



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELI FERNANDA ZAMPIERI

**INFLUÊNCIA DE PROTEÍNAS DO LEITE NA AÇÃO
ANTIOXIDANTE DE FLAVANÓIS EM CHOCOLATE.**

Londrina
2009

DANIELI FERNANDA ZAMPIERI

**INFLUÊNCIA DAS PROTEÍNAS DO LEITE NA AÇÃO
ANTIOXIDANTE DE FLAVANÓIS EM CHOCOLATE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena da Silva Miglioranza

Londrina
2009

DANIELI FERNANDA ZAMPIERI

**INFLUÊNCIA DAS PROTEÍNAS DO LEITE NA AÇÃO ANTIOXIDANTE
DE FLAVANÓIS EM CHOCOLATE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lúcia Helena da Silva Miglioranza
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
UNOPAR – Londrina – PR

Profa. Dra. Suely Mayumi Obara Doi
UEL – Londrina – PR

DEDICATÓRIA

“Dedico ao meu esposo Lucio pelo carinho e
dedicação”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a oportunidade de realizar o mestrado sob orientação da Profa. Dra. Lúcia, que me recebeu em todos os momentos de dificuldade com um sorriso encantador e foi responsável por partilhar toda a sua sabedoria e inteligência. Agradeço a Profa. Lúcia por ter orientado este trabalho e apresentado o melhor caminho a ser seguido.

Agradeço a Dra. Priscilla Efraim, pesquisadora do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Chocolates, Balas, Confeitos e Panificação – CEREAL CHOCOTEC do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas – ITAL, pela oportunidade de desenvolvimento dos chocolates e pela vasta experiência compartilhada, além da imensa ajuda neste trabalho.

Agradeço ao meu esposo por sempre ter segurado minha mão em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais e meu irmão pelos momentos de felicidade.

Agradeço as minhas amigas, Lilian, Elis, Giselle, Gi, Fran, Karlinha, Romi, cada qual ocupando um espaço em minha vida.

Agradeço a Profa. Rúbia e a Profa. Sandra Helena, pelas sugestões e correções do trabalho na qualificação.

Agradeço a toda equipe de Professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelas aulas, que me ajudaram a conduzir este trabalho com firmeza.

Agradeço a Sandra Rezende pela solicitude dedicada a todos nós.

Agradeço a Dra. Elza Yosseff e Berenice pela condução e orientação no laboratório.

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

“Deixe o alimento ser teu remédio e o
remédio ser teu alimento”

Hipócrates 2.500 anos atrás

ZAMPIERI, D. F.; MIGLIORANZA, L. **Influência das proteínas do leite na ação antioxidante de flavanóis em chocolate.** 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito das proteínas do leite na atividade antioxidante de catequinas do chocolate. A atividade antioxidante foi avaliada em soluções de caseína com catequina ou isolado protéico de soro com catequina, e em quatro formulações de chocolate: A - chocolate amargo, B - chocolate com soro de leite, C - chocolate com leite em pó desnatado e D - chocolate com leite em pó integral. Aplicaram-se os métodos de inibição do radical ABTS^{•+} e método FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) em diferentes tempos de estocagem (0, 6h, 1 dia, 3 dias e 7 dias). Os resultados dos testes com soluções permitiram observar que a atividade antioxidante aumentou com o aumento do período de estocagem, sendo maior no sétimo dia. A atividade antioxidante apresentada pela solução de caseína com catequina foi superior à apresentada pela solução de isolado protéico de soro com catequina nos dois métodos e em todos os tempos de estocagem. As amostras de chocolate nas quatro formulações apresentaram teor de umidade inferior a 3%, teor de resíduo mineral fixo inferior a 2,5%, teor de gordura de 30,45% e carboidratos não superior a 68%, estando dessa forma em conformidade com a legislação. O teor de flavanóis encontrado obedeceu à seguinte ordem: A=B=D>C. A amostra A seguida de D e B, sendo que a apresentou menor teor de polifenóis totais. A maior atividade antioxidante devido a inibição do radical ABTS^{•+} foi observada na formulação com chocolate amargo, de 72,07±8,94 seguida por chocolate com soro de leite 65,28 ± 4,61, chocolate com leite em pó integral 62,84 ± 2,32 e chocolate com leite em pó desnatado 62,43 ± 7,31, embora sem apresentarem diferenças estatisticamente significativas (P>0.05) entre as formulações.

Palavras-chave: Inibição do radical ABTS. Método FRAP. Caseína. Isolado protéico de soro. Catequina.

ZAMPIERI, D. F.; MIGLIORANZA, L. **Influence of milk proteins on the antioxidant activity of chocolate in flavanols**. 2009. 87 f. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

This the aim of this study is to investigate the effect of Milk protein in catechin antioxidant activity of chocolate. The antioxidant activity has been rated in casein solutions with catechin, isolated in serum protein with catechin and in four chocolate formulation process A-Bitter chocolate; B-Chocolate with Milk serum; C-Chocolate with fat free powder milk, D-Chocolate with full fat powder milk. Methods of inhibition of ABTS^{•+} radical and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) have been applied to different storing periods (0,6h, 01 day, 03 days and 07 days). The result of the tests in the solutions showed that the antioxidant activity increased as the storing period increased, which was higher on the 7th Day. The antioxidant activity showed by the casein solution with catechin was higher compared to the solution of isolated serum protein with catechin in both methods and storing periods. The chocolate samples in the four formulations showed humidity purport lower to 3%, mineral stable residue purport lower to 2,5%, fat purport 30,45% and carbohydrates not higher 68%. This way, in conformity with the demands of the legislation. The flavanol purport found followed this sequence: A=B>D>C. The A sample follows D and B samples, and C sample showed lower purport of the entire polyphenol. Higher antioxidant activity was observed due to inhibition of ABTS radical in bitter chocolate formulation $72,07 \pm 8,94$, followed by chocolate with serum of Milk $65,28 \pm 4,61$, chocolate with full fat powder milk $62,84 \pm 2,32$ and chocolate with fat free powder milk $62,43 \pm 7,31$, however, without showing differences statistically meaningful ($p > 0,05$) amongst the formulations.

Keywords: Inhibition of the radical ABTS. FRAP method. Casein protein isolate. Catechin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Cacaueiro.....	21
Figura 2	– Mapa de maior produção de cacau no mundo.....	22
Figura 3	– Sementes de cacau sendo fermentadas sob folhas de bananeira (A) e em caixas (B).....	22
Figura 4	– Sementes de cacau sendo secas em suportes móveis.....	23
Figura 5	– Ingredientes não refinados utilizados para produzir o chocolate escuro, A açúcar, B manteiga de cacau, C nibs de cacau.....	25
Figura 6	– Refinador de cinco rolos.....	27
Figura 7	– Conchas rotatórias.....	27
Figura 8	– Temperagem manual.....	28
Figura 09	– Tablete de chocolate.....	29
Figura 10	– Estrutura monomérica básica de flavonóides.....	36
Figura 11	– Estrutura das catequinas maiores.....	40
Figura 12	– Estrutura das procianidinas.....	42
Figura 13	– Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	49
Figura 14	– Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe ³⁺	50
Figura 15	– Fluxograma de processamento do chocolate.....	55
Figura 16	– <i>Liquor</i> de cacau (A) e manteiga de cacau (B).....	56
Figura 17	– Etapas do processamento do chocolate da esquerda para direita, de cima para baixo em ordem numérica.....	58
Figura 18	– Atividade antioxidante avaliada pela % de redução do radical ABTS ^{•+} por soluções de proteínas e catequina.....	64
Figura 19	– Atividade antioxidante avaliada pela % de redução do íon férrico a ferroso por soluções de proteínas e catequina.....	64
Figura 20	– Teores de Umidade, Resíduo mineral fixo, Lipídeos, Proteínas e Carboidratos do chocolates.....	66
Figura 21	– Teor de flavanóis totais (mg eq. Catequina/100g).....	68
Figura 22	– Quantidade de polifenóis totais (mg eq. Ácido gálico/100g).....	69
Figura 23	– Teor de atividade antioxidante pelo ensaio ABTS em chocolates.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres.....	31
Tabela 2 – Algumas doenças relacionadas com a geração de radicais livres	32
Tabela 3 – Classes de flavonóides, exemplos de compostos mais encontrados em alimentos e fonte em alimentos	38
Tabela 4 – Propriedades das proteínas do leite.....	45
Tabela 5 – Composição média das proteínas presentes no leite bovino	45
Tabela 6 – Formulação do chocolate	54
Tabela 7 – Atividade antioxidante avaliada pela % de inibição do radical ABTS ^{••} por soluções de proteínas do leite (caseína e isolado protéico de soro) e catequina	63
Tabela 8 – Atividade antioxidante avaliada pela % de redução do íon férrico a ferroso por soluções de proteínas e catequina.....	64
Tabela 9 – Teores de Umidade, Resíduo mineral fixo, Lipídeos, Proteínas, Carboidratos e Valor energético dos chocolates	66
Tabela 10 – Teores de flavanóis totais em chocolates.....	68
Tabela 11 – Teores de polifenóis totais em chocolates.....	69
Tabela 12 – Teor de atividade antioxidante pelo ensaio ABTS em chocolates	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	butilato hidroxianisol
BHT	butilato hidroxitolueno
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
DMACA	p-dimetilaminocinamaldeído
DNA	ácido desoxirribinucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EROS	espécies reativas ao oxigênio
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> – Poder Antioxidante de Redução do Ferro
HDL	lipoproteína de alta densidade
LDL	lipoproteína de baixa densidade
TBHQ	terc-butil hidroquinona
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
UV	ultra violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
4.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	19
4.1.1 Legislação para Alimentos Funcionais	19
4.2 CACAU	21
4.2.1 Chocolate	25
4.3 RADICAIS LIVRES	30
4.3.1 Estresse Oxidativo	31
4.3.2 Oxidação	32
4.4 ANTIOXIDANTES	33
4.4.1 Fontes de Antioxidantes em Alimentos	35
4.5 COMPOSTOS FENÓLICOS	35
4.5.1 Flavonóides	36
4.5.1.1 Catequinas	39
4.5.1.2 Procianidinas	41
4.6 POLIFENÓIS DO CHOCOLATE E SUA IMPORTÂNCIA À SAÚDE	42
4.7 INTERAÇÃO PROTEÍNA-FLAVONÓIDES	43
4.8 LEITE	44
4.8.1 Caseína.....	46
4.9 SORO.....	46
4.10 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	48
4.10.1 Ensaio de Captura do Radical Cátion ABTS	48
4.10.2 Método de Redução do Ferro (FRAP).....	49
5 MATERIAL E MÉTODOS	51
5.1 MATERIAL	51

5.1.1	Reagentes	51
5.2	MÉTODOS	52
5.2.1	Avaliação da Interação da C (+)-catequina, com Caseína e Isolado Protéico de Soro	52
5.2.1.1	Incubação da C (+)-catequina, Caseína e Isolado Protéico de Soro	52
5.2.2	Avaliação da Atividade Antioxidante Total	52
5.2.2.1	Ensaio de captura do radical cátion ABTS	53
5.2.2.2	Método de Redução do Ferro (FRAP)	53
5.2.3	Formulação dos Chocolates em Barras	54
5.2.4	Preparação de Chocolate em Barra	54
5.2.5	Caracterização Físico-Química do Chocolate	59
5.2.5.1	Composição centesimal	59
5.2.6	Determinação dos Compostos Fenólicos	60
5.2.6.1	Determinação de polifenóis totais do chocolate	60
5.2.6.2	Determinação dos flavanóis totais	61
5.2.7	Determinação da Atividade Antioxidante Total do Chocolate	61
5.2.8	Análise Estatística	62
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	63
6.2	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	66
6.3	DETERMINAÇÃO DOS FLAVANÓIS TOTAIS	67
6.4	DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS	69
6.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS DE CHOCOLATE	70
7	CONCLUSÃO	72
8	CONTINUIDADE DOS ESTUDOS	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que lhes confere o poder antioxidante (ANGELO; JORGE, 2007).

A estrutura química mais simples é o fenol, que apresenta um anel aromático ligado a uma hidroxila. Os compostos chamados polifenóis são estruturas químicas que apresentam mais de um anel aromático com hidroxilas ligadas a estes anéis.

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário de plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Estes compostos são encontrados na natureza geralmente na forma ligada de ésteres ou heterosídeos.

Os compostos fenólicos, em particular os polifenóis, pertencem a uma das classes mais estudadas de ingredientes dos alimentos, como mostra o aumento contínuo do número de artigos de pesquisa na área de ciência médica e de nutrição. A atividade antioxidante de polifenóis pode ter função de prevenção de oxidação e proteção favorável aos danos de DNA. Além disso, estes compostos possuem uma variedade de efeitos benéficos à saúde, como propriedade antiinflamatória e anticarcinogênica. (GOTTI; FURLANETTO; CAVRINI, 2006).

A classificação dos compostos fenólicos pode ser feita de acordo com a estrutura química do esqueleto básico. Dessa forma, o C6 corresponde a fenóis simples e os demais compostos apresentam o C6 ligado a grupos substituintes.

Dentre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (KING; YANG, 1999).

Os flavonóides são metabólitos secundários de plantas, que são derivados da reação de condensação do ácido cinâmico com grupos malonil-CoA (BLOOR, 2001).

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, constituídos de 15 átomos de carbono, organizados na configuração C6-C3-C6 (HARBONE *et al.*, 1999).

Mais de 4000 flavonóides têm sido identificados. Os flavonóides são responsáveis pela cor de frutas e vegetais, mas flavonóides sem cor também estão presentes na natureza (YILMAZ, 2006).

De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes (HAVSTEEN, 2002).

De acordo com Peterson e Dwyer (1998) os flavonóides são frequentemente classificados em seis grupos, sendo eles: antocianinas, flavonóis, flavanóis, isoflavonóides, flavonas e flavononas.

As catequinas são flavonóides monoméricos que são também chamados de flavonóis. Este grupo de flavonóides inclui catequinas maiores como as catequinas, epicatequinas, eicatequina galato e epigalocatequina galato (YILMAZ, 2006).

As catequinas e as procianidinas constituem os dois maiores grupos dos flavonóis, e são compostos bioativos presentes em uma variedade de alimentos e bebidas (AUGER *et al.*, 2004).

As catequinas são encontradas em frutas, como damasco, uvas, mas as maiores fontes são o chá verde e o chocolate. A epicatequina e a catequina não são glicosiladas, ao contrário das outras classes de flavonóides (MANACH, 2004).

Os hábitos alimentares apresentam uma grande variedade de compostos que ocorrem em frutas, vegetais, vinho, chá, azeite de oliva extra virgem, chocolate e outros produtos do cacau. Eles são na maioria das vezes derivados e/ou isômeros de flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas e ácidos fenólicos, e possuem diversas propriedades biológicas tais como: antioxidante, antiapoptótica, antienvhecimento, anticarcinogênica, antiinflamatória, antiaterosclerótica, protetora cardiovascular, melhora a função endotelial, assim como atua na inibição da angiogênese e na atividade de proliferação celular (HAN *et al.*, 2007).

De acordo estudo realizado por Lee *et al.* (2003), o cacau apresentou conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides superiores aos

encontrados no chá verde, chá preto e vinho tinto. Este estudo comprovou também que a atividade antioxidante do cacau superou a do chá e do vinho tinto.

