85267

Para o IPS

Regression Summary for Dependent Variable: IPS
 R= ,98285472 R²= ,96600340 Adjusted R²= ,96521278
 F(1,43)=1221,8 p<,00000 Std.Error of estimate: ,06669

	BETA	St. Err. of BETA	B	St. Err. of B	t(43)	p-level
Intercpt	,000002		0,112864		,020562	5,43601
AF	,982855 ,000000	,028118	1,459520		,041755	34,9547

ANEXO 3 - LINEARIDADE DO MÉTODO INDIRETO DO AF PARA O CPS E PIS

Para o CPS

Regression Summary for Dependent Variable: PIS

R= ,99653698 R²= ,99308595 Adjusted R²= ,99292881

F(1,44)=6319,9 p<,00000 Std.Error of estimate: ,0,6972

	BETA	of BETA	B	of B	t(44)	p-level	
		St. Err.		St. Err.			
AF	,996537	,012535	1,653411	,020798	79,49749	,00	

Para o IPS

Regression Summary for Dependent Variable: PIS

R= ,99477183 R²= ,98957099 Adjusted R²= ,98933396

F(1,44)=4175,0 p<,00000 Std.Error of estimate: ,08563

	BETA	of BETA	B	of B	t(44)	p-level	
		St. Err.		St. Err.			
AF	,994772	,015396	1,658788	,025672	64,61423	,000000	

ANEXO 4 - CURVA PADRÃO UTILIZANDO PEITO DE FRANGO MARINADO COM PIS PELO MÉTODO DE ELISA

Regression Summary for Dependent Variable: VAR2 (coe.sta)

R= ,98516322 R²= ,97054657 Adjusted R²= ,96949466

F(1,28)=922,65 p<,00000 Std.Error of estimate: ,01013

	BETA	St. Err. of BETA	B	St. Err. of B	t(28)	p-level	
Intercpt				,33330	,005851	56,96633	,000000
VAR1	,985163		,032433	,056200	,001850	30,37521	
	,000000						

ANEXO 5 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNA DA SOJA COM CPS E IPS

Grouping: GRUPO (cp_pi.sta)

Group 1: G_1:2

Group 2: G_2:1

Mean	Mean			Valid N	Valid N		
Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p				
G_1:2	G_2:1	t-value	df	p	G_1:2	G_2:1	
,786667	,726000	4,769696	4	,008842	3	3	,021385
,005292	16,33333	,115385					

ANEXO 6 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNA DE SOJA COM MARINADOS

Grouping: GRUPO (coz_crua.sta)

Group 1: G_1:3

Group 2: G_2:4

Mean	Mean			Valid N	Valid N		
Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p				
G_1:3	G_2:4	t-value	df	p	G_1:2	G_2:1	
G_1:2	G_2:1	variancs	variancs		,390000		
0,397000	-,736502	4	,502285	3	3	,010392	,012767
1,509259	,797048						

ANEXO 7 - COMPARAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DE SOJA PELO MÉTODOS INDIRETOS DO AF E ELISA

Amostra A

Grouping: VAR1 (a.sta)

Group 1: G_1:5

Group 2: G_2:6

	Mean	Mean	F-ratio	p	Valid N	Valid N	
	Std.Dev.	Std.Dev.	t-value	df	p	G_1:5	G_2:6
	G_1:5	G_2:6	variancs	variancs			
VAR2	1,007403	1,032854	-,188605	4	,859585	3	3
	,114549	6,955321	,251404				,02869

Amostra B

Grouping: VAR1 (b.sta)

Group 1: G_1:8

Group 2: G_2:7

	Mean	Mean	F-ratio	p	Valid N	Valid N	
	Std.Dev.	Std.Dev.	t-value	df	p	G_1:8	G_2:7
	G_1:8	G_2:7	variancs	variancs			
VAR2	9,874857	7,246688	3,189220	4	,033241	3	3
	0,316902,	941528	3,470535		,447374		

Amostra C

Grouping: VAR1 (c.sta)

Group 1: G_1:9

Group 2: G_2:10

	Mean	Mean	F-ratio	p	Valid N	Valid N	
	Std.Dev.	Std.Dev.	t-value	df	p	G_1:9	G_2:10
	G_1:9	G_2:10	variancs	variancs			
VAR2	,916516	1,351190	-5,48564	4	,005379	3	3
	,145344	3,795991	,417015				,047674

Amostra D

Grouping: VAR1 (d.sta)

Group 1: G_1:12

Group 2: G_2:11

	Mean	Mean			Valid N	Valid N		
	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p				
	G_1:12	G_2:11	t-value	df	p	G_1:12	G_2:11	
	G_1:12	G_2:11	variancs	variancs				
VAR2	,794009	1,229344	-1,97228	4	,019856	3	3	,048432
	,347949	9,124360	,197543					

Amostra E

Grouping: VAR1 (e.sta)

Group 1: G_1:13

Group 2: G_2:14

	Mean	Mean			Valid N	Valid N		
	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p				
	G_1:13	G_2:14	t-value	df	p	G_1:13	G_2:14	
	G_1:13	G_2:14	variancs	variancs				
VAR2	1,821990	1,634543	1,485328	4	,211638	3	3	,010992
	,158485	13,66334	,136395					

Amostra frango inteiro

Grouping: VAR1 (fi.sta)

Group 1: G_1:15

Group 2: G_2:16

	Mean	Mean			Valid N	Valid N		
	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p				
	G_1:15	G_2:16	t-value	df	p	G_1:15	G_2:16	
	G_1:15	G_2:16	variancs	variancs				
VAR2	3,224044	2,083537	2,014118	4	,014261	3	3	,063812
	,455000	3,015334	,498091					

