

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parcer

Este exemplar corresponde a redaç^õ
final da tese defendida por Marco Túlio
Coelho Silva e aprovada pela Comissão
Julgadora em 09.06.87.

Campinas, 09 de junho de 1987.

J. 116
Presidente da Banca

ANTIOXIDANTE EXTRAÍDO DA SOJA

05/87

MARCO TÚLIO COELHO SILVA
ENGENHEIRO DE ALIMENTOS

DR. JOÃO SHOJIRO TANGO
ORIENTADOR - ITAL

Tese apresentada ao DTA/FEA/UNICAMP para a obtenção do título de
Mestre em Tecnologia de Alimentos.

CAMPINAS - 1987

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À meus pais e irmãs
À Ana e Guilherme

Com Amor

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. João Shojiro Tango pela orientação na execução deste trabalho.
- Ao Dr. Alfredo de Almeida Vitali e colegas do ITAL pelo apoio e incentivo constantes.
- Ao Dr. Manoel Miranda do Instituto Agronômico de Campinas pelas amostras de cultivares de soja.
- Ao Dr. Walter Heinrich pelos ensinamentos e conselhos.
- Ao Dr. Issao Shirose e ao Dr. Katumi Yotsuyanagi pela análise estatística dos dados experimentais.
- Ao Dr. Walter Esteves e à Ana do Laboratório de Óleos e Gorduras da FEA pelos ensinamentos e pelo uso do Rancimat.
- À Antonieta, da biblioteca do ITAL, pelo inestimável auxílio no levantamento bibliográfico.
- Ao Sr. Elpidio de Campos pela montagem do aparelho de AOM.
- Ao Sr. Antonio Carriero da gráfica do ITAL pelas fotografias dos cromatogramas.
- À Vera Luporini e à Lucia pela revisão e datilografia do texto.
- À Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos - ABIA pela gentileza das cópias deste trabalho.
- À todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

CONTEÚDO

	PÁGINA
Índice de Quadros	IV
Índice de Figuras	VI
Sumário	VII
Summary	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Oxidação dos lípideos.....	3
2.1.1. Mecanismos da autoxidação	3
2.1.2. Autoxidação pela formação inicial de radicais livres	5
2.1.3. Oxidação pela adição de oxigênio no estado "singlet"	7
2.1.4. Produtos da decomposição dos hidroperóxidos	11
2.1.5. Outros mecanismos para o início da autoxidação	14
2.1.6. Efeitos biológicos da autoxidação dos lípideos.....	15
2.2. Antioxidantes	17
2.2.1. Fatores ambientais	18
2.2.2. Substâncias que evitam a formação de radicais livres	19
2.2.3. Inibidores da reação em cadeia	20
2.2.4. Antioxidantes para os alimentos	23
2.2.5. Antioxidantes naturais	24

2.2.6. Flavonoides como antioxidantes	25
2.2.7. Atividade antioxidante da soja e seus derivados	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Testes preliminares: solvente x cultivar (S x C)	36
3.2. Teste da atividade antioxidante dos extratos solvente x cultivar (S x C)	38
3.2.1. Preparação da emulsão de teste	40
3.2.2. Teste da atividade antioxidante	41
3.3. Extratos em etanol: número de extrações x teor de água no solvente	42
3.3.1. Análise dos extratos em etanol	42
3.3.2. Análise da soja IAC-8 do Instituto Agrônomo de Campinas, safra 1985/1986 e dos resíduos dos extratos em etanol	43
3.3.3. Teste da atividade antioxidante dos extratos em etanol: emulsão aquosa	43
3.3.4. Teste da atividade antioxidante dos extratos em etanol: "Schaal Oven Test"	44
3.3.5. Teste da atividade antioxidante dos extratos em etanol: AOM	45
3.4. Separação e identificação do antioxidante	46
3.4.1. CCD do extrato SDET 75	46
3.4.2. Primeira separação: Solvente I	48
3.4.3. Segunda separação: Solvente II	49
3.4.4. Identificação da banda com maior atividade antioxidante	50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. Atividade antioxidante dos extratos solvente x cul- tivar	53
4.2. Grau de hidratação do solvente x número de extra- ções	58
4.3. Atividade antioxidante dos extratos em etanol	66
4.4. Teste da atividade dos extratos em etanol, concen- trados, no óleo de soja	69
4.5. Isolamento do componente de maior atividade antio- xidante	75
4.6. Identificação do extrato SDET 75.1.C.	83
CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ÍNDICE DE QUADROS

	PÁGINA
QUADRO 1 - Cultivares usadas no estudo da atividade antioxidante de extrato de soja	37
QUADRO 2 - Atividade antioxidante dos extratos de soja em metanol no sistema modelo de β -caroteno e ácido linolêico	54
QUADRO 3 - Atividade antioxidante dos extratos de soja em etanol no sistema modelo de β -caroteno e ácido linolêico	55
QUADRO 4 - Atividade antioxidante dos extratos de soja em acetona no sistema modelo de β -caroteno e ácido linolêico	56
QUADRO 5 - Características da Soja IAC-8, (Instituto Agrônômico de Campinas, safra 85/86) da farinha desengordurada e dos resíduos dos extratos SIETX e SDET X	61
QUADRO 6 - Caracterização dos extratos SDET X	62
QUADRO 7 - Caracterização dos extratos SIETX	63
QUADRO 8 - Atividade antioxidante do extrato SIETX no sistema modelo de β -caroteno e ácido linolêico	67
QUADRO 9 - Atividade antioxidante do extrato SDET X no sistema modelo de β -caroteno e ácido linolêico	68

ÍNDICE DE QUADROS (CONT.)

	PÁGINA
QUADRO 10 - Índice de peróxido: "Schaal Oven Test" dos extratos em etanol	72
QUADRO 11 - Atividade antioxidante dos extratos SDET 75.1 2, 3 e 4	81
QUADRO 12 - Atividade antioxidante dos extratos SDET 75.1 a, b, c	84
QUADRO 13 - Caracterização do espectro em ultravioleta da substância isolada (Extrato SDET 75.1.c).	88

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1 - Esquema de preparação dos extratos solventes X cultivar	39
FIGURA 2 - Esquema de desenvolvimento das placas de cromatografia do extrato SDET 75	47
FIGURA 3 - Atividade antioxidante dos extratos em água destilada de algumas cultivares de soja no sistema modelo de ácido linolêico e β -caroteno	64
FIGURA 4 - Atividade antioxidante dos extratos SIETX e SDET _X concentrados no sistema modelo de β -caroteno e ácido linolêico	70
FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante dos extratos SI: AOM	73
FIGURA 6 - Teste de atividade antioxidante dos extratos SD: AOM	74
FIGURA 7 - Placa de cromatografia do extrato SDET 75	76
FIGURA 8 - Placa de cromatografia do extrato SDET 75	77
FIGURA 9 - Placa de cromatografia do extrato SDET 75	78
FIGURA 10 - Placa de cromatografia dos extratos SDET 75	79
FIGURA 11 - Cromatografia do extrato SDET 75.1 no Solvente II	82
FIGURA 12 - Espectro de UV do extrato antioxidante SDET 75.1.C.	84

SUMÁRIO

Extratos em metanol, etanol, acetona e água de grãos de soja de quatro cultivares, de diferentes safras e locais de colheita foram testados quanto à atividade antioxidante em um sistema modelo de ácido linolêico e β -caroteno.

Não foi encontrada grande influência no local de colheita, do ano da safra ou da variedade do cultivar na atividade antioxidante dos extratos. A influência do tipo de solvente usado na preparação dos extratos foi bem definida, sendo os extratos em etanol os mais ativos, seguidos dos extratos em acetona e metanol. Os extratos em água destilada demonstraram atividade prooxidante.

Verificou-se a influência do grau de hidratação do solvente na atividade antioxidante dos extratos em etanol. Os extratos em etanol a 95%, da soja integral, foram os mais ativos no sistema modelo de ácido linolêico e β -caroteno seguidos dos extratos em etanol a 75% da farinha desengordurada e da soja integral. Os extratos em etanol a 75% da farinha desengordurada foram os mais ativos no óleo de soja.

A atividade antioxidante dos extratos em etanol, da farinha desengordurada aumenta com o teor de compostos fenólicos dos extratos. Com etanol a 75%, quatro extrações com a proporção entre solvente e matéria-prima igual a 2:1 extraem mais de 80% dos compostos fenólicos da farinha de soja desengordurada.

O extrato em etanol a 75% da farinha desengordurada foi dividido em quatro grupos de substâncias, por cromatografia em camada delgada. O grupo contendo as substâncias com R_f menores que 0,34 demonstrou ser o de maior atividade antioxidante. Desse grupo, foi isolada uma substância com atividade antioxidante moderada.

A substância isolada, depois de hidrolisada foi identificada por espectrometria em ultra-violeta como sendo a 5,7,4'-trihidroxi-isoflavona.

SUMMARY

Antioxidante Extracted from Soybeans.

Soybean extracts in ethanol, methanol, acetone and water, obtained from four different cultivars, harvested in different locations and years, were tested for antioxidant activity in an aqueous emulsion of linoleic acid and β -carotene.

It was shown that neither the environment nor the variety of cultivar had a marked effect on the antioxidant activity of the extracts. However, a well-defined influence of the solvent was demonstrated. The extracts in ethanol were the most active, followed by those in acetone and methanol. The aqueous extracts showed pro-oxidant activity.

The water content of the ethanol had an effect on the antioxidant activity of the extracts. Whole soybean extracts in 95% ethanol were the most effective in the aqueous emulsion of linoleic acid and β -carotene, followed by 75% ethanolic extracts from defatted meal and whole soybeans. Defatted meal extracts in 75% ethanol were the most active in soybean oil.

The antioxidant activity of the ethanolic extracts from defatted meal increased with the phenolic content of the extracts. Four extractions with a 75% ethanolic solvent, in a 2:1 solvent to meal ratio, extracted more than 80% of the phenolic compounds from defatted meal.

The 75% ethanol extract from defatted meal was divided into four bands by TLC. The band containing substances with R_f values below 0.34 was the active one. From this band one substance with antioxidant activity was isolated by TLC.

The isolated substance, after mild hydrolysis, was identified, by U-V spectrometry, as 5,7,4'-trihydroxy-isoflavone.

1. INTRODUÇÃO

A preservação dos alimentos é uma das grandes preocupações da humanidade. Desde o momento que são colhidos, durante o seu processamento ou estocagem e até à hora do consumo, os alimentos estão sujeitos a diversos tipos de deterioração, principalmente os causados por bactérias, enzimas e a reação com o oxigênio do ar.

A oxidação espontânea dos lipídeos, chamada autooxidação, causa a perda das qualidades organolépticas dos alimentos devido à produção de aromas e sabores estranhos (rancificação). Os produtos da reação de autooxidação podem reagir com as proteínas, vitaminas e outros componentes dos alimentos, causando a perda de suas qualidades nutricionais.

A reação de autooxidação dos lipídeos ocorre por meio da formação de radicais livres, que reagem com o oxigênio, formando hidroperóxidos e novos radicais livres, numa reação em cadeia.

Tendo em vista esse mecanismo, duas soluções são propostas para evitar a sua ocorrência. A primeira é evitar a formação dos radicais livres e a sua reação com o oxigênio. A segunda é evitar ou retardar a propagação da reação em cadeia. Como a formação de radicais livres é praticamente impossível de ser evitada e a quantidade de oxigênio necessária à reação é diminuta, a segunda solução é a que se tenta normalmente. As substâncias que, adicionadas aos alimentos, diminuem a velocidade da reação de oxidação dos lipídeos são chamadas de antioxidantes.

Existem muitas substâncias que possuem atividade antioxidante, mas devido a restrições de ordem técnica, legal, organoléptica ou toxicológica, apenas algumas são efetivamente usadas pela indústria de alimentos. No caso do Brasil, essas substâncias

são geralmente importadas. A produção de antioxidantes extraídos de fontes naturais pode ser uma das soluções para esse problema.

A soja (*Glycine max*, L.) é uma leguminosa usada como alimento pelos povos orientais há milhares de anos. Conhecida no Ocidente há apenas algumas décadas, a soja e seus derivados são utilizados cada vez mais na indústria de alimentos.

A atividade antioxidante da soja e seus derivados tem sido demonstrada por muitos autores.

O objetivo deste estudo é comparar a atividade antioxidante de algumas cultivares de soja e extrair e identificar substâncias responsáveis por essa atividade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. OXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS

A oxidação dos lipídeos tem como ponto de partida a formação de hidroperóxidos devido à reação do oxigênio com os ácidos graxos, principalmente os insaturados, sendo a velocidade da reação relacionada com o número de insaturações (SWERN, 1964).

RIEMENSCHNEIDER *et alii* (1945) calcularam a velocidade relativa da reação dos ácidos graxos com o oxigênio como sendo de 0,6 para o ácido esteárico, 6 para o ácido oléico, 64 para o ácido linoléico e 100 para o ácido linolênico. HILDITCH & GUNSTONE (1945) encontraram os valores de 4 para o ácido oléico, 48 para o ácido linoléico e 100 para o ácido linolênico. Desse modo, a proporção de ácidos graxos insaturados nos lipídeos é mais importante que o teor de lipídeos totais em um alimento, tendo em vista o processo de autoxidação (LABUZA, 1971).

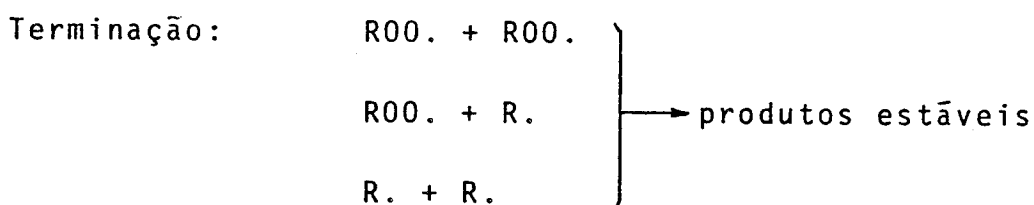
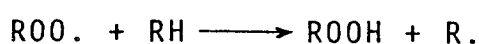
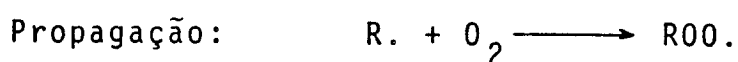
Segundo CHAN (1976, 1982), a oxidação dos lipídeos está associada exclusivamente aos ácidos graxos insaturados, principalmente os poliinsaturados. SWERN (1964) diz que os ácidos graxos saturados e os monoinsaturados também se oxidam, mas a velocidades bem menores que a velocidade de oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, de modo que apenas a oxidação desses últimos tem importância na rancificação dos alimentos.

2.1.1. MECANISMO DA AUTOXIDAÇÃO

O mecanismo da reação da autoxidação vem sendo estudado há muito tempo por vários autores e os resultados desses estudos podem ser encontrados em trabalhos de revisão como os de SWERN

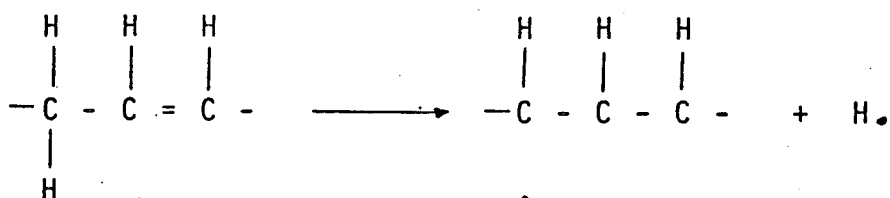
(1961), URI (1961), LUNDBERG (1962) e LABUZA (1971).

A reação do oxigênio com os ácidos graxos para a formação de hidroperóxidos é dividida por esses autores em três etapas: iniciação, propagação e terminação, conforme as equações abaixo:

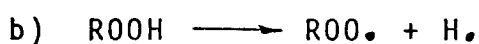
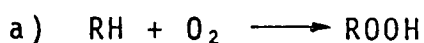


Esta forma simplificada de escrever a reação não esclarece o que realmente ocorre, pois ainda existem dúvidas sobre qual seria o primeiro radical livre formado.

Segundo SHERWIN (1976, 1978) e SHULER (1980), a formação do primeiro radical livre ocorre com a retirada de um átomo de hidrogênio do carbono- α -metilênico da ligação dupla de um ácido graxo insaturado, como a equação abaixo:



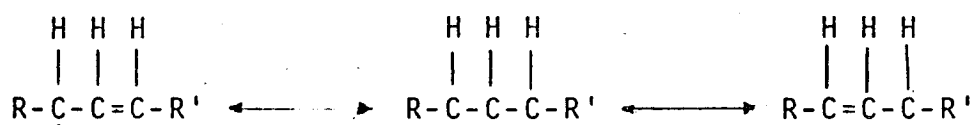
Os estudos iniciais de FARMER *et alii* (1942), FARMER (1946), BOLLAND (1946), BOLLAND & GEE (1946, a, b) também sugerem esse mecanismo mas devido a considerações sobre a energia necessária para romper a ligação C-H- α -metilênico eles concluem que o início da reação se dá pela adição direta do oxigênio à ligação dupla formando dois radicais livres, conforme as equações a seguir:



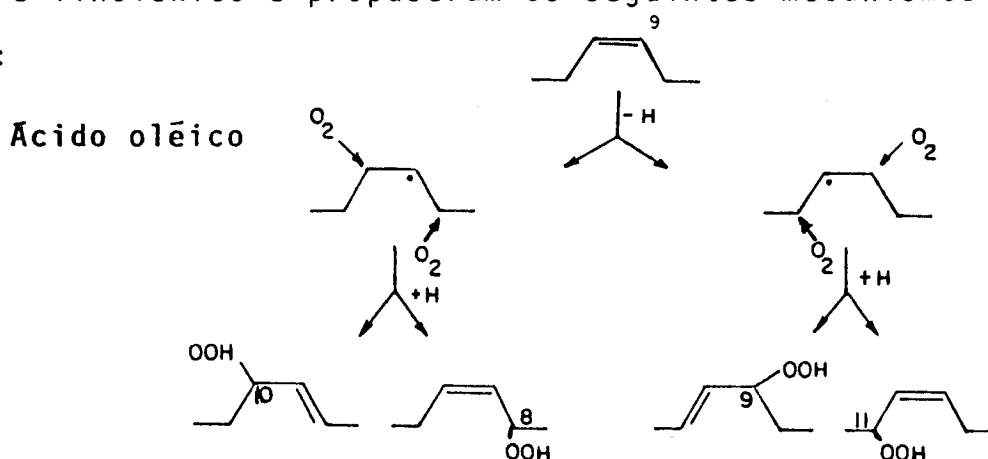
Em revisões mais recentes, LOGANI & DAVIES (1980) e FRANKEL (1980) apresentam dois mecanismos distintos para a formação do primeiro radical livre.

2.1.2. AUTOXIDAÇÃO PELA FORMAÇÃO INICIAL DE RADICAIS LIVRES

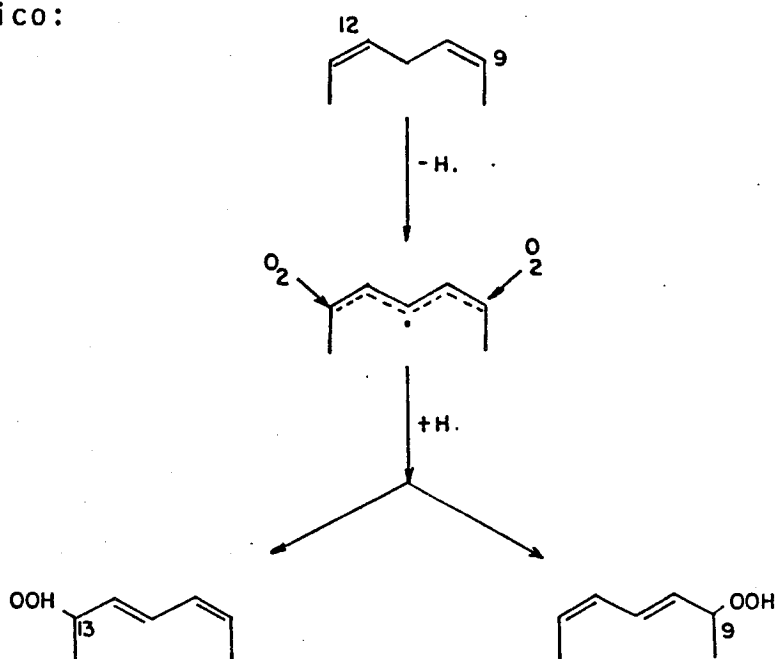
Segundo este conceito, a formação do primeiro radical livre se dá pela cisão da ligação C-H proposta por SHERWIN (1976, 1978), SHULER (1980) e SWERN (1961). A análise de hidroperóxidos formados na oxidação do oleato de metila comprova a teorias de FARMER (1942, 1946) e BOLLAND (1949) de que o primeiro radical livre formado na autoxidação tem a estrutura de um híbrido de ressonância nas formas:



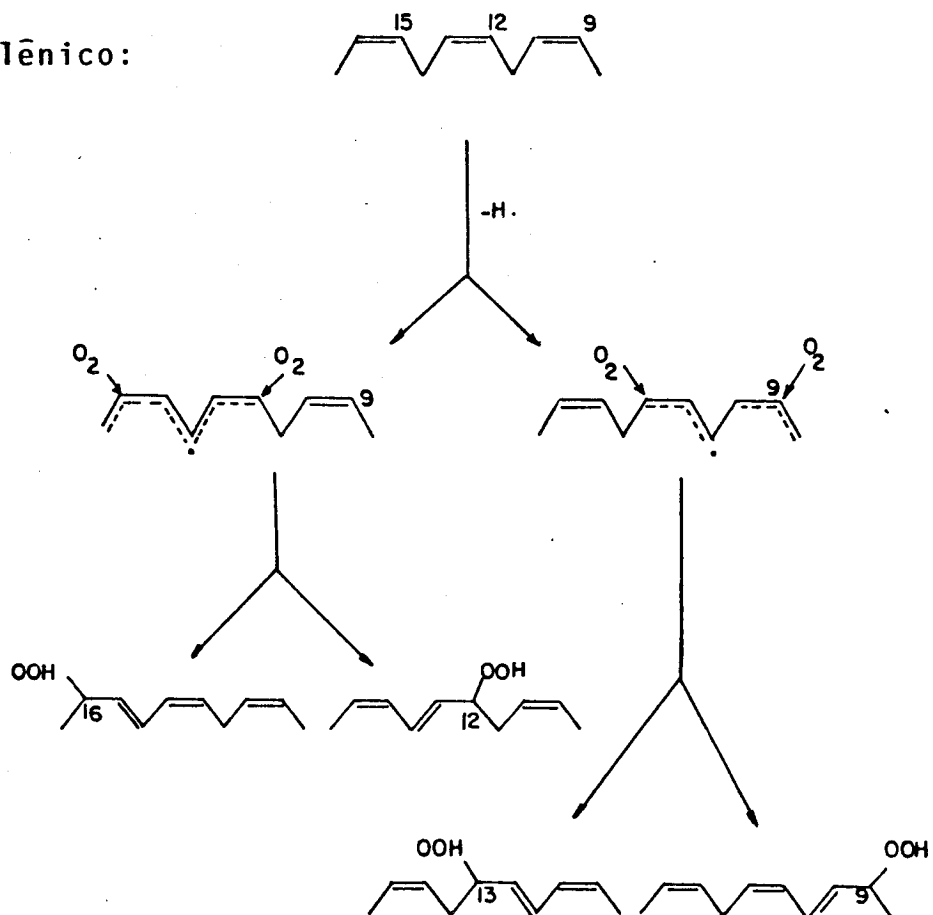
FRANKEL *et alii* (1977 a, b, c) investigaram a composição dos hidroperóxidos formados na autoxidação dos ácidos oléico, linoléico e linolênico e propuseram os seguintes mecanismos para as reações:



Ácido linolêico:



Ácido linolênico:



Na quantificação dos hidroperóxidos formados pela autoxidação dos ésteres metílicos desses ácidos graxos, apenas os isômeros derivados do ácido linoléico corresponderam à distribuição prevista por esses mecanismos. Os desvios encontrados podem ser atribuídos ao rearranjo dos hidroperóxidos alílicos (BRYLL, 1965); reações de decomposição ou ciclização dos hidroperóxidos (SWERN *et alii*, 1948; SWIFT & DOLLEAR, 1948; HAVERKAMP-BEGEMANN *et alii*, 1968, PRYOR *et alii*, 1976) ou à seletividade da reação do oxigênio com alguns radicais livres devido à fatores de estereoquímica (CHAN & LEVET, 1977).

2.1.3. OXIDAÇÃO PELA ADIÇÃO DE OXIGÊNIO NO ESTADO "SINGLET"

A adição de oxigênio no estado normal 3O_2 , "triplet", a ligação dupla é difícil porque requer muita energia (64 Kcal/mol) e a mudança dos "spins" dos elétrons nos orbitais moleculares (WATERS, 1941).

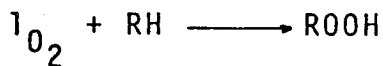
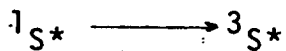
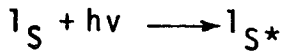
FOOTE & WEXLER (1964 a, b), COREY & TAYLOR (1964) e McKEOUN & WATERS (1966) estudaram a adição de oxigênio a olefinas. Verificaram que a barreira formada pela conservação dos "spins" dos elétrons e pela energia da ativação da reação poderia ser superada se se considerasse a reação com o oxigênio no estado excitado 1O_2 , "singlet". Esse estado de excitação pode ser produzido pela transferência da energia absorvida por substâncias fotossensíveis ao oxigênio no estado normal, "triplet" (CRAM & HAMMOND, 1964).

Muitas dessas substâncias fotossensíveis, como as clorofilas e heme-proteínas podem ser encontradas nos alimentos (KHAN *et alii*, 1954; COBERN *et alii*, 1966; CARLSON *et alii*, 1976; FEDELI *et alii*, 1971; SATTER & DEMAN, 1976).

A reação do oxigênio com alguns metais também pode produ-

zir oxigênio no estado "singlet" (URI, 1961; AURAND *et alii*, 1977).

Com base nesses princípios, RAWLS & VAN SATEN (1966) propuseram o seguinte mecanismo para a formação dos primeiros radicais livres:



onde:

I_S é uma substância fotossensível (clorofila, por exemplo).

hv é a energia na forma de luz no comprimento de onda apropriado.

I_{S^*} é a substância fotossensível excitada pela absorção da energia luminosa.

3_{S^*} é a substância fotossensível no estado "triplet".

3O_2 é o oxigênio no estado "triplet".

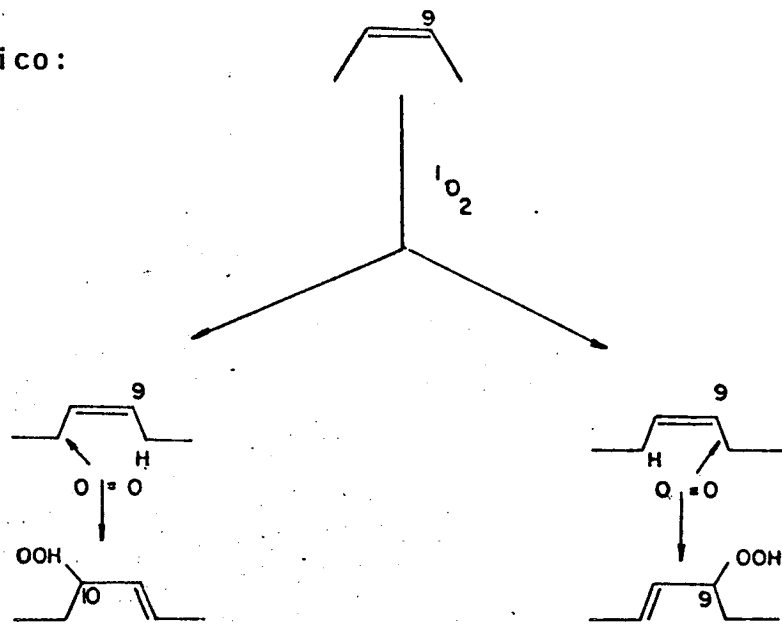
1O_2 é o oxigênio no estado "singlet".

RH é um ácido graxo insaturado.

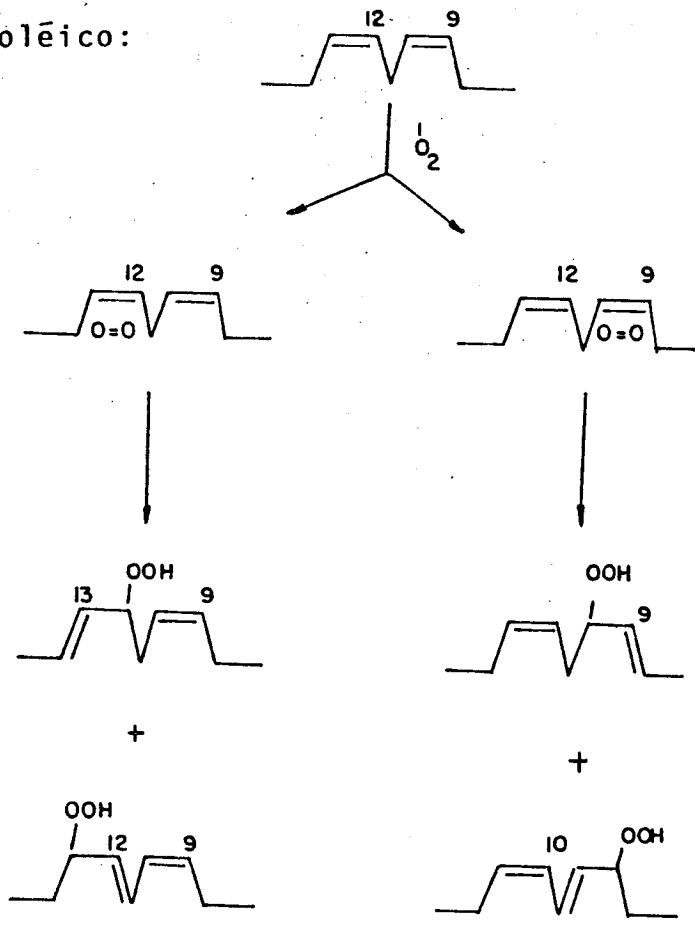
$ROOH$ é um hidroperóxido.