Entre os flavonóides presentes no chocolate, destacam-se a classe de flavano-3-ol, incluindo os monômeros epicatequina e catequina, junto com os oligômeros procianidina (dímero até decâmero) resultantes da condensação destes monômeros (HAMMERSTONE *et al.*, 1999).

De acordo com Efraim (2004), estudos “in vitro” e “in vivo” vêm comprovando que os flavonóides do cacau promovem:

- Diminuição da concentração das lipoproteínas de baixa densidade (colesterol ruim);
- Modulação ou diminuição da ativação de plaquetas, auxiliando na manutenção da função cardiovascular (as plaquetas são encontradas em sítios de lesões arteriais; o aumento de sua atividade e sua agregação espontânea está associado ao alto risco de ocorrência de doenças coronárias arteriais);
- Redução de lesões gástricas induzidas pelo consumo excessivo de álcool.

Wang *et al.* (2000) demonstraram que chocolates contendo 5,3 mg/g de procianidinas e 1,3 mg/g de epicatequina apresentaram efeito antioxidante em seres humanos.

O chocolate é um produto consumido por pessoas de todo o mundo e todas as idades. No ano de 2008 o Brasil assumiu o posto de quarto maior consumidor de chocolate do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, da Alemanha e do Reino Unido (COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA, 2008).

O chocolate pode ser consumido na forma de chocolate em pó, achocolatados (líquidos), ou na forma de tabletes sendo chocolate ao leite, chocolate amargo ou chocolate branco dentre outros de acordo com a ANVISA 2003.

Dessa forma, o leite apresenta-se como ingrediente bastante utilizado na produção de chocolate, e dessa forma, se faz necessário observar as possíveis interações entre os flavonóides do chocolate e componentes do leite.

Interações diretas entre polifenóis e alguns componentes dos alimentos como ligações com proteínas, lipídeos, polissacarídeos ou álcool, podem

ocorrer, e estas interações podem afetar a absorção. (LESSER et al., 2004; DONOVAN et al., 2002)

As interações de flavonóides com proteínas constituem uma das fontes mais importantes para explicar a atividade biológica dos flavonóides (CODORNIU-HERNANDEZ et al., 2007).

Embora os antioxidantes tenham sido freqüentemente estudados em óleos, emulsões e outros alimentos, poucos relatos existem acerca de como as proteínas podem afetar a atividade antioxidante em alimentos. Muitos antioxidantes de interesse têm um ou mais grupos hidroxil fenólico e são vários os estudos demonstrando que as moléculas com essa estrutura podem se ligar às proteínas (ALMAJANO; GORDON, 2007).

Devido ao fato de que alguns polifenóis formam complexos com proteínas, tem sido sugerido que a adição de leite ao chá preto reduz a biodisponibilidade dos polifenóis. Isto foi confirmado pela observação de que a ingestão de chá verde ou preto aumentou significativamente a capacidade antioxidante total do plasma, mas a adição de leite ao chá aboliu este efeito (SERAFINI et al., 1996).

Estudos recentes relatam a interação de catequinas com caseínas (JOBSTL et al., 2006), surgindo então a necessidade de avaliar as interações de catequinas e procianidinas presentes no chocolate com proteínas do leite.

2 JUSTIFICATIVA

As matérias-primas básicas para a produção de chocolate são o *liquor* (obtido pelo refino da massa de cacau), a manteiga de cacau e o açúcar, podendo-se ou não adicionar leite ou derivados lácteos (EFRAIM, 2004).

As interações flavonóides-proteínas são uma das mais importantes fontes para explicar a alteração na atividade biológica dos flavonóides (CODORNIU-HERNANDEZ et al., 2007).

Estudos recentes demonstram ligações de caseínas com catequinas e conseqüente alteração da atividade antioxidante (JOBSTL et al., 2006).

Por ser o cacau fonte de flavonóides e estar combinado com leite em diversas formulações, surgiu a necessidade de se verificar as interações de caseínas e proteínas do soro com os flavonóides, sendo a catequina destacada para este estudo. Também avaliou-se a influência de ingredientes de leite à atividade antioxidante do chocolate em formulações de cacau com leite em pó integral, leite em pó desnatado, soro de leite, e somente com *liquor* de cacau.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a influência de ingredientes lácteos sobre a atividade antioxidante dos flavonóides presentes em chocolate.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade antioxidante de catequinas complexadas com caseína.
- Determinar a atividade antioxidante de catequinas complexadas com proteínas do soro.
- Definir e caracterizar física e quimicamente as formulações de chocolate com leite em pó integral, leite em pó desnatado, soro de leite em pó e sem leite.
- Determinar a concentração de flavanóis e polifenóis nas formulações em estudo.
- Determinar a atividade antioxidante das formulações de chocolate.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Segundo Yilmaz (2006) alimentos funcionais são considerados como alimentos que tem uma finalidade fisiológica no corpo.

Sanders (1998) definiu como alimentos funcionais “alimentos ou ingredientes de alimentos que provém benefícios à saúde além de satisfazer o tradicional requerimento nutricional”.

A Portaria nº398 de 30 de abril de 1999 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde define que “um alimento funcional é todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica” (PIMENTEL *et al.*, 2005).

4.1.1 Legislação para Alimentos Funcionais

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1999), regulamentou os Alimentos Funcionais e Novos Alimentos através das seguintes Resoluções:

- Resolução Nº 16 de 1999 (ANVISA/MS): Trata de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, cuja característica é de não necessitar um Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para registrar um alimento, além de permitir o registro de novos produtos sem histórico de consumo no país e, também, novas formas de comercialização para produtos já consumidos (BRASIL, 1999a).

- Resolução 17 de 1999 (ANVISA/MS): estabelece as diretrizes básicas para Avaliação de Risco e Segurança de Alimentos que prova, baseado em estudos e evidências científicas, se o produto é seguro sob o ponto de vista de risco a saúde ou não (BRASIL, 1999b).
- Resolução 18 de 1999 (ANVISA/MS): aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde, alegadas em rotulagem de alimentos (BRASIL, 1999c).
- Resolução 19 de 1999 (ANVISA/MS): aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem (BRASIL, 1999d).

As alegações de propriedade funcional e alegações de saúde são descritas nas Resoluções nº 18 e 19 de 1999 (ANVISA/MS), onde se determinam que:

- O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.
- São permitidas alegações de função para nutrientes e não nutrientes, podendo ser aceitas aquelas que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração da eficácia. Para os nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica não será necessária a demonstração de eficácia ou análise dos mesmos para alegação funcional na rotulagem. No caso de uma nova propriedade funcional, há necessidade de comprovação científica de alegação de propriedades funcionais e ou de saúde e da segurança de uso, segundo as Diretrizes Básicas

para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos na Resolução 17 de 1999.

- As alegações podem fazer referências a manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes e a redução de risco de doenças, não sendo permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças.

4.2 CACAU

O cacaeiro é uma planta nativa das matas equatoriais da região amazônica (Figura 1). Pertence à família *Esterculiaceae*, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao*. O nome da planta é de origem asteca: *cacahuatl* (cacau) ou *cacahuaquahuitl* (cacaeiro); o nome chocolate vem da bebida, *tchocoatl*, de origem maia, que já era consumida há mais de três mil anos. Com base na origem botânica e na expansão geográfica da espécie, distinguem-se duas variedades de cacau cultivadas: *Criollo* e *Forastero* (LAJUS, 1982).



Figura 1 - Cacaeiro
Fonte: Beckett (2008)

As três maiores regiões produtoras de cacau são: oeste da África, sul e leste da Ásia e América do Sul (Figura 2).

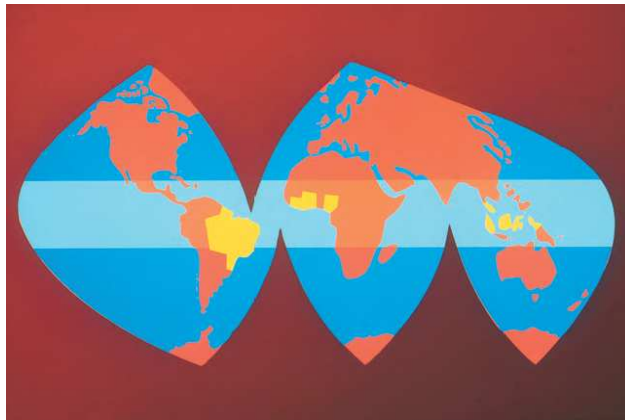


Figura 2 – Mapa de maior produção de cacau no mundo
Fonte: Beckett (2008)

O cacau para poder ser utilizado para a fabricação do chocolate precisa passar por um processo de fermentação (Figura 3). Após a colheita, os frutos devem ser quebrados e deles retiradas as sementes com a polpa aderida, que serão submetidas à fermentação (EFRAIM, 2004).

A correta fermentação e posterior secagem da semente de cacau é fundamental para o desenvolvimento de aromas e precursores. A etapa de fermentação é a maior responsável pela redução significativa de polifenóis solúveis, compostos presentes na semente de cacau fresca (LUNA et al., 2002).

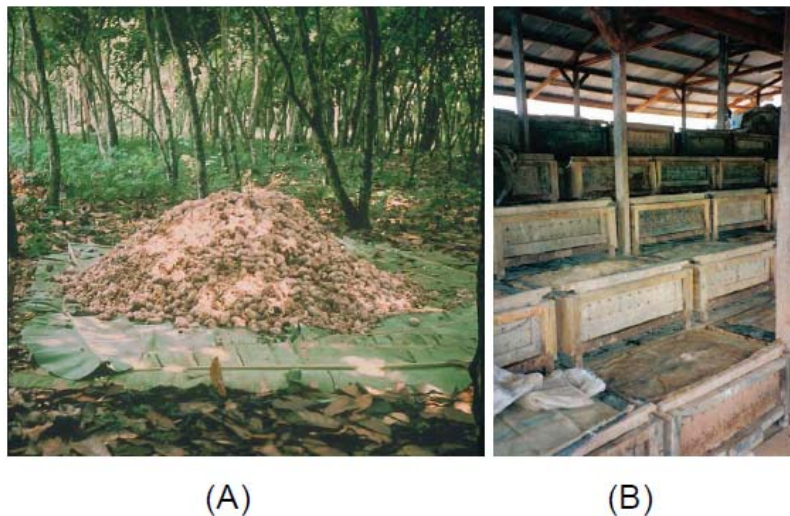


Figura 3 – Sementes de cacau sendo fermentadas sob folhas de bananeira (A) e em caixas (B)
Fonte: Beckett (2008)

Segundo Efraim (2004) a secagem deve ser iniciada imediatamente após a fermentação. Não deve ser lenta ou mal conduzida para que não possibilite o desenvolvimento de fungos que, quando presentes, conferem sabor desagradável ao produto final (Figura 4).



Figura 4 – Sementes de cacau sendo secas em suportes móveis

Fonte: Beckett (2008)

A torração é fundamental na obtenção das características de qualidade do chocolate (EFRAIM, 2004).

Além da perda pelo escoamento do líquido gerado durante a fermentação, os polifenóis sofrem ação das enzimas polifenol oxidase. Devido à ação dessa enzima, os polifenóis presentes são oxidados, e grande parte forma polímeros de altos pesos moleculares chamados de polifenóis condensados (HANSEN; OLMO; BURRI, 1998; WEISBURGER, 2001). Segundo Bonvehi e Coll (1996) os compostos polifenólicos presentes na semente de cacau são submetidos a uma oxidação bioquímica onde estes compostos aumentarão a cadeia polimérica e se complexarão com as proteínas, diminuindo a solubilidade e o sabor adstringente característicos dos polifenóis e flavonóides.

Na fermentação e posteriormente a torrefação da semente, as procianidinas serão convertidas em um material marrom avermelhado insolúvel resultando na cor característica da semente (PORTER; MA; GAN, 1991).

Os principais compostos identificados nas sementes de cacau Forastero, segundo Kim e Keeney (1984); Porter (1991); Kealey et al. (1998); Sanbongi et al. (1998), citados por Efraim, 2004, são apresentados a seguir:

➤ **Catequinas**

- (-)-epicatequina
- (+)-catequina
- (+)-gallocatequina
- (-)-epigallocatequina

➤ **Procianidinas**

- procianidina B1 = epicatequina-(4 β →8)-catequina
- procianidina B2 = epicatequina-(4 β →8)-epicatequina
- procianidina B3 = catequina-(4 α →8)-catequina
- procianidina B4 = catequina-(4 α →8)-epicatequina
- procianidina B5 = epicatequina-(4 β →6)-epicatequina
- procianidina C1 = epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)epicatequina
- procianidina D = epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)epicatequina-(4 β →8) epicatequina
- oligômeros elevados e polímeros homólogos a epicatequina com 2 a 18 unidades monoméricas

➤ **Antocianinas**

- 3- β -D-galactosidil-cianidina
- 3- α -L-arabinosidil-cianidina

➤ **Flavonóis Glicosídicos**

- quercetina-3-O- α -D-arabinosídeo
- quercetina-3-O- β -D-glucopuranosídeo

➤ **Outros**

- clovamida
- dideoxiclovamida

4.2.1 Chocolate

O chocolate é o único alimento que é sólido em temperaturas normais e derrete facilmente dentro da boca. Isto porque a gordura principal, que é chamada manteiga de cacau, é essencialmente sólida em temperaturas abaixo de 25°C quando participam todos os sólidos de açúcar e cacau em conjunto. Esta gordura é, no entanto, quase totalmente líquida a temperatura corpórea, permitindo o fluxo de partículas, de modo a tornar-se chocolate líquido quando é aquecido na boca. O Chocolate também tem um gosto doce que é atraente para a maioria das pessoas, porém a bebida consumida era um pouco adstringente, gordurosa e com sabor desagradável, por isso foi aperfeiçoado ao longo da história. (BECKETT, 2008).

O chocolate foi consumido inicialmente como bebida, pelos Mayas, e era chamada *chocolatl*. Baunilha, especiarias ou mel eram freqüentemente adicionados às bebidas. Porém, a bebida era muito gordurosa, e então processos começaram a ser desenvolvidos pelos holandeses para retirar parte da gordura das sementes de cacau e melhorar a dispersão do pó na água ou no leite. A gordura que fora retirada das sementes, passou então a ser utilizada juntamente com açúcar e os *nibs* (Figura 5) de cacau para produzir o chocolate escuro comestível (BECKETT, 2008).

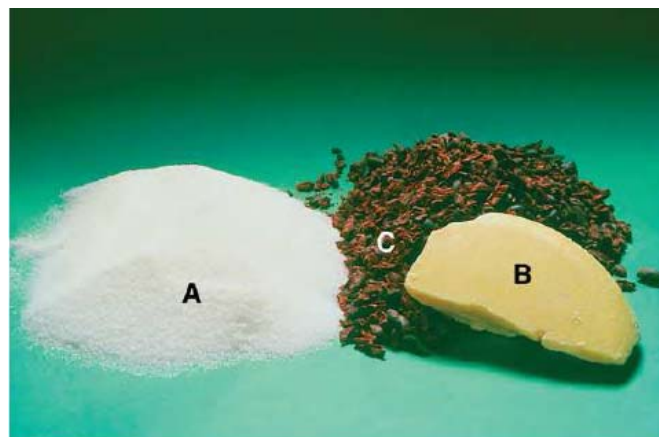


Figura 5 – Ingredientes não refinados utilizados para produzir o chocolate escuro, A açúcar, B manteiga de cacau, C *nibs* de cacau

Fonte: Beckett (2008)

Segundo a Resolução -RDC nº 227, de 28 de agosto de 2003 da ANVISA, o chocolate passa a ser denominado como o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao*): massa de cacau, cacau em pó e manteiga de cacau com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25% de sólidos totais de cacau (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Com essa nova resolução, torna-se possível produzir chocolates utilizando-se gorduras vegetais alternativas além da manteiga de cacau, o que permite reduzir os custos de produção. As matérias-primas básicas para a produção de chocolate são o *liquor* (obtido pelo refino da massa de cacau), a manteiga de cacau e o açúcar, podendo-se ou não adicionar leite e derivados lácteos (EFRAIM, 2004).

Existem muitos métodos diferentes de fabricar o chocolate, porém os mais tradicionais estão baseados nas etapas básicas: mistura, refino, conchagem, temperagem, moldagem, resfriamento, desmoldagem, embalagem e armazenamento (BECKETT, 2008).

A mistura dos ingredientes tem como objetivo a obtenção de uma massa homogênea. Os ingredientes sólidos, com exceção da manteiga de cacau que é colocada apenas uma porção, são colocados em misturadores e são malaxados até a formação de uma massa homogênea.

O refino da massa já homogeneizada tem como objetivo diminuir a granulometria da mistura. A massa é colocada em refinadores (Figura 6) encamisados com água fria, que apresentam geralmente dois ou cinco rolos, os quais vão diminuir aproximadamente 90% das partículas ao tamanho máximo entre 15 e 35 microns. O tamanho real depende do tipo de chocolate a ser feito, e afeta grandemente as suas propriedades como um fluxo líquido, bem como o gosto e textura na boca (BECKETT, 2008).



Figura 6 – Refinador de cinco rolos
Fonte: Beckett (2008)

A etapa da conchagem é realizada em conchas (Figura 7) que podem ser rotatórias e com temperatura que pode variar de 70 a 100°C por não menos do que 12 horas. Permitem o desenvolvimento de reações físico-químicas, cor, aroma e perda de umidade. Dois processos distintos ocorrem, primeiro é o desenvolvimento de flavor e desprendimento de ácidos voláteis, e o segundo é a transformação de pasta seca a um líquido que flui livre. Após a conchagem adiciona-se o restante da manteiga de cacau e emulsificante (BECKETT, 2008).



Figura 7 – Conchas rotatórias
Fonte: Beckett (2008)

A temperagem (Figura 8) é o processo de pré-cristalização de uma pequena quantidade de gordura no chocolate, a fim de que os cristais formem núcleos, que ajudam a definir a gordura rapidamente na forma correta. A quantidade real de gordura, que é necessário a cristalizar é incerta, mas é provavelmente entre

1% e 3%. A temperagem pode ser feita em equipamentos ou manual. A massa é fundida a 40-45°C e é resfriada sob agitação constante para induzir a cristalização, seja na mesa de mármore com raspadores ou em equipamentos por processo contínuo e no final eleva-se novamente a temperatura para fundir os cristais instáveis (BECKETT, 2008).



Figura 8 – Temperagem manual
Fonte: Beckett (2008)

A etapa de moldagem consiste em transferir o chocolate para moldes, que são geralmente de materiais plásticos, e devem ser pré-aquecidos e então são mantidos sob agitação para a retirada de bolhas de ar.

Em seguida os moldes são levados aos resfriadores, que geralmente são túneis de resfriamento, com temperatura de aproximadamente 13°C, mas que podem apresentar zonas com diferentes temperaturas ao longo do túnel.

Ao sair do resfriamento, o chocolate já solidificado se contrai e então é facilmente retirado do molde e embalado (Figura 09). A conservação e armazenamento ideal são à temperatura de aproximadamente 20°C.



Figura 9 – Tablete de chocolate
Fonte: Zampieri (2009)

Entre os flavonóides presentes no chocolate, destacam-se a classe de flavano-3-ol, incluindo os monômeros epicatequina e catequina, junto com os oligômeros procianidina (dímero até decâmero) resultantes da condensação destes monômeros (HAMMERSTONE et al., 1999).

Apesar de grande parte das procianidinas serem reduzidas durante o processo de fermentação e secagem do cacau, e ainda ocorrer a redução desses níveis após a fabricação do chocolate, o seu teor no chocolate é superior ao teor desses compostos em outros produtos (HAMMERSTONE; LAZARUS; SCHMITZ, 2000).

No estudo de Mursu (2004), o consumo de cacau e de chocolate aumentou a concentração de colesterol HDL, o que está relacionado com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares.

Epicatequinas e catequinas podem prevenir a depleção de α -tocoferol (vitamina E), atuando como um antioxidante de reatividade intermediária entre ascorbato e α -tocoferol (LOLITO; FRAGA, 1998).

Mais um detalhe que confirma a prevenção contra doenças cardiovasculares é que a procianidina do chocolate estimula o relaxamento endotélio-dependente da aorta de ratos via a ativação do óxido nítrico sintetase endotelial (KARIM; MCCORMICK; KAPPAGODA, 2000).

Conforme observação de Schroeter (2001), os flavanóis podem ser usados como agentes protetores contra apoptose neuronal causada por estresse

oxidativo, já que inibem a ativação de proteínas quinases e proteínas tipo caspase-3 nos neurônios.

Segundo Sato, Matsui e Arakawa, (2002), a catequina protege contra lesões na mucosa gástrica, através da inibição da liberação de gastrina, somatostatina e histamina. Ela também protege células epiteliais contra os danos causados pela radiação ultravioleta (JEON *et al.*, 2003). Os polifenóis do chocolate têm uma atividade antitumorigênica em todas as fases do tumor, início, progressão e metástase (LAMUELA-RAVENTÓS *et al.*, 2005).

Já foi observada *in vitro*, a capacidade que polifenóis do cacau apresentam de modular a resposta imune. Inibem a produção de espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio e superóxido de hidrogênio) por linfócitos e granulócitos, inibindo também a proliferação de linfócitos e imunoglobulinas (SANBONGI *et al.*, 1998).

Não se conhecem reações adversas aos flavonóides do chocolate, porém quando ingeridos na forma concentrada de suplemento há um potencial de toxicidade (SKIBOLA; SMITH, 2000).

4.3 RADICAIS LIVRES

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994).

Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997).

De acordo com Bianchi e Antunes (1999), algumas espécies de radicais livres estão relacionadas abaixo:

- $^1\text{O}_2$ oxigênio singlete
- O_2^- radical superóxido
- OH^\cdot radical hidroxila
- NO^\cdot óxido nítrico

- ONOO⁻ peroxinitrito
- Q[•] radical semiquinona

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996). Entre as principais formas reativas de oxigênio, o O₂⁻ apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o •OH mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O H₂O₂ não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

4.3.1 Estresse Oxidativo

Segundo Bianchi e Antunes (1999), a formação de radicais livres in vivo ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (Tabela 1). Radicais livres de oxigênio, mais comumente conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROS), podem ser produzidos por fonte endógena ou exógena (Tabela 1). A indução de danos celulares causados pelos radicais livres tem sido chamada de estresse oxidativo e é resultante do desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes (SIES, 1993).

Tabela 1 – Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres

Endógenas	Exógenas
Respiração aeróbia	Ozônio
Inflamações	Radiações gama, ultravioleta
Peroxisomos	Medicamentos
Enzimas do citocromo P450	Dieta/cigarro

Fonte: Bianchi e Antunes (1999)

A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, freqüentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996).

Os radicais livres provocam certos danos oxidativos nas células, e estão relacionados com a etiologia de diversas doenças, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Algumas doenças relacionadas com a geração de radicais livres

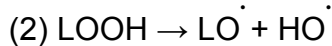
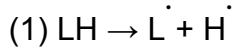
Artrite	Disfunção cerebral
Arteriosclerose	Cardiopatias
Diabetes	Enfisema
Catarata	Envelhecimento
Esclerose múltipla	Câncer
Inflamações crônicas	Doenças do sistema imune

Fonte: Bianchi e Antunes (1999)

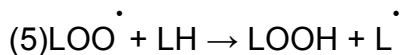
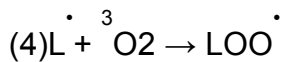
4.3.2 Oxidação

Todos os compostos celulares são susceptíveis às espécies reativas de oxigênio, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da oxidação lipídica, que acarreta alterações em sua estrutura e permeabilidade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

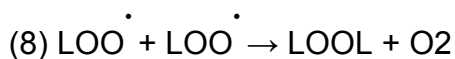
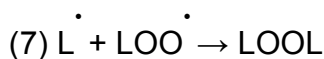
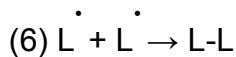
De acordo com Jadhav et al. (1996), a autoxidação de lipídios se inicia com a formação de radical livre. Quando em contato com oxigênio, os lipídios insaturados levam a formação de radicais livres (1). A formação do radical lipídico L• é usualmente mediada por traços de metais, irradiação, luz ou calor. Também o hidroperóxido lipídico, que existe em quantidades traços antes da reação de oxidação, é quebrado para formar radicais como produtos, como mostrado nas equações 2 e 3.



Nas reações de propagação, radicais livres são convertidos em outros radicais. A propagação do processo de oxidação lipídica ocorre por meio de reações em cadeia que consomem oxigênio e formam novos radicais livres (radicais peróxido LOO^\cdot) ou hidroperóxidos lipídicos (LOOH), como nas equações 4 e 5.



Na fase de terminação há uma redução na quantidade de lipídios insaturados (ou ácidos graxos) presentes, radicais ligam-se uns aos outros, formando um composto estável. Então as reações de terminação levam a interrupção da seqüência repetitiva da fase de propagação da reação em cadeia.



4.4 ANTIOXIDANTES

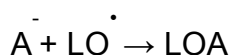
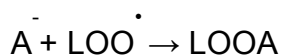
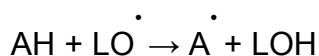
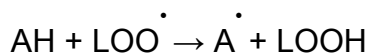
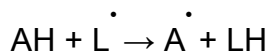
Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis podendo ser estes enzimáticos ou não enzimáticos, tais como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides) (HALLIWELL, 2001).

O consumo de antioxidantes naturais, tais como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, e tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002).

Os antioxidantes pertencem a um grupo de compostos químicos, empregados para estender a vida útil de uma ampla variedade de produtos. O uso de antioxidantes em alimentos acontece desde antes dos anos 40. O uso de antioxidantes em produtos alimentícios é governado por leis regulatórias do país ou

padrões internacionais. Embora muitos compostos naturais ou sintéticos tenham atividade antioxidante, poucos deles têm sido aceitos como GRAS (reconhecidos como seguros) para uso em alimentos. De acordo com as funções os antioxidantes são classificados em primários, sinérgicos e secundários. (RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1996).

Segundo Rajalakshmi (1996), antioxidantes primários são aqueles que interrompem a formação de radicais livres através da doação de hidrogênio ou de elétrons. Os antioxidantes primários incluem compostos fenólicos e polihidroxifenólicos. Muitos compostos fenólicos ocorrem naturalmente como flavonóides, eugenol, vanilina, extrato de alecrim. Os antioxidantes primários são efetivos em baixas concentrações, e em concentrações elevadas podem tornar-se prooxidantes. Eles podem inibir a iniciação da peroxidação lipídica por reagir com o radical livre ou inibir a propagação por reagir com radicais peroxila ou alcóxila.



Antioxidantes secundários atuam por uma variedade de mecanismos, incluindo ligação a íons metálicos, absorção de oxigênio, conversão de hidroperóxidos em espécies não radicalares, absorção de radiação UV ou desativando o oxigênio singlete (GORDON, 2003), e ainda funcionam na decomposição de hidroperóxidos em compostos estáveis (RAJALAKSHMI, 1996).

Os antioxidantes sinérgicos podem ser classificados como absorventes de oxigênio e agentes quelantes. Eles podem atuar doando hidrogênio ao radical fenoxil, regenerando o antioxidante primário. Dessa forma, fenólicos podem ser usados em baixas concentrações se um antioxidante sinérgico é adicionado (RAJALAKSHMI, 1996).

4.4.1 Fontes de Antioxidantes em Alimentos

Os antioxidantes sintéticos são principalmente fenólicos e incluem o butilato hidroxianisol (BHA), butilato hidroxitolueno (BHT), terc-butil hidroquinona (TBHQ), e os galatos de propil, octil, e dodecil (RAJALAKSHMI, 1996).

Os antioxidantes naturais: são encontrados praticamente em todas as plantas, microrganismos, fungos e até mesmo em tecidos animais. A maioria é formada por compostos fenólicos e os grupos mais importantes são os tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos (RAJALAKSHMI, 1996).

4.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

O fenol se constitui de um anel aromático ligado a um grupo hidroxila (-OH). Um polifenol é uma estrutura que apresenta mais de um anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxila ligado em cada anel (BLOOR, 2001).

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário de plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Estes compostos são encontrados na natureza geralmente na forma ligada de ésteres ou heterosídeos.

Os polifenóis possuem, pelo menos, um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Podem ser classificados segundo o tipo de esqueleto principal, dividindo-se em flavonóides e os não-flavonóides (FERGUSON, 2001).

As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos ocorrem, principalmente, devido ao seu potencial de oxidorredução, que permite aos fenólicos atuarem como agentes redutores doando hidrogênio e neutralizando os radicais livres (RICE-EVANS et al. 1997).

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos

problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas), eles são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos, e suscetíveis à ação de enzimas (KING; YOUNG, 1999).

4.5.1 Flavonóides

Flavonóides são metabólitos secundários de plantas, que são derivados da reação de condensação do ácido cinâmico com grupos malonil-CoA (BLOOR, 2001). Eles são compostos fenólicos devido a sua estrutura química (Figura 10).