FRANKEL (1979, 1980) sugere o seguinte mecanismo para a formação dos hidroperóxidos pela reação do oxigênio no estado "singlet" com os ácidos oléico e linoléico:

Ácido oléico:



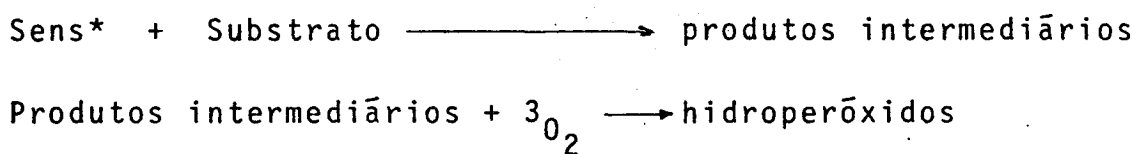
Ácido linoléico:



RAWLS & VAN SATEN (1970) estudaram a oxidação do linoleato de metila pelo oxigênio no estado "singlet" produzido por radiofrequência e por fotossensibilização de pigmentos naturais. A composição de hidroperóxidos formados nessas reações sugere que o mecanismo da reação é o mesmo nos dois casos. Além disso verificaram que o oxigênio no estado "singlet" reage pelo menos 1450 vezes mais rapidamente com o linoleato de metila que o oxigênio no estado "triplet". Segundo esses autores, a fotooxidação do linoleato de metila pode ocorrer por outro mecanismo não identificado.

CLEMENTS *et alii* (1973) confirmaram essas observações estudando a fotooxidação do 4-cis, 7-cis undecadieno separadamente e junto com o óleo de soja, que pode agir como sensibilizador na oxidação do undecadieno.

CHAN (1977), estudando a fotooxidação dos ésteres metílicos dos ácidos oléico e linoléico, confirmou o mecanismo da reação com o oxigênio no estado "singlet" mas sugeriu um novo mecanismo, pelo qual o substrato é que reage com o sensibilizador excitado, formando um complexo que reage com o oxigênio no estado "triplet".



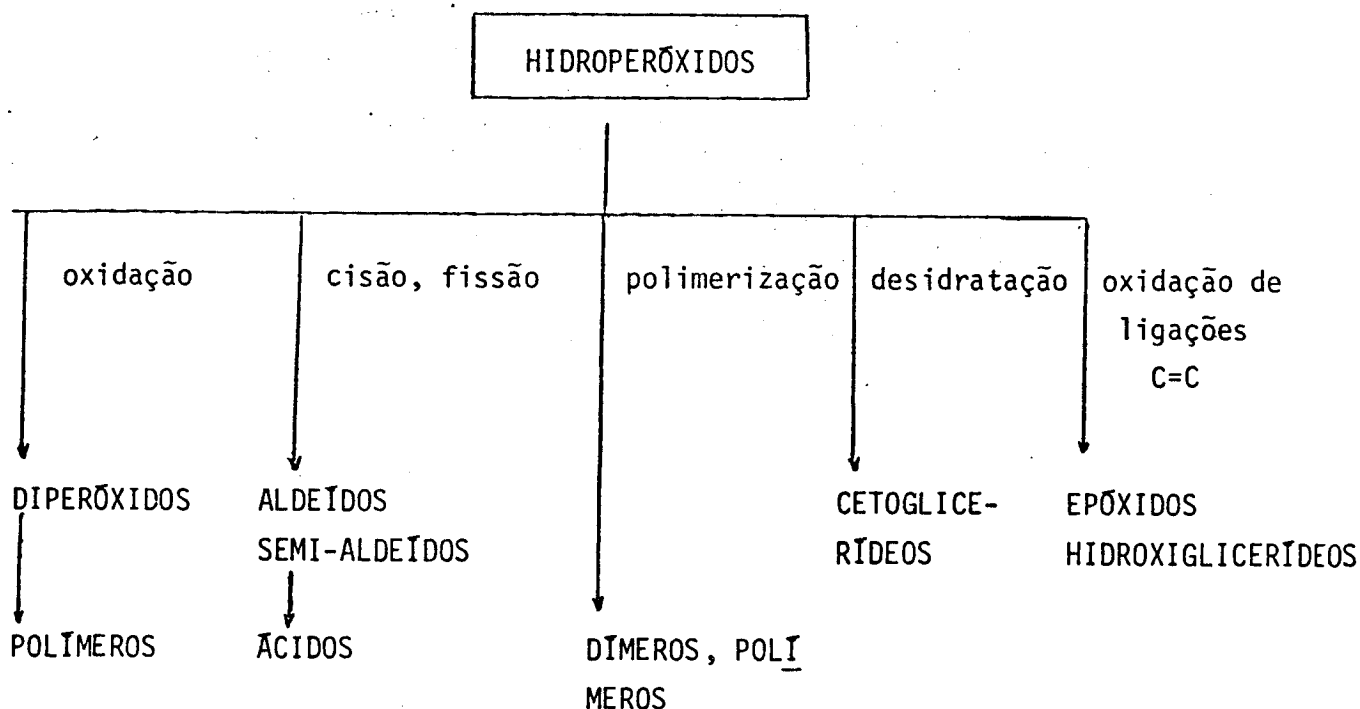
CARLSON *et alii* (1976) verificaram que a fotooxidação dos óleos vegetais pode ser retardada por substâncias capazes de inativar o oxigênio no estado "singlet" mas que os antioxidantes fenólicos, que retardam o processo de autooxidação pela estabilização dos radicais livres, têm pouco efeito na oxidação causada pela luz.

2.1.4. PRODUTOS DA DECOMPOSIÇÃO DOS HIDROPERÓXIDOS

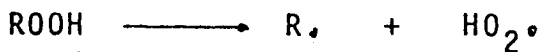
Existem muitas teorias sobre o mecanismo de iniciação da reação de autoxidação, mas todos os autores concordam que os primeiros produtos da reação são os hidroperóxidos.

Os hidroperóxidos "per se" não possuem aromas ou sabores que caracterizam a rancidez dos alimentos. São, no entanto, instáveis e as substâncias formadas pela sua decomposição alteram as características organolépticas dos alimentos. Algumas dessas substâncias, como os aldeídos hexenal e nonenal, podem ser percebidos nos alimentos em concentrações muito pequenas, da ordem de 0,1 a 1,0ppm (LEA & SWOBODA, 1958a, b; LILLARD & DAY, 1961; BERRY & McKERRIGAN, 1958; BADDINGS, 1960; KEPPLER *et alii*, 1965).

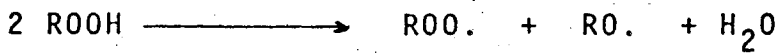
São muitos os mecanismos propostos para a decomposição dos hidroperóxidos. LEA (1962) mostra o seguinte esquema geral:



LABUZA (1971) divide a decomposição dos hidroperóxidos em duas fases, de acordo com a concentração. A primeira fase, monomolecular, ocorre quando a concentração de hidroperóxidos ainda é pequena, no início da reação:

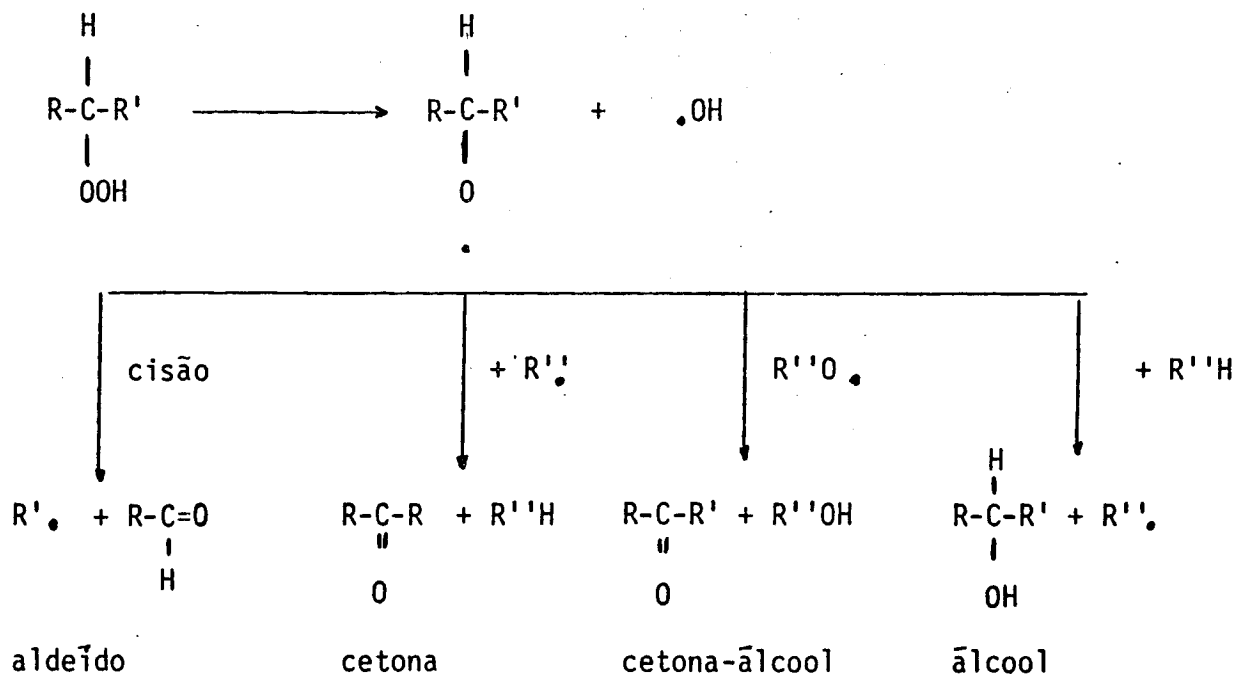


A segunda fase, bimolecular, passa a ocorrer com o aumento da concentração dos hidroperóxidos:

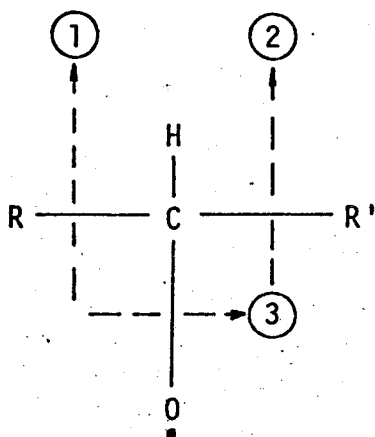


Em ambos os casos, os produtos são radicais livres, que agem como propagadores da reação em cadeia.

KEENEY (1962) apresenta o mecanismo proposto por BELL *et alii* (1951) e por BADDINGS (1960), em que numa primeira fase ocorre a decomposição do hidroperóxido em radicais livres: alcoxi e hidroxí. Esses radicais livres, formam aldeídos, álcoois, cetonas e outros radicais livres:



Segundo CHAN (1976) e FRANKEL (1980), o radical alcoxi po de sofrer cisões entre as ligações C-C ou C-O, dando origem a aldeídos ou a novos hidroperóxidos por isomerização:



onde: ① e ② → aldeídos
 ③ → hidroperóxidos (Isomerização)

LOURY (1972) apresenta uma visão mais geral da autoxidação e diz que o mecanismo é mais complexo, porque os produtos formados na decomposição dos hidroperóxidos são, por sua vez, oxidados, dando origem a dezenas de outras substâncias e reações.

A formação dos aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos e outras substâncias resultantes da decomposição dos hidroperóxidos po de ser encontrada em trabalhos de revisão como os de FRANKEL (1978, 1979, 1980); USUKI & KANEDA (1980); WHITLOCK & NAWAR (1976), CHANG & SMOUSE (1967); PERKINS (1960); GADDIS *et alii* (1959a, b, 1960) JOHNSON *et alii* (1953, 1957a, b); SWIFT *et alii* (1948, 1949).

Os hidroperóxidos também reagem com as ligações duplas, formando epóxidos (FARMER *et alii*, 1942; KNIGHT *et alii*, 1951; CHANG & SMOUSE, 1967), ou entre si, formando dímeros e polímeros (PERKINS, 1960; FRANKEL, 1960; JOHNSON 1957a, b; WITTING *et alii*, 1957).

TERAO & MATSUSHITA (1977a, b, 1978, 1980) verificaram que

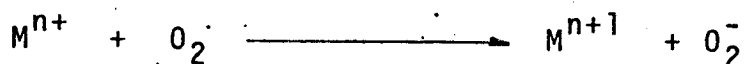
a composição dos hidroperóxidos formados pela oxidação dos ácidos graxos por fotossensibilização da clorofila e a dos formados pela oxidação com o oxigênio no estado "singlet" é muito semelhante. Constataram, ainda, que a fraca atuação dos tocoferóis como antioxidantes frente à fotooxidação pode ser reforçada pela adição de β -caroteno que age como um filtro para a luz.

2.1.5. OUTROS MECANISMOS PARA O INÍCIO DA AUTOXIDAÇÃO

A oxidação dos ácidos graxos também pode ser causada pela reação do oxigênio com os metais ou ainda pela reação de hidroperóxidos com metais, produzindo radicais livres (FRANKEL 1980).

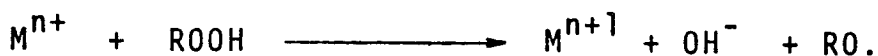
URI (1961) classifica a ação catalítica dos metais em três tipos de reação:

a) Reação direta do oxigênio com os metais:

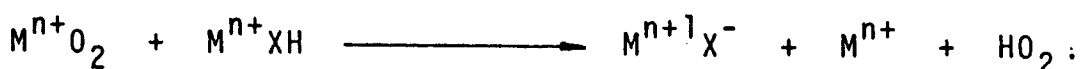


O radical O_2^- pode agir como iniciador da reação em cadeia. Segundo AURAND (1977), esse radical passa a oxigênio no estado "singlet".

b) Reação do metal com traços de hidroperóxidos presentes no sistema formando radicais livres:



c) Reação do oxigênio com o metal formando complexo e liberando um radical HO_2 .:



A ação dos metais como catalisadores da autoxidação dos lipídeos pode ser estudada nos trabalhos de revisão de INGOLD (1962) e LABUZA (1971).

WATERS(1971) em seu trabalho de revisão sobre o mecanismo e a cinética das reações de autoxidação catalisada por metais diz que o principal modo de ação dos metais é a formação de radicais livres pela decomposição dos hidroperóxidos, segundo a reação:



O efeito catalisador depende da velocidade da reação.



A velocidade desta última reação depende dos grupos aos quais o metal está ligado.

TAPPEL (1961, 1962) sugere um mecanismo semelhante para a ação das hemeoproteínas que reagem com os hidroperóxidos, formando complexos e catalisando a liberação de radicais livres.

WILLS (1966), LOVE & PEARSON (1971), ERIKSON *et alii* (1971), LIU (1970a, b) e LIU & WATTS (1970) estudaram a oxidação dos lipídeos da carne. Comprovaram que a oxidação pode ser causada por hemeoproteínas e outros complexos que contenham ferro.

TAPPEL (1961, 1962) cita as lipoxidases como formadoras de hidroperóxidos, mas por um mecanismo diferente da oxidação por radicais livres. A ação de lipoxidase é específica para o ácido linoléico.

2.1.6. EFEITOS BIOLÓGICOS DA AUTOXIDAÇÃO DOS LIPÍDEOS

O efeito mais visível da oxidação dos lipídeos nos ali-

mentos é a perda da qualidade organoléptica devido à produção de substâncias voláteis que dão origem a aromas e sabores estranhos (LUNDBERG, 1962; LEA, 1962; SHERWIN, 1976).

A degradação dos ácidos graxos essenciais, das vitaminas e outros nutrientes, induzida pela oxidação dos lipídeos é um fato bem estabelecido na literatura, desde os trabalhos de PAVCECK & SMALL (1942); HOLMAN (1949, 1950); WITTING *et alii* (1957); ALFIN-SLATER (1959).

PERKINS (1960) estudou as transformações químicas e nutricionais causadas pelo tratamento térmico dos óleos e gorduras. O efeito negativo da ingestão de gorduras altamente oxidadas no crescimento e reprodução de ratos e outros animais foi estudado por CRAPTOM *et alii* (1951a, b; 1953, 1956); KAUNITZ *et alii* (1952, 1956, 1962); JOHNSON *et alii* (1956, 1957a, b). KAUNITZ (1962) e MELNIC (1957a, b) concordam com essas observações mas ressaltam que na maioria desses estudos foram usadas gorduras ou frações de gorduras, oxidadas em condições muito mais drásticas que as encontradas no processamento normal dos alimentos.

KEANY *et alii* (1959) & POLLING *et alii* (1960) conseguiram diminuir o efeito depressivo no crescimento de ratos, causado pela ingestão de gorduras oxidadas em condições normais de uso, com uma dieta suplementar rica em ácido linoléico e vitaminas.

Os hidroperóxidos e os produtos da sua decomposição reagem com as proteínas e aminoácidos causando a perda de seu valor nutricional (TAPPEL, 1955; WENDEMEYER & DOLLEAR, 1966; ROUBAL & TAPPEL, 1966; ROUBAL, 1971), perda da sua atividade como enzimas (CHIO & TAPPEL, 1969; WILLS, 1961), cisão da cadeia polipeptídica (ZIRLIN & KAREL, 1969) formação de pigmentos marrons (BRADDOCK & DUGAN, 1973) e a destruição das membranas das paredes celulares (TSEN & COLLIER, 1960; WILLS & WILKINSON, 1966).

As transformações químicas e os efeitos biológicos da oxidação dos lipídeos podem ser estudados nos trabalhos de revisão de PERKINS (1960), KAUNITZ (1962), KUMEROW (1962), GARDNER (1979), LOGANI & DAVIES (1980).

2.2. ANTIOXIDANTES

Devido aos efeitos da oxidação dos lipídeos nos alimentos é natural que um grande número de pesquisadores se dedique à solução dos problemas causados por essas reações químicas.

As substâncias capazes de evitar ou retardar a oxidação dos lipídeos são chamadas de antioxidantes (LUDBERG, 1962; STUKEY, 1962).

Segundo CHIPAUT (1962), o antioxidante ideal para alimentos deveria ter as seguintes qualidades:

1. Ser ativo em baixas concentrações;
2. Não ser tóxico nas concentrações usadas;
3. Não causar aromas ou sabores estranhos aos alimentos;
4. Ser facilmente incorporado aos alimentos;
5. Ser de fácil produção e baixo custo;
6. Ser de fácil detecção e determinação nos alimentos, para controle do seu uso.

Tendo em vista o mecanismo mais aceito para a oxidação dos lipídeos, ou seja, a reação em cadeia propagada por radicais livres, URI (1961), SHERWIN (1976, 1978) e SHULER (1980) sugerem dois tipos de medidas para retardar a reação: evitar a formação de radicais livres ou a propagação da reação em cadeia.

LABUZA (1971) divide os antioxidantes em três tipos:

1. Fatores ambientais.
2. Substâncias que evitam a formação de radicais livres.
3. Inibidores da reação em cadeia.

2.2.1. FATORES AMBIENTAIS

Umidade: a água é um dos principais componentes dos alimentos. Serve como solvente para os outros componentes, substrato e meio para reações químicas (FENNEMA, 1976).

Em alimentos com alto teor de umidade, as transformações causadas pelos microrganismos são os fatores mais importantes de deterioração (SCOTT, 1957; CHRISTIAN, 1963). A desidratação é um dos meios tradicionais de preservação dos alimentos (DESROSIER, 1977). A desidratação dos alimentos a teores muito baixos de umidade causa a exposição direta dos lipídeos ao oxigênio do ar e, conseqüentemente, acelera a sua autoxidação (LABUZA *et alii*, 1970).

Os mecanismos e efeitos do teor de umidade residual na oxidação dos lipídeos dos alimentos desidratados foram estudados por LABUZA *et alii* (1966a, b; 1969a, b; 1970, 1971a, b), que verificaram a influência da monocamada de moléculas de água residual na proteção dos lipídeos.

Luz e calor: a energia necessária à formação inicial de radicais livres pode ser fornecida pela luz, com ou sem o auxílio de fotossensibilizadores (FRANKEL, 1980).

O calor, de modo geral, acelera as reações químicas (CASTELAN, 1967). A influência da temperatura na velocidade das reações de autoxidação pode ser estudada nos trabalhos de revisão de LABUZA (1971), URI (1962), LUNDBERG (1962) e PERKINS (1960).

Oxigênio: MARCUSE & FREDRIKSON (1971a, b, c) estudaram o efeito da pressão parcial do oxigênio na velocidade da oxidação dos lipídeos, em um sistema modelo que continha ácido linolêico. Verificaram que a velocidade da reação diminui muito quando o teor de oxigênio nos gases sobre o substrato é menor que 5%.

Segundo BERK (1976), a velocidade da reação de autooxidação é proporcional à pressão parcial do oxigênio no meio.

A influência da concentração de oxigênio também é considerada nos trabalhos de revisão de LABUZA (1971), URI (1962) e LUNDBERG (1962).

2.2.2. SUBSTÂNCIAS QUE EVITAM A FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

Os antioxidantes desse grupo são substâncias quelantes que impedem a atividade catalisadora dos metais na formação de radicais livres.

Traços de metais presentes nos alimentos ou sistemas lipídicos reduzem a energia necessária à formação de radicais livres, aumentando a velocidade da reação (COWAN, 1966).

EVANS *et alii* (1951), ZIELS & SCHMIDT (1945) e MORRIS *et alii* (1950) estudaram o efeito catalisador do cobre, ferro, chumbo, manganês, níquel e estanho no desenvolvimento da autooxidação. A cinética e o mecanismo das reações catalisadas por metais podem ser estudados nas revisões de INGOLD (1962) e WATERS (1971).

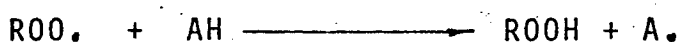
Os agentes quelantes usados na indústria de alimentos são ácidos cítrico, tartárico, fosfórico (SWERN, 1946; SHERWING, 1976; 1978; COWAN, 1966; DUTTON *et alii*, 1948), lecitina (LUNDE, *et alii*, 1976) e, em alguns casos, EDTA (tetraacetato de etilenodiamina) (LABUZA, 1971b; KELLY & WATERS, 1957).

O ácido ascórbico também pode ser usado como agente quelante mas a sua ação principal é a de inativar (seqüestrar) o oxigênio, doando hidrogênio para a formação de água (CORT, 1974; KANNER & MENDEL, 1977; KELLY & WATTS, 1957; KHAN & MARTELL, 1967).

2.2.3. INIBIDORES DA REAÇÃO EM CADEIA

Os inibidores da reação em cadeia são chamados de antioxidantes primários (SHERWIN, 1976; CHIPAUT, 1962). São substâncias que reagem com os radicais livres formando produtos estáveis (FRANKEL, 1980).

O mecanismo mais aceito para a ação dos antioxidantes primários é o proposto por BOLLAND & TEN HAVE (1947), pelo qual o antioxidante cede um átomo de hidrogênio ao radical livre, segundo as equações:



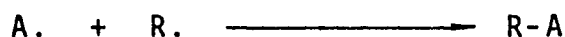
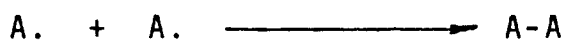
onde: R.; R00. são radicais livres ativos.

AH é o antioxidante.

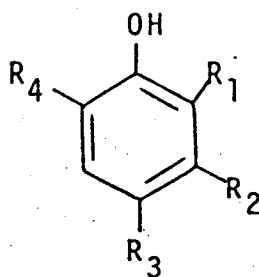
RH; R00H são produtos da reação de antioxidante com o radical livre.

A. é um radical livre estável.

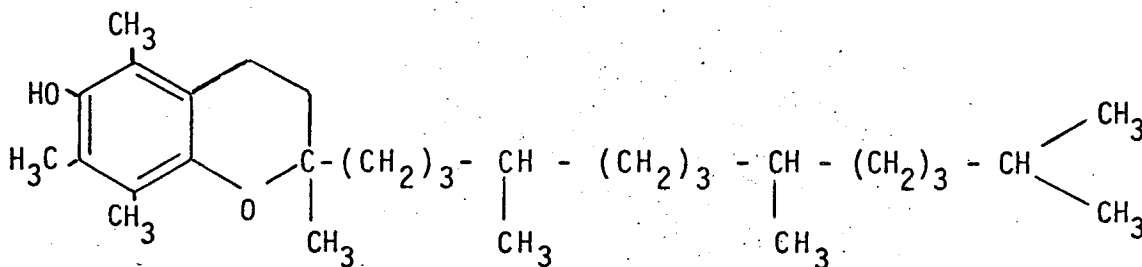
Segundo FRANKEL (1980), o radical livre formado pelo antioxidante pode formar outros produtos estáveis por dimerização ou pela reação com outro radical livre, conforme as equações:



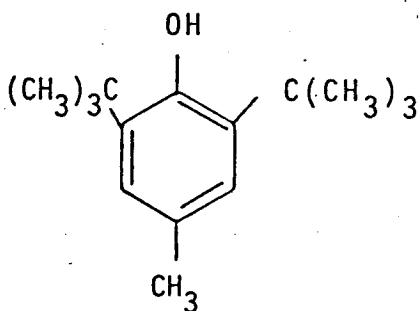
Embora grande número de substâncias possam reagir desse modo, como algumas aminas, por exemplo (BROWNLIE & INGOLD, 1967; ADAMIC, 1970), os antioxidantes primários usados nos alimentos são compostos fenólicos do tipo:



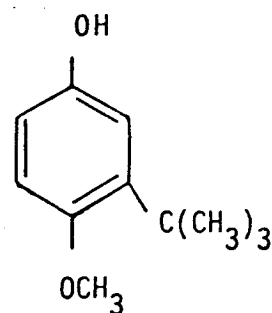
Os antioxidantes fenólicos mais usados na indústria de alimentos são:



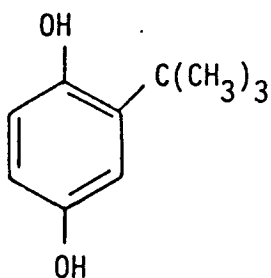
α -Tocoferol



BHT - butil-hidroxitolueno

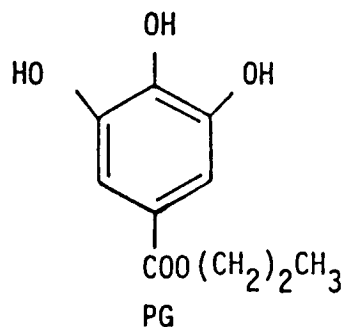


BHA - butil-hidroxianisol



TBHQ

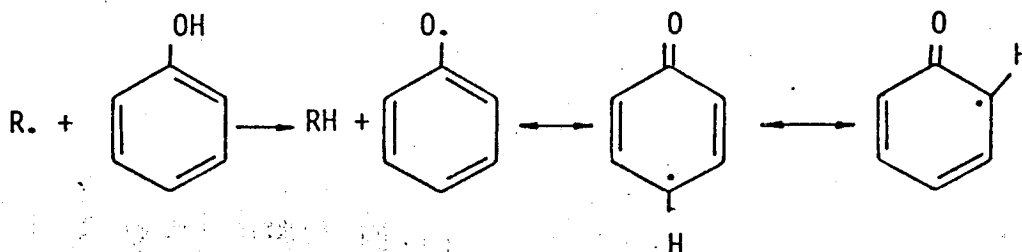
terciobutil-hidroquinona



PG

galato de propila

Na reação dos antioxidantes fenólicos com os radicais livres ocorre a formação de um radical livre que se estabiliza por ressonância conforme a equação:



A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende basicamente da possibilidade da deslocalização do elétron isolado que aparece após a reação com o radical livre. Quanto mais estáveis as formas de ressonância, melhor a atividade antioxidante do composto fenólico. Dessa forma, as substituições orto e para no anel fenólico são mais efetivas que as substituições meta porque proporcionam um número maior de estruturas de ressonância (SCOTT, 1965).

A mistura de dois ou mais antioxidantes primários pode causar o aumento da atividade dos antioxidantes isolados, num efeito chamado sinergismo. Por esta razão, é comum a mistura de várias substâncias antioxidantes na formulação de antioxidantes para alimentos (EASTMAN, 1963; 1974).

Alguns ácidos, como os ácidos cítrico e tartárico, também possuem efeito sinérgico, reduzindo os antioxidantes oxidados pelos radicais livres pela doação de um hidrogênio (KRAYBILL *et alii*, 1949; STUCKEY, 1962; SHERWIN, 1976, 1978).

HUDSON & LEWIS (1983a) atribuem o efeito sinérgico da fosfatidil-etanolamina, na ação antioxidante dos flavonóides, à sua capacidade de regenerar o antioxidante primário pela doação de um hidrogênio.

2.2.4. ANTIOXIDANTES PARA OS ALIMENTOS

No Brasil, o uso de antioxidantes nos alimentos está regulamentado por portarias do Ministério da Saúde (Brasil, 1977) e a legislação em vigor está sendo revisada pela DINAL (Divisão Nacional de Alimentos - Ministério da Saúde), desde 1984 (Brasil, 1984).

Segundo esta legislação, os antioxidantes permitidos e as respectivas siglas para rotulagem dos alimentos são os seguintes:

Antioxidantes	Sigla
- Butil-hidroxianisol - (BHA)	A V
- Butil-hidroxitolueno - (BHT)	A VI
- Terciobutil hidroquinona - (TBHQ)	A XIX
- Ácido gálico e derivados	A IX
- Guaiacol (resina)	A X
- Tocoferóis	A XI
- Lecitina (fosfolídeos)	A VIII
- Ácido cítrico e derivados	A II
	A XII
	A VII
- Ácido ascórbico e derivados	A I
	A XIV
	A XV
- Ácido fosfórico	A III
- EDTA	A XII

2.2.5. ANTIOXIDANTES NATURAIS

Os antioxidantes fenólicos usados na indústria de alimentos, como o BHT, BHA e TBHQ são aditivos sintéticos. Embora trabalhos de revisão como os de JOHNSON (1971), BRANEN (1975) e PASCAL (1978) indiquem que essas substâncias não são tóxicas nas concentrações usadas nos alimentos, atualmente existe uma tendência à substituição dos aditivos sintéticos por outros de origem natural (MARSHAL, 1974; CHANG *et alii*, 1977).

Os tocoferóis, por exemplo, são antioxidantes naturais muito citados na literatura (SHERWIN, 1976, 1978; SWERN, 1964; CHIPAUT, 1962).

O gossipol, extraído do algodão, é um poderoso antioxidante, embora tóxico (STUCKEY, 1962). CHIPAUT (1957) e CHIPAUT *et alii* (1952, 1955, 1956) estudaram a atividade antioxidante de várias espécies de condimentos e extratos de plantas. CHANG *et alii* (1977, 1982, 1984), seguindo as observações de RAC & OSTRIC (1955), isolaram e identificaram três substâncias fenólicas: rosmanol, car nosol e rosmaridifenol, com propriedades antioxidantes, extraídas das sementes de rosmanol (*Rosmarinus Officinalis* L.). INATANI & NAKTANI (1981) e INATANI *et alii* (1983) determinaram a estrutura e estudaram a atividade antioxidante do rosmanol em vários substratos.