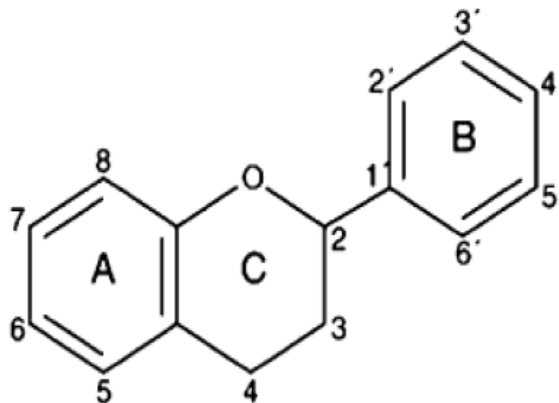


Figura 10 – Estrutura monomérica básica de flavonóides
Fonte: Yilmaz (2006)

Os flavonóides consistem em dois anéis benzênicos (anéis A e B), que são conectados por um anel pirano contendo oxigênio (anel C) (Fig. 1). Os flavonóides contendo um grupo hidroxila na posição C-3 do anel C são classificados como 3-hidroxi-flavonóides (flavonóis, anthocianidinas, leucoanthocianidinas, e catequinas), bem como aqueles nos quais falta este grupo, que são 3-desoxiflavonóides (flavanonas e flavonas). A classificação nas duas famílias fundamenta-se na disposição do grupo adicional hidroxila, ou dos grupos metila, deslocados para as diferentes posições da molécula. Os isoflavonóides diferem dos

outros grupos, pois o anel B é ligado a C-3 do anel C em vez de C-2. Às antocianidinas e catequinas, por outro lado, falta o grupo carbonila na posição C-4. Os flavonóides estão presentes principalmente em plantas como glicosídeos. As agliconas (sem as moléculas de açúcar) ocorrem com menos frequência. Pelo menos 8 diferentes monossacáridos ou combinações destes (di ou trissacarídeos) podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxila dos flavonóides agliconas. O grande número de flavonóides é um resultado das muitas combinações diferentes de flavonóides agliconas e esses açúcares. As mais comuns incluem moléculas de açúcar e D-glucose e L-ramnose. Os glicosídeos são geralmente formados de O-glicosídeos, sendo o agrupamento de açúcar vinculado ao grupo hidroxila na posição C-3 ou C-7. Os flavonóides estão presentes na maioria das frutas e legumes, mas existem variações dos tipos de flavonóides obtidos a partir de diferentes fontes alimentares. Estimativas do consumo de flavonóides pela população só estão disponíveis para algumas subclasses de flavonóides, tais como flavonóis, flavanonas e isoflavonas (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

Mais de 6000 flavonóides têm sido identificados (HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Embora flavonóides sejam responsáveis pela cor de frutas e vegetais, flavonóides sem coloração também estão presentes na natureza. A classificação de flavonóides varia de acordo com o nível de oxidação na estrutura do anel (14 classes segundo Seigler, 1995); entretanto a maioria dos flavonóides da dieta é classificada em seis grupos (PETERSON; DWYER, 1998) (Tabela 3).

Tabela 3 – Classes de flavonóides, exemplos de compostos mais encontrados em alimentos e fonte em alimentos.

Classe de Flavonóides	Compostos em alimentos	Fontes
Flavanóis ou Flavan-3-ols	catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, epicatequina-3-galato, epigalocatequina-3-alato	chá, chocolate e vinho tinto
Flavanonas	naringenina, hesperina, eriodictol	frutas cítricas
Flavonas	apigenina, luteolina	aipo e pimenta vermelha
Isoflavonas	daidzeina, genisteina, gliciteina, biochanina, formononetina	Soja
Flavonóis	quercetina, kaempferol, miracetina, isorhamnetina	cebolas, maçãs, chá e vinho tinto
Antocianinas	cianidina, malvidina, peonidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina.	pigmentos de frutas vermelhas, como <i>berries</i> e uvas tintas.

Fonte: Peterson e Dwyer (1998).

A via de formação dos flavonóides faz parte da grande via do fenilpropanóide, que produz uma série de outros metabólitos secundários, tais como ácidos fenólicos, ligninas, lignanas, e estilbenos. Os principais flavonóides são precursores da fenilalanina, e são obtidos por meio da via do chiquimato-arogenato e malonil-CoA derivado de citrato produzido na via dos ácidos tri carboxílicos. A maioria das enzimas biossintéticas dos flavonóides atuam em complexos enzimáticos localizados no citosol. Os flavonóides e produtos finais são transportados para vários locais, nas frações subcelulares ou extracelulares, sendo que os flavonóides envolvidos na pigmentação geralmente são transportados ao vacúolo (DAVIES; SCHWINN, 2006).

Os compostos fenólicos representam uma das classes mais estudadas de ingredientes comuns em alimentos, como mostra o aumento do número de artigos de pesquisa na área de ciência médica e nutrição. A potente

atividade antioxidante de polifenóis pode ter função na prevenção de oxidação e proteção contra danos ao DNA; além disso, estes compostos possuem uma variedade de efeitos benéficos à saúde, como as propriedades antiinflamatórias e anticarcinogênicas (GOTTI; FURLANETTO; CAVRINI, 2006).

Outras pesquisas abordam as características anti-aterogênicas, anti-trombóticas, antimicrobianas, vasodilatadora e analgésica. Os polifenóis exercem estes benefícios pelo seu poder antioxidante (WOLLGAST; ANKLAN, 2000).

Segundo Ramos (2007), os flavonóides são potentes moléculas bioativas que possuem efeito anticarcinogênico, desde que eles possam agir na iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer por modulação da proliferação celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e metástase.

4.5.1.1 Catequinas

Catequinas são flavonóides monoméricos (YILMAZ, 2006) que são também chamados de flavan-3-óis. Este grupo de flavonóides inclui catequinas maiores como as catequinas, epicatequinas, eicatequina galato e epigalocatequina galato. Quando administradas separadamente, a epicatequina tem maior disponibilidade biológica que a catequina, porém quando administradas conjuntamente, como no chocolate, demonstram haver uma competição por absorção no trato gastrointestinal de ratos (SATO; MATSUI; ARAKAWA, 2001). Porém, no chocolate, há seis ou sete vezes mais epicatequina do que catequina (KEEN, 2001).

Vinho tinto, chá preto, chá verde, frutas como maçãs, morangos, cerejas, ameixa, pêsego, feijão e grãos como feijão, lentilha e cacau são ricos em catequinas (YILMAZ, 2006).

Na literatura, há numerosos estudos da atividade antioxidante in vitro, de catequinas do chá contra vários radicais como hidroxila, superóxido, peroxila e DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), (ATOUI et al., 2005; TANG et al., 2002).

As catequinas do chá têm sido também testadas na atividade antibacteriana contra *Helicobacter pylori*, causador da ulcera bacteriana (YILMAZ, 2006).

Segundo Williamson e Manach (2005), em estudos em humanos, as catequinas aumentaram a atividade antioxidante, diminuíram o peróxido lipídico no plasma e as concentrações de malonaldeído. Com o aumento das concentrações de ascorbato no plasma, diminuiu a absorção de ferro não-heme e aumentou a resistência de LDL (low density lipoprotein) à oxidação.

Makoto et al. (2007), concluíram em seu estudo que o consumo de uma dieta com alimentos ricos em polifenóis como o cacau, pode ser benéfico para prevenir a diabetes melitus tipo 2.

As estruturas das catequinas podem ser observadas na figura 11.

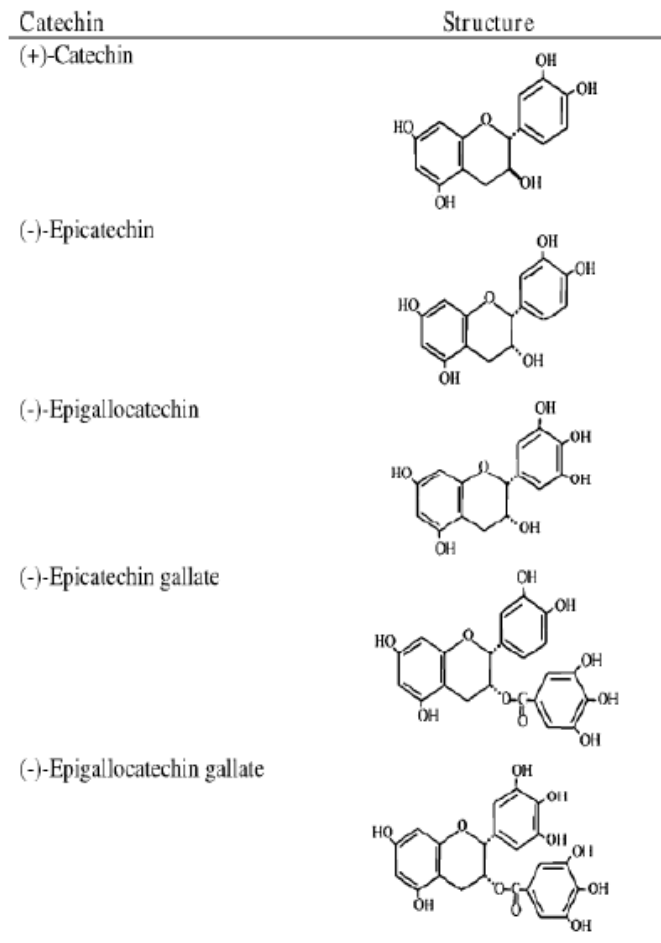
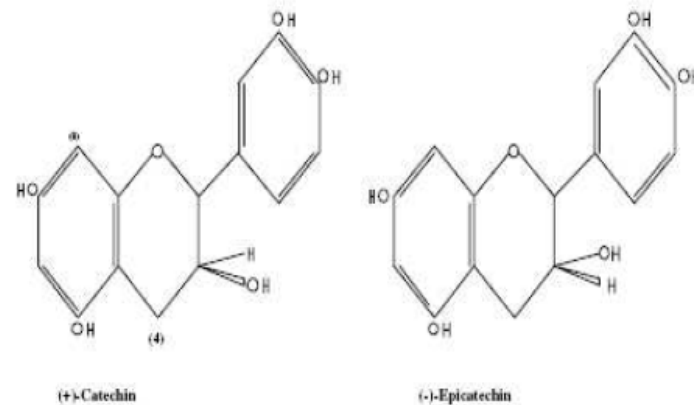


Figura 11 – Estrutura das catequinas maiores
Fonte: Yilmaz (2006).

4.5.1.2 Procianidinas

As procianidinas são formadas a partir da associação de várias unidades monoméricas (catequinas e epicatequinas): 2-5 unidades -catequinas oligoméricas, acima de 5 unidades -catequinas poliméricas. As procianidinas diferem na posição e configuração das ligações monoméricas. As estruturas de dímeros de procianidinas B1, B2, B3 e B4 e de trímeros C1e C2 são os mais conhecidos. As procianidinas estão presentes particularmente em altas concentrações no cacau, uvas/vinho, maçãs, e são também encontradas em muitas frutas (DE PACUAL-TERESA; SANTOS-BUELGA; RIVAS-GONZALO, 2000). A estrutura das procianidinas pode ser observada na Figura 12.

Segundo Williamson e Manach (2005), as procianidinas exibem efeitos no sistema vascular e aumentam substancialmente a atividade antioxidante do plasma, diminuindo a agregação plaquetária e a reação de peroxidação lipídica medida por ácido tiobarbitúrico. Além disso, diminuem a concentração e a suscetibilidade de oxidação do LDL, a pressão sanguínea, a concentração de tromboxano no sangue, o diâmetro de microvasos, e aumentam a concentração de colesterol HDL e de homocisteína no sangue. Aumentam ainda a concentração de vitamina B6 e a concentração de alfa-tocoferol no plasma, diminuindo a concentração de anticorpos circulantes para oxidar o LDL.



NAME	STRUCTURE
Procyanidin B1	(-)-epicatechin-(4-8)-(+)-catechin
Procyanidin B2	(-)-epicatechin-(4-8)-(-)-epicatechin
Procyanidin B3	(+)-catechin-(4-8)-(+)-catechin
Procyanidin B4	(+)-catechin-(4-8)-(-)-epicatechin
Procyanidin C1	(-)-epicatechin-(4-8)-(-)-epicatechin-(4-8)-(-)-epicatechin
Procyanidin C2	(-)-epicatechin-(4-8)-(-)-epicatechin-(4-8)-(+)-catechin

Figura 12: Estrutura das procianidinas
Fonte: Auger *et al.* (2004)

4.6 POLIFENÓIS DO CHOCOLATE E SUA IMPORTÂNCIA À SAÚDE

O cacau e o chocolate têm uma longa história de uso tradicional como alimento e tem crescido o conhecimento científico de vários compostos, especialmente os flavanóis e as procianidinas que são abundantes no cacau, com atividade biológica relacionada à saúde cardiovascular (KWIK-URIBE, 2005).

O chocolate apresenta vários benefícios à saúde e, portanto, poderia ser considerado um alimento funcional.

Os flavonóides do cacau têm sido relatados com efeito cardioprotetor específico, incluindo diminuição da oxidação do LDL, aumento dos níveis de HDL, inibição da ativação e agregação plaquetária e propriedades anti-inflamatórias (DING *et al.*, 2006).

Shiina *et al.*, 2007, concluiu em seus estudos que o consumo de chocolate escuro rico em flavonóides aumentou a circulação coronariana em adultos

saudáveis, independente das mudanças dos parâmetros do estresse oxidativo, como pressão sanguínea e perfil lipídico, quando comparado com o chocolate branco sem flavonóides.

O chá preto, chá verde, vinho tinto e cacau foram avaliados em relação ao teor total de fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante. Neste estudo o cacau apresentou atividade antioxidante superior às demais amostras. A atividade antioxidante foi determinada usando o ABTS e DPPH e os resultados expressos como capacidade antioxidante equivalente a vitamina C. O teor total de fenólicos e flavonóides também foram superiores no cacau comparado aos demais (LEE et al., 2003).

4.7 INTERAÇÃO PROTEÍNA-FLAVONÓIDES

As interações de flavonóides com proteínas são uma das fontes mais importantes para explicar a alteração da atividade biológica dos flavonóides (CODORNIU-HERNANDEZ; ROLO-NARANO; MONTERO-CABRERA, 2007).

Embora os antioxidantes tenham sido freqüentemente estudados em óleos, emulsões e outros alimentos, existem informações escassas à cerca de como as proteínas podem afetar a atividade antioxidante em alimentos. Muitos antioxidantes de interesse em alimentos têm um ou mais grupos hidroxila fenólicos, e existem vários estudos demonstrando que as moléculas com essa estrutura podem se ligar às proteínas (ALMAJANO; GORDON, 2007).

Como agentes complexantes, os polifenóis, e os 3-flavanóis (catequinas e procianidinas) são capazes de interagir com diversas proteínas formando complexos insolúveis (Haslam, 1980). Trata-se de interações de superfície dinâmicas como ligações por pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas, que se estabelecem entre os grupos fenólicos doadores de prótons, como as procianidinas e os grupos carbonila receptores de prótons, como os peptídeos (HAGERMAN *et al.*, 1980).

A intensidade de ocorrência destes fenômenos depende da natureza da proteína e da procianidina em questão. As proteínas com elevado teor de prolina, como o colágeno, a gelatina, as proteínas salivares e a caseína, revelam uma maior

afinidade para com as procianidinas (HAGERMAN *et al*, 1980). A glicosilação das proteínas pode igualmente afetar esta interação. As procianidinas de maior peso molecular (SARNI-MANCHADO *et al*, 1999) e as que apresentam o ácido gálico em sua composição, apresentam maior afinidade com as proteínas (SILVA *et al*, 1991; FREITAS, 2001, 2002).

Os polifenóis podem associar-se com as proteínas por meio de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, e muitos antioxidantes fenólicos têm demonstrado ligar-se a proteínas bovinas (WANG; GOODMAN, 1999).

Algumas proteínas têm exibido propriedade antioxidante e a galato epigallocatequina tem mostrado também causar um aumento sinérgico na estabilidade oxidativa em emulsão de óleo em água, na presença de proteínas menores do soro, e albumina de soro bovina (ALMAJANO; GORDON, 2004).

Há alguma evidência de que os polifenóis possuem alta afinidade de ligação por proteínas ricas em prolina, como as caseínas. Um estudo recente demonstra que ocorre uma ligação cruzada não covalente entre galato epigallocatequina e caseínas, e também aumento na interação das catequinas do chá com as caseínas do leite (LORENZ *et al*. 2007).

4.8 LEITE

O leite é um sistema coloidal constituído por uma solução aquosa de lactose (5%), sais (0,7%) e muitos outros elementos em estado de dissolução, onde se encontram as proteínas (3,2%) em estado de suspensão e gordura em estado de emulsão. O extrato seco total do leite é em média 13,1% e o extrato seco desengordurado 9,2% (AMIOT, 1991).

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: a) caseínas; b) proteínas do soro; c) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; d) enzimas e fatores de crescimento (SGARBIERI, 1996; LOURENÇO, 2000).

Tanto o grupo das caseínas quanto das proteínas do soro são heterogêneos, cada qual contendo várias proteínas (Tabela 4).

De acordo com Fox e McSweeney (1998), (tabela 5) as proteínas de soro do leite são molecularmente dispersas em solução e têm estruturas quaternárias simples, enquanto que as caseínas têm uma estrutura quaternária complexa e que existem no leite como grandes agregados coloidais, referidos como micelas, com partículas de massas de 106-109 Da.

Tabela 4 – Composição média das proteínas presentes no leite bovino

Componentes	Total	Caseína	Soro
Caseínas	80		
caseína α_{s1}	36	45	
caseína α_{s2}	9	11	
β -caseína	21	26	
K-caseína	12	15	
γ -caseína	4	5	
Soro	20		
β -lactoglobulina	10		50
α -lactoalbumina	4		20
Imunoglobulinas	2		10
Albumina do soro	1		5
Lactoferrina			1-2

* valores expressos em porcentagens presentes nas frações

Fonte: Antunes (2003).

Tabela 5 – Propriedades das proteínas do leite

Caseínas	Proteínas do Soro
Liga-se a água	Solúvel em ampla faixa de pH
Estável ao calor	Desnaturada pelo calor
Estrutura de cadeia aberta	Globular
Liga-se a gorduras	

Fonte: Fox e McSweeney (1998).

4.8.1 Caseína

As caseínas são classificadas em quatro subgrupos principais: caseínas α , β , κ e γ . A caseína α_{s1} é constituída de uma cadeia polipeptídica com 199 resíduos de aminoácidos e PM de 23,6 kDa.

As caseínas α_{s2} apresentam PM na faixa de 23,5 a 24 kDa e uma cadeia polipeptídica com 207 resíduos de aminoácidos e, contêm mais resíduos com cadeias laterais carregadas do que a caseína α_{s1} . Por isso apresentam baixa hidrofobicidade média (1.111 cal/res) e carga líquida (entre -16 e -21 mV), com boa solubilidade em água, sendo a mais hidrofílica das caseínas.

As caseínas β representam 30 – 35% do total das caseínas. Na presença de Ca^{++} formam suspensões coloidais ao invés de precipitarem, como as caseínas α_{s1} . As caseínas β apresentam temperatura, concentrações e pH em que ocorre equilíbrio, associação – dissociação.

As κ -caseínas têm os resíduos de aminoácidos dicarboxílicos localizados em sua seqüência na região carboxiterminal, que é também glicosilada. Em geral, três monossacarídeos (galactose, N-acetil-galactosamina ou ácido N-acetil neuramínico), formando tri ou tetrassacarídeos, ligados aos resíduos treonil 131, 133, 135 ou 136, constituem a parte glicosídica da molécula. A estrutura secundária e/ou terciária parece ser o fator primordial na determinação dos sítios de glicosilação, sendo a única caseína glicosilada.

4.9 SORO

A composição e o tipo de soro produzido em plantas de laticínios depende dos tipos de queijo manufaturados, e do processo tecnológico empregado para sua produção, e normalmente são resultantes da ação do coalho sobre as caseínas.

O coalho é uma peptidase (quimosina) que atua em primeiro lugar hidrolisando a κ -caseína. A ruptura acontece na ligação fenilalanina-metionina formando-se a κ -paracaseína e liberando o glicomacropéptideo (como algumas κ -

caseínas não tem carboidratos, é mais correta a denominação caseinomacropéptido). A perda do fragmento hidrofílico da k-caseína a impede de manter a estabilidade da micela de caseína, provavelmente a causa de uma importante diminuição das cargas elétricas e da capacidade de hidratação (AMIOT, 1991).

O soro do leite é altamente poluente; a sua biodegradação demanda alta concentração de oxigênio. Vários trabalhos de pesquisa foram desenvolvidos em diversos países visando criar opções para a utilização do soro, evitando assim que funcione como agente de poluição ambiental (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001). No Brasil, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro do leite. Contudo, o aproveitamento desse subproduto atinge apenas 15% do total de soro produzido, com a produção nacional de 2002 estimada em 470 milhares de toneladas (NEVES, 2001).

Os métodos de purificação das proteínas do soro do leite aumentam a concentração de proteínas. Os produtos mais importantes encontrados no mercado são os concentrados de proteínas do soro do leite, conhecido comercialmente como WPC (whey protein concentrate), com cerca de 80% de proteína e os isolados de proteína do soro do leite, conhecido comercialmente como WPI (whey protein isolate), com cerca de 90% de proteína (VIEIRA; GIOVANNI; MARES-GUIA, 1991).

A beta-lactoglobulina é o maior peptídeo do soro (45,0%-57,0%), representando, no leite bovino, cerca de 3,2g/l. Apresenta médio peso molecular (18,4-36,8kDa), o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado (KINSELLA; WHITEHEAD, 1989).

Em termos quantitativos, a alfa-lactoalbumina é o segundo peptídeo do soro (15%-25%) do leite bovino e o principal do leite humano (SHANNON et al., 2003). Com peso molecular de 14,2kDa, caracteriza-se por ser de fácil e rápida digestão. Contém o maior teor de triptofano (6%) entre todas as fontes protéicas alimentares, sendo, também, rica em lisina, leucina, treonina e cistina (KINSELLA; WHITEHEAD, 1989). É a única proteína do soro capaz de se ligar ao cálcio e a outros metais como zinco, manganês, cádmio, cobre e alumínio (WALZEM, DILLARD; GERMAN, 2002).

A albumina do soro bovino (BSA) tem conformação nativa globular, solúvel em água, formada por uma cadeia polipeptídica com cerca de 580 resíduos de aminoácidos e apresenta peso molecular 66,2 kDa e pI a pH 4,7-4,8 (SGARBIERI, 1996).

Quatro das cinco imunoglobulinas (IgA, IgE, IgG e IgM) ocorrem em baixas concentrações no leite bovino. A massa molecular dessas proteínas varia de 150 a 1000 kDa (ZYDNEY, 1998).

A lactoferrina possui alta afinidade pelo ferro e possui massa molecular na ordem de 78 kDa (ZYDNEY, 1998).

4.10 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Dentre os métodos disponíveis, destacam-se o ensaio de captura do radical cátion ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e o método de redução do ferro FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power – Poder Antioxidante de Redução do Ferro).

4.10.1 Ensaio de Captura do Radical Cátion ABTS

A geração do radical cátion ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) forma a base de um dos métodos espectrofotométricos que tem sido aplicado para medir a atividade antioxidante de soluções de substâncias puras, misturas aquosas e bebidas. O radical monocátion pré-formado de ABTS^{•+} foi gerado por oxidação do ABTS com persulfato de sódio e é reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio (Figura 13). A influência da concentração do antioxidante e duração da reação na inibição da absorção do radical cátion são

incluídas na contagem quando a atividade antioxidante é determinada (RE et al., 1999).

De acordo com Kuskoski et al. (2005) um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática e com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica.

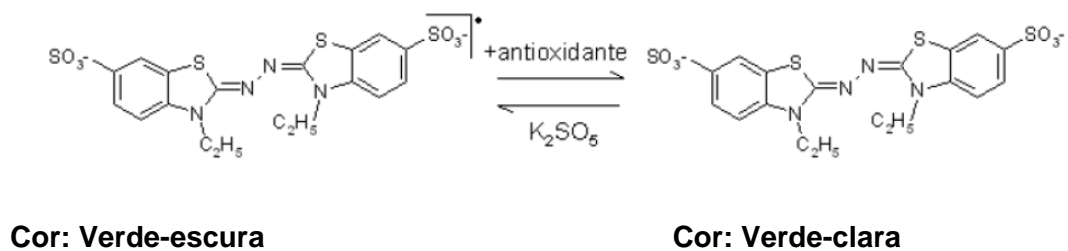


Figura 13 – Estabilização do radical ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: Rufino et al., (2007).

4.10.2 Método de Redução do Ferro (FRAP)

De acordo com Benzie e Strain (1996), o ensaio do FRAP, avalia o poder do antioxidante. O íon férrico é reduzido a ferroso em pH baixo e causa um complexo colorido ferroso-tripiridiltriazina (TPTZ). Os valores FRAP são obtidos comparando-se a mudança da absorvância em 595 nm das misturas de reação do teste com concentração conhecida de íons ferrosos (Figura 14).

Pulido et al. (2000) descrevem o método FRAP como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros.

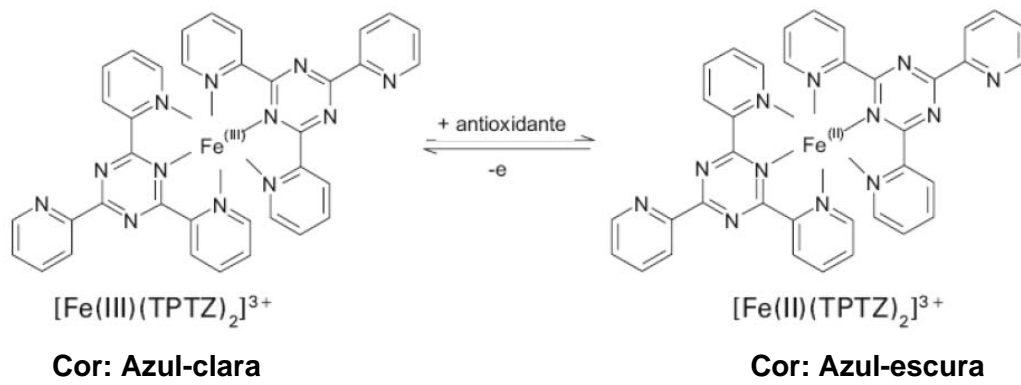


Figura 14 – Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe³⁺
Fonte: Rufino et al, (2006).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

- (+)-catequina -Sigma Chemical Co.
- Caseína -Sigma Chemical Co.
- Isolado Protéico de Soro – ALIBRA Ing. Ltda
- *Liquor* de Cacau – Harald Ind. Com. Alim.
- Soro de leite em pó parcialmente desmineralizado – ALIBRA Ing. Ltda
- Manteiga de Cacau – Barry Callebaut
- Aroma artificial de baunilha – Ottens Flavours
- Lecitina de soja – Solae Solec
- Açúcar de confeitiro – Glaçúcar União
- Sal – Cisne
- Leite em pó integral – La Sereníssima
- Leite em pó desnatado – Nestlé

5.1.1 Reagentes

- ABTS (2,2 AZINO BIS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (PM = 548,68) – Sigma
- Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) (PM = 250,29) -Sigma,
- TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (PM = 312,34) -Sigma
- Cloreto férrico hexahidratado (PM = 270,3)
- Sulfato ferroso heptahidratado (PM = 278,02)
- Persulfato de Potássio (PM = 270,3) Acros Organics,
- Água destilada
- Álcool etílico P.A.

- Acetato de sódio trihidratado
- Ácido acético glacial P.A.
- Ácido clorídrico P.A.
- Ácido Sulfúrico P.A.
- Ácido Bórico
- Ácido Clorídrico
- Éter de petróleo

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Avaliação da Interação da C (+)-catequina, com Caseína e Isolado Protéico de Soro.

5.2.1.1 Incubação da C (+)-catequina, caseína e isolado protéico de soro.

A incubação da catequina com a caseína ou com o isolado protéico de soro foi realizada de acordo com Almajano, Delgado e Gordon, (2007). Foram preparadas soluções de caseína 0,2% em tampão fosfato salino pH 7,4, solução de isolado protéico de soro 0,2% em água destilada e solução de catequina 0,5mM em água destilada. As amostras foram incubadas a 30°C em banho-maria e foram removidas em 0 h, em 6 h, em 1 dia, 3 dias e 7 dias, sendo posteriormente armazenadas a -20°C antes da investigação.

5.2.2 Avaliação da Atividade Antioxidante Total

A Atividade Antioxidante Total foi determinada por dois métodos: ensaio de captura do radical cátion ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sendo o resultado obtido pela inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ pela amostra a

partir da descoloração e o método de redução do ferro (FRAP) com resultado expresso em porcentagem de redução do íon férrico a ferroso.

5.2.2.1 Ensaio de captura do radical cátion ABTS

Foi preparada uma solução de radical cátion ABTS^{•+} a partir da reação de uma solução estoque de ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) 7 mM em água destilada e uma solução de persulfato do potássio 2,45 mM concentração final, após 16h em temperatura ambiente no escuro. Em seguida 1,0 mL desta mistura foi diluído em etanol até obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ nm a 734 nm em espectrofotômetro. Foi transferido em ambiente escuro 30µL de cada amostra com 3,0 mL da solução de radical cátion ABTS^{•+} para tubos de ensaio, sendo homogeneizados e agitados por 6 minutos. O etanol foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro. O resultado é obtido pela inibição do radical ABTS^{•+} pela amostra a partir da descoloração.

5.2.2.2 Método de redução do ferro (frap)

Foi preparada uma solução de Reagente FRAP a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM em HCl 40 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Em seguida, em ambiente escuro, 90 µL de cada amostra foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos foram homogeneizados, agitados e mantidos em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm e o reagente FRAP foi usado como branco para calibrar o espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem de redução do íon férrico a ferroso, de acordo com Benzie e Strain (1996).

5.2.3 Formulação dos chocolates em barras

As formulações dos chocolates foram realizadas de acordo com Efraim, 2004. Quatro formulações de chocolate foram utilizadas (Tabela 6), sendo que as quatro formulações apresentaram o mesmo teor de gordura de 30,45% (base úmida). As quatro formulações variaram em relação ao leite. A formulação A pode ser chamada de chocolate amargo por não conter leite, e como substituto foi adicionado açúcar. Na formulação B foi adicionado soro de leite em pó como substituto do leite. Na formulação C o leite em pó desnatado foi utilizado, enquanto que na formulação D utilizou-se leite em pó integral. As quatro formulações de chocolate foram produzidas sob as mesmas condições tecnológicas.

Tabela 6 – Formulação do chocolate

INGREDIENTES	FORMULAÇÕES			
	A	B	C	D
<i>Liquor</i> de cacau	20%	20%	20%	20%
Açúcar	59,88%	45,88%	45,88%	49,52%
Lecitina de soja	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Manteiga de cacau	20%	20%	20%	16,36%
Soro de leite em pó	0%	14%	0%	0%
Leite em pó integral	0%	0%	0%	14%
Leite em pó desnatado	0%	0%	14%	0%
Aroma de baunilha	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%
Sal	0,06%	0,06%	0,06%	0,06%

5.2.4 Preparação de Chocolate em Barra

Os chocolates foram produzidos na planta-piloto de chocolates do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Chocolates, Balas, Confeitos e

Panificação – CEREAL CHOCOTEC do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas – ITAL.