BRACCO *et alii* (1982) desenvolveram um processo industrial para a produção de extratos antioxidantes em óleo, a partir de condimentos como sálvia (*Salvia Officinalis* L.), o rosmanol (*Rosmarinus Officinalis* L.) e outras ervas.

TAKAGI & IIDA (1980) extraíram esteróides e álcoois terpenicos com propriedades antioxidantes das sementes de alpiste. SIMS *et alii* (1972), BOSKOW & MORTON (1976) e GORDON & MAGOS (1983)

estudaram a atividade antioxidante de alguns esteróides e álcoois triterpênicos em banha e outros substratos.

FEDELI & CAMURATI (1982) extraíram compostos fenólicos com atividade antioxidante da fase aquosa da extração de óleo de oliva e FEDELI *et alii* (1979) estudaram a atividade antioxidante do ácido clorogênico extraído de sementes de girassol.

HUDSON & DIZIEDZIC (1984a) estudaram a atividade antioxidante dos ácidos p-coumárico, , cafêico, ferúlico, gálico, sinápico e de alguns de seus derivados hidroxilados ou esteres propílicos em banha. A atividade antioxidante desses ácidos depende do número e da posição das hidroxilas do anel fenólico e do efeito estereoquímico ou estabilizante de outros substituintes. Os derivados do ácido cinâmico são mais ativos que os derivados do ácido benzóico e os ácidos fenilacéticos e fenil-propionicos mais ativos ainda.

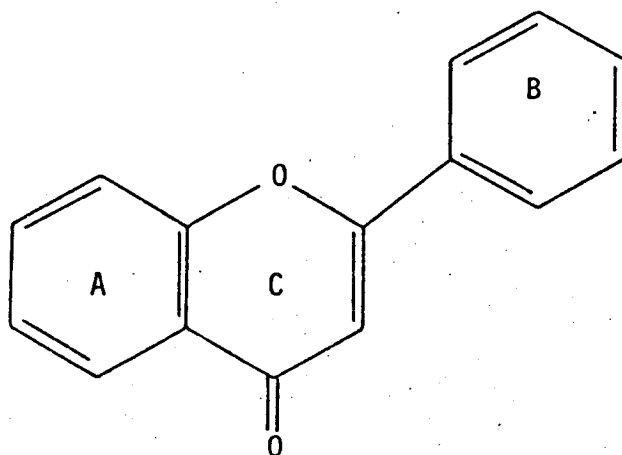
HUDSON & MAHGOUB (1980) extraíram substâncias com atividade antioxidante das folhas de algumas ervas; PRATT *et alii* (1984) extraíram substâncias antioxidantes das sementes de sálvia. PRATT & WATTS (1964) e PRATT (1965) extraíram substâncias com atividade antioxidante de várias espécies de vegetais; WHITERN *et alii* (1984) extraíram, com metanol, substâncias antioxidantes da semente de algodão. De modo geral, essas substâncias antioxidantes extraídas de vegetais são ácidos fenólicos ou, principalmente, flavonóides.

2.2.6. FLAVONÓIDES COMO ANTIOXIDANTES

Os flavonóides são substâncias fenólicas encontradas em quase todas as espécies vegetais (HERRMAN, 1976; GEISSMAN, 1962).

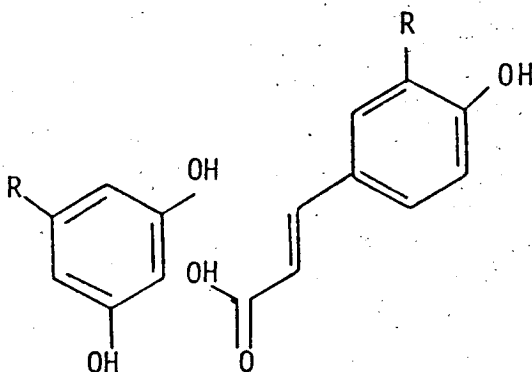
Estruturalmente essas substâncias são formadas por dois anéis aromáticos (A, B) unidos por uma cadeia alifática de três

carbonos os quais com um oxigênio, completam um anel de pirano (C). (HARBORNE *et alii*, 1975) (KÜHNAU, 1976).

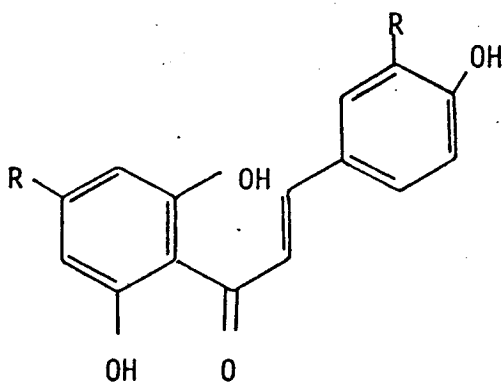


Biologicamente, são formados pela condensação de uma molécula de resorcinol ou phloroglucionol (anel A), com um ácido fenólico insaturado (anel B). O produto da condensação, a chalcona, por ciclização do anel de pirano (anel C), forma os flavonóides.

Resorcinol

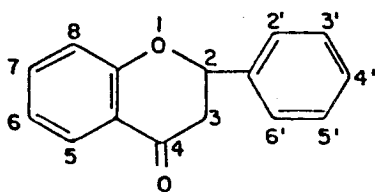


Ácido fenólico

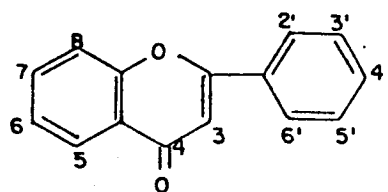


Chalcona

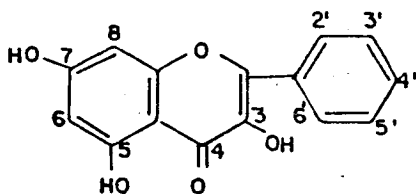
Dependendo da existência ou não de hidroxila na cadeia lateral (C_3) do ácido fenólico precursor, duas famílias de flavonóides são formadas: os desoxiflavonóides e os hidroxiflavonóides (KUHNAW, 1976; BIRCH, 1962; MABRY *et alii*, 1970).



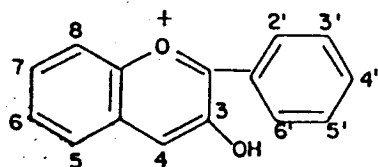
1. Flavanona



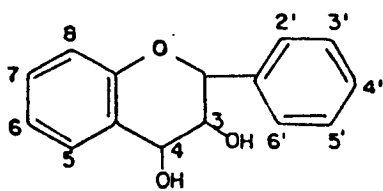
2. Flavona



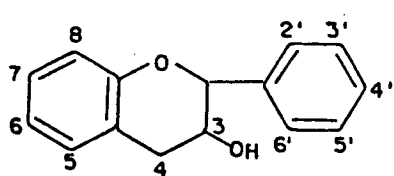
2. Flavonol



4. Antocianidina

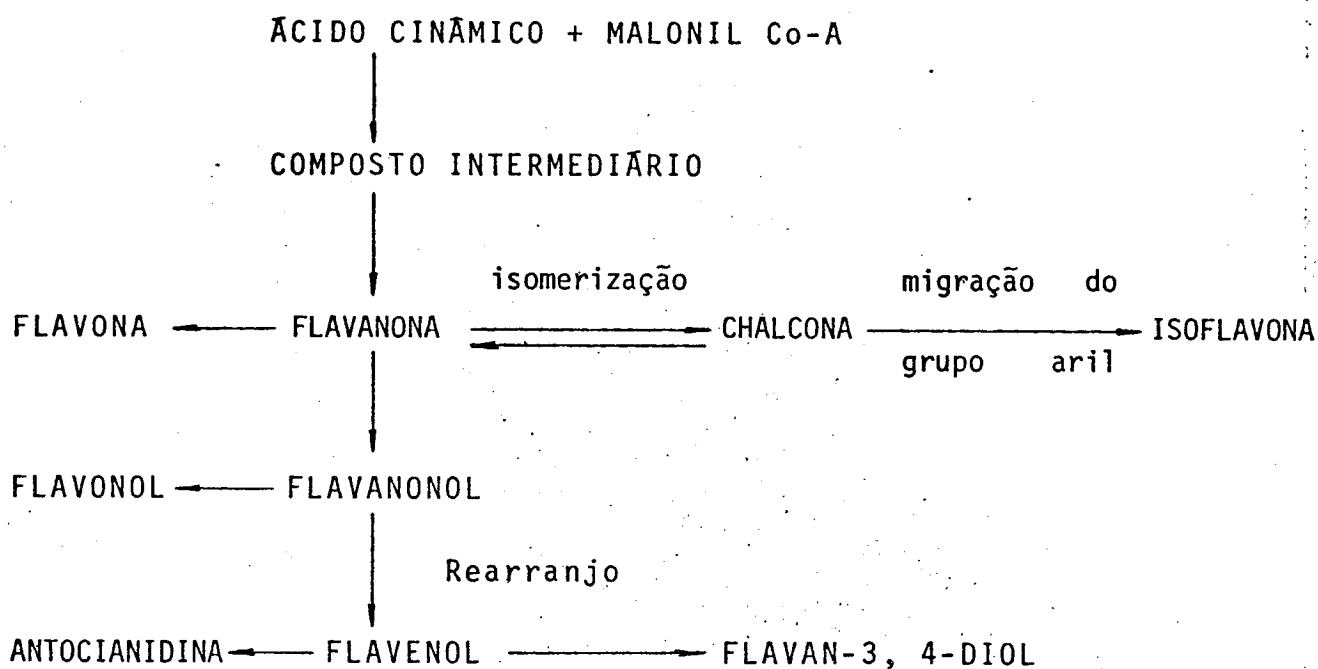


3. Flavan-3,4-diol



6. Flavan-3-ol

HARBONE (1967) apresenta o seguinte esquema para a biosíntese e interconversão dos flavonóides.



O estudo da atividade antioxidante dos flavonóides começa com os trabalhos de HEIMAN & REIFF (1953), LEA & SWOBOBA (1956), SIMPSON & URI (1956), KURT & CHAN (1951), RICHARDSON *et alii* (1947) que investigaram a atividade antioxidante da quercetina e alguns dos seus derivados em linoleato de metila e concluíram que:

1. As hidroxiflavonas agiam principalmente como antioxidantes primários estabilizando radicais livres e retardando a propagação em cadeia;

2. A atividade da quercetina era equivalente à do galato de propila;

3. A atividade se devia ao número e à localização das hidroxilas, sendo importantes a hidroxila livre no carbono 3 e a orto-hidroxilação do anel fenólico, como favoráveis e a meta-hidroxilação do sistema de anéis da cromona como desfavorável;

4. Era importante a estrutura cetônica do anel da pirona.

METHA & SESHADRI (1958) confirmaram essas observações estudando a atividade dos flavonóides em banha de porco e sugeriram que parte da atividade se devia à complexação dos metais pelos flavonóides.

LEWIS & WATTS (1958) e KELLEY & WATTS (1957) estudaram a formação de complexos entre os flavonóides e os metais. Verificaram uma atividade como seqüestrantes do cobre pouco menor que a do ácido cítrico. DETTY *et alii* (1955) verificaram que a atividade quelante depende do pH e pode ocorrer entre o oxigênio do grupo cetônico e as hidroxilas vizinhas (C₃ ou C₅) ou entre hidroxilas em posição orto.

CRAWFORD *et alii* (1961) estudaram o efeito da metilação seletiva das hidroxilas da quercetina e da diidroquercetina nas suas atividades antioxidantes, usando banha como substrato. Concluíram que:

1. As poliidroxi flavonas possuem características estruturais para agirem como antioxidantes primários e como agentes quelantes.

2. As hidroxilas nas posições 3' e 4' (orto) do anel fenólico são essenciais à atividade antioxidante da quercetina, uma vez que a sua metilação reduziu a atividade antioxidante do produto formado para 15% da atividade da quercetina.

3. As hidroxilas nas posições 5 e 6 do anel de cromona não são muito importantes individualmente, uma vez que a sua metilação em separado reduziu a atividade da quercetina em 10% e 20%, respectivamente. A metilação simultânea das duas hidroxilas reduziu em mais da metade a ação antioxidante da quercetina.

4. A insaturação entre os carbonos 2 e 3, no anel de pirano, é muito importante, porque a sua hidrogenação reduziu em 70% a atividade de quercetina.

PRATT & WATTS (1964), estudando a atividade antioxidante de extratos aquosos de vários vegetais em um sistema contendo banha e caroteno, verificaram que as substâncias ativas desses extratos eram principalmente a quercetina e seus derivados e que a atividade dos compostos hidrolisados era igual à dos glicosídeos. Ao contrário dos outros autores, a importância da insaturação entre os carbonos 2 e 3 não foi confirmada, sendo, entretanto, a dihidroxilação do anel B confirmada como importante.

LETAN (1966a), estudando a atividade antioxidante da quercetina em ésteres metílicos de ácidos graxos, verificou que a metilação das hidroxilas nas posições 3 e 5, 3 e 7 e 5 e 7 do anel A causa considerável redução da atividade antioxidante da quercetina, ao passo que a metilação apenas da hidroxila na posição 7 teve pouca influência. A metilação da hidroxila 3' ou da 4', ou a sua metilação conjunta, ou a metilação conjunta de uma hidroxila do anel B e de uma hidroxila do anel A reduzem em 90% a atividade antioxidante da quercetina. A 3, 7, 3', 4' -tetrametil quercetina não apresentou atividade antioxidante enquanto a hidrogenação da ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 reduziu a atividade em 50%.

Quanto à atividade quelante da quercetina, LETAN (1966b) confirmou as observações a respeito da atividade do oxigênio cetônico com as hidroxilas vizinhas mas não encontrou atividade quelante nas hidroxilas 3', 4'. A hidrogenação da ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 tornou a quercetina praticamente inativa.

HUDSON & LEWIS (1983b) e HUDSON & DZIEDZIC (1983, 1984b) estudaram o efeito da estrutura na atividade antioxidante de vários flavonóides e concluíram que os fatores importantes para essa atividade são:

1. O grupo cetônico no carbono 4;

2. As hidroxilas no carbono 4' e 3' do anel B;
3. As hidroxilas nos carbonos 3 ou 5 do anel A.

2.2.7. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOJA E SEUS DERIVADOS

A soja e seus derivados podem ser usados como alimentos ou como componentes de alimentos, por razões nutricionais e funcionais (MARKLEY, 1944; WOLF, 1971; SMITH & CIRCLE, 1972; COSTA, 1976). A sua atividade como antioxidante tem sido estudada por vários autores (HAYES *et alii*, 1977).

MUSHER (1935a, b) estudou a atividade antioxidante de grãos e cereais, principalmente aveia e soja. GREEN & HILDITCH (1937) extraíram substâncias antioxidantes da soja, usando ácido acético diluído como solvente. SYLVESTER *et alii* (1942) adicionaram farinha de soja a gorduras em várias proporções e verificaram que a atividade antioxidante dependia do estado inicial das gorduras e da percentagem de farinha adicionada. OVERMAN (1947, 1951) e LIPSET *et alii* (1949) usaram farinha de soja integral e desengordurada na preparação de macarrão e biscoito e observaram que a estabilidade dos produtos frente à oxidação dos lipídeos era melhorada proporcionalmente à quantidade de farinha usada; NEIL & PAGE (1956) verificaram que a adição de farinha de soja à carne de porco "*in natura*", cozida ou congelada, retardava a formação de peróxidos. BOOKWALTER *et alii* (1971a, b) e ANDERSON (1976) prepararam alimentos à base de farinha de milho e verificaram que a adição de farinha de soja integral ou desengordurada na proporção de até 25% melhorava as qualidades funcionais e organolépticas dos alimentos e a sua estabilidade frente à oxidação dos lipídeos, independentemente do uso ou não de antioxidantes comerciais como o BHT e o BHA. SANGOR & PRATT (1974) verificaram a atividade antioxidante da

proteína texturizada de soja em sopas de carne com legumes. BURNS & QUAQUENBUSH (1951) e WALL & KELLEY (1951) usaram farinha de soja como suporte para preparações contendo vitamina A e constataram um aumento no período de estabilidade do produto.

PRATT (1971) estudou a atividade antioxidante de extratos aquosos de soja integral natural, e após secagem em estufa, da farinha desengordurada e do concentrado proteico de soja. Os extratos dos produtos que sofreram tratamento térmico e os extratos em água quente apresentaram atividade antioxidante maior que a dos extratos em água fria e dos extratos de produtos que não tiveram tratamento térmico. O extrato da soja natural em água fria apresentou forte atividade pró-oxidante, provavelmente devido à extração conjunta da lipoxidase. Os extratos em água fria, após aquecimento até a ebulição, apresentaram atividade antioxidante semelhante à dos extratos em água quente.

A atividade antioxidante da soja tem sido atribuída a várias substâncias.

DAHLE & NELSON (1941) prepararam extratos de soja em água, etanol, éter etílico, acetona e hexano e testaram a atividade antioxidante desses extratos em gordura de manteiga. Segundo esses autores, a atividade antioxidante dos extratos se devia a vários componentes da soja, principalmente os fosfatídeos, sendo o extrato em etanol o mais ativo.

OLCOT & MATTIL (1936) atribuíram a atividade antioxidante dos fosfolipídeos da soja exclusivamente à cefalina (fosfatidil etanolamina), que agiria como sinergista de antioxidantes primários pela doação de um hidrogênio do ácido fosfórico.

ERDAHL *et alii* (1973) analisaram amostras comerciais de lecitina de soja e encontraram a seguinte composição:

Fosfatidil colina (lecitina)	29%
Fosfatidil etanolamina (cefalina)	23,5%
Fosfatidil inositol.	15,1%
Ácido fosfatídico	7,0%
Outros componentes	7,9%

O óleo de soja bruto contém entre 1,5% e 3% de fosfatídeos (ANDERSON, 1974). Segundo HONING *et alii* (1969), os fosfatídeos correspondem a 60% dos lipídeos extraídos do farelo desengordurado de soja.

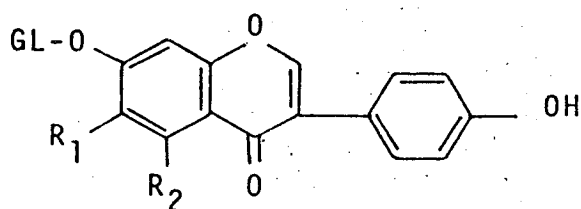
PRATT & WATTS (1964) atribuíram a atividade antioxidante de extratos de vários vegetais aos compostos fenólicos. RHEE *et alii* (1979, 1981) estudaram a atividade antioxidante de extratos aquosos e em metanol de farinhas desengorduradas, concentrados e isolados protéicos de algodão, amendoim e soja. A atividade antioxidante desses extratos apresentou boa correlação com o teor de compostos fenólicos dos extratos.

WALTER (1941) isolou uma isoflavona, a genisteína, a partir de farelo desengordurado de soja, confirmando o trabalho de WALZ (1931), que havia isolado os glicosídeos genistina e daidzina a partir da farinha de soja, obtendo, por hidrólise, as isoflavonas 5, 7, 4' triidroxiiisoflavona (genisteína), 7, 4' diidroxiiisoflavona (daidzeína) e glicose.

NAIN *et alii* (1973) isolaram, a partir de grãos de soja e caracterizaram uma nova isoflavona, 7, 4' diidroxiiisoflavona (gliciteína) que aparentemente é a forma não hidrolisada do antioxidante encontrado por GYORGY *et alii* (1964) e IKEHATA

et alii (1968), a 7, 6, 4' triidroxiiisoflavona, no tempeh, um alimento preparado pela fermentação da soja.

NAIN *et alii* (1974) isolaram e caracterizaram as isoflavonas da soja, encontrando um teor de 0,25% na farinha desengordurada, dos quais 99% na forma de glicosídeos com a seguinte distribuição: genisteína 64%, daidzeína 23% e gliciteína 13%.



Genistina R1 = OH

 R2 = H

Daidzeína R1 = R2 = H

Gliciteína R1 = H

 R2 = CH₃

* GL = Glicose

Segundo ELDRIDGE & KWOLEK (1983), o teor de isoflavonas na soja e a sua distribuição no grão dependem da variedade da cultivar e do local de cultivo, com teores de até 300mg/100g nos grãos das cultivares estudadas.

A maior parte das isoflavonas está nos cotilédones, com teores variando de 158mg/100g a 31mg/100g enquanto na casca os teores são de 10mg/100g a 20mg/100g. A concentração no hipocotilédone é mais alta, de 1495mg/100g a 1756mg/100g mas este representa, em média, apenas 2% do grão de soja (MARKLEY, 1944; SMITH & CIRCLE, 1972).

ELDRIDGE (1982) determinou o teor de isoflavonas em várias amostras de farinha, concentrados e isolados proteicos de

soja, encontrando valores de 210mg/100g a 305mg/100g nas farinhas, 21mg/100g a 317mg/100g nos concentrados, e 103mg/100g a 145mg/100g nos isolados.

PRATT & HAMMERSHIMIDT (1978), PRATT & BIRAC (1979) e PRATT *et alii* (1982) estudaram a atividade antioxidante da soja e seus derivados e atribuíram essa atividade a compostos fenólicos, como os ácidos clorogênico, cafêico e ferúlico e também, às isoflavonas.

ARAI *et alii* (1966) identificaram os ácidos siríngico, vanílico, cafêico, ferúlico, p-cumárico e p-hidroxibenzóico na farinha de soja integral desengordurada.

NAIN *et alii* (1976) demonstraram que a atividade antioxidante das isoflavonas da soja está correlacionada com o número de hidroxilas livres.

HUDSON & DZIEDZIC (1983) estudaram a atividade antioxidante de algumas isoflavonas e flavonas em banha de porco. As isoflavonas foram consideradas antioxidantes fracos em relação às flavonas; a presença de hidroxilas livres nos carbonos 5 e 4' e da carboxila no carbono 4 foram consideradas essenciais à estabilização do radical fenóxido formado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Durante este estudo foi examinada a atividade antioxidante de várias cultivares de soja, de diferentes locais de cultivo e safras. Na etapa final, tendo em vista os resultados dos testes preliminares e a facilidade de obtenção do material, os testes foram feitos com a cultivar IAC-8 fornecida pelo Instituto Agronômico de Campinas.

No Quadro 1 está a lista das cultivares usadas neste estudo.

3.1. TESTES PRELIMINARES: SOLVENTES X CULTIVAR (S X C)

A atividade antioxidante dos grãos de soja foi estudada a partir de extratos em vários solventes, obtidos por metodologia semelhante à citada por PRATT & HAMMERSCHMIDT (1978), conforme se segue: para cada extrato, 50g de grãos moídos em moinho de disco (moinho de café "La Cimbali") até se obter uma farinha integral com partículas passando por peneiras de Tyler 20 (Granutest) foram macerados durante 16 horas em 150ml de solvente em um bēquer de 500ml, seguindo-se 4 horas de extração no mesmo solvente da maceração, a 60°C, com agitação por cāpsula magnética (aquecedor/agitador Termolyne, modelo 1000 - Sybrom Corporation). A suspensão resultante desse processo foi filtrada em papel de filtro (Klabin, qualitativo, 80g/m²) e o resíduo lavado com mais 100ml de solvente, a 70°C, que se juntou ao primeiro filtrado. O filtrado foi guardado em refrigerador a 3°C durante dois dias e novamente filtrado no mesmo papel, obtendo-se aproximadamente 200ml de extrato límpido à temperatura ambiente, o qual foi concentrado para 20ml em evaporador rotativo (rotovapor BUCHI, modelo RE), a 50°C sob vācuo de 630mmHg (bomba de vācuo PRIMAR, modelo 141). Os extratos

QUADRO 1. Cultivares usadas no estudo da atividade antioxidante de extrato de soja.

Cultivar	Origem	Safra
Paraná	CNPS - Londrina, PR ¹	81/82
UFV-1	CNPS - Londrina, PR	81/82
IAC-2	CNPS - Londrina, PR	81/82
Paraná	CPAC - Planaltina, DF ²	81/82
UFV-1	CPAC - Planaltina, DF	81/82
IAC-2	CPAC - Planaltina, DF	81/82
Paraná	IAC - Campinas, SP ³	81/82
UFV-1	IAC - Campinas, SP	81/82
IAC-2	IAC - Campinas, SP	81/82
Paraná	IAC - Campinas, SP	82/83
IAC-2	IAC - Campinas, SP	82/83
IAC-8	IAC - Campinas, SP	82/83
Paraná	IAC - Campinas, SP	83/84
IAC-2	IAC - Campinas, SP	83/84
Paraná	IAC - Campinas, SP	84/85
IAC-8	IAC - Campinas, SP	84/85
IAC-8	IAC - Campinas, SP	set./85
IAC-8	IAC - Campinas, SP	85/86

1. Centro Nacional de Pesquisa da Soja - EMBRAPA. Londrina, Paraná.
2. Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados - EMBRAPA, Planaltina, Distrito Federal - Brasília.
3. Instituto Agronômico de Campinas, SP.

concentrados foram guardados em frascos escuros sob refrigeração a -12°C .

Com as cultivares Paranã e IAC-8 do Instituto Agronômico de Campinas, da safra de 1984/85 foram preparadas farinhas desengorduradas, com éter de petróleo, em um extrator Imerex, modelo 1000 (A.H. Thomas, Catálogo de 1974), até o teor de matéria graxa de 1%, conforme determinação pelo método Bc 3-49 (AOCS, 1974). Dessas farinhas foram preparados extratos pela metodologia já citada, usando-se 40g de farinha desengordurada para cada extrato.

Os solventes usados na preparação dos extratos foram etanol, metanol, acetona (Merck, p.a.) e água destilada. As soluções de etanol foram preparadas à temperatura ambiente, volume/volume. Os extratos em água destilada não foram concentrados.

A Figura 1 mostra um esquema do processo de preparação dos extratos.

3.2. TESTES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS SOLVENTE X CULTIVAR (S X C)

A atividade antioxidante dos extratos foi testada em emulsão aquosa de β -caroteno e ácido linoléico, sistema modelo usado por MARCO (1968) e MILLER (1971). A concentração de β -caroteno nas emulsões foi determinada pela leitura da absorção a 470nm em um espectrofotômetro Bausch e Lomb "Expectronic 600".

Foram considerados dois índices de atividade antioxidante para cada extrato: Fator de Atividade Individual (FAI) e Fator de Atividade Relativa (FAR).

$$\text{FAI} = (\text{Absorção final}) \div (\text{Absorção inicial})$$

$$\text{FAR} = (\text{FAI de cada extrato}) \div (\text{FAI da emulsão sem extrato})$$

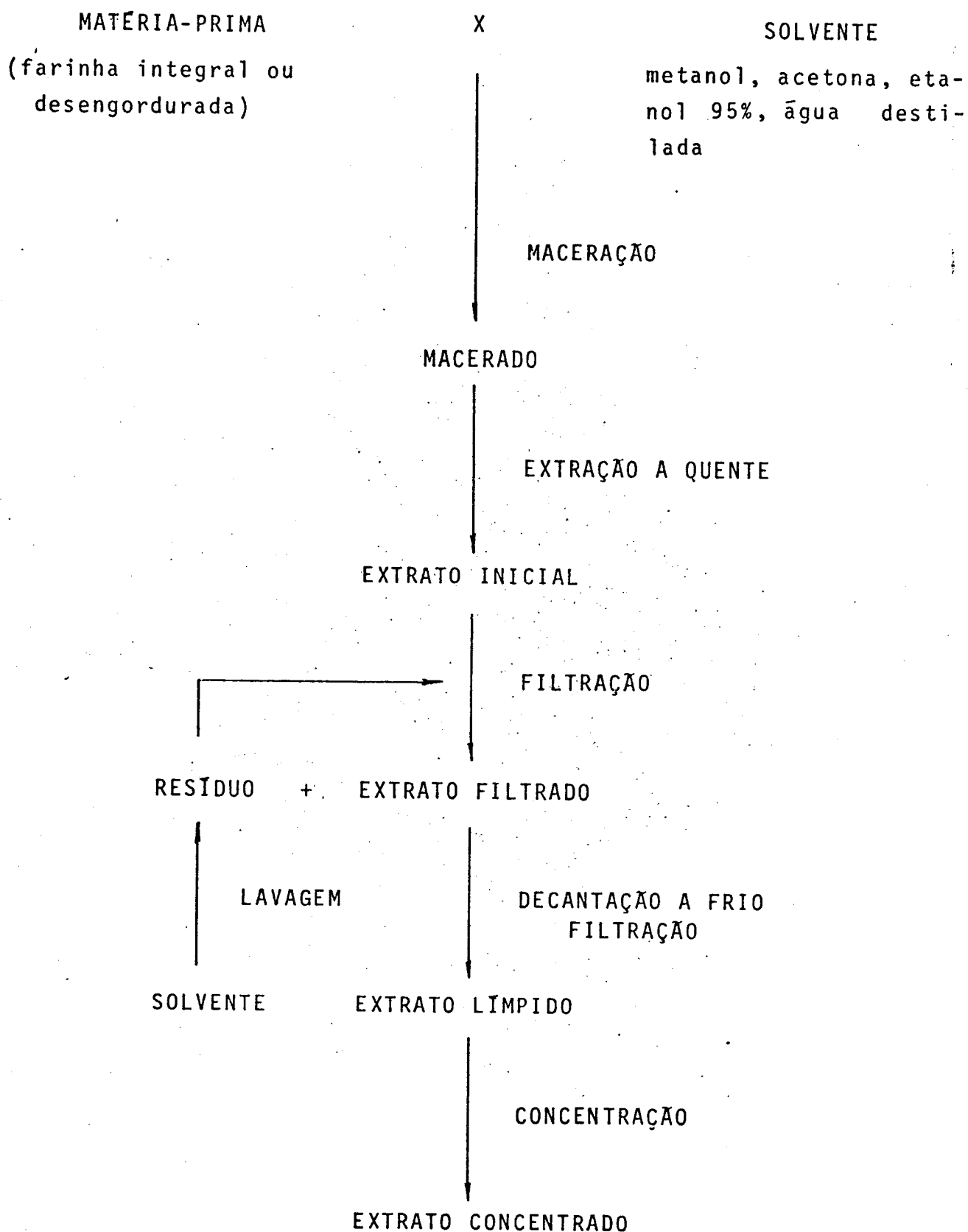


FIGURA 1. Esquema de preparação dos extratos solvente X cultivar

3.2.1. PREPARAÇÃO DA EMULSÃO DE TESTE

As emulsões para os testes de atividade antioxidante dos extratos foram preparadas com os seguintes reagentes:

β -caroteno: devido à rápida deterioração do reagente e a dificuldade para a sua obtenção, foram usadas amostras de " β -caroteno solúvel em óleo" fornecido pela "Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos - Departamento de Nutrição Humana, Setor de Alimentos" em latas de 20g, fechados sob nitrogênio e guardadas sob refrigeração a -18°C .