De acordo com Efraim, 2004, o preparo do chocolate seguiu as seguintes etapas (Figura 15).

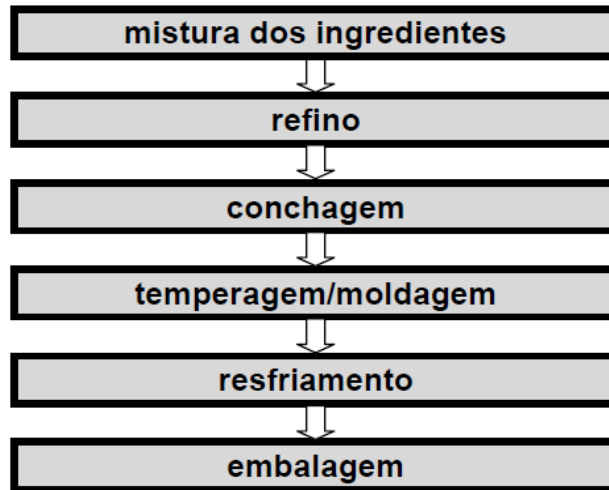


Figura 15 – Fluxograma de processamento do chocolate

Fonte: Efraim (2004).

De acordo com o fluxograma (Figura 15) a primeira etapa consiste em misturar os ingredientes. Os ingredientes sólidos foram colocados no misturador planetário marca KITCHEN AID, modelo K5SS, com capacidade para cinco litros, na seguinte ordem: açúcar, sal, aroma de baunilha, leite ou soro de leite quando havia, manteiga de cacau (metade) e liquor de cacau (Figura 16). O misturador foi regulado a temperatura de 40 °C a uma velocidade inicial de 28 rpm e logo depois foi ajustada para 48 rpm por aproximadamente 4-6 minutos.



(A)

(B)

Figura 16 – *Liquor* de cacau (A) e manteiga de cacau (B)

Fonte: Zampieri (2009).

Após a massa já apresentar-se homogênea foi realizado o refinamento, que tem como objetivo diminuir o tamanho das partículas da massa. O refinamento foi feito em refinador DRAISWERK GMBH, com três cilindros horizontais encamisados, resfriados internamente com água a 15 °C. Os cilindros foram ajustados para que o tamanho das partículas ficasse entre 0,0020 e 0,0025 mm. Para controlar o tamanho das partículas foram realizadas medidas durante o processo. Utilizou-se um micrômetro digital da marca Mytutoio, com escala de 0 a 250 mm, calibrado sempre antes de cada medida. Para a realização da análise solubilizou-se a amostra em petrolato líquido da marca “Nujol” – 100% óleo mineral na proporção de 1:1. Dessa forma com os resultados dos tamanhos das partículas pode-se então abrir ou fechar os rolos para sempre manter o tamanho entre 0,0020 e 0,0025 mm.

A etapa da conchagem foi realizada em misturador planetário marca KITCHEN AID, modelo K5SS, com capacidade para cinco litros, em que se adicionou a massa refinada e o restante da manteiga de cacau. A conchagem ocorreu por 12 horas à temperatura de 60 °C com velocidade final de 132 rpm. Após o término da conchagem a massa foi transferida para um recipiente plástico com tampa e armazenada em estufa de secagem e esterilização da marca FANEM e modelo 320-SE a temperatura de 32 °C até a temperagem.

As amostras foram retiradas da estufa e aquecidas até atingirem temperatura de 37 °C e em seguida foram espalhadas em uma mesa de mármore com auxílio de uma espátula até que a temperatura fosse reduzida a 28 °C. Quando

a massa atingiu esta temperatura foi rapidamente transferida para moldes de chocolate em barra com capacidade para 500 g e realizaram-se movimentos de bateção para retirar as bolhas da massa.

O resfriamento foi realizado em um túnel de resfriamento da marca SIAHT, com comprimento de 10 m e temperatura média de 10 °C. As amostras passaram pelo túnel e foram recolhidas no final para a desmoldagem e embalagem.

As amostras foram desmoldadas e em seguida embaladas em papel alumínio individualmente. A sala de temperagem, moldagem, resfriamento e embalagem é climatizada a 20-23 °C (Figura 17).



Figura 17 – Etapas do processamento do chocolate da esquerda para direita, de cima para baixo em ordem numérica.

Fonte: Zampieri (2009).

5.2.5 Caracterização Físico-Química do Chocolate

5.2.5.1 Composição centesimal

Todas as análises realizadas (umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos) seguiram as metodologias propostas pela A.O.A.C. (1995).

Os teores de umidade e substâncias voláteis foram verificados por metodologia gravimétrica, através de secagem da amostra em estufa a 105 °C, até peso constante.

O teor de resíduo mineral fixo foi verificado por metodologia gravimétrica por meio da incineração das amostras em mufla a 550 °C.

O método utilizado para determinação de lipídeos foi o da hidrólise ácida, pois é o método indicado para produtos que contém cacau. A determinação foi feita adicionando-se ácido clorídrico à amostra para dissolver os protídeos e liberar os lipídeos. Em seguida foi feita a extração com éter de petróleo e posterior verificação gravimétrica.

A determinação do teor de proteína bruta foi realizada de forma indireta, através da quantificação de nitrogênio presente na amostra, utilizando-se MicroKjeldahl[®], cujo valor foi multiplicado pelo fator de conversão de 6,25.

Os carboidratos foram quantificados por diferença. O valor foi alcançado pela diferença entre cem e a soma dos valores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos.

O teor de fibras não foi calculado, por não apresentar-se de forma significativa.

Foi calculado também o valor energético em Kcal/100g de amostra. Para obtenção do valor calórico foram considerados 4 kcal por grama de carboidratos e proteínas e 9 kcal por grama de lipídeos.

Os resultados da composição centesimal foram expressos em g/100g da amostra.

5.2.6 Determinação dos Compostos Fenólicos

Os polifenóis são usualmente extraídos por solventes como água, metanol, etanol e acetona ou uma mistura desses solventes uma vez que as moléculas que contém um radical glicosídeo são solúveis em água e as agliconas (polifenóis sem açúcar) que são pouco polares, são mais solúveis em outros solventes. A combinação de vários solventes pode ser utilizada para se obter uma vantagem da especificidade de cada um e aumentar o rendimento da extração (Escribano-Bailón; Santos-Buelga, 2003).

5.2.6.1 Determinação de polifenóis totais do chocolate

A determinação de polifenóis totais foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, de acordo com Amerine e Ough (s.d.) e Efraim (2004), com algumas modificações. Foram pesados 100,0 mg da amostra e submetida a extração em três etapas: a primeira e a segunda lavagem foram realizadas com 5 mL de solução composta de 70% de metanol, 1% de ácido clorídrico e 29% de água e a terceira lavagem foi realizada em solução composta de 70% de acetona e 30% de metanol. Em balões volumétricos de 100 mL foram adicionados os seguintes reagentes na ordem indicada: 60 mL de água destilada; 0,5 mL do sobrenadante obtido na extração da amostra; 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 15 mL de uma solução contendo 200 mL de carbonato de sódio, 1,2% de tartarato de sódio e 800 mL de água. Os balões foram deixados durante 30 minutos em temperatura ambiente antes da leitura, que foi feita em espectrofotômetro a 765 nm. A curva padrão foi feita com ácido gálico. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico por grama de matéria.

5.2.6.2 Determinação dos flavanóis totais

A determinação de flavanóis foi realizada aplicando o método DMACA (p-dimetilaminocinmaldeído), descrito por Arnous et al. (2002). Foram pesados 100,0 mg da amostra e submetida à extração em três etapas: a primeira e a segunda lavagem foram realizadas com solução composta de 70% de metanol, 1% de ácido clorídrico e 29% de água e a terceira lavagem foi realizada em solução composta de 70% de acetona e 30% de metanol. Foram pesados 0,2 mg das amostras de chocolate e foram diluídas em 1:100 de metanol e 1,5 mL foram introduzidos em tubo eppendorf e adicionados 1,0 mL de DMACA (0,1% em ácido clorídrico 1 N e metanol). A mistura foi agitada e em seguida permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 10 min. Após o repouso as amostras foram lidas em espectrofotômetro na absorvância de 640 nm e o branco foi preparado sem DMACA. A concentração total de flavanóis foi estimada conforme a curva de calibração, preparada com solução de catequina (1-16 mg de catequina/L). Os resultados foram expressos em equivalente a mg catequina $100g^{-1}$ de amostra.

5.2.7 Determinação da Atividade Antioxidante Total do Chocolate

As amostras de chocolate passaram por extração realizada em três etapas: a primeira e a segunda etapa foram realizadas com lavagens das amostras com uma solução composta de 70% de metanol, 1% de ácido clorídrico e 29% de água e a terceira etapa foi realizada uma lavagem com solução composta de 70% de acetona e 30% de metanol. Estas lavagens têm como objetivo extrair os polifenóis.

Foi preparada uma solução de radical cátion ABTS^{•+} a partir da reação de uma solução estoque de ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) 7 mM em água destilada e uma solução de persulfato do potássio 2,45 mM concentração final, após 16h em temperatura ambiente no escuro, de acordo com Re et al. (1999). Em seguida 1,0 mL desta mistura foi diluída em etanol até obter uma absorvância de $0,70 \pm 0,05$ nm a 734 nm em espectrofotômetro. Foi

transferido em ambiente escuro 30µL de cada amostra previamente preparada na concentração 3,0 mL da solução de radical cátion ABTS^{•+} para tubos de ensaio, sendo homogeneizados e agitados por 6 minutos. O etanol foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro. A curva padrão de Trolox foi construída a partir da mistura de 30µL de solução trolox (100, 500, 1000, 1500, 2000µM) com 3,0 mL da solução de radical cátion ABTS^{•+}. A mistura foi homogeneizada e agitada por 6 minutos e em seguida realizou-se a leitura a 734 nm. Utilizou-se o etanol com branco para calibrar o espectrofotômetro. A absorbância da solução oxidada resultante foi plotada contra a curva padrão de Trolox. Os resultados foram expressos em termos de atividade antioxidante equivalente do trolox (valor de TEAC) em µM trolox/g da amostra.

5.2.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram tratados por análise de variância (ANOVA) e submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas em triplicata com uma repetição, e foram obtidos a média (\bar{X}) e desvio padrão (δ) dos resultados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A atividade Antioxidante total das amostras foi determinada pelo ensaio de captura do radical cátion ABTS (2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e expresso como a porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+}.

O resultado foi obtido pela inibição do ABTS^{•+} pela amostra a partir da descoloração (Tabela 7) e (Figura 18).

Tabela 7 – Atividade antioxidante avaliada pela % de inibição do radical ABTS^{•+} por soluções de proteínas do leite (caseína e isolado protéico de soro) e catequina.

Amostra	0	6h	1 dia	3 dias	7 dias
Cas+Cat	3,64±0,80 ^a	4,79±0,50 ^a	5,50±0,80 ^a	6,02±0,50 ^a	8,86±0,70 ^a
Iso+Cat	2,17±0,50 ^b	3,44±0,70 ^b	3,94±0,50 ^b	4,47±0,60 ^b	6,17±0,60 ^b

Cas+Cat: solução de caseína e catequina; Iso+Cat: solução de isolado protéico de soro e catequina Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey.

O método de FRAP é baseado na redução do íon férrico a ferroso em pH baixo e formação de um complexo colorido azul ferroso-tripiridiltriazina (TPTZ). Os valores FRAP são obtidos por comparação da mudança de absorbância em 593 nm, em misturas das amostras com concentração conhecida de íons ferro (Tabela 8) e (Figura 19) (Benzie; Strain, 1996).

Tabela 8 – Atividade antioxidante avaliada pela % de redução do íon férrico a ferroso em soluções de proteínas e catequina

Amostra	0	6h	1 dia	3 dias	7 dias
Cas+Cat	17,32±1,20 ^a	31,79±2,80 ^a	34,87±1,50 ^a	48,87±0,90 ^a	55,64±1,10 ^a
Iso+Cat	2,92±0,80 ^b	5,41±1,00 ^b	7,98±0,90 ^b	14,74±0,70 ^b	21,09±0,60 ^b

Cas+Cat: solução de caseína e catequina; Iso+Cat: solução de isolado protéico de soro e catequina
Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa ($P<0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey.

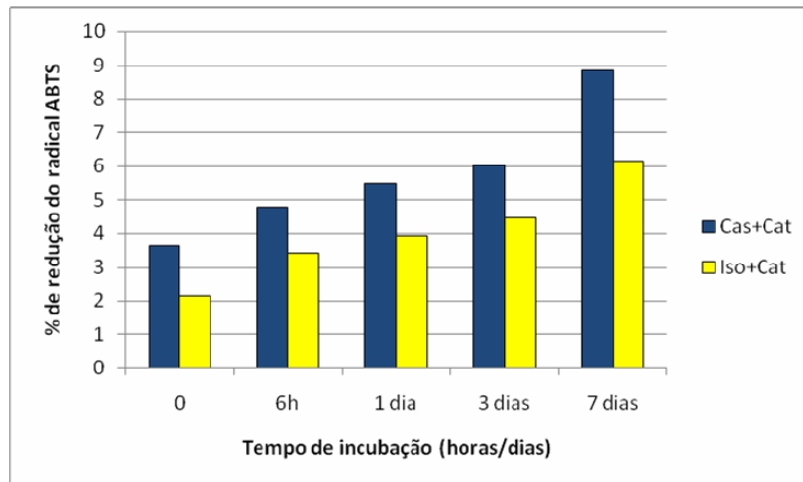


Figura 18 – Atividade antioxidante avaliada pela % de redução do radical ABTS⁺⁺ por soluções de proteínas e catequina cas+cat: solução de caseína com catequina iso+cat: solução de isolado protéico de soro com catequina

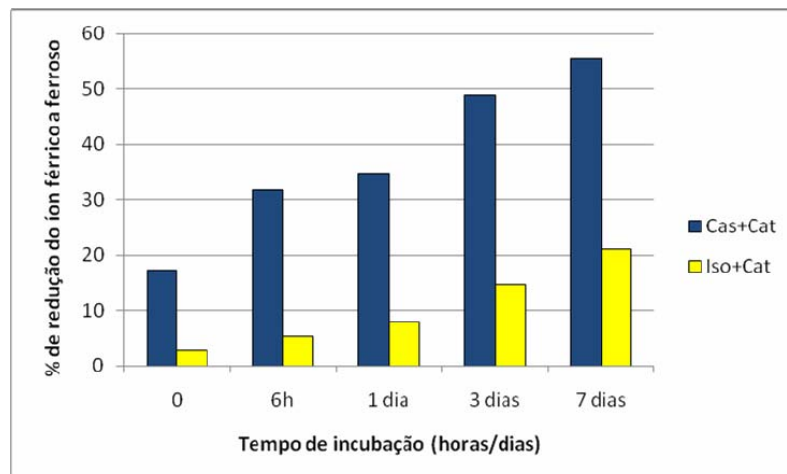


Figura 19 – Atividade antioxidante avaliada pela % de redução do íon férrico a ferroso por soluções de proteínas e catequina cas+cat: solução de caseína com catequina iso+cat: solução de isolado protéico de soro com catequina

De acordo com Thaipong et al. (2006) o método FRAP apresentou-se mais reprodutível e com elevada correlação com os teores de ácido ascórbico e grupos fenólicos. A eficiência desse método é maior em substâncias puras (PULIDO et al., 2000).