Com esse produto, a cada 6 meses foram preparadas soluções em clorofórmio contendo 10mg/ml de β -caroteno (solução estoque β -1). A partir dessas soluções, a cada 30 dias foram preparadas soluções de clorofórmio contendo 0,5mg/ml de β -caroteno (solução estoque β -2). A cada semana ou quando necessário, a partir dessas soluções, foram preparadas soluções em clorofórmio contendo 0,05mg/ml de β -caroteno (solução de teste β -3).

Ácido linoléico: foram usadas amostras preparadas na Seção de Lipídeos do Instituto de Tecnologia de Alimentos a partir de sementes de girassol.

Do óleo extraído com éter de petróleo foram separados os ácidos graxos, conforme o método CD 6-38 (AOCS, 1974), e dos ácidos graxos por cristalização fracionada a -15°C separou-se uma fração contendo 85% de ácido linoléico, 13% de ácido oléico e 2% de outros ácidos, conforme determinação por cromatografia gás-líquido, segundo o método Ce 1-62 (AOCS, 1974). Essa fração foi conservada em frascos de vidro escuro, selados sob nitrogênio a -18°C .

A cada 3 meses foram preparadas soluções de clorofórmio

contendo 40mg/ml de ácido linoléico (solução estoque AL-1) e a cada semana ou, quando necessário, foram preparadas soluções em clorofórmio contendo 0,8mg/ml de ácido linoléico (solução de teste AL-2).

Emulsificante: Foi usado o agente emulsificante "Tween 40", gentilmente fornecido pela "Atlas Indústrias Químicas S/A" (lote 026/1082). Soluções contendo 50mg/ml em clorofórmio foram preparadas mensalmente ou quando necessário (solução de teste TW).

As soluções estoque e de teste foram guardadas em frascos escuros a -120°C.

Emulsão de teste: As emulsões para o teste da atividade antioxidante dos extratos foram preparadas juntando-se em um balão de vidro de 500ml, 10ml de solução de teste β -3, 10ml de solução de teste AL-2 e 20ml de solução de teste TW.

Após a evaporação do solvente à temperatura ambiente no evaporador rotativo, 200ml de água destilada foram adicionadas no balão, com agitação violenta para homogeneizar os componentes e aerar a emulsão. A emulsão límpida formada tinha uma absorção inicial de 0,650.

3.2.2. TESTE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Em tubos de ensaio de 50ml (25mm x 140mm) foram adicionados 30ml da emulsão de teste e 0,50ml do extrato a ser testado. Os tubos tampados com rolhas de cortiça foram postos em um banho de água com temperatura controlada (A.H. Thomas Co., modelo 9820-E-10, catálogo de 1974) a 60°C e a cada 20 minutos foram retiradas alíquotas de 3ml para leitura da absorção. Em cada ensaio foram usados seis tubos, dois contendo a emulsão pura e quatro contendo a emulsão mais extrato. Cada extrato foi testado pelo menos 5 vezes, sen-

do o resultado final a média aritmética dos resultados dos três testes mais coerentes.

3.3. EXTRATOS EM ETANOL: NÚMERO DE EXTRAÇÕES X TEOR DE ÁGUA NO SOLVENTE

Com a cultivar IAC-8 fornecida pelo Instituto Agronômico de Campinas, da safra de 1985/86 foram preparados extratos em soluções de etanol em água destilada (95%, 85%, 75%, 65%, V/V) conforme segue: 75g de farinha integral (ou 60 de farinha desengordurada) foram macerados em 300ml de solvente durante 16 horas e, a seguir, extraídos no mesmo solvente da maceração, com agitação por cápsula magnética, a 60°C, durante 3 horas. Após decantar durante 1 hora, foram retirados e filtrados 125ml de sobrenadante e tratados como os extratos anteriores, exceto pela concentração. O solvente retirado foi repostado, repetindo-se a extração por mais três vezes, obtendo-se quatro extratos de 125ml cada, chamados de extratos SIET X a, b, c, d e SDET X a, b, c, d, sendo SI e SD os extratos da soja integral e desengordurada, respectivamente, e X o teor de etanol no solvente.

Por exemplo, o extrato SIET 75b é o segundo extrato da soja integral com etanol 75%.

Dos 125ml de cada extrato, 50ml foram usados para análise do extrato e teste da sua atividade antioxidante e 75ml juntados formando 300ml do extrato SIETX ou SDET X, que foram concentrados para 30ml, do mesmo modo que os extratos anteriores.

3.3.1. ANÁLISE DOS EXTRATOS EM ETANOL

Os extratos em etanol foram analisados para sua caracterização pelos seguintes métodos:

- **Concentração de sólidos:** o teor de sólidos foi determinado pelo resíduo da evaporação do extrato a 100°C até peso constante em estufa com ventilação natural (FANEM, modelo 330/3).

- **Concentração de proteína** - foi determinada aplicando-se aos extratos o método da AACC (1969).

- **Concentração de compostos fenólicos:** os compostos fenólicos nos extratos foram determinados pelo métodos de PRICE & BUTLER (1977), sendo os resultados fornecidos em relação a uma curva determinada com o padrão de catequina (Sigma Chemical CO.).

3.3.2. ANÁLISE DA SOJA IAC-8 DO INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, SAFRA 1985/1986 E DOS RESÍDUOS DOS EXTRATOS EM ETANOL

Os grãos de soja, a farinha desengodurada usada na preparação dos extratos e o resíduo dos extratos após secagem parcial em estufa a vácuo (Precision Scientific, modelo 19) à temperatura de 70°C e vácuo de 630mmHg foram analisados para a sua caracterização pelos seguintes métodos:

- **Umidade:** métodos Bc 2-49 (AOCS, 1974).

- **Matéria-graxa:** método Bc 3-49 (AOCS, 1974).

- **Proteína:** método AACC (1969).

- **Concentração de compostos fenólicos:** por extração em metanol, segundo o método de PRICE & BUTLER (1977).

3.3.3. TESTE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS EM ETANOL: EMULSÃO AQUOSA

Os extratos em etanol foram testados quanto à sua atividade

de antioxidante do mesmo modo que os extratos anteriores, sendo usadas as proporções de 0,3ml de extrato concentrado em 30ml de emulsão e de 3ml de extrato não concentrado em 27ml de emulsão. No último caso, o teste feito normalmente com a emulsão pura para comparação da atividade relativa (FAR) foi feito em 27ml de emulsão pura mais 3ml do solvente do extrato.

3.3.4. TESTE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS EM ETANOL. "SCHAAL OVEN TEST"

O teste da estabilidade dos óleos e gorduras em estufa, ou "Schaal Oven Test" (SHULER, 1980; SHERWIN, 1968), é aplicado geralmente para produtos que contenham gorduras como biscoitos, massas e outros, onde é difícil a aeração do produto. O teste é aplicado especificamente para um determinado produto e o resultado é geralmente comparado com outro teste de tempo real, sendo pouco usado para óleos e gorduras. Neste estudo da atividade antioxidante dos extratos em etanol, o teste foi usado apenas como um indicador primário da atividade dos extratos.

Em frascos escuros de 400ml, foram adicionados 100g de óleo de soja e 5ml de extrato concentrado, de forma a se obter uma concentração na faixa de 0,01% de compostos fenólicos no óleo. Soluções em metanol de BHT e TBHQ (Eastman-Kodak), catequina (Sigma Chemical Co.), quercetina (Merk) e rutina (Fluka, AG) foram preparadas e adicionadas em frascos com óleo, de modo a se obter uma concentração de 0,01%. Os frascos destampados foram conservados em uma estufa (FANEM, modelo 330/3) a $70 \pm 20^\circ\text{C}$, sendo agitados duas vezes por dia (de manhã e à tarde), para homogeneizar os componentes da emulsão formada.

O estado de oxidação do óleo foi determinado pelo método

do Índice de peróxidos (AOCS, 1974, método Cd 8-53), em alíquotas de 5ml, retiradas após a homogeneização de cada frasco, em intervalos de 2 ou 3 dias.

Foram efetuados dois ensaios em duplicata para cada extrato ou antioxidante testado. O resultado final foi obtido com a média aritmética das três determinações mais coerentes, para cada ponto das curvas traçadas no final do teste.

3.3.5. TESTE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS EM ETANOL. AOM

O método do oxigênio ativo (AOM) ou "Swift Stability Test" é um dos testes mais usados para determinar a estabilidade de óleos e gorduras, quanto à oxidação (SHULER, 1980, SHERWIN, 1968).

Para este estudo, foi montado um equipamento semelhante ao indicado pelo método Cd 12-57 (AOCS, 1974) formado pelas seguintes partes:

- Banho de temperatura controlada (A.H. Thomas, já citado).
- Agitador para banho (Mixer Croydon).
- Compressor de ar (PRIMAR, já citado).
- Caixa distribuidora de ar (conforme especificado no método)
- Tubos de polietileno (para ligação das partes).

Os ensaios foram feitos juntando-se em cada tubo de aeração 10g de óleo e 0,5ml de extrato concentrado, de modo a se obter uma concentração de compostos fenólicos na faixa de 0,01%. Após a homogeneização da emulsão óleo/extrato (Lab Line Super Mixer - A.H. Thomas, catálogo 1974, produto nº 8294-F10), os tubos foram postos em banho a $99,0 \pm 0,10^\circ\text{C}$ e aerados com uma vazão de ar de $12,0 \pm 0,5 \text{ l/h}$.

Soluções de BHT e TBHQ (Eastman Kodak) em metanol foram preparadas e usadas no ensaios, de modo a se obter a concentração de 0,01%.

O estado de oxidação dos óleos foi determinado pelo índice de peróxidos (AOCS, 1974, método Cd 8-53) depois de 6, 7, 8, 9 e 10 horas de teste.

Cada determinação foi feita com quatro repetições. O resultado final foi obtido com a média aritmética das três determinações mais coerentes para cada ponto das curvas traçadas no final dos testes.

3.4. SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO ANTIOXIDANTE

Os extratos da farinha de soja e seus derivados em etanol são uma mistura complexa. A separação dos seus componentes já foi testada por vários métodos, sendo a cromatografia em camada delgada (CCD), um dos mais eficientes (ELDRIDGE *et alii*, 1963, 1967; HONING *et alii*, 1969). Depois de testes com vários solventes foram adotados os solventes citados por ELDRIDGE *et alii*, (1967) e por PRATT & HEMMERSCHMIDT (1968), ou seja: clorofórmio, metanol e água (65:25:4 ——— solvente I) e acetato de etila, ácido fórmico e água (10:2:3 ——— solvente II), respectivamente.

3.4.1. CCD DO EXTRATO SDET 75

Tendo em vista os resultados dos testes de atividade antioxidante dos extratos em etanol, a isolamento do antioxidante foi feita a partir do extrato SDET 75.

Para uma visão geral do extrato e uma pré-seleção das bandas com atividade antioxidante foi feita a sua cromatografia com os dois solventes, em direções diferentes, conforme a Figura 2.

Placas de sílicagel (Kieselgel 60,20 x 20cm, MERCK), de 0,25mm de espessura, ativadas a 110°C durante 20 minutos, foram

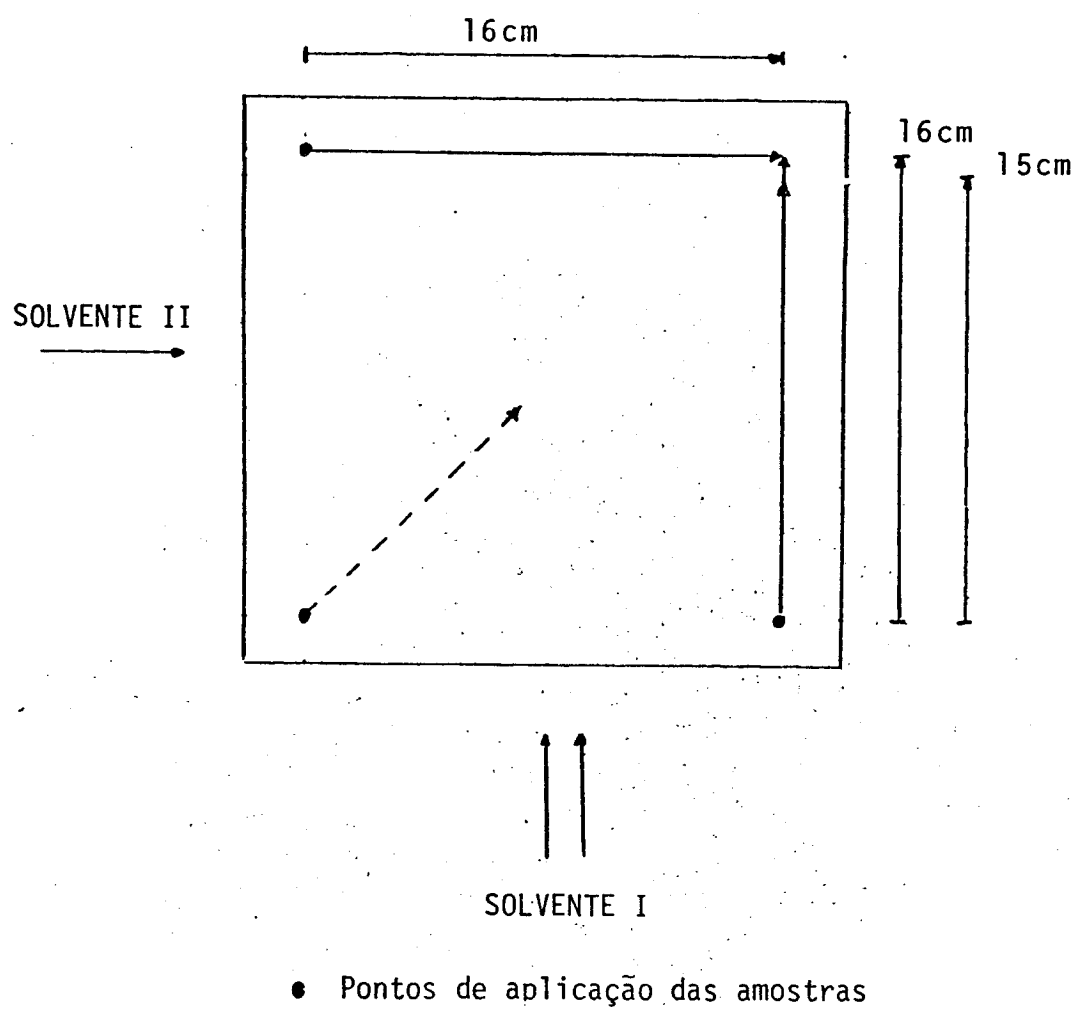


FIGURA 2. Esquema de desenvolvimento das placas de cromatografia do extrato SDET 75.

desenvolvidos após a aplicação da amostra, com o solvente I, por 15cm. Após secagem em estufa com ventilação forçada a 60°C, durante 4 horas, as placas foram novamente desenvolvidas no mesmo solvente I, por 16cm. Depois de nova secagem, de um dia para o outro ao ar livre e mais 2 horas na estufa a 60°C, as placas foram desenvolvidas com o solvente II em direção perpendicular à do solvente I, correspondendo a um giro de 90° no sentido anti-horário.

Depois de nova secagem para remoção do solvente, as placas foram observadas do seguinte modo:

- Placa 1: sem nenhum revelador, sob luz natural;
- Placa 2: sob luz ultravioleta;
- Placa 3: após aplicação de "spray" de H₂SO₄ a 50%, seguida de revelação na estufa a 110°C durante 15 minutos;
- Placa 4: após aplicação de "spray" de uma solução de β-caroteno e ácido linoléico em etanol e clorofórmio (PHILIP, 1974), as placas foram expostas à luz do dia até o desaparecimento da coloração amarela do fundo. Os pontos que permaneceram amarelos foram considerados como frações com atividade antioxidante.

3.4.2. PRIMEIRA SEPARAÇÃO: SOLVENTE I

Placas de 0,4mm de espessura, preparadas com Kieselgel G (Merck), segundo STAHL (1965), foram usadas para a separação das bandas com atividade antioxidante. Foram aplicados 5ml de extrato SDET 75, divididos em 10 placas.

As placas foram desenvolvidas no solvente I, duas vezes, conforme explicado na seção anterior e divididas em quatro zonas.

A sílica correspondente as zonas foi transferida para tubos de ensaio de 50ml e extraída duas vezes com clorofórmio e cinco vezes com metanol.

Os extratos foram concentrados no "rotavapor", sob vácuo a 60°C, até o volume de 4ml, obtendo-se, dessa forma, os extratos SDET 75 1, 2, 3, e 4. Os extratos foram testados quanto à sua atividade antioxidante no aparelho de "teste do oxigênio ativo" do mesmo modo que os extratos SDET X.

3.4.3. SEGUNDA SEPARAÇÃO: SOLVENTE II

Placas de cromatografia preparadas do modo explicado na seção anterior foram usadas para a separação dos componentes do extrato mais ativo (SDET 75 1). Dois ml da fração foram aplicados em quatro placas (0,5ml em cada placa). As placas foram desenvolvidas no solvente II, por 16cm. Uma placa de 0,25mm de espessura (Merk) foi preparada e desenvolvida do mesmo modo e revelada com o "spray" de β -caroteno para detecção de bandas com atividade antioxidante.

As bandas que apresentaram atividade antioxidante, ou seja, as bandas de Rf 0,20, 0,30 e 0,43, foram retirados da placa preparatória e extraídas da sílica com clorofórmio (2 vezes) e metanol (5 vezes). Os extratos foram concentrados até o volume de 2ml, obtendo-se, assim, os extratos SDET 75.1. a, b, c. Esses extratos foram testados quanto à atividade antioxidante no aparelho de "teste do oxigênio ativo" na proporção de 0,5ml de extrato para 5g de óleo. Testes comparativos foram efetuados paralelamente com o óleo puro, BHT e TBHQ do mesmo modo que nas seções anteriores.

3.4.4. IDENTIFICAÇÃO DA BANDA COM MAIOR ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A banda que demonstrou ser a de maior atividade antioxidante nos extratos em etanol a 75% da farinha de soja desengordurada foi novamente isolada.

60g de soja desengordurada foram extraídas com etanol a 75% obtendo-se 500ml de extrato. O extrato foi concentrado para 40ml.

Uma alíquota de 6ml do extrato foi dividida em doze placas de sílicagel, de 0,4mm de espessura. As placas foram desenvolvidas no solvente I por duas vezes e a sílica correspondente à zona contendo a banda mais ativa foi extraída com clorofórmio e metanol. O extrato foi concentrado até o volume de 4ml.

Os 4ml do extrato SDET 75.1 foram divididos em oito placas de sílicagel, de 0,4mm de espessura. As placas foram desenvolvidas no solvente II e as porções de sílica contendo a banda mais ativa foram extraídas com clorofórmio e metanol. Os solventes foram evaporados e o resíduo redissolvido em 4ml de metanol.

Uma porção de 2ml da solução em metanol da banda mais ativa foi hidrolisada em um tubo de ensaio de 25ml, com 4ml de HCl a 10%. O tubo, tampado, foi aquecido em banho de água em ebulição por uma hora. Depois de resfriado, o hidrolisado foi extraído com três porções de 5ml de éter de petróleo.

A fração solúvel em éter de petróleo foi transferida para outro tubo de ensaio e lavada com três porções de 5ml de água destilada. O solvente foi evaporado e o resíduo redissolvido em 2ml de metanol.

As soluções, em metanol, da banda mais ativa e da fração hidrolisada solúvel em éter de petróleo, foram aplicadas em

placas de "sílicagel 60, MERCK" de 0,25mm de espessura. As placas foram desenvolvidas nos seguintes solventes:

- Solvente I
- Solvente II
- Clorofórmio, metanol (9:1); (9:4); (1:9)
- Butanol, ácido acético, água (4:1:1)

Depois da evaporação dos solventes ao ar livre, de um dia para o outro, os cromatogramas foram revelados com "sprays" dos seguintes reagentes:

- β -caroteno: conforme explicado na seção 3.4.1.
- H_2SO_4 a 50%: conforme explicado na seção 3.4.1.
- $FeCl_3$: solução de 2g/100ml em etanol.*
- $FeCl_3-K_3Fe(CN)_6$: volumes iguais de solução de cada sal em água destilada.*
- Na_2CO_3 : solução a 20% em água destilada.*

* (PRATT & MILLER, 1984; PRATT & HAMMERSHIMIDT, 1978).

Os espectros em UV das soluções em metanol da banda mais ativa e da fração hidrolisada solúvel em éter de petróleo foram obtidos em um espectrofotômetro "Varian Techtron, Série 634" ligado a um registrador "Linear Instruments Corp., 261/MM".

O espectro em NaOH foi obtido com a adição de 4 gotas de NaOH, 5%, à cubeta contendo a solução; o espectro em $AlCl_3$, com a adição de 2 gotas de $AlCl_3$, 2g/100ml em metanol, à cubeta contendo a solução e o espectro em NaOAc com a adição de 5 gotas de solução a 20% à cubeta contendo a solução.

A fase aquosa, concentrada para 1,5ml, foi aplicada em uma placa de sílicagel de 0,25mm de espessura. A placa foi desenvolvida com butanol, ácido acético, água (4:1:1).

Depois da evaporação do solvente, o cromatograma foi revelado com o "spray" contendo volumes iguais de ácido oxálico, 2%, em água e anilina, 2%, em etanol, seguido de aquecimento na estufa a 100°C durante 10 minutos (PRATT e MILLER, 1984).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS SOLVENTE X CULTIVAR

Os Quadros 2, 3 e 4 apresentam os resultados dos testes da atividade antioxidante, em emulsão aquosa de β -caroteno e ácido linoléico, dos extratos em etanol, mentanol e acetona, que foram considerados como antioxidantes.

O teste desenvolvido por MARCO (1969) e MILLER (1971) é um método rápido e de fácil aplicação para a avaliação da atividade de um antioxidante. Embora esses autores usem até 120 minutos para completar o teste, verifica-se que, depois de 60 minutos, o valor da absorção da emulsão pura, que inicialmente decresce de forma quase linear, passa a se manter praticamente estável. Por esta razão, os valores de FAI e de FAR, neste trabalho, foram determinados com os valores de absorção das emulsões de teste 60 minutos depois do início de cada teste.

O índice FAR foi usado para a seleção dos extratos com maior atividade antioxidante porque relaciona a atividade de cada extrato, FAI, com um parâmetro fixo. O FAI da emulsão sem extrato apresenta variações muito pequenas de um teste para o outro.

Desse modo, extratos com FAR menores que 1,0 apresentam atividade pro-oxidante, enquanto extratos com FAR maiores que 1,0 apresentam atividade antioxidante.

Nas figuras apresentadas nos trabalhos de MARCO (1968), MILLER (1971) e PRATT (1978), verifica-se que os índices do FAI para a emulsão pura estão próximos de 0,15, enquanto os índices de FAI para as emulsões contendo antioxidantes considerados efetivos

QUADRO 2. Atividade antioxidante dos extratos de soja em metanol no sistema modelo de β -caroteno e α -ceto do linoléico.

Extrato x Cultivar	(Absorbância a 470nm) x 10 ³						
	Tempo (minutos)						
	00	20	40	60	FAI	FAR	
Paraná							
UFV-1	692	630	591	455	0,65	5,4	5,4
IAC-2	698	637	553	460	0,65	5,4	5,4
Paraná	685	628	547	458	0,66	5,5	5,5
UFV-1	690	633	555	443	0,64	5,3	5,3
IAC-2	693	636	549	449	0,65	5,4	5,4
Paraná	690	631	543	450	0,65	5,4	5,4
UFV-1	683	635	550	452	0,66	5,5	5,5
IAC-2	695	640	551	447	0,64	5,3	5,3
Paraná	691	641	553	465	0,67	5,6	5,6
IAC-2	695	636	551	462	0,66	5,5	5,5
Paraná	686	633	548	452	0,66	5,5	5,5
IAC-8	685	638	556	458	0,66	5,5	5,5
Paraná	693	650	548	449	0,64	5,3	5,3
IAC-2	691	651	547	451	0,65	5,4	5,4
IAC-8	686	655	560	460	0,67	5,6	5,6
Paraná	693	640	547	452	0,65	5,4	5,4
IAC-8	687	638	550	450	0,65	5,4	5,4
IAC-8	691	631	556	459	0,66	5,5	5,5
Paraná	658	649	542	449	0,68	5,7	5,7
IAC-8	660	651	548	452	0,68	5,7	5,7
Emulsão pura	660	358	130	085	0,12	-	-

*Farinha desengordurada.

FAI = (Absorção Final) ÷ (Absorção Inicial)

FAR = (FAI da Emulsão + Extrato) ÷ (FAI da Emulsão Pura)

FAR - DMS (5%) = 0,3 (teste de Tukey)

QUADRO 3. Atividade antioxidante dos extratos de soja em etanol no sistema modelo de β -caroteno e α -tocoferol do linol\u00e9ico.

Extrato x Cultivar	(Absorbancia a 470 nm) x 10 ³					
	Tempo (minuto)					
	00	20	40	60	FAI	FAR
Paraná						
UFV-1	655	631	600	582	0,88	6,8
IAC-2	638	623	595	580	0,90	6,9
Paraná	643	630	596	591	0,91	7,0
UFV-1	642	622	608	578	0,90	6,9
IAC-2	648	624	600	585	0,90	6,9
Paraná	645	620	603	586	0,90	6,9
UFV-1	654	615	591	580	0,88	6,7
IAC-2	660	631	610	577	0,87	6,7
Paraná	659	630	603	590	0,89	6,8
IAC-2	652	618	598	572	0,87	6,7
IAC-8	657	623	603	581	0,88	6,7
Paraná	660	631	608	588	0,89	6,8
IAC-2	645	628	592	581	0,90	6,9
Paraná	651	630	601	588	0,88	6,7
IAC-8	643	615	595	576	0,89	6,8
IAC-8	651	619	598	587	0,90	6,9
Paraná	644	615	590	578	0,89	6,7
IAC-8	640	622	591	578	0,90	6,9
Emulsão pura	642	628	602	590	0,91	7,0
	652	358	138	088	0,13	-

* Farinha desengordurada.

FAI = (Absorção Final) ÷ (Absorção Inicial)

FAR = (FAI da Emulsão + Extrato) ÷ (FAI da Emulsão Pura)

FAR - DMS (5%) = 0,4 (teste de Tukey)

QUADRO 4. Atividade antioxidante dos extratos de soja em acetona no sistema modelo de β -caroteno e α -
do linoléico.

Extrato x Cultivar		(Absorbância a 470nm) x 10 ³					
		Tempo (minutos)					
		00	20	40	60	FAI	FAR
Paraná							
UFV-1	CNPS 81/82	661	615	595	570	0,86	6,1
IAC-2	"	652	535	598	561	0,86	6,1
Paraná	"	650	601	591	568	0,87	6,2
UFV-1	CPAC	660	610	592	565	0,85	6,1
IAC-2	"	655	612	581	570	0,87	6,2
Paraná	"	658	609	592	572	0,86	6,1
UFV-1	IAC	660	605	590	568	0,86	6,1
IAC-2	"	658	611	595	563	0,85	6,1
Paraná	"	661	601	597	565	0,85	6,1
IAC-2	"	663	610	588	565	0,85	6,1
IAC-8	82/83	657	613	596	574	0,87	6,2
Paraná	"	651	611	592	568	0,87	6,2
IAC-2	83/84	658	598	590	568	0,86	6,1
IAC-8	"	655	605	595	570	0,87	6,2
Paraná	"	660	608	597	571	0,86	6,1
IAC-8	84/85	657	601	591	565	0,85	6,1
IAC-8	"	660	611	592	572	0,86	6,1
Paraná	Set. 84/85	655	603	581	571	0,87	6,2
IAC-8	84/85*	651	605	585	570	0,87	6,2
Emulsão pura	" *	652	608	588	574	0,88	6,2
		640	357	147	92	0,14	-

* Farinhas desengorduradas

FAI = (Absorção Final) ÷ (Absorção Inicial)

FAR = (FAI da Emulsão + Extrato) ÷ (FAI da Emulsão Pura)

FAR - DMS (5%) = 0,3 (teste de Tukey)

estão acima de 0,6. Desse modo, substâncias com FAR maiores do que 4,0 podem ser consideradas como antioxidantes efetivos.

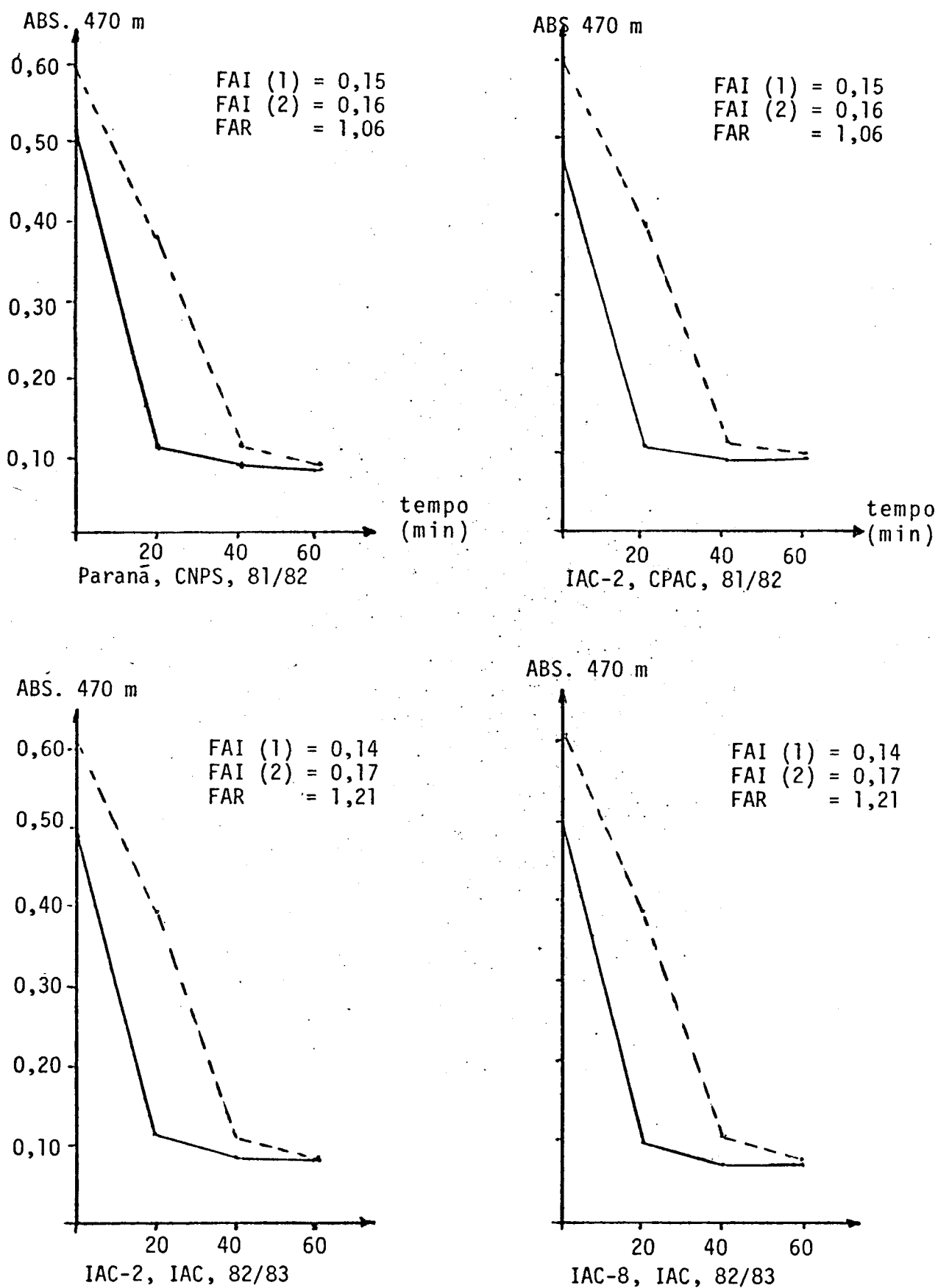
Todos os extratos experimentados neste trabalho apresentaram valores de FAR maiores que 4,0, no tempo de 60 minutos, com exceção dos extratos em água destilada, que apresentaram FAR menores que 1,5 (FIGURA 3).

PRATT (1972) comparou a atividade antioxidante de extratos de soja em água fria e em água em ebulição. Os extratos em água fria foram considerados como pro-oxidantes e os extratos em água quente foram considerados como antioxidantes. Depois de aquecidos até a ebulição, os extratos em água fria apresentaram atividade antioxidante igual à dos extratos em água em ebulição. Segundo o autor, a atividade pro-oxidante do extrato em água fria pode ser atribuída à extração conjunta de lipoxidase, uma enzima que pode ser inativada pelo calor úmido (SMITH & CIRCLE, 1972).

De modo geral, a variedade da cultivar, o local do plantio e o ano da safra não influenciaram a atividade antioxidante dos extratos.

PRATT (1979) atribui a atividade antioxidante da soja aos compostos fenólicos, principalmente às isoflavonas. Segundo ELDRIDGE (1982), o teor de isoflavonas na soja é influenciado pelo tipo da cultivar, pelo local de plantio e pelo ano da safra.

Os extratos das cultivares IAC-2 e IAC-8, em etanol e metanol, apresentaram atividade antioxidante ligeiramente superior à dos outros extratos das outras cultivares. Esses dados, no entanto, não podem ser considerados como conclusivos porque as diferenças entre eles não foram consideradas significativas quando as médias foram comparadas pelo "Teste de Tukey" ao nível de 5% de significância.



FAI = (Absorção Final) ÷ (Absorção Inicial)

FAI (1) = Emulsão Pura -----

FAI (2) = Emulsão + Extrato ———

FAR = (FAI Da Emulsão + Extrato) ÷ (FAI da Emulsão Pura)

FIGURA 3 - Atividade antioxidante dos extratos em água destilada de algumas cultivares de soja no sistema modelo de β -caroteno e ácido linolêico.

A influência do solvente na atividade dos extratos é evidente, mesmo que se considere a margem de erros dos experimentos. Os extratos em etanol foram os mais ativos, seguidos dos extratos em acetona e metanol. A maior "Diferença Mínima Significativa" (DMS) dos valores FAR para a comparação da influência do solvente na atividade antioxidante dos extratos das cultivares testadas, pelo "Teste de Tukey", foi de 0,4, ao nível de 5% de significância.

Etanol, metanol e acetona são solventes usados por vários autores para a extração de compostos fenólicos da soja. WALTER (1941) e NAIN *et alii* (1973, 1974) usaram etanol para extrair isoflavonas da soja. Em ambos os casos, acetona foi usada para precipitar os fosfolipídeos durante o processo de isolamento. As isoflavonas permaneceram em solução na acetona. ARAI *et alii* (1966) usaram etanol para extrair ácidos fenólicos da soja.

PRATT & HAMERSHIMIDT (1978), PRATT & BIRAC (1979) e RHEE *et alii* (1981) usaram metanol para extrair antioxidantes fenólicos da soja. ELDRIDGE *et alii* (1982, 1983) experimentaram etanol e metanol, a 100%, 80% e 50%, em água, para extrair isoflavonas da soja. Verificaram que o melhor solvente era o metanol a 80%, em refluxo, durante quatro horas.

A atividade antioxidante da soja é atribuída a vários componentes, além dos compostos fenólicos, como os fosfolipídeos, os tocoferóis e alguns aminoácidos (HAYES & BOOKWALTER, 1977). A maior atividade dos extratos em etanol pode ser consequência da menor seletividade desse solvente na extração desses componentes. Os fosfatídeos, por exemplo, são solúveis em etanol e insolúveis em acetona (DEUEL, 1951); os tocoferóis são mais solúveis em etanol que em metanol ou acetona (FARMACOPEIA BRASILEIRA; 1977).

4.2. GRAU DE HIDRATAÇÃO DO SOLVENTE X NÚMERO DE EXTRAÇÕES

O Quadro 5 apresenta as características da soja IAC-8, da safra 1985/86, fornecida pelo Instituto Agronômico de Campinas, da farinha desengordurada e dos resíduos dos extratos SIET X e SDET X.

Verifica-se, nesse quadro, que os teores de proteínas e de matéria graxa nos resíduos dos extratos aumenta com o grau de hidratação do solvente. Esses dados indicam que a extração do óleo e proteína foi pequena. Foram extraídos principalmente açúcares e outros componentes.

O etanol ou as soluções de etanol em água, a temperaturas baixas, não são solventes eficientes para a extração do óleo da soja. A 60°C, a solubilidade do óleo de soja em etanol a 95% e a 90% é de 12% e 4%, respectivamente. A solubilidade do óleo de soja em etanol diminui com o grau de hidratação do solvente (ARNOLD *et alii*; 1955).

Por outro lado, o etanol hidratado é um solvente eficiente na extração de açúcares e outros componentes que causam aromas e sabores estranhos na preparação de concentrados proteicos de soja, a partir da farinha desengordurada (BECKEL *et alii*, 1948, BECKEL & SMITH, 1944; SMITH & CIRCLE, 1972).

NAGEL *et alii* (1938) estudaram o tratamento da farinha de soja desengordurada com soluções de etanol em água, em proporções variando de 100% a 10%. Os teores de açúcares extraídos aumentam com o grau de hidratação do solvente. Com etanol a 95%, 80% e 70%, foram extraídos 17%, 80% e 87%, respectivamente, dos açúcares totais da farinha desengordurada. Os teores de nitrogênio extraídos aumentam pouco com o grau de hidratação do solvente. Com etanol a 90% e a 60% foram extraídos 1,2% e 3,4% do nitrogênio total da fa-

QUADRO 5. Características da Soja IAC-8, (Instituto Agronômico de Campinas, safra 85/86) da farinha desengordurada e dos resíduos dos extratos SIETX e SDETX.

	Umidade %	Matéria graxa* %	Proteína* (Nx6,25)%	Compostos Fenólicos* mg/100g
Soja IAC-8	8,60	20,3	41,21	265
Farinha desengordurada	7,30	1,1	52,8	282
Resíduo SIET	3,0	18,6	45,0	206
	85	20,5	46,0	57
	75	21,5	47,4	49
	65	21,9	48,3	48
Resíduo SDET	3,4	0,8	54,3	258
	85	0,9	56,1	88
	75	1,0	59,1	33
	65	1,0	63,8	23

* Base seca.

SIETX - Soja Integral em Etanol X%.

SDETX - Soja Desengordurada em Etanol X%.

rinha desengordurada. O grau de hidratação sō tem influência maior em soluções mais diluídas, acima de 50% de água. Os teores de fosfolipídeos extraídos aumentam com o grau de hidratação do solvente. Com etanol a 95%, 80% e a 70% foram extraídos 35%, 68% e 71%, respectivamente, dos fosfolipídeos totais da farinha desengordurada. A melhor extração foi conseguida com etanol a 60%. Com proporções maiores de água, o teor de fosfolipídeos extraídos foi menor.

ARNOLD & CHOUDHRURY (1962) usaram soluções de etanol em água para extrair óleo de soja, a 71°C, com a concentração de etanol variando de 100% a 90%. Verificaram que o teor de proteínas na farinha desengordurada aumenta à medida que o solvente se torna mais hidratado.

Os teores de compostos fenólicos foram determinados contra uma curva-pradrão de catequina. Segundo ELDRIDGE (1982), os compostos fenólicos da soja sō, principalmente, isoflavonas e destas a maior parte se encontra na forma de glicosídeos. O teor de compostos fenólicos nos resíduos dos extratos diminui com o aumento do grau de hidratação do solvente devido à maior solubilidade dos glicosídeos no solvente mais hidratado.

Os Quadros 6 e 7 apresentam a caracterização dos extratos SIET X e SDET X. As concentrações de sólidos (nō voláteis) e de proteínas aumentam com o grau de hidratação do solvente mas diminuem do primeiro para o quarto extrato. Esses dados estō de acordo com os experimentos de NAGEL (1938) e de ARNOLD & CHOUDHRURY (1962).

Os extratos da soja integral em etanol a 95% e 85% apresentam concentrações de sólidos (nō voláteis) ligeiramente maiores que os respectivos extratos da farinha de soja desengordurada, enquanto nos extratos em etanol a 75% e a 65%, essas concentrações sō semelhantes para as duas matērias-primas. Isto se deve, prova-

QUADRO 6. Caracterização dos extratos SDETX

	Teor. de Sólidos g/10ml, sem concentrar g/ml, concentrado	Proteína (N x 6,25) g/100ml, sem concentrar g/10ml, concentrado	Composto Fenólico (Equivalente a Ca. tequina) (mg/ml)
SDET 85 a	0,059	0,042	-
b	0,040	0,028	-
c	0,029	0,024	-
d	0,030	0,020	-
Concentrado	0,035	0,025	0,10
SDET 85 a	0,112	0,077	0,160
b	0,092	0,059	0,084
c	0,082	0,045	0,050
d	0,071	0,030	0,034
Concentrado	0,088	0,050	0,75
SDET 75 a	0,220	0,168	0,334
b	0,167	0,133	0,230
c	0,121	0,098	0,130
d	0,099	0,077	0,080
Concentrado	0,148	0,084	2,18
SDET 65 a	0,279	0,196	0,264
b	0,238	0,140	0,154
c	0,148	0,110	0,080
d	0,108	0,087	0,056
Concentrado	0,185	0,126	1,38

SDETX - Soja Desengordurada em Etanol X%

QUADRO 7. Caracterização dos extratos SIETX

Extrato	Teor de Sólidos g/10ml sem concentrar g/ml concentrado	Proteína (N x 6,25) g/100ml sem concentrar g/10ml concentrado	Composto fenólico (Equivalente a Ca tequina) mg/ml
SIET 95 a	0,082	0,049	0,030
b	0,076	0,043	0,035
c	0,068	0,035	0,025
d	0,063	0,025	0,020
Concentrado	0,067	0,032	0,27
SIET 85 a	0,122	0,080	0,164
b	0,096	0,063	0,126
c	0,081	0,052	0,086
d	0,079	0,040	0,032
Concentrado	0,094	0,062	1,02
SIET 75 a	0,212	0,140	0,336
b	0,162	0,105	0,228
c	0,122	0,084	0,116
d	0,102	0,075	0,086
Concentrado	0,150	0,091	1,93
SIET 65 a	0,296	0,203	0,316
b	0,177	0,133	0,150
c	0,124	0,094	0,074
d	0,105	0,080	0,054
Concentrado	0,175	0,132	1,55

* g/ml

SIETX - Soja Integral em Etanol X%

velmente, a extração de lipídeos, existentes na soja integral em maior quantidade, pelos solventes menos hidratados.

A concentração de compostos fenólicos nos extratos aumenta com o grau de hidratação do solvente, até o teor de 75%, diminuindo no etanol a 65%. Esta observação contraria em parte alguns dados do Quadro 5, onde se verifica que os teores de compostos fenólicos dos resíduos dos extratos em etanol a 65% são os menores. A explicação encontrada para esta observação é a seguinte: todos os extratos foram guardados na geladeira durante alguns dias, antes de ser analisados ou testados. Durante esse período de estocagem, parte do material extraído se precipitou. A análise qualitativa do precipitado formado durante a estocagem dos extratos na geladeira indicou a presença de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos podem formar, com as proteínas, complexos que se precipitam (KUHNAU, 1976). A quantidade de material precipitado foi maior nos extratos com os solventes mais hidratados.

Se se considerar que nos trabalhos de WATER (1941), ELDRIDGE (1983) e NAIN (1974), a proporção de solvente para matéria-prima usada foi sempre maior que 10:1 e que os compostos fenólicos foram isolados, por esses autores, por cristalização, nos extratos em etanol concentrados, essa discordância entre os dados fica esclarecida. De fato, nos Quadros 5, 6 e 7, ao se somar o total de compostos fenólicos extraídos em um determinado solvente, com o teor de compostos fenólicos do resíduo dessa extração, verifica-se que uma parte dos compostos fenólicos foi "perdida" durante o processo de extração. Por exemplo: nos quatro extratos SDET 75 foram extraídos 61% dos compostos fenólicos da farinha desengordurada. No resíduo foram encontrados 20% dos compostos fenólicos iniciais. Portanto, 19% dos compostos fenólicos devem ter se precipitado durante o período de estocagem.

A concentração de compostos fenólicos nos extratos diminui do primeiro para o quarto extrato, tendo o terceiro extrato, geralmente, menos da metade da concentração de compostos fenólicos do primeiro extrato. Com quatro extrações, 80% dos compostos fenólicos da farinha desengordurada foram extraídos com etanol a 75%.

Ao se considerar o rendimento dessas extrações, deve-se lembrar que os autores citados sobre a extração de compostos fenólicos usaram proporções muito maiores de solvente: matéria-prima e que a extração é feita em refluxo, com aquecimento prolongado.

4.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE ETANOL

Os Quadros 8 e 9 apresentam os resultados dos testes da atividade antioxidante dos extratos SIET X e SDET X em emulsão aquosa de ácido linoléico e β -caroteno.

Para cada grau de hidratação do solvente, a atividade antioxidante dos extratos diminui do primeiro para o quarto extrato. Os extratos com maior concentração de sólidos são os mais ativos.

Os extratos de soja integral foram mais ativos que os extratos da farinha desengordurada, provavelmente devido à extração de substâncias antioxidantes, como os tocoferóis e fosfolipídeos, presentes na soja integral, além dos compostos fenólicos.

A alta atividade dos extratos em etanol a 95% foge à correlação entre a atividade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos apresentada pelos outros extratos. Os extratos em etanol a 95% que apresentam valores de FAR maiores que os outros são os que apresentam as menores concentrações de sólidos, proteínas e de compostos fenólicos.

Duas hipóteses foram usadas para explicar essa discordân-

QUADRO 8. Atividade antioxidante dos extratos SIETX no sistema modelo de β -caroteno e ácido linolêico.

Tempo (Minutos)	(Absorbância a 470mm) X 10 ³ (1)																			
	SIET 95 (2)				SIET 85 (2)				SIET 75				SIET 65							
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d				
00	690	687	630	621	610	609	614	615	620	605	604	606	610	623	590	590	595	598	615	
15	587	575	568	468	416	554	550	552	551	407	558	551	540	541	395	557	552	540	539	440
30	528	520	527	532	185	507	498	496	475	170	530	514	490	480	150	530	521	505	500	175
45	516	492	483	483	085	461	450	448	419	075	490	507	453	430	065	520	506	485	475	080
60	502	485	448	435	040	452	441	436	412	045	486	467	412	400	040	504	493	470	459	050
FAI	0,73	0,71	0,71	0,70	0,06	0,74	0,72	0,71	0,67	0,07	0,80	0,77	0,68	0,65	0,06	0,85	0,83	0,78	0,76	0,08
FAR	12,2	11,8	11,8	11,6	-	10,6	10,3	10,1	9,6	-	13,3	12,8	11,3	10,8	-	10,6	10,4	9,7	9,5	-

* - Emulsão + Solvente

(1) - Testes realizados com 3ml de extrato em 27m de emulsão

(2) - Ligeiramente turvo

FAI = (Absorção Final) ÷ (Absorção Inicial)

FAR = (FAI da Emulsão + Extrato) ÷ (FAI da Emulsão Pura)

SIETX = Soja Integral em Etanol X%

QUADRO 9. Atividade antioxidante dos extratos SDETX no sistema modelo de β -caroteno e ácido linolêico

Tempo (Minutos)	(Absorbância a 470mm) X 10 ³ (1)																						
	SDET 95 (2)				SDET 85				SDET 75				SDET 65										
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d							
00	573	575	576	573	605	586	586	582	586	586	588	590	610	583	586	588	590	588	598	590	587	623	
15	518	512	508	510	400	548	542	542	541	450	553	555	540	535	400	530	525	505	500	415			
30	471	456	460	460	180	506	496	498	500	190	528	530	513	490	165	505	490	465	465	185			
45	430	410	410	397	070	471	456	459	458	090	516	509	486	461	083	483	460	433	450	095			
60	390	360	360	345	040	443	422	423	427	065	501	496	466	435	045	452	444	421	415	067			
FAI	0,68 0,62 0,62 0,60				0,06	0,75 0,72 0,72 0,72				0,10	0,85 0,84 0,79 0,73				0,07	0,76 0,74 0,71 0,70				0,10			
FAR	11,3 10,3 10,3 10,1				-	7,5 7,2 7,2 7,2				7,2	-	12,1 12,0 11,2 10,4				-	7,6 7,4 7,1 7,0				-		

* - Emulsão + solvente

(1) - Testes realizados com 3ml de extrato + 27m de emulsão

(2) - Ligeiramente turvo

FAI = (Absorção Final) ÷ (Absorção Inicial)

FAR = (FAI da Emulsão + Extrato) ÷ (FAI da Emulsão Pura)

SDETX = Soja Desengordurada em Etanol X%

cia. A primeira, e mais evidente, é o fato de que esses extratos formaram emulsões ligeiramente turvas com a emulsão de teste. Desse modo, os valores de FAI dessas emulsões eram sempre elevados em relação ao FAI da emulsão pura. A segunda hipótese é a de que o etanol a 95% extraiu outras substâncias antioxidantes, além dos compostos fenólicos.

A Figura 4 mostra os resultados dos testes da atividade antioxidante dos extratos SIET X e SDET X, concentrados, na emulsão de ácido linoléico e β -caroteno. Nestes casos, os extratos da soja integral também fogem à correlação entre a atividade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos. O extrato em etanol a 95% é mais ativo que os extratos em etanol a 85% e a 75%.

Nos extratos concentrados da farinha de soja desengordurada, a correlação é parcialmente mantida. O extrato em etanol a 75%, que é o mais ativo, tem a maior concentração de compostos fenólicos. O extrato em etanol a 95% tem a menor concentração de compostos fenólicos e é menos ativo.

4.4. TESTE DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS EM ETANOL, CONCENTRADOS, NO ÓLEO DE SOJA

Para eliminar as dúvidas surgidas nos testes dos extratos em etanol na emulsão aquosa, os extratos concentrados foram testados em um sistema diferente, o óleo de soja.

O maior problema encontrado para a execução do teste da atividade dos extratos concentrados pelo "Schall Oven Test" foi a baixa solubilidade dos extratos no óleo de soja. Esse problema foi parcialmente solucionado agitando-se os frascos contendo o óleo e o antioxidante duas vezes por dia, de manhã e à tarde. Mesmo assim, no final de cada período, o óleo e o antioxidante estavam parcialmente separados.

O "Schaal Oven Test", embora seja pouco usado para a avaliação da estabilidade de óleos foi usado, com pequenas modifica-

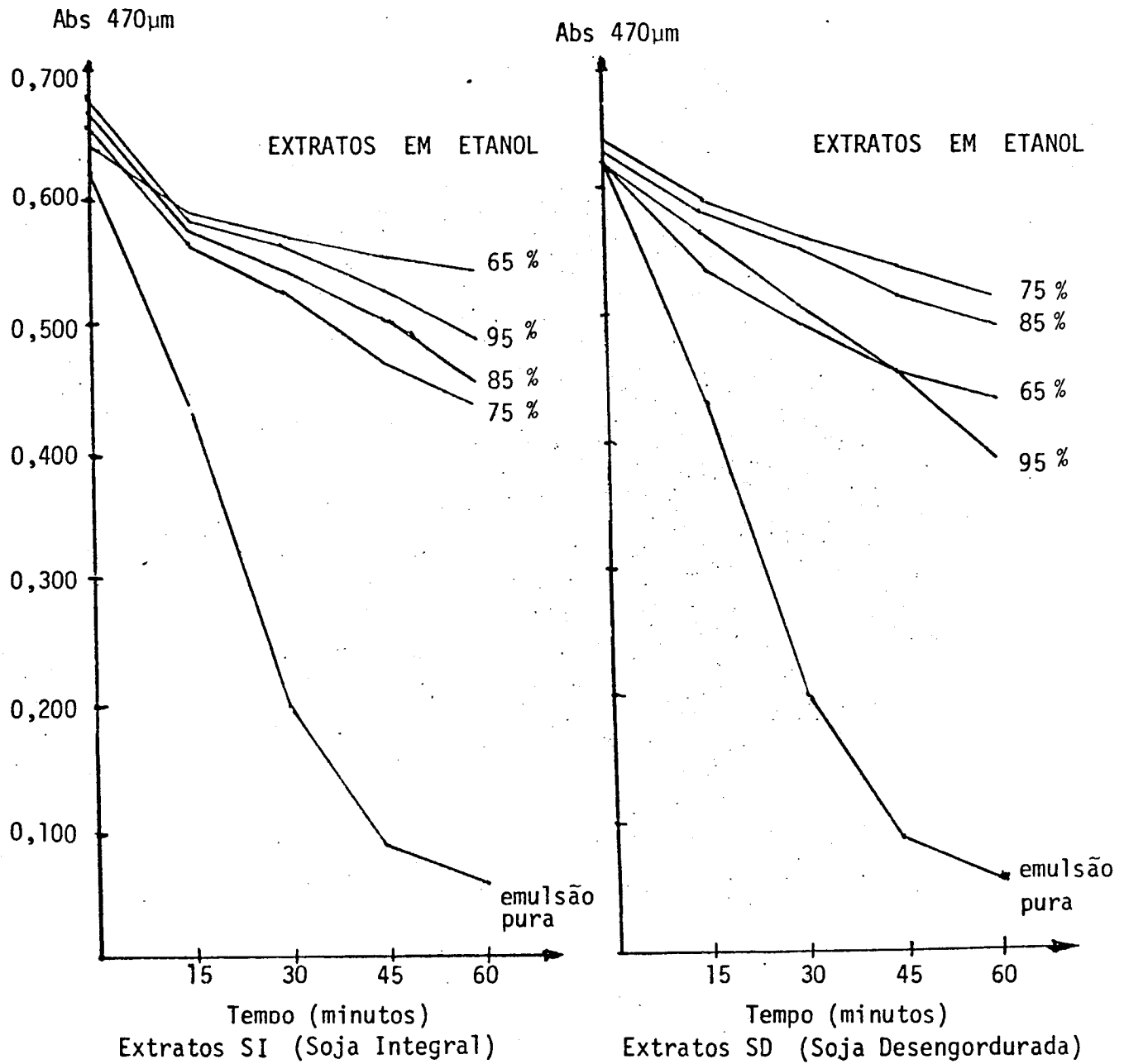


FIGURA 4 - Atividade antioxidante dos extratos SIETX e SDET X concentrados no sistema modelo de β -caroteno e ácido linolêico.

ções, por LETAN (1966a, b), PHILIP (1974), TAKAGI (1980), RHEE (1981) e FEDELI (1982) para a avaliação da atividade de substâncias antioxidantes.

O Quadro 10 apresenta os resultados dos testes da atividade de antioxidante dos extratos em etanol, concentrados, pelo método do "Schall Oven Test". Também são apresentados os resultados dos testes paralelos com três substâncias fenólicas puras: catequina, quercetina e rutina.

Ao contrário do que ocorreu nos testes com a emulsão aquosa a atividade dos extratos foi bem correlacionada com a concentração de compostos fenólicos, com exceção da atividade do extrato SIET 65, que apresentou baixa atividade. Os extratos em etanol a 95% apresentaram atividades muito baixas e mesmo pro-oxidantes, no caso do extrato da farinha desengordurada. Os extratos SIET 75, SDET 75 e SDET 65, com as maiores concentrações de compostos fenólicos, apresentaram atividade semelhante à da quercetina, que é considerada uma substância com boa atividade (LETAN, 1966; HUDSON & LEWIS, 1983). A catequina e a rutina apresentaram atividade baixa. A catequina foi considerada por HUDSON E LEWIS (1983) como um antioxidante fraco em relação à quercetina. A rutina, quercetina-3-rutinosídeo, um derivado da quercetina, 3, 5, 7, 3', 4-pentahidroxiflavona, tem atividade menor que esta devido à ausência da hidroxila livre no C₃ do anel A.

As Figuras 5 e 6 apresentam os resultados dos testes da atividade antioxidante dos extratos em etanol, concentrados, pelo "Active Oxygen Method", que é o método-padrão da AOCS para se medir a estabilidade de óleos e gorduras. Nestes testes fica evidente a maior atividade dos extratos em etanol a 75%, que são os de maior concentração de compostos fenólicos.

A soja é usada, industrialmente, principalmente para a pro

QUADRO 10. Índice de Peróxido: "Schaal Oven Test" dos extratos em etanol no óleo de soja.

Extrato	Índice de Peróxido (m.eq./1000g)							
	Tempo (dias)							
	0	3	5	7	10	13	20	22
SIET 95	0,9	1,4	1,6	2,0	3,2	4,5	8,0	41
85	0,8	1,4	1,2	1,8	3,0	3,9	5,6	35
75	0,9	1,3	1,5	2,0	3,1	3,7	4,2	26
65	1,1	1,3	1,4	1,9	3,3	4,4	7,8	38
SDET 95	1,0	1,6	1,9	2,1	2,1	3,7	6,6	55
85	1,2	1,4	1,7	1,7	2,1	3,2	4,7	42
75	1,0	1,4	1,3	1,3	1,6	3,0	3,0	24
65	0,9	1,4	1,5	1,5	1,8	3,1	3,1	23
BHT	1,0	1,2	1,2	1,4	2,8	3,1	3,6	17
TBHQ	1,1	1,2	1,2	1,2	1,5	2,2	2,4	4,0
QUERCETINA	1,1	1,2	1,4	1,8	3,1	3,2	6,0	25
CATEQUINA	1,2	1,6	1,8	1,8	3,2	4,6	11,0	36
RUTINA	1,3	1,4	1,6	1,7	3,2	4,1	10,2	43
ÓLEO PURO	1,0	1,6	1,6	2,1	3,5	4,0	11,6	45

SIETX = Soja Integral em Etanol X%.

SDET X = Soja Desengordurada em Etanol X%

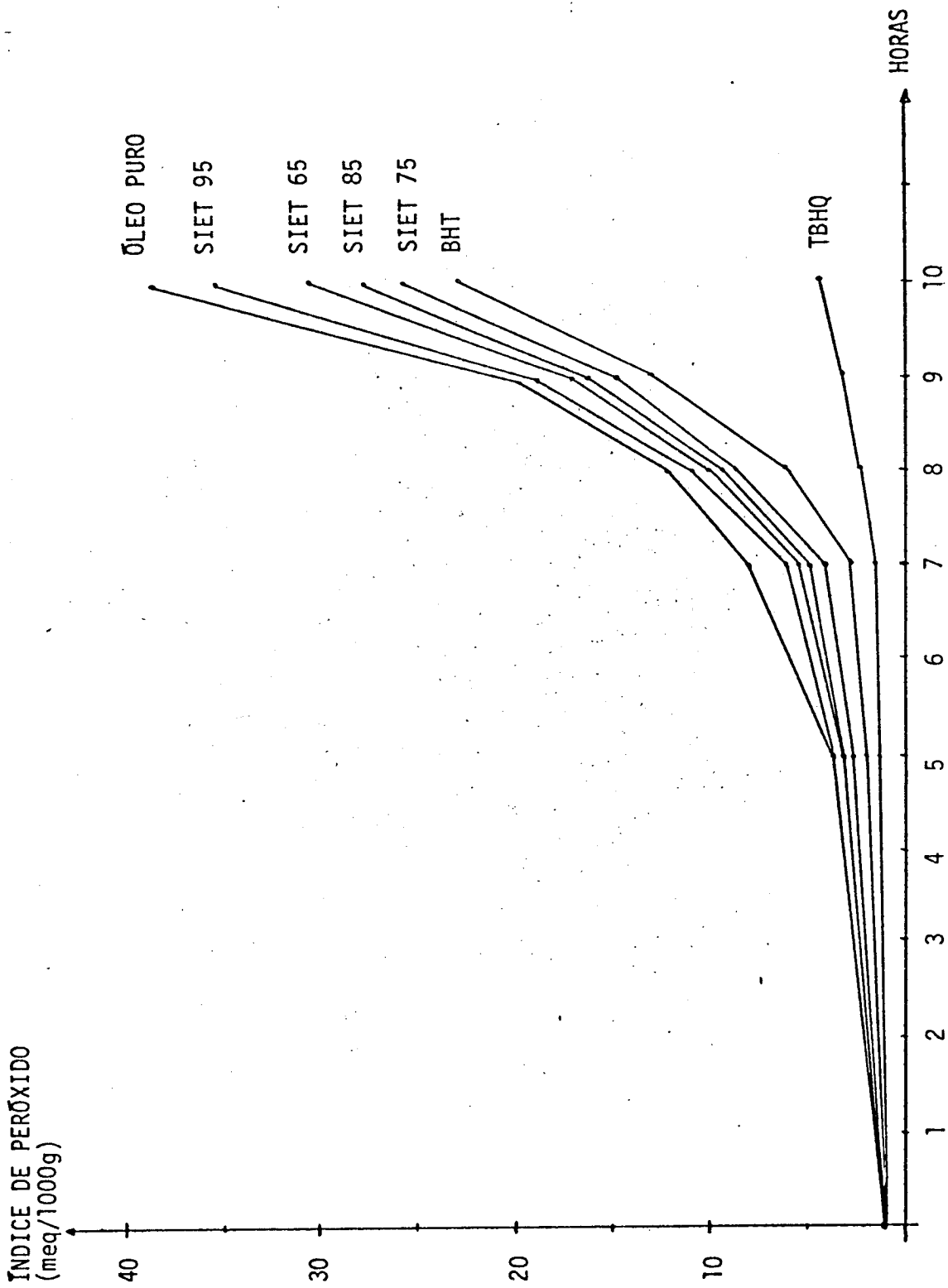


FIGURA 5 - Teste de atividade antioxidante dos extratos SI no óleo de soja: AOM

SIETX - Soja Integral em Etanol X%.