As amostras contendo caseína e catequina apresentaram maior atividade antioxidante quando comparadas com a solução de isolado protéico de soro e catequina tanto no ensaio de captura do radical ABTS quanto pelo método FRAP (Tabela 7 e Tabela 8).

Segundo Kim et al. (2007) é conhecida a habilidade do hidrolisado de caseína de seqüestrar radicais livres bem como complexar metais de transição tais como o cálcio, o cobre, o ferro e o zinco. A capacidade dos peptídios de seqüestrarem radicais livres tem sido correlacionada positivamente com a quantidade de histidina, lisina, prolina e de tirosina que contribuem com a atividade antioxidante de algumas proteínas e peptídios.

De acordo com Almajano et al. (2007), a atividade antioxidante das caseínas é superior à de proteínas do soro, tanto isoladas quanto adicionadas a catequinas. Isso se deve a algumas proteínas que também exibem atividade antioxidante e quando adicionadas a catequinas o complexo mostra um aumento sinérgico da atividade.

A atividade antioxidante das amostras foi aumentando com o tempo de estocagem. Segundo o estudo de Almajano et al. (2007) o aumento da atividade antioxidante se faz devido ao fortalecimento da ligação das proteínas com a catequina, porém o complexo formado pelas proteínas e os antioxidantes durante a estocagem não está bem definido.

Segundo Almajano et al. (2007), o produto formado parece ser devido a uma ligação não covalente para formar o complexo e depois, com a estocagem, parece que se forma então a ligação covalente.

6.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Foram determinados os valores de umidade, resíduo mineral fixo (cinzas), lipídeos, proteínas (nitrogênio total), carboidratos e valor energético dos chocolates (Tabela 9) e (Figura 20).

Tabela 9 – Teores de Umidade, Resíduo mineral fixo, Lipídeos, Proteínas, Carboidratos e Valor energético das formulações de chocolate.

Amostra	Umidade	Resíduo mineral fixo	Lipídeos	Proteínas	Carboidratos	Valor energético
A	0,49±0,30	0,90±1,44	35,50±2,56	2,73±3,66	60,38±1,75	571,94±0,85
B	1,60±1,50	1,29±1,18	37,41±1,44	4,08±2,45	55,22±0,69	573,89±0,51
C	1,36±0,73	1,86±0,54	33,15±0,84	7,28±2,19	56,35±0,21	552,87±0,25
D	1,17±1,31	1,59±0,86	37,15±7,11	5,87±0,85	54,26±4,88	574,87±2,32

A: chocolate amargo, B: chocolate com soro de leite, C: chocolate com leite em pó desnatado, D: chocolate com leite em pó integral

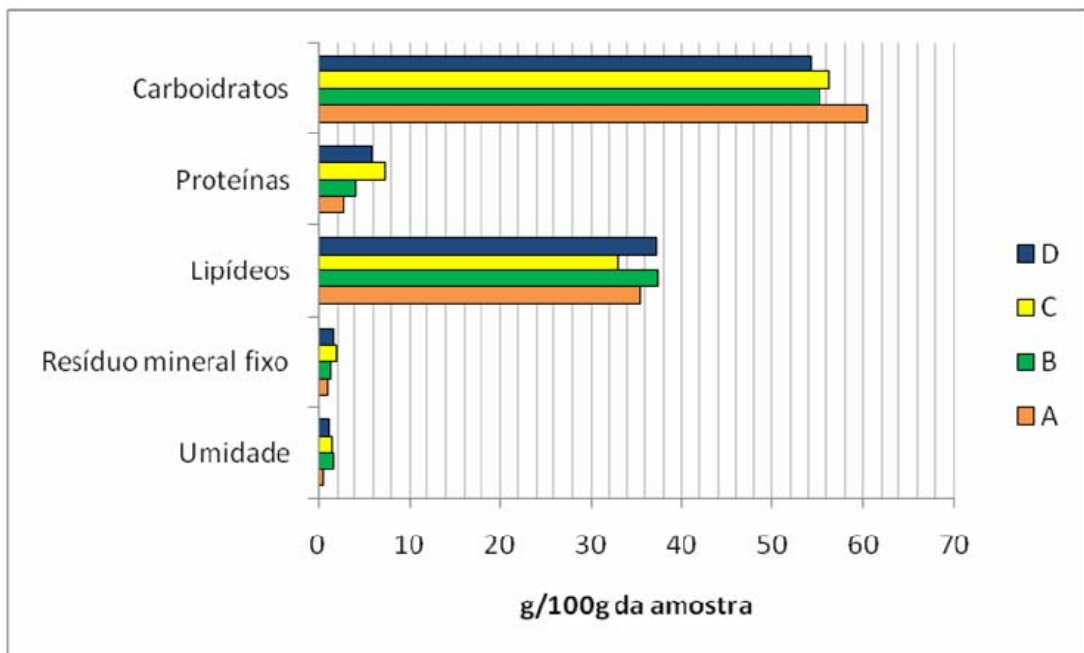


Figura 20 – Teores de Umidade, Resíduo mineral fixo, Lipídeos, Proteínas e Carboidratos das formulações.

De acordo com Resolução -CNNPA nº 12, de 1978 da ANVISA temos:

- umidade máximo 3,0% p/p,
- glicídios não redutores, em sacarose, máximo 68,0% p/p
- lipídeos: mínimo 20,0% p/p
- resíduo mineral fixo, máximo 2,5% p/p (exceto para o chocolate solúvel)

Nas amostras de chocolate analisadas o teor de umidade por 100g todas as amostras tiveram teores de umidade de acordo com a Resolução da ANVISA que estabelece no máximo 3,00% de umidade.

De acordo com a as normas, o máximo teor de resíduo mineral fixo é de 2,5%. No presente estudo, os valores encontrados estão em conformidade com este parâmetro.

O teor mínimo de lipídeos exigido pela legislação é de 20%. Nas formulações deste trabalho, escolheu-se um teor mínimo de gordura de 30,45% para garantir melhores atributos tecnológicos e de qualidade.

6.3 DETERMINAÇÃO DOS FLAVANÓIS TOTAIS

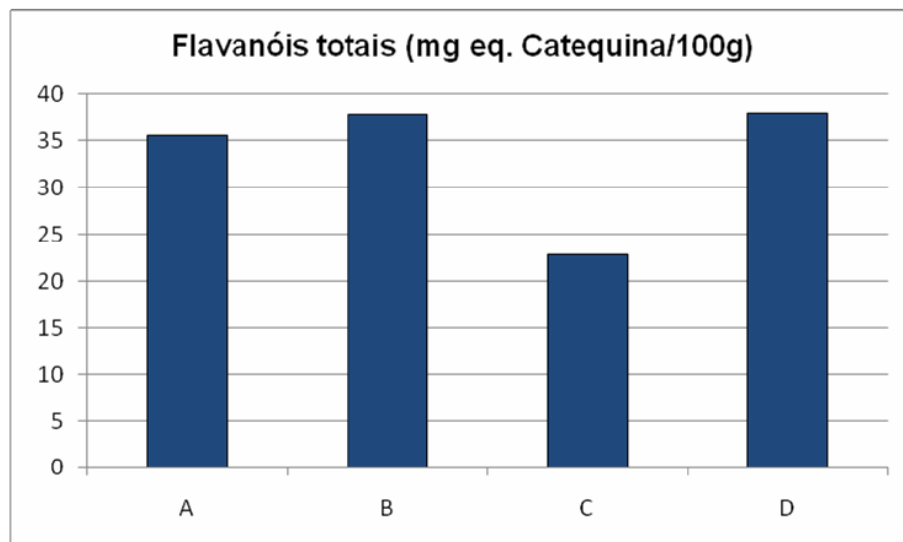
A determinação de flavanóis totais foi determinada por meio da reação espectrofotométrica com o reagente de DMACA. Na tabela 10 e figura 21 verificamos o teor total de flavanóis expressos em equivalentes de catequina por 100g da amostra.

Tabela 10 – Teores de flavanóis totais em chocolates

Amostra	Flavanóis totais (mg eq. Catequina/100g)
A	35,51 ± 2,38^a
B	37,83 ± 3,35^a
C	22,83 ± 7,40^b
D	37,97 ± 5,56^a

A: chocolate amargo, B: chocolate com soro de leite, C: chocolate com leite em pó desnatado, D: chocolate com leite em pó integral

Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey.

**Figura 21** – Teor de flavanóis totais (mg eq. Catequina/100g)

A amostra que apresentou teor mais baixo de flavanóis foi a formulação contendo leite em pó desnatado, e o teor mais elevado foi encontrado na formulação com leite em pó integral, apesar de não ter diferença significativa ($P < 0,05$) das formulações de chocolate amargo ou contendo soro de leite.

6.4 DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS

A concentração de polifenóis totais foi determinada por meio da reação espectrofotométrica com o reagente de Folin Ciocalteu. Os resultados de polifenóis expressos em equivalentes de ácido gálico por 100g de amostra foram obtidos para as quatro formulações estudadas (Tabela 11) e (Figura 22).

Tabela 11 – Teores de polifenóis totais das amostras de chocolate. Amostra Polifenóis totais (mg eq. Ácido gálico/100g)

Amostra	Polifenóis totais (mg eq. Ácido gálico/100g)
A	667,07 ± 2,43^a
B	649,21 ± 5,00^b
C	499,90 ± 9,09^c
D	654,08 ± 9,42^{a,b}

A: chocolate amargo, B: chocolate com soro de leite, C: chocolate com leite em pó desnatado, D: chocolate com leite em pó integral

Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey.

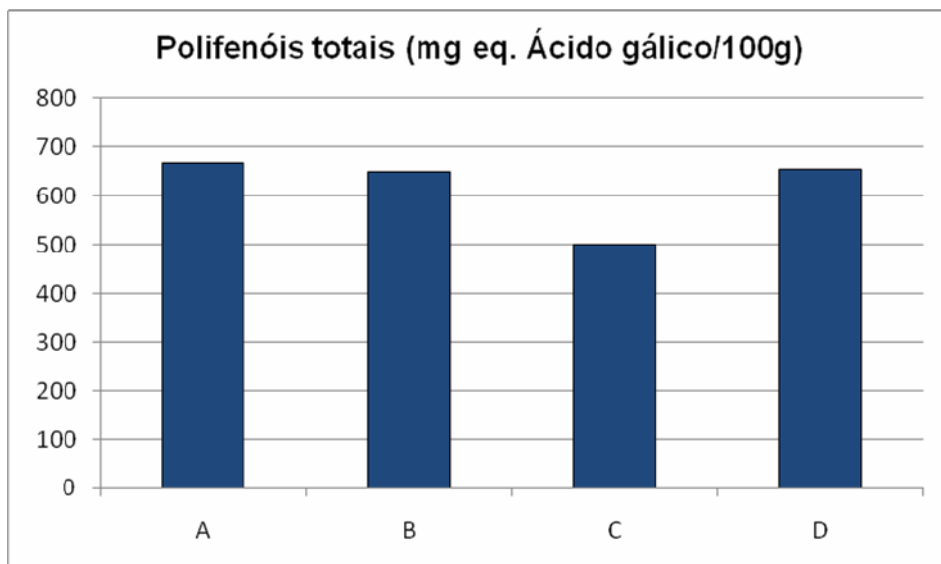


Figura 22 – Concentração de polifenóis totais (mg eq. Ácido gálico/100g) em amostras de chocolate.

No estudo de Vinson et al., (2006), foi realizada uma comparação de diferentes produtos de cacau de acordo com a quantidade total de polifenóis. Os produtos de chocolate, em porções de 40 g, foram comparados, e resultaram em concentrações de 951 mg encontrados em chocolate amargo, e 394 mg, no chocolate ao leite. Os autores concluíram neste estudo que o chocolate amargo tem maior teor de polifenóis, porém não foi informada a composição destes chocolates. Provavelmente no chocolate amargo têm maior teor de liquor de cacau que o chocolate ao leite.

No presente estudo foi mantida a mesma proporção de liquor de cacau nas quatro amostras, justamente para se investigar a influência das proteínas do leite na possível redução de teor de polifenóis. Como esse fato não se constatou, uma vez que tanto o chocolate amargo como o chocolate ao leite não tiveram diferenças significativas ($P < 0,05$) quanto ao teor de polifenóis, conclui-se que não houve influência nem de caseínas, nem de proteínas do soro na diminuição destes compostos no chocolate.

6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS DE CHOCOLATE

Os resultados de avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio de captura do radical ABTS, foram expressos em equivalente Trolox, para amostras de quatro formulações de chocolate (Tabela 12) e (Figura 23).

Tabela 12 – Teor de atividade antioxidante pelo ensaio ABTS das amostras de chocolate.

Amostra	Ensaio ABTS ($\mu\text{mol eq. Trolox}/100\text{g}$)
A	72,07 \pm 8,94^a
B	65,28 \pm 4,61^a
C	62,43 \pm 7,31^a
D	62,84 \pm 2,32^a

A: chocolate amargo, B: chocolate com soro de leite, C: chocolate com leite em pó desnatado, D: chocolate com leite em pó integral

Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey.

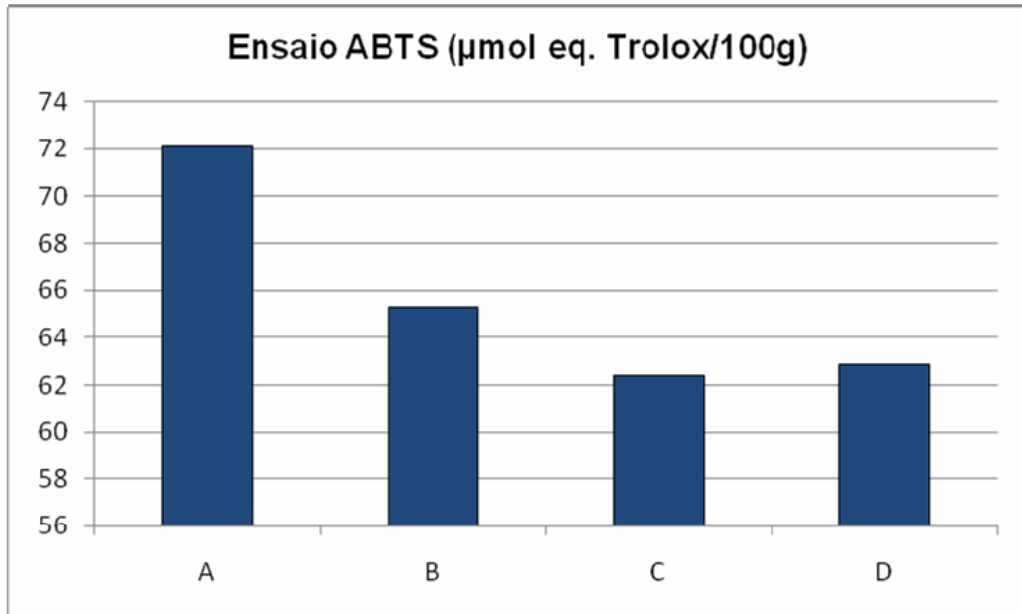


Figura 23 – Atividade antioxidante avaliada pelo ensaio ABTS em amostras de chocolate.