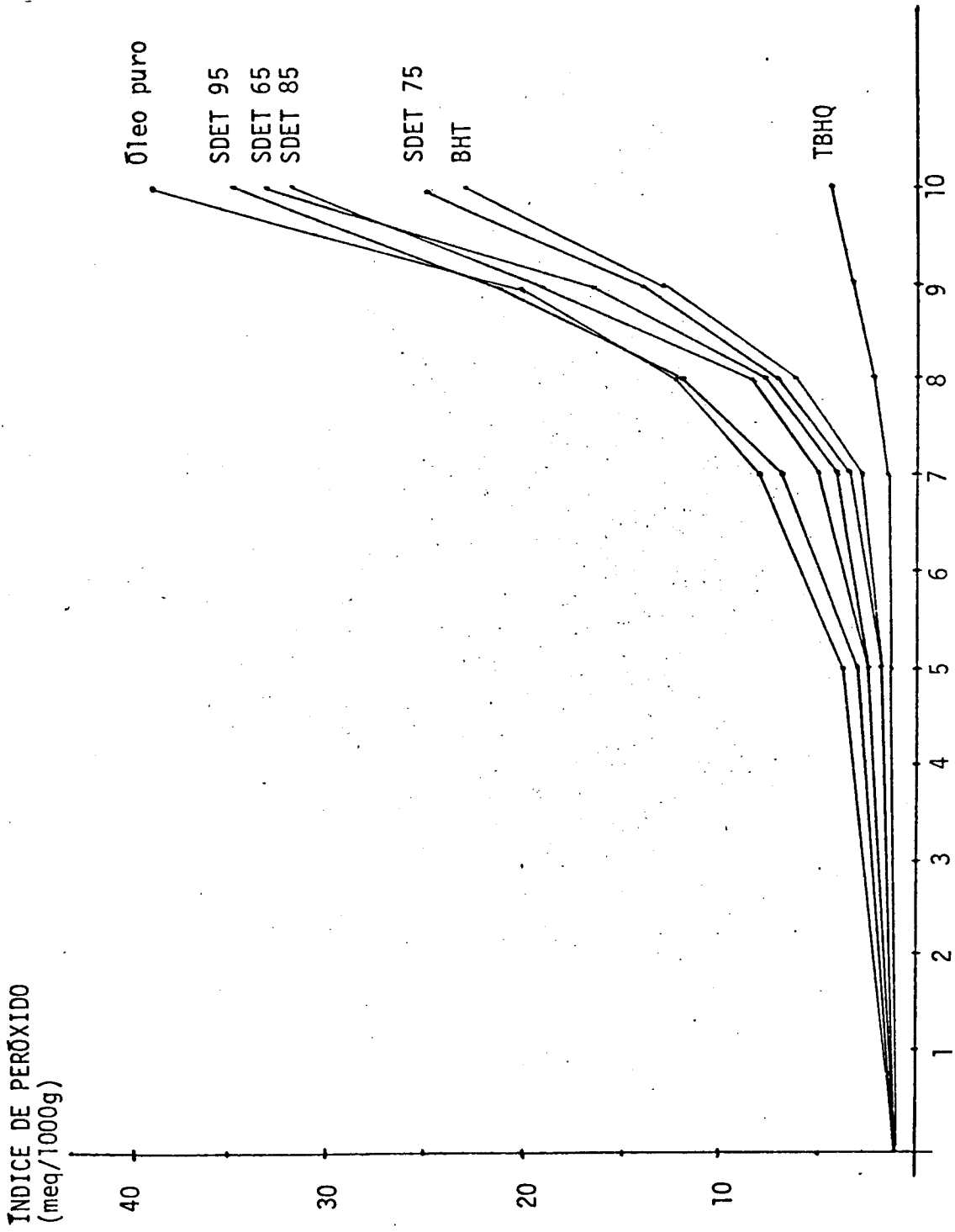


FIGURA 6 - Teste da atividade antioxidante dos extratos SD no óleo de soja: AOM.
SDET X - Soja Desengordurada em Etanol X%.

dução de óleo, extraído com hexano e farelo desengordurado (ERICKSON 1980). O farelo desengordurado é usado principalmente como ração animal e, numa tendência mais moderna, processado para produzir alimentos protéicos para consumo humano (WOLF, 1971).

O tratamento da farinha desengordurada de soja com soluções de etanol em água melhora as qualidades organolépticas e funcionais dos concentrados e isolados protéicos (BECKEL & SMITH, 1944; TEETER *et alii*, 1955; ELDRIDGE *et alii*, 1963; WOLF *et alii*, 1963; SMITH & CIRCLE, 1972).

Em vista das observações desses autores e da maior atividade do extrato em etanol a 75%, da farinha desengordurada, em óleo de soja, esse extrato foi selecionado para a separação da fração com maior atividade antioxidante.

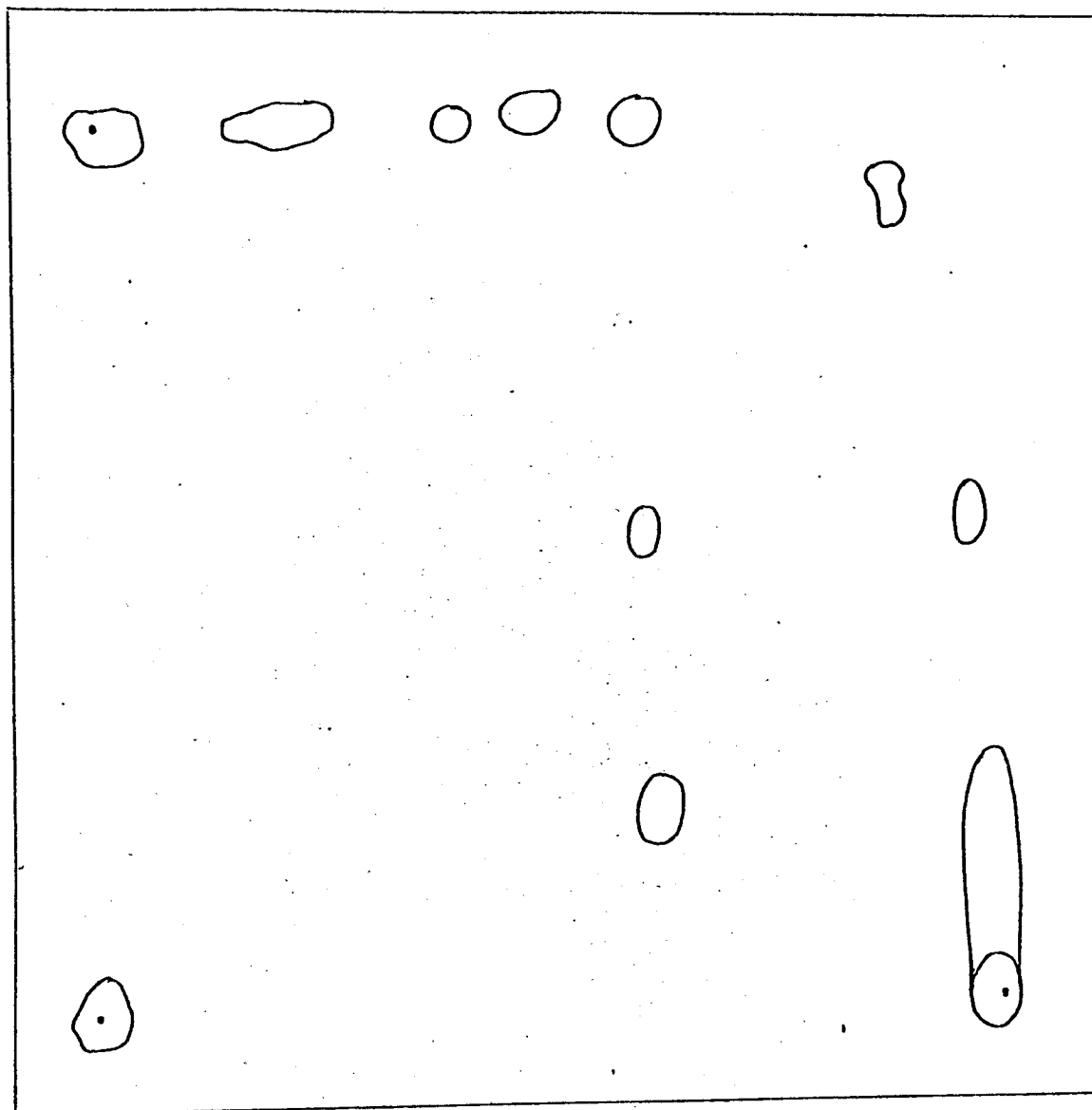
4.5. ISOLAMENTO DO COMPONENTE DE MAIOR ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os solventes usados na separação dos componentes do extrato SDET por cromatografia em camada delgada têm sido usados por vários autores para isolar os componentes de extratos de soja.

O solvente I, clorofórmio:metanol:água (65:25:4) foi usado por HONING (1969) e ELDRIDGE (1967) para separar os componentes de extratos da farinha desengordurada e do concentrado protéico de soja. O solvente II foi usado por PRATT (1978) para a separação de substâncias com atividade antioxidante no extrato de soja em metanol.

As Figuras 7, 8, 9 e 10 são reproduções desenhadas de placas de cromatografia desenvolvidas nos dois solventes em direções perpendiculares.

Nesses desenhos são mostradas as manchas que apresentaram



Extrato SDET 75 - Solvente I (sentido vertical, 2 vezes)

Solvente II (sentido horizontal, 1 vez)

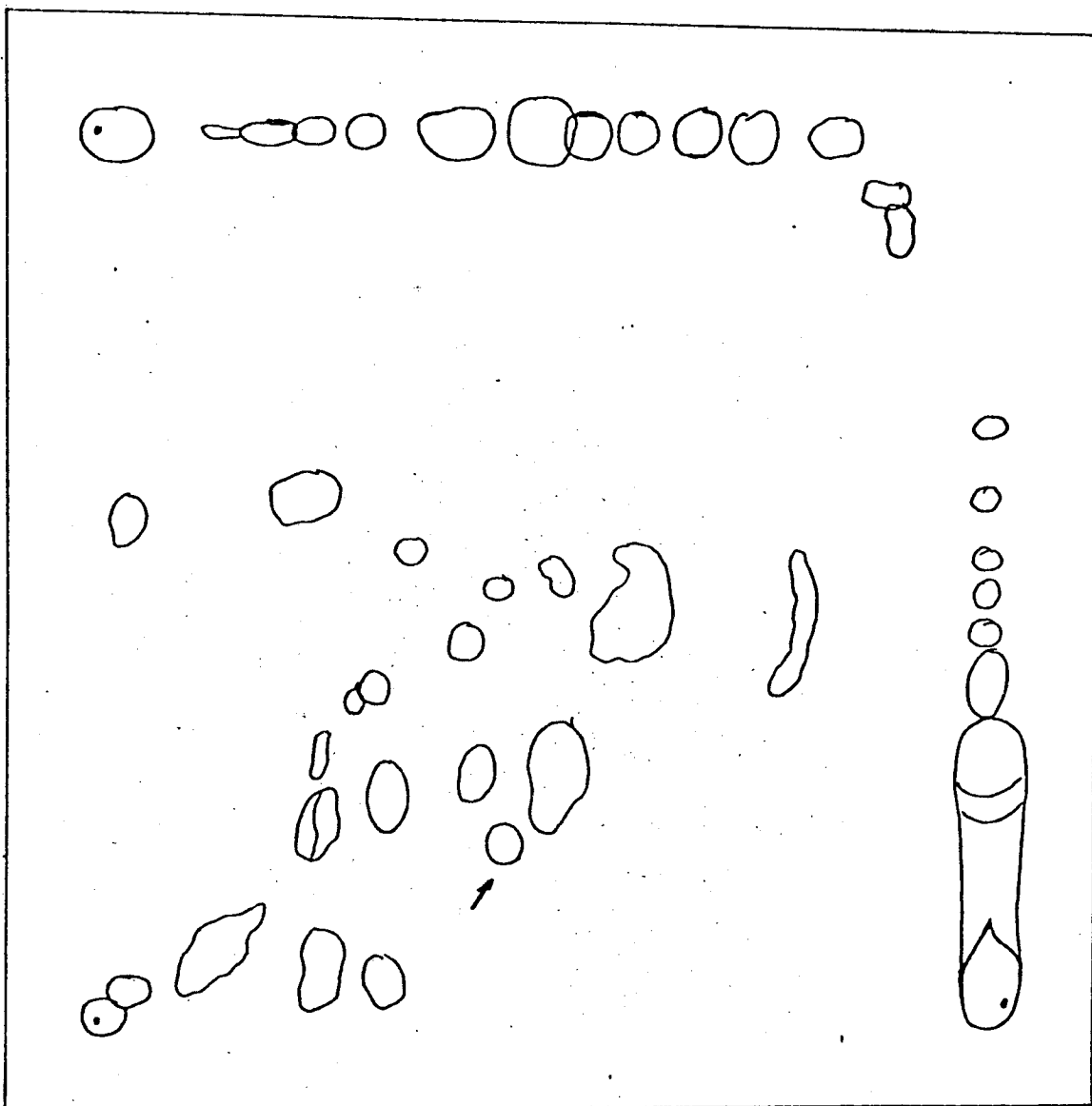
. pontos de aplicação da amostra

- revelação: Luz visível

SOLVENTE I - clorofórmio, metanol, água (65:25:4)

SOLVENTE II - acetato de etila, ácido fórmico,
água (10:2:3)

FIGURA 7 - Placa de cromatografia - Extrato SDET 75. (Soja Desengordurada em Etanol a 75%).



Extrato SDET 75 - Solvente I (sentido vertical, 2 vezes)

Solvente II (sentido horizontal, 1 vez)

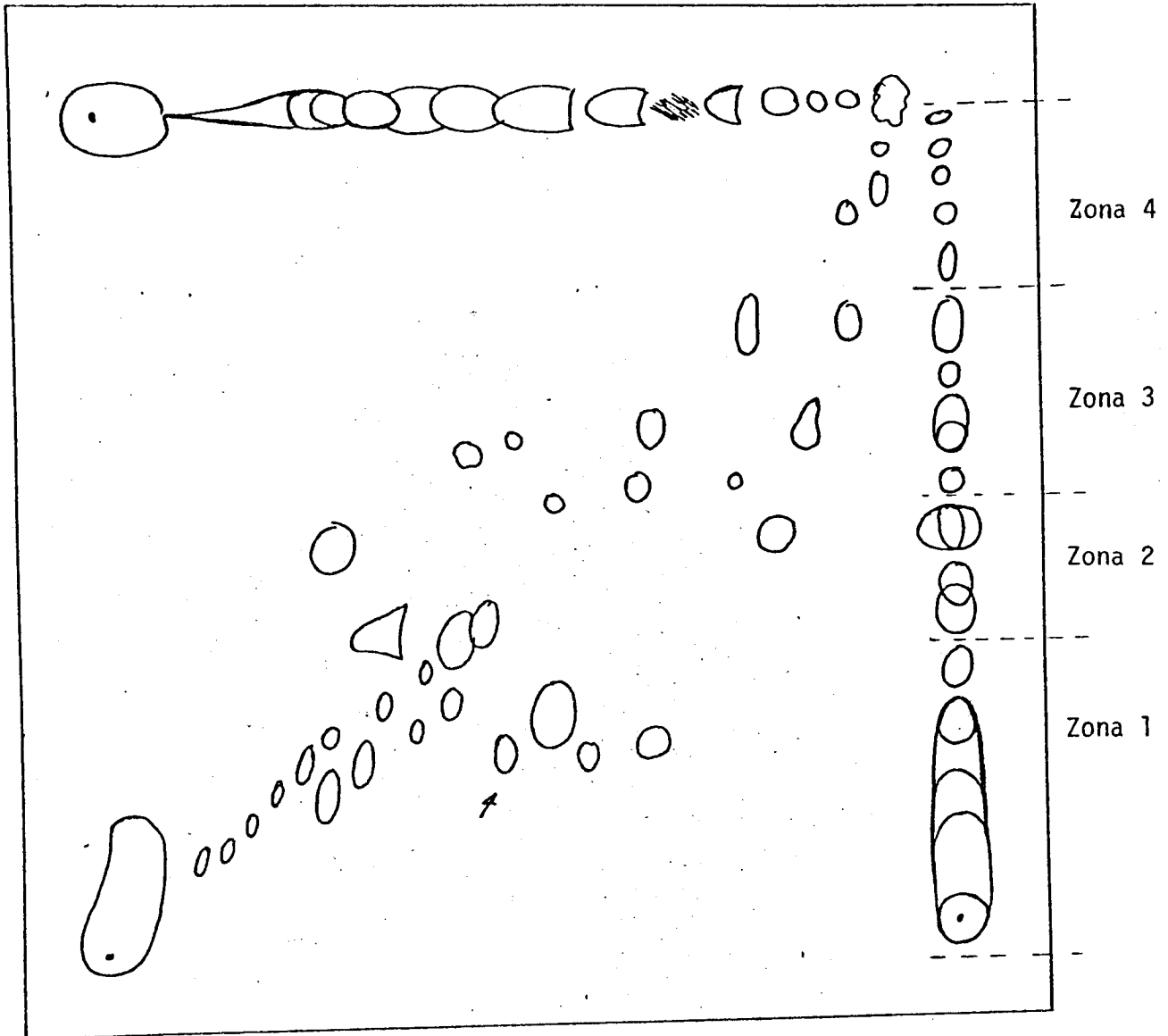
. Pontos de aplicação da amostra

- Revelação: Luz Ultra Violeta

Solvente I - clorofórmio, metanol, água (65:25:4)

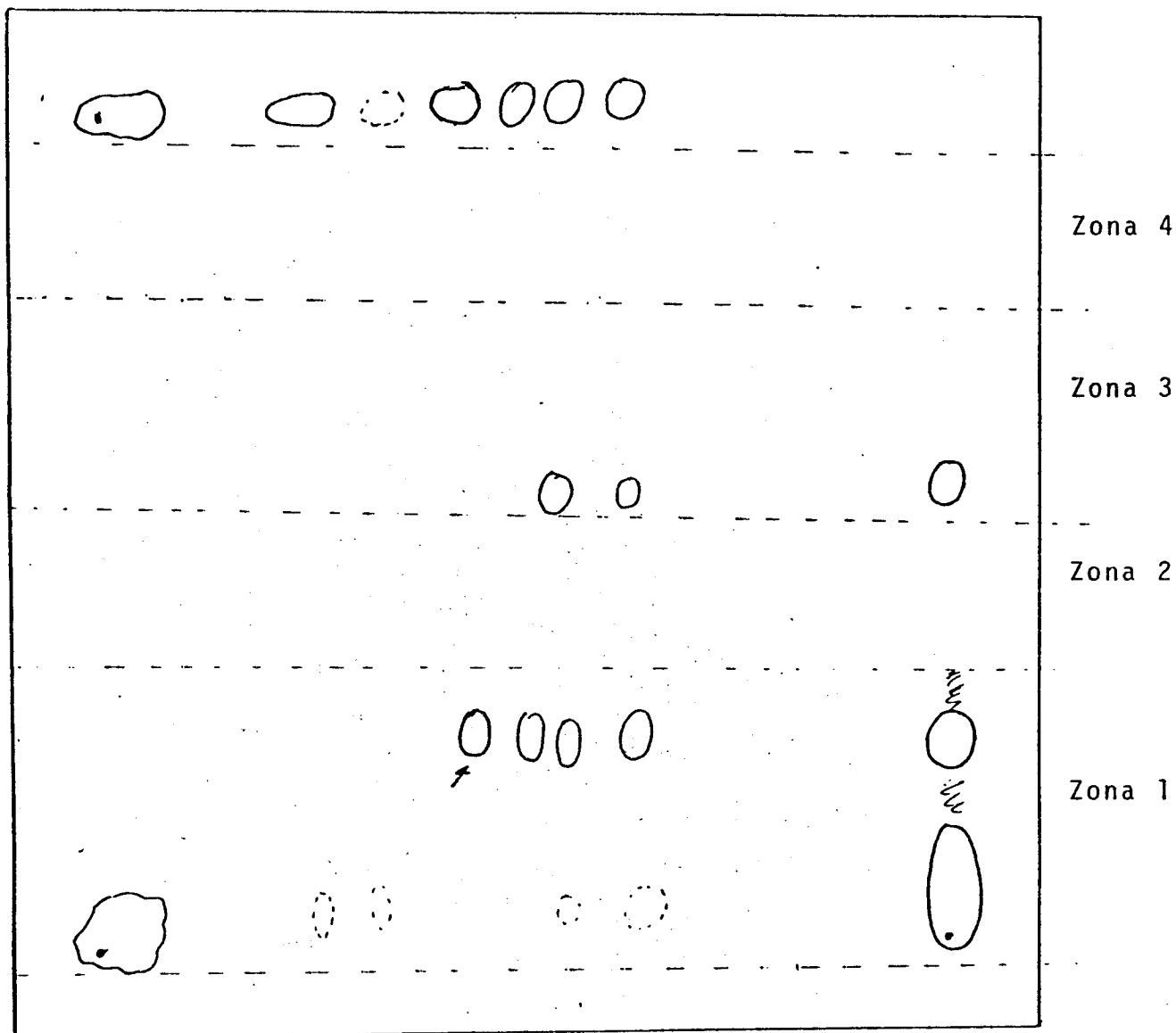
Solvente II - acetato de etila, ácido fórmico,
água (10:2:3)

FIGURA 8 - Placa de cromatografia do extrato SDET 75 (Soja Desengordurada em Etanol a 75%).



Extrato SDET 75 - Solvente I (sentido vertical, 2 vezes)
 Solvente II (sentido horizontal, 1 vez).
 . ponto de aplicação da amostra
 - revelação: H_2SO_4 , 50%
 Solvente I - clorofórmio, metanol, água (65:25:4)
 Solvente II - acetato de etila, ácido fórmico, água
 (10:2:3)

FIGURA 9 - Placa de cromatografia do extrato SDET 75. (Soja De sengordurada em Etanol a 75%).



Extrato SDET 75 - Solvente I (sentido vertical, 2 vezes)
 Solvente II (sentido horizontal, 1 vez)
 . ponto de aplicação da amostra

- revelador: "spray" de β -caroteno

Solvente I: clorofórmio, metanol, água (65,25,4)

Solvente II: acetato de etila, ácido fórmico, água
(10,2,3)

FIGURA 10 - Placa de cromatografia do extrato SDET 75. (Soja Desengordurada em Etanol a. 75%).

separação mais nítida. Nas placas reais, a separação entre as manchas não é tão nítida quanto nos desenhos devido à superposição parcial de alguns componentes, principalmente no desenvolvimento com o solvente II.

O solvente I foi escolhido como o primeiro solvente porque apresentou melhor separação das manchas. As zonas 1, 2, 3 e 4 foram separadas, de certa forma, aleatoriamente, nos pontos das placas onde não foi visualizada nenhuma "mancha" na revelação dos cromatogramas com ácido sulfúrico, β -caroteno, ou sob luz visível ou ultravioleta.

Segundo ELDRIDGE (1967) e HONING (1969), a zona 1, que vai da origem até a região de $R_f = 0,34$ deve conter, principalmente, aminoácidos e proteínas, glicosídeos, saponinas e fosfolipídeos. A zona 2, que vai da região de $R_f = 0,34$ até a região de $R_f = 0,51$, deve conter principalmente fosfolipídeos. A zona 3, que vai da região de $R_f = 0,51$ até a região de $R_f = 0,77$, deve conter agliconas de compostos fenólicos, glicosídeos de esteróides e alguns fosfolipídeos. A zona 4, que vai da região de $R_f = 0,77$ até a frente do solvente contém os lipídeos neutros.

O Quadro 11 apresenta o resultado dos testes da atividade antioxidante dos extratos SDET 75.1, 2, 3 e 4 em óleo de soja, determinado pelo "Active Oxygen Method". Os extratos 2, 3 e 4 apresentaram índices de peróxidos maiores que o do óleo puro. Somente o extrato SDET 75.1 apresentou atividade antioxidante apreciável, comparável à atividade do extrato integral e à do BHT.

A Figura 11 é uma representação desenhada da placa de cromatografia em camada delgada do extrato SDET 75.1, desenvolvida com o solvente II. Na revelação com ácido sulfúrico foram detectadas onze manchas, das quais apenas três apresentaram atividade antioxidante na revelação com o "spray" de β -caroteno.

QUADRO 11. Atividade antioxidante dos extratos SDET 75 1, 2, 3 e 4.

Amostra	IP (meq/1000g amostra)
Extrato SDET 75	23
Extrato SDET 75.1	27
Extrato SDET 75.2	53
Extrato SDET 75.3	40
Extrato SDET 75.4	48
BHT	22
TBHQ	3
Óleo Puro	36

Teste AOM, 10 horas

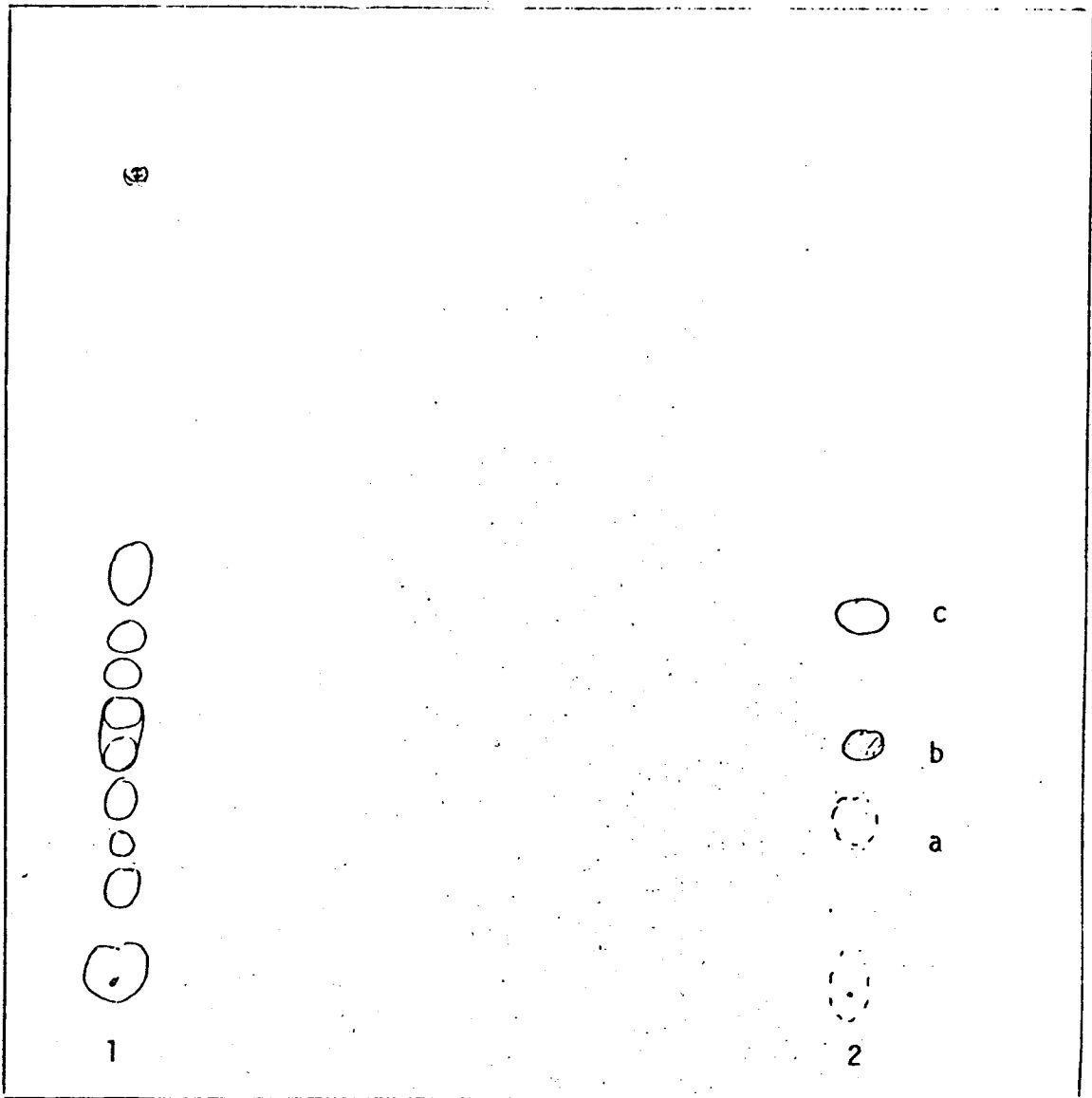
Temperatura: 99°C

Vazão do ar: 12L/hora

(IP) Índice de peróxidos: método Cd 8-53, AOCs, 1974.

Sistema: Óleo de soja

SDET 75 = Soja Desengordurada em Etanol a 75%.



Revelação: H₂SO₄ (1)

spray de β-Caroteno (2)

manchas antioxidantes: a, b, c

Solvente: acetato de etila, ácido fórmico, água (10,2,3)

FIGURA II - Cromatografia do extrato SDET 75.1 (SDET 75 = Soja Desengordurada em Etanol a 75%) no solvente II .

O Quadro 12 apresenta os resultados dos testes da atividade antioxidante dos extratos SDET 75.1.a, b e c, determinados pelo "Active Oxigen Method" em óleo de soja.

A mancha c, com $R_f = 0,44$ no solvente II foi a única que apresentou atividade antioxidante no óleo de soja. Uma mancha com valores de R_f semelhantes, que apresenta atividade antioxidante com o "spray" de β -caroteno, está indicada por uma seta nas Figuras 8, 9 e 10. Sob luz ultravioleta, a mancha apresenta coloração cinza, fraca, quase como uma sombra.

4.6. IDENTIFICAÇÃO DO EXTRATO SDET 75.1.c.

Os cromatogramas do extrato SDET 75.1.c. em vários solventes, revelados com ácido sulfúrico e vistos sob luz ultravioleta, apresentam apenas um componente. Esse componente apresenta atividade antioxidante, quando tratado com o "spray" de β -caroteno. A revelação dos cromatogramas com "spray" de cloreto de ferro/ferricianeto de potássio apresentou uma mancha azul, característica dos compostos fenólicos. A revelação com cloreto de ferro apresentou uma mancha marrom, também característica de compostos fenólicos.

Depois de tratado com Na_2CO_3 a 20%, o cromatograma apresentou uma mancha marrom, fraca, sob luz visível. Sob luz ultravioleta, a mancha, antes de coloração cinza, apagada, apresentou tonalidade marrom/verde brilhante, indicando a presença de um composto fenólico com hidroxilas ionizáveis.

Os cromatogramas da fração solúvel em éter de petróleo, do extrato hidrolisado, apresentaram apenas uma mancha, quando revelados com ácido sulfúrico.

A revelação com cloreto de ferro/ferricianeto de potássio apresentou a coloração azul, característica dos compostos fenólicos.

QUADRO 12. Atividade antioxidante dos extratos SDET 75,1 a, b, c.

Amostra	IP (meq/1000g amostra)
Extrato SDET 75,1 a	42
b	37
c	29
BHT	22
TBHQ	3
ÓLEO PURO	38

Teste AOM, 10 horas

Temperatura: 99°C

Vazão de ar: 12L/hora

(IP) Índice de peróxido: método Cd. 8-53, AOCs, 1974.

Sistema: Óleo de soja

SDET 75: Soja Desengordurada em Etanol a 75%

licos. A revelação com cloreto de ferro apresentou apenas uma mancha fraca de coloração azul/verde, indicando a presença de duas ou três hidroxilas livres, das quais uma não se encontrava livre na substância não hidrolisada.

Vista sob luz ultravioleta, a substância hidrolisada apresentou coloração rosada fraca, que se tornou marrom/verde depois da aplicação do "spray" de Na_2CO_3 .

As reações com reagentes cromatogênicos permitiram as seguintes conclusões: a substância isolada era um composto fenólico, com uma ou duas hidroxilas livres e mais uma hidroxila ligada a um grupo desconhecido. O grupo desconhecido provavelmente seria um açúcar porque a substância foi isolada a partir do extrato SDET 75.1, que continha glicosídeos.

A fração hidrolisada, solúvel em água, foi aplicada em uma placa de sílicagel, junto com amostras autênticas de glicose, frutose, ribose, arabinose, sacarose, ramnose e rafinose (SERVA FEINBIOCHEM.). O cromatograma foi desenvolvido com butanol: ácido acético: água (4:1:1) e revelado com oxalato de anilina. A coloração marrom/verde e o R_f da substância hidrossolúvel foram idênticos aos da glicose.

Os compostos fenólicos da soja são ácidos fenólicos e principalmente isoflavonas. As isoflavonas são difíceis de identificar por meio de reagentes cromatogênicos, mas possuem espectros de absorção na luz ultravioleta que são bem característicos (HARBORNE, 1967).

Os flavonóides (MARKAN & MABRY, 1975) são facilmente identificados pelo espectro da absorção em luz ultravioleta. De modo geral, apresentam duas faixas de absorção máxima (λ máxima). A banda I, na faixa de 300nm a 400nm corresponde à absorção do anel B; a banda II, na faixa de 240nm a 285nm corresponde à absorção do

anel A. O comprimento de onda de λ máxima aumenta com o número de hidroxilas livres em cada anel.

Nas isoflavonas, devido à ausência de conjugação entre os anéis A e B, o pico de absorção da banda I é atenuado, aparecendo como um ponto de inflexão (ombro) na curva de absorção. A absorção máxima da banda II ocorre na faixa de 245nm e 270nm e o "ombro" da banda II ocorre na faixa de 300nm a 400nm.

A adição de uma base forte, como o NaOH, à solução de metanol contendo uma isoflavona causa um aumento no comprimento da onda da absorção máxima, proporcional ao número de hidroxilas livres, que se ionizam. A adição de uma base fraca, como o NaOAc causa a ionização somente da hidroxila livre no carbono 7 do anel A, que é facilmente ionizável. A adição de $AlCl_3$ causa um aumento do comprimento da onda de absorção máxima devido à formação de um complexo entre o $AlCl_3$, uma hidroxila livre no carbono 5 e o grupo cetônico no carbono 3.

A Figura 12 apresenta os espectros em luz ultravioleta do extrato SDET 75.1.c em metanol, metanol mais NaOH e metanol mais $AlCl_3$. Esses espectros são bem semelhantes aos mostrados por GEISSMAN (1962) e HARBORNE (1967) para a 5, 7, 4'-tri-hidroxi-isoflavona (GENISTEINA). O espectro da fração hidrolisada solúvel em éter de petróleo se sobrepõe ao espectro da substância não hidrolisada.

O Quadro 13 apresenta os comprimentos de onda para λ máxima e para o "ombro" do extrato SDET 75.1.c. antes e depois da hidrólise, em metanol, metanol mais NaOH, metanol mais NaOAc e metanol mais $AlCl_3$. Os comprimentos de onda de λ máxima e do ombro são idênticos para a substância, antes e depois da hidrólise, em metanol puro. A adição de NaOAc causa um aumento de λ máxima de substância hidrolisada mas não altera λ máxima para a substância antes da hidrólise, indicando que a hidroxila do carbono 7 está ligada

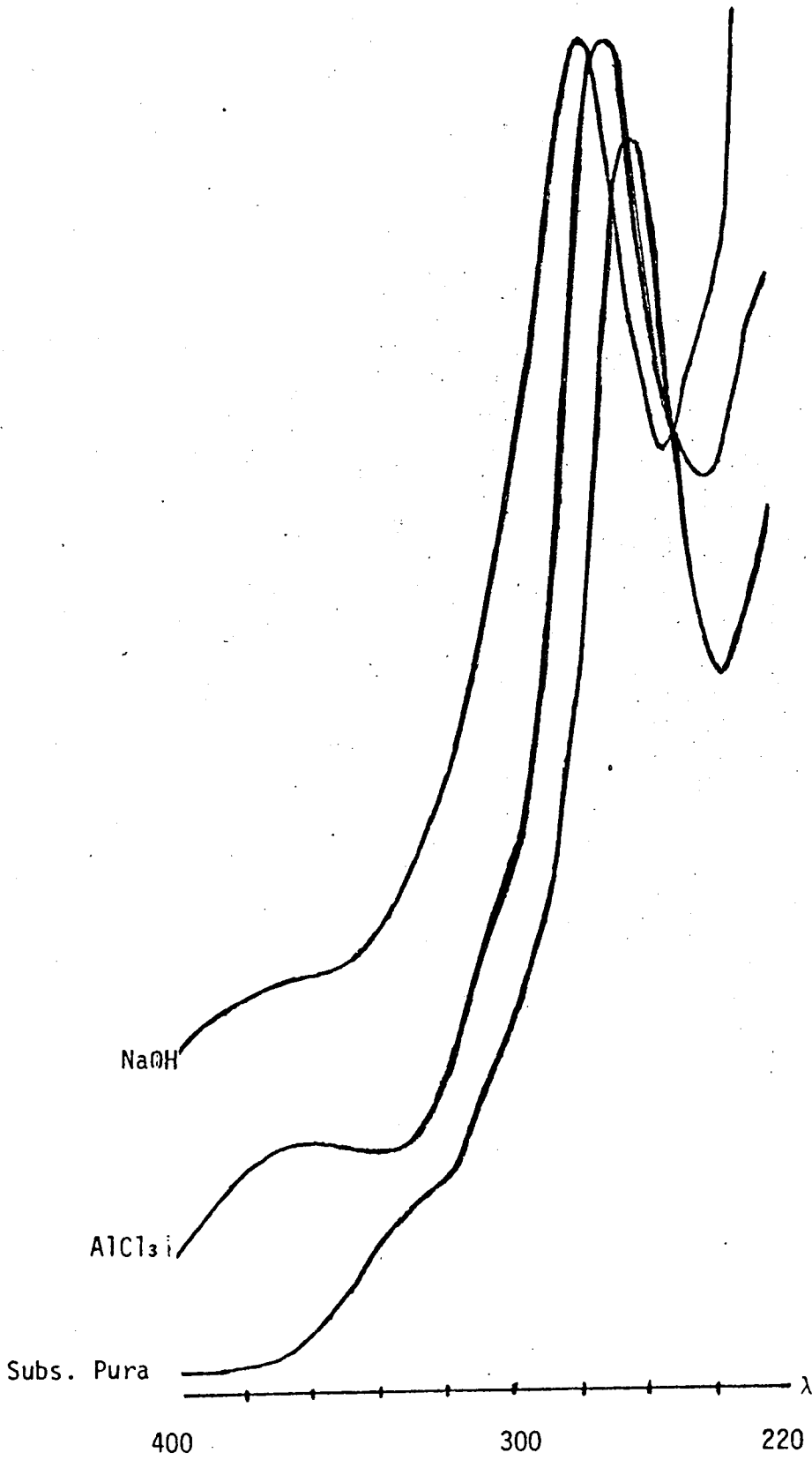


FIGURA 12. Espectro em UV do extrato antioxidante SDET 751C (Soja Desengordurada em Etanol a 75%) em metanol.

QUADRO 13. Caracterização do extrato em ultravioleta da substância isolada (extrato SDET 75.1.C)

Sem Hidrólise/Solvente	Máximo	Inflexão da Curva (ombro)
Metanol	261-263	330-335
Metanol + NaOH	270-275	370-380
Metanol + $AlCl_3$	270-275	345-355
Metanol + acetato de sódio	261-263	330-355
Hidrolizado/Solvente		
Metanol	260-263	330-335
Metanol + NaOH	275-280	350-360
Metanol + $AlCl_3$	270-275	345-350
Metanol + acetato de sódio	270-275	330-335

SDET 75 = Soja Desengordurada em Etanol a 75%.

a um grupo qualquer, na substância antes da hidrólise. Esse grupo já foi identificado como sendo uma molécula de glicose.

A adição de $AlCl_3$ provoca mudanças semelhantes nos valores de λ máxima da substância antes e depois da hidrólise, indicando a presença da hidroxila livre no carbono 5 do grupo cetônico do carbono 3 nos dois casos.

A cromatografia em placas de sílicagel, da substância antes e depois da hidrólise, desenvolvida com clorofórmio: metanol (9:1) apresentou valores de $R_f = 0,50$ e $R_f = 0,05$ para a substância hidrolisada e sem hidrólise, respectivamente. Esses valores são muito próximos aos citados por GEISSMAN (1962) para a GENISTINA (genisteína-7-O-glicosídeo) e a GENISTEINA.

PRATT e BIRAC (1979) atribuíram a atividade antioxidante da soja aos ácidos fenólicos e às isoflavona. Segundo ELDRIDGE e KWOLECK (1983), as isoflavonas são os compostos fenólicos que aparecem na soja em maior quantidade, e destas, a maior proporção, 60% das isoflavonas, é do glicosídeo da genistina.

Os dados da cromatografia em camada delgada, do espectro em ultravioleta e da literatura estudados para este trabalho permitem concluir que a substância isolada no extrato SDET 75.1.c é um glicosídeo de 5, 7, 4'-tri-hidroxi-isoflavona, a GENISTEINA.

5. CONCLUSÕES

1. O local do plantio, a variedade da cultivar e o ano da safra não influenciaram a atividade antioxidante dos extratos no teste com o sistema modelo de ácido linolêico e β -caroteno.

2. Dos solventes testados para a extração das substâncias com atividade antioxidante da soja, o melhor foi o etanol, seguido da acetona e do metanol, no teste com o sistema modelo de ácido linolêico e β -caroteno.

3. Na extração com etanol hidratado, os extratos da soja integral foram mais ativos que os extratos da soja desengordurada, no teste com o sistema modelo de ácido linolêico e β -caroteno.

4. Na extração com etanol hidratado, a solução A 75% foi o melhor solvente para as substâncias antioxidantes no teste com óleo de soja pelo "Schaal Oven Test" e no teste do AOM.

5. Os extratos em etanol a 75% possuem atividade antioxidante próxima à do BHT em óleo de soja no teste do AOM.

6. A substância mais ativa do extrato em etanol a 75% é a GENISTINA, 7-O-glicosídeo da GENISTEÍNA (5,7,4'-trihidroxi-isoflavona).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC. - Approved Methods of the American Association of Cereal chemists. St. Paul, American Association of Cereal Chemists, 1969.
- ADAMIC, K.; BOWMAN, D.F. & INGOLD, K.V. - The inhibition of autoxidation by aromatic amines. J. AOCS 47:109-111, 1970.
- ALFIN-SLATER, R.B.; AUERBACHI, S. & AFTERGOOD, L. - Nutritional evaluation of some heated oils. J. AOCS 36:638-641, 1959.
- ALTWICKER, E.R. - The chemistry of stable phenoxi radicals. Chem. Rev. 67:475-480, 1967.
- ANDERSON, R.A.; LOJNOVICH, C. & BOOKWALTER, G.N. - Iron enrichment of dry milled corn products. Cereal Chem. 53:937-946, 1976.
- AOCS - Official and Tentative Methods of Analysis of the American Oil Chemist's Society. Champaign, Illinois, 1974.
- ARAI, S.; SUZUKI, H.; FUJIMAKI, M. & SAKURAI, Y. - Studies on flavor components in soybeans. Part 2. Phenolic acids in defatted soybean flour. Agr. Biol. Chem. 30:364-369, 1966.
- ARNOLD, L.K.; ZAHEER, S.H.; KRISHNA, M.G. & RAO, R.K. - Alcoholic extraction of vegetable Oils. I. Solubilities of cottonseed, peanut, sesame, and soybean oils in aqueous ethanol. J. AOCS, 32:420-423, 1955,
- ARNOLD, L.K. & CHOUDHURY, R.B.R. - Ethanol extraction of soybean J. AOCS, 39:379-380, 1962.
- BECK, A. - The oestrogenic isoflavones of subterranean clover. Austr. J. Agric. Res. 15:223-230, 1964.

- BECKEL, A.C. & SMITH, A.K. - Alcohol extraction improves soya flour flavor and color. Food Ind., 16:116-119, 1944.
- BECKEL, A.C.; BELTER, P.A. & SMITH, A.K. - Solvent effects on the products of soybean oil extraction. J. AOCS, 27:7-9, 1948.
- BELL, E.E.; RALEY, J.H.; RUST, F.F.; SENBOLD, F.H. & VAUGHAN, W.E. - Reaction of free radical associated with low temperature oxidation of paraffins. Discussions Faraday Soc. 10:242-249, 1951.
- BERK, Z. - "Braverman's introduction to the biochemistry of foods". Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing, 1976. 315p.
- BEROZA, M. - Pyrethrin synergists in sesame oils. Sesamol, a potent synergist. J. AOCS, 31:302-305, 1954.
- BEROZA, M. - 3,4 - Methylene-dioxyphenoxi compounds synergists for natural and synthetic pyrethrins. J. Agric. Food Chem. 4:49-52, 1956.
- BERRY, N.W. & MCKERRIGAS, A.A. - Carbonyl compounds as a criterion of flavor deterioration in edible fats. J. Sci. Food Agric. 9: 693-701, 1958.
- BIRCH, A.J. - Biosynthesis of flavonoids and antocyanins. In: Geisman, T.A. ed. The chemistry of flavonoid compounds. N.Y. The Mc Millan Company, 1962, p.618-625.
- BOLAND, J.L. - Kinetic studies in the chemistry of rubber and related materials. I. The thermal oxidation of ethyl oleate. Proc. Roy. Soc. 186 A:218-236, 1946.
- BOLLAND, J.L. & GEE, G. - Kinetic studies the chemistry of rubber and related materials. II. The kinetics of oxidation of uncojugated olefins. Trans Faraday, Soc. 42:236-243, 1946a.

- BOLLAND, J.L. & GEE, G. - Kinetic studies the chemistry of rubber and related materials. III. Thermochemistry and mechanisms of olefin oxidation. Trans. Faraday Soc. 42:244-252, 1946b.
- BOLLAND, J.L. - Kinetic studies the chemistry of rubber and related materials. IV. The inhibitory effect of hidroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate. Trans Faraday Soc. 43:201-210, 1947.
- BOLLAND, J.L. - Kinetics of olefin oxidation. Chem. Soc. 3:1-21, 1949.
- BOOKWALTER, G.N.; KWOLECK, W.F.; BLACK, L.T. & GRIFFIN, E.L - Corn meal/soy flour blends. Characteristics and food application. J. Food Science. 36:1026-1032, 1971a.
- BOOKWALTER, G.N.; MUSTAKAS, G.C.; KWOLECK, W.F.; MCGHEE, J.E. & ALBRETCH, W.J. - Full fat soy flour extrusion cooked:properties and food uses. J. Food Science. 36:5-9, 1971b.
- BOSKOW, D. & MORTON, I.D. - Effect of plant sterols on the rate of deterioration of heated oils. J. Sci. Food Agr. 27:928-932, 1976.
- BRACCO, U.; LOLIGER, J. & VIRET, J.L. - Production and use of natural antioxidant. J. AOCS. 59:686-690, 1982.
- BRANEM, A.L. - Toxicology and biochemistry of BHA and BHT. J. AOCS. 52:59-63, 1975.
- BRASIL. - Ministério da Saúde. Legislação federal do setor de saúde. Brasília, 1977. p. 503-515. Decreto Federal 55871, 1965.
- BRASIL. - Ministério da Saúde. SNVS-DINAL. Ofício/Circular nº 05/84 de 22/05/84.

- BRYLL, W.F. - The isolation and rearrangements of pure acyclic hydroperoxides. J. Am. Chem. Soc. 87:3286-3289, 1965.
- BROWNLIE, I.T. & INGOLD, K.V. - The inhibited autoxidation of styrene IV. The relative efficiencies and kinetics for inhibition by n-arylanilines and n-alkylanilines. Can. J. Chem. 45:2419-2425, 1967.
- BURNS, M.J. & QUAQUERNBUSH, F.W. - Stability of dry vitamin A concentrates. Ind. Eng. Chem. 43:1952-1954, 1951.
- CARLSSON, D.J.; SUPRUCHUNCK, T. & WILLS, D. - Photooxidation of unsaturated oils: effects of singlet oxygen quenchers. J. AOCS. 53:656-659, 1976.
- CASTELAN, G.W. - Physical Chemistry. Addison-Wesley Publishing Co., 1967. 715p.
- CHAN, H.W.S.; PRESCOTT, F.A.A. & SWOBODA, P.A.T. - Thermal decomposition of individual positional isomers of methyl linoleate hydroperoxides: evidence of carbon-oxygen bond scission. J. AOCS. 53:572-576, 1976.
- CHAN, H.W.S. - Photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid methyl esters. The identification of different pathways. J. AOCS. 54:100-104, 1977.
- CHAN, H.W.S. & LEVET, G. - Autoxidation of methyl linoleate: analysis of methyl hydroxylinoleate isomers by HPLC. Lipids. 12: 837-840, 1977.
- CHANG, S.S.; OSTRIC-MATYASEVIC, B.; HSIEH, O.A. & HUANG, C. - Natural antioxidants from rosemary and sage. J. Food Sci. 42: 1102-1106, 1977.

- CHANG, S.S.; OSTRIC-MATYASEVIC, B.; HSIEH, O.A. & HUANG, C. - Natural antioxidants from rosemary and sage. Food Chem. 9:21-25, 1982.
- CHANG, S.S. & SMOUSE, T.H. - A systematic characterization of the reversion of soybean oil. J. AOCS. 44:509-514, 1967.
- CHANG, S.S.; HO, C.; M. & WU, W.J. - Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. J. AOCS. 59:339-345, 1982.
- CHANG, S.S.; HO, C. & HOULIHAM, C.M. - Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmarydiphenol, isolated from rosemary. J. AOCS. 61:1036-1039, 1984.
- CHIPAUT, J.R. - Antioxidants for use in foods. In: Lundberg, W.O. Ed. Autoxidation Antioxidants N.Y., Interscienc Publ., 1962, Vol. 2, p. 477-542.
- CHIPAUT, J.R.; MIZUNO, G.R.; HAWKINS, J.M. & LUNDBERG, W.O. - The antioxidant properties of natural species. Food Res. 17:46-55,
- CHIPAUT, J.R. - 32 spices gaged as antioxidants. Food Eng. 29:134-137, 1957.
- CHIPAUT, J.R.; MIZUNO, G.R. & LUNDBERG, W.O. - Antioxidant properties of spices in oil in water emulsion. Food Res. 20:443-448, 1955.
- CHIPAUT, J.R.; MIZUNO, G.R. & LUNDBERG, W.O. - The antioxidant properties of spices in foods. Food Technol. 10:209-211, 1956.
- CHOUDHRYRY, R.B.R. & ARNOLD, L.K. - Ethanol extraction of soybean oil. J. AOCS. 39:379-380, 1962.

- COWAN, J.C. - Key factors and recent advances in the flavor stability of soybean oil. J. AOCS. 43:300A-302A, 1966.
- CRAM, D.J. & HAMMOND, G.S. - "Organic Chemistry". McGraw-Hill Book Company Inc. 1964. p. 412, 742-743.
- CRAPTON, E.W.; COMMON, R.H.; FARMER, F.A.; BERRYHILL, F.M. & WISEBLAT, L. - Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment. I. The relation of autoxidation to the nutritive value of heated linseed oil. J. Nutrition. 43:533-539, 1951a.
- CRAPTON, E.W.; COMMON, R.H.; FARMER, F.A.; BERRYHILL, A. F. & WISEBLAT, L. - Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment. II. Investigation of the nutritiouness of the products of thermally polymerized linseed oil. J. Nutrition. 44:177-189, 1951b.
- CRAPTON, E.W.; COMMON, R.H.; FARMER, F.A.; WELLS, A.F. & CRAWFORD, D. - Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment. III. The segregation of toxic and no toxic material from the esters of heat polymerized linseed oil by distillation and by urea adduct formation. J. Nutrition. 49:333-346, 1953.
- CRAPTON, E.W.; COMMON, R.H.; PRITCHARD, E.T. & FARMER, F.A. - Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment. IV. Heat polymerized linseed, soybean and sunflowers oils. J. Nutrition. 60:13-24, 1956.

- CHRISTIAN, J.H.B. - Water Activity and the growth of microorganisms. In: Leict, S.M. & Rhodes, D.N. Recent Advances in Food Science. London, Butterworths, 1963, p.248-255.
- CLEMENTS, A.H.; VAN DEN ENGH, R.H.; FROST, D.J.; HOOGHENHOUT, K. - Participation of singlet oxygen in photosensitized oxidation of 1,4 dienoic systems and photooxidation of soybean oil. J. AOCS. 50:325-330, 1973.
- COBERN, B.; HOBBS, J.S.; LUCAS, R.A. & MACKENZIE, D.K. - Localization of hydroperoxides group in monohydroperoxides formed by chlorophyll-photosensitized photooxidation of unsaturated acids. J. Chem. Soc. C:1897-1902, 1966.
- COLE, E.R.; CRANCK, G. & MINH, H. - Antioxidant properties of synthetic 5-hydroxy benzodioxole derivatives. J. Agr. Food Chem. 30:719-724, 1982.
- CORT, W.M. - Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. J. AOCS. 51:321-325, 1977.
- COREY, E.J. & TAYLOR, W.C. - Peroxidation of organic compounds by externally generated singlet oxygen molecules. J. Am. Chem. Soc. 86:3881-3882, 1964.
- COSTA, S.I.; QUAIST, D.G.; MORETTI, V.A.; CANTO, W.L. & COBBE, R. V. - O emprego da soja na alimentação humana. Boletim do ITAL. 46:1-24, 1976.
- COWAN, J.C.; SCHWAB, A.W.; EVANS, C.D. & COONEY, P.M. - Influence of heat on oxidative stability and effectiveness of metal inactivating agents in vegetable oils. J. AOCS. 35:152-156. 1958.

- CRAWFORD, D.L.; SINHUBER, R.O. & AFT, O.H. - The effect of metilation upon the antioxidant and chelation capacity of quercetin and dihydroquercetin in a lard substrate. J. Food Science. 28: 139-145, 1961.
- DAHLE, C.E. & NELSON, D.H. - Antioxigenic fraction of oat and soybean flour. J. Dairy Science. 24:29-39, 1941.
- DESROSIER, 1977. N.W. & DESROSIER, J.N. - "The technology of food preservation". 4^a ed., Westport, AVI Publishing, 1977, 558p.
- DETTY, W.E.; HESTON, B.O. & WENDER, S.H. - Amperometric titration of some flavonoid compounds with cupric sulfate. J. Am. Chem. Soc. 77:162-164, 1955.
- DEUEL, H.J. Jr. - The chemistry of the phosphatides and cerebrosides. In: The Lipids. Their Chemistry and Biochemistry. N.Y., Interscience Publishers, 1951, Vol. I, p. 424-506.
- DUTTON, H.S.; SCHWAB, A.W.; MOSER, H.A. & COWAN, J.C. - The flavor problem of soybean oil. IV. Structures of compounds counteracting the effect of prooxidant metals. J. AOCS. 25:385-388, 1948.
- EASTMAN, KODAK Co. - Eastman guide to fat and oil antioxidant technology. Eastman Kodak Company, 1963, 150p.
- EASTMAN, KODAK Co. - Tenox food-grade antioxidants. Eastman Kodak Company, Kingsport, 1974, 11p. Publication nº 2G 109A.
- ELDRIDGE, A.C.; WOLF, W.J.; NASH, A.M. & SMITH, A.K. - Alcohol washing of soybean protein. J. Agric. Food Chem. 11:323-328, 1963.

- ELDRIDGE, A.C.; NASH, A.M. & WOLF, W.J. - Fractionation and characterization of alcohol extractables with soybean protein. J. Agric. Food Chem. 15:102-108, 1967.
- ELDRIDGE, A.C. - Determination of isoflavonoids in soybean flours, protein concentrates and isolates. J. Agric. Food Chem. 30: 353-355, 1982.
- ELDRIDGE, A.C. & KUWOLEK, E. - Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. J. Agric. Food Chem. 31: 394-400, 1983.
- ERDAHL, W.; STOLYKWO, A. & PRIVETT, O.S. - Analysis of soybean lecithin by thinlayer and analytical liquid chromatography. J. AOCS. 50:513-515, 1973.
- ERIKSON, C.E.; OLSSON, D.A. & SVENSON, S.G. - Denaturated hemeprotein as catalysts in lipid oxidation. J. AOCS. 45:442-447, 1971.
- EVANS, C.D.; SCHWAB, A.W.; MOSES, H.A.; HAWLEY, J.E. & MELVIN, E. H. - The flavor problem of soybean oil. VII. Effect of trace metals. J. AOCS. 28:68-73, 1951.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. - SP. Organização Andrei Editôra, 3^a ed. 1977, p. 774.
- FARMER, E.H. - α -Metilenic reactivity in olefinic and polyolefinic systems. Trans. Faraday Soc. 38:340-348, 1942.
- FARMER, E.H.; BLOOMFIELD, G.F.; SUNDRALINGAM, A. & SULTON, D.A. - The course on mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances including rubber. Trans. Faraday Soc. 38:348-356, 1942.

- FARMER, E.H. - Peroxidation in relation to olefinic structure.
Trans. Faraday Soc. 42:228-326, 1946.
- FEDELI, A.; CAMURATI, F. & JACINI, G. - Structure of monohydroperoxides formed by photooxidation of methyl linoleate. J. AOCS. 45:787-789, 1971.
- FEDELI, E.; CORDILLO, M. & LAZANI, A. - Studio del potere antiossidante dell'acido clorogenico isolato dei semi di girasole. Riv. Ital. delle Sost. Grasse. 56:273-275, 1979.
- FEDELI, E. & CAMURATI, F. - Atividade antioxidante di estrati fenolici delle acque de vegetazione delle olive. Riv. Ital. delle Sost. Grasse. 59:623-627, 1982.
- FENEMA, O.R. - Principles of Food Science. Part I. Food chemistry. in: Fenema, O.R. - Ed. Food Science. A Serie of Monographs. N.Y., Marcel Dekker Inc., 1976, 792p.
- FOOTE, C.S. & WEXLER, S. - Olefin oxidation with excited singlet oxygen. J. Am. Chem. Soc. 86:3879-3880, 1964a.
- FOOTE, C.S. & WEXLER, S. - Singlet oxygen. A probable intermediate in photosensitized autoxidation. J. Am. Chem. Soc. 86:3880-3881, 1964b.
- FRANKEL, E.N.; EVANS, C.D. & COWAN, J.C. - Thermal dimerization of fatty ester hydroperoxides. J. AOCS. 37:418-424, 1960.
- FRANKEL, E.N.; NEFF, W.E.; ROHWEDDER, W.K.; KHAMBAY, B.S.P. & WEEDOM, B.C.L. - Analysis of Autoxidized fats by GC-MS. I: methyl oleate. Lipids. 12:901-907, 1977a.

- FRANKEL, E.N.; NEFF, W.E.; ROHWEDDER, W.K.; KHAMBAY, B.S.P. &
GARWOOD, B.C.L. - Analysis of autoxidized fats by GC-MS. II-
methyl linoleate. Lipids. 12:908-913, 1977b.
- FRANKEL, E.N.; NEFF, W.E.; ROHWEDDER, W.K.; KHAMBAY, B.S.P. &
GARWOOD, B.C.L. - Analysis of autoxidized fats by GC-MS. III-
methyl linoleate. Lipids. 12:1055-1061, 1977c.
- FRANKEL, E.N.; SELK, E. & NEFF, W.E. - Thermal decomposition of
methyl oleate hydroperoxides and identification of volatile com-
ponents by GC-MS. Lipids. 13:511-513, 1978.
- FRANKEL, E.N. & NEFF, W.E. - Analysis of autoxidized fats by GC-
-MS. IV- Soybean oil methyl esters. Lipids. 14:39-45, 1979.
- FRANKEL, E.N.; NEFF, W.E. & BESSLER, T.R. - Analysis of autoxidi-
zed fats by GC-MS. V- Photosensitized oxidation. Lipids. 14:
961-967, 1979.
- FRANKEL, E.N. - Lipid oxidation. Progress in Lipid Research. 19:1-
-22, 1980.
- FUKUZUMI, K. & IKEDA, N. - The effects of antioxidants in the auto-
xidation of methyl conjugated cis, trans, octadienoates, J.
AOCS. 47:369-363, 1970.
- FUKUZUMI, K. & IKEDA, N. - Study on the effects of antioxidants in
the autoxidation of methyl non conjugated octadienoates. J.
AOCS. 46:64-66, 1969.
- GADDIS, A.M.; ELLIS, R. & CURRIE, G.T. - Carbonyls in oxidizing fats. I.
Separation of steam volatile carbonyls into classes. Food
Research. 24:283, 1959a.
- GADDIS, A.M. & ELLIS, R. - Carbonyls in oxidizing fats. II. The
identity and amounts of steam volatile carbonyls in a rancid
freezed stored pork fat. Food Research. 24:392-400, 1958b.