Para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico é necessário que, em baixas concentrações, sejam capazes de impedir, retardar ou prevenir a auto-oxidação ou oxidação mediada por radicais livres e que o produto formado após a reação seja estável (RICE-EVANS, 1996).

Dessa forma pelos resultados obtidos neste estudo constata-se que tanto o chocolate amargo quanto o chocolate com soro de leite, o chocolate com leite em pó desnatado e o chocolate com leite em pó integral exibiram atividade antioxidante, pois demonstraram capacidade de inibir o radical ABTS em todas as formulações.

A maior atividade antioxidante, de $72,07 \pm 8,94$, foi verificada no chocolate amargo, seguida do chocolate com soro de leite, com $65,28 \pm 4,61$, chocolate com leite em pó integral, com $62,84 \pm 2,32$ e chocolate com leite em pó desnatado, com $62,43 \pm 7,31$. No entanto, esses resultados não diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$), e por isso pode-se considerar que o chocolate ao leite e o chocolate amargo apresentam equivalentes atividades antioxidantes, sendo benéficos à saúde e podendo inibir radicais livres causadores de doenças em nosso organismo.

7 CONCLUSÃO

Em um ensaio preliminar, avaliou-se a atividade antioxidante das soluções de proteínas contendo catequina, que apresentaram maior porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} e redução do íon férrico a ferroso no método de FRAP, com o aumento do período de estocagem, ou seja, houve maior inibição no sétimo dia de estocagem. Em relação às proteínas, em ambos os métodos, a porcentagem de inibição foi maior para a caseína comparado com o isolado protéico de soro.

Os valores de umidade, resíduo mineral fixo (cinzas), lipídeos, proteínas (nitrogênio total) e carboidratos das amostras de chocolate estavam em conformidade com a legislação específica.

O teor mais elevado foi encontrado na formulação com leite em pó integral ($37,97 \pm 5,56$) e o teor mais baixo de flavanóis foi encontrado na formulação contendo leite em pó desnatado ($22,83 \pm 7,40$), apesar de não ter diferença significativa ($P < 0,05$) nas formulações de chocolate amargo ou contendo soro de leite.

O chocolate amargo e o chocolate ao leite apresentaram maior teor de polifenóis e não tiveram diferenças significativas ($P < 0,05$). O chocolate com leite em pó desnatado ($499,90 \pm 9,09$) apresentou menor teor de polifenóis.

A maior atividade antioxidante medida pela inibição do radical ABTS^{•+} foi de $72,07 \pm 8,94$, observada no chocolate amargo, seguida por chocolate com soro de leite, $65,28 \pm 4,61$, e chocolate com leite em pó desnatado, $62,43 \pm 7,31$, sem diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as formulações. A menor atividade antioxidante foi verificada na formulação de chocolate com leite em pó integral $62,84 \pm 2,32$.

8 CONTINUIDADE DOS ESTUDOS

- Tendo em vista que as quatro formulações de chocolate apresentaram atividade antioxidante frente à capacidade de inibir o radical cátion $ABTS^{•+}$, devido a concentração de polifenóis presentes na amostras, surge a necessidade de se verificar a biodisponibilidade destes polifenóis no organismo.
- Poderia ser realizado teste de biodisponibilidade em sistema gastro-intestinal modelo, simulando a ação de enzimas presentes nos diferentes tecidos.
- Poderia também ser realizado *in vivo* por meio da ingestão das amostras e posterior verificação do teor de polifenóis no plasma.
- A divulgação dos resultados a população para que tomem ciência dos benefícios dos chocolates tanto amargo, quanto ao leite, visto que apresentam atividade antioxidante e índice de polifenóis equivalentes.
- A produção de chocolates com soro de leite como alternativa de aproveitamento dessas proteínas, uma vez que não se verificou redução de atividade antioxidante nas formulações de chocolate.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12806**: Análise sensorial dos alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1993. 8p.

ALMAJANO, M. P.; DELGADO, M. E.; GORDON, M. H. Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. **Food Chemistry**, v. 101, p. 126-130, 2007.

ALMAJANO, M. P.; GORDON, M. H. Synergistic effect of BSA on antioxidant activities in model food emulsions. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 81, n. 3, p. 275-280, 2004.

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 187-192, maio/ago., 2001.

AMIOT, J. **Ciencia y tecnología de la leche**: principios y aplicaciones. Zaragoza: Acribia, 1991. 547p.

ANDERSEN, K. R.; MARKHAM (ed.). **The Flavonoids**: advances in research. London: CRC Publishers, 2006.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996. In: BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago, 1999.

ANGELO, P. M.; JORGE, N., Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANTUNES, A. J., Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. Barueri: Manole, 2003.

A.O.A.C. **Official methods of analysis association of official analytical chemists**. 16. ed. v. I -II, 1995.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.15, p.655-665, 2002.

ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27-36, 2005.

AUGER, C.; et al. Catechins e procyanidins in Mediterranean diets. **Food Research International**, v. 37, p. 233-245, 2004.

BECKETT, S. T. **The Science of Chocolate**. 2. ed. Inglaterra: Cambridge, 2008. 240p.

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

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

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 3-14, 2001.

BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. **Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 365-370, 1997.

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

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria nº 398, de 30 de Abril de 1999.**

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 16 de 30 de Abril de 1999a.**

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 17 de 30 de Abril de 1999b.**

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 18 de 30 de Abril de 1999c.**

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 19 de 30 de Abril de 1999d.**

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RDC nº 227, de 28 de agosto de 2003.**

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução -CNNPA nº 12, de 1978.**

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa N° 62 de 2003** . Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para alimentos.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº. 51. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2002.

BYLUND, G. Dairy processing handbook. Suíça: Tetra Pak, 1995.436p.

CARNEIRO, J. C. S. et al. Sensory profile and acceptability of cultivars of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 18-24, jan./mar., 2005.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentárias**. Zaragoza: Acribia, 1989. 346 p.

CODORNIU-HERNÁNDEZ, E.; ROLO-NARANJO, A.; MONTERO-CABRERA, L. A. Theoretical affinity order among flavonoids and amino acid residues: an approach to understand flavonoid-protein interactions. **Journal of Molecular Structure**, v. 819, n. 1/3, p. 121-129, 2007.

COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. Brasil é 4º em consumo de chocolate no mundo. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 14 fev. 2008. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/Noticias/200802/not00779.htm>. Acesso em: 20 jul. 2009.

DAVIES, K. M.; SCHWINN, K. E. FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis. In: **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 143-218.

DE PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5331-5337, 2000.

DELLA TORRE, J. C. M. et al. Sensory evaluation and consumer test of minimally processed orange juice. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, n. 2, p. 105-111, Maio/Ago., 2003.

DING, E. L. et al. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. **Nutrition Metab.**, v.3, n.2, 2006

DONOVAN, J. L. et al. Urinary excretion of catechin metabolites by human subjects after red wine consumption. **Braz. J. Nutr.**, v.87, p. 31–37, 2002.

DOROSHOW, J. H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, v. 43, n. 2, p. 460-472, 1983.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 282, p. 47–95, 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 2004. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ESCRÍBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C. Methods in polyphenol analysis. Polyphenol Extraction from Foods. **The Royal Society of chemistry**, p. 1-15, 2003.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mut. Res.** v.475, p. 89-111, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. USA: Thomson Science, 1998.

GORDON, M. H.; The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2003. p. 7-21.

GOTTI, R. et al. Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 345-352, 2006.

GOURSAUD, J. La leche de vaca: composición y propiedades fisico-químicas. In: LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos: la leche de la mamá a la lechería**. Zaragoza: Acribia, 1991, v. 1, p. 3-92.

HAGERMAN, A. E. et al. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1887 – 1882, 1998.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: **Encyclopedia of Life Science**. Nature publishing Group, p.1-7, 2001.

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

HAMMERSTONE, J. F.; LAZARUS, S. A.; SCHMITZ, H.H. Chocolate: modern science investigates and ancient medicine. **The Journal of Nutrition**, n. 130, p. 2086s-2092s, 2000.

HAMMERSTONE, J.F. et al. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47; n. 2; p. 490-496, 1999.

HAN, D. W. et al. Effects of green tea polyphenol on preservation of human saphenous vein. **J. Biotechnol.** v.110, p.109-117, 2004.

HANSEN, C. E.; DEL OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.77, p. 273-281, 1998.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p.481-504, 2000.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P.(ed.). **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2. ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HASLAM, E. Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2577-2592, 1980.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**. London, v.96, p. 67-202, 2002.

JADHAV, S. J. et al. Lipid oxidation in biological and food systems. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker, 1996. p. 5-63.

JEON, S. E. et al. Dietary supplementation of (-)-catechin protects against UVB-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 19, p.235-241, 2003.

JOBSTL E. et al. Noncovalent crosslinking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4077– 4081, 2006.

KARIM, M.; MCCORMICK, K.; KAPPAGODA, C. T. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2105S-2108S, 2000.

KEALEY, K. S. et al. Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same medical uses. Patent Corporation Treaty (PCT) WO 98/09533, Mars Incorporated, USA. In: EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 2004. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KEEN, C. L. Chocolate: food as medicine/medicine as food. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20. p. 436S–439S, 2001.

KIM, H.; KEENEY, P. G. (-)Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1090-1092, 1984. In: EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 2004. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KIM, G. N.; JANG, H. D.; KIM, C. L. Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate use alcalase. **Food Chemistry**, v.104, p.1359-1365, 2007.

KING, A., YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v.99, n.2, p.213-218, 1999.

KINSELLA, J. E. ; WHITEHEAD, D.M. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 33, p. 343-438, 1989.

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

KWIK-URIBE, C. Potential health benefits of cocoa flavanols. **The Manufacturing Confectioner**, p.43-49, out. 2005

LAJUS, B. **Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau**. 1982. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1982. In: EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 2004. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. et al. Health effects of cocoa flavonoids. **Food Sci Tech Int**, v. 11, n. 3, p. 159–176, 2005.

LEE, K. W. et al. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7292-7295, 2003.

LESSER, S.; CERMAK, R.; WOLFFRAM S. Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. **J. Nutr.** v.134, p.1508–1511, 2004.

LOLITO, S. B.; FRAGA, C. G. (-)-Catequina preventes human plasma oxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, p. 435-441, 1998.

LORENZ, M. et al. Addition of Milk vasculat protective effects of tea. **European Heart Journal**, v. 28, p. 219-223, 2007.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. p.179-231.

LUNA, F. et al. Chemical Composition And Flavor Of Ecuatorian Cocoa Liquor. **Journal Agric. Chemistry**, n. 50, p. 3527-3532, 2002.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 79, p. 727-747, 2004.

MAKOTO T. et al. Dietary supplementation with cacao liquor proanthocyanidins prevents elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. **Nutrition**, v. 23, p. 351–355, 2007.

MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J.F. Review: whey-pollution problem and potential utilization. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 23, p. 323-336, 1998.

MATHUR, S. et al. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. **American Society for Nutritional Sciences**. 2002.

MURSU, J. et al. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, p. 1351-1359, 2004.

NACZK M.; SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr.** v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, 2004.

NEVES, B. S.; Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: EMBRAPA. **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar**, Juiz de Fora: Embrapa, 2001, p. 97-108.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PIMENTEL, C. V. M. B; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

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

PORTER, L.J.; MA, Z.; CHANG, G. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, v. 5, p. 1657-1663, 1991.

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

RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996. p.65-157.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 427–442, 2007.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p.1231-1237, 1999.

SILVA, R. et al. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. **J. Sci. Food Agric.** v. 56, p. 111-125, 1991.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.**, v. 2, n.4, p.152-159, 1997.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAPANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolics acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROHN, S.; RAWEL, H. M.; KROLL, J. Antioxidant activity of protein-bound quercetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.15, p. 4725–4729, 2004.

ROSSI JR, J. A.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-158, 1965

ROY, P., KULKARNI, A.P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**, v. 34, n. 6, p. 563-570, 1996.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado Técnico on line 125 Embrapa**, p. 1-4, 2006.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}. **Comunicado Técnico on line 128 Embrapa**, p. 1-4, 2007.

SANBONGI, C. et al. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A., SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria**, Lisboa, p.29-40, jan./fev. 2002.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: Emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 341–347, 1998.

SARNI-MANCHADO, P.; CHEYNIER, V., MOUTOUNET, M. Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. **J. Agric. Food Chem.** v.47, p. 42-47, 1999.

SATO, H.; MATSUI, T.; ARAKAWA, Y. The protective effect of catechin on gastric mucosal lesions in rats, and its hormonal mechanisms. **Journal of Gastroenterol**, v. 37, n. 2, p. 106-11, 2002.

SCHROETER, H. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. **The Biochemical Journal**, v. 358, p. 547–557, 2001.

SEIGLER, D. S. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 341-347, 1995.

SERAFIN, I. M.; GHISELLI, A.; FERRO LUZZI, A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, p. 28-32, 1996.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, jan./mar., 2005.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996. p.139-157.

SHIINA, Y. et al. Acute effect of oral flavonoid-rich dark chocolate intake on coronary circulation, as compared with non-flavonoid White chocolate, by transthoracic Doppler echocardiography in healthy adults. **International Journal of Cardiology**, 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence: review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993. In: BIANCHI, M. L. P; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago, 1999.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin: ciocalteu reagent. **Oxidants and Antioxidants**, v.299, p. 152–178, 1999.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 375–383, 2000.

STAHL, W., SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, v. 46, p. S14-S18, 1997.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of milk proteins. In: FOX, P.F. (ed.). **Developments in dairy chemistry. I. Proteins**. New York: Applied Sciences Publishers, 1982. p. 1-60.

TANG, S. Z. et al. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry**, v. 76, p. 45–51, 2002.

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

VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Bioquímica celular e biologia molecular**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1991. p. 56.

VINSON, J. A. et al. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in a animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8071-8076, 2006.

WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42 , n. 4, p. 353-375, 2002.

WANG, H., CAO, G., PRIOR, R. L. Development of an automated oxygen radical absorbance capacity assay for the determination of total antioxidant activity in fruits. **Faseb Journal**, v. 9, n. 3, p. A453, 1995.

WANG, J.F. et al. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. **Journal of Nutrition**, n.130. p.2115S– 2119S, 2000.

WANG, W. Q.; GOODMAN, M. T. Antioxidant property of dietary phenolic agents in a human LDL-oxidation ex vivo model: Interaction of protein binding activity. **Nutrition Research**, v. 19, n. 2, p. 191–202. 1999.

WEIJL, N. I., CLETON, F. J., OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, n. 4, p. 209-240, 1997.

WEISBURGUER, J. H. Chemoprventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. **American Health Foundation**, 10595, p. 891-897, 2001.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: review of 93 intervention studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 243S-55S, 2005.

WITZUM, J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, v. 344, n. 926, p. 793-795, 1994.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International**, n. 33, p. 449-459, 2000.

YILMAZ, Y. Novel uses of catechins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 64-71, 2006.

ZAMALOA, W. A. C. **Caracterização físico-química e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor, em dez cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzidos no Estado de São Paulo**. 1994. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ZYDNEY, A. L. Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 243-250, 1998.