- GADDIS, A.M.; ELLIS, R. & CURRIE, G.T. - Carbonyls in oxidizing fats. III. The distribution of volatile and non-volatile carbonyls. Food Research. 25:495-506, 1960.
- GADDIS, A.M.; ELLIS, R. & CURRIE, G.T. - Carbonyls in oxidizing fats. IV. The role of various fatty acid components in carbonyl generation. J. Food Sci. 26:131-138, 1961.
- GARDNER, H.W. - Lipid hydroperoxide reactivity with protein and aminoacids: A Review. H. Agric. Food Chem., 27:220-229, 1979.
- GEISSMAN, T.A. - The chemistry of flavonoid compounds. N.Y. The McMillan Co, 1962, 666p.
- GORDON, M.H. & MAGOS, P. - The effect of sterols on the oxidation of edible oils. Food Chemistry. 10:141-147, 1983.
- GREEN, T.G. & HILDITCH, T.P. - Studies on the nature of antioxidant compounds in extracted soybean oil cake. J. Soc. Chem. Ind. 56:23-28, 1937.
- GYORGY, P.; MURATA, K. & IKEHATA, H. - Antioxidant isolated from fermented soybeans. Nature. 203:870-872, 1964.
- HARBORNE, J.B. - Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic Press, London, 1967. 383p.
- HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J. & MABRY, H. - The flavonoids. N.Y. Academic Press, 1975, Vol.1, Vol. 2, 1023p.
- HAYES, R.E.; BOOKWALTER, G.N. & BAGLEY, B. - Antioxidant activity of soy flour and derivatives. A Review. J. Food Sci., 42:1527-1532, 1977.

- HAVERKAMP-BEGEMANN, P. WOESTERBURG, W.J. & LEER, S. - Structure of methyl linolenate diperoxides. J. Agr. Food Chem. 16: 679-682, 1968.
- HEIMANN, I.W. & REIFF, F. - Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und antioxidativer Wirkung bei Flavonolen. Fette und Seifen. 55:451-453, 1953.
- HERRMANN, K. - Flavonols and flavones in food plants: A Review. J. Food Technol. 11:433-448, 1976.
- HIKEHATA, H.; WAIKAZUMI, M. & MURATA, K. - Antioxidant and anti-hemolytic activity of a new isoflavone: Factor 2 isolated from tempeh. Agr. Biol. Chem. 32:740-746, 1968.
- HIKEHATA, H. & MURATA, K. - Antioxidant isolated from fermented soybeans (Tempeh). Nature. 203:870-875, 1984.
- HILDITCH, T.P. & GUNSTONE, F.D. - Relative rates of oxidation for unsaturated fatty acids. J. Chem. Soc. 386-841, 1945.
- HOLMAN, R.T. - Spectrophotometric studies of the oxidation of fats. VII. Coupled oxidation of carotene. Arch. Biochem. 25: 51-57, 1949.
- HOLMAN, R.T. - Spectrophotometric studies of the oxidation of fats. IX. Coupled oxidation of vitamin A acetate. Arch. Biochem. 26:85-90, 1950.
- HONING, D.H.; SESSA, D.J.; HOFFMAN, R.L. & RACKIS, J.J. - Lipids of defatted soybean flakes: Extraction and characterization. Food Technology. 23:803-809, 1969.
- HUDSON, B.F. & MAHGOUB, S.E.O. - Naturally occurring antioxidants in leaf lipids. J. Sci. Food Agr. 31:646-650, 1980.

- HUDSON, B.J.F. & DIZEDZIC, S.Z. - Hydroxi isoflavones antioxidants for edible oils. Food Chemistry. 11:161-166, 1983.
- HUDSON, B.J.F. & LEWIS, J.I. - Polyhydroxy flavonoid antioxidants or edible oils. Phospholipids as synergists. Food Chemistry. 10:111-121, 1983.
- HUDSON, B.J.F. & LEWIS, J.I. - Polyhydroxi flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. Food Chemistry. 10:47-55, 1983b.
- HUDSON, B.J.F. & DIZIEDZIC, S.Z. - Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. Food Chemistry. 14:45-51, 1984a.
- HUDSON, B.J.F. & DIZIEDZIC, S.Z. - Polyhydroxy chalcones and flavones as antioxidants for edible oils. Food Chemistry. 12:205-211, 1984b.
- INATANI, R. & NAKATANI, N. - Structure for rosmanol, a new antioxidant from rosemary. Agr. Biol. Chem. 45:2385-2386, 1981.
- INATANI, R.; NAKATANI, N. & FUWA, H. - Antioxidative effects of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.) Agr. Biol. Chem. 47:521-523, 1983.
- INGOLD, K.V. - Metal catalysis. In: Schults, H.W.; Day, E. A.; Sinhuber, R.O. - Symposium on foods: Lipids and their oxidation Westport, AVI, 1962. p.93-121.
- JOHNSON, O.C.; CHANG, S.C. & KUMEROW, F.A. - Volatile decomposition products of the oxidative polymers of ethyl oleate. J. AOCS. 30:317-321, 1953.
- JOHNSON, O. C.; SAKURAJI, T. & KUMEROW, F.A. - Comparative study of the nutritional value of thermally oxidized oils. J. AOCS. 33:433-435, 1956.

- JOHNSON, O.C.; PERKINS, E.G.; SUGAI, M. & KUMEROW, F.A. - Studies on the nutritional and physiological effects of thermally oxidized oils. J. AOCS. 34:594-597, 1957a.
- JOHNSON, O.C. & KUMEROW, F.A. - Chemical changes which take place in edible oil during thermal oxidation. J. AOCS. 34:407-409, 1957b.
- JOHNSON, F.C. - A critical review of the safety of phenolic antioxidants in food. CRC Critical Reviews in Food Technology. 2 (3):267-304, 1971.
- KANNER, R.J. & MENDEL, H. - Prooxidant and antioxidant effects of ascorbic acid and metal salts in a β -carotene linoleate model system. J. Food. Science. 42:60-64, 1977.
- KAUNITZ, H.; JOHNSON, R.E. & SLANETZ, C.A. - Rancid lard effect on rats complete and deficient diets. J. Nutrition. 46:151-159, 1952.
- KAUNITZ, H.; SLANITZ, C.A.; JOHNSON, R.E.; KNIGHT, H.B.; SAUNDERS, D.H. & SWERN, D. - Biological effects of the polymeric residues from autoxidized fats. J. AOCS. 33:630-634, 1956.
- KAUNITZ, H. - Biological effects of autoxidized lipids. In: Schultz, H.W.; Day, E.A. & Sinhuber, R.O. Ed. Symposium on Foods: Lipids and their oxidation. Westport, AVI, 1962. p. 269-293.
- KEANY, K.W.; JACOBSON, G.A. & KRYGIER, C.H. - Biological and chemical studies on commercial frying oils. J. Nutrition 68:57-61, 1959.
- KEENEY, M. - Secondary degradation products. In: Schultz, H. W.; Day, E.A. & Sinhuber, R.O., Ed. Symposium of Foods: Lipids and their oxidation. Westport, AVI, 1962, p. 79-99.

- KELLY, G.C. & WATTS, B.W. - Effect of copper chelating agents on the prooxidant activity of ascorbic acid with unsaturated fats. J. Food Sci. 22:308-315, 1957.
- KEPPLER, J.G.; FEENSTRA, H.W.; SCHOLS, J.A. & MEIJBOOM, P. W. - Components of the hardening flavor in hardened linseed and soybean oil. J. AOCS. 42:246-249, 1965.
- KHAN, N.A.; LUNDBERG, W.O. & HOLMAN, R.T. - Displacement analysis of lipids. IX. Products of the oxidation of methyl-linoleate. J. Am. Chem. Soc. 76:1779-1784, 1954.
- KHAN, T.M.M. & MARTELL, A.E. - Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation. J. Am. Chem. Soc. 89:4176-4184, 1967.
- KNIGHT, H.B.; COLEMAN, J.E. & SWERN, D. Reactions of fatty materials with oxygen. IX. Analytical study of the autoxidation of methyl oleate. J. AOCS. 28:498-501, 1951.
- KOCH, R.B. - Dehydrated foods and model systems. In: Schultz, H. W., Day, E.A.; Sinhuber, E.D. ed. Symposium on foods: Lipids and their oxidation. Westport, AVI. 1962. p. 231-251.
- KRAYBIL, H.R.; DUGAM, L.R.; BEADLE, B.W.; VIBRANS, F.C.; SCHWARTZ, V. & REZABECK, H. - Butylated hydroxyanisole as an antioxidant for animal fats. J. AOCS, 26:449-453, 1949.
- KÜHNAU, J. - The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. World Rev. Nutr. Diet. 24:117, 1976.
- KURT, E.F. & CHAN, F.L. - Dihydroquercetin as an antioxidant J. AOCS. 28:433-436, 1958.
- KWO, T.L. - Catalysts of lipid peroxidation in meats. J. AOCS. 45:550-555, 1971.

- KUMEROW, F.A. - Toxicity of heated fats. In: Schultz, H.W.; Day, E. A. & Sinhuber, R.O. Symposium on foods: Lipids and their oxidation. Westports, AVI, 1962, p. 294-320.
- LABUZA, T.P.; MALONEY, J.F.; WALLACE, D.H. & KAREL, M. - Autoxidation of methyl-linoleate in freeze-dried model-systems. J. Food Science. 31:878-884, 1966a.
- LABUZA, T.P.; MALONEY, J.F. & KAREL, M. - Autoxidation of methyl-linoleate in freeze dried model systems. II. Effect of water on cobalt-catalyzed oxidation. J. Food Science. 31:885-891, 1966b.
- LABUZA, T.P.; TSUYUKI, H. & KAREL, M. - Kinetics of linoleate oxidation in model systems. J. AOCS. 46:409-410, 1969a.
- LABUZA, T.P.; TYHIO, K.H. & KAREL, M. - Effect of humidity on activity of catalysts and antioxidants in model systems. J. AOCS. 46:597-600, 1969b.
- LABUZA, T.P. - Kinetics of lipid oxidation in foods. CRC Critical Reviews in Food Technology. 2(3):355-405, 1971.
- LABUZA, T.P.; TANNEBAUN, S.R. & KARL, M. - Water content and stability of low moisture and intermediate moisture foods. Food Technology. 24:543-555, 1970.
- LABUZA, T.P.; SIMON, I.B. & KAREL, M. - Computer-aided predictions of food storage stability: oxidative deterioration of a shrimp product. J. Food Science. 36:280-286, 1971.a.
- LABUZA, T.P. & HEIDELBAUGH, N.D.; SILVER, M.; KAREL, M. - Oxidation at intermediate moisture content. J. AOCS. 48:86-90, 1971b.

- LEA, C.H. & SWOBODA, P.A.T. - On the antioxidant activity of the flavonols gossypetin and quercetagentin. Chemistry and Industry. 44:1426-1430, 1956.
- LEA, C.H. & SWOBODA, P.A.T. - A new procedure for the determination of volatile carbonylic substances in autoxidizing fats. Chemistry and Industry. 46:974-975, 1958a.
- LEA, C.H. & SWOBODA, P.A.T. - The flavor of aliphatic aldehydes. Chem. and Industry. 1289-1230, 1958b.
- LEA, C.H. - The oxidative deterioration of food lipids. In: Schultz, H.W.; Day, E.A. & Sinhuber, R.O. Symposium on Foods: Lipids and their oxidation. Westport, AVI, 1962, p. 3-28.
- LETAN, A. - The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives. I. Primary Activity. J. Food Science. 31:518-523, 1966a.
- LETAN, A. - The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives. II. Secondary (metal-complexing activity). J. Food Science. 31:395-399, 1966b.
- LEWIS, E.J. & WATTS, B.M. - Antioxidants and copper binding properties of anions. Food Research. 23:274-279, 1958.
- LILLARD, D.A. & DAY, E.A. - The relationship of sensory to chemical methods for measuring the oxidized flavor of milk fats. J. Dairy Science. 44:623-632, 1961.
- LIPS, H.J.; MARSHAL, J.B.; WHITE, W.H. & GRANT, G.A. - Ration biscuits. 5. Effects of kind and concentration of various constituents on keeping quality. Can. J. Res. 27F:419-425, 1949.

- LIU, H.P. - Catalysts of lipid peroxidation in meats. 1. Linoleate peroxidation catalysed by met Mb or Fe(II) EDTA. J. Food Science. 35:590-592, 1970a.
- LIU, H.P. - Catalysts of lipid peroxidation in meats. 2. Linoleate oxidation catalyzed by tissue homogenates. J. Food Science. 5:593-595, 1970b.
- LIU, H.P.; WATTS, B.M. - Catalysts of lipid peroxidation in meats. 3. Catalysts of oxidative rancidity in meats. J. Food Science. 35:596-598, 1970.
- LOGANI, M.K. & DAVIES, S. - Lipid oxidation: biologic effects and antioxidants: A Review. Lipids. 15:485-495, 1980.
- LOURY, M. - Possible mechanisms of autoxidative rancidity. Lipids. 7:671-675, 1972.
- LOVE, D. & PEARSON, A.M. - Lipid oxidation in meat and meat products. A Review. J. AOCS. 45:547-549, 1971.
- LUNDBERG, W.O. - Oxidative rancidity in food fats and its prevention. In: Lundberg, W.O. Ed. Autoxidation and Antioxidants. N. Y., Interscience Publishers, 1962, Vol. 2, p. 451-476.
- LUNDBERG, W.O. - Mechanisms. In: Schultz, H.W.; Day, E.A. & Sinhuber, 2-0. ed. Symposium on Foods: Lipids and their oxidation: Westport, AVI, 1962, p. 31-50.
- LUNDE, G.; LANDMARCK, L.K. & GETHER, J. - Sequestering and exchange of metal ions in edible oils containing phospholipids. J. AOCS. 52:207-210, 1976.
- MARKHAN, K.R. & MABRY, T.J. - Ultraviolet visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In: Harborne, J.B.; Mabry, T.J. & Mabry, H. The Flavonoids. N.Y.; Academic Press, 1975, Vol. 2, p. 45-77.

- McKEOWN, E. & WATERS, W.A. - The oxidation of organic compounds by "Singlet" oxygen. J. Chem. Soc. B. 1040-1046, 1966.
- MARCO, G.J. - A rapid method for evaluation of antioxidants. J. AOCS. 47:594-599, 1968.
- MARCUSE, R. & FREDRIKSON, P. - Fat oxidation at low oxygen pressure. I. Kinetic studies on the rate fat oxidation in emulsions. J. AOCS. 45:400-407, 1971.
- MARCUSE, R. & FREDRIKSON, P. - Fat oxidation at low oxygen pressure. II. Linoleic acid oxidation in emulsions in the presence of antioxidants. J. AOCS. 45:262-268, 1971b.
- MARCUSE, R. & FREDRIKSON, P. - Fat oxidation at low oxygen pressure. III. Studies on linoleic acid oxidation in emulsion in the presence of added salts. J. AOCS. 45:448-450, 1971c.
- MARKLEY, K.S. - Soybean Chemistry and Technology. Brooklin, Chemical Publ. Co., 1944. 261p.
- MARSHAL, W.E. - Health foods organic foods, natural foods. Food Technol. 28:50-60, 1974.
- MELNICK, D. - Absence of thermal polymers in potato chip frying oil. J. AOCS. 34:351-356, 1975a.
- MELNICK, D. - Nutritional quality of frying fats in commercial use. J. AOCS. 34:578-582, 1975b.
- METHA, A.C. & SESHADRY, T.R. - Flavonoids as antioxidants. J. Sci. Research. 18B:25-28, 1958.
- MILLER, E.E. - A simplified method for the evaluation of antioxidants. J. AOCS. 45:91, 1971.

- MORRIS, S.G.; MEYERS, J.S.; KIP, M.L.; RIEMENSHINEIDER, R.W. - Metal deactivation in lard. J. AOCS. 27:105-108, 1950.
- MUSHER, S. - Cereals and seeds inhibit rancidity in lard. Food Industries. 7:167-168, 1935a.
- MUSHER, S. - Inhibiting rancidity: oat flour protects fatty food. Food Industrie. 7:329-331, 1935b.
- NAGEL, R.N.; BECKER, H.C. & MILNER, R.T. - The solubility of some constituents of soybean meal in alcohol-water solutions. Cereal Chem., 15:766-774, 1938.
- NAIN, M.; GESTETNER, B.; KIRSON, I.; BIRK, Y. & BONDI, A. - A new isoflavone from soybeans. Phytochemistry. 12:169-170, 1973.
- NAIN, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; BIRK, Y. & BONDI, A. - Soybean isoflavones: characterization, determination and antifungal activity. J. Agr. Food Chem. 22:806-810, 1974.
- NAIN, M.; GESTETNER, B.; BONDI, A. & MIRK, Y. - Antioxidative and antihemolytic activity of soybean isoflavones. J. Agr. Food Chem. 24:1174-1177, 1976.
- NEIL, J. & PAGE, L. - The effect of antioxidants on frozen ground pork. Food Technol. 10:315-319, 1956.
- OLCOTT, H.S.; MATTIL, H.A. - Antioxidants and the autoxidation of fats. 4. Lecithin as an antioxidant. Oil and Soap. 13:98-102, 1936.
- OVERMAN, A. - Antioxidant effect of soybean flour in frozen pastry. Food Res. 12:365-371, 1947.
- OVERMAN, A. - Antioxidant effect of soy and cottonseed flours in raw pastry mixes and baked mixes. Food Res. 16:39-42, 1951.

- PASCAL, G. - Comparaison des donnés toxicologiques concernant les antioxygènes phénoliques autorisés en alimentation humaine. Rev. Franç. Des corps Gras. 25:239-244, 1978.
- PAVCECK, P.L.; SMALL, G.M. - Inactivation of biotin by rancid fats. J. Biol. Chem. 146:351-354, 1942.
- PERKINS, E.G. - Nutritional and chemical changes occurring in heated fats. A review. Food Technol. 14:508-514, 1960.
- PHILIP, F. - An investigation of the antioxidants in a textured vegetable protein product from soy flour. PhD Thesis. Purdue University W. Lafayette, In., 61p. 1974.
- POLING, C.E.; WARNER, W.D.; MOVE, P.E. & RICE, E.E. The nutritional value of fats after use in commercial deep fat frying. J. Nutrition. 72:109-120, 1960.
- PRATT, D.E. & WATTS, B.M. - The antioxidant activity of vegetable extracts. I. Flavone aglicones. J. Food Science. 29:27-33, 1964.
- PRATT, D.E. - Lipid antioxidant in plant tissues. J. Food Science. 30:737-741, 1965.
- PRATT, D.E. - Water soluble antioxidant activity in soybeans. J. Food Science. 37:322-323, 1972.
- PRATT, D.E. & SANGOR, M.R. - Lipid oxidation and fatty acid changes in beef combined with vegetables and textured proteins. J. An. Diet. Assoc. 64:268-270, 1974.
- PRATT, D.E. & HAMMERSCHMIDT, P.A. - Phenolic antioxidants of dried soybeans. J. Food Sci., 43:556-559, 1978.
- PRATT, D.E. & BIRAC, P.M. - Source of antioxidant activity of soybean and soy products. J. Food Science. 44:1720-1722, 1979.

- PRATT, D.E.; DIPIETRO, C.; PORTEZ, W. & GIFFE, J.W. - Phenolic antioxidants of soy protein hydrolyses. J. Food Science. 47: 24-35, 1982.
- PRATT, D.E.; MILLER, E.E. & TAGA, M.S. - Chia seed as a source of natural antioxidants. J. AOCS, 81:928-931, 1984.
- PRATT, D.E. & MILLER, E.E. - Flavonoid antioxidants in spanish peanuts. J. AOCS. 61:1064,1067, 1984.
- PRICE, M.L. & BUTLER, L.G. - Rapid visual and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. J. Agr. Food Chem. 25:1268-1273, 1977.
- PRYOR, W.A.; STANLEY, J.P. & BLAIR, E. - Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. A suggested mechanism for the formation of TBA reactive materials. Lipids. 11:370-379, 1976.
- RAC, M. & OSTRIC, B. - Les Properties antioxygènes du rosmarin. Rev. Franç. Corps. Gras. 2:796-802, 1955.
- RAWLS, H.R. & VAN SATEN, P.J. - Singlet oxigen and the initiation of fatty acid autoxidation. Tetrahedron Letters 14:1675-1678, 1970.
- RAWLS, H.R. & VAN SATEN, P.J. - Possible role for singlet oxigen in initiation of fatty acid autoxidation. J. AOCS. 47:121-125, 1970.
- RHEE, K.S.; ZIPRIN, Y.S. & RHEE, K.C. - Water soluble antioxidant activity of oil seed protein derivatives in model lipid peroxidation systems of meat. J. Food Sci. 44:1132-1135, 1979.
- RHEE, K.S.; ZIPRIN, Y. & RHEE, K.C. - Antioxidant activity of methanolic extracts of various oil seed protein ingredients. J. Food Science. 46:75-77, 1981.

- RICHARDSON, G.A.; EL-RAFEY, M.S.; LOURY, M.L. - Flavone and flavone derivatives as antioxidants. J. Dairy Science. 30:397-413, 1947.
- RIEMENSCHNEIDER, R.W.; TURER, J.; STIRTON, A.J. - Relative rates of oxidation of unsaturated fatty acids. Oil and Soap. 22:81-83, 1945.
- ROUBAL, W.T.; TAPPEL, A.L. - Polymerization of proteins induced by free radical lipid peroxidation. Arch Biochem. Biophys. 113:150-155, 1966.
- ROUBAL, W.T. - Free radicals, malonaldehyde and protein damage in lipid-protein systems. Lipids. 6:62-64, 1971.
- SANGOR, M.R. & PRATT, D.E. - Lipid oxidation and fatty acid changes in beef combined with vegetable protein. J. Am. Diet. Assoc. 64:268-270, 1974.
- SASTRY, Y.S.R. & LAKSHMINARAYANA, G. - Chlorophyll-sensitized peroxidation of saturated fatty acid esters. J. AOCS. 48:452-454, 1971.
- SATTAR, A. & DE MAN, J.M. - Stability of edible oils and fats to fluorescent light irradiation. J. AOCS. 53:473-477, 1976.
- SCOTT, W.J. - Water relations of food spoilage microorganisms. Advances in Food Research, Vol. VII. Academic Press, N.Y., 1957.
- SCOTT, G. - Atmospheric oxidation and antioxidants. NY Elsevier Publishing Co., NY, 1965, 528p.
- SHERWIN, E.R. - Methods for stability and antioxidant measurement. J. AOCS. 44:632A-649A, 1968.
- SHERWIN, E.R. - Antioxidants for vegetable oils. J. AOCS. 53:430-436, 1976.

- SHERWIN, E.E. - Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. J. AOCS. 55:809-814, 1978.
- SHULER, P. - Autoxidation of fats and its prevention with antioxidants. Basel, F. Hoffmann La Roche & Co., 1980, 6p.
- SIMS, R.J.; FIORITI, J.A. & NANUK, M.J. - Sterols additives as polymerisation inhibitors for frying oils. J. AOCS. 49:298-301, 1972.
- SIMPSON, T.H. & URI, N. - Hydroxyisoflavones as inhibitors of the aerobic oxidation of unsaturated fatty acids. Chem. Ind. 44: 956-957, 1956.
- SMITH, A.K.; JOHNSEN, V.L. & PERGES, R.E. Denaturation of soybean protein with alcohols and with acetone. Cereal Chem. 28:325-233, 1951.
- SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. Soybean: Chemistry and technology. AVI Publishing Co. Westport, Co. 1972. Vol. 1. 470p.
- STAHL, E. - Thinlayer chromatography: a laboratory handbook. N.Y. Academic Press Inc., 1965. 552p.
- STUKEY, B.N. - Antioxidants. In: Schultz, H.W. Day, E.A. & Sinhuber, E.O. Ed. Symposium on Foods: Lipids and their oxidation. Westport. AVI, 1962, p. 139-149.
- SYLVESTER, N.D.; LAMPITT, L.H. & AINSWORTH, A.N. - Determination of the stability of oils and fats. J. Soc. Chem. Ind. 61:165-169, 1942.
- SWERN, D. - Primary products of olefinic autoxidation. In: Lundberg, W.O. Autoxidation and antioxidants. N.Y. Interscience Publishers, 1961, Vol. 1, p. 1-54.

- SWERN, D.; SCALAN, J.T. & KNIGHT, H.B. - Mechanism of the reactions of oxygen with fatty materials: advances from 1941 through 1946. J. AOCS. 25:193-202, 1948.
- SWERN, D. - Bailey's industrial oil and fat products. N.Y., Interscience Publishers, 1964. 1103p.
- SWIFT, C.E.; DOLLEAR, F.G.; BROWN, L.E. & O'CONNOR, R.T. - Decomposition of methyl hydroperoxide oleate. J. AOCS. 25:39-45, 1948a.
- SWIFT, C.E. & DOLLEAR, F.G. - The oxidation of methyl oleate. II. Reaction between methyl hydroperoxide oleate and oleic acid. J. AOCS. 25:52-58, 1948.
- SWIFT, C.E. O'CONNOR, R.T. BROWN, L.E. & DOLLEAR, F.G. - The aldehydes produced during autoxidation of cotton seed oil. J. AOCS. 26:297-305, 1949.
- TAKAGI, T. & IIDA, T. - Antioxidant for fat and oils from canary seeds: Sterol and triterpene alcohol esters of caffeic acid. J. AOCS. 57:326-330, 1980.
- TAPPEL, A.L. - Studies on the mechanism of vitamin E action. III. In vitro copolymerization of oxidized fats with protein. Arch. Biochem. Biophys. 54:266-280, 1955.
- TAPPEL, A.L. - Biocatalysts: Lipoxidase Hematin Compounds. In: Lundberg, W.O. Ed. Autoxidation and Antioxidants. N.Y., Interscience Publishers, 1961, Vol. 1, p. 325-366.
- TAPPEL, A.L. - Hematin compounds and lipoxidase as biocatalysts. In: Schultz, H.W.; Day, E.A. & SINHUBER, E.O. Ed. Symposium on Foods: Lipids and their oxidation. Westport, AVI, 1962, p. 122-138.

- WALZ, E. - Isoflavone and saponin glucosides in soya hispida. Jus Lieigs Annal Chem. 499:118-155, 1931.
- WATERS, W.A. - Process in the oxidation of hydrocarbon fuels. Trans. Faraday Soc. 42:281-283, 1964.
- WATERS, W.A. - Kinetics and mechanism of metal-catalysed autoxidation. J. AOCS. 48:427-433, 1971.
- WENDEMEYER, G.A. & DOLLEAR, A.M. - Cooxidation of the sulfur containing aminoacids in a autoxidizing lipid system. J. Food. Sci. 28:537-543, 1963.
- WHITTERN, C.C.; WILLER, E.E. & PRATT, D.E. - Cottonseed flavonoids as lipids antioxidants. J. AOCS. 61:1075-1078, 1984.
- WHITLOCK, C.B. & NAWAR, W.W. - Thermal oxidation of mono-insaturated short chain fatty acids. I. Ethyl-3-hexenoate. J. AOCS. 53:586-591, 1976.
- WILLS, E.D. - Biochem. Pharmacol. 7:7, 1961. "APUD" Wills, 1966.
- WILLS, E.D. - Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. Biochem. J. 99:667-676, 1966.
- WILLS, E.D. & WILKINSON, A.E. - Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation on lipid peroxide formation to enzyme release. Biochem. J. 99:657-666, 1966.
- WITTING, L.A.; NISHIDA, T.; JOHNSON, O.C. & KUMEROW, F.A. - The relationship of piridoxine and riboflavine to the nutritional value of polymerized fats. J. AOCS. 34:421-426, 1957.
- WITTING, L.A.; CHANG, S.S. & KUMEROW, F.A. - The isolation and characterization of polymers formed during the autoxidation of ethyl linoleate. J. AOCS. 34:470-473, 1957.

- TAPPEL, A.L. & CHIO, K.S. - Biochemistry. 8:2927, 1969. "APUD"
Wills, E.D., 1966.
- TEETER, H.M.; GASTIL, E.; BELL, E.W.; SCHNEIDER, W.S. & COWAN, J.
C. - Investigation on the bitter and beany components of soy-
beans. J. AOCS, 32:390-397, 1955.
- TERAO, J. & MATSUSHITA, S. - Products formed by photensitized oxi-
dation of unsaturated fatty acid esters. J. AOCS. 54:234-238 ,
1977a.
- TERAO, J. & MATSUSHITA, S. - Structures of monohydroperoxides pro-
duced from chlorophyl sensitized photooxidation of methyl lino-
leate. Agr. Biol. Chem. 41:2466-2463, 1977b.
- TERAO, J. & MATSUSHITA, S. - Reactivities and products in photosen-
sitized oxidation of unsaturated triglycerides, Agr. Biol. Chem.
42:667-668, 1978.
- TERAO, J. & MATSUSHITA, S. - Inhibitory effects of tocopherols and
-carotene on singlet oxygen initiated photooxidation of me-
thyllinoleate and soybean oil. J. Food Process. Pres. 4:79-
-83, 1980.
- TSEN, C.C. & COLLIER, H.B. - The protective action of tocopherol
against hemolysis of rat erythrocytes by dialuric acid. Can J.
Biochem. Physiol. 38:957-964, 1960.
- WALTER, E.D. - Genistin (an isoflavone glucoside) and its agluco-
ne, genistein, from soybean. J. Am. Chem. Soc. 63:3272-3276,
1941.
- WALL, M.E.; KELLY, E.G. - Stability of carotene and vitamin A in
dry nutrients. Ind. Eng. Chem. 43:1146-1150, 1951.

WOLF, V.S. - Soybean as a food source. CRC Press. Cleveland, Ohio, 1971, 86p.

WONG, E. - Detection and estimation of oestrogenic constituents in red clover. J. Sci. Food. Agr. 13:305-308, 1962.

URI, N. - Physico-Chemical aspects of autoxidation; Mechanisms of Autoxidation. In: Lundberg, W.O. Ed. Autoxidation and Antioxidants. Interscience Publishers, 1961, Vol. 1, p.55-106; 133-169.

USUKI, R. & KANEDA, T. - Bitter taste of oxidized fatty acids. Agr. Biol. Chem. 44:2477-2481, 1980.

ZEILS, N.W. & SCHMIDT, W.H. - Catalytic effect of metals and light on fat and oils. Oil and Soap. 22:327-330, 1945.

ZIRLIN, A. & KAREL, J. - Oxidation effect in a freeze-dried gelatin-methyl linoleate system. J. Food Sci. 34:160-164, 1969